

## 論文の内容の要旨

論文題目 日本人急性壊死性脳症の遺伝的素因

氏名 星野 愛

【序文】急性壊死性脳症（ANE）は小児期の一般感染症に続発し、急激な意識障害及び多臓器不全を呈する予後不良の急性脳症の亜群である。急性期の頭部検査でびまん性の浮腫及び特徴的な両側対称性の視床病変を認める。発症機序は未だ不明であるが、急性期の血液・脳脊髄液中のIL6及びTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインが異常高値を示すことから、感染後のサイトカイン過剰産生（サイトカインストーム）が主病態として推測されている。日本国内での年間発症数は約20例と希少疾患であるが、多くは健常児にありふれた感染症を契機に発症し、25%以上が死亡、半数以上に慢性期に知的又は運動後遺症を残している現状にあり、早急な分子生物学的病因の解明が求められる。ANEの発症には小児期年齢や一部の非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）の服用といった環境要因に併せて、欧米比べ日本を含む東アジアに報告が多いことから何らかの宿主要因（遺伝的素因）の関与が想定される。本研究の目的はANEの発症に関連する遺伝的素因を同定することである。

【対象・方法】日本全国の小児科専門医研修施設よりANEの診断基準を満たした日本人症例を収集した。小児科主治医より患者及びその保護者に対し、研究の目的、不利益、危険性を十分に説明し、同意が得られた患者を対象とした。本研究は東大大学院医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会における審査を受け、承認を得て実施した（研究課題「急性脳症の包括的遺伝子解析」倫理承認番号 G3504-(12)）。対象は日本人ANE 31例（男児15例、女児16例）。発症年齢は8ヶ月から9歳7ヶ月（平均2歳2ヶ月）。方法は末梢血からゲノムDNAを抽出し、推測されるANEの病態に基づいて候補遺伝子を選択し、変異の有無あるいは遺伝子多型頻度を解析した。本研究では、①常染色体優性遺伝形式をとる再発性の家族性急性壊死性脳症（ANE1）の原因遺伝子である*RANBP2*、②ANEと初期の臨床経過及び画像所見が類似するLeigh症候群の原因遺伝子で、ミトコンドリア電子伝達系でエネルギー産生に関連する*COX*群（*COX11*、*COX10*、*COX15*）③*HLA*遺伝子型、④サイトカイン産生に関連が報告されている遺伝子多型（*IL1B*、*IL6*、*IL8*、*IL10*、*TNF $\alpha$* ）を対象に遺伝子解析を行った。ケース・コントロール関連分析を行い、患者群及び健常日本人群における陽性率又は遺伝子型頻度につ

いて統計的比較をし、疾患発症の関連性について検討した。また④で ANE と有意に関連を示した *IL6* 及び *IL10* プロモーター領域の SNP については国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所の JCRB 生物資源バンクの健常日本人のリンパ芽球細胞株を用い、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激によって産生されるサイトカイン量を Bio-Rad 社の Bio-Plex® システムで定量し、SNP の遺伝子型又はディプロタイプ毎での産生量を比較した。

【結果】①*RANBP2* 解析：全例に ANE1 の原因遺伝子として同定されている *RANBP2* exon12 内の変異 (c.1880C→T;p.Thr585Met) 及び exon14 内の 3 つの変異 (c.1958C→T;p.Thr653Ile, c.1968A→G;p.Ile656Val, c.2043G→C;p.Trp681Cys) は検出されなかった。1 例に *RANBP2* exon20 内のヘテロ接合の 177bp 欠失を同定した。この欠失は *RANBP2* データベース及び既存の論文で報告のない欠失であったが、無症候の母親にも認め、健常日本人 DNA 検体を使用した解析では健常日本人 111 人に 1 人が同部位の欠失を認めた (MAF 0.0045)。その他の新規変異は同定されなかった。また、1 例に *RANBP2* exon7 内の一塩基多型 (SNP: Single nucleotide polymorphism) rs76352345 のミスセンスバリエント c.816G>C (p.L272F) を同定した。②*COX* 解析：*RanBP2* と結合して機能する *Cox11* をコードする *COX11* の全エクソン解析では全例に新規変異及び疾患感受性多型は認めなかった。*COX10* 解析は exon3 に位置する rs2230351 の TT 遺伝子型の保有率が健常日本人コントロール (2%) と比較し ANE 群 (12.9%) で高かった (Pc=0.03)。マイナーアレル (T) 頻度が患者群で有意に高く、ANE の発症に関連がみられた (Pc=0.01)。*COX15* 解析では exon5 内の rs2231682 のミスセンスバリエント c.664G>A (p.R222C) が ANE 2 名に同定されたが、疾患発症との関連はなかった。③HLA 遺伝子型：*HLA-A\*31:01*、*HLA-DRB1\*09:01* 及び *HLA-DQB1\*03:03* の陽性率が有意に増加していた (それぞれ P=0.027, 0.025, 0.026)。また、強い連鎖不均衡の関係にある *HLA-DRB1\*09:01* 及び *HLA-DQB1\*03:03* のアレル頻度が ANE 群で有意に増加していた (それぞれ、P =0.043, P=0.034)。④サイトカイン関連遺伝子多型：*IL6* プロモーター領域内の SNP rs1800796 の GG 遺伝子型が健常日本人群で 4.2%に対し、ANE 群で 9.7%と 2 倍以上の保有率であり、マイナーアレル G の保有率が健常日本人群で 21.0%と比べ ANE 群の保有率は 37.1%と多い傾向にあった (Pc=0.069)。ボンフェローニ補正後に統計学的有意差は認めなかったが、*IL10* プロモーター領域内の完全連鎖関係にある rs1800871 及び rs1800872 の CC/CC ディプロタイプ保有率が ANE 群で 22.6%と健常日本人群で 8.4%と比較し高い傾向にあった (P=0.011, Pc=0.110)。*IL1B*, *IL8*, *TNF* の多型解析ではいずれの SNP も ANE と関連がみられなかった。ANE で関連のあった *IL10* rs1800871/rs1800872 のディプロタイプ毎の *IL10* 産生量の検討では、ディプロタイプ CC/CC がディプロタイプ TA/TA と比較し有意に *IL10* 産生量比が低かった (P=0.040)。ディプロタイプ TA/CC とディプロタイプ TA/TA 及び CC/CC の間に有意差はみられなかった (それぞれ P=0.508, P=0.774)。*IL6* rs1800796 の遺伝子型での産生量の比較検討

では、3つの遺伝子型の間に有意差はみられなかった。

【考察】 ANE の発症には多因子の関連が想定されるがこれまで宿主の遺伝要因について解析した研究はなかった。ANE 患者の多くが孤発性でかつ家族集積性が乏しく、発症率が低いことから遺伝素因解析は難しい疾患と想定された。しかし東アジアに発症が偏在することは何らかの遺伝素因の関与を示唆するものであり、本研究では候補遺伝子アプローチを用いてケース・コントロール解析を行った。希少疾患であることから症例集積が難しく 31 例での検討となったが、本研究は ANE の診断基準を満たした典型的な症例を集積し、疾患感受性遺伝子解析を行った初めての報告である。RANBP2 解析では孤発性 ANE の原因となる変異は認めず、欧米で稀に報告のある ANE 1 とは異なる遺伝背景が考えられた。ANE の推測される主病態に基づいて検討された候補遺伝子解析では COX10 rs2230351 のアレル T、HLA-DRB1\*09:01、HLA-DQB1\*03:03、HLA-A\*31:01、IL10 プロモーター領域の SNP (rs1800871, rs1800872) ディプロタイプ CC/CC が ANE の疾患感受性遺伝子として推測され、複数の遺伝的リスクファクターが発症に寄与している可能性が明らかになった。ANE は本邦をはじめ、台湾、韓国などの東アジア人種での報告が多く、一方で欧米人種での報告は非常に少ない。本研究結果を通じて、リスクファクターである HLA-DRB1\*09:01, DQB1\*03:03 が欧米人種の一般人口に比べ日本人（一般人口）で保有率が高いことが、人種間での発症率違いに相関している可能性が考えられた。ANE が提唱されてから 20 年が経過し、臨床経過、血液・髄液検査、病理所見から殻となる病態背景には感染に対する過剰な免疫応答、サイトカインストームが強く推測されているが、その根拠となる分子学的機序は明らかでなかった。本研究によるサイトカイン産生に関連するプロモーター領域の多型解析では IL10 プロモーター領域の完全連鎖関係にある SNP (rs1800871, rs1800872) ディプロタイプ CC/CC が ANE の感受性遺伝子と推測され、健常日本人のリンパ芽球を用いた *in vitro* の機能解析ではディプロタイプ CC/CC が他のディプロタイプと比較し IL10 低産生と関連していた。これにより ANE 症例の急性期にみられる炎症性サイトカインの異常高値の背景には、IL10 に関連する感染後の過剰免疫応答の抑制制御異常による生体恒常性の破綻が関与することが示唆され、サイトカインストームが ANE の主病態である可能性を支持する初めての研究報告となった。