

令和元年6月11日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10072

研究課題名(和文)川崎病発症に関与する複数スーパー抗原解明への新たなアプローチ

研究課題名(英文) A new approach for the elucidation of multiple superantigens related to the trigger of Kawasaki disease

研究代表者

鈴木 啓之 (Suzuki, Hiroyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80196865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病患児130例の入院時の咽頭ぬぐい液を液体培地(BHI)を用いて増菌培養した。増菌液から全DNAを抽出し、4つのスーパー抗原(SAg)遺伝子(SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J)断片をPCRで検討した。その結果、SAg遺伝子断片は、SPE-A:8例、SPE-C:14例、SPE-Gが32例、SPE-Jが5例で陽性あった。PCR陽性培養液からBHI寒天培地を用いてコロニーを得て、各コロニーのSAg遺伝子を検索した。この結果、純粋培養の細菌中にSPE-G遺伝子を保有する菌を同定した。16S rRNA遺伝子解析の結果、A群溶連菌以外のレンサ球菌Xと判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病による心後遺症は、今や、後天性心疾患の中で最も頻度の高い疾患となっている。従って、川崎病の原因を解明し、その予防法を確立することは、小児科医療に従事する者にとって喫緊の課題である。A群レンサ球菌(GAS)が本来保持するとされるスーパー抗原(streptococcus pyrogenic exotoxin G:SPE-G)を他のレンサ球菌Xが保持しているという今回の研究成果は、SPE-Gの遺伝子がレンサ球菌間で水平伝播していることを示唆するものであり、細菌学的にも、また川崎病原因解明の観点からも学術的意義は大きく、さらに、川崎病発症予防への道の可能性を開くものであり社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：We performed bacterial cultures from throat samples in 130 patients with KD on admission using BHI liquid solution. After overnight incubation, total DNA were extracted from the culture solution. Then, we examined gene fragments of 4 superantigens (streptococcus pyrogenic exotoxin-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J) derived from Streptococcus pyogenes. The numbers of patients showing positive PCR reactions to SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J were eight, fourteen, thirty-two, five, respectively. We scattered the culture solution with PCR positive reaction to culture dishes, and then we screened each colony if it harbored SAg gene fragments or not. After these screening, we found a bacterial colony harboring SPE-G gene fragment. In addition, it was identified as streptococcus X by analysis of 16S rRNA gene.

研究分野：小児科学、川崎病

キーワード：川崎病 スーパー抗原 遺伝子水平伝播

## 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(KD)の病因論に関する最近の国内・国外の研究動向は、大きく3つに分類される。1つは、ウイルスや細菌そのものが原因とする conventional antigen 説、2つ目は、主に細菌などが産生するスーパー抗原(SAg)説である。前者の代表的論文は、Rowley AH らの new RNA ウイルス説(J Infect Dis, 203(7):1021-1030, 2011)であり、後者の論文の一つは申請者らが報告した論文である(J Pediatr 2009;155:266-270)。さらに、近年、KD 患児血清から特異物質 (Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Yersinia pseudotuberculosis, Staphylococcus aureus 由来の microbe-associated molecular patterns (MAMPs)を見出し、これらの特異物質が、KD を発症させるとする自然免疫説が報告され注目されている(PLoS One, 2014;20;9(11):e113054)。いずれの説もまだ川崎病の病因として確定するに至っていないが、Onouchi らは inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C (ITPKC)遺伝子や Caspase-3 (CASP3)遺伝子の一塩基多型 (SNP)が、KD 罹患感受性、IVIG 反応性、冠動脈病変発症など重症度と関与すると報告した(Nat Genet.2008, Hum Mol Genet. 2010)。両遺伝子に SNP が生じて ITPKC、CASP3 の活性低下を生じ、T 細胞の NFAT (Nuclear factor of activated T cells)活性亢進が持続し得る状況となる。これらの事実は、KD 発症に T 細胞を活性化する SAg が関与することに矛盾はなく、むしろ傍証と成り得ると考えられる。

### 2. 研究の目的

川崎病(KD)は疫学上、地域・時間集積性を認め感染性因子の関与が強く疑われてきたが、病原性を有する一定の感染性因子を分離できず、今なお原因不明である。我々は、KD 急性期患児の便中DNA 分析から、本来 *St.pyogenes* (GAS)が保有するスーパー抗原(SAg)遺伝子が有意に多く検出されることを明らかにした(J Pediatr 2009;155:266-270)。今回、この新たな知見に基づき、口腔・咽頭に存在し、病因への関与が想定出来なかった常在菌(主にレンサ球菌)に、本来 GAS が保有する SAg 遺伝子の transfer の可能性を想定し、その SAg 遺伝子を保有する細菌種を同定し、KD 発症への関与を解明することが目的である。

### 3. 研究の方法

研究期間の以前からストックしていた川崎病患児の咽頭菌および研究期間 3 年間に入院した川崎病症例の入院時咽頭菌について検討した。その結果、平成 26 年 10 月から平成 31 年 2 月までに川崎病診断基準を満たして当院に入院した川崎病患児 130 例が対象となった。入院時に咽頭ぬぐい液を採取し、液体培地(Brain-Heart Infusion Broth)を用いて overnight で増菌培養し、得られた咽頭培養液を-80°に保存した。その培養液から DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて全 DNA を抽出し、4 つの SAg 遺伝子(SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J)断片について PCR で検討した。当初は PCR 反応陽性率が低かったため、PCR の条件をいろいろ変更して陽性率の高い条件設定を模索した。最終的には、Tm を 50 に変更し、プライマーには 25mar を用いることによって SAg 遺伝子断片の検出率が改善した。

### 4. 研究成果

対象症例 130 例中、個々のスーパー抗原遺伝子について陽性例は、SPE-A:8 例、SPE-C:14 例、SPE-G が 32 例、SPE-J が 5 例であった。2 つ以上のスーパー抗原遺伝子が検出されたのは 6 例で、SPE-A と SPE-J が 1 例、SPE-A と SPE-G が 1 例、SPE-C と SPE-G が 3 例、SPE-C と SPE-G と SPE-J の 3 つの遺伝子が検出されたのが 1 例であった。3 年目の研究において、PCR で陽性反応の出た培養液を、BHI 寒天培地に蒔いてコロニーを形成させ、生じた各々の細菌コロニーの SAg 遺伝子を検討した。研究期間内に純粋培養された細菌中に SPE-G 遺伝子を保有する菌種を同定し、この菌種の 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った結果、*St.pyogenes* 以外のレンサ球菌 X と同定された。このレンサ球菌について更なる詳細な検討を行う予定である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Hamada H, [Suzuki H](#), Onouchi Y, et al.: Efficacy of primary treatment with immunoglobulin plus ciclosporin for prevention of coronary artery abnormalities in patients with Kawasaki disease predicted to be at increased risk of non-response to intravenous immunoglobulin (KAICA): a randomised controlled, open-label, blinded-endpoints, phase 3 trial. Lancet. 2019 Mar 16;393(10176):1128-1137. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32003-8. Epub 2019 Mar 7. Erratum in: Lancet. 2019 Mar 30;393(10178):1298. Lancet. 2019 Apr 3.
2. Thiha K, Mashimo Y, [Suzuki H](#), et al : Investigation of novel variations of ORAI1 gene and their association with Kawasaki disease. J Hum Genet. 2019 Mar 11. doi: 10.1038/s10038-019-0588-2. [Epub ahead of print]
3. 鈴木啓之:(特集)川崎病アップデート ~病因・病態論の推移と展望~ 細菌・スーパー抗原 ~提唱当時から最近の知見をまとめる~ アレルギー・免疫 2018;25(11):1415-1421.
4. Kitano N, [Suzuki H](#), Takeuchi T. : Patient Age and the Seasonal Pattern of Onset of Kawasaki's Disease. N Engl J Med. 2018 ;24;378(21):2048-2049. doi: 10.1056/NEJMc1804312.
5. Kim HJ, Yun SW, Yu JJ, Yoon KL, Lee KY, Kil HR, Kim GB, Han MK, Song MS, Lee HD, Ha KS, Sohn S, Ebata R, Hamada H, [Suzuki H](#), et al.: Identification of LEF1 as a Susceptibility Locus for

- Kawasaki Disease in Patients Younger than 6 Months of Age. Genomics Inform. 2018 ;16(2):36-41.
6. Kwon YC, Kim JJ, Yun SW, Yu JJ, Yoon KL, Lee KY, Kil HR, Kim GB, Han MK, Song MS, Lee HD, Ha KS, Sohn S, Ebata R, Hamada H, Suzuki H, et al. : Male-specific association of the FCGR2A His167Arg polymorphism with Kawasaki disease. PLoS One. 2017 Sep 8;12(9): e0184248. doi: 10.1371/journal.pone.0184248. eCollection 2017.
  7. Onouchi Y, Fukazawa R, Yamamura K, Suzuki H, et al. : Variations in ORAI1 Gene Associated with Kawasaki Disease. PLoS One. 2016 Jan 20;11(1):e0145486. doi: 10.1371/journal.pone.0145486. eCollection 2016.

〔主な学会発表〕(計 5 件)

1. Suzuki T, Kakimoto N, Onouchi Y, Suenaga T, Takeuchi T, Tachibana S, Takekoshi N, Shibuta S, Suzuki H.: Relationship of three gene polymorphisms related to Ca<sup>2+</sup> /NFAT-pathway with clinical characteristics in the acute phase of Kawasaki disease. The 12th International Kawasaki Disease Symposium, June 12-15 , 2018, Yokohama, Japan
2. Suenaga T, Suzuki T, Kakimoto N, Takeuchi T, Suzuki H: Are the serum levels of immunoglobulin G in patients with Kawasaki disease lower than those in other children? The 12th International Kawasaki Disease Symposium, June 12-15 , 2018, Yokohama, Japan
3. Kitano N, Takeuchi T, Suenaga T, Kakimoto N, Shibuta S, Suzuki T, Tachibana S, Takekoshi N, Suzuki H; On behalf of Wakayama Kawasaki Disease Study group (WKDS): The interaction between patients' age and sex in the development of coronary artery lesions attributable with Kawasaki disease in Japan. The 12th International Kawasaki Disease Symposium, June 12-15 , 2018, Yokohama, Jap
4. Kakimoto N, Takeuchi T, Taruya A, Ino Y, Tanaka A, Kubo T, Suzuki T, Suenaga T, Akasaka T, Suzuki H.: What role do the vasa vasorum play in the sequelae of coronary arterial lesions in Kawasaki disease? The 12th International Kawasaki Disease Symposium, June 12-15 , 2018, Yokohama, Japan
5. 鈴木崇之、垣本信幸、尾内善広、立花伸也、竹腰信人、洪田昌一、末永智浩、武内 崇、鈴木啓之 : Ca<sup>2+</sup>/NFAT 経路関連 3 遺伝子多型から見た川崎病の急性期臨床像  
第 37 回日本川崎病学会集會 2017.10.27. 東京

6.

〔図書〕(計 1 件)

1. 鈴木啓之 : 川崎病学 (日本川崎病学会編集) 分担執筆 診断と治療社、2018: pp129-132.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 武内 崇

ローマ字氏名： Takeuchi Takashi  
所属研究機関名： 和歌山県立医科大学  
部局名： 医学部  
職名： 講師  
研究者番号（8桁）： 10246522

研究分担者氏名： 末永智浩  
ローマ字氏名： Suenaga Tomohiro  
所属研究機関名： 和歌山県立医科大学  
部局名： 医学部  
職名： 助教  
研究者番号（8桁）： 70433365

研究分担者氏名： 垣本信幸  
ローマ字氏名： Kakimoto Nobuyuki  
所属研究機関名： 和歌山県立医科大学  
部局名： 医学部  
職名： 助教  
研究者番号（8桁）： 90614412

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※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。