

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591579

研究課題名(和文)動物モデルを用いた川崎病血管炎発症メカニズムに関する分子免疫学的研究

研究課題名(英文)Experimental study on the pathogenesis of Kawasaki vasculitis

研究代表者

中村 明宏(Nakamura, Akihiro)

京都府立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50313854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は小児にみられる原因不明の血管炎で、しばしば冠動脈にみられるその後遺症は、青壮年期の虚血性心疾患の危険因子となる可能性が懸念されている。本研究ではその発症メカニズムを解明すべく、真菌成分誘発性川崎病モデルマウスを用いて、免疫生化学的研究を行い、その結果、1)炎症好発部位にIgM, MBLおよび補体が沈着すること、2)真菌成分による感染刺激で自己反応性IgMが増加すること、3)沈着するIgMはミトコンドリア酵素などのマウス蛋白質を認識していること、を見いだした。これらの知見は真菌成分による宿主の自然自己免疫および自然免疫系の活性化が、血管炎発症に関与することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is an idiopathic vasculitis in children. As its coronary sequelae could be a risk factor of ischemic heart diseases in young adulthood, elucidation of its pathogenesis is one of the most important issues in cardiovascular medicine. Using *Candida albicans* water soluble extract (CAWS)-induced mouse model for KD, we got the following results: 1) IgM, MBLs and C3-derived peptides deposited in the inflamed vasculature. 2) IgM type autoantibody was increased in response to CAWS-stimulation. 3) the autoantibody recognized some specific endogenous proteins including a mitochondrial enzyme. These findings suggest that some specific infectious stimuli provoke innate humoral immunity to cause sterile vasculitis such as Kawasaki disease.

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 真菌 動物モデル 自然免疫

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

川崎病の原因および発症機序については、ウィルス説、スーパー抗原説をはじめとしてこれまで数多くの仮説が提唱されてきたが、いずれも議論が続いており、今もってあきらかでない。しかし、近年の分子遺伝学的研究等から、川崎病病態の背景に、感染刺激に対する免疫応答の制御異常があることが示唆されている。また、ANCA 関連血管炎に代表されるように、川崎病を含め各種血管炎と自己免疫応答の関連は以前よりしばしば指摘されていた。こうした川崎病の病因および発症機序解明を目指す研究については、川崎病の標準的治療法として IVIG 療法が確立され、その急性期死亡率は大きく減少したことに伴い、近年、動物モデルを用いた研究にシフトしている。本研究代表者は、確立された川崎病モデルとして川崎病基礎研究に広く用いられているカンジダ抽出物誘発血管炎マウスモデルにおいて、本モデルマウスの炎症好発部位である冠動脈を含む大動脈起始部に IgM が集積するなどの予備的データを得た。この発見にもとづき、感染刺激で誘導された IgM 型自己抗体の血管炎発症における役割について、同動物モデルを用いて免疫生化学的研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は *Candida albicans* 細胞壁抽出画分 (CAWS) による刺激により誘導される IgM 型自己抗体の性質を解析し、CAWS-誘発川崎病様マウス血管炎発症におけるその役割を明らかにするとともに、川崎病の発症機序の解明および新規治療法開発に有用な知見を得ることを目標として実施した。

## 3. 研究の方法

川崎病マウスモデルは、大野らの確立した方法に準じ、カンジダ細胞壁抽出物水溶性画分 (CAWS) を DBA/2 マウス (雄、4-5 週齢) の腹腔内に 5 日間連続投与して作成した。対照群には PBS を同一条件にて投与した。投与終了後 1 日目、6 日目に血清採取および心臓を摘出し、生化学的、あるいは病理組織化学的分析に供した。作成した大動脈起始部の連続凍結切片について IgM, IgG, マンノース結合蛋白質 A (MBL-A), マンノース結合蛋白質 C (MBL-C) および補体 C3d に対する免疫染色を行った。また大動脈起始部を含む心臓組織の一部より蛋白質を抽出し、抗マウス IgM 抗体-磁性ビーズを用いて IgM-自己抗原複合体を精製した。さらに精製物について液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) による分析による自己抗原候補蛋白質の同定を行った。同結果についてはウェスタンブロットングによっても検証した。

一方、対照群および CAWS 投与マウスより血清を得て、これを 1 次抗体として、大動脈組織抽出蛋白質に対する反応性を 2 次元電気泳動法 / ウェスタンブロットングにより分析し、IgM 型抗体の潜在的な自己抗原の検出を試みた。さらに潜在的自己抗原蛋白質は LC-MS/MS により同定した。また予備的検討であるが、IgM 自己抗体により惹起される古典経路の関与について、C1 エステラーゼ阻害剤を腹腔内に投与し、その炎症抑制効果について病理組織学的に調べた。

## 4. 研究成果

血管炎初期より大動脈起始部、特に大動脈弁基部内膜側に IgM および MBL の沈着を認めた (IgM の沈着について添付図に示す)。これらの沈着は炎症の進展に伴い冠動脈、外膜側にも拡大した。また当該部位への補体成分 (C3 由来ペプチド) の沈着も認めた。CAWS 誘発マウス川崎病様血管炎には、IgM と MBL によるそれぞれ独立した、あるいは両者の協同した補体活性化が関与していることが示唆された。

炎症組織よりアフィニティー精製した IgM-自己抗原複合体について LC-MS/MS にて解析した結果、IgM とともにミトコンドリア酵素を含む 4 種の組織蛋白質を同定することができた。このうち 2 種は他の自己免疫疾患において主要な自己抗原としてすでに知られているものであった。さらにミトコンドリア抗原の存在はウェスタンブロットによっても確認している。CAWS 誘発川崎病様血管炎への、いわゆる抗ミトコンドリア抗体 (anti-mitochondria antibody :AMA) の関与が示唆される。同結果については現在、さらに詳細な検証作業を進めている。(Nakamura A et al 投稿準備中)

一方、血中の IgM が認識する自己抗原について 2-D PAGE と LC-MS/MS にて分析した。血中に存在する IgM 抗体は主としていくつかのミトコンドリア代謝酵素と一部の細胞質代謝酵素を主として認識した。これらの自己反応性 IgM は対照群においても低濃度で存在しており、その多くは自然抗体 (とくに自然自己抗体) と考えられる。また、CAWS 刺激に伴いこれら IgM 型自己抗体は増加する傾向を示した。以上の結果から、感染刺激にともないアップレギュレートした IgM 型自然自己抗体による組織傷害が、本モデルにみられる血管炎の病態機序の一部に関わる可能性が示唆された。IgM 型自然自己抗体についての先行研究は多くないため、まだ明らかでない点が多いが、虚血に伴う組織傷害の病態増悪に関与するなどの報告が散見される。しかし血管炎病態への関与については私達の知る限り、まだ報告は無い。なお本研究ではとくに蛋白

質抗原について分析を進めたが、IgM 自己抗体が変性した糖鎖やリン脂質を認識する可能性もあり、これらの分子の探索は今後の主要な課題と考えている。

IgM や MBL は補体経路（古典経路，レクチン経路）を活性化することが知られている。事実、本マウス血管炎モデルでは炎症部位に補体成分 C3 由来ペプチドの沈着を認めた。同血管炎の発症進展機序における IgM 依存性古典経路活性化の寄与を知るため、C1 エステラーゼ阻害剤を用いた予備的な治療実験を同マウスで試みた。その結果、弱い炎症抑制効果を示す傾向は見られたが、十分な炎症抑制を示す安定したデータを得るまでには至っておらず、今後投与量、投与時期、等の実験プロトコルを検討する必要と考えられる。また古典経路のみならず近年明らかになりつつある MBL による直接の、あるいは IgM を介した MBL によるレクチン経路活性化の関与も考えられる。この点についてさらに明らかにすることも今後の課題とする。なお、IgM および MBL の、CAWS 刺激など感染刺激に対する生体防御機構をになう分子としての本来の役割を考えた時、CAWS 投与など感染刺激時に、単純にこれらの補体経路を抑制することの適否については慎重な考察が必要であり、今後は炎症部位のみならず他臓器も含めた総合的な検索を行うべきものと考えている。以上の点から本モデルを用いた治療実験については、実験のデザイン等さらなる検討が必要と考えられる。

マウスモデルから得られた本研究結果から、ヒトの川崎病の発症機序を論じるにあたっては、臨床検体の生化学的、免疫学的データとの十分かつ慎重な比較検討が不可欠である。ただ川崎病患者血漿中の IgM 型抗体の有意な増加あるいは川崎病における自己抗体の関与を示唆する報告はいくつかあり、マウスモデルの研究から得られた知見は今後、ヒト川崎病病態の解明に資するものがあると考えられる。

#### 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2件)

1) Nakamura A, Okigaki M, Miura N, Suzuki C, Ohno N, kametani F, Hamaoka K.

Involvement of mannose-binding lectin in the pathogenesis of Kawasaki disease-like murine vasculitis.

Clin Immunol. 2014, 153, 64-72. 査読有り

2) Suzuki C, yahata T, Okamoto-Hamaoka

A, Fujii M, Yoshioka A, Niwa Y, Ikeda K, Nakamura A, and Hamaoka K.

Utility of whole-blood aggregometry for evaluating anti-platelet therapy for Kawasaki disease.

Pediatr Int. 2013, 55, 550-4. 査読有り

[学会発表](計3件)

1) Okamoto-Hamaoka A, Fujii M, Suzuki C, Yahata T, Nakamura A, Ikeda K, Takamastu T, Hamaoka K. The involvement of vasa vasorum in development of vasculitis in the Kawasaki disease animal model. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for European Pediatric and Congenital Cardiology. 22<sup>nd</sup>-25<sup>th</sup> May 2013. London.

2) Nakamura A, Okigaki M, kametani F, Miura N, Ohno N, Hamaoka K. Possible involvement of natural immune systems in the pathogenesis of Kawasaki disease.

10<sup>th</sup> International Kawasaki Disease Symposium, Kyoto, Japan (Feb. 7<sup>th</sup> -10<sup>th</sup>, 2012)

3) Suzuki C, Yahata T, Hamaoka A, Fujii M, Nakamura A, Miura N, Ikeda K, Hamaoka K. Experimental study on etiological participation of oxidative stress in vasculitis by Kawasaki disease. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for European Pediatric and Congenital Cardiology. (May 23-26, 2012) Istanbul.

4) 中村明宏 (他4名) カンジダ誘発川崎病様血管炎における IgM 型自己抗体に関する免疫生化学的研究 (2011年, 9月30日~10月1日, 横浜) 第31回日本川崎病学会

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村明宏 (Akihiro Nakamura)

京都府立医科大学医学部、研究員

研究者番号: 50313854

##### (2) 研究分担者

濱岡建城 (Kenji Hamaoka)

京都府立医科大学大学院医学研究科、教授

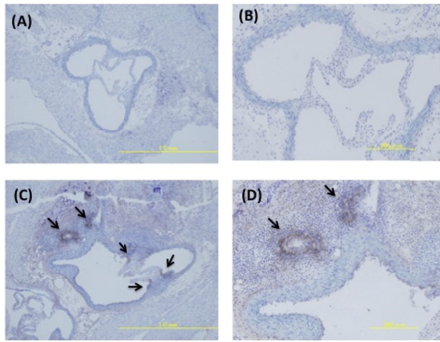
研究者番号: 60189602

##### (3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号:

## 添付図



対照群マウス (A,B)およびCAWS誘発川崎病様血管炎モデルマウス(C,D)の大動脈起始部の抗IgM抗体による免疫染色。 IgMの沈着部位を矢印で示す。A, Bは弱拡大、C,Dは強拡大像。