

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19652

研究課題名(和文)カルシニューリン阻害薬の川崎病類似冠動脈炎に対する作用機序の検討

研究課題名(英文) Study of the mechanisms of action of calcineurin inhibitors on Kawasaki disease-like coronary arteritis

研究代表者

村田 憲治 (Murata, Kenji)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：70770642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カルシニューリン阻害薬は難治性川崎病に用いられるが、冠動脈病変に対する効果は明らかでない。そこで、カルシニューリン阻害薬による川崎病類似冠動脈炎への影響とその機序を調べることを目的とした。

カルシニューリン阻害薬は投与量依存的にNod1リガンド誘発冠動脈炎を増悪させた。冠動脈炎増悪効果はSCIDマウスでも同様であり、T・B細胞は必須ではなかった。また、TLRのアダプター分子であるMyD88がカルシニューリン阻害薬による冠動脈炎増悪に必須であった。さらに、カルシニューリン阻害薬が血管内皮細胞の接着因子発現を亢進させ、また、単球系細胞のサイトカイン産生をMyD88依存性に亢進させた。

研究成果の概要(英文)：Calcineurin inhibitors have been used for the treatment of refractory Kawasaki disease. However, the effect on coronary artery lesions in Kawasaki disease patients remains unknown. This study aimed to investigate the effects and the mechanisms of actions on Kawasaki disease-like coronary arteritis of calcineurin inhibitors.

Calcineurin inhibitors exacerbated the Nod1-mediated coronary arteritis in a dose-dependent manner. Similar effects were obtained in SCID mice, suggesting that T and B cells were not essential. On the other hand, MyD88, adapter molecule downstream of Toll-like receptors, was essential for the exacerbation of arteritis due to calcineurin inhibitors. Furthermore, calcineurin inhibitors enhanced the expression of adhesion molecules by endothelial cells and the cytokine secretion by monocytic cells on MyD88 dependence.

研究分野：自然免疫

キーワード：カルシニューリン阻害薬 川崎病 冠動脈炎 自然免疫 MyD88 マウスモデル 血管炎 小児科

1. 研究開始当初の背景

(1) 川崎病の現状と課題

1967年に川崎病が発見されて40年以上経過したが、病因として未だ特定されたものはない。川崎病の治療法として免疫グロブリン大量投与の有効性が明らかとなり、現在は標準治療となっている。さらに、免疫グロブリン療法不応例に対してはステロイド、抗TNF $\alpha$ 抗体、免疫抑制剤、血漿交換など様々な治療法が検討されている。ところが、それらの治療法がどのような機序で作用しているかについては解明されておらず、特に免疫抑制剤の川崎病に対する作用機序や、重大な合併症である冠動脈病変に対する効果は未だ明らかとなっていない。

(2) 川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルから得られたこと

当教室では自然免疫リガンドである Nod1 リガンドをマウスに皮下投与あるいは口腔内投与をすることで、川崎病類似の冠動脈炎が発症することを報告した(図1)<sup>1</sup>。このモデルは人工で純粋な Nod1 リガンドにより冠動脈炎を発症させた世界初のモデルであり、今までの川崎病の病因論のブレイクスルーとなるものである。

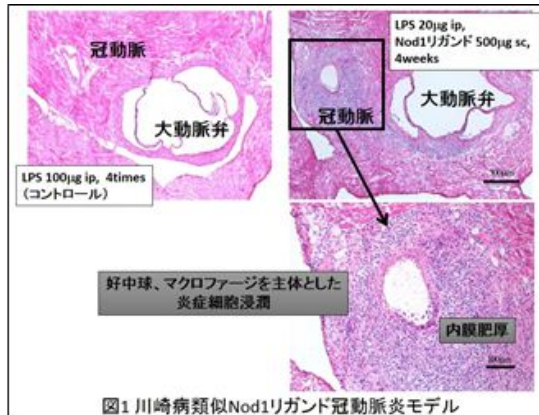


図1 川崎病類似Nod1リガンド冠動脈炎モデル

川崎病の発症における何らかの感染因子の関与について多くの報告があるが、未だ特定されたものはない。Nod1 リガンドはグラム陽性菌および一部のグラム陰性菌から放出される物質であり、『今まで原因として指摘されていた病原体・病因物質により常在菌叢が攪乱され、そういった自然免疫を活性化させるリガンドが放出され、川崎病を発症する』という新病因説が考えられるようになった。

当教室のその後の研究により、この川崎病類似冠動脈炎モデルにおいて、“非”血球系細胞の Nod1 が必須であることが判明した。ヒトおよびマウス由来血管内皮細胞は Nod1 リガンドの刺激により様々なケモカインを産生しており、この血管内皮細胞によるケモカインがマクロファージを誘導し、冠動脈の炎症に寄与していることが明らかとなった<sup>2</sup>。

(3) 川崎病とカルシニューリン阻害薬

『川崎病急性期治療のガイドライン(平成24年改訂版)』では、免疫抑制薬としてカルシニューリン阻害薬であるシクロスポリン A

がエビデンスレベル Class C、Grade C として記載されており、現時点では免疫抑制剤は治療効果についてのエビデンスはないという状態である。

カルシニューリン阻害薬は獲得免疫だけでなく、自然免疫に関わる免疫細胞の分化と機能を制御すること<sup>3</sup>、さらに、血球系細胞だけでなく、血管内皮や平滑筋などの非血球系細胞への作用についても報告されている<sup>4</sup>。

我々は川崎病治療におけるカルシニューリン阻害薬の効果を確認するために、川崎病類似冠動脈炎マウスモデルにカルシニューリン阻害薬の投与を行ったところ、予想に反して高用量のカルシニューリン阻害薬により冠動脈炎の増悪が確認された(図2)。

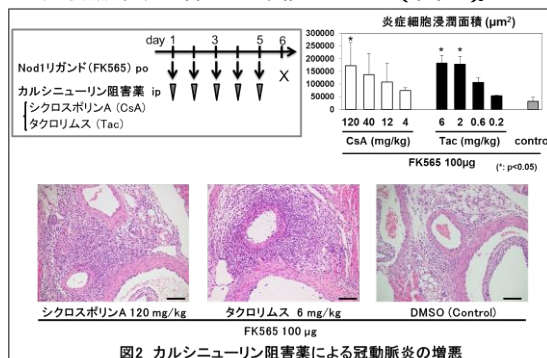


図2 カルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪

前述のように、川崎病類似冠動脈炎モデルでは非血球系細胞(特に血管構成細胞)とマクロファージの関与が明らかとなったため、両者を *in vitro* で刺激し、サイトカイン産生の変化を検討した。まず、血管構成細胞であるヒト冠動脈血管内皮細胞と平滑筋細胞の培養細胞を Nod1 リガンド(FK565)とカルシニューリン阻害薬で刺激したが、一貫した傾向はみられなかった。一方、マウスのマクロファージ(骨髄由来マクロファージ(BMDM)、RAW264.7細胞株)を同様に刺激したところ、カルシニューリン阻害薬の濃度依存的に TNF の産生が亢進することを確認した(図3)。

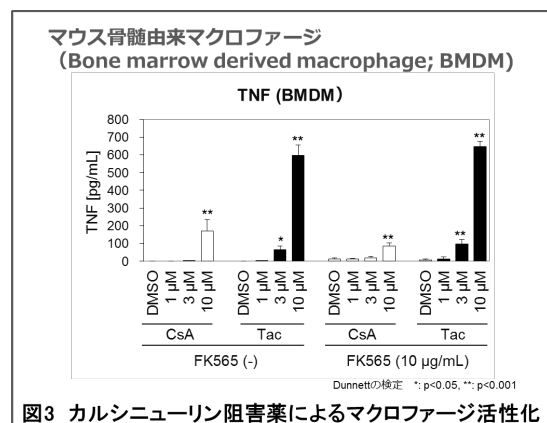


図3 カルシニューリン阻害薬によるマクロファージ活性化

以上のように *in vivo* と *in vitro*(マクロファージ)で、カルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪を疑わせる所見が確認されたため、臨床応用されつつある川崎病に対するカルシニューリン阻害薬による治療が冠動脈炎を増悪させる可能性が疑われた。

## 2. 研究の目的

本研究では、カルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪を疑わせる所見が確認されたことから、遺伝子改変マウスなどを用いて、自然免疫受容体 Nod1 のリガンド投与による「川崎病類似冠動脈炎モデルマウス」に対する影響 (*in vivo*) と、マクロファージや血管構成細胞 (冠動脈内皮細胞・平滑筋細胞) の刺激実験など (*in vitro*) を組み合わせ、川崎病治療におけるカルシニューリン阻害薬の作用、特に冠動脈への影響とその機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞に Nod1 リガンド (FK565) とカルシニューリン阻害薬を添加し、細胞接着能をフローサイトメトリー法と定量的リアルタイム PCR 法を用いて解析する。  
 (2) 獲得免疫不全の SCID マウスや、自然免疫受容体シグナル経路のアプター分子である myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)、あるいは caspase-associated recruitment domain 9 (CARD9) の遺伝子改変マウスを用い、*in vivo*、*in vitro* の両方で作用機序を明らかにする。  
 (3) 心臓に浸潤している白血球 (CD45 陽性細胞) の表面マーカーをフローサイトメトリー解析する (心臓浸潤細胞のフローサイトメトリー解析)。カルシニューリン阻害薬により特異的に変化している細胞集団を見出し、影響を受ける細胞を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) カルシニューリン阻害薬は血管内皮細胞の接着因子の発現を亢進させる

前述のように、川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルで重要な役割を果たすマクロファージを FK565 とカルシニューリン阻害薬で刺激すると、カルシニューリン阻害薬の濃度依存的に培養上清中の TNF 産生が亢進した (図 3)。一方で、もう一つの重要な役割を果たす血管構成細胞では、炎症性サイトカイン産生については一定した結果を示さなかった。

そこで、血管内皮細胞と白血球の接着能や接着因子に対するカルシニューリン阻害薬の影響について検討した。まず、ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) と U937 細胞 (ヒト単球様細胞株) を用いて、血管内皮細胞白血球接着アッセイを行ったが、FK565 刺激下で血管内皮細胞と白血球の接着に明らかな亢進は認めなかった。

次に、カルシニューリン阻害薬により血管内皮細胞の接着因子の発現が亢進するかどうかを調べるために、カルシニューリン阻害薬と FK565 で HCAEC を刺激し、接着因子である ICAM-1、VCAM-1、E-selectin の発現をフローサイトメトリー法と定量的リアルタイム PCR 法で解析した。シクロスポリン A (CsA) とタクロリムス (Tac) により、

FK565 で誘導された HCAEC の ICAM-1 発現が亢進することが明らかとなった (図 4a)。定量的リアルタイム PCR 法では、FK565 刺激のない状況で CsA が ICAM-1 と E-selectin の発現を亢進させた (図 4b)。以上より、CNI が血管内皮細胞の接着因子の発現を亢進させ、それによりマクロファージなどの炎症細胞を誘導し、冠動脈炎を進展させる可能性を示唆している。

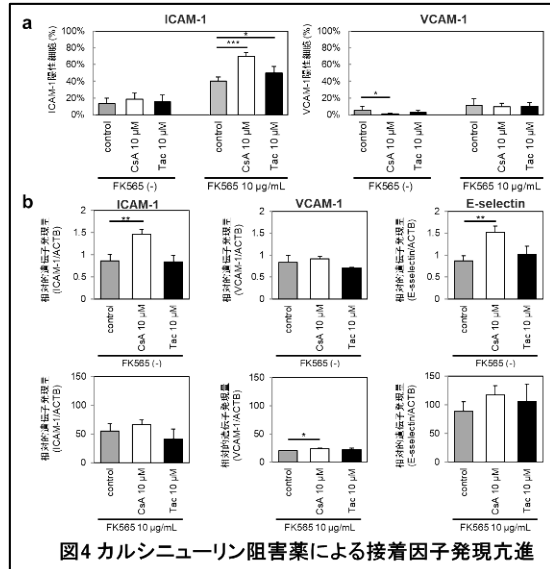


図4 カルシニューリン阻害薬による接着因子発現亢進

(2) カルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪には T 細胞・B 細胞は必須ではない

カルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪にどの細胞が関与するかを調べるために、T 細胞と B 細胞が欠損した SCID マウスを用いて、前述と同様の *in vivo* 実験を行った。SCID マウスでもカルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪を認めるため、T 細胞と B 細胞は冠動脈炎の増悪に必須ではないことが示唆された (図 5)

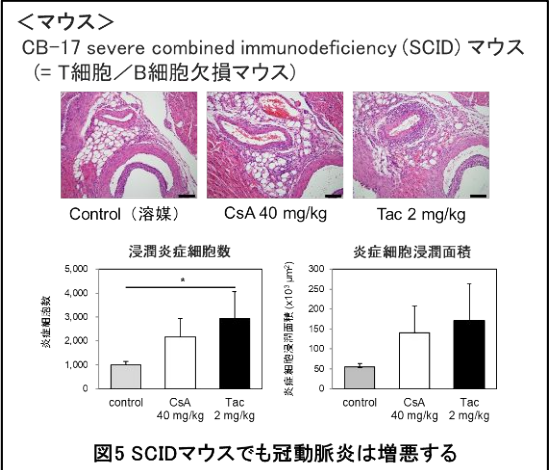


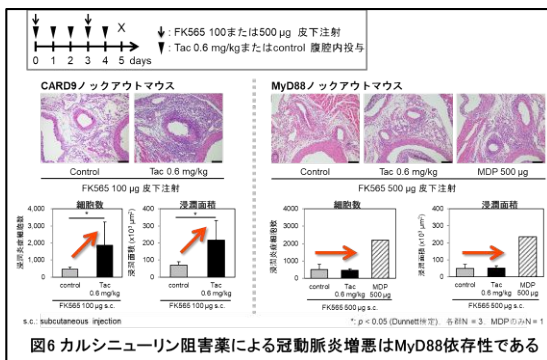
図5 SCIDマウスでも冠動脈炎は増悪する

(3) カルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪は MyD88 依存性である

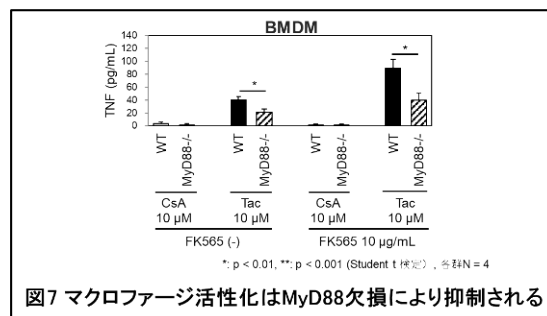
以前に、カルシニューリン阻害薬が自然免疫経路の一つである Toll like receptor (TLR)-4 - MyD88 シグナル経路を活性化し、マクロファージからの炎症性サイトカイン (TNF など) の産生を亢進させるとの報告があった<sup>5</sup>。MyD88 は TLR の下流にあるアダ

プター分子である。一方、CARD9 は非 TLR 自然免疫経路のシグナル伝達物質の一つである。そこで、MyD88 あるいは CARD9 の欠損によりカルシニューリン阻害薬による Nod1 誘導性冠動脈炎増悪に影響を及ぼすかどうかを調べた。

軽度の冠動脈炎を引き起こすような実験の状態を作るため、FK565 の投与量を野生型と CARD9 欠損マウスは 100  $\mu\text{g}$ 、MyD88 欠損マウスは 500  $\mu\text{g}$  に設定した。野生型と CARD9 欠損マウスでは、Tac 0.6 mg/kg により Nod1 誘導性冠動脈炎が同程度増悪した。一方、MyD88 欠損マウスでは、Tac による冠動脈炎の増悪は認めなかった。Nod2 リガンドである Muramyl dipeptide (MDP) は野生型マウスの Nod1 誘導性冠動脈炎を増悪させるため、陽性コントロールとして MyD88 欠損マウスに MDP を投与したところ、予想通り MDP により冠動脈炎が増悪した (図 6)。したがって、カルシニューリン阻害薬は MyD88 依存性炎症性シグナルの活性化により Nod1 誘導性冠動脈炎を増悪させ、一方 CARD9 はこの増悪の過程には必須ではないと結論付けた。



(4) カルシニューリン阻害薬によるマクロファージ活性化も MyD88 経路が関与している  
 前述のように、カルシニューリン阻害薬による冠動脈炎の増悪が MyD88 依存性であることが明らかとなったことから、マクロファージの活性化についても MyD88 欠損により抑制されるかどうかを *in vitro* で調べた。MyD88 欠損 (MyD88<sup>-/-</sup>) あるいは野生型 (WT) マウス由来の BMDM をカルシニューリン阻害薬と FK565 で刺激した。Tac と FK565 による TNF 産生は、野生型 BMDM と比較して MyD88 欠損 BMDM では 56% 抑制され ( $p < 0.01$ ) (図 7)。CNI によるマクロファージの活性化は部分的に MyD88 依存であることを示唆している。



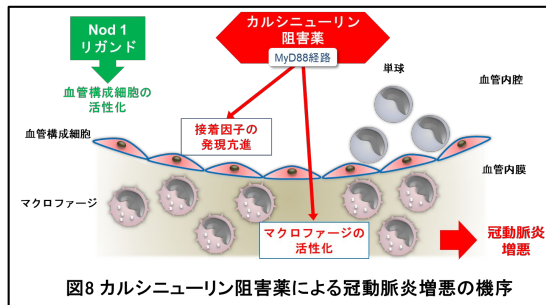
(5) カルシニューリン阻害薬による Nod1 リガンド誘発冠動脈炎の浸潤細胞の変化

既報<sup>2</sup>の方法を用いて、カルシニューリン阻害薬と FK565 を投与した野生型マウスの心臓をコラゲナーゼで処理した上で浮遊細胞を回収し、浸潤している白血球 (CD45 陽性細胞) の表面マーカーをフローサイトメトリー法で解析した。好中球・NK 細胞・マクロファージ・リンパ球の全てで、カルシニューリン阻害薬による細胞数への影響は見られなかった。

(6) 結果のまとめ

既報で示したように、Nod1 リガンドが血管構成細胞を活性化し、多量のサイトカインを産生すると、末梢血中の単球が誘導される。次に単球が心臓マクロファージに分化し、冠動脈炎発症に重要な役割を果たす<sup>2</sup>。

カルシニューリン阻害薬は MyD88 経路を介して血管構成細胞やマクロファージを活性化することで冠動脈炎を増悪していると考えられる (図 8)。



(7) 得られた成果の位置づけ

本研究は主に動物実験と細胞実験に基づいており、必ずしもヒトの冠動脈病変に対するカルシニューリン阻害薬の増悪効果を反映しているわけではないかもしれない。しかし、川崎病患者に対してカルシニューリン阻害薬が投与され、冠動脈病変増悪への関与が否定できない症例の報告<sup>6-8</sup>が散見され、本研究結果はヒト冠動脈病変の増悪メカニズムに一部関連している可能性があると考えられる。よって、難治性川崎病にカルシニューリン阻害薬を使用する際には冠動脈病変の発症・増悪に細心の注意を払う必要がある。

< 参考文献 >

- Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusahara K, et al. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):1093-9.
- Motomura Y, Kanno S, Asano K, Tanaka M, Hasegawa Y, Katagiri H, et al. Identification of Pathogenic Cardiac CD11c+ Macrophages in Nod1-Mediated Acute Coronary Arteritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(6):1423-33.
- Fric J, Zelante T, Wong AY, Mertes A,

- Yu HB, Ricciardi-Castagnoli P. NFAT control of innate immunity. *Blood*. 2012;120(7):1380-9. doi: 10.1182/blood-2012-02-404475.
4. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1483-521.
  5. Kang YJ, Kusler B, Otsuka M, Hughes M, Suzuki N, Suzuki S, et al. Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *J Immunol*. 2007;179(7):4598-607.
  6. Suzuki H, Terai M, Hamada H, Honda T, Suenaga T, Takeuchi T, et al. Cyclosporin A treatment for Kawasaki disease refractory to initial and additional intravenous immunoglobulin. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(10):871-6.
  7. Tremoulet AH, Pancoast P, Franco A, Bujold M, Shimizu C, Onouchi Y, et al. Calcineurin inhibitor treatment of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. *J Pediatr*. 2012;161(3):506-12 e1.
  8. Hamada H, Suzuki H, Abe J, Suzuki Y, Suenaga T, Takeuchi T, et al. Inflammatory cytokine profiles during Cyclosporin treatment for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. *Cytokine*. 2012;60(3):681-5.

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Murata K, Motomura Y, Tanaka T, Kanno S, Yano T, Onimaru M, Shimoyama A, Nishio H, Sakai Y, Oh-Hora M, Hara H, Fukase K, Takada H, Masuda S, Ohga S, Yamasaki S, Hara T. Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signaling pathway in a murine model of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 2017;190(1):54-67. doi: 10.1111/cei.13002.

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

村田 憲治、カルシニューリン阻害薬は MyD88 を介して川崎病マウスモデルの NOD1 誘導性冠動脈炎を増悪させる、血管炎病因病態研究会 ( 東京 ) 2018

村田 憲治、Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signaling pathway in a murine model of Kawasaki disease、第 70 回九

州小児科学会 ( 福岡 ) 2017

村田 憲治、カルシニューリン阻害薬は MyD88 依存性に川崎病マウスモデルの冠動脈炎を増悪させる、第 49 回日本小児感染症学会 ( 金沢 ) 2017

Murata K, Calcineurin inhibitors exacerbate Nod1-mediated coronary arteritis via the MyD88 signaling pathway, The 13th Congress of Asian Society for Pediatric Research (Hong Kong), 2017

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

村田 憲治 ( MURATA, Kenji )

九州大学大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号 : 70770642

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

##### (4) 研究協力者

( )