

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591587

研究課題名(和文)川崎病発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Kawasaki disease onset mechanism

研究代表者

深澤 隆治 (Ryuji, Fukazawa)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80277566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病の発症機序を解明するため、川崎病モデルマウスを解析した。Candida Albicans Water Soluble Fraction (CAWS)はマウスに川崎病類似の血管炎を生じた。血管炎はTNF 受容体阻害薬で著名に抑制され、血管炎の程度と血中TNF 濃度とは強い正の相関を認めた。遺伝子発現プロファイリングでは、自然免疫に関わる遺伝子が強く抑制されていた。川崎病症例とCAWS血管炎での血清サイトカインプロファイリング比較では、高い類似性を認めた。川崎病とCAWS血管炎は組織学的、生化学的、治療反応性において類似していた。川崎病発症には自然免疫とTNFが深くかかわることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of Kawasaki disease (KD) onset, we analyzed mouse KD model.

Intra-peritoneal injection of Candida Albicans Water Soluble Fraction (CAWS) induced severe arteritis resembling KD in mice. Arteritis was markedly reduced by Tumor Necrosis alpha (TNF α) receptor blocker, and serum TNF α level positively correlated with arteritis severity. In addition, Gene expression profiling revealed TNF α receptor blocker attenuated genes, associated with innate immunity. Serum cytokines expression profiling of KD patients was quite similar to that of CAWS arteritis.

All of these findings suggested that Kawasaki disease arteritis and CAWS arteritis have similar biological features. And innate immunity and TNF pathway are associated with KD onset.

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 川崎病モデルマウス 遺伝子プロファイリング サイトカインプロファイリング Tumor Necrosis Factor Innate Immunity

1. 研究開始当初の背景

- (1) 川崎病は原因不明の血管炎で、乳幼児を中心に毎年約1万人の新規発症があり、急性期治療が進歩した現在でも約5%に冠動脈瘤をはじめとした心後遺症を残す。原因はいまだ不明であるが、感染などの外的要因を契機とし、宿主の多遺伝子的要因、環境因子が組み合わさって発症する多因子疾患であると考えられる。
- (2) 我々はこれまで川崎病発症初期の遺伝子発現を解析する目的で、川崎病患者の入院時血小板を採取し、川崎病発症に関わる初期のサイトカイン発現動態の解析を試みた。血小板は脱核しており、それ自体には新たな遺伝子発現はないが、放出の際に数千の遺伝子トランスクリプトを含蓄するため、血小板の遺伝子トランスクリプトをプロファイリングすることで、川崎病発症初期のメカニズムを解析可能であった。その結果、川崎病発症初期には自然免疫と補体の関与があることが判明した。

2. 研究の目的

川崎病の発症機序を解明するために、川崎病モデルマウスを用いて、その血管炎の発症機序を解明し、川崎病との類似性を確認する。川崎病モデルマウスでの血管炎発症機序が、川崎病の発症機序として証明されるかを確認する。

- (1) *Candida Albicans* Water Soluble Fraction (CAWS) を用いてマウスに冠動脈炎を生じさせる川崎病モデルマウスを用いて、その血管炎の発症機序を解明する。
- (2) CAWS による血管炎と川崎病症例との類似性を確認し、CAWS 血管炎での血管炎発症機序が川崎病についても認められ

るかを検証する。

3. 研究の方法

4~5週齢の DBA/2 マウスに CAWS 0.5mg を5日間連続腹腔内投与することで冠動脈を含む大動脈基部に強い血管炎が惹起される。このマウス CAWS 血管炎モデルを用いて実験を行った。

- (1) 川崎病治療薬の CAWS 血管炎抑制作用効果を確認する。

CAWS 血管炎を惹起したマウスに、免疫グロブリン(IgG)、Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα) 受容体阻害薬 (Etanercept)、メチルプレドニゾロン、シクロスポリンを投与し、それぞれの血管炎抑制効果を組織学的に評価した。また、BioRad 社 BioPlex による血清サイトカインプロファイリングを行い、サイトカインの抑制効果を評価した。

- (2) 川崎病治療薬の血管抑制効果の機序を確認するために、Agilent 社製 DNA チップを用いてマウス血中白血球の遺伝子プロファイリングを行い、どのような遺伝子が CAWS 血管炎抑制に効果を表すのかを確認した。

- (3) CAWS 血管炎と川崎病との共通性を確認するため、川崎病患者と CAWS 血管炎の血清サイトカインプロファイリングを確認した。

マウス血清中サイトカインの測定は *BIO-RAD* Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Standard Group 123-Plex

を用いて行った。また、川崎病にて入院となった症例から入院時の治療前の採血を行い、その血清から *BIO-RAD* Bio-Plex Pro™ human Cytokine Standard Group 123-Plex を用いてサイトカインの測定を行った。測定された炎症性サイトカインのなかで、ヒトとマウ

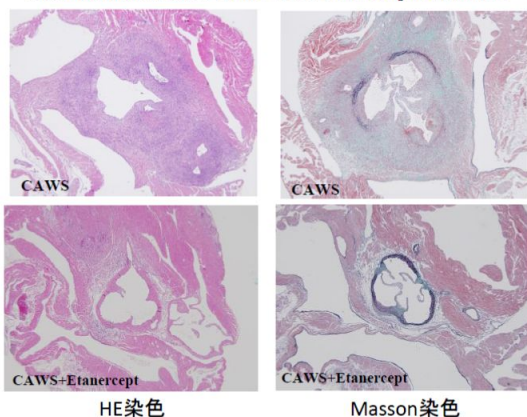
スで比較可能なサイトカインをコントロールに対する比で表現し、比較した。

4. 研究成果

(1) 川崎病治療薬の CAWS 血管炎抑制効果の確認

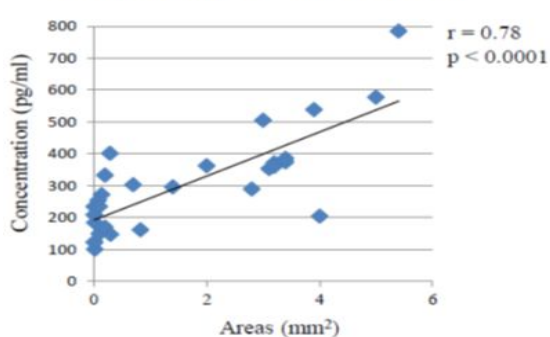
川崎病治療薬それぞれに種々の程度の血管炎抑制効果が認められた。特に、Etanercept は組織学的に血管炎を著明に抑制し（図1）

図1: CAWS 腹腔注射後4Wの血管炎とEtanerceptの抑制効果



IL-6、IL-12、TNF α 等のサイトカインの上昇を著明に抑制していた。また、TNF α の血清濃度と組織学的血管炎の重症度とは強い正の相関が認められた。（図2）

図2: Inflammatory areas vs TNF- α



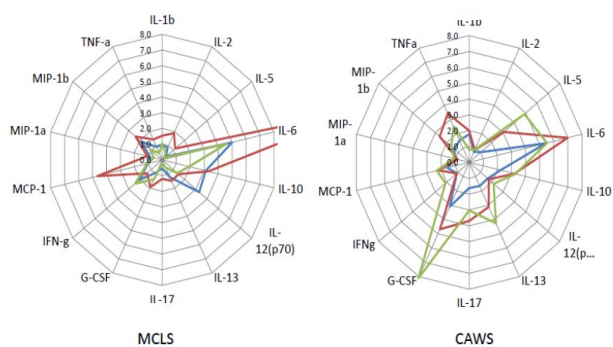
(2) CAWS 血管炎における遺伝子プロファイリングの確認

CAWS により発現が亢進した遺伝子において、IgG および Etanercept とともに発現が抑制された遺伝子は126 遺伝子存在し、GO Term による分類では defense response, immune system process, inflammatory response, innate immune response, TNF super family cytokine などが有意に抑制を受けていた。またパスウェイ解析においては、抑制される遺伝子が多く含まれるパスウェイとして、自然免疫にかかわるパスウェイがあげられた。

(3) CAWS 血管炎と川崎病とのサイトカインプロファイリングまたの比較

CAWS 血管炎および川崎病ともに、IL-6、IL-10 の上昇が著しかった。加えて、CAWS 血管炎ではG-CSF の発現高値を認めたが、全体的にはマウス CAWS 血管炎と川崎病の血清サイトカインプロファイリングでは、極めて類似する炎症性サイトカインの発現パターンを示していた。（図3）

図3: 川崎病とCAWS血管炎のサイトカインプロファイル



川崎病と CAWS 血管炎とは、病理組織学的類似性、治療薬剤の反応に対する類似性、血清サイトカイン発現パターンの類似性が確認された。以上のことから、CAWS 血管炎は川崎病のモデルと考えられる可

能性が一層高くなったと結論された。また、血管炎発症にあたっては自然免疫と TNF パスウェイが深くかかわっていると考えられた。

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) Ohashi R, Fukazawa R, Ogawa S, Ohno N, et al. Etanercept Suppresses Arteritis in a Murine Model of Kawasaki Disease: A Comparative Study Involving Different Biological Agents Int J Vasc Med、査読有、Vol. 2013、p1-10、DOI: 10.1155/2013/543141
- (2) Kobayashi T, Saji T, Otani T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Fukazawa R, Ogawa C, Furuno K, Tokunaga H, Takatsuki S, Hara S, Morikawa A, investigators Rsg.: Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe kawasaki disease (RAISE study): A randomised, open-label, blinded-endpoints trial. *Lancet*. 379:1613-1620, 2012
- (3) Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, Shimizu C, Terai M, Hamada H, Honda T, Suzuki H, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Suzuki Y, Yasukawa K, Ebata R, Higashi K, Saji T, Kemmotsu Y, Takatsuki S, Ouchi K, Kishi F, Yoshikawa T, Nagai T, Hamamoto K, Sato Y, Honda A, Kobayashi H, Sato J, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Murata Y, Sasago K, Takahashi A, Kamatani N, Kubo

M, Tsunoda T, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T, Japan Kawasaki Disease Genome C (Abe J, Kobayashi T, Arakawa H, Ichida F, Nomura Y, Miura M, Ikeda K, Hara T, Fukazawa R, Ogawa S, Hamaoka K), Consortium USKDG.: A genome-wide association study identifies three new risk loci for kawasaki disease. Nat Genet. 44:517-521, 2012

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Fukazawa R: What is new in Kawasaki disease: Any breakthrough in aetiology? NHAM (National Heart Association of Malaysia) annual scientific meeting 2013. Kuala Lumpur, Malaysia, 2013
- (2) Fukazawa R, Ogawa S, et al.: Nationwide Survey of Patients with Giant Aneurysm Caused by Kawasaki Disease in Recent 10 Years: Analysis of Myocardial Infarction and Cardiac Death. American Heart Association Scientific Session, Dallas, USA, 2013
- (3) Ohashi R, Fukazawa R, Ohno N, Ogawa S. Comparison of 4 Different Biological Agents for Suppression of Arteritis in a Kawasaki Disease Mouse Model 2013 年 3 月 The 77th Annual Scientific Meeting of the Japan Circulation Society 横浜
- (4) 深澤隆治、渡邊 誠、小川俊一、川崎病モデルマウスにおける血管炎の発症機序の解明 2012 年 9 月 第 60 回日本心臓病学会 金沢
- (5) 深澤隆治、大野尚仁、三浦典子、渡邊 誠、阿部正徳、林 美雪、池上 英、橋本康司、小川俊一 川崎病モデルマウス遺伝子解析による川崎病発症機構の解明

2012年7月 第48回日本小児循環器学会 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤隆治 (Ryuji Fukazawa)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80277566

(2) 研究分担者

小川俊一 (Shunichi Ogawa)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：50194436

(3) 連携研究者

大野尚仁 (Naohito Ohno)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80152213