

令和 3 年 10 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10048

研究課題名(和文)川崎病急性期新治療薬「シアル化Fc製剤」の開発

研究課題名(英文) Sialylated Fc as a novel therapeutic agent in the acute phase of Kawasaki disease

研究代表者

吉兼 由佳子 (YOSHIKANE, YUKAKO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00449927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダ・アルピカンスを用いて川崎病モデルマウスを作成し、IgG、Fab領域、Fc領域、IgG1/10量、シアル酸高含有IgG1/10量、シアル酸高含有Fc1/10量を投与した。プラセボ群の冠動脈炎発現は100%であったのに対し、IgGは0%、Fab領域は75%、Fc領域は10%で、抗炎症作用は主にFc領域にあることがわかった。またIgG1/10量の冠動脈炎発現が50%あったのに対し、シアル酸高含有IgG1/10量及びシアル酸高含有Fc1/10量は0～20%で、シアル酸高含有のIgG及びFc製剤では10分の1の成分量で十分な効果があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の免疫グロブリン製剤は、Fab領域・Fc領域両者を含む、シアル酸が少ない抗体を含む等の問題があり、非効率的で、総投与量が多くなっていた。「シアル酸高含有Fc」は抗炎症作用を有するシアル酸の含有が高いFc領域のみを含むため少量投与で十分な効果があり、効率的な治療が可能となる。将来的に組み替え型的人工シアル化Fcを開発することにより、ヒトドナーを必要とせずに現行の免疫グロブリン大量療法と同等の効果が得られる人工製剤を作成できれば、さらなる供給の増加、感染症リスクの解消につながる。

研究成果の概要(英文)：A *Candida albicans* cell wall extract (CAWE)-induced KD-like vasculitis model was established in DBA/2 mice. They all had coronary arteritis.

1. Administration of existing immunoglobulin suppressed coronary arteritis in all of mice. 2. Administration of Fab suppressed coronary arteritis in 25% of mice. 3. Administration of Fc suppressed arteritis in 90% of mice. We suggested Fc works for suppressing arteritis. 4. One-tenth dose IgG suppressed coronary arteritis in 50% of mice. 5. One-tenth dose sialic acid-rich IgG and 6. One-tenth dose sialic acid-rich Fc suppressed coronary arteritis in 80～100% of mice. one-tenth dose sialic acid-rich IgG and Fc had an anti-inflammatory effect equivalent to that of high-dose IgG.

研究分野：小児循環器

キーワード：川崎病 カンジダ モデルマウス 免疫グロブリン Fc シアル酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

川崎病の研究は疾病が発見されて(川崎、1967)以来40年余り多数なされてきたが、未だに原因は解明されていない。急性期における現在最も有効な治療法とされる高容量の免疫グロブリン静注療法に関しても作用機序は明らかでないとされてきたが、近年Fc領域のシアル酸が関節炎モデルマウスにおいて抗炎症作用を示したと報告された(Anthony et al. 2011)。そこで代表者らは現行の免疫グロブリン製剤大量投与の問題を解決するべく、シアル化Fcのみで構成される強力な抗炎症作用により投与必要量が最小限で抑えられる「シアル酸高含有Fc製剤」の開発を目的とする研究に着手することとした。

2. 研究の目的

川崎病血管炎におけるシアル酸高含有Fcの果たす治療効果を証明し、強力かつ投与必要量の少ない「シアル酸高含有製剤」を開発すること

具体的には以下の5点の達成を目標とする。

- 目標1; 川崎病類似汎血管炎モデルマウスを作成し、現行免疫グロブリンの効果を確認する。
- 目標2; モデルマウスにおいてFab領域による中和作用でないことを証明する。
- 目標3; モデルマウスにおいて、Fcによる抗炎症作用を検証する。
- 目標4; モデルマウスにおいて、シアル酸高含有IgGによる抗炎症作用効果を証明する。
- 目標5; シアル酸高含有Fc製剤を作成し、抗炎症作用効果及び瘤形成抑制作用の検証と少量投与による効果を証明する。

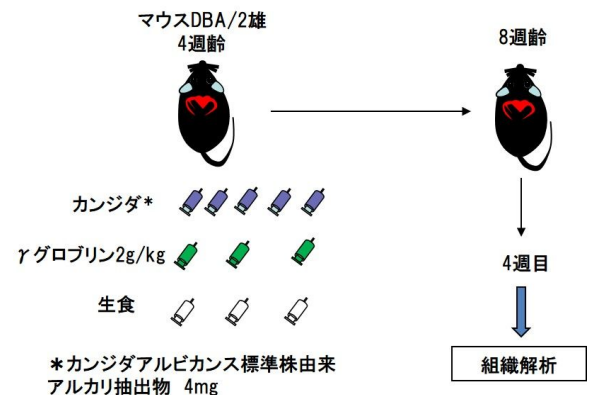
3. 研究の方法

(1) 川崎病冠動脈病変モデルマウスを作成

- カンジダ・アルピカンス標準株凍結保存菌液を37℃で培養し、遠心で集菌する。水酸化カリウム溶液でアルカリ化し、熱処理の温度が97℃、87℃、また、蛋白含量が640µg/mouse、430µg/mouse、320µg/mouseに調整し、最も血管炎の発症が強い抽出液を選定し、4週齢雄のDBA/2マウス5匹ずつに腹腔内に連続5日間接種。4週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。冠動脈起始部の炎症細胞浸潤(HE染色、好中球染色、マクロファージ染色), エラスチン線維破壊(EVG染色)にて血管炎の発現を確認する。この方法で十分に抗原性がありかつ致死性の少ない抽出液を選定し、その抽出液を用いて作成したモデルマウスにプラセボとして生理食塩水0.5mlを1,3,5日目に投与しコントロール群とする。

(2) 現行免疫グロブリンの効果を確認

- カンジダ接種開始1,3,5日目に免疫グロブリン2g/kgを腹腔内投与。4週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。冠動脈起始部の炎症細胞浸潤(HE染色、好中球染色、マクロファージ染色), エラスチン線維破壊(EVG染色)を解析し、コントロール群と比較する。(右図)



(3) Fab領域による中和作用でないことの証明

- カンジダ接種開始1,3,5日目に免疫グロブリン2g/kg相当のFab製剤を腹腔内投与。4週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。冠動脈起始部の炎症細胞浸潤(HE染色、好中球染色、マクロファージ染色), エラスチン線維破壊(EVG染色)を解析し、コントロール群と比較する。

(4) Fc領域による抗炎症作用の検証

- パパイン処理にてFcを精製。カンジダ接種開始1,3,5日目に免疫グロブリン2g/kg相当のFcを腹腔内投与。4週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。冠動脈起始部の炎症細胞浸潤(HE染色、好中球染色、マクロファージ染色), エラスチン線維破壊(EVG染色)を解析し、コントロール群と比較する。

(5) 現行免疫グロブリン(IgG)の少量投与が効果不十分であることの証明

- カンジダ接種開始1,3,5日目に免疫グロブリン0.2g/kgを腹腔内投与。4週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。冠動脈起始部の炎症細胞浸潤(HE染色、好中球染色、マクロファージ染色), エラスチン線維破壊(EVG染色)を解析し、コントロール群と比較する。

(6) シアル酸高含有IgGによる抗炎症作用の検証及び少量投与の効果の証明

- シアル酸リッチヒトIgGを準備する。カンジダ接種開始1,3,5日目に免疫グロブリン0.2g/kg(1/10量)相当のシアル酸リッチヒトIgGを腹腔内投与。4週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。冠動脈起始部の炎症細胞浸潤(HE染色、好中球染色、マクロファージ染色), エラスチン線維破壊(EVG染色)を解析し、IgG1/10量群と比較する。

(7) シアル酸高含有Fcによる抗炎症作用の検証及び少量投与の効果の証明

- シアル酸リッチヒトFcを準備する。カンジダ接種開始1,3,5日目に免疫グロブリン0.2g/kg(1/10量)相当のシアル酸リッチヒトFcを腹腔内投与。4週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。冠動脈起始部の炎症細胞浸潤(HE染色、好中球染色、マクロファージ染色), エラスチン線維破壊(EVG染色)を解析し、IgG1/10量群と比較する。

* 定量的組織解析

Grade 1: 浸潤細胞数 < 20 個/HPF、Grade 2: 浸潤細胞数 < 100 個/HPF、Grade 3: 浸潤細胞数 > 100 個/HPF、Grade 4: 内弾性板破壊、Grade 5: 新生内膜浸潤

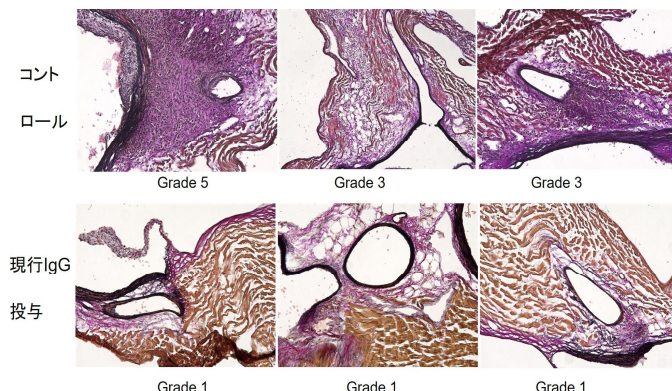
4. 研究成果

(1) 川崎病冠動脈病変モデルマウスを作成

血管炎の所見は 97 群で 0/5 匹、87 群で 4/5 匹で得られた。また蛋白含量 640 μg 群で、投与開始 2 日目に 3/5 匹が死亡した。430 μg 群では 1/5 匹、320 μg 群では 0/5 匹死亡した。320 μg 群でも 4 週後の大動脈基部組織周囲の炎症細胞浸潤が得られた。以上より 87 で熱処理を行い、蛋白含量が 320 μg/mouse になるように菌体量を調整した抽出液が十分に抗原性ありかつ致死性の少ない最適なカンジダアルカリ抽出液であるとした。この抽出液を用いてモデルマウスを作成したところ、5 匹中 5 匹 (100%) で Grade 3 以上の炎症が得られ、コントロール群とした。

(2) 現行免疫グロブリンの効果を確認

現行免疫グロブリン投与群では 5 匹中 5 匹が Grade 1 の炎症所見しか得られず、Grade 3 以上は 0% であった。以上より現行免疫グロブリンは川崎病冠動脈病変モデルマウスに対し有効であると判断した。(右図)



(3) Fab 領域による中和作用でないことの証明

Fab 製剤投与群は、1 匹早期死亡したため、残りの 4 匹で解析した。4 匹中 3 匹 (75%) (75%) で Grade 3 以上の炎症所見を得た。以上より、Fab 領域による効果は弱い、つまり免疫グロブリンの作用は Fab 領域の中和作用ではないことが証明された。

(4) Fc 領域による抗炎症作用の検証

Fc 投与群では、Grade 3 以上の炎症所見を得たのが 5 匹中 1 匹 (20%) のみであった。以上より川崎病血管炎モデルマウスに対する免疫グロブリンの効果は主に Fc 領域であることがわかった。

(5) 現行免疫グロブリン(IgG)の少量投与が効果不十分であることの証明

IgG 1/10 量投与群は、1 匹早期死亡したため、残りの 4 匹で解析した。4 匹中 2 匹 (50%) で Grade 3 以上の炎症所見を得た。以上より、現行免疫グロブリン(IgG)の少量投与が効果不十分であることが証明された。

(6) シアル酸高含有 IgG による抗炎症作用の検証及び少量投与の効果の証明

シアル酸高含有 IgG 1/10 量投与群では、Grade 3 以上の炎症所見が見られたのが 5 匹中 1 匹 (20%) のみであった。以上よりシアル酸高含有 IgG は 10 分の 1 量で十分効果が得られることが証明された。

(7) シアル酸高含有 Fc による抗炎症作用の検証及び少量投与の効果の証明

シアル酸高含有 Fc 1/10 量投与群では、Grade 3 以上の炎症所見が見られたマウスは 5 匹中 0 匹 (0%) であった。以上よりシアル酸高含有 Fc は 10 分の 1 量で十分効果が得られることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件) 米国心臓病学会 2021、日本川崎病学会 2021

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件) 特願 2021-83812

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：原岡 誠司
ローマ字氏名：Seiji Haraoka
所属研究機関名：福岡大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：40251053

研究分担者氏名：古賀 允久
ローマ字氏名：Mitsuhisa Koga
所属研究機関名：福岡大学
部局名：薬学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：60570801

研究分担者氏名：長 環
ローマ字氏名：Tmaki Cho
所属研究機関名：福岡歯科大学
部局名：歯学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90131870

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松山大輔
ローマ字氏名：Daisuke Matsuyama

研究協力者氏名：江口円俊
ローマ字氏名：Mitsutoshi Eguchi

研究協力者氏名：為石正幸
ローマ字氏名：Masayuki Tameishi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。