

平成21年5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591229

研究課題名（和文）川崎病発症に自己免疫機序が関与している：モデルマウスを用いた分子相同仮説の検証

研究課題名（英文）The role of the molecular mimicry in the pathogenesis of Kawasaki disease.

研究代表者

中村常之（NAKAMURA TSUNEYUKI）

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40340004

研究成果の概要:BCG ワクチン接種により,抗原性を発揮する。その中で菌体成分である AhpC に対する抗体が産生される。さらに AhpC と相同性のある抗原をもつ外来菌による感染,あるいは常在菌などによる持続的な刺激が,いわばブースター効果となり,AhpC に対する抗体が過剰に産生された状態になる。その時、皮膚内で生きている BCG 菌に対し、生体内免疫細胞が集合し、臨床的には BCG 接種部位の発赤腫脹という状態を呈し、同時に AhpC と高い相同性のある血管内皮抗原であるペルオキシレドキシニンⅡに自己免疫的反応が生じ、全身性血管炎、高サイトカイン血症へ伸展し、川崎病の臨床症状が完成すると仮定した。そこで今回ペルオキシレドキシニンⅡノックアウトマウスを用いて分子相同仮説を検証した。今回のモデル動物は、分子相同仮説機序に基づく冠動脈炎モデルと考えることができる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000円	630,000円	2,730,000円
2008年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：川崎病、自己免疫、分子相同、ペルオキシレドキシニンⅡ、AhpC、冠動脈炎

1. 研究開始当初の背景：我々は川崎病の診断手引き（厚生労働省川崎病研究班作成、2002年2月改訂5版）中の参考条項である、BCG（Bacillus Calmette Guerin）接種部位の発赤、痂皮形成に注目し、病因としてBCG菌と強い交叉性のある病原体を考慮し、非定型抗酸菌（Mycobacterium intracellulare）をその候補と考え、川崎病モデルマウス作製

の研究を開始した。非定型抗酸菌（Mycobacterium intracellulare）壁成分投与10日後のBCG免疫マウスの心臓組織（HE染色）にて冠動脈の観察を行い、血管炎評価、冠動脈拡張の評価を行った。結果は中型冠動脈の外膜周囲に、軽度白血球（好中球）の浸潤を確認し、血管炎初期と判断した。

初期の研究のまとめ

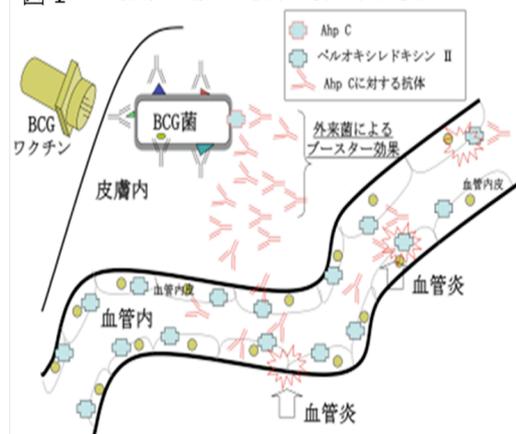
- (1) BCG 菌で免疫したマウスに非定型抗酸菌の壁成分を腹腔内投与した群で、冠動脈炎が誘発された。血中炎症性サイトカイン値も同群が有意に上昇した。
- (2) AhpC 及び Prx II 抗原蛋白を軸とした免疫交叉性による冠動脈炎発症機序を作業仮説として、BCG 菌で免疫したマウスに抗 Prx II 抗体を静脈内投与した群で、冠動脈炎が誘発され、血中炎症性サイトカイン値も、同群が有意に上昇した。

研究過程で非定型抗酸菌や BCG 菌の表現抗原の中で類縁菌のみならず、他の細菌やウイルスにも類似抗原として存在する AhpC (alkyl hydroperoxide peroxidase C) を着目するに至った。AhpC は活性酸素種消去系の 1 つであり、最近、血管炎の原因抗原として注目され、ヒト血管内皮細胞に存在するペルオキシレドキシニン II (Prx II) と強い相同 (約 35%) を示すことが判明した。

## 2. 研究の目的

分子相同仮説 (図 1) による機序で冠動脈炎モデルマウスを作製し、強い冠動脈炎を誘発させるために、血管炎誘発物質の投与後時期の工夫、ブースター効果による工夫を行い、川崎病の冠動脈拡張、冠動脈瘤形成を引き起こさせ、この実験系が川崎病モデルマウスであることを証明することが目的である。

図 1 川崎病発症機序に関する分子相同仮説

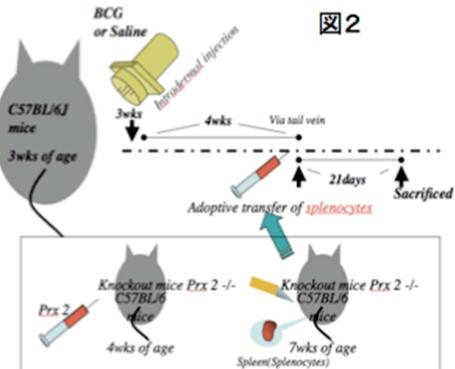


## 3. 研究の方法

- (1) Prx II  $\text{-/-}$  ノックアウトマウス (KO マウス) を作製した Prx II で免疫する。この処置により、Prx II  $\text{-/-}$  KO マウスは、Prx II を自己抗原とみなさず (自己寛容システムが作動せず)、脾細胞にて Prx II に対する抗体を産生する。
- (2) Prx II 免疫 4 週間後にそれぞれの脾臓組織を取り出し、脾細胞 (sp) を分離する。分離した sp (Prx II  $\text{-/-}$  KO-sp) を、今までの研

- 究で行われている BCG 菌で免疫を行った C57BL/6J マウス 7 週齢に対し、尾静脈から投与する。この処置により C57BL/6J マウスの脾臓に、これらの sp が定着し、Prx II 抗体を高度産生し、冠動脈炎ならびに全身の血管炎を誘発することが可能となる (自己抗原に対する抗体産生を誘導)。
- (3) 脾細胞投与後、21 日目にマウスを屠殺後、心臓をすばやく取り出し組織評価用の試料とする。HE 染色によりマウス冠動脈炎の組織学的評価を行い、川崎病モデルマウスとしての妥当性を検討した。

下記の図 (図 2) は、Prx II  $\text{-/-}$  KO マウスの脾細胞 (Prx II  $\text{-/-}$  KO-sp) を用いた今回の実験系であり、投与後 21 日目に屠殺後、心臓をすばやく取り出し、組織評価用の試料とした。



(B+:BCG の免疫施行マウス、KP: KO マウスに Prx II で免疫して脾細胞抽出)。

BCG 免疫マウスに Prx II  $\text{-/-}$  KO-sp を投与した群 (B+KP 群) の対照群として以下の 7 群を設定する。

- ・B+KS 群 (B+:BCG 免疫マウス、KS:KO マウスに生理食塩水を投与して脾抽出)
- ・B-KP 群 (B $\text{-}$ :BCG 非免疫マウス、KP: KO マウスに Prx II で免疫して脾抽出)
- ・B-KS 群 (B $\text{-}$ :BCG 非免疫マウス、KS:KO マウスに生理食塩水を投与して脾抽出)
- ・B+WP 群 (B+:BCG 免疫マウス、WP: C57BL/6J 系統マウスに Prx II で免疫して脾抽出)
- ・B+WS 群 (B+:BCG 免疫マウス、WS: C57BL/6J 系統マウスに生理食塩水を投

与して脾抽出)

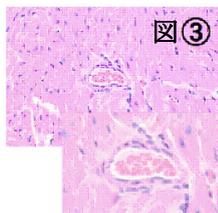
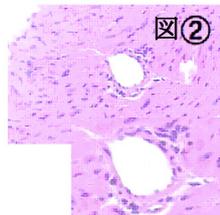
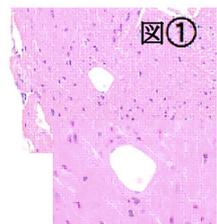
・B-WP 群 (B:BCG 非免疫マウス、WP:  
C57BL/6J 系統マウスに Prx II で免疫して  
脾抽出)

・B-WS 群 (B:BCG 非免疫マウス、WS:  
C57BL/6J 系統マウスに生理食塩水を投  
与して脾抽出)

尚、Prx II  $-/-$ KO マウス (M H Choi et al.  
Nature 435 : 347-353,2005) は韓国の Yu 博  
士の御好意により供与されたマウスである。

#### 4. 研究成果

対照群(図①)に比較し、BCG 免疫 C57BL6J  
マウスに Prx II  $-/-$ KO-sp を投与した群(図②)  
BCG 非免疫 C57BL6J マウスに Prx II  
 $-/-$ KO-sp を投与した群(図③)の心臓組織の  
HE 染色は明らかに冠動脈炎を呈していた。



今回の研究結果として、BCG 免疫 C57BL6J  
マウスに Prx II  $-/-$ KO-sp を投与した群(図②)  
BCG 非免疫 C57BL6J マウスに Prx II  
 $-/-$ KO-sp を投与した群(図③)において冠動脈  
炎を引き起こすと予想した。しかしながら、  
その炎症反応は弱く、さらに BCG 免疫  
C57BL6J マウスに Prx II  $-/-$ KO-sp を投与した  
群(図②)において、BCG 非免疫 C57BL6J

マウスに Prx II  $-/-$ KO-sp を投与した群(図③)  
と比較し、より強い冠動脈炎を期待していた  
が結果としては同程度であった。現時点で、  
分子相同仮説機序に基づく冠動脈炎モデル  
と考えることができるが、臨床的に即した川  
崎病モデルマウスと言いきれない結果とな  
った。

まとめおよび今後の展望

AhpC 及び Prx II という抗原蛋白を軸とし  
た分子相同仮説に基づき、冠動脈炎マウスモ  
デルの作製に成功した。しかしながら、冠動  
脈炎マウスモデルの組織学的変化は弱く、冠  
動脈炎マウスモデル=川崎病マウスモデル  
とは言い切れない。そのため、今回の研究の  
目的は、これまでの研究成果をふまえ、重症  
川崎病と同様の冠動脈障害(拡張、瘤形成)  
を引き起こさせるための、今後の展望を以下  
に列挙した。

(1) Prx II  $-/-$ KO-sp 投与から 28 日後、35 日  
後、42 日後のマウス心筋組織を確認し、冠動  
脈障害の強さを確認する(冠動脈炎のピーク  
となる時期の確認)

(2) BCG 免疫と非免疫マウスに冠動脈障害  
の差がないため、ブースター効果として、非  
定型抗酸菌の壁成分を追加投与し、冠動脈障  
害の強さを確認する(抗体産生量の増加を期  
待)。

(3) 以上、冠動脈障害(拡張、瘤形成)を確  
認した後、川崎病治療の応用研究を行う。

## 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)

- ① T. Nakamura, J. Yamamura, H. Sato, H. Kakinuma, H. Takahashi: Vasculitis induced by immunization with Bacillus Calmette-Guerin followed by atypical mycobacterium antigen: a new mouse model for Kawasaki disease, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 49:391-397, 2007

[学会発表] (計 2 件)

- ① 中村常之、分子相同仮説に基づく川崎病発症機序：新たな川崎病モデルマウス、第44回日本小児循環器学会学術集会、2008年7月2日、福島県
- ② 中村常之、当教室における新しい川崎病モデルマウスの作成：分子相同性の関与から、第8回金沢医科大学小児科地域連携症例検討会、2007年6月30日、石川県

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村常之 (NAKAMURA TSUNEYUKI)  
金沢医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40340004

### (2) 研究分担者

山村淳一 (YAMAMURA JUN-ICHI)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70367473  
佐藤仁志 (SATO HITOSHI)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20303224

### (3) 連携研究者

なし