

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：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461629

研究課題名(和文)川崎病発症メカニズム解明に対する新たな分子遺伝学的検討

研究課題名(英文)A new trial of molecular genetics for the onset of Kawasaki disease

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病診断基準を満たして入院した患児から、入院時に咽頭ぬぐい液を採取して、液体培地を用いてovernightで増菌培養し、Kitを用いて全DNAを抽出し、5つのスーパー抗原遺伝子(SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J, TSST-1)断片をPCRで検討した。3年間で34例検討した。3例からSPE-G、4例からSPE-A、8例からSPE-Jの遺伝子断片が検出された。この内、1例(ID=10)の菌からSPE-GとSPE-Jの2種のDNA断片が検出された。数回の培養を反復しても陽性であった2例(ID=10, ID=25)については菌種同定のための実験を継続中である。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate whether superantigens (SAGs) are involved in the development of Kawasaki Disease (KD) by examining SAG genes in patients with KD, throat specimens were obtained from a total of 34 KD patients who fulfilled diagnostic criteria on admission. These samples were cultured with liquid culture solution of Brain-Heart Infusion Broth under 37 during overnight. Total DNA was extracted from these cultured bacterial solution. Using polymerase chain reaction, we examined the genes of five SAGs: streptococcal pyrogenic exotoxin-A (SPE-A), SPE-C, SPE-G, SPE-J, and Toxic Shock Syndrome Toxin-1. SPE-G, SPE-A, and SPE-J genes were detected in 3, 4, 8 specimens from KD patients. Two SAG genes of SPE-G and SPE-J were detected in one patients of KD. Now, we continue the examines for the identification of bacterial species of bacteria keeping SAG genes.

研究分野：小児循環器病、川崎病

キーワード：川崎病 スーパー抗原 レンサ球菌 gene transfer

1. 研究開始当初の背景

川崎病の病因論に関する最近の国内・国外の研究動向は、大きく分けて2つに分類される。一つは、ウイルスや細菌そのものが原因とする conventional antigen 説であり、もう一方は細菌などが産生するスーパー抗原(SAg)説である。前者の代表的論文は、Rowley AH らの new RNA ウイルス説(J Infect Dis, 203(7):1021-1030, 2011)であり、後者の論文の一つは申請者らが報告した論文である(J Pediatr 2009;155:266-270)。

Conventional antigen 説は、40年以上の研究の歴史の中で数多く提唱されてきたが、一定の病原体が患児から検出できなかった経緯がある。一方、SAg 説では末梢血から分離される T 細胞レセプター(TCR)のレポトリ分析結果が報告者によって異なることから病因として確定するに至っていない。

2. 研究の目的

川崎病は疫学上、地域・時間集積性を認め感染性因子の関与が強く疑われてきたが、病原性を有する一定の感染性因子を分離できず、今なお原因不明である。我々は、川崎病急性期患児の便中 DNA から、本来、S.pyogenes(GAS)が保有するスーパー抗原(SAg)遺伝子を有意に多く検出することを明らかにした(J Pediatr 2009;155:266-270)。今回、この新たな知見に基づいて、口腔・咽頭に存在し、病因に関与する菌として想定されてこなかった常在菌(主にレンサ球菌)に GAS の SAg 遺伝子が transfer されている可能性を想定し、その SAg と細菌種を同定することが目的である。

3. 研究の方法

【1】患児から口腔・咽頭培養検体及び臨床データの収集

対象患児：

川崎病診断基準を満たして入院した患児 同時期、同年齢のコントロールとして、ワクチン接種時の健康小児や急性熱性疾患患児(各 5-10 例)。熱性疾患では、咽頭の溶連菌迅速反応(ストレップ反応)陽性例や咽頭から溶連菌が分離されたいわゆる溶連菌感染症は除外する。アデノウイルスなどのウイルス感染症も対象とする。

臨床データ収集：以下の臨床データを収集する。(1)発症年齢・性別 (2)急性期主要症状(3) グロブリン治療への反応 (4)冠動脈病変の有無(5)健康小児の年齢・性別 (6)熱性コントロール疾患の診断・年齢・性別

検体収集：対象となる小児の口腔・咽頭ぬぐい液を採取する。

【2】口腔・咽頭ぬぐい液の培養と得られた培養液から細菌 DNA の抽出

得られた口腔・咽頭ぬぐい液を液体培地(Brain-Heart infusion, Trypticase-Soy Broth etc)で嫌気・好気培養で増菌を行う。

上記で得られた口腔・咽頭培養液から、DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて全 DNA を抽出し、PCR 使用時まで-20 で保存する。

【3】PCR による SAg 遺伝子の増幅

【2】から得られた細菌由来の DNA を用いて以下の SAg 遺伝子について検討する。

検討する SAg は、申請者らがすでに便中の SAg 遺伝子で検討した GAS 由来の SPEA, SPE-C, SPE-G, SPE-J を含めて 11 の種類の GAS 由来の SAg である。それぞれの SAg の特異プライマーを設定し、それらを mix して、一度の遺伝子増幅で検討する(J Pediatr 2009;155:266-270, Pol J Microbiol 2011; 60(3):187-201)。

陽性コントロールは、SPE-A, G, J は理化学研の JCM No.5674(St.pyogenes)、SPE-C は ATCC No.700294(St.pyogenes)から DNA を採取して用いる。

【4】細菌の菌種同定:

【3】で SAg 遺伝子が増幅された場合に、増菌された液体培地中のその SAg 遺伝子をもつ細菌が含まれると予測される。これを分離同定するために、各種寒天培地(選択培地も含む)に液体培地の菌を散布し培養する。得られたコロニーの1つ1つの DNA を簡易法で抽出し、【3】で陽性となった SAg 遺伝子の有無を PCR で確認する。

上記で陽性となった細菌の菌種を同定するために、コロニーから得られた DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行って菌種を最終的に同定する。

****【予期される問題点に対する配慮、問題が生じた時の対応策】**

目的とする SAg 遺伝子はプロファージの形で細菌染色体中に組み込まれている可能性が高いため、目的とする遺伝子をより確実に増幅する目的で、増菌中(log phase)にマイトマイシンを添加することを考慮している。

4. 研究成果

初年度から川崎病診断基準を満たして当院に入院した川崎病患児 34 例から、入院時に咽頭ぬぐい液を採取して、液体培地(Brain-Heart Infusion Broth)を用いて overnight で増菌培養し、DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて全 DNA を抽出し、5つのスーパー抗原遺伝子(SPE-A, SPE-C, SPE-G, SPE-J, TSST-1)断片について PCR で検討した。

当初は検出率が低かったが、PCR の条件を変更することによってスーパー抗原遺伝子断片の検出率が改善された。その結果、3例から SPE-G、4例から SPE-A、8例から SPE-J の遺伝子断片が検出された。この内、1例(ID=10)の咽頭ぬぐい液から培養した菌から SPE-G と SPE-J の 2 種の DNA 断片が検出された。さらに、得られた咽頭培養液を-80 °に保存したが、数回の培養を反復しても DNA 断片が陽性であった 2 例(ID=10, ID=25)については菌種同定のための実験を継続中である。さらに、患児から得られた液体培地中の細菌をマイトマイシンを用いて再度増菌培養して phage を誘導し、SPE-G, J を保有する Phage が得られるかどうか検討中である。

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 12 件)

1. Onouchi Y, Fukazawa R, Yamamura K, Suzuki H, Kakimoto N, Suenaga T, Takeuchi T, Hamada H, Honda T, Yasukawa K, Terai M, 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, Yoshiyama M, Miyashita R, Murata Y, Fujino A, Ozaki K, Kawasaki T, Abe J, Seki M, Kobayashi T, Arakawa H, Ogawa S, Hara T, Hata A, Tanaka T.: Variations in ORAI1 Gene Associated with Kawasaki Disease. PLoS One. 2016 Jan 20;11(1):e0145486.
2. 立花伸也, 垣本 信幸, 末永智浩, 武内 崇, 鈴木啓之, 吉川 徳茂, 洪田昌一: 川崎病主要症状 2/6 で超巨大瘤を形成した 5 か月女児の 1 例 Prog Med 35:1143-1148, 2015
3. Aoyagi R, Hamada H, Sato Y, Suzuki H, Onouchi Y, Ebata R, Nagashima K, Terauchi M, Terai M, Hanaoka H, Hata A; KAICA Trial investigators.: Study protocol for a phase III multicentre, randomised, open-label, blinded-end point trial to evaluate the efficacy and safety of immunoglobulin plus cyclosporin A in patients with severe Kawasaki disease (KAICA Trial).BMJ Open. 2015 Dec 1;5(12):e009562.
4. 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: 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 34:1245-1249, 2014
5. 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 30 (8):956. e7-9, 2014
6. 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 24(5):427-434, 2014
7. Tsuda E, Hamaoka K, Suzuki H, Sakazaki H, Murakami Y, Nakagawa M, Takasugi H, Yoshiyama M.: A survey of the 3-decade outcome for patients with giant aneurysms caused by Kawasaki disease. Am Heart J

167(2):249-58, 2014

8. 鈴木啓之, 末永智浩, 垣本信幸, 武内 崇, 洪田昌一: シクロスポリン A 治療日本臨床 72(9): 1636-1640, 2014
9. 鈴木啓之: シクロスポリン A 治療小児内科 46(6): 759-762, 2014
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 66(1):25-31, 2013
11. 末永智浩, 鈴木啓之, 垣本信幸, 武内 崇, 吉川徳茂, 洪田昌一: 川崎病の急性期に突発性発疹を発症した 1 例 Prog Med 33:1458-1460, 2013
12. 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 13(1):52-59, 2013

[学会発表](計 23 件)

1. 垣本信幸, 末永智浩, 武内 崇, 鈴木啓之, 洪田昌一, 立花伸也, 竹腰信人, 横山宏司, 原茂登, 吉田晃: 川崎病冠動脈病変の疑いが契機となり発見された右冠動脈右室瘻の 1 例 第 40 回近畿川崎病研究会 2016.2. 大阪
2. 末永智浩, 鈴木啓之, 垣本信幸, 武内崇, 洪田昌一, 立花伸也: 川崎病巨大冠動脈瘤症例に合併した両側腋窩動脈瘤の経過について 第 35 回日本川崎病学会・学術集会 2015.10. 鹿児島
3. 垣本信幸, 末永智浩, 洪田 昌一, 武内 崇, 鈴木啓之: 両側巨大冠動脈瘤を合併した症例に対する血行再建を考慮する上で教訓となった 1 女児例 第 35 回日本川崎病学会・学術集会 2015.10. 鹿児島
4. 垣本信幸, 末永智浩, 洪田昌一, 武内崇, 鈴木啓之: 川崎病急性期の Presepsin 値の検討 (第 2 報) 第 35 回日本川崎病学会・学術集会 2015.10. 鹿児島
5. 垣本信幸, 久保隆史, 末永智浩, 武内 崇, 洪田昌一, 猪野 靖, 赤阪隆史, 鈴木啓之: 光干渉断層法(OCT)で明らかになった遠隔期川崎病冠動脈病変の特徴 ~ 内膜肥厚、中膜断裂は瘤病変のみならず、退縮部位にも存在する ~ 第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2015.7. 東京
6. 立花伸也, 垣本信幸, 末永智浩, 武内 崇, 鈴木啓之, 吉川徳茂, 洪田昌一: 川崎病主要症状 2/6 で超巨大瘤を形成した 5 か月女児の 1 例 第 39 回近畿川崎病研究会 2015.3. 大阪
7. 鈴木啓之: 『川崎病急性期の診断と治療の問題点』—不全型、重症例への治療戦略

- 一』第 13 回青森川崎病研究会 2015.11. 青森市
8. 鈴木啓之:『川崎病急性期の診断と治療の問題点 —不全型、不応例への対応— 第 10 回北大阪小児医療懇話会 2015.9.守口市
 9. 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
 10. 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. 東京
 11. 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
 12. 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
 13. 濱田洋通、鈴木啓之、江畑亮太、尾内善広、花岡英紀、羽田明:重症川崎病に対するシクロスポリン A の有用性に関する医師主導治験 第 117 回日本小児科学会学会学術集会 2014.4. 名古屋
 14. 鈴木啓之、垣本信幸、末永智浩、武内 崇、洪田昌一、吉川徳茂、濱田洋通、寺井 勝、江畑亮太、花岡英紀、尾内善広、羽田明:重症川崎病の治療戦略 - シクロスポリン A (CsA)の有用性と課題 - 「川崎病急性期治療ガイドライン (H24 改訂版) 発表後の治療の実際」第 38 回近畿川崎病研究会 2014.3.大阪市
 15. 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:川崎病急性期におけるマトリックスメタロポロテアーゼ-3(MMP-3)と関節症状との関連 第 38 回近畿川崎病研究会 2014.3. 大阪
 16. 鈴木啓之:川崎病の急性期治療におけるシクロスポリン A (CsA) の有用性と今後の展望 第 10 回 岡山川崎病研究会 2014.11. 岡山市
 17. 鈴木啓之:難治性川崎病の急性期治療における治療戦略 - シクロスポリン A (CsA)の有用性と課題 - 第 13 回九州川崎病研究会 2014.5.鹿児島市
 18. 鈴木啓之:重症川崎病の急性期治療におけるシクロスポリン A (CsA)の有用性と課題 第 34 回東海川崎病研究会 2014.5. 名古屋市
 19. 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
20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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会 2013.7. 東京

〔図書〕(計 1 件)

1. 鈴木啓之:シクロスポリン療法、小児科臨床 ピクシス 9 川崎病のすべて (全訂新版) 総編集:五十嵐 隆 専門編集:石井正浩、中山書店、東京、2015.4.8

〔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 0 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

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

(2)研究分担者

吉川徳茂 (Yoshikawa Norishige)
和歌山県立医科大学・医学部・臨床研究センター長 研究者番号：10158412

(3)研究分担者

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

(4)研究分担者

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

(5)研究分担者

垣本信幸 (Kakimoto Nobuyuki)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：90614412

(6)連携研究者

なし()

研究者番号：