

**日本川崎病学会研究小委員会活動報告**  
**多施設共同による川崎病の遺伝的要因に関する研究（川崎病遺伝コンソーシアム）**

尾内善広<sup>1)</sup>，小林 徹<sup>2)</sup>，関 満<sup>3)</sup>，浅見雄司<sup>4)</sup>，阿部 淳<sup>5)</sup>

- 1) 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学
- 2) 国立成育医療研究センター臨床研究開発センター開発企画部
- 3) 自治医科大学小児科学
- 4) 群馬県立小児医療センター循環器科
- 5) 国立成育医療研究センター高度先進医療研究室

## 要約

川崎病は感染を含む環境要因と遺伝や年齢など個体側の要因が複雑に関与する多因子疾患であり，発症や重症化に関連する遺伝子のバリエーションの情報はそれらが関与するメカニズムの解明に有用な情報であることが先行研究で示されつつある．今後病因の謎の解明や精密医療をさらに実現に近づけるためには，臨床情報を組み合わせて実施する遺伝的要因分析が重要であり，世界でも罹患率が高い日本で主導すべき課題であるとの認識のもと，我々は川崎病遺伝コンソーシアム（Japan Kawasaki Disease Genome Consortium; JKDGC）を組織し，2012年から川崎病患児のDNA試料と臨床情報の収集を行っている．2019年6月末時点で48施設が参加，2093人からの試料が収集済みであり，これらの一部を用いた遺伝疫学研究の成果も出始めている．現在試料・情報の収集を継続しつつ層別化した患者サブグループ間のゲノムワイド関連解析に着手しており，川崎病の謎の解明や精密医療，予防法や新規治療法の開発に資する知見を世界に向け発信していきたいと考えている．

### 1. 目的

川崎病患児やその家族のDNA試料，臨床情報を多施設共同で収集する体制を構築，得られた試料・情報を用いた遺伝疫学研究を実施するとともに将来の川崎病研究の貴重な資源として継承していくこと．

### 2. 方法

#### (1) 参加施設

学会等でJKDGCへの参加啓発を行い，趣旨に賛同する施設に対し，倫理審査等の参加に必要な手続きをサポートする．すべての参加施設は，倫理審査委員会による承認済みである．

#### (2) 試料収集

文書を用いた説明を受けた保護者の代諾の下，患児より約2.0mlの採血を行った．得られた血液試料が入った匿名化ID付き採血管を，外部委託業者（SRL）に送り，DNAを抽出した．

#### (3) 研究デザイン

理化学研究所および千葉大学公衆衛生学を中心に川崎病罹患感受性遺伝子に関するケースコントロール研究が国内・国際共同研究として進行しており，JKDGC試料を川崎病患

者群の一部として解析した．また巨大冠動脈瘤症例，頻回罹患同胞例家族については，稀で特異なこれら表現型への関与を想定する遺伝的要因の検索をそれぞれ，全エクソーム解析，全ゲノムシーケンス解析により行った．また発症時年齢等の患者属性，検査データなどの連続変数と関係する遺伝子座のゲノムワイド検索を属性の違いにより層別化したケースコントロール解析やQTL解析におこなう．

#### (4) 遺伝子解析方法

インベータ法，直接シーケンス法によりバリエーションの検出，遺伝型の決定を実施した．全エクソーム解析および全ゲノムシーケンス解析は次世代シーケンサー（HiSeq2000および2500）にて実施した．ゲノムワイドのSNVタイピングにはイルミナ社のAsian Screening Arrayを用いて実施中である．

#### (5) 関連解析

$\chi^2$ 検定，Fisher正確確率検定，ロジスティック回帰分析により行った．

### 3. 結果

#### (1) 参加施設

令和元年6月末時点で，48施設が倫理委員会の承認のもと，参加している．

#### (2) 試料収集

令和元年6月末日時点で2093検体が収集されている。

(3) JKDGC 収集試料を用いた川崎病関連遺伝子研究

(ア) *ORAI1* 遺伝子のバリエントと川崎病との関連に関する研究

(a) 集団内にありふれたバリエント

Onouchi らが同胞罹患例を対象に実施した全ゲノム連鎖解析において、連鎖の傾向を示した12番染色体長腕上の候補として、*ORAI1* 遺伝子に注目し、比較的頻度の高い遺伝子領域(14キログラム塩基)内のバリエントを94人の川崎病患者の検索で見出し、それらと川崎病との関連をJKDGC参加施設の既採取試料を含む川崎病患者2544人、対照者2432人を用いて解析した。その結果、欧米人にはみられず、日本人におけるアレル頻度が最も高い非同義一塩基バリエント(SNV)(表1)と、一般集団中のアレル頻度が0.1%に満たない稀なインフレーム挿入バリエント(表2)が川崎病との関連が見出された。

患者対照パネル	AA	AG	GG	合計	アレル頻度	オッズ比 95%信頼区間	P値
1	川崎病	444	252	33	729	0.22	1.19
	対照	867	398	50	1315	0.19	1.02-1.40
2	川崎病	1172	577	64	1813	0.19	1.22
	対照	760	311	26	1097	0.17	1.06-1.40
1+2						1.21	0.0041
						1.09-1.34	

表1 rs3741596 A/G と川崎病の関連

	野生型 ホモ接合	ヘテロ接合	6塩基挿入 ホモ接合	合計	アレル頻度	オッズ比 95%信頼区間	P値
川崎病	2528	16	0	2544	0.0031	3.8	0.012
対照	2410	4	0	2414	0.00083	1.23-15.64	

表2 rs141919534 (6塩基挿入) と川崎病の関連

(b) 低頻度・患者固有のバリエント

表2に示した知見を受け、(a)の研究手法では検討対象にならなかったより低頻度なバリエントの関与を探るべく、*ORAI1* 遺伝子の蛋白コード領域(903塩基)を川崎病患者3812人(うち1378人がJKDGC症例)、対照2644人について直接シークエンス法により解析し、バリエントの検出および頻度の比較を行った。その結果合計27箇所の低頻度バリエントが新たに見出された。それらをアレル頻度、*in silico*の有害性予測ツール(CADD)の結果により分類し、複数の座位を単一とみなしてアレル数の比較を行うcollapse法で関連を検討した結果、既知の機能獲得型SNVを含む6つの極低頻度(0.1%未満)の有害と予測されるSNVが川崎病群にのみ存在し(表3)、それらが見出された6名中3人が2名

の中等～巨大瘤形成例を含む治療抵抗例であった(表4)。反対に、蛋白機能を喪失させることが予想されるフレームシフト型のバリエントは対照群に多いに多い傾向であった(表3)。

バリエント	アレル数		オッズ比	P値
	川崎病 n=3711	対照 n=2593		
全バリエント	27	95	68	0.98
アレル頻度0.1%より大	4	74	60	0.86
Cスコア<20	2	18	22	0.57
Cスコア≥20	2	56	38	1.03
アレル頻度0.1%未満	23	21	8	1.84
Cスコア<20	12	13	4	2.27
インフレーム挿入・欠失	1	3	0	∞
同義バリエント	8	8	3	1.86
ミスセンスバリエント	3	2	1	1.40
Cスコア≥20	11	8	4	1.40
フレームシフト型	5	2	4	0.35
ミスセンスバリエント	6	6	0	∞

表3 *ORAI1* 遺伝子の低頻度バリエントと川崎病の関連

患者	バリエント	年齢	性別	IVIGレジメ	追加治療	冠動脈病変	心血管イベント
#1	p.Gly26Ser	1y2m	F	400mg/kg x 5	-	-	-
#2	p.Glu62Lys	5m	M	2g/kg x 2	mPSL/バルス IFX,UTI	右冠動脈、左 前下行枝に中 等瘤形成	-
#3	p.Gly98Asp	1y8m	F	2g/kg x 1	-	-	-
#4	p.Ala122Thr	2m	M	2g/kg x 4	-	冠動脈3枝に 巨大瘤形成	心筋梗塞 (34病日)
#5	p.Arg259His	1y11m	F	2g/kg x 1	-	-	-
#6	p.Thr295Met	1y11m	F	2g/kg x 2	CsA	-	-

表4 *ORAI1* 遺伝子の低頻度かつ有害なミスセンスバリエントを有する川崎病患児の特徴

(イ) 巨大冠動脈瘤症例の全エクソーム解析

JKDGCにて収集された48人の巨大冠動脈瘤合併症例のうち47人について全エクソーム解析を実施した。常染色体、X,Y染色体上に見出されたバリエントを各種データベースに0.3%以上の頻度で登録されたものを除外、さらにCADDによる有害性の指標(Cスコア)20以上のも4400に絞り込んだ。さらに蛋白をコードし、コード領域長の情報がbiomartにあるのみを対象に、47人に見出されたバリエントのコード領域長あたりの数でランキングを行った、上位20のリストを表5に示す。

(ウ) 頻回罹患例の全ゲノムシークエンス解析  
川崎病に3回以上罹患した患者を含む川崎病の同胞罹患例を有する2家族(図1)と3回罹患例1人の合計10人について全エクソームシークエンス解析を外部委託により実施した。

遺伝子名	有害アレル数	コード領域長	1000塩基あたりのアレル数
PRPF40B	1	18	55.6
MIER3	1	72	13.9
AC005493.1	1	84	11.9
OR5AK2	11	930	11.8
KRT18	13	1293	10.1
IGHV3-66	3	348	8.6
MIER2	13	1638	7.9
CTC-487M23.8	1	132	7.6
CTD-3105H18.14	1	141	7.1
RPL22	1	143	7.0
G0S2	2	312	6.4
AP005482.1	1	159	6.3
AL391152.1	1	171	5.8
C19orf70	2	357	5.6
C10orf35	2	366	5.5
DEFB133	1	186	5.4
MARK4	1	187	5.3
ZNF550	2	378	5.3
WDR89	6	1164	5.2
RPL19	3	591	5.1
AICDA	3	597	5.0

表5 47人の巨大冠動脈瘤合併例に認められたコード領域あたりに観察された有害アレル数が多い上位20遺伝子

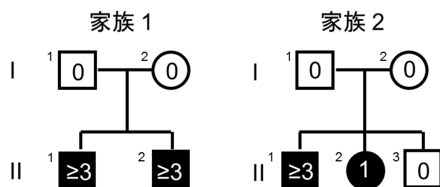


図1. 川崎病頻回罹患例を含む同胞症例の2家族  
記号内の数字は川崎病罹患回数を表す。

(エ) 国際共同研究による新規川崎病罹患感受性遺伝子の検索  
理化学研究所，ソウル峨山病院（韓国），中央研究院（台湾）間の国際共同研究において，それぞれが過去に実施した川崎病のゲノムワイド関連解析の結果のメタ解析により見出された新たな罹患感受性遺伝子座について，JKDGCにて収集された1284人を含む合計3175人の日本人川崎病患者，2352人の対照者試料による関連の再現性の確認が行われた。新規川崎病罹患感受性遺伝子はB細胞に発現が特異的であり，感受性バリエーションのアレル間において，顕著な発現量の違い（expression quantity trait loci 効果；eQTL 効果）が確認された。本研究成果については論文化が進行中である。

#### 4. 考察

川崎病は病原因子への曝露を契機に発生する2次的な病態であると考えられているが，近年の疫学および原因物質の探索研究の結果から病原因子が単一のものではない可能性が示唆されていることを踏まえれば，患者間で異なる

る遺伝要因が発症に関与している，あるいは同じ遺伝要因でも寄与の度合いが異なる可能性も十分考える。JKDGCは2009年に組織され，2012年から今日まで試料及び臨床情報の順調な収集が実施，収集された試料を用いた成果も出始めている。現在ゲノムワイドのSNVタイピングが開始されており，患者サブグループ間でのゲノムワイド関連解析により，各治療への反応性や冠動脈病変のリスクの関連遺伝要因だけでなく，患児の発症時年齢や発症時期に着目した解析を行うことで，上記の病原因子の異質性を裏付ける知見が得られることも期待されている。川崎病全国調査に並び，JKDGCにおけるDNAを試料及び臨床情報の収集は今後共継続していくことが望ましい事業であると考えられる。

#### 5. 結論

JKDGCにより川崎病患者・家族のDNAの試料および臨床情報収集のオールジャパン体制が構築され，収集および，試料を用いた研究が順調に進行中である

#### 6. 研究発表

論文

- 1) Onouchi Y., et al. Variations in *ORAI1* Gene Associated with Kawasaki Disease. *PLoS One*. 2016;11:e0145486.
- 2) Thiha K., et al. Investigation of novel variations of *ORAI1* gene and their association with Kawasaki disease. *J Hum Genet*. 2019;64:511-9. 学会
- 1) 尾内善広，他：「*ORAI1* 遺伝子の多型と川崎病との関連」第33回日本川崎病学会（口頭発表）2013.9 富山
- 2) Onouchi Y., et al. “Variations in *ORAI1* gene associated with Kawasaki disease.” The American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting; 2013. 10 Boston (poster presentation)
- 3) 尾内善広，他：「*ORAI1* 遺伝子の多型と川崎病との関連」日本人類遺伝学会第58大会（口頭発表）2013.11 仙台
- 4) Onouchi Y., et al. “Search for genetic variations responsible for giant coronary aneurysms in Kawasaki disease patients by whole exome sequencing”. 13th International Congress of Human Genetics 2016.4 Kyoto (poster presentation).

- 5) 尾内善広, 他:「全エクソーム解析による川崎病巨大瘤の遺伝的リスクファクターの検索」第36回日本川崎病学会 2016.10. 横浜(口頭発表)
- 6) Thiha K., 他:「*ORAI1* 遺伝子の稀な多型と川崎病」第37回日本川崎病学会 2017.10 東京(ポスター発表)
- 7) Thiha K., 他:「Investigation of Novel Variations of *ORAI1* gene and Their Association with Kawasaki Disease.」第63回日本人類遺伝学会大会 2018.10 横浜(口頭発表)
- 8) Thiha K., *et al.* “Investigation of Novel Variations of *ORAI1* gene and Their Association with Kawasaki Disease.” The American Society of Human Genetics 68th Annual Meeting; 2018.10 San Diego (poster presentation).
- 9) Onouchi Y., “Investigation of Rare Variations of *ORAI1* Gene and their Association with Kawasaki Disease.” International Vasculitis and ANCA Workshop 2019. 2019.4 Philadelphia (poster presentation).