

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790993

研究課題名（和文） 川崎病の包括的研究・急性期病態と自然免疫の関連

研究課題名（英文） Association between innate immunity and pathophysiology of Kawasaki disease

研究代表者 池田 和幸（九州大学病院小児科講師）

九州大学・医学研究院・成長発達医学分野

研究者番号：30507786

研究成果の概要（和文）：

定量 PCR, マイクロアレイ解析により、自然免疫系が川崎病急性期の病態に深く関与していることが判明した。さらに、HCAECs を用いた *in vitro* の実験により、自然免疫系受容体の ligand である NOD1 ligand により ICAM-1 の発現や、IL-8 の産生が促進されることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Both microarray and quantitative RT-PCR analyses have shown that the innate immune system might be involved in the pathogenesis and pathophysiology of Kawasaki disease. NOD Ligands enhance ICAM-1 expression and cytokine production by human coronary artery endothelial cells *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1800000	540000	2340000
2010年度	1500000	112500	1612500
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	652500	3952500

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、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

川崎病の原著が 1967 年に発表されて以降、多くの原因解明研究がなされているが川崎病の原因はいまなお明らかになっていない。一方、川崎病急性期の病態は、免疫系の過剰な活性化を特徴とし、炎症性サイトカインおよびケモカインの上昇を伴うこ

とは報告されてきた。末梢血単核球 (PBMNC) がこれら chemical mediator の主要な産生源であるかははっきりしていない。

2. 研究の目的

本研究は、川崎病急性期の病態解析を通

じて、いまだ原因不明である川崎病の病因解明を最終目標とする。

3. 研究の方法

川崎病の急性期病態を明らかにするために、急性期 PBMNC の活性化については Flow cytometer を、急性期 PBMNC の遺伝子発現については、マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。

次に、自然免疫系受容体を刺激する菌もしくは菌体壁成分により、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト正常冠動脈内皮細胞(HCAECs)を *in vitro* で刺激した。

day1、3、5において、

a. ICAM-1(CD54)の発現を flow cytometer により解析した。

b. 培養上清中の IL-8、IL-6、IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、IL-12p70 産生を BDTM cytometric Bead Array により解析した。

<刺激に用いた ligands>

peptidoglycan (PGN、*S.aureus* 由来)、PGN K12 (*E.coli* 由来)、crude LPS、合成 lipid A (LPS の毒性中心)、Flagellin (*S.typhimurium* 由来)、Nod1 ligand (iE-DAP)、Muramyl dipeptide (MDP、NOD2 ligand)、zymosan を用いた。

4. 研究成果

【マイクロアレイデータを用いた Pathway 解析】

急性期川崎病患者 PBMNC についてマイクロアレイ解析および Pathway 解析を行った。その結果、Pathway 解析では急性期川崎病に関連のある上位 12 pathway のうち、獲得免疫に関連する 3 pathway が down-regulate されており、自然免疫に関連する 2 pathway が一部 up-regulate されていた。マイクロアレイ解析では、急性期で高発現の上位 10 遺伝子のうち 5 遺伝子

が自然免疫に関連していた(NAIP、IPAF、S100A9、FCGR1A、GCA)。一方、大半のサイトカイン発現レベルが上昇していなかった。

【定量 PCR】

マイクロアレイの結果に基づいて、定量 PCR を行った。その結果、S100A9、A12 発現レベルは川崎病急性期に有意に上昇したが、TNF、IL6、IL1B 発現レベルは上昇しておらず IL8 の上昇も軽度だった。

川崎病急性期の病態に自然免疫が関与している可能性が示唆されたため、自然免疫系受容体 (Toll-like receptors, TLR、NOD-like receptor, NLR) の発現レベルを定量 PCR により解析した。その結果、TLR2、3、4、9 発現レベルに有意な変化は認められなかった。一方、NOD1、NOD2 発現レベルは正常対照に比較して急性期で有意に上昇した。

以上の解析結果から、自然免疫系が急性期川崎病の病態に深く関与していることが示唆された。さらに、細胞内サイトカイン染色の結果から、PBMNC からは TNF- α 、IL-10、IFN- γ 等のサイトカインは殆ど産生されていなかったことから、PBMNC は IL-6 や TNF 等の炎症性サイトカインの主要な産生源でないことが判明した。

次に、自然免疫系受容体 ligand により内皮細胞を刺激することにより、川崎病急性期の病態における内皮細胞の役割を解析した。

【経時的変化 (HCAECs)】

a. ICAM-1 の発現

crude LPS による刺激では day1 で最も高値でその後減少傾向を示した。NOD1 ligand、MDP、PGN K12 による刺激では、day3 でピークを示した。

b. サイトカイン産生

crude LPS による刺激では day3~5 で IL-8 産生が高値を示した。PGN K12、MDP、Zymosan、NOD1 ligand 刺激では、IL-8 産生のピークは day5 であった。IL-6 産生は、crude LPS 刺激によってのみ認められ、他の 4 種類のサイトカイン産生は認められなかった。

【種々の濃度による Ligand 刺激 (day3, HCAECs)】

a. ICAM-1 の発現

細胞の viability、および ICAM-1 発現の結果から解析は day3 で行った。crude LPS、PGN K12 刺激により ICAM-1 の発現が強く誘導された。NOD1 ligand や MDP 刺激でも ICAM-1 の発現が誘導された。

b. サイトカイン産生

crude LPS、PGN K12、NOD1 ligand、zymosan 刺激により IL-8 産生が強く認められた。IL-6 産生は、crude LPS 刺激によってのみ認められ、他の 4 種類のサイトカイン産生はいずれの刺激でも認められなかった。

【NLR, TLR ligand の組み合わせによる相乗効果の検討】

HCAECsを用いたin vitroの実験において、ICAM-1の発現やサイトカイン産生の増強が、synthetic iE-DAP + MDP, もしくは iE-DAP + lipid Aの組み合わせで認められた。一方、IL-1, IL-10, TNF-a, IL-12p70 の産生は認められなかった。これらの結果から、Nod1およびNod2, TLR の合成 ligandによりHCAECsが活性化されることが判明した。

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 3 件)

1. Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 160: 246-55, 2010

2. Muneuchi J, Ishimura M, Takada H, Hoshina T, Utsunomiya R, Ikeda K, Yamaguchi K, Ohga S, Kusuhara K, Hara T: Incomplete Kawasaki disease in a patient with chronic granulomatous disease. Pediatr Int 52: e134-6, 2010

3. Yamamura K, Muneuchi J, Uike K, Ikeda K, Inoue H, Takahata Y, Shiokawa Y, Yoshikane Y, Makiyama T, Horie M, Hara T: A novel SCN5A mutation associated with the linker between III and IV domains of Na(v)1.5 in a neonate with fatal long QT syndrome. Int J Cardiol 145: 61-4, 2010

〔学会発表〕 (計 6 件)

1. Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. The 6th Congress of Asian Society of Pediatric Research. April 15-18, 2010. Taipei, Taiwan

2. Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood

mononuclear cells at acute phase of
Kawasaki disease.

The Fukuoka International Symposium
on Perinatal Medicine (FISPM). August
21, 2010. Fukuoka, Japan

3. 池田和幸、山村健一郎、井上普介、宗内
淳、永田弾、総崎直樹、角秀秋、原寿郎
重度細胞性免疫不全症のため動脈管ステ
ント留置術を選択した総動脈管症、大動脈弓
離断症の1例

第 21 回日本 Pediatric Interventional
Cardiology 研究会 2010.1.21-23 静岡

4. 池田和幸、山村健一郎、永田弾、松尾知
子、水野由美、原寿郎
Host genetic factor と臨床データを組み合
わせた新たな冠動脈病変(CAL)予測法の開
発

第 9 回九州川崎病研究会 2010.5.22 長崎

5. 池田和幸、山村健一郎、永田弾、松尾
知子、水野由美、原寿郎
Host genetic factor と臨床データを組み合
わせた新たな冠動脈病変(CAL)予測法の開
発

第 46 回日本小児循環器学会総会・学術集
会 2010.7.7-9 千葉

6. 池田和幸、山村健一郎、永田弾、松尾
知子、水野由美、原寿郎
遺伝子多型解析を用いた川崎病発症に関す
る宿主因子の検討
第 30 回日本川崎病学会 2010.10.10-11
京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者 池田和幸

研究者番号：30507786

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：