

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390287  
 研究課題名（和文） TLR・Nod 蛋白の調節異常から見た乳幼児 Cytokine Storm 病態解析  
 研究課題名（英文） TLR/Nod proteins in infants from dysregulation Pathological analysis Cytokine Storm  
 研究代表者  
 横田 俊平（YOKOTA SHUMPEI）  
 横浜市立大学・医学研究科・教授  
 研究者番号：10158363

研究成果の概要（和文）：小児期の免疫疾患の中には、川崎病、インフルエンザ脳症、ウイルス関連血球貪食症候群、全身発症型若年性特発性関節炎など、炎症性サイトカインによる cytokine storm が病態形成に濃厚に関わっている疾患が少なくない。これらの炎症性サイトカインの過剰を来たす疾患での自然免疫との関連について検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Immune diseases in childhood, Kawasaki disease, influenza-associated encephalopathy, virus-associated hemophagocytic syndrome, and systemic-onset juvenile idiopathic arthritis, excessive inflammatory cytokines are involved in disease pathogenesis. We investigated the relationship between innate immunity to these diseases in excess of inflammatory cytokines.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫アレルギー疾患等予防・治療

キーワード：自然免疫、乳幼児、免疫疾患、サイトカインストーム

## 1. 研究開始当初の背景

小児期の免疫疾患の中には、川崎病、インフルエンザ脳症、ウイルス関連血球貪食症候群、全身発症型若年性特発性関節炎など、炎症性サイトカインによる cytokine storm が病態形成に濃厚に関わっている疾患が少なくない。しかも川崎病の好発年齢は0歳から1歳をピークとして0歳～5歳までの罹患が約85%を占め、またインフルエンザ脳症も0

歳から1歳をピークとする5歳までの子どもの疾患である。しかし、なぜこのような低年齢の子ども達が cytokine storm を生じやすいのかの検討はこれまで行われてはいない。炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ など)は、感染症に対して炎症を惹起して感染因子を排除することが一義的な目的で存在していると考えられる。これら炎症性サイトカインの機能として、1)骨髄に作用

して顆粒球の成熟を促し、かつ末梢血へと好中球を送り出す、2)神経中枢の作用しプロスタグランدينを介して発熱を惹起する、3)肝臓に作用してCRP、フィブリノゲン、血清アミロイド A などの急性相反応蛋白の産出に関わる、などが共通に認められる。しかし、一方でこれらの炎症性サイトカインが過剰に産出されると、血管内皮細胞の異常な活性化が起こり、やがて血管壁の内皮細胞の破壊により凝固系調節の破綻 (DIC への進行)、内皮透過性の破綻、多臓器不全へと移行する。小児期にみられる免疫病の進展はまさにこのようなことが共通にみられる特徴があり、**cytokine storm**は炎症性サイトカインの調節不全として理解できる。

最近の免疫学の進歩は、抗原特異性を主軸とした獲得免疫系の他に、自然免疫系が重要な役割を果たしていることが明らかになったことである。しかも自然免疫系は外界の異物を認識する独自の受容体構造をもち、より幅広く異物を認識することで未熟な生体の防御的役割を担っている。すなわち獲得免疫系は細菌Aと細菌Bとを峻別するシステムであるが、自然免疫系の代表的な認識機構である **Toll-like receptor** では細菌 A でも細菌 B でも、グラム陰性菌であれば共通分子である **lipopolysaccharide** を認識することでグラム陰性菌全体に対して炎症を惹起して排除機能を発揮することになり、またグラム陽性菌であれば共通分子である **peptidoglycan** を **Toll-like receptor** が認識して炎症を惹起することになる。そしてこの炎症は **Toll-like receptor** を発現するマクロファージの活性化、炎症性サイトカインの産出として表現される。

わが国にはこれまでないとされていた家族性地中海熱、高 IgD 症候群、CINCA 症候群など間歇性発熱症候群と一括される疾患の解析が進み、現在では4つ分子の遺伝子異常に伴う7つの疾患が分類され、当科も含めわが国からの報告が相次いでいる。間歇性発熱の病態については、**Toll-like receptor** が細胞外膜にアンカーする分子として異物認識を行うのに対して細胞内の異物認識機構として理解される。間歇性発熱疾患では **Nod** ファミリー・タンパクの異常により、過剰な **IL-1** 産出が起こり、同時に他の炎症性サイトカインの **transcription** を促す「炎症転写調節因子 **NFκB**」の **up-regulation** が起こることにより生じることが明らかにされてきた。これらの疾患群は現在では「自己炎症症候群」として一括される。すなわち **Toll-like receptor** は細胞外に **LRR**(ロイシン・リッチ・リピート)を表出して異物認識を行うのに対して、**Nod** ファミリー・タンパクは C 末端に **Toll-like receptor** と同様の **LRR** を持ち異物認識を行い、N 末端には **CARD** ドメイン

をもち下流タンパク **RICK** に結合して **NFκB** を活性化する機構が提唱されている。その結果、**IL-1** の産出および **NFκB** 活性化による **IL-1** 以外の炎症性サイトカインの産出増加が生じる。現在明らかになりつつある自然免疫系は、**Toll-like receptor** システムと **Nod** ファミリータンパク群の2つが主要なものとして認識されてきた。

ところで、乳幼児期は抗原刺激をつねに受け続けて「免疫学的学習＝抗原特異性の認識」を積む時期である。そして成人と同様の獲得免疫系が成立するのは2歳～3歳である。したがって獲得免疫系の機能が未熟な生後2～3年間は、成人とは異なり自然免疫系が重要な機能を果たしていると考えられる。しかし乳幼児期に特有の免疫系の実態についてはこれまで明らかにはされていない。そこで私たちは、乳幼児期は自然免疫系が優位な状況にあり、獲得免疫系が成立までの間は生体防御に重要な役割を担っていると仮説を立てた。**Cytokine storm** が病態を形成する川崎病、インフルエンザ脳症、全身発症型若年性特発性関節炎、ウイルス関連血球貪食症候群などの乳幼児疾患は0歳から3歳ころまでが好発時期であり、これらの免疫疾患を自然免疫系の異常な賦活化とサイトカインの転写調節異常として捉えることで発症病態の理解が進み、治療戦略の構築が可能になろう。

## 2. 研究の目的

私たちはこれまで、川崎病の治療に大量γ-グロブリン療法と血漿交換療法を導入し、冠動脈障害を阻止できることを証明してきた。その理由として **cytokine storm** の是正が挙げられる。また全身発症型若年性特発性関節炎に対しては **tocilizumab**(抗 **IL-6** レセプター・モノクローナル抗体)が著効することを **double-blind, placebo-controlled** 試験により世界に先駆けて明らかにしてきた。すなわちこれらの疾患は **cytokine storm** が病態形成に関わり、その **cytokine** を除去することで病態の終息を図ることが出来ることを証明したことになる。そこで、調節不全に陥った **cytokine** の産出について以下のような手順で検討を加えていく。

- 1) 炎症病態の推移に応じた炎症性サイトカイン産出のプロフィールを確定していく。
- 2) プロテーム解析により、炎症極期・鎮静期の末梢血細胞に発現している蛋白を網羅的に解析する。
- 3) とくに **Nod** ファミリータンパク、**RICK**、**ASC**、**pyrin**、**cryopyrin** などについて発現量の変化を検討する。同時に、**Toll-like receptor** に関わる発現量の変化から、使用されている **receptor** 型を特定する (**TLR-3**、**TLR-4**、**TLR-9** など)。
- 4) 特定の **Nod** ファミリータンパクの発現に

絞り込み、NFkB発現との関連性を確定する。  
5) Cryopyrin のリガンドには、MDP、細菌毒素、細菌 RNA、尿酸などが知られている。Cryopyrin に応答する caspase-1 の発現を検討することにより、apoptosis との関連を追及する。

### 3. 研究の方法

(1) 小児期にみられる免疫病における cytokine storm (炎症性サイトカインの調節不全) の解析 (代表研究者: 横田、分担研究者: 森)

これまで当科では、川崎病急性期に血清中で炎症に関わるサイトカインの異常高値が生じ、血管内皮細胞の活性化、接着因子や凝固調節因子の異常発現を介した血管炎の病態について検討してきた。

小児期の免疫疾患の中でも、川崎病、インフルエンザ脳症、ウイルス関連血球貪食症候群、全身発症型若年性特発性関節炎などの炎症性サイトカインによる cytokine storm が病態形成に濃厚に関わっている疾患に焦点をあて、その発症機序を解析する。その方法として、患者の炎症極期および鎮静期の末梢血白血球および血清の収集を、上記疾患群の患者家族の informed consent を取得後、患者の急性期および回復期の全血(5ml)から末梢血白血球(105 個細胞)および血清(100~200  $\mu$ l)を 15~20 ペア収集する。そして各種炎症性サイトカインについて検討を行う。

(2) 小児の自然免疫における Toll-like receptor を介した炎症応答の検討 (分担研究者: 今川、成戸)

獲得免疫の未成熟な乳幼児において自然免疫は重要な感染防御機構である一方で、過剰な免疫応答によると考えられる川崎病や全身型若年性特発性関節炎、インフルエンザ脳症などの炎症性疾患がこの年齢群に好発する。これらの疾患では TNF  $\alpha$  や IL-6 など各種の炎症性サイトカインの増加が見られ、重症型においてはサイトカインストームと呼ばれる状態に陥る。小児疾患における自然免疫応答による炎症反応について、小児期発症 Lupus 腎炎の腎生検組織を用いて、TLR9 や糸球体スリット膜関連蛋白(nephrin、podocin)、糸球体上皮細胞構造蛋白(synaptopodin)の免疫染色を行い、TLR9 の腎組織内での局在を確認するとともに、SLE の主症状である Lupus 腎炎において自然免疫受容体である TLR9 が担う病態への関与の解明を試みた。また免疫組織染色で得られた知見が in vitro で再現しうるか否か、マウス腎糸球体上皮細胞(MPC)株を種々の cytokine、ligand で刺激し、mRNA レベルで TLR9 やスリット膜関連蛋白の発現量変化という観点から評価を行い、小児疾患における自然免疫の関与について検討

を行った。

### 4. 研究成果

(1) 小児期にみられる免疫病における cytokine storm (炎症性サイトカインの調節不全) の解析

小児リウマチ性疾患における炎症性サイトカインについて、疾患活動期と回復期に IL-6、TNF  $\alpha$  などについて検討を行った。乳幼児期に発症する川崎病において、疾患活動期に IL-6、TNF  $\alpha$ 、IL-2 など炎症性サイトカインの著明な上昇を認め、一方、炎症抑制サイトカインである IL-10 も上昇を認めた。さらに幼児から小児期に発症する全身型若年性特発性関節炎についても同様の炎症性サイトカイン産生について、多関節型若年性特発性関節炎を対象として検討を行った。多関節型若年性特発性関節炎は発熱など全身症状を認めず、成人に認められる関節リウマチに対応した小児リウマチ性疾患である。全身型若年性特発性関節炎は、疾患活動期において対照に比して IL-6、TNF  $\alpha$ 、可溶性 TNF 受容体ともに著明な上昇を認めた。これらの結果より発熱を伴う小児リウマチ性疾患では炎症性サイトカインの過剰分泌によるサイトカインストームを来していることが明らかとなった。

(2) 小児の自然免疫における Toll-like receptor を介した炎症応答の検討

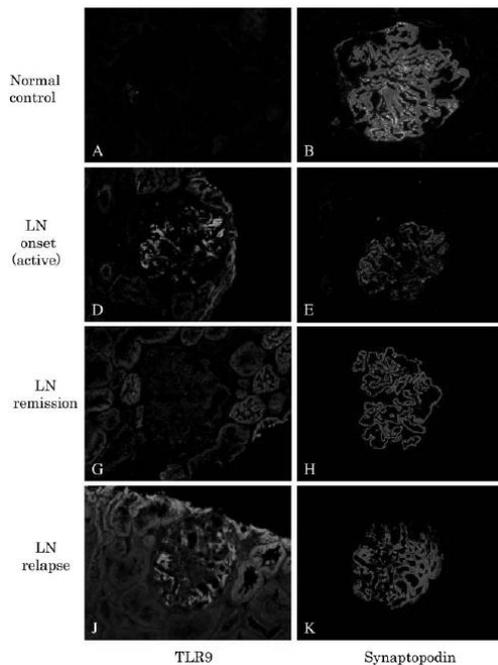
小児期発症 Lupus 腎炎患者の生検腎組織の免疫組織染色において、TLR9 の発現は寛解期や正常腎では認められなかったが、疾患活動期において糸球体上皮細胞領域に一致した発現増強が観察された。また、TLR9 が強発現する時期は血中抗二重鎖 DNA 抗体価の上昇と低補体血症とを認める時期に一致し、血中に DNA 含有免疫複合体が多い時期である事が推測された。一方、synaptopodin、nephrin、及び podocin は疾患活動期においてはその発現が一過性に減弱し、症状回復期においては正常腎とほぼ同程度に発現が改善していた。また、cytokine や ligand で刺激した MPC 株においては、無刺激時には発現の見られなかった TLR9 が mRNA レベルで発現していることを確認し、さらに transfection 試薬を用いて TLR9 遺伝子の MPC への導入を試みたところ、蛋白レベルで TLR9 の発現を確認することが出来た。

Lupus 腎炎において、TLR9 は腎炎症状活動期に一致して podocyte に発現が認められ、寛解期にはその発現が認められないことから、免疫複合体の刺激、沈着により TLR9 の発現が可逆的に誘導される事が推測できる。同時に synaptopodin、nephrin、podocin の蛍光強度は治療前後で変化しており、特に腎炎の活動期に不均一かつ減弱していた発現

が寛解期には糸球体全体にほぼ均一に発現していることから、Lupus 腎炎の活動期には可逆的なスリット膜障害を含めた podocyte の一過性障害が起きうることと、TLR9 が糸球体上皮細胞障害の過程に何らかの関与を示している可能性とが示唆された。この知見は、腎炎症状出現時に蛋白尿が出現する臨床所見と一致する。(次項図)

今回の研究では、Lupus 腎炎症状が出現している時には一時的に podocyte 障害が出現し、TLR9 の発現が可逆的に認められることを初めて確認したが、SLE の病態推移に TLR9 が果たしうる役割について、すなわち podocyte に TLR9 が発現することの意義については、真相を突き止めることは出来なかった。しかし今回の研究で得られた知見は TLR9 を始めとする自然免疫が自己免疫疾患である小児期発症 Lupus 腎炎の臨床経過に少なからず関与を示すことを実証し、今後の病態解明の一助となることを示唆するものであった。と同時に、TLR を含む自然免疫系をターゲットとした新たな治療法の確立に寄与するものと考えられる。

(図)



## 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 14 件)

1) Higuchi R, Mori M, Ozawa R, Miyamae T, Imagawa T, Nishimaki S, Mitsuda T, Aihara Y, Yokota S. Whole blood interferon-gamma assay for tuberculosis in children in Japan. *Pediatr Int.* 51(1):97-102. 2009.

2) Takahashi A, Mori M, Naruto T, Nakajima S, Miyamae T, Imagawa T, Yokota S. The role of heme oxygenase-1 in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Mod Rheumatol.* 19(3):302-8. 2009.

3) Machida H, Ito S, Hirose T, Takeshita F, Oshiro H, Nakamura T, Mori M, Inayama Y, Yan K, Kobayashi N, Yokota S. Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* On line 2010

4) 横田俊平：子どもの脳死臓器移植を巡る日本小児科学会会長として考えたこと 今後の議論のために. *日本小児科学会雑誌* 113 巻 9 号 1-8, 2009.

5) 横田俊平, 森雅亮, 今川智之, 村田卓士, 富板美奈子, 伊藤保彦, 藤川敏, 武井修治, 日本小児リウマチ学会：若年性特発性関節炎に対する生物学的製剤治療の手引き 2009 エタネルセプト. *日本小児科学会雑誌* 113 巻 8 号 : 1344-1352. 2009.

6) 岩田直美, 宮前多佳子, 菊地雅子, 岸崇之, 原良紀, 金子詩子, 篠木敏彦, 今川智之, 稲山嘉明, 横田俊平：小児シェーグレン症候群における小唾液腺組織の経時的変化を観察しえた 8 例の経験. *日本臨床免疫学会誌* 32 巻 3 号 : 195-200, 2009.

7) 中島章子, 横田俊平：抗 IL-6 受容体抗体療法 of 軟骨内骨化への効果. *THE BONE* 23 巻 4 号 : 451-457, 2009.

8) 横田俊平：自己炎症疾患 自己炎症症候群 ベーチェット病、クローン病. *Topics in Atopy* 8 巻 3 号 : 8-13, 2009.

9) 横田俊平：【ステロイド療法の実際】 特殊な状態におけるステロイドの使い方 小児に対するステロイド使用の注意点. *Modern Physician* 29 巻 5 号 667-671, 2009.

10) 横田俊平：【新たな生物学的製剤によるリウマチ性疾患の治療】 Tocilizumab による若年性特発性関節炎の治療. *リウマチ科* 41 巻 3 号 240-245, 2009.

11) 横田俊平：【小児診療のピットフォール】 子どもの診かた 正常、異常、バリエーション. *臨床と研究* 86 巻 4 号 405-409, 2009.

・横田俊平, 鈴木ゆめ：【注意すべきウイルス感染症】 インフルエンザと精神症状. *診断と治療* 97 巻 3 号 601-605, 2009.

12) 横田俊平：【リウマチ性疾患診療における日本のエビデンス】 小児リウマチ治療における生物学的製剤の有効性. *リウマチ科* 41 巻 1 号 48-53, 2009.

13) 宮前多佳子, 横田俊平：小児線維筋痛症と疲労. *日本疲労学会誌* 4 巻 2 号 : 40-45, 2009.

14) 今川智之：【小児リウマチ性疾患をどう診るか 変貌した一次医療と専門医療】 若年

性特発性関節炎 難治例に対する IL-6 阻害薬. 小児科臨床 62 巻 9 号 1995-2002, 2009.  
・今川智之:【ステロイド薬の上手な使い方】ステロイド薬の使用法、減量方法. 小児内科 41 巻 5 号 726-729, 2009.

〔学会発表〕(計 13 件)

1)Norihiro Nishimoto, Yuichi Kawata, Hooi-Ming Lee, Chieko Aoki, Yasuo Adachi, Hidehiko Sugino, Tomoyuki Imagawa, Masaaki Mori, Minako Tomiita, Naomi Iwata, Takuji Murata, Mari Miyoshi, Syuji Takei, Yukoh Aihara, Takahiro Ochi and Shumpei Yokota: The Peripheral Blood Genes That Account for Predictability of Clinical Response to Tocilizumab (TCZ) Treatment, Corticosteroid Dose Reduction, and Serum IL-6 Normalization at Week 48 On Systemic Onset Juvenile Idiopathic Arthritis (sJIA) Patients. American College of Rheumatology, annual scientific meeting, Philadelphia, November, 2009.

2)Shumpei Yokota, Takuma Hara, Masako Kikuchi, Takayuki Kishi, Ryoki Hara, Rumiko Kurosawa, Remi Ozawa, Takako Miyamae, Tomoyuki Imagawa, Masaaki Mori: Drug-Free Remission of Patients with Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis Receiving Tocilizumab for Treatment. American College of Rheumatology, annual scientific meeting, Philadelphia, November, 2009.

3)Shumpei Yokota: Auto-inflammatory Diseases in Childhood - Clinical and Genetic Advances. World Congress on Inflammation. Tokyo, July, 2009.

4)Takako Miyamae, Yutaka Inaba, Takayuki Kishi, Utakako Kaneko, Tomoyuki Imagawa, Shumpei Yokota: Effect of Anakinra on arthropathy in CINCA/NOMID syndrome. World Congress on Inflammation. Tokyo, July, 2009.

5)Takayuki Kishi, Masako Kikuchi, Ryoki Hara, Utako Kaneko, Toshihiko Shinoki, Takako Miyamae, Tomoyuki Imagawa, Masaaki Mori, Shumpei Yokota. Clinical Analysis of Juvenile Dermatomyositis; A Retrospective Study of 45 Japanese. The European League Against Rheumatism, The Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, June, 2009.

6)Shumpei Yokota, Tomoyuki Imagawa, Takako Miyamae, Takayuki Kishi, Utako Kaneko, Norihiro Nishimoto, Tadimitsu Kishimoto: SAFETY AND EFFICACY OF UP TO THREE YEARS OF CONTINUOUS TOCILIZUMAB THERAPY IN CHILDREN WITH SYSTEMIC-ONSET

JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS. The European League Against Rheumatism, The Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, June, 2009.

7)Shumpei Yokota: IL-6 and Beyond. The European League Against Rheumatism, The Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, June, 2009.

8)Chie Aoki, Yutaka Inaba, Remi Ozawa, Tomoyuki Imagawa, Takako Miyamae, Masaaki Mori, Tomoyuki Saito, Shumpei Yokota: EFFECTS OF TOCILIZUMAB ON RADIOLOGICAL FINDINGS IN POLYARTICULAR JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS. The European League Against Rheumatism, The Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, June, 2009.

9)Takako Miyamae, Yutaka Inaba, Takayuki Kishi, Utakako Kaneko, Tomoyuki Imagawa, Shumpei Yokota: Effect of Anakinra on arthropathy in CINCA/NOMID syndrome. The European League Against Rheumatism, The Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, June, 2009.

10)Yutaka Inaba, Chie Aoki, Remi Ozawa, Tomoyuki Imagawa, Takako Miyamae, Masaaki Mori, Tomoyuki Saito, Shumpei Yokota: RADIOLOGIC EVALUATION OF LARGE JOINTS DURING TOCILIZUMAB TREATMENT IN CHILDREN WITH SYSTEMIC JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS. The European League Against Rheumatism, The Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, June, 2009.

11)Utako Kaneko, Tomoyuki Imagawa, Takayuki Kishi, Masako Kikuchi, Ryoki Hara, Toshihiko Shinoki, Takako Miyamae, Masaaki Mori, Shumpei Yokota: DISCREPANCY BETWEEN PROGRESSION OF JOINT DAMAGE AND IMPROVEMENT OF SYSTEMIC INFLAMMATION IN PATIENTS WITH SYSTEMIC-ONSET JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS TREATED WITH TOCILIZUMAB. The European League Against Rheumatism, The Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, June, 2009.

12)Shumpei Yokota: A new Biologic response Modifier: Tocilizumab. A New challenge against JIA. アジア小児科学会&アジア太平洋小児科学会, 上海, 2009 年 10 月.

13)Shumpei Yokota: Recent progress of diagnosis and treatment in children with systemic juvenile idiopathic arthritis. First Indonesia-Japan Rheumatology Forum, Indonesia, December, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 俊平 (YOKOTA SHUMPEI)

横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10158363

(2)研究分担者

森 雅亮 (MORI MASAOKI)  
横浜市立大学・市民総合医療センター・准  
教授  
研究者番号：30254204

(3)研究分担者

今川 智之 (IMAGAWA TOMOYUKI)  
横浜市立大学・附属病院・准教授  
研究者番号：20336548