

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08302

研究課題名(和文) 川崎病急性期におけるHMGB-1の制御を目的とした分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of Molecularly Targeted Therapy to Regulate HMGB-1 in the Acute Phase of Kawasaki Disease

研究代表者

上野 健太郎 (Ueno, Kentaro)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：20644892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、川崎病モデルマウスを用いた研究で、damage associated molecular patterns (DAMPs) の中心的役割を担うHigh mobility group box-1 (HMGB1) が、マクロファージや冠動脈組織のNLRP3/Caspase1を活性化し、冠動脈病変形成に関与するIL-1 やTNF- の発現を誘導することを明らかにした。さらに標準的な治療である免疫グロブリンに抗HMGB1抗体を投与すると、これらの発現が低下し冠動脈組織障害が軽減することを見出した。HMGB1を枢軸とした免疫応答制御は、川崎病冠動脈病変を減少させる新規治療薬として有望と考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病治療における抗HMGB1抗体投与は、NLRP3/Caspase1シグナルの抑制および冠動脈病変形成に関与するIL-1の発現を抑制した。宿主自然免疫応答の制御は、川崎病冠動脈病変を抑える重要な役割を担っていると確信した。本研究は、HMGB1を枢軸とした宿主自然免疫応答制御による新たな川崎病の治療戦略を確立し、臨床応用へ展開する基礎的な研究である。小児後天性心疾患の最大の原因である川崎病冠動脈病変の形成を抑え、遠隔期における臓器障害や急性冠症候群・動脈硬化を抑えることができれば、長期予後を見据えた新たな治療戦略として期待できる。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of Kawasaki disease, we found that high mobility group box-1 (HMGB1), which plays a significant role in damage associated molecular patterns (DAMPs), is a key regulator of NLRP3/Caspase 1 inflammasome pathway and induces the expression of IL-1 and TNF-, which are associated with coronary artery lesion formation. Furthermore, we found that addition of anti-HMGB1 antibody to standard therapy with intravenous immunoglobulin reduced mRNA expression of IL-1 and TNF- and protein expression of NLRP3/Caspase1 in coronary artery lesions. These results suggest that immunomodulation with anti-HMGB1 antibody may be a new therapeutic approach to reduce coronary artery lesions in Kawasaki disease.

研究分野：小児循環器学

キーワード：川崎病 DAMPs HMGB1 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

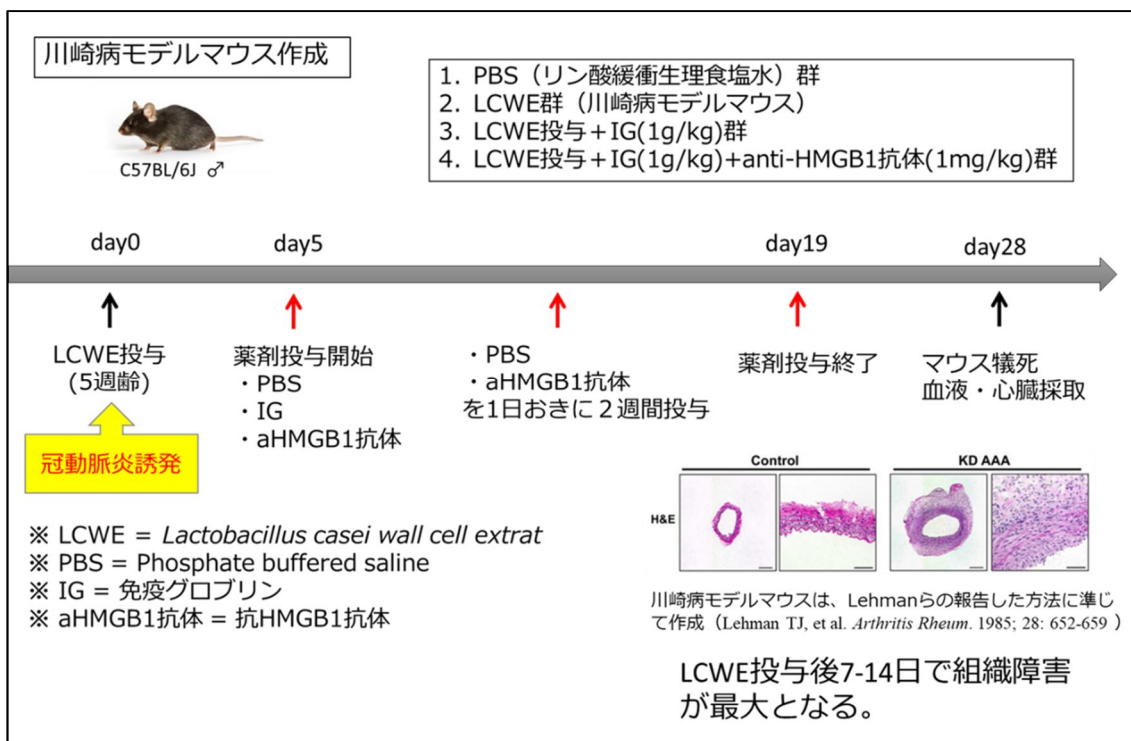
川崎病冠動脈病変は、小児の後天性心疾患の最大の原因である。免疫グロブリン大量療法(IVIG)や重症例でのステロイド初期併用療法でその頻度は減少しているが、2.6~2.8%に心後遺症がみられる。また虚血性心疾患が疑われた若年成人において、急性冠症候群の約5%に川崎病罹患歴があることが示された(Daniels LB et al. Circulation 2012)。川崎病は遠隔期まで内皮障害が続くと考えられており、私たちは長期的な予後改善を見据えた治療を考えていかなければならない。申請者らは川崎病患者血清刺激した冠動脈内皮細胞(Human Coronary Artery Endothelial Cells: HCAECs)を評価したところ、内皮細胞はネクローシス優位の細胞死を起こし、Damage associated molecular patterns (DAMPs)の中心的役割を担うHigh mobility group box-1 (HMGB-1)が多量に放出され、炎症が遷延し冠動脈病変発症に関与している可能性を示した(Ueno K et al. Scientific Reports 2017)。これらの成果をもとに、川崎病におけるHMGB-1シグナル伝達経路に着目した。

2. 研究の目的

川崎病におけるHMGB-1シグナルの活性化が冠動脈病変発症に関与していることを示し、HMGB-1を標的とした分子標的治療が冠動脈病変の発症を抑制することを示す。

3. 研究の方法

本研究ではLCWE(Lactobacillus casei wall cell extract)川崎病モデルマウス(Schulte DJ et al. J Immunol 2009, Arditi M. Int Kawasaki Disease Symp 2015)を用い、臨床応用に展開する基盤となる研究を行った。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)腹腔内投与群をコントロール群とし、川崎病モデルマウスは、Lactobacillus casei cell wall extract(LCWE)を腹腔内投与し作成した。川崎病モデルマウス群は、無治療群(PBS投与群)、免疫グロブリン(IG)投与群、免疫グロブリン+抗HMGB1抗体(IG+aHMGB1)投与群の3群を作成し、マウス心臓切片の病理組織、心臓組織中のサイトカインmRNAおよびNLRP3蛋白発現量を解析した。研究期間内には以下の実験を行った。



(1) HMGB1を用いた冠動脈内皮細胞の刺激

Recombinant human HMGB1で刺激したTHP-1細胞(マクロファージ)を用い、ヒト冠動脈内皮細胞(HCAEC)上で24時間共培養し、濃度勾配による冠動脈組織中のNLRP3、IL-1βの発現量を確認する。

(2) 川崎病モデルマウスにおける抗HMGB-1抗体投与の効果(冠動脈病変発症の抑制効果)

組織学的評価はHE染色、CD68染色、SMA染色、Elastica van Gieson(EVG)染色、HMGB1染色を行った。冠動脈組織の炎症評価はスコアリング方法を用いた半定量的な解析を行った。コントロール群、各薬物治療群の効果について評価した。

(3) 川崎病モデルマウスにおけるHMGB-1シグナル関連因子の測定

安楽死後のマウスから冠動脈を含む心臓組織(上部1/3)を採取し、細胞溶解物から蛋白質を抽

出した。得られた蛋白抽出物を用いて HMGB-1 シグナル関連蛋白(PI3K/AKT/mTOR、MAPK/ERK 1/2、NF-kB p65、NLRP3/Caspase1) を Western blotting 法で測定した。組織中のサイトカイン・ケモカインについては、IL-1 β /TNF- α /IL-6、IL-10/RANTES/VEGF-A/E-selectin など を rt-PCR で評価した。これらの HMGB-1 シグナル関連蛋白

(4) 川崎病モデルマウスにおけるサイトカインの発現

day 28 安楽死前の川崎病モデルマウス頸静脈から血液 0.1-0.3ml を採取し、HMGB-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、VEGF などサイトカイン・ケモカインをマルチプレックスサスペンションアレイで測定した。

4 . 研究成果

(1) HMGB1を用いた冠動脈内皮細胞の刺激

HMGB1 で刺激した THP-1 細胞を 24 時間冠動脈内皮細胞上で刺激したところ、濃度依存性に組織中の NLRP3、IL-1 β の mRNA 発現が上昇した (図 1)。

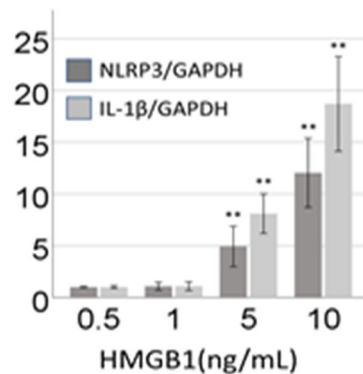
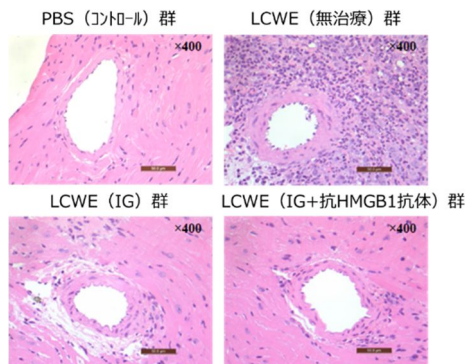


図 1 冠動脈 NLRP3/IL-1 β

(2) 川崎病モデルマウスにおける抗HMGB-1抗体投与の効果 (冠動脈病変発症の抑制効果)

LCWE 投与による川崎病モデルマウス冠動脈の組織学的変化を調べた。HE 染色の組織画像では、PBS を投与したコントロール群のマウスはいずれも組織学的変化を起こしていないが、LCWE を投与したマウスは冠動脈周囲に炎症細胞の浸潤が認められた。川崎病モデルマウスでは、無治療群 (PBS) で最も強い炎症細胞の浸潤がみられ、IG 投与群および IG+抗 HMGB1 抗体投与群で炎症細胞の浸潤が抑制されていた。

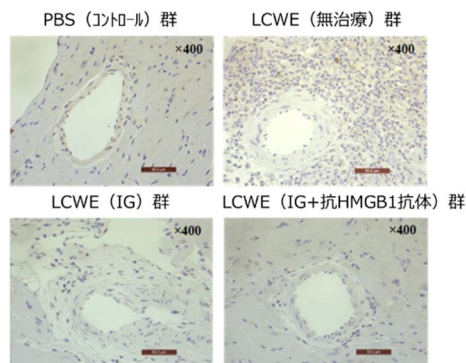
(HE 染色)



マウス心臓切片 (全体画像) x400

(CD68 染色)

CD68 染色の組織画像では、LCWE 投与マウスの無治療群 (PBS) で最も強いマクロファージの浸潤がみられ、IG 投与群および IG+抗 HMGB1 抗体投与群で有意にマクロファージの浸潤が抑制されていた。



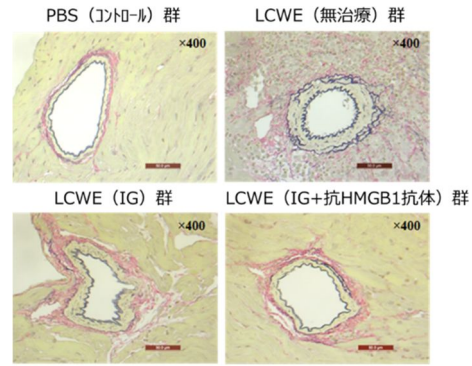
マウス心臓切片 (全体画像) x400

(EVG 染色)

Elastica van Gieson 染色 (EVG) 染色画像では、LCWE 投与マウスの無治療群で外弾性板の断裂が認められたが、IG 投与群および IG + HMGB1 抗体投与群では内弾性板の断裂は認められなかった。

川崎病モデルマウス無治療群で外弾性板の断裂がみられ、外膜周辺のコラーゲン線維が不規則に観察された。

IG 群および IG + aHMGB1 群では、内・外弾性板、外膜周囲のコラーゲン線維は構築が保たれていた。

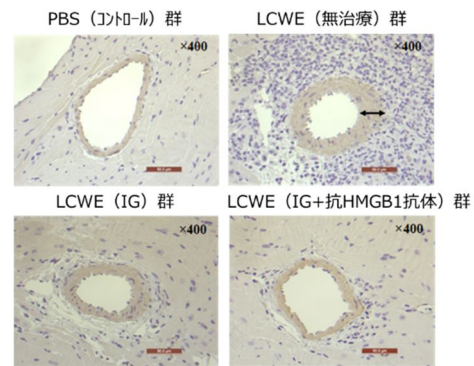


マウス心臓切片 (全体画像) x400

(α SMA 染色)

α SMA 染色画像では、LCWE 投与マウスの無治療群で血管平滑筋細胞が主体の α SMA 陽性細胞が増殖し内膜が肥厚しているのが確認された。IG 投与群および IG + HMGB1 抗体投与群では内膜の肥厚は認められなかった。

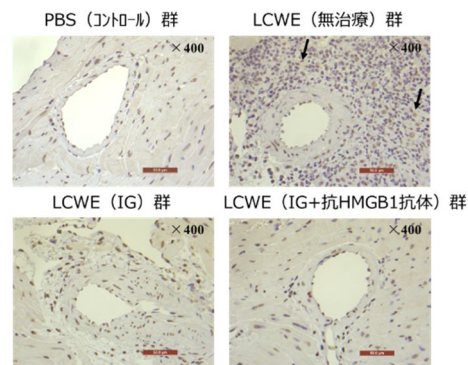
川崎病モデルマウス無治療群で血管平滑筋細胞の増生 (\blackleftrightarrow) が確認された。



マウス心臓切片 (全体画像) x400

(HMGB1 染色)

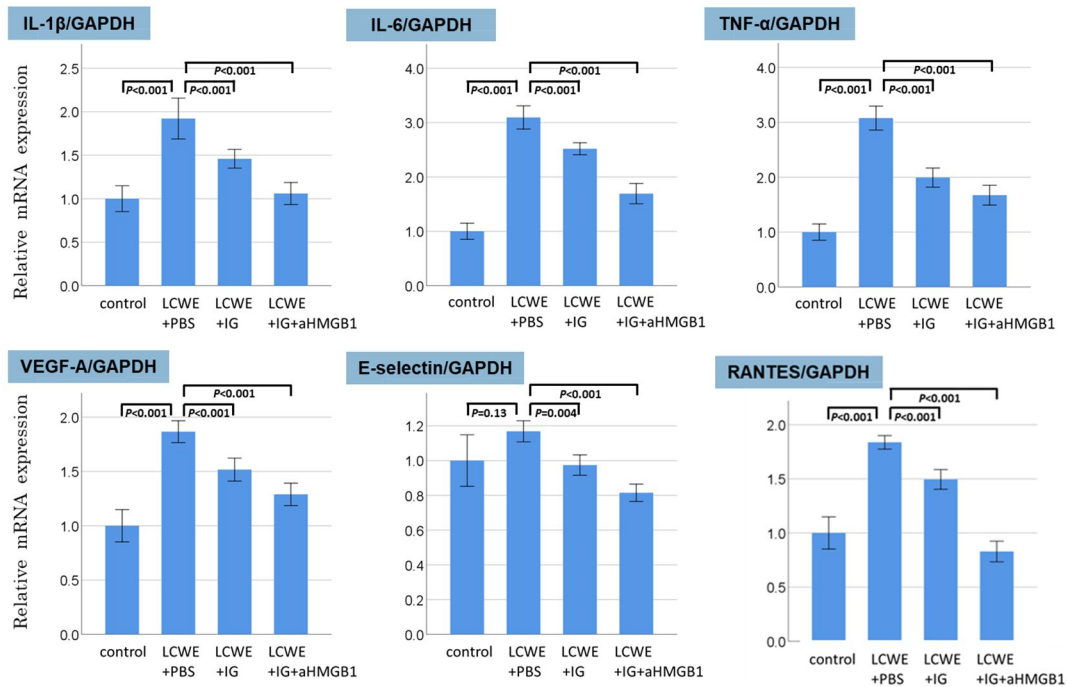
HMGB1 染色画像では、LCWE 投与マウスの無治療群で HMGB1 蛋白が濃染された。IG 投与群および IG + HMGB1 抗体投与群で HMGB1 蛋白の発現は抑制された。



マウス心臓切片 (全体画像) x400 ● HMGB1染色

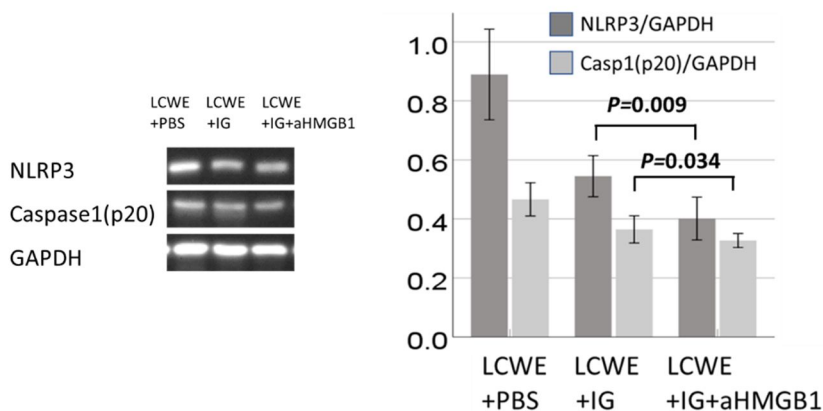
(3) 川崎病モデルマウスにおける HMGB-1シグナル関連因子の測定

川崎病モデルマウス無治療群で、コントロール群と比較し、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 や VEGF-A、E-selectin、RANTES の心臓組織内 mRNA の発現量が増加していた。これらの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現量は、川崎病モデルマウス IG 群で低下し、IG+aHMGB1 群でさらに低下した。



NLRP3/Casp1 の発現

川崎病モデルマウスでは無治療群と比較し、IG 群、IG+aHMGB1 群で発現量が低下し、さらに IG+aHMGB1 群では IG 群より有意に低下することが分かった。



(4) 川崎病モデルマウスにおけるサイトカインの発現

マルチプレックスサスペンションアレイは期間内に測定することができなかった。

川崎病モデルマウスを用いた本研究では、川崎病の治療として確立されている免疫グロブリン療法を行うことで冠動脈組織所見、炎症スコア、心臓組織内の炎症性サイトカインの発現は抑制されることが示されたが、免疫グロブリンに抗 HMGB1 抗体を投与することで、これらの発現がさらに抑制されることが分かった。川崎病では、標準的治療である免疫グロブリン持続静注療法に加えて抗 HMGB1 抗体を投与することで、冠動脈病変発症を抑制する可能性が示された。現在、各実験の再現性を確認し、期限内に終わることのできなかった実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamura Junpei, Ueno Kentaro, Taimura Eri, Matsuba Tomoyuki, Imoto Yutaka, Jinguji Megumi, Kawano Yoshifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Case Report: 18F-FDG PET-CT for Diagnosing Prosthetic Device-Related Infection in an Infant With CHD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 584741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2021.584741	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 -
1. 著者名 Horinouchi Kensuke, Ueno Kentaro, Nakae Koji, Kawamura Junpei, Kawano Yoshifumi	4. 巻 62
2. 論文標題 Successful treatment of pulmonary hypertension with unilateral absent pulmonary artery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 1117～1118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14262	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 -
1. 著者名 Ueno Kentaro, Kawamura Junpei, Kawano Yoshifumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Letter to the Editor (Author comments) “Determining risk factors of acute kidney injury after neonatal cardiac surgery”	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 648～649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-020-01891-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimozono Tsubasa, Ueno Kentaro, Shiokawa Naohiro, Ohno Seiko, Kawano Yoshifumi	4. 巻 63
2. 論文標題 Early diagnosis of infantile Danon disease complicated by tetralogy of Fallot	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 988～990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Kentaro, Shiokawa Naohiro, Takahashi Yoshihiro, Nakae Koji, Kawamura Jumpei, Imoto Yutaka, Kawano Yoshifumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Kidney Disease: Improving Global Outcomes in neonates with acute kidney injury after cardiac surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 167 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-019-01805-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagatome Yuka, Ueno Kentaro, Takahashi Yoshihiro, Hazeki Daisuke, Kawano Yoshifumi	4. 巻 61
2. 論文標題 Neonatal ventricular tachycardia: Adverse event possibly due to maternal ritodrine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 298 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Kentaro, Seki Shunji, Shiokawa Naohiro, Matsuba Tomoyuki, Miyazono Akinori, Hazeki Daisuke, Imoto Yutaka, Kawano Yoshifumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Validation of acute kidney injury according to the modified KDIGO criteria in infants after cardiac surgery for congenital heart disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 294 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.13240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Kentaro, Nomura Yuichi, Morita Yasuko, Kawano Yoshifumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Prednisolone Suppresses the Extracellular Release of HMGB-1 and Associated Inflammatory Pathways in Kawasaki Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2021.640315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋宜宏, 上野健太郎, 塩川直宏, 中江広治, 川村順平.
2. 発表標題 Fontan手術 1 か月後に左内胸動脈瘤を発症し、コイル塞栓術を行った三尖弁閉鎖症の 2 歳男児例.
3. 学会等名 第31回日本Pediatric Interventional Cardiology学会学術集会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 樫木大祐, 塩川直宏, 上野健太郎, 楠生 亮, 野村裕一, 吉永正夫.
2. 発表標題 学校心臓検診におけるQT延長スクリーニングを自動計測でおこなうための基準値.
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 川村順平, 塩川直宏, 高橋宜宏, 中江広治, 上野健太郎.
2. 発表標題 心室中隔欠損術後に肺高血圧症を合併したDown症候群患者の術前右心機能に関する検討.
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田井村依里, 川村順平, 三浦希和子, 中江広治, 上野健太郎, 河野嘉文.
2. 発表標題 徐脈発作を繰り返した発作性完全房室ブロックの乳児例.
3. 学会等名 第174回日本小児科学会鹿児島地方会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Kentaro Ueno
2. 発表標題 Prednisolone treatment ameliorates HMGB1 mediated inflammatory responses in Kawasaki disease
3. 学会等名 AEPC 2020 congress (第54回欧州小児心臓学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本川崎病学会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 68
3. 書名 川崎病診断の手引きガイドブック2020	

1. 著者名 日本川崎病学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 268
3. 書名 川崎病学 改訂第2版	

〔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	河野 嘉文 (Kawano Yoshifumi) (20260680)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	野村 裕一 (Nomura Yuichi) (90237884)	独立行政法人国立病院機構鹿児島医療センター（臨床研究部）・小児科・研究員 (87701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関