

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790735

研究課題名（和文） 周期性発熱を伴う高 IgD 症候群における代謝異常と発熱の解明

研究課題名（英文） Clarification of metabolic disorder and fever in hyper IgD syndrome

研究代表者

成戸 卓也（NARUTO TAKUYA）

熊本大学・エイズ学研究センター・非常勤研究員

研究者番号：60438124

研究成果の概要：自己炎症症候群を疑う患者の同意を得て末梢白血球からの核酸抽出、MVK シグナル塩基配列領域の増幅しシーケンス解析した。この自己炎症症候群を疑う患者のなかでメバロン酸の高値を伴う患者を見出し塩基配列解析の結果、新たに 1 例目と同じ変異を持つ新たな高 IgD 症候群の家系を見出した。このため G326R 変異は日本で潜在していることが推察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	330,000	2,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学・小児科学

キーワード：自己炎症症候群、高 IgD 症候群、メバロン酸、MVK、代謝性疾患

1. 研究開始当初の背景

周期性発熱を伴う高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ(MK)をコードする MVK 遺伝子の突然変異により引き起こされるものである。活性が 1～2 割ほどに低下することが周期性発熱を伴う高 IgD 症候群を引き起こすが、MK の活性が完全消失するとメバロン酸尿症を引き起こし違う症状を呈する。しかし、発熱時には尿中のメバロン酸が高値を示し、発熱の原因であることが示唆される。しかしながら現在のところメバロン酸の代謝異常と発熱を伴う炎症との関連について不明である。このため炎症病態における代謝

異常症の関係についての研究が望まれている。

IgD は各免疫グロブリンの中で最も量が少ないもので生理学的意義もいまだ未解明であり、なぜ高値を呈するのかも不明である。

これまで多くの生物のゲノム配列が明らかにされ、配列情報は飛躍的に充実したにもかかわらず、すべての生体物質の代謝経路が解明された生物はいない。メバロン酸は脂質代謝経路として重要な経路であるが、高 IgD 症候群においてコレステロール、トリグリセライド等はメタボリックシンドロームのように脂質代謝の異常は特に認められない。

2. 研究の目的

高 IgD 症候群を引き起こすメバロン酸キナーゼの活性低下は現在のところメバロン酸の代謝異常と発熱を伴う炎症との関連については不明である。このため炎症病態における代謝異常症の関係について検討した。

自己炎症症候群を疑う患者の同意を得て末梢白血球からの核酸抽出、シグナル塩基配列領域の増幅、シグナル塩基配列をシーケンス解析した。高 IgD 症候群との鑑別のため家族性地中海熱、TNF 受容体関連周期性発熱症候群、CINCA 症候群の塩基配列解析も併せて行った。

3. 研究の方法

(1) 蓄尿によるメバロン酸の測定

液体クロマトグラフィーによるメバロン酸の測定を行った。メバロン酸を強酸性条件化でデヒドロメバノラクトンに変化させ、その UV 吸収を測定することにより定量した。

(2) 遺伝子解析

臨床症状と検査値より高 IgD 症候群を疑う患者における MVK 遺伝子の全エクソンをシーケンス解析した。

末梢白血球からの核酸抽出

末梢血を EDTA 採血管に 5ml 採取し、検体コードをラベルした。常温で保存後、QIAamp DNA Blood Mini Kit および RNeasy Mini Kit を用いて、核酸を抽出した。抽出した核酸は TE バッファーに溶解後、核酸量を分光光度計を用いて測定し、専用の保存箱に収納し-60 以下で冷凍保存した。

シグナル塩基配列領域の増幅

抽出した核酸を各プライマーセットを用いて、PCR により 94 2min、(94 30sec、55 30sec、72 30sec) 30 サイクル、72 3min の条件下で増幅した。増幅した PCR 産物は、

1.2%アガロースゲル上に電気泳動を行い増幅塩基長を確認した。その後、増幅 PCR 産物は、専用の保存箱に収納し-20 以下で冷凍保存した。

シグナル塩基配列の解析

で得られたシグナル塩基配列を含む PCR 産物の塩基配列解析のため、精製後に ABI 3730 DNA Analyzer でシーケンス解析した。

(3) サイトカインプロファイル

各患者の発熱期と無熱期のサイトカインプロファイルを BD Cytometric Bead Array (CBA) 法を用いて IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、TNF、IFN を同時に測定した。

(4) メバロン酸蓄積の炎症解析

末梢白血球より分離した単球を用いメバロン酸添加時とシンバスタチン添加時のサイトカインの mRNA 発現と細胞内タンパク発現により比較した。

・研究内容の倫理面への配慮

本研究では直接ヒト検体の解析を行うためには倫理委員会に申請を行い、患者の同意を得て施行した。

4. 研究成果

(1) 蓄尿によるメバロン酸の測定

自己炎症症候群を疑う患者のなかでメバロン酸の高値を伴う患者を 2 例見出した。

(2) 遺伝子解析

塩基配列解析の結果、2 例とも同じ変異を持つ新たな高 IgD 症候群の家系を見出した。このためホモ G326R 変異は日本で潜在していることが推察された。この G326R 変異は既にヘテロで報告があり、またメバロン酸が蓄積していることからメバロン酸キナーゼの活性が低下していると推察された。

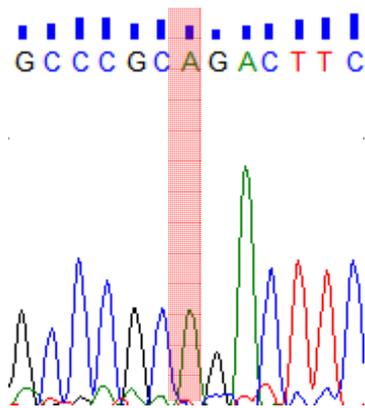


図 1. 患者のシーケンス波形

G > A に塩基置換しており G326R の変異と同一した。

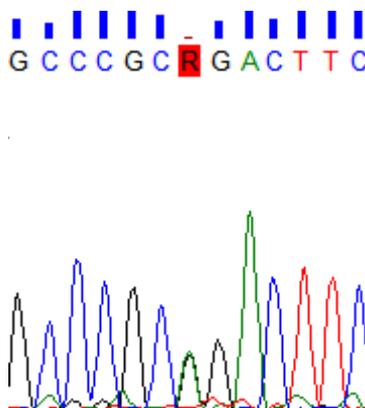


図 2. 患者の両親のシーケンス波形

父親、母親とも G と A の混合塩基から G326R のヘテロの変異と同一した。

(3) サイトカインプロファイル

サイトカインプロファイルの解析により血清中の IL-1 の産生上昇は顕著でなかったが炎症性サイトカインのうち IL-6 が極度に上昇していた。

	無熱期	有熱期
IL-1β	0.00	3.91
IL-6	2.99	94.08
IL-8	119.95	20.94
IL-10	1.53	2.13
TNFα	0.00	1.54
IFNγ	0.00	2.82

表 1. 患者のサイトカインプロファイル(単位

pg/ml)

(4) メバロン酸蓄積の炎症解析

末梢白血球より分離した単球を用いメバロン酸添加時とシンバスタチン添加時のサイトカインの mRNA 発現と細胞内タンパク発現により比較したところ、発現に有意差は認められなかった。

高 IgD 症候群に特徴的なサイトカインプロファイルは見いだせなく、

- ・ 3~7 日の発熱を 6 カ月以上繰り返す。
- ・ 血清 IgD 値が 100 IU/ml (約 14mg/dl) 以上の高値を示す。
- ・ ワクチン接種などにより発熱がはじまる。
- ・ 発熱以外の症状としては、頸部リンパ節腫脹、頭痛、関節痛・関節炎、腹痛、下痢、嘔吐、発疹等を伴う。

上記の臨床所見に加え有熱期の尿中または血中のメバロン酸測定および MVK 遺伝子の検索が本疾患の診断に結びつくことが示された。

また、サイトカインプロファイルを比較したところ、IL-6 が著明に増加しているため治療の方法とし IL-6 遮断療法が選択として考えられる。

本研究においてヨーロッパで多く報告されている高 IgD 症候群が本邦にも存在し、自己炎症症候群の鑑別に考慮する必要があることを示した。メバロン酸の蓄積が炎症にどうかかわるかは直接的に解決し得なかったが、今後さらに詳細に解析する必要があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

成戸卓也、高 IgD 症候群の MVK 遺伝子異常と新しい治療法の導入、日本臨床免疫学会会誌 30 巻 2 号 Page86-89(2007)
査読:無

Naruto T, Nakagishi Y, Mori M, Miyamae T, Imagawa T, Yokota S. Hyper-IgD syndrome with novel mutation in a Japanese girl. Mod Rheumatol. 2009;19(1):96-9. 査読:有

[学会発表] (計 1 件)

成戸卓也、高 IgD 症候群、第 29 回日本炎症・再生医学会、2008 年 7 月 10 日、東京

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

成戸 卓也 (NARUTO TAKUYA)

熊本大学・エイズ学研究センター・非常勤研究員

研究者番号 : 60438124

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者