

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591584

研究課題名(和文) 難治性川崎病に対するNFAT経路遮断薬による新たな治療法開発の試み

研究課題名(英文) Functional mechanism of cyclosporin A therapy for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease

研究代表者

武内 崇 (Takeuchi, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10246522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：KDへのCsA投与時の免疫応答は未解明な点が多い。CsA例、初回IVIG奏功例、追加IVIG奏功例の末梢血を用い、NFAT経路とJAK-STAT経路のCsAとの関連性を検討した。STAT3,5のリン酸化活性と遺伝子発現量を測定しCsA群で、CsA後にFCMで好中球、リンパ球pSTAT3のMFIが低下した。1st群で、IVIG後にSTAT3, 5A, 5Bの遺伝子発現量が低下し、FCMでリンパ球pSTAT3のMFIが低下した。初回IVIG後、1st群で2nd群よりNFATc1発現量が高値だった。IVIG不応KDでCsAはNFATやJAK-STAT経路に影響するがNFAT以外の関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The functional mechanism of CsA therapy in KD patients has remained unclear. To evaluate the NFAT pathway and activation of JAK and STAT pathway, we examined the gene expression using real-time RT-PCR and, pSTAT3 and pSTAT5 using flow cytometry. Thirty-six KD patients were divided into three groups: responsive to initial IVIG, responsive to additional IVIG, and treated with CsA group. In the CsA group, expression of mRNAs for interleukin-2, NFATc1 and NFATc2 was significantly increased, whereas the mean fluorescence intensity (MFI) of pSTAT3 (CD3+ T cell) and pSTAT3 (CD16b+ granulocyte) was decreased after CsA treatment. In the group responsive to initial IVIG, the expression of mRNAs for STAT3, 5A, 5B was decreased after IVIG treatment; on the other hand, the MFI of pSTAT3 (CD3+ T cell) and pSTAT3 (CD16b+ granulocyte) was decreased, and that of pSTAT5 (CD16b+ granulocyte) was increased, after IVIG. Our results suggest that CsA may act through a mechanism other than the NFAT pathway.

研究分野：小児循環器学

キーワード：難治性川崎病 シクロスポリンA NFAT ITPKC CASP3

1. 研究開始当初の背景

当院では川崎病 (KD) 急性期に、2 回のガンマグロブリン (IVIG) 無効例にシクロスポリン A (CsA) を投与し効果を得ている。CsA は Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) 経路の活性を抑制する (図 1) が、投与時の免疫応答について未解明な点が多く残っている。川崎病の病因、病態は未解明な点が多く、難治性 KD や重症 KD に対して CsA がどのような免疫応答をもたらしているか不明である。最近、当教室の Suzuki らは難治性 KD 患児の急性期において、炎症性サイトカインであるインターロイキン-2 (IL-2) の受容体である、可溶性インターロイキン-2 受容体 (sIL-2R) とインターロイキン-6 (IL-6) の血中濃度が有意に上昇するとの報告をした (Pediatr Int. 2010)。ヒトにおける免疫系には、主に、細胞性免疫と、液性免疫が存在する。IL-2 は細胞性免疫に關与する重要なサイトカインであり、一方で IL-6 は液性免疫に關与する。すなわち、KD に罹患すると、体内の免疫系では、細胞性免疫、液性免疫の活性化の両者が關与していることが考えられる。IL-2 は T 細胞膜表面に存在する受容体に結合し、受容体タンパク質と会合している JAK1/3 が活性化され、細胞内で引き続き Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 5 の活性化をもたらす。STAT5 は核内へ移行し、以降の免疫応答を引き起こす。一方で、IL-6 が細胞膜表面の受容体に結合すると JAK1/1 が活性化され、引き続き STAT1/3 が活性化され、核内へ移行し、転写活性化を引き起こす。すなわち、KD 罹患児の急性期、治療過程において、FCM で細胞内シグナル伝達物質として各 STAT を測定することで各免疫担当細胞の活性化の状態を把握することができると思われる。

NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) pathway

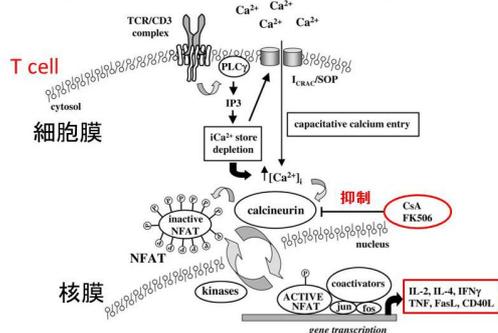


図1 シクロスポリン A の作用機序

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性川崎病における、CsA 投与時およびガンマグロブリン投与時の NFAT 経路および炎症性サイトカインシグナル伝達経路である JAK-STAT 経路の関与を解明することである。

3. 研究の方法

NFAT 経路と JAK-STAT 経路の関与を明らかにするために、2012 年 4 月から 2014 年 12 月の間に、CsA 投与例 (CsA 群、n=10)、初回 IVIG 奏功例 (1st 群、n=19)、追加 IVIG 奏功例 (2nd 群、n=7) の KD 急性期の末梢血を得た。mRNA を採取し、realtime RT-PCR にて細胞内シグナル伝達物質等の遺伝子発現量を計測し、同時に、フローサイトメトリー (FCM) で phospho Signal Transducer and Activator of Transcription (pSTAT) 3, 5 の平均蛍光強度 (MFI) の計測を行った。

4. 研究成果

CsA 群で、CsA 投与後に NFATc1, c2 の遺伝子発現量が共に有意に上昇し (図 2)、FCM で pSTAT3 (CD3+, CD16b+) の MFI が共に有意に低下した (図 3)。また、1st 群で、IVIG 投与後に STAT3, 5A, 5B の遺伝子発現量が低下し (図 3, 4)、NFATc1, NFATc2 の発現量が上昇した (図 2)。FCM では、pSTAT3 (CD3+, CD16b+) の MFI が低下し (図 3)、pSTAT5 (CD16b+) の MFI が上昇した (図 4)。1st 群と 2nd 群の比較では、初回 IVIG 後、1st 群で NFATc1 発現量が高値であった (図 2)。

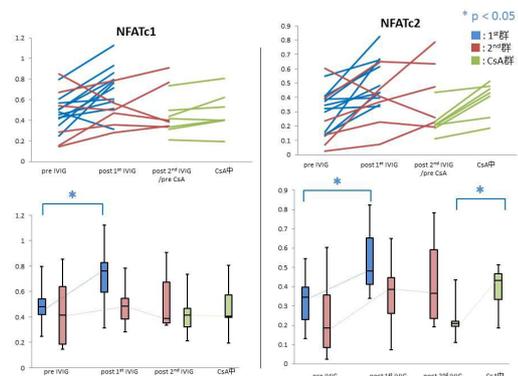


図 2. NFATc1, c2 発現量

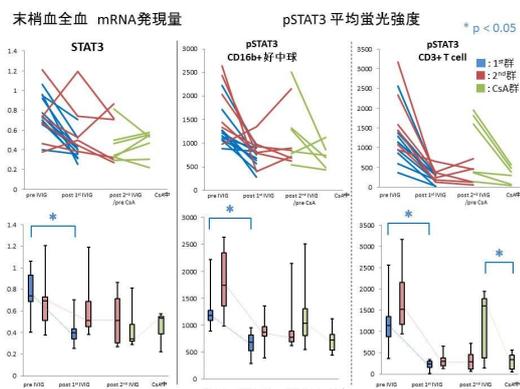


図 3. STAT3 発現量、pSTAT3 平均蛍光強度

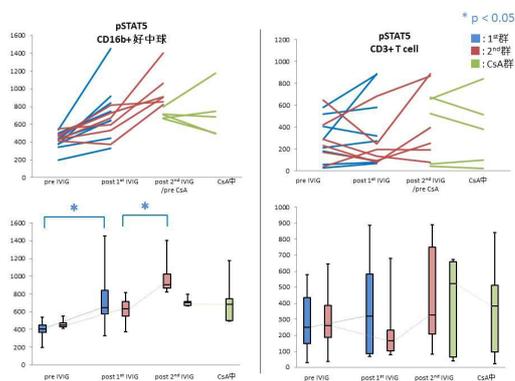


図 4. pSTAT5 平均蛍光強度

以上の結果から、CsA、IVIg 共に治療に反応した場合に、NFATc1、NFATc2 の発現量が上昇しており、NFAT の活性化が抑制されたことにより、ポジティブ・フィードバックが生じて NFAT の遺伝子発現量が増加していることが示唆される。また、STAT3、5 の発現量、pSTAT3、5 の MFI の変化を認めたことは、STAT3 と STAT5 の経路がそれぞれ、CsA、IVIg の投与に対する免疫応答に関与し、CsA の作用機序として、NFAT 経路以外の関与が示唆された。

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 13 件)

1. Kakimoto N, Suzuki H, Kubo T, Suenaga T, Takeuchi T, Shibuta S, Ino Y, Akasaka T, Yoshikawa N.: Evaluation of coronary arterial lesions due to Kawasaki disease using optical coherence tomography. Canadian Journal Cardiology 査読有 30 (8):956. e7-9, 2014
2. Kitano N, Suzuki H, Takeuchi T, Suenaga T, Kakimoto N, Shibuta S, Yoshikawa N, Takeshita T.: Epidemiologic features and prognostic factors of coronary artery lesions associated with Kawasaki disease based on a 13-year cohort of consecutive cases identified by complete enumeration surveys in Wakayama, Japan. J Epidemiology 査読有 24(5):427-434, 2014
3. 末永智浩, 鈴木啓之, 垣本信幸, 佐藤 匡, 武内 崇, 吉川徳茂, 渋田昌一: 川崎病の急性期におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-3(MMP-3)と関節症状との関連性 Prog Med 査読無 34:1245-1249, 2014
4. 鈴木啓之: シクロスポリン A 治療 小児内科 査読無 46(6): 759-762, 2014
5. 鈴木啓之, 末永智浩, 垣本信幸, 武内 崇, 渋田昌一: シクロスポリン A 治療 日本臨床 査読無 72(9): 636-1640, 2014
6. 鈴木啓之: 川崎病の診断と治療 医学のあゆみ 査読有 246(1): 27-33, 2013
7. 末永智浩, 鈴木啓之, 垣本信幸, 武内 崇, 吉川徳茂, 渋田昌一: 川崎病の急性期に突発性発疹を発症した 1 例 Prog Med 査読無 33:1458-1460, 2013
8. Onouchi Y, Suzuki Y, Suzuki H, Terai M, Yasukawa K, Hamada H, Suenaga T, Honda T, Honda A, Kobayashi H, Takeuchi T, Yoshikawa N, Sato J, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Murata Y, Ebata R, Higashi K, Ozaki K, Sasago K, Tanaka T and Hata A.: ITPKC and CASP3 polymorphism and risks for IVIG unresponsiveness and coronary artery lesion formation in Kawasaki disease. The Pharmacogenomics journal 査読有 13(1):52-59, 2013
9. 鈴木啓之: 川崎病の治療 日本臨床 (増刊号) 査読無: 132-136, 2013
10. 鈴木啓之: 免疫抑制剤シクロスポリン A の有用性 小児科臨床 査読無 66(1): 25-31, 2013
11. 垣本信幸, 鈴木啓之, 末永智浩, 武内 崇, 吉川徳茂, 渋田昌一, 濱田洋通, 本田隆文, 寺井 勝, 笹子久美子, 尾内善広, 鈴木洋一, 羽田 明: IVIG 不応川崎病症例に対する CsA 療法時の血中カリウム濃度の検討 Prog Med 査読無 32:1469-1473, 2012
12. Hamada H, Suzuki H, Abe J, Suzuki Y, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Honda A, Onouchi Y, Terai M, and Hata.A: Inflammatory cytokine profiles during Cyclosporin treatment for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. Cytokine 査読有 60:681-685, 2012
13. 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, Takatsuji 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 Consortium & US Kawasaki disease Genetics Consortium.: A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease. Nature Genetics 査読有 44 (5): 517-521, 2012

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Kakimoto N, Suzuki H, Suenaga T, Takeuchi T, Shibuta S, Abe J, Yoshikawa N.: Functional mechanisms of Cyclosporin A therapy for Immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. The 11th International Kawasaki Disease Symposium, 2015.2 Hawaii, USA,
2. Kakimoto N, Suzuki H, Kubo T, Suenaga T, Takeuchi T, Shibuta S, Ino Y, Akasaka T, Yoshikawa N.: Evaluation of coronary arterial lesions due to Kawasaki disease using optical coherence tomography. The 11th International Kawasaki Disease Symposium, 2015.2 Hawaii, USA
3. Suzuki H, Terai M, Hamada H, Honda T, Suenaga T, Tekeuchi T, Shibuta S, Yoshikawa N, Onouchi Y, Hata A.: Third IVIG is an effective option for KD patients resistant to cyclosporin A. The 11th International Kawasaki Disease Symposium, 2015.2 Hawaii, USA
4. 鈴木啓之、垣本信幸、久保隆史、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、猪野 靖、赤坂隆史、吉川徳茂: 光干渉断層法(OCT)で判明した川崎病遠隔期冠動脈病変の特徴 第 39 回近畿川崎病研究会 2015.3 大阪市
5. 末永智浩、鈴木啓之、垣本信幸、佐藤 匡、武内 崇、吉川徳茂、洪田昌一、大石 興、飯島 文憲: 和歌山県北東部での 2 回の川崎病小流行におけるガンマグロブリン不応頻度の検討 第 34 回日本川崎病研究会 2014. 10.31. ~ 11.1. 東京
6. 垣本信幸、鈴木啓之、佐藤 匡、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、阿部 淳、吉川徳茂: 川崎病急性期における Presepsin (sCD14-ST)値の検討 第 34 回日本川崎病研究会 2014. 10. 東京
7. 鈴木啓之、垣本信幸、久保隆史、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、猪野 靖、赤坂隆史、吉川徳茂: 光干渉断層法(OCT)を用いた川崎病冠動脈病変の評価第 23 回日本心血管インターベンション治療学会 2014.7. 名古屋市
8. 垣本信幸、鈴木啓之、佐藤 匡、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、阿部 淳、吉川徳茂: 治療抵抗性川崎病に対するシクロスポリン A の作用メカニズムの検討 第 50 回日本小児循環器学会 2014.7. 岡山市
9. 北野尚美、大谷和正、家永信彦、中井寛明、高辻幹雄、池田明彦、鈴木啓之、竹下達也、日高医師会学校医部会: 川崎病の病名認知度と既往歴認識に関する横断調査成績 -日高地方における喫煙防止のための成人式調査報告- 第 33 回日本川崎病研究会 2013. 9. 富山市
10. 垣本信幸、鈴木啓之、佐藤 匡、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、阿部 淳、吉川徳茂: 治療抵抗性川崎病に対するシクロスポリン A 療法時の免疫担当細胞の NFAT 経路、JAK-STAT 経路の関与についての検討 第 33 回日本川崎病研究会 2013. 9. 富山市
11. 末永智浩、鈴木啓之、垣本信幸、佐藤 匡、武内 崇、吉川徳茂、洪田昌一、大石 興、飯島文憲: 川崎病ガンマグロブリン不応例の地域集積性について第 33 回日本川崎病研究会 2013. 9. 富山市
12. 垣本信幸、鈴木啓之、久保隆史、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、猪野 靖、赤坂隆史、吉川徳茂: 川崎病冠動脈病変遠隔期の光干渉断層法(OCT)を用いた評価 第 49 回日本小児循環器学会 2013.7. 東京
13. 鈴木啓之、末永智浩、垣本信幸、武内 崇、洪田昌一、吉川徳茂、寺井 勝、濱田洋通、本田 隆文、尾内善広、羽田 明: シクロスポリン A 治療抵抗例に対する 3rd-IVIG に関する検討 第 49 回日本小児循環器学 2013.7. 東京
14. 北野尚美、鈴木啓之、武内 崇、屋代真弓、上原里程、中村好一、柳川 洋、末永智浩、垣本信幸、吉川徳茂、洪田昌一、上村 茂、松尾健司、竹下達也: 第 17 回 ~ 第 21 回川崎病全国調査への和歌山県からの症例報告割合に関する検討 第 32 回日本川崎病研究会 2012.10. 東京
15. 垣本信幸、鈴木啓之、久保隆史、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、猪野 靖、赤坂隆史、吉川徳茂: 光干渉断層法(OCT)を用いた川崎病冠動脈病変の評価第 32 回日本川崎病研究会 2012.10. 東京
16. 鈴木啓之: IVIG 不応例に対するシクロスポリン A の有用性と今後の展望 第 32

回日本川崎病学会 2012.10. 東京

17. 垣本信幸、鈴木啓之、久保隆史、末永智
浩、武内 崇、洪田昌一、猪野 靖、赤
阪隆史、吉川徳茂：光干渉断層法(OCT)
を用いた川崎病冠動脈病変の評価の試
み 第 48 回日本小児循環器学会
2012.7. 京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

武内 崇 (Takeuchi Takashi)
和歌山県立医科大学医学部 講師
研究者番号：10246522

(2)研究分担者

吉川 徳茂 (Yoshikawa Norishige)
和歌山県立医科大学医学部 教授
研究者番号：10158412

鈴木 啓之 (Suzuki Hiroyuki)
和歌山県立医科大学医学部 准教授
研究者番号：80196865

末永 智浩 (Suenaga Tomohiro)
和歌山県立医科大学医学部 助教
研究者番号：70433365