

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 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：25461628

研究課題名(和文)川崎病血管炎の炎症増悪因子としてのマンノース結合蛋白質に関する実験病理学的研究

研究課題名(英文)Experimental pathological study on mannose binding lectin in Kawasaki disease

## 研究代表者

浜岡 建城 (Hamaoka, Kenji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60189602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は小児に見られる原因不明の血管炎である。これまでに自然免疫応答と補体活性化に働くことで知られるマンナン結合レクチン(MBL)とよばれる血漿蛋白質の遺伝的多型性との関連が指摘されている。本研究では川崎病マウスモデルを用いてその病態におけるMBLの役割を実験病理学的手法により調べた。同マウスにおいて、大動脈起始部および冠動脈にMBL-AおよびMBL-Cの沈着を認めた。これらの沈着部位に一致して補体成分C3/C3断片とIgMの沈着も認めた。加えてMBLは一部の組織蛋白質に結合してレクチン経路を活性化することも分かった。川崎病血管炎におけるMBLを介した補体レクチン経路の関与が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is an idiopathic vasculitis. Its etiology is not clear, some clinical genetic studies have indicated involvement of genetic polymorphisms of mannose binding lectin (MBL) gene in the disease. Using an animal model for KD, in this study, we explored the roles of MBL in KD. Deposition of MBL-A, MBL-C and complement were observed in the aortic root including coronary arteries in the model mice. Plasma MBL-A level was gradually increased with development of the vasculitis, whereas plasma MBL-C level was rapidly decreased. Employing proteomics, furthermore, we revealed that MBL-A and -C interact with some specific endogenous proteins to activate lectin pathway in vitro weakly but significantly. Taken together, these results suggest that MBLs involve in exacerbation of KD-like murine vasculitis through interacting with intracellular proteins released from damaged tissues.

研究分野：小児科学

キーワード：mannose binding lectin vasculitis Kawasaki disease mouse model complement

### 1. 研究開始当初の背景

川崎病は小児に見られる血管炎で、その原因および発症機序はいまだ明らかでない。90年代以降、年間発症件数は漸増を続けており、本疾患の特徴のひとつである冠動脈炎はしばしば冠動脈瘤に代表される後遺症をともしない、青壮年期における虚血性心疾患の罹患リスクを増加させる可能性が強く懸念されている。ゆえに、川崎病の病因究明は小児循環器領域に止まらず、広く循環器病学分野における解明すべき重要課題となりつつある。川崎病の罹患および後遺症リスクに影響を与える遺伝的背景に関する臨床遺伝学的研究から、マンノース結合蛋白質(MBL)遺伝子の多型性と冠動脈後遺症との関連を示唆することが明らかにされている。しかし川崎病の分子病態におけるその意義はまだ調べられていない。本研究では川崎病血管炎の分子機序における MBL の役割について動物モデルを用いて調べた。

### 2. 研究の目的

川崎病血管炎の発症、進展における MBL の役割を明らかにし、同蛋白質を標的とする新規治療法開発の理論的基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

三浦、大野らの方法に従い、カンジダアルピカンス水溶性抽出物画分(CAWS)を DBA/2 マウス腹腔内に5日間連続して投与して川崎病様血管炎を発症させたものを川崎病動物モデルとして実験に供した。MBL-A, MBL-C, 補体成分の検出には大動脈起始部を含む凍結切片を用いた。MBL の内在性標的蛋白質は1次元および2次元のウェストウェスタン法で検出した。細胞分画および酸性尿素ゲル2次元電気泳動で分離した標的分子はトリプシン消化後、液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS/MS)で分析し、その分子種を同定した。組織より精製した標的蛋白質は既報を参考に市販キットを利用して、正常血清、および MBL 活性欠損血清を用いてその補体活性化能を *in vitro* で評価した。

### 4. 研究成果

CAWS 刺激後1日目の炎症のごく初期より大動脈弁の基部などに MBL-A, MBL-C, 補体の沈着を認めた。炎症の進展にともない、大動脈起始部および冠動脈にこれらの分子の著明な沈着を認めた。ただし MBL-A や補体 C3/C3 分解物が内膜側だけでなく外膜側、大動脈周囲にも比較的広範囲に沈着していたのに対して、MBL-C の沈着は大動脈弁基部内膜側、および冠動脈に限局していた。いずれの免疫染色も control rat/rabbit IgG では陰性だった。

大動脈抽出物を試料として、MBL-A および MBL-C をリガンドとするウェストウェスタン法による分析で、分子量 250KDa 以上および 15KDa 付近の蛋白質を検出した。いずれも Mannan 存在下ではシグナルが消失したことから、MBL の糖認識ドメインと相互作用する

内在性蛋白質である事が示唆された。このうち 15KDa 蛋白質は可溶化法を変えた段階的細胞分画で核の酸可溶性画分に分画されたため、酸性尿素ゲルにより分離を行い、ウェストウェスタン法で検出されたスポットについて LC-MS/MS にて分析した。その結果、これらの蛋白質はコアヒストンを構成する H2A, H2B, H3, H4 であることが分かった。組織よりヒストンを精製し、ELISA plate に架橋剤により共有結合で固相化したあと、市販のレクチン経路活性評価キットを利用して、補体活性化を評価した。その結果、正常ヒト血清では補体活性化がみられたが、MBL 活性を欠損するヒト血清では活性化がみられなかった。このことから、すくなくとも *In vitro* では、ヒストンは MBL を介してレクチン経路を活性化しうることがわかった。250KDa 以上の標的蛋白質(群)については分子種を同定するまでに至らなかった。

本研究の結果から、MBL がレクチン補体経路の活性化などを介して血管炎の発症過程に直接関与する事が示唆される。ヒストンは本来、核蛋白質であるが、好中球の活性化で細胞外に放出されることや、細胞死の過程で細胞膜表面に移行することが知られている。本血管炎モデルは著明な好中球浸潤を伴うことから、血管炎部位に検出された MBL の少なくとも一部は、これらに由来するヒストンを主に認識して沈着している可能性がある。MBL の認識するヒストンの構造については明らかにできなかったが、ヒストンに見られる糖修飾として O-GlcNAc 修飾体などの可能性を考えている。今後、MBL による内在性標的分子の認識について O-GlcNAcase 処理による影響などについてさらに調べることを計画している。

MBL は MBL 結合セリンプロテアーゼ(MASP)を介してレクチン補体経路を活性化するが、MASP は内皮細胞の細胞膜に分布するプロテアーゼ活性化受容体 4(PAR4)の限定分解による内皮細胞活性化や、キニンノーゲン分解による炎症性メディエーターのひとつブラジキニンの生成など補体経路以外にも血管炎につながりうる経路の活性化に関わる。ゆえに MBL は補体依存的のみならず非依存的経路も介してマウス川崎病様血管炎の発症進展に関与していると考えられる。MASP に対する障害ペプチドが2つのグループより報告されており、*in vitro* での阻害活性が示されているが *in vivo* での効果はまだ報告がない。今回、同ペプチドを本モデルマウスに腹腔内投与して炎症抑制効果を調べたが、あきらかな治療効果は認められなかった。投与量、投与ルート、生体内での安定性について検討が必要と思われる。

MBL は自然免疫応答を担う主要な分子の一つであり、死細胞のクリアランスの促進などにも働く。一方で、川崎病はウイルスあるいは細菌、真菌の感染刺激を背景とすることが示唆されていることや、自己免疫応答の関

与も以前より議論がある。ゆえに血管炎の治療を目的として、単に MBL-MASP 系の機能を抑制することが適切かどうかは、本研究の成果を臨床へつなげる際にはさらに慎重な検討が必要と思われる。この点に十分な注意が払われるならば、MBL あるいは MASP は川崎病の新しい治療標的分子として期待できるかもしれない。

#### 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 7 件)

1. Hamaoka K, Yahata T, Okamoto A, Suzuki C, Kutsuk Y, Yoshioka A and Ikeda K.

Oxidative Stress in Kawasaki Disease Vasculitis. Int J of Pediatrics Neonatal Care.2015

<http://dx.doi.org/10.15344/2455-2364/2015/103> (査読あり)

2. 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. (査読あり)

3. Hamaoka-Okamoto A, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Nagi-Miura N, Ohno N, Arai Y, Tanaka H, Takamatsu T, Hamaoka K. The involvement of the vasa vasorum in the development of vasculitis in animal model of Kawasaki disease. Pediatr Rheumatol Online J. 2014 doi: 10.1186/1546-0096-12-12.

(査読あり)

4. 池田和幸、瀧岡建城. 『川崎病医療の現状と今後の展望』 日本臨床 72 (9) :1523-9. 2014 (査読なし)

5. 中村明宏 特集ピンポイント川崎病. 『原因をめぐり最近の議論』 小児内科 46, 713-16. 2014. (査読なし)

6. Suzuki C, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Fujii M, Yoshioka A, Niwa Y, Ikeda K, Nakamura A, Hamaoka K. Utility of whole-blood aggregometry for evaluating anti-platelet therapy for Kawasaki disease. Pediatr Int. 2013 Oct;55(5):550-4.(査読あり)

7. 八幡倫代, 瀧岡建城. 川崎病血管炎と粥状動脈硬化発症の関連. 血管医学 14(4), 80-86, 2013 (査読なし)

[学会発表](計 4 件)

1. 中村 明宏, 鈴木 千夏, 三浦 典子, 亀谷 富由樹, 大野 尚仁, 瀧岡 建城. マウス川崎病様血管炎における自己免疫応答の関与. 第 3 4 回日本川崎病学会学術集、学術総合センター (東京都千代田区) 2014. 10.31-2014.11.1.

2. Hamaoka K, Nakamura A, Suzuki C, Yahata T, Yoshioka A, Okamoto-Hamaoka A, Ikeda K. Involvement of innate humoral immunity in the pathogenesis of Kawasaki Disease-like murine vasculitis.Meeting of European Society of Cardiology. 2014, 30<sup>th</sup> Aug—2<sup>nd</sup> Sep. Barcelona (Spain).

3. 中村 明宏, 沖垣 光彦, 鈴木 千夏, 三浦 典子, 亀谷 富由樹, 大野 尚仁, 瀧岡 建城. 川崎病血管炎発症の分子機序における Mannose binding lectin(MBL)の役割. 第 1 回系統的血管炎疾患モデル研究会, 東邦大学大橋医療センター(東京都渋谷区) 2014.2.28

4. 中村 明宏, 沖垣 光彦, 鈴木 千夏, 三浦 典子, 亀谷 富由樹, 大野 尚仁, 瀧岡 建城. 川崎病発症進展機序における Mannose binding lectin (MBL) の関与 川崎病動物モデルを用いた解析 第 33 回日本川崎病学会学術集会, 富山国際会議場(富山県富山市) 2013.9.27-28.

[図書](計 1 件),

Yahata T, Hamaoka K

Oxidative Stress in Kawasaki disease. Studies on Pediatric Disorders.

Springer Cham (ZG) pp 271-282, 2014

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 濱岡 建城  
(HAMAOKA kenji)  
京都府立医科大学大学院医学(系)研究科(研  
究院)・教授

研究者番号： 60189602

(2)研究分担者 中村 明宏  
(NAKAMURA Akihiro)  
京都府立医科大学大学院医学(系)研究科(研  
究院)・博士研究員

研究者番号： 50313854

(3)連携研究者  
なし  
( )

研究者番号：