

令和元年5月8日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16270

研究課題名(和文)川崎病類似冠動脈炎におけるIL-1の役割の検討

研究課題名(英文)Role of IL-1 in Nod1-induced coronary arteritis

研究代表者

本村 良知 (Motomura, Yoshitomo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10737175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前、自然免疫受容体 Nod1 のリガンドをマウスに投与すると川崎病類似冠動脈炎を発症し、その炎症に心臓のCD11c陽性マクロファージが関与することを報告した。本研究で、その心臓のCD11c陽性マクロファージで、IL-1a、IL-1bなどのIL-1関連分子の発現が著明に亢進していることを新たに発見した。IL-1受容体アンタゴニストを川崎病類似冠動脈モデルマウスへ投与したが、改善を認めなかった。本研究の成果として、川崎病類似冠動脈モデルマウスにおいて、IL-1の関与を示唆する所見は認められたものの、治療的介入としての証明は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病の治療法は免疫グロブリン大量投与が中心であるが、不応例についてはステロイド、抗TNF抗体、免疫抑制剤など様々な治療法が検討されている。しかし、その作用機序はほとんど解明されておらず、治療効果も十分とは言えない。米国では川崎病モデルマウスにおけるIL-1阻害薬(Anakinra)の効果が示され、Anakinraの臨床試験が行われている。研究では、申請者らがこれまでに開発してきた自然免疫受容体 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を用いて、川崎病におけるIL-1の意義を確認した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that innate immune receptor "Nod1" ligand induced coronary arteritis which resembled Kawasaki disease and cardiac CD11c positive macrophage caused arteritis. In this study, we newly found that cardiac CD11c positive macrophages in FK565 induced-coronary arteritis model mice highly expressed IL-1 related genes such as IL-1a and IL-1b. We examined the effect of IL-1 antagonist in FK565 induced-coronary arteritis model mouse. Unfortunately, administration of IL-1 antagonist (Hydrocinnamoyl-L-valyl Pyrrolidine) could not improve coronary arteritis.

研究分野：小児感染症

キーワード：川崎病 Nod1

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

## 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、川崎病の治療法も免疫グロブリン大量投与によりかなりの川崎病患者が後遺症なく治癒していくようになった。さらに、日本の臨床医・研究者を中心に免疫グロブリン大量投与+ステロイド投与、抗TNF $\alpha$ 抗体、免疫抑制剤など、免疫グロブリン療法不応例に対しても効果的な治療法が検討されてきている。ところが、そ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、治療効果も十分とは言えない。

### 2. 川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルについて

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 (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011、図1)。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。

川崎病の原因は溶連菌やマイコプラズマ、EB ウィルスなどの感染病原体やシャンプー・水銀など多岐に及んでいた (*Nat Rev Microbiol.* 2008)。この 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。**

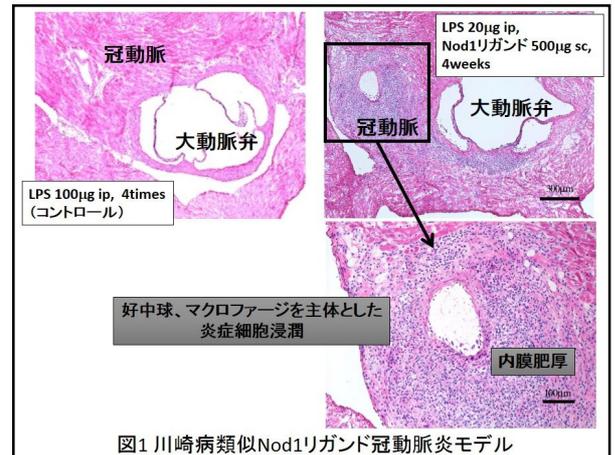


図1 川崎病類似Nod1リガンド冠動脈炎モデル

### 3. 川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルにおける CD11c 陽性マクロファージの発見

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単球を動員することを示した (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015)。

次に、冠動脈炎の浸潤細胞をより詳細に評価するため、心臓より白血球を分離し、フローサイトメトリー解析を行った。

マウスの心臓をコラゲナーゼ処理し、得られた浮遊細胞の細胞表面マーカーを解析したところ、CD11c 陽性の骨髄球系細胞が特異的に増加していることが明らかとなった。この反応は Nod1 欠損マウスでは認めなかった。この細胞は他にも単球系の表面マーカーを有しており、セルソーターを用いて単離した細胞の遺伝子プロファイルはマクロファージに分類され、CD11c 陽性マクロファージと命名した。また、この CD11c 陽性マクロファージはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)や M1 マクロファージマーカーなどを発現しており、冠動脈の炎症に寄与していることが明らかとなった (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015)。

その後、Lee らの報告によると、CD11c 陽性マクロファージは、他の川崎病モデルマウス (LCWE:乳酸菌抽出物投与マウス) にも重要である事が示された (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015)。この事は、CD11c 陽性マクロファージの川崎病モデルマウスにおける普遍性を示すものであり、この細胞の性状や機能、浸潤機構を探求することが、川崎病の病態の解明に

繋がると思われる。

### 3. 川崎病とIL-1

IL-1 はマクロファージや単球、滑膜細胞など多様な細胞によって産生される炎症性サイトカインであり、血管内皮細胞、リンパ球、マクロファージなどを活性化する。その結果、様々な炎症メディエーターの発現が誘導され、炎症性細胞の浸潤や血管透過性の亢進を招き、炎症を引き起こす。川崎病患者の血液検体で IL-1 が上昇していることは古くから知られており、動脈硬化のドライバーとしても注目されている。

LCWE 投与川崎病モデルマウスでは、IL-1 の重要性が既に示されており(Circulation. 2012)、最近、IL-1 の産生細胞が申請者らの発見した CD11c 陽性マクロファージであることが明らかとなっていた(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015)。

#### 2. 研究の目的

本研究では、当教室で開発した川崎病類似冠動脈炎モデルにも IL-1 が関与していることが示唆されたため、その機序と新規治療の研究を行う。

#### 3. 研究の方法

##### 1. 川崎病類似冠動脈炎モデルの CD11c 陽性マクロファージにおける IL-1 関連遺伝子の解析

FK565 投与川崎病類似冠動脈モデルマウスの心臓をフローサイトメトリー解析し、CD11c 陽性 MHC II 陽性細胞 (CD11c 陽性マクロファージ) をセルソーターで分離し、マイクロアレイ解析を行った。以前の論文にある、他の免疫担当細胞のマイクロアレイデータと比較した。

##### 2. 川崎病類似冠動脈炎モデルマウスを用いた IL-1 の関与の評価

LCWE 投与川崎病モデルマウスにおいて、IL-1 受容体欠損マウスおよび受容体拮抗薬や中和抗体により冠動脈炎が改善し(Circulation. 2012)、さらに CD11c 陽性細胞が IL-1 産生に関与する Caspase-1 活性を持つことが冠動脈病変の免疫染色で示されている(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015)。当教室で開発した川崎病類似冠動脈炎モデルマウスでも IL-1 の関与があるか調べるため、IL-1 受容体欠損マウスおよび、受容体拮抗薬または中和抗体投与マウスに Nod1 リガンドを投与し、既に確立したスコアを用いて (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015)、冠動脈炎の発症頻度および病変の重症度を判定した。

#### 4. 研究成果

1. FK565 投与川崎病類似冠動脈モデルマウスの心臓の CD11c 陽性マクロファージでは、IL-1a, IL-1b などの IL-1 関連分子の発現が著名に亢進していた(図2)。また、LCWE 投与による腹部大動脈瘤での解析でも CD11c 陽性マクロファージの産生する IL-1 の関与が示され、関連因子として MMP-12 が挙げられ

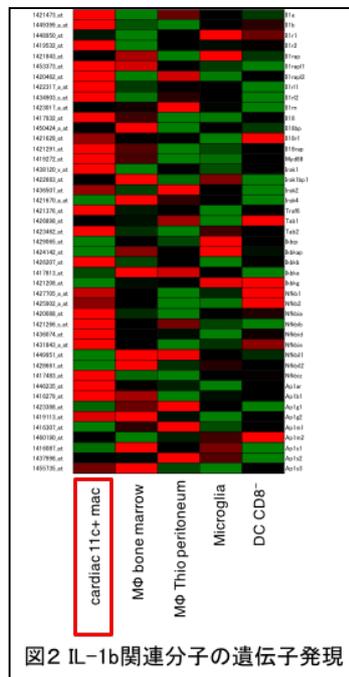


図2 IL-1b関連分子の遺伝子発現

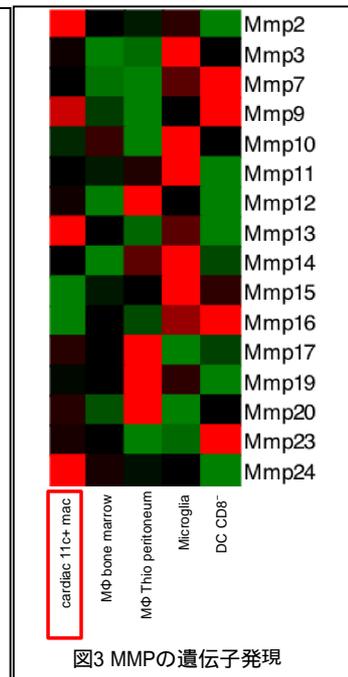
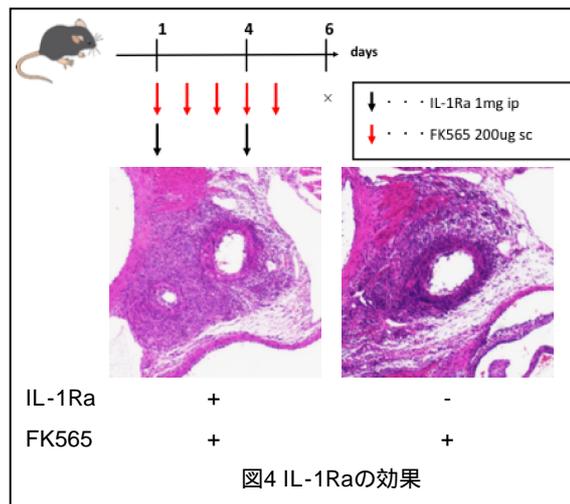


図3 MMPの遺伝子発現

ている(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015)。そこで、CD11c 陽性マクロファージにおける MMP 関連遺伝子を解析したところ、発現が亢進していたのは MMP-2, 9, 13, 24 であり、MMP-12 の亢進は無かった(図3)。MMP-12 は組織から放出されマクロファージの浸潤に関与しているものと考えられた。

2. IL-1 受容体拮抗薬である Anakinra は日本国内では入手が難しく、Anakinra の代替となる薬剤を調査した。IL-1 受容体アンタゴニストである少分子 Hydrocinnamoyl-L-valyl Pyrrolidine(CAS 566914-00-9:以下、IL-1Ra と略す)は、TIR ドメインにおける MyD88 と IL1 受容体の会合を阻害する。マウスへの投与により、IL-1 による発熱や Staphylococcal enterotoxin B による炎症性サイトカインの産生を抑制したとの報告(*Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003)があり、有用と考えた。Day1-5 に IL-1Ra 1mg/body または溶媒を腹腔内投与し、Day1, 4 に FK565 200ug/body の投与を行った(各 n=3)。病理学的所見、浸潤細胞数、病変範囲でいずれも改善を認めなかった。(図4)

本研究の成果として、川崎病類似冠動脈モデルマウスにおいて、IL-1 の関与を示唆する所見は認めたものの、治療的介入としての証明は困難であった。米国で川崎病に対する Anakinra の臨床試験が既に行われており、結果が待たれる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

本村 良知 川崎病における自然免疫の関与 -Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルと CD11c 陽性マクロファージ 第37回日本川崎病学会・学術集会 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

九州大学医学部小児科 <https://pediatr.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし