

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：24303  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659526  
 研究課題名（和文） 難治性川崎病における血小板蛋白の網羅的解析と新しい標的治療のための萌芽的検討  
 研究課題名（英文） Comprehensive Analysis of Platelet Protein in High-Risk Kawasaki Disease  
 研究代表者  
 浜岡 建城（HAMAOKA KENJI）  
 京都府立医科大学・医学研究科・教授  
 研究者番号：60189602

## 研究成果の概要（和文）：

対象成人例での血液検体は、①血小板の単離と全血マイクロパーティクルの生成、②蛋白質の沈殿物、③溶液中での消化、④ハイドロゲル ナノ粒子培養、⑤ナノ HPLC-MS/MS 分析、⑥データベース検索および蛋白質同定、の順に検討された。ナノ粒子濃縮と溶液中消化によって、結果的に 603 の蛋白質グループが同定された。

今回の研究では血液サンプルから PMP 蛋白質の特性分析に向けた迅速で簡単なプロトコルを確立した。今後さらに、川崎病例の各病態での血小板蛋白動態を検討し、その意義を検討する予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

We evaluated using blood samples of adult control in order as follows: ①isolation of blood platelet and production of microparticle in blood, ②deposit or sediment of protein, ③digestion in solution or medium, ④culture of hydrogel nano-particle, ⑤nano-analysis with HPL-MS/MS, ⑥search of data base and identification of protein. In result, 603 protein groups were identified by nano-particle concentration and digestion in solution.

In this study, the rapid and simple protocol for analysis of characteristics of PMP protein in blood sample.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：小児循環器学、血小板、マイクロパーティクル、プロテオミクス、質量分析、川崎病

## 1. 研究開始当初の背景

川崎病では免疫グロブリン大量療法

(IVIG) が標準治療に位置づけられているが、10%以上の症例が IVIG に不応の難治例である (Wallace et al Pediatrics 200;105:78)。また、IVIG 不応例は IVIG 反応例と比べ冠動脈障害が 8~10 倍の高頻度で発現し、この IVIG 不応が患者の予後を決定する冠動脈病変 (CAL) 形成と密接に関連している (Uehara et al Pediatr Infect Dis J 2008) ことから、難治例に対する治療法の確率が早急に求められている。

## 2. 研究の目的

### 研究の目的

川崎病では血小板の数・形態とともに活性化も大きく変動するが、免疫グロブリン大量療法 (IVIG) 不応のリスク因子として血小板数減少も指摘され、IVIG 不応に代表される難治性病態には血小板の数的・質的異常が関与していると考えられる。無核細胞である血小板では、蛋白の発現調節は転写レベルではなく主に転写後に制御されるため、動態解析には蛋白レベルの検討が必要である。そこで難治性病態に関わる候補分子群の選定を目的に、川崎病患者の血小板蛋白をネイティブ電気泳動および質量分析を用いてプロファイリングする。特に転写後修飾のパターンに注目し、またリン酸化に関してはアフィニティークラムを用いてより鮮明に分子選定を行う。そこで難治性病態に関わる候補分子群の選定を目的に、川崎病患者の血小板蛋白をネイティブ電気泳動および質量分析を用いてプロファイリングする。特に本研究では 2 年間をかけて同様の方法で特に血小板マイクロパーティクル (PMP) タンパク質の特徴分析を中心として、血小板蛋白のプロファイルを完成させ、IVIG 不応に関する分子候補の選定を目的とした。

## 3. 研究の方法

IVIG 有効および不応の川崎病患者血小板を用いプロテオミクス解析を行う。今回は転写後修飾に焦点をあてて解析を進めるため、ネイティブ PAGE での二次元展開および MALDI-TOF/MS でプロファイリングを進め、特に重要と考えられるリン酸化については IMAC を用いて濃縮後に MALDI-TOF/MS あるいは LC-MS/MS でペプチド断片を解析、MASCOT 解析で同定を試みる。このようにマインニングされたデータについて、再現性、安定性を検定の上で同一患者由来検体間 (経時的比較)、治療反応性に関する患者群間で比較検討する。最後にバイオインフォマティクスの手法でクラスタリングし、有意な分子群を選定する。

PMP 蛋白質の特徴分析のためには、ナノ HPLC 分離によるショットガンプロテオミクス手法を使用し、引き続いて LTQ オービトラップ XL による質量分析が行われた。使用した分析プラットフォームはすでに報告されている通り、標準的なショットガン法とともに低分子質量および低量の蛋白質道程を改善するための濃縮化システムである。

## 4. 研究成果

対象成人例での血液検体は、①血小板の単離と全血マイクロパーティクルの生成、②蛋白質の沈殿物、③溶液中での消化、④ハイドロゲル ナノ粒子培養、⑤ナノ HPLC-MS/MS 分析、⑥データベース検索および蛋白質同定、の順に検討された。ナノ粒子濃縮と溶液中消化によって、結果的に 603 の蛋白質グループが同定された。

今回の研究では血液サンプルから PMP 蛋白質の特性分析に向けた迅速で簡単なプロトコルを確立した。今後さらに、川崎病例の各病態での血小板蛋白動態を検討し、その意義を検討する予定である。

## 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6件)

- ① Yoko Kawai, Kenji Hamaoka, Spontaneous Thrombotic Obstruction of Aneurysmal Coronary Artery
- ② Arteriovenous Fistula. *Pediatric Cardiol*, 2012. PMID:23341051
- ③ Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Hamaoka K. Dynamics of reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in the acute stage of Kawasaki disease. *Circulation Journal* 2011;75(10):2453-9 (査読有)
- ④ Tohru Kobayashi, Tsutomu Saji, Tetsuya Otani, Kazuo Takeuchi, Tetsuya Nakamura, Hirokazu Arakawa, Taichi Kato, Toshiro Hara, Kenji Hamaoka, Shunichi Ogawa, Masaru Miura, Yuichi Nomura, Shigeto Fuse, Fukiko Ichida, Mitsuru Seki, Ryuji Fukazawa, Chitose Ogawa, Kenji Furuno, Hirohide Tokunaga, Shinichi Takatsuki, Shinya Hara, Akihiro Morikawa, on behalf of the RAISE study group investigators. Efficacy of immunoglobulin prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease (RAISE study): a randomized, open-label, blinded-endpoints trial. *The Lancet*. 379: 1613-20, 2012. (査読有)
- ⑤ Nakamura A., Hamaoka A., Fujii M., Yahata T., Suzuki C., Yoshioka A., Niwa N., Ikeda K., Hamaoka K. Possible Involvement of the Natural Immune

Systems in the Pathogenesis of Kawasaki Disease. *Cardiology in the young*. 22(Sup. 1), 2012.

- ⑥ Hamaoka A, Fujii M, Suzuki C., Yahata T., Yoshioka A., Niwa Y., Nakamura A., Ikeda K., Hamaoka K. Dynamic Changes in the Vaso-Vasorum as an Inducing Factor for Vasculitis in Kawasaki Disease. *Cardiology in the young*. 22(Sup. 1), 2012.
- ⑦ Yahata T, Suzuki C., Hamaoka A., Fujii M., Ikeda K., Hamaoka K. Correlation between calcification and oxidative stress in chronic Kawasaki disease. *Cardiology in the Young*. 22(Sup. 1), 2012.

[学会発表] (計3件)

- ① 鈴木千夏、八幡倫代、濱岡亜希子、藤井麻衣子、中村明宏、三浦典子、濱岡建城：川崎病血管炎発症における参加ストレスの一時的関与について、第25回近畿小児科学会、2012. 3. 11. 京都
- ② 鈴木千夏、中村明宏、八幡倫代、岡本亜希子、藤井麻衣子、三浦典子、池田和幸、沖垣光彦、濱岡建城：川崎病血管炎発症における血管外膜の酸化ストレス障害の関与について、第32回日本川崎病学会・学術集会、2012. 10. 12-13. 東京
- ③ 丹羽陽子、中村明宏、岡本(濱岡)亜希子、藤井麻衣子、八幡倫代、鈴木千夏、濱岡建城：川崎病における動脈硬化の発生機構の仮説—脱分化型平滑筋の動態を中心として、第32回日本川崎病学会・学術集会、2012. 10. 12-13. 東京

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜岡 建城 (HAMAOKA KENJI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60189602

(2) 研究分担者

小澤 誠一郎 (OZAWA SEIICHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40405246

中村 明宏 (NAKAMURA AKIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・博士研究  
員

研究者番号：50313854

秋岡 親司 (AKIOKA SHINJI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60598093

(3) 連携研究者

なし