

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461604

研究課題名(和文) iPS細胞技術を用いたガンマグロブリン不応川崎病に対する新規治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease using iPS cell technology

研究代表者

池田 和幸 (Ikeda, Kazuyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30507786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞技術を用いて川崎病におけるIVIG不応の病態を解明することを目的とした。川崎病患者4例から体細胞を採取しiPS細胞を作製し、血管内皮細胞(ECs)へ誘導した。RNA-seq解析を用いて、IVIG反応例由来ECs 2例、IVIG不応例由来ECs 2例の比較解析を行ったところ、chemokine XがIVIG不応例由来ECsで有意に高発現であった。GSEA解析では、IL-6関連遺伝子群がIVIG不応例由来ECsにおいて高発現であり、IVIG不応の病態への関与が示唆された。白血球の遊走に関連しているchemokine Xは、IVIG不応の病態に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Objective: This study clarifies the mechanisms of IVIG resistance in Kawasaki disease (KD) using an iPSC disease model.

Methods and Results: Dermal fibroblasts or PBMCs from two IVIG-resistant and two IVIG-responsive KD patients were reprogrammed by the episomal vector-mediated transduction of reprogramming factors. KD patient-derived iPSCs were differentiated into ECs (iPSC-ECs). The gene expression profiles of iPSC-ECs generated from IVIG-resistant and IVIG-responsive KD patients were compared by RNA-sequencing analyses. We found that the expression of chemokine X was significantly up-regulated in iPSC-ECs from IVIG-resistant KD patients. Additionally, GSEA revealed that gene sets involved in IL-6 signaling were also up-regulated.

Conclusions: Our mechanistic analyses suggest that chemokine X, which plays a role in leukocyte transmigration, is a candidate key molecule for IVIG resistance. They also indicate that up-regulation of IL-6 related genes may be involved in this pathogenesis.

研究分野：小児循環器・川崎病

キーワード：川崎病 iPS細胞 IVIG不応

1. 研究開始当初の背景

川崎病は乳幼児に好発する血管炎症候群であり、いまだ原因不明である。世界中の60以上の国・地域から報告されているが、わが国ほど高い罹患率を示す国・地域は他にない。無治療の場合、約25%の割合で冠動脈病変を合併するが、ガンマグロブリン超大量療法(IVIG)により冠動脈病変合併頻度は3-10%へ減少した。一方、15-20%の割合でIVIGにより解熱しないIVIG不応例が存在し、冠動脈病変を高率に合併する。

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。これまでに、IL-6, IL-8, TNF- α をはじめとした炎症性サイトカイン、ケモカインが川崎病急性期の末梢血中で上昇していることが報告されてきた。一方、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解明されていないかった。

申請者らは、急性期川崎病患者PBMNCを用いてマイクロアレイ解析、定量PCR解析を行い、自然免疫関連分子が急性期川崎病の病態に深く関与していることを発見した(Ikeda K, et al. 2010)。一方、サイトカイン遺伝子の発現上昇は認められず、炎症性サイトカインの産生源がPBMNCではない可能性が示された。

炎症性サイトカインの産生源が血管内皮細胞である可能性を考え、自然免疫受容体ligandによりヒト冠動脈内皮細胞を刺激したところ、ICAM-1の発現が有意に上昇しIL-8の産生が著明に亢進した。さらに、自然免疫受容体ligand(合成Nod1 ligand)の投与により川崎病類似冠動脈炎マウスモデルの開発に成功した(Nishio H, Ikeda K, et al. 2011)。

一方、川崎病は疫学的に季節性や流行性があることから、病因として病原性微生物の関与が強く疑われている。しかし、川崎病患者の咽頭、便検体について、次世代シーケンサーによりウイルス、細菌の両面から解析が

行われているが、いまだ原因特定には至っていない。さらに、ヨーロッパ諸国に比較して日本での罹患率が10-20倍と非常に高い疫学的な特徴からも、川崎病の発症には宿主側の要因も関与していることが示唆されている。IVIG不応予測スコアにより初期治療を層別化した研究でも、治療前の遺伝子発現プロファイリングにおいて多様性を認めており(Ogata S, et al. 2009)、宿主側の要因の関与が示唆された。

そこで申請者は、川崎病の治療戦略を考える上で重要課題であるIVIG不応のメカニズムを解明するにあたり、既存の川崎病類似血管炎マウスモデルや、正常ヒト血管組織を用いた研究も考慮したが、宿主側の要因が加味されず不十分であると判断した。

一方、簡便な遺伝子操作にて体細胞から作製可能な多能性幹細胞であるiPS細胞がヒトにおいても開発され(Takahashi, K. et al. 2007)、難治性疾患の患者体細胞より発症に関与する遺伝情報を有する「疾患特異的iPS細胞」を樹立し、罹患細胞種に分化させることによって、病態を模倣する疾患モデルを作製し、詳しい病態解析や治療薬の探索を行う「疾患モデル作製研究(Disease modeling)」が盛んに行われている。

このiPS細胞技術を用いることにより、患者の遺伝情報を有する川崎病血管炎モデルを作製することで、宿主側の要因の観点からも、IVIG不応のメカニズムの解明が可能となり、病態関連分子の探索から新規治療標的分子の同定につながるとの着想に至り、平成24年5月から京都大学iPS細胞研究所へ出向し、iPS細胞技術を用いた川崎病の病態解明を目指す研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、IVIG反応例および不応例川崎病患者の皮膚組織もしくは血液からiPS細胞を樹立し、血管、免疫細胞に分化させること

により、新規の疾患モデルの構築を行う。さらに、作製された血管、免疫細胞の遺伝子発現解析を行い、IVIG 不応例の細胞において特異的な発現を示す病態関連分子を探索する。得られた候補分子について、in vitro と in vivo の実験系、臨床検体などを用いた検証を行うことによって、新規の治療標的分子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立、および樹立した iPS 細胞株の評価

IVIG 反応患者 2 例および不応川崎病患者 2 例から皮膚組織または末梢血 T 細胞を採取し、エピソーマルベクターを用いて初期化因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53 shRNA の 6 因子) を導入することにより、疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞株の評価は、(1)ゲノム integration の解析、(2)OCT3/4 や NANOG などの未分化マーカーの発現、(3)胚様体形成法(EB 法)及び奇形腫(Teratoma)形成法にて三胚葉への分化能の評価、(4)罹患細胞種である血管内皮および単球への分化誘導効率、の 4 点を行った。

2) 川崎病特異的 iPS 細胞から分化誘導した罹患細胞種を用いた病態関連分子の探索

IVIG 反応および IVIG 不応川崎病患者 iPS 細胞および健常日本人 iPS 細胞由来の血管内皮細胞、単球のマイクロアレイによる遺伝子発現の比較解析を行った。そして、IVIG 不応川崎病患者 iPS 細胞由来の血管内皮細胞および単球にて発現が特異的に変化している分子を同定した。IVIG 反応川崎病 2 症例、不応 2 症例、健常日本人 7 名に由来する iPS 細胞について解析を行うが、各症例においても複数の細胞株で共通する分子を選択した。

4. 研究成果

研究対象は、IVIG 反応川崎病 2 例、IVIG 不応川崎病 2 例とした。患者由来の皮膚線維芽細胞もしくは末梢血 T 細胞にエピソーマル

ベクターを用いて初期化 6 因子を導入し iPS 細胞を作製することが可能だった。

次に、川崎病患者由来 iPS 細胞における未分化マーカーの発現を確認した。OCT3/4, Sox2, Nanog などの核内転写因子、SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81 などの細胞表面抗原が同定され、川崎病患者由来 iPS 細胞が未分化状態であることを確認した。

さらに、胚様体形成法にて三胚葉への分化能を確認した。外胚葉、中胚葉、内胚葉のマーカーである TUJ-1, alpha SMA, SOX17 を用いることにより、川崎病患者由来 iPS 細胞が、外胚葉、中胚葉、内胚葉へ分化しており、多分化能を有することを確認した。

樹立した川崎病患者由来 iPS 細胞を既存の方法により血管内皮細胞へ分化誘導を行った。フローサイトメトリーにより、VE-cadherin 陽性、Flk-1 陽性の血管内皮細胞が 7.6%の割合で誘導され、免疫染色にて CD31 陽性細胞を確認した。その結果、川崎病患者由来 iPS 細胞は血管内皮細胞へ分化誘導可能と判断した。

川崎病患者由来 iPS 細胞を既存の方法により単球へ分化誘導を行った。フローサイトメトリーにより、CD45 陽性、CD14 陽性の単球が 82.5%と高効率に誘導されており、メイギムザ染色では、胞体の大きい、核に切れ込みのある単球が観察された。

さらに、誘導した単球の機能解析を行った。誘導した単球を LPS や ATP により刺激を行ったところ、IL-8, IL-6, TNFalpha の分泌が上昇しており、反応性のサイトカイン分泌能を示した。

以上から、川崎病患者由来 iPS 細胞の樹立と樹立した株の評価が完了し、研究施行に耐えうると判断した細胞株を用いて RNA-seq 解析を行う方針とした。

RNA-seq 解析のプロトコールは以下の通りとした。健常コントロール由来血管内皮細胞 7 例、IVIG 反応例、responder 由来血管内皮

細胞 2 例、IVG 不応例、non-responder 由来血管内皮細胞 2 例を対象とし、健常コントロール対川崎病 4 例（平均）、健常コントロール対 IVIG non-responder、IVIG responder 対 non-responder で比較検討した。

iPS 細胞由来血管内皮細胞について、principal component analysis : PCA 解析（主成分分析）を行った。PCA 解析は、多くの変数を持つデータに対して、より少ない変数に縮約することにより、データの特徴をより際立たせる方法。健常コントロール群、IVIG responder 群、IVIG non-responder とそれぞれ独立した分布を示しており、3 群とも異なった遺伝子発現の特徴をもつことが示された。

次に、クラスター解析を行った。IVIG responder 群と non-responder 群はやや似通った遺伝子発現パターンを示していますが、健常コントロール群と川崎病群（4 例全体）で比較すると、異なる遺伝子発現パターンを示しているのがわかった。

iPS 細胞由来血管内皮細胞について 2 倍以上発現が上昇もしくは減少する遺伝子について検討した。健常コントロール群に比較して川崎病 4 例で遺伝子発現が 2 倍以上増加している遺伝子数は 58、健常コントロール群と non-responder 群では 127 遺伝子、IVIG responder 群と non-responder 群での比較では 101 遺伝子の発現が up-regulate していた。

iPS 細胞由来血管内皮細胞における gene ontology(GO)解析を行った。GO 解析は、どのような機能を持った遺伝子が多いかを解析する方法である。健常コントロール群に比較して川崎病 4 例全例において統計学的に有意な遺伝子群を検討した。上位に抽出された遺伝子は、プロテオグリカン、コラーゲンに関連する遺伝子であり、炎症に関連するものは認められなかった。

健常コントロール群と IVIG non-responder 群を比較した GO 解析では、血管発生や細胞

の接着に関連した遺伝子群が上位に抽出され、高い有意差も示していた。また上位に位置する遺伝子としては、遺伝子名を伏せたが、chemokine X は白血球の走化性に関連しており、MMP-2 は、川崎病冠動脈瘤組織に高発現であることが報告されている。

IVIG responder 群と non-responder 群を比較した GO 解析では、細胞の接着に関連する遺伝子群が最も上位に位置していた。また、白血球の走化性に関連する chemokine X が IVIG responder 群に比較して non-responder 群で有意に高発現であることが示された。

次に Gene Set Enrichment Analysis (GSEA 解析)を行った。GSEA 解析は、今回行った RNA-seq 解析の結果に最も近い解析データを過去のデータベースから探し出す解析方法である。その結果、データベースに登録されている IL-6 関連遺伝子群（遺伝子セット）が IVIG non-responder 群において高発現であることが示された。

また、IVIG responder 群と non-responder 群を比較した GSEA 解析では、NRAS といった膵癌などの消化器癌関連遺伝子や乳癌などの他のマイクロアレイ解析の結果とも今回の解析結果が類似していることが示された。

IVIG 不応川崎病患者における血清 IL-6 濃度の高値は既に報告されている。本研究の結果から、iPS 細胞由来血管内皮細胞における IL-6 関連遺伝子セットの発現亢進は、IVIG 不応川崎病の病態に関与していることが示唆された。

また、chemokine X は白血球、血管内皮細胞などに発現しており、白血球の遊走を制御していることも既に報告されている。IVIG 不応例、重症例では著明な炎症細胞浸潤が認められ、白血球から炎症サイトカイン産生が誘導されることから、chemokine X は IVIG 不応の病態に関連する key molecule である可能性が示唆された。

結論として、血管内皮細胞における IL-6

関連遺伝子群の発現の変動は、IVIG 不応の病態に関連している可能性が示唆された。さらに、白血球の migration に関連している chemokine X は、IVIG 不応の病態や川崎病の重症度に関連している可能性が示唆された。

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 11 件)

1. Oxidative Stress in Kawasaki Disease Vasculitis.

Hamaoka K, Yahata T, Okamoto A, Suzuki C, Kuchitsu Y, Yoshioka A, Ikeda K.

International Journal of Pediatrics & Neonatal Care. volume 1 : 103 (2015) 査読あり

2. The involvement of the vasa vasorum in the development of vasculitis in animal model of Kawasaki disease.

Hamaoka-Okamoto A, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Nagi-Miura N, Ohno N, Arai Y, Tanaka H, Takamatsu T, Hamaoka K.

Pediatr Rheumatol Online J. 12 : 12 (2014) 査読あり

3. Platelet activation dynamics evaluated using platelet-derived microparticles in Kawasaki disease.

Yahata T, Suzuki C, Yoshioka A, Hamaoka A, Ikeda K. Circ J. 78 (1)

188-193頁 (2014) 査読あり

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

Suzuki C, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Fujii M, Yoshioka A, Niwa Y, Ikeda K, Nakamura A, Hamaoka K.

Pediatr Int. 55 (5) 550-554頁 (2013) 査読あり

5. Development of Kawasaki disease in a patient with PFAPA.

Ninomiya T, Takada H, Nagatomo Y, Nanishi E, Nagata H, Yamamura K, Doi T, Ikeda K, Hara T. Pediatr Int. 55 (6) 801-802頁 (2013) 査読あり

6. Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism.

Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T.

Int J Cardiol. 167 (5) 2259-2263頁 (2013) 査読あり

7. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells.

Mae S, (他14名), Yamanaka S, Osafune K. Nat Commun. 4:1367 (2013)

査読あり 他、雑誌論文 4件

[学会発表](計 28 件)

1. Analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease using iPS cell technology.

Ikeda K, Ameku T, Nomiya Y, Nakamura M, Mae S, Matsui S, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Suzuki C, Kuchitsu Y, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K. 49th Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology. (Prague, Czech Republic)(May 22th, 2015)

2. Analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease using iPS cell technology.

Ikeda K, Ameku T, Nomiya Y, Nakamura M, Mae S, Matsui S, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Suzuki C, Yoshioka A, Kuchitsu Y, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K.

11th International Kawasaki Disease

Symposium.(Honolulu,USA) (Feb 3rd, 2015)

3. Analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease using iPS cell technology.

Ikeda K, Ameku T, Nomiya Y, Nakamura M, Matsui S, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Suzuki C, Kuchitsu Y, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K. American Heart Association. (Chicago, USA) (Nov 17th, 2014)

4. Optimal timing of initial treatment in severe Kawasaki disease: A sub-analysis of the RAISE study.

Ikeda K, Saji T, Kobayashi T, Yahata T, Okamoto A, Arakawa H, Kato T, Hara T, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Ayusawa M, Abe J, Morikawa A, Hamaoka K 47th Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology. (London, United Kingdom)(May 24th, 2013)

5. 京都地区におけるステロイド初期併用療法の効果検証～RAISE 不応重症川崎病の経験 池田和幸、鈴木千夏、八幡倫代、朽津有紀、岡本亜希子、小澤誠一郎、松尾憲典、足立晋介、内藤岳史、濱岡 建城

第 35 回日本川崎病学会・学術集会(鹿児島県医師会館・鹿児島市)(2015 年 10 月 9 日)

6. iPS 細胞由来血管内皮細胞を用いたガンマグロブリン不応川崎病の病態解明

池田和幸、天久朝廷、松井敏、八幡倫代、岡本亜希子、鈴木千夏、朽津有紀、渡辺亮、長船健二、濱岡建城 第 34 回日本川崎病学会学術集会(学術総合センター・東京都千代田区)(2014 年 10 月 31 日)

7. iPS 細胞技術を用いたガンマグロブリン不応川崎病の病態解明

池田和幸、天久朝廷、松井敏、八幡倫代、岡本亜希子、鈴木千夏、長船健二、濱岡建城 川崎病治療懇話会(岡山コンベンションセン

ター・岡山市)(2014 年 7 月 3 日)

8. iPS 細胞技術を用いたガンマグロブリン不応川崎病の病態解明 池田和幸、天久朝廷、松井敏、八幡倫代、岡本亜希子、鈴木千夏、長船健二、濱岡建城 第 49 回日本小児循環器学会(国立オリンピック記念青少年総合センター・東京都渋谷区)(2013 年 7 月 12 日) 他、学会発表 20 件

〔図書〕(計 3 件)

1. 別冊日本臨床「免疫症候群」第 2 版(分担執筆) 池田和幸、濱岡建城 日本臨床社 川崎病の章担当 772-776 頁(2015)

2. 今日の小児治療指針第 16 版(分担執筆) 川崎病性心血管障害の章担当 濱岡建城、池田和幸

医学書院 531-533 頁(2015)

3. 川崎病医療の現状と今後の展望(分担執筆) 池田和幸、濱岡建城 日本臨床 72(9)1523-1529 頁(2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(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 池田 和幸 (IKEDA, Kazuyuki) 京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教 研究者番号: 30507786

(2) 研究分担者 濱岡 建城 (HAMAOKA, Kenji) 京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授 研究者番号: 60189602

研究分担者 長船 健二 (OSAFUNE, Kenji) 京都大学 iPS 細胞研究所・教授 研究者番号: 80502947

(3) 連携研究者 なし