

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10082

研究課題名(和文)川崎病の病態における好中球細胞外トラップ(NETs)の関与とその制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of Kawasaki disease

研究代表者

竹下 誠一郎(TAKESHITA, SEIICHIRO)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・その他・教授)

研究者番号：50369542

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):neutrophil extracellular traps (NETs)の過剰産生は血管炎を含めた組織障害に関与すると報告されている。本研究では、川崎病(KD)急性期においてNETosisが亢進しているかどうかを検討した。KD急性期のNET形成数は、KD回復期や健常児に比較して有意に増加していた。さらに、急性期に増加したcell-free DNA (cfDNA)値とneutrophil elastase (NE)-DNA complex値は、回復期にかけて低下傾向を示した。従って、KD急性期のNET形成は亢進しており、KD血管炎の病態にNETosisが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KDではNETosisの制御機構が破綻することによってNETsの過剰な放出が起こり、血管炎の病態形成に深く関与することが予想される。KDの病態におけるNETs形成の関与を検討し制御機構を解明することによって、原因の究明・重症度判定・治療薬の新たな作用機序の解明に貢献することが可能であり、本研究の学術的な意義は大きい。申請者らはKDにおける活性化好中球の研究に長年携わっており、世界に先駆けて、NETs形成の動態に関する成果を発信することができると思う。

研究成果の概要(英文):Neutrophils contribute to the clearance of pathogens through the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in a process known as NETosis, but the excessive release of NETs has been reported to be involved in the pathogenesis of various diseases, including vasculitis, through inducing tissue injury. The aim of the present study was to investigate whether or not NETosis is enhanced in the acute phase of Kawasaki disease (KD). Spontaneous NET formation in vitro was observed in neutrophils isolated from KD patients, and the number of NET formations was significantly higher in acute KD than in convalescent KD and healthy children (HC). The increased levels of cell-free DNA (cfDNA) and neutrophil elastase (NE)-DNA complex in the acute phase of KD tended to decrease in the convalescent phase. Spontaneous NET formation was enhanced in neutrophils from patients with acute KD, suggesting the possible involvement of NETosis in the pathogenesis of KD vasculitis.

研究分野：川崎病、好中球

キーワード：川崎病 好中球 好中球細胞外トラップ NETosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、川崎病 (Kawasaki disease, KD) 急性期において、末梢血好中球は増加するとともに機能的にも活性化されて elastase 等を過剰に産生して血管炎の病態に深く関与していることを報告してきた。近年、核内のクロマチンで構成される網目状の好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps, NETs) 放出を伴う NETosis という新たな細胞外殺菌機構が報告され、敗血症・血栓症・自己免疫疾患等の病態への関与が注目を集めている。

2. 研究の目的

本研究では「KD 血管炎の病態における NETosis の関与を検討し、その制御機構を解明する」ことを目的とした。

3. 研究の方法

KD 患児 37 人と健常児 6 人の末梢血好中球を抽出した後 in vitro における spontaneous NET 形成を免疫染色学的に検討し、KD 急性期と回復期および健常児と比較検討した。

(1) 免疫染色を実施して、NET 形成を蛍光顕微鏡で観察した。蛍光フィルタは DAPI・GFP・TRITC の 3 種類を用いた。染色された糸状もしくは網状の構造物で、Merge によってそれら全てが一致した構造物を NETs と判断した。さらに、丸形カルチャーカバーガラスの全域を 682 視野において、NETs を観察し得た視野数をカウントした。

(2) 培養上清中の cell-free DNA を定量リアルタイム PCR 法で測定した。

(3) 培養上清中の neutrophil elastase (NE)-DNA complexes を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) KD 患児の好中球を in vitro において観察した場合、KD 急性期では NET 形成を認めたが、KD 回復期や健常児ではほとんど認めなかった (図 1)。

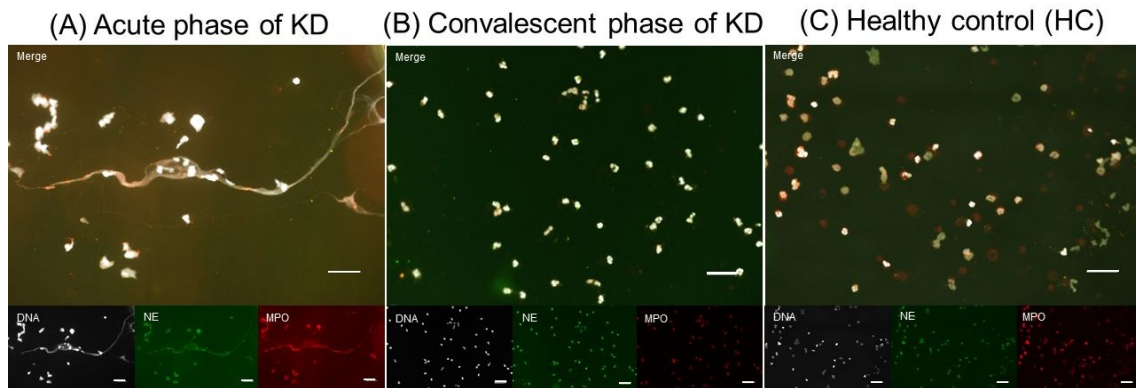


図 1 KD 急性期 (A) 回復期 (B) および健常児の NET 形成

KD 急性期の NET 形成数は、回復期や健常児に比較して有意に増加していた (図 2 (A))。さらに、KD 急性期と回復期を測定しえた 11 例の検討でも、KD 急性期の NET 形成数は、回復期にかけて有意に減少していた (図 2 (B))。

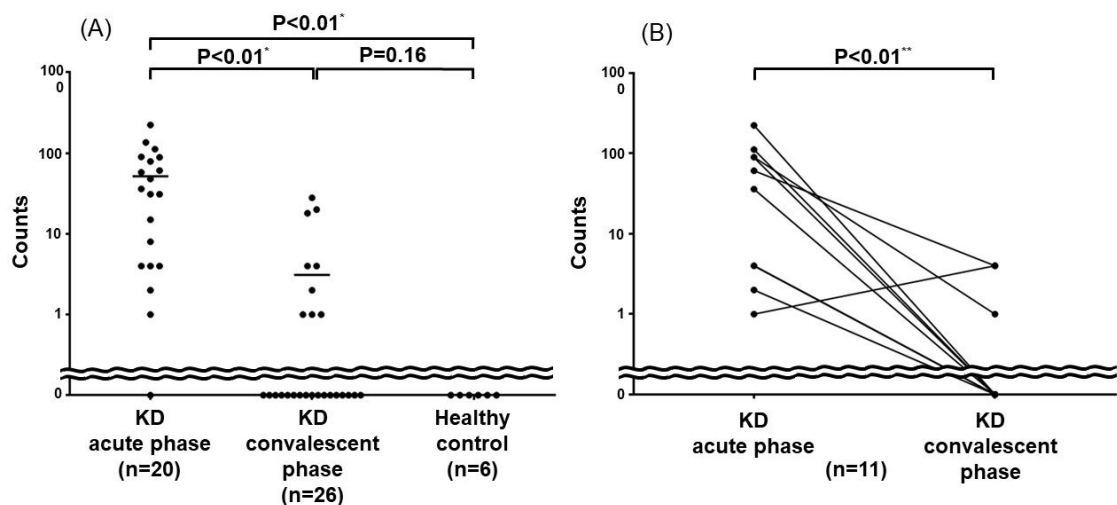


図 2 KD 急性期 (A) 回復期 (B) および健常児の NET 形成数

(2) KD 急性期に増加していた cf-DNA 値は回復期にかけて減少する傾向を示したが、統計学的有意差を認めなかった(図3(A))。KD 急性期と回復期を測定しえた 14 例の検討では、KD 急性期の cf-DNA 値は、回復期にかけて有意に減少していた(図3(B))。

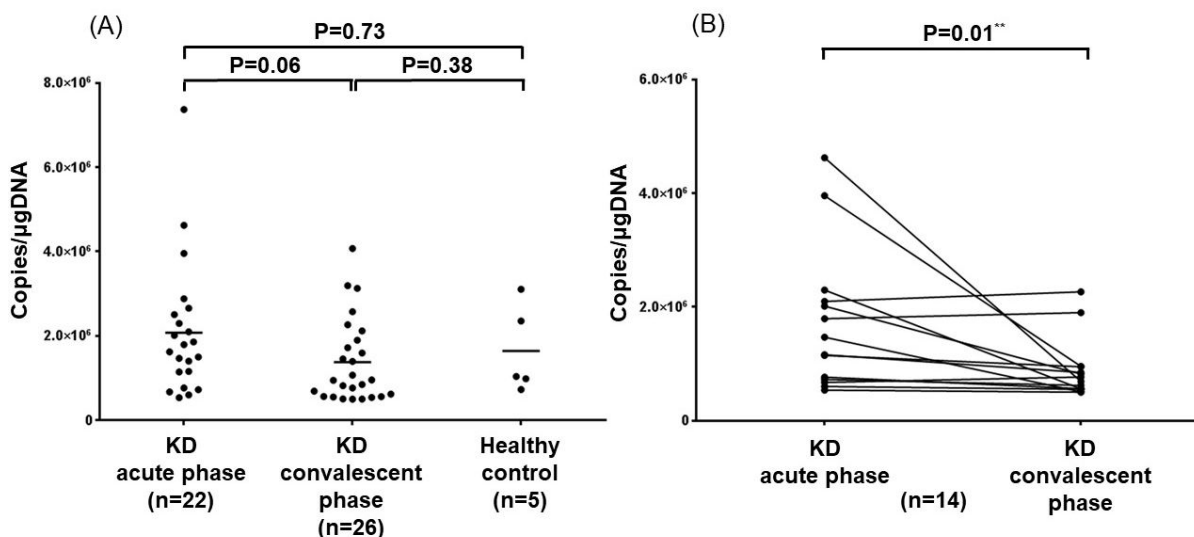


図3 KD 急性期 (A) 回復期 (B) および健常児の cf-DNA 値

(3) KD 急性期の NE-DNA complexes 値は、回復期や健常児に比較して有意に増加していた(図4(A))。さらに、KD 急性期と回復期を測定しえた 15 例の検討でも、KD 急性期の NE-DNA complexes 値は、回復期にかけて有意に減少していた(図4(B))。

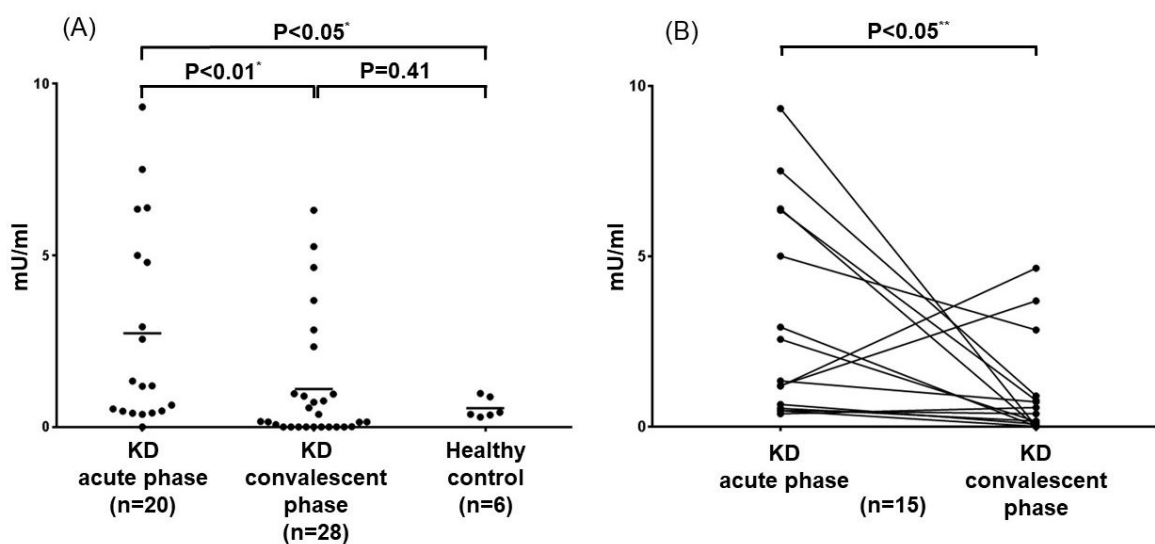


図4 KD 急性期 (A) 回復期 (B) および健常児の NE-DNA complexes 値

< 引用文献 >

Yoshida Y, Takeshita S, Kawamura Y, Kanai T, Ysujita Y, Nonoyama S. Enhanced formation of neutrophil extracellular traps in Kawasaki disease. *Pediatric Research* 2020 Jan 14. doi: 10.1038/s41390-019-0710-3..

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshida Yusuke, Takeshita Seiichiro, Kawamura Yoichi, Kanai Takashi, Tsujita Yuki, Nonoyama Shigeaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Enhanced formation of neutrophil extracellular traps in Kawasaki disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41390-019-0710-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeshita Seiichiro, Kanai Takashi, Kawamura Yoichi, Yoshida Yusuke, Nonoyama Shigeaki	4. 巻 12
2. 論文標題 A comparison of the predictive validity of the combination of the neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio and other risk scoring systems for intravenous immunoglobulin (ivig)-resistance in Kawasaki disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0176957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0176957. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeshita Seiichiro, Kawamura Yoichi, Kanai Takashi, Yoshida Yusuke, Nonoyama Shigeaki	4. 巻 3
2. 論文標題 The role of neutrophil activation in the pathogenesis of Kawasaki disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4172/2573-0282.100057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawamura Yoichi, Takeshita Seiichiro, Kanai Takashi, Yoshida Yusuke, Nonoyama Shigeaki	4. 巻 178
2. 論文標題 The Combined Usefulness of the Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in Predicting Intravenous Immunoglobulin Resistance with Kawasaki Disease	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Pediatrics	6. 最初と最後の頁 281 ~ 284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpeds.2016.07.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawamura Yoichi, Takeshita Seiichiro, Kanai Takashi, Takizawa Mari, Yoshida Yusuke, Tsujita Yuki, Nonoyama Shigeaki	4. 巻 2017
2. 論文標題 Urinary Lactate Dehydrogenase Activity and Its Isozyme Patterns in Kawasaki Disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/4162597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tsujita Yuki, Kanai Takashi, Yoichi Kawamura, Nonoyama Shigeaki, Takeshita Seiichiro
2. 発表標題 Trial of ulinastatin treatment for a murine model of Kawasaki Disease
3. 学会等名 The 12th International Kawasaki Disease Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida Yusuke, Takeshita Seiichiro, Kawamura Yoichi, Kanai Takashi, Tsujita Yuki, Nonoyama Shigeaki
2. 発表標題 Involvement of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of Kawasaki disease
3. 学会等名 The 12th International Kawasaki Disease Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田裕輔、竹下誠一郎、川村陽一、金井貴志、辻田由喜、野々山恵章
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ(NETs)の川崎病の病態への関与
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井貴志、竹下誠一郎、川村陽一、木下恵司、中谷圭吾、岩島覚、瀧澤裕司、廣野恵一、森一越、吉田裕輔、野々山恵章
2. 発表標題 好中球/リンパ球比,血小板/リンパ球比によるIVI _G 不応の予測に関する多施設共同研究
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井貴志、川村陽一、吉田裕輔、大澤麻登里、竹下誠一郎、野々山恵章
2. 発表標題 ウリナスタチン併用療法プロトコルにおける冠動脈病変合併例の予後検討
3. 学会等名 第38回日本川崎病学会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村陽一、金井貴志、辻田由喜、吉田裕輔、竹下誠一郎、野々山恵章
2. 発表標題 川崎病のIVI _G 不応予測因子としての好中球-リンパ球比と血小板-リンパ球比の有用性
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川村陽一、竹下誠一郎、金井貴志、辻田由喜、吉田裕輔、野々山恵章
2. 発表標題 川崎病急性期のIVI _G 不応予測における好中球/リンパ球比、血小板/リンパ球比の有用性:他のリスクスコアとの比較
3. 学会等名 第53回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田裕輔、竹下誠一郎、川村陽一、金井貴志、辻田由喜、野々山恵章
2. 発表標題 川崎病の病態における好中球細胞外トラップ(NETs)の関与について
3. 学会等名 第37回日本川崎病学会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井貴志、竹下誠一郎、川村陽一、木下恵司、中谷圭吾、岩島覚、瀧澤裕司、廣野恵一、森一越、吉田裕輔、野々山恵章
2. 発表標題 好中球/リンパ球比、血小板/リンパ球比によるIVIg不応の予測に関する多施設共同研究
3. 学会等名 第37回日本川崎病学会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻田由喜、金井貴志、吉田裕輔、川村陽一、三浦典子、大野尚仁、野々山恵章、竹下誠一郎
2. 発表標題 CAWS誘導川崎病類似マウス血管炎に対するウリナスタチンの効果について
3. 学会等名 第37回日本川崎病学会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川村陽一、金井貴志、辻田由喜、吉田裕輔、竹下誠一郎、野々山恵章
2. 発表標題 川崎病急性期の好中球/リンパ球比、血小板/リンパ球比はIVIg治療抵抗性の予測因子になりうるか?
3. 学会等名 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 金井貴志, 川村陽一, 辻田由喜, 吉田裕輔, 竹下誠一郎, 野々山恵章
2. 発表標題 川崎病急性期の好中球-リンパ球比、血小板-リンパ球比はIVIG 治療不応性の予測因子である
3. 学会等名 第36回日本川崎病学会・学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 辻田由喜, 金井貴志, 吉田裕輔, 川村陽一, 竹下誠一郎, 三浦典子, 大野尚仁, 野々山恵章
2. 発表標題 CAWS誘導血管炎に対するウリナスタチン投与の検討
3. 学会等名 第60回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川村陽一, 金井貴志, 辻田由喜, 吉田裕輔, 竹下誠一郎, 野々山恵章
2. 発表標題 川崎病のIVIG不応予測因子としての好中球-リンパ球比と血小板-リンパ球比の有用性
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takeshita Seiichiro, Kawamura Yoichi, Kanai Takashi	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Avid Science	5. 総ページ数 2-31
3. 書名 Vasculitis (eBook), Chapter 1: Update on the immunomodulatory therapy for Kawasaki disease	

1. 著者名 Takeshita Seiichiro, Kawamura Yoichi, Kanai Takashi	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 552
3. 書名 Kawasaki Disease. Current understanding of the mechanism and evidence-based treatment.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川村 陽一 (Kawamura Yoichi) (10648801)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・小児科学・助教) (82406)	
研究分担者	野々山 憲章 (Nonoyama Shigeaki) (40280961)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・小児科学・教授) (82406)	