

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670496

研究課題名(和文) 発病前検体を用いた網羅的DNA/RNA解析による川崎病の病原体の同定

研究課題名(英文) Comprehensive DNA/RNA analysis of Kawasaki disease before the onset of symptoms

## 研究代表者

小島 勢二 (Kojima, Seiji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20313992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病の病因は未だ不明である。我々は、最近、川崎病発病時のCD4+CD25+Foxp3+制御性T細胞(Treg)が極度に減少していることを発見した。一方、従来の研究では、川崎病発病時の30%の患児から市中感染でしばしばみられる病原体が検出される。以上から、川崎病の発病以前に、Tregを減少させる感染症が起こり、さらに川崎病の発症には第2の感染症が関わるとの仮説を持つにいたった。しかしながら、この仮説に基づいて、収集できた発病前あるいは発病直後と考えられる4検体について全DNA/RNA解析を行ったが、いずれについても病原体の確定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Despite the long history since the discovery of Kawasaki disease, its molecular pathogenesis still remains to be elucidated. In our previous study, we showed that at the very beginning of Kawasaki disease, CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells were significantly decreased. Additionally, several epidemiological evidence suggests the requirement of infection for the development of Kawasaki disease. Based on these concepts, we hypothesized that an initial infection of unknown pathogen decreases T regulatory cells and the second infection of a common pathogen triggers Kawasaki disease onset. Based on this hypothesis, we planned to perform comprehensive DNA/RNA analysis of clinical specimen obtained before the diagnosis of Kawasaki disease. We successfully collected four clinical specimens obtained before the fulfillment of diagnostic criteria; however, we could not identify any pathogenic genomic sequences among these specimens.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 次世代シーケンス 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

川崎病は、各国における発症頻度が大きく異なる疾患であるが、本邦では世界中で最も高い頻度で発症する。本疾患の解明は、本邦における臨床的な意義のみならず、症例数の多さから、研究的な役割も大きく期待されている。

川崎病研究の最大の障害は、川崎富作博士の報告以来半世紀が経過したにもかかわらず、病因が不明な点である。さまざまな疫学情報からは感染症の関与が示唆される。我々は、最近、川崎病発病時の CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞(Treg)が極度に減少していることを発見した。一方、従来の研究では、川崎病診断時の 30%の患児から市中でしばしばみられる病原体が検出される。以上から、川崎病の発病以前に、Treg を減少させる何らかの感染症が起こり(イベント 1)、さらに川崎病の発症には第 2 の感染症が関わる(イベント 2)との仮説をもつに至った。

今回の研究の目的は、BCG 接種部位の発赤・腫張を手がかりに川崎病の発病前の検体と診断確定時に採取した検体を対象に、次世代シーケンサーを用いて網羅的な全 DNA/RNA の解析をおこない、既知あるいは未知の病原体を同定して、上記の仮説を証明することである。

## 2. 研究の目的

わが国では、年間 1 万人以上の小児が川崎病に罹患している。大量免疫グロブリン静注療法(IVIg)等の治療法の開発により、死亡例や冠動脈瘤を含む重篤な合併症が減少したとはいえ、川崎病のわが国の小児医療における重要性は極めて高い。川崎病においては特異的な診断法が存在せず、その診断が 5 日以上の発熱を含む非特異的な診断基準によるために、発症早期に治療を開始できない。また、診断基準を満たさない不全型に対しては有効な治療がおこなわれず、冠動脈瘤等の後遺症を残す危険性が高まることが確認されている。

川崎病の診断における最大の問題点は、川崎富作博士による報告からすでに半世紀経過したにもかかわらず、その病因が不明なことである。乳幼児の発症、季節性の変動、地域的な集積、同胞内発症等の疫学的観察から、何らかの感染症が関与する可能性が高く、これまでも多くの病原体に関する報告があるが、追試で確認できた報告はない。川崎病と診断された患者の 30%において、感染症が合併していることが報告されているが(Pediatrics, 2005)、検出された病原体は市中でよく検出されるものが多く、これらの感染症だけが原因で川崎病が発病するとは考え

にくい。CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞(Treg)は、自己免疫疾患、感染症、腫瘍性疾患等、多様な病態に関与する細胞である。我々は、川崎病診断時の末梢血における Treg の絶対数は健常人と比較して減少しており、とりわけ IVIg 治療に抵抗性の川崎病の患児においては、検出限界以下と著減していることを発見した。さらに発症時の Treg を測定することで、IVIg に対する治療反応を予測することが可能であった(Hirabayashi Y, Kojima S, Eur J Pediatr 2013)。

これまで数々のウイルス感染症で Treg の動態が研究されており、ウイルスの初期感染、あるいは持続感染により、Treg が減少し、宿主の免疫、炎症反応が修飾を受けることが知られている(Immunol Rev, 2013)。以上の知見から、我々は、川崎病の発熱で規定される第 1 病日以前に、何らかのウイルスに罹患して Treg が減少している可能性を考えるに至った(第 1 のイベント)。Treg が減少し、炎症や免疫反応をコントロールできない状況で、新たなイベントが起こると強い炎症が惹起され、全身性の血管炎、すなわち川崎病が発症すると考えられる。

川崎病においては、これまでも、種々な感染症の関与が報告されているが、第 2 のイベントは特定の病原体で惹起されるのではなく、種々の病原体がその発症に関与するのかもしれない。この仮説を検証するために、本研究では川崎病の発病以前と診断確定時に次世代シーケンサーを用いて網羅的な DNA/RNA の解析を行い、ウイルスの同定を試みる。

川崎病において、Treg の減少を指標に、上記の新しいアイデアと手法でもって病原体の同定を試みた報告は世界的にもみられない。川崎病の病原体が発見されれば、発症早期に正確な診断をおこなうことが可能になり、ワクチンの開発など、予防も可能となる。

## 3. 研究の方法

本研究の対象となる患児は、BCG 接種部位の発赤・腫張を含む訴えで受診して、担当医が川崎病の可能性を考え患者である。日常診療のなかで、川崎病以外の疾患で BCG 接種部位の発赤や腫張をみることは極めて稀である。BCG 接種部位の発赤や腫張が見られる例はとりわけ 1 歳未満の乳児では頻度が高く、しばしば、発熱などの診断基準に含まれる症状に先行して現れる場合がある。当然ながら、BCG 接種部位が発赤・腫張した患児のすべてが川崎病を発症するわけではないが、高率に川崎病を発症することが予想される。川崎病の診断基準に含まれる発熱などの症状がみられない時点で採血すれば、川崎病の第 1 病日以前の検体を得ることができる(第 1 のイ

イベント)。これまでの川崎病の病原体をめぐる研究は、診断基準を満たした第5病日以降の検体を対象としており、今回のような発病前の検体から、病原体の検出を試みた報告はみられない。次に発熱がみられ、第5病日以降の診断基準を満たした時点で再度検体を採取する(第2のイベント)。すなわち、BCG接種部位の発赤・腫張を訴えて受診した患児のうち、患者家族から本研究への参加の同意が得られた場合に、臨床検査に必要な血液を採血すると同時に本研究用に2~3mlの末梢血を採取する。サイトカイン測定用に血漿を凍結保存し、末梢血単核球分離をし、Tregの測定とDNA/RNA抽出、保存をおこなう。5日以上発熱が続き、診断が確定した時点で再度、同量の検体を採取する。経時的に病原体の検出を試みることで、それぞれ、第1のイベント、第2のイベントに関わる病原体の検出が可能となる。

川崎病の検体は、名古屋大学医学部附属病院をはじめ、愛知県内の関連施設から収集する。関連病院における川崎病の新規発症数は、2010年が665人、2011年が573人、2012年が606人であり、研究期間内に目標とする20検体の採取は可能と考える。発症前と診断確定後の検体について、全DNA/RNA解析によって、既知、あるいは未知の病原体の検出を試み、第1、第2のイベントの原因となる病原体を同定する。

近年の次世代シーケンサーの進歩により、微生物(細菌、ウイルス、真菌)のゲノムを含むDNAやRNAの配列を直接読み取ることによって、既知の微生物はもとより、未知の微生物も検出できる環境が整った。この方法は、微生物の分離や培養を必要としない。これまで、川崎病に対して、微生物に関する検討は行われているが、原因微生物は同定されていない。これまでの研究で、病原体が発見されなかった原因として、診断確定時には、すでに病原体は生体の免疫反応により駆逐された可能を考えている。これを克服するために、発病前の検体を検索の対象とする。また、これまでとは異なる次世代シーケンサーによる強力な病原体の検出法を利用することによって、病原体の検出に挑戦する。我々の研究室では、次世代シーケンサーを用いて複数の血液・腫瘍性疾患における新規遺伝子を発見しており、パイオインフォーマティクスを始め、次世代シーケンサーによる研究体制は整備されている(Sakaguchi H, Okuno Y, Kojima S, Nature Genetics 2013)。

末梢血単核球よりDNAとRNAを抽出し、それぞれ次世代シーケンサーで全DNA/RNAを網羅的に解読する。ヒト由来の配列を除去した後、既知病原体と未知病原体の塩基配列を検索することにより、病原体の同定をおこなう。次世代シーケンスはHiSeq 2500 (Illumina)

で行い、スーパーコンピュータを使用して解析する。当研究室は以前より次世代シーケンサーを用いた解析をおこなっており、サンプルの調製や、次世代シーケンサーの扱い、あるいはその後のデータ解析に習熟している。In-houseで独自の解析プログラムを作ることにも十分な経験があり、滞りなく解析を進めることができる。

#### 4. 研究成果

研究計画について、名古屋大学医学部の倫理委員会で承認を得た。名古屋大学医学部附属病院の関連病院においても、各施設の倫理委員会で承認を得て、検体の収集を開始した。名古屋大学医学部附属病院の関連病院のうち、多数例の川崎病を診療している病院のほとんどを含む研究体制を構築した上に、川崎病に関わる別の臨床研究(治療法に関する研究)とも連携し、万全の研究体制を整えることができた。しかしながら、川崎病の診断基準を満たす前の検体の収集は、受診のタイミングなどの問題で、期待する検体数を収集することができなかった。

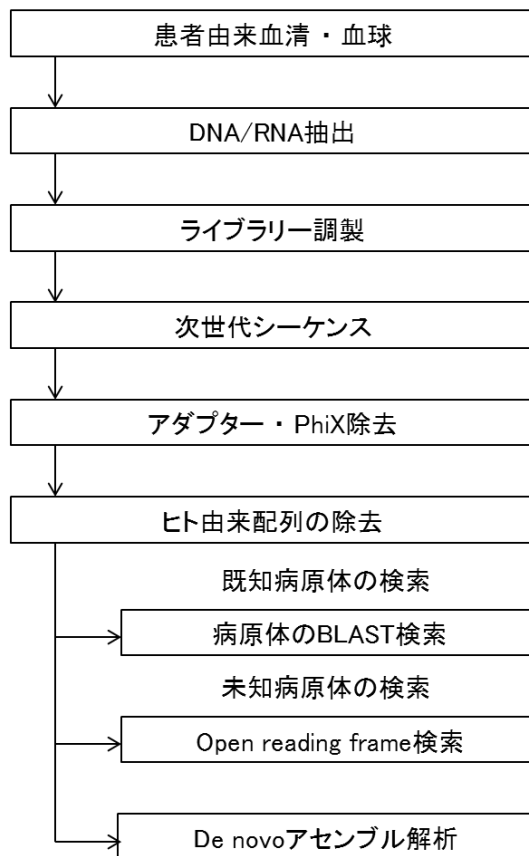
非特異的所見、すなわち持続する発熱などで受診する患児のうち、川崎病が考えられる患児の割合を推定する情報が存在しておらず、地域の小児人口に期待する形で研究を開始したが、地域コホートからは十分な検体数を確保できなかった。これを解決するためには、数倍の人口を持つコホートの確立が必要である。すなわち、東海地方全域などの研究体制が必要となると考えられる。

収集した検体のうち、発病前・あるいは発病直後と考えられる4検体について全DNA/RNAシーケンス解析を行った。NEBNext Ultra DNA Prep Kit for Illumina、並びにNEBNext Ultra RNA Prep Kit for Illumina (New England Biolabs)を用いてサンプル調製を行い、HiSeq 2500による次世代シーケンスを行った。以下の解析は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピューティング資源を用いて行った(図1)。

得られた配列のうち、まず、次世代シーケンス解析のアーティファクトと考えられる配列を除外した。すなわち、シーケンス反応に必要なアダプター配列、並びにコントロールとして用いられるPhiX174由来の配列を除去した。その後、ヒト由来の配列を、ヒトゲノム (NCBI GRCh37: [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/))、並びにBLASTデータベースに存在するヒト由来の情報と照合し、これを除去した。全体のリード数のうち、99%はこの工程で除去された。

残存するリードについて、既知病原体と考え

図1 解析の流れ



られるものの検出を試みた。BLAST データベースに登録された全ての配列に対してマッチングを行い、全長に渡って一致する配列を抽出した。しかしながら、唯一検出された病原体は土壌に生息することが確認されている、人体に無害で感染も確認されていない細菌のみであった。この菌は2つの検体で検出されていたことから病態への関与が期待されたが、のちに他の疾患におけるDNA解析でも同じ菌が検出されていることが判明した。検体にこの菌が含まれることとなった経緯は不明であるが、いずれにせよ、この菌は川崎病に特異的に関与するとはいえない結果であった。

アーティファクト、ヒト由来配列、既知細菌由来配列など、由来の決定できる配列を除去した後に、未知病原体の検出を試みた。まず、リード配列の150塩基をアミノ酸に翻訳し、配列から機能性の蛋白が予測できるかを検討した。しかしながら、全長に渡って終止することなくアミノ酸配列に変換することができた配列はわずかであり、その中で機能ドメインなど、意味のあるアミノ酸配列を構成するものは検出されなかった。すなわち、既知病原体の構成蛋白との類似性に基づいて、未知病原体を検出する試みは成功しなかった。

由来不明の配列を de novo アセンブルして、長い遺伝子配列を構成する試みを行った。す

なわち、SOAPdenovo、Velvet、CAP3等の既存のソフトを用いて、長い配列を構成し、そこに遺伝子を予測することができるかを検討した。しかしながら、由来不明の配列の多くは、1~30塩基程度の繰り返しを含む配列であり、生物学的には、これらはヒトゲノムの未知・あるいは既知のマイクロサテライト由来の配列であると推定することができた。すなわち、de novo アセンブルにもとついて、未知病原体を検出する試みもまた、成功しなかった。

システムの欠陥から、病原体が検出されないという可能性を否定するため、既知病原体(HHV-6、HCV等)を含むDNAの解析を同様のパイプラインで行い、システムを検証した。その結果、我々のシステムにおいては、DNAウイルスについては既報のシステムと同様の感度で検出できる上、RNAウイルスについては既報のシステムと比較して100倍以上の感度で血清からの検出が可能であることが明らかとなった。

これまでに検討を行った例数は少数であり、一部はこの研究目的に保存されていたものでなく、わずかな検体について新たな同意を得たうえで解析したものである。すなわち、症例数、あるいは検体量といった制限が、今回の結果につながった可能性がある。今後、検体の収集を行い、解析を進めることで、成果が得られるものと考えられた。

我が国の小児科医が発見した病気で、川崎病ほど世界にインパクトを与えた疾患はみられない。川崎富作博士の報告から半世紀が経過し、しかも、わが国では毎年1万人以上も発病しているのに、その病因が発見されていない。病原体が判明すれば、診断基準が満たされるまで待つことなく、早期の治療介入が可能となる。さらに、病原体が発見されれば、ワクチンの開発が可能となり、本症を予防する道が開けるであろう。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小島 勢二 (KOJIMA, Seiji)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20313992

##### (2) 研究分担者

奥野 友介 (OKUNO, Yusuke)

名古屋大学医学部附属病院・先端医療・  
臨床研究支援センター・特任講師  
研究者番号：00725533  
加藤 太一 (KATO, Taichi)  
名古屋大学医学部附属病院・小児科・講師  
研究者番号：20422777