

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：81301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461597

研究課題名(和文)川崎病病態形成における免疫抑制性受容体LILRBの役割の検討と治療への応用

研究課題名(英文)The role of immunosuppressive receptor LILRB in the pathogenesis of Kawasaki disease, and its application to the therapy.

研究代表者

久間木 悟 (Kumaki, Satoru)

独立行政法人国立病院機構(仙台医療センター臨床研究部)・その他部局等・部長

研究者番号：20311566

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)：川崎病は幼少児期に発症する原因不明の血管炎で、免疫グロブリン大量療法(IVIG)が有効である。本研究では川崎病患者におけるB細胞分画と各細胞表面上の免疫抑制性受容体LILRBの発現パターンについて解析を行った。その結果、川崎病患者ではmemory B細胞の割合が増加していた。また、plasmablastの割合も急性期に有意に上昇していたが、IVIG後は正常化した。これらのことから川崎病の病態形成には獲得免疫が関与していることが示唆された。また、川崎病の急性期にはplasmablast上のLILRB4発現が亢進しており、川崎病の病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is an acute vasculitis of unknown pathogenesis which occurs most frequently in early childhood, and intravenous immunoglobulin (IVIG) is effective. To obtain a mechanistic insight into the humoral immune response in KD patients, B cell subpopulations and the expression pattern of immunosuppressive receptor LILRB was analyzed. As a result, proportion of memory B cells increased in acute phase of the KD patients when compared with normal controls. Furthermore, the proportion of plasmablasts was significantly elevated in the acute phase of KD, which returned to the basal level after IVIG. From these results, it was suggested that adaptive immunity is involved in the pathogenesis of KD. In addition, we demonstrate that the expression of LILRB4 was enhanced in the acute phase of KD, and the expression was controlled by IVIG. These results suggest that plasmablasts with increased LILRB4 expression play an important role in the pathogenesis of KD.

研究分野：小児科

キーワード：川崎病 免疫抑制性受容体 LILRB4 免疫グロブリン大量療法 plasmablast

1. 研究開始当初の背景

川崎病は 1967 年に川崎富作によって初めて報告された乳幼児に好発する全身の血管炎で、無治療の場合冠動脈病変が 20~25%合併する。症状としては 5 日以上続く発熱、両側眼球結膜の充血、口唇の紅潮・いちご舌・口腔咽頭粘膜のびまん性発赤、不定型発疹、急性期の手足の硬性浮腫および掌蹠ないし指趾先端の紅斑・回復期の指先からの膜様落屑、急性期における非化膿性頸部リンパ節腫脹が挙げられる。これらの症状は治療なしでも 2~3 週で自然に回復すること、4 歳未満の乳幼児に多く発症し、発生に地域性や流行がみられることなどから、何らかの感染症が引き金になって発症する可能性が考えられている。

これまでに多くの病原体が川崎病の原因として挙げられてきたが、いまだに特定の病原体は同定されていない。川崎病で死亡した患者の血管壁細胞や肺線毛上皮細胞などの細胞内に病原体の存在を疑わせる封入体と多数のオリゴクローナルな IgA 産生 B 細胞の浸潤が認められた^{1, 2)}。これらのことから川崎病の病原体は気道を介して侵入し、免疫反応を惹起して全身に広がっていくことが示唆された。

一方、最近のゲノムワイド関連解析で川崎病が様々な遺伝子と関連することがわかってきた。代表的なのが *FCGR2A*, *CASP3*, *HLA*, *BLK*, *ITPKC*, *CD40* で、いずれも免疫に関係する遺伝子群である³⁾。その中で *BLK* と *CD40* の SNP は SLE や関節リウマチと有意な相関を示すことが示されている⁴⁾。以上より、何らかの遺伝的背景を持った患児が感染を契機に川崎病を発症すると考えられた。

我々はこれまでに多くの川崎病患者を診療してきた。仙台医療センター小児科で過去 3 年間に経験した 163 例の川崎病患者の解析では頸部リンパ節腫脹が著明な患者では重症になる傾向があることを示した⁵⁾。この結果

は、川崎病の病原体が頸部リンパ節で特に強い反応を示した場合に重症化しやすく、川崎病の病原体が上気道から侵入するという考え方と矛盾しない。

治療としては免疫グロブリン大量療法 (IVIG) が有効であるが、川崎病に対する IVIG の作用機序に関してはまだ十分にわかっていない。我々はこれまでに免疫系でブレーキの役割を果たす抑制性受容体について研究を進める過程で、IVIG が抑制性受容体に直接作用し、活性化された B 細胞から産生される IL-10 を抑制する可能性を示してきた⁶⁾。川崎病患者でも IL-10 が異常高値を示しており、IVIG で軽快する。以上のことから、川崎病患者では感染によって引き起こされた炎症に対するブレーキがかかりにくくなった状態にあることが考えられた。これらのことを踏まえ、川崎病の病態は“何らかの遺伝的背景を持った患児に感染症が引き金となり強い炎症が起こり、それがコントロールできなくなった状態”ではないかという発想に到った。この点を明らかにするために本研究では免疫系でブレーキの役割を果たす抑制性受容体 LILRB に着目し研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では

- 1) 川崎病急性期において B 細胞分画が急性期と回復期でどのように変化するかを確認する。
- 2) B 細胞表面上の抑制性受容体 LILRB の発現を IVIG 前後で比較する。

3. 研究の方法

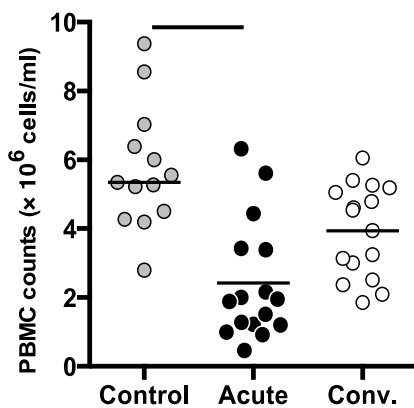
- 1) 研究対象患者: 2013 年 12 月から 2016 年 7 月までの間に、仙台医療センター小児科において川崎病の診断で グロブリン大量療法を受けた患者および健常児のうち、文書で同意の得られた患者を対象とした。川崎病患者では急性

期の採血は発症から平均 5.0 日、回復期の採血は平均 13 日に施行した。

- 2) 川崎病患者の臨床症状を詳細に記載し、治療前後で白血球数、肝機能、炎症反応などの一般血液検査を行うとともに、心機能のマーカ-*pro*-BNP を測定し、心エコー検査も行った。
- 3) リンパ球分画を、CD4 および CD8 で展開し、double negative の分画をさらに CD19 と CD27 で展開することで、naïve B 細胞、memory B 細胞、plasmablast の分画に分けて検討した。
- 4) T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、好中球上に発現する抑制性受容体 LILRB の定量化を行なった。

4. 研究成果

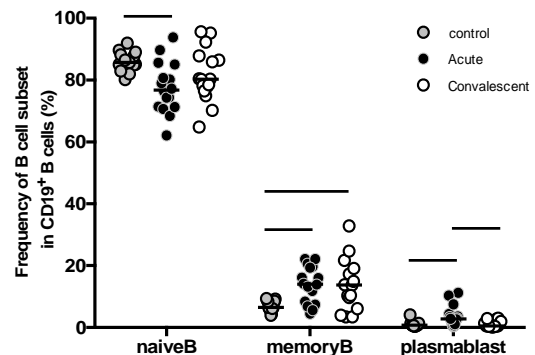
1) 川崎病の急性期では末梢血単核球数が減少していた。



2) T 細胞、B 細胞、単球の割合について検討したが、以前の報告と同様に川崎病患者では急性期で T 細胞の割合が減り、逆に B 細胞の割合は増加していた。

3) 川崎病患者末梢血中の B 細胞分画の急性期と回復期の変化について検討したところ、川崎病患者では正常コントロールに比し memory B 細胞の割合が増加し、naïve B 細胞の割合が少なくなっていた。さらに末梢血中で抗体を産生する plasmablast の割

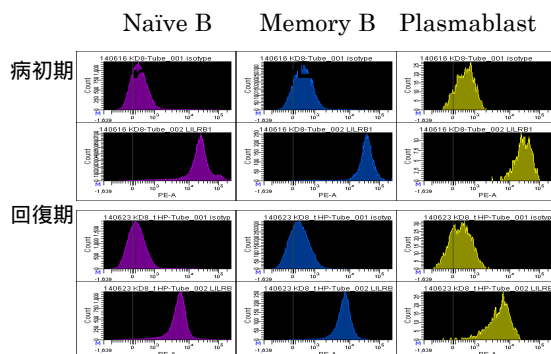
合は川崎病急性期に有意に上昇していたが、IVIG 後は正常コントロールと同程度まで低下した。



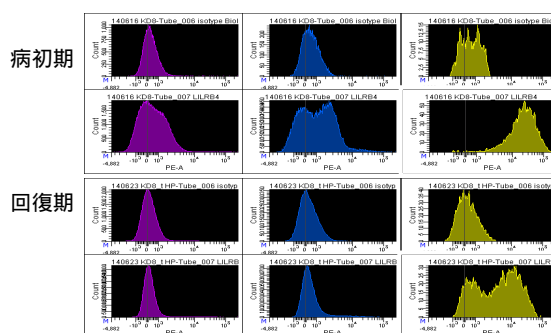
これらのことから川崎病の病態形成には抗体産生細胞を含む獲得免疫が関与していることが示唆された。

4) 川崎病患者末梢血細胞表面上の LILRB の発現。

LILRB1



LILRB4



B 細胞のサブセットに発現している抑制性受容体 LILRB について検討したのがこの図である。LILRB1 はすべての B 細胞サブセットで発現していた。これに対し、

LILRB4は急性期の plasmablast に発現が亢進していたが、IVIG 後の回復期には低下した。このことから、川崎病では IVIG により LILRB4 の発現がコントロールされ、その結果炎症反応が抑制される可能性が考えられた。以上より LILRB4 が川崎病の病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Rowley AH, et al. *J Immunol.* 159:5946, 1997.
- 2) Rowley AH, et al. *Nature Rev Microbiol.* 6:394-401, 2008.
- 3) Onouchi Y, *Circ J.* 76:1581-1586, 2012.
- 4) Onouchi Y, et al. *Nature Genet.* 44:517-521, 2012.
- 5) 松原容子ら . 過去 3 年間に当科で経験した川崎病 164 例の検討. 第 65 回北日本小児科学会 . 2013 年 9 月、仙台。
- 6) Tanaka J, et al. *Open J Immunol.* 4:149-160, 2012.

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 17 件)

1. Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. ***Pediatr Transplant.* 18:E25-30, 2014.**
2. Yamaguchi H, Nagumo K, Nakashima T, Kinugawa Y, Kumaki S. Life-threatening QT prolongation in a boy with attention-deficit/hyperactivity disorder on

atomoxetine. ***Eur J Pediatr.* 173:1631-4, 2014.**

3. Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaiki I, Uchiyama M, Wong WF, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, Kure S. The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. ***Int Immunol.* 26:341-52, 2014.**
4. Suzuki S, Kaga A, Kusaka N, Uematsu M, Haginoya, Katata Y, Matsubara Y, Ishida T, Kitaoka S, Kumaki S. A case of acute cerebellitis with a unique sequential change on MRI. ***Pediatr Neurol.* 51(2):279-81, 2014.**
5. Kanari Y, Sugahara-Tobinai A, Takahashi H, Inui M, Nakamura A, Hirose S, Takai T. Dichotomy in FcγRIIB deficiency and autoimmune-prone SLAM haplotype clarifies the roles of the Fc receptor in development of autoantibodies and glomerulonephritis. ***BMC Immunol.* 15:47, 2014.**
6. Ito Y, Akimoto T, Cho K, Yamada M, Tanino M, Dobata T, Kitaichi M, Kumaki S, Kinugawa Y. A late presenter and long-term survivor of alveolar capillary dysplasia with misalignment of the pulmonary veins. ***Eur J Pediatr.* 174:1123-6, 2015.**
7. Kimura T, Endo S, Inui M, Saitoh S, Miyake K, Takai T. Endoplasmic Protein Nogo-B (RTN4-B) Interacts with GRAMD4 and Regulates TLR9-Mediated Innate Immune Responses. ***J Immunol.* 194(11):5426-36, 2015.**
8. Inui M, Tazawa K, Kishi Y, Takai T. Platelets convert peripheral blood

- circulating monocytes to regulatory cells via immunoglobulin G and activating-type Fcγ receptors. **BMC Immunol.** **16:20, 2015.**
9. Inui M, Hirota S, Hirano K, Fujii H, Sugahara-Tobinai A, Ishii T, Harigae H, Takai T. Human CD43+ B cells are closely related not only to memory B cells phenotypically but also to plasmablasts developmentally in healthy individuals. **Int Immunol.** **27:345-55, 2015.**
 10. Rokugo Y, Kumaki S, Onuma R, Noguchi R, Suzuki S, Kusaka N, Watanabe Y, Kitaoka S. Transient Creatine Kinase Elevation Followed by Hypocomplementemia in a Case of Rotavirus Myositis. **Case Rep Pediatr.** **2016:3034170, 2016.**
 11. Kaga A, Katata Y, Suzuki A, Otani K, Watanabe H, Kitaoka S, Kumaki S. Perinatal Coxsackievirus B3 Infection with Transient Thrombocytopenia. **Tohoku J Exp Med.** **239:135-138, 2016.**
 12. Nanishi E, Hoshina T, Takada H, Ishimura M, Nishio H, Uehara T, Mizuno Y, Hasegawa S, Ohga S, Nagao M, Igarashi M, Yajima S, Kusumoto Y, Onishi N, Sasahara Y, Yasumi T, Heike T, Hara T, Kumaki S, et al.; PID-Infection Study Group. A nationwide survey of common viral infections in childhood among patients with primary immunodeficiency diseases. **J Infect.** **73:358-368, 2016.**
 13. Kaga A, Watanabe H, Miyabayashi H, Metoki T, Kitaoka S, Kumaki S. A Term Infant of Neonatal Toxic Shock Syndrome-Like Exanthematous Disease Complicated with Hemophagocytic Syndrome. **Tohoku J Exp Med.** **240:167-170, 2016.**
 14. Inui M, Sugahara-Tobinai A, Fujii H, Itoh-Nakadai A, Fukuyama H, Kurosaki T, Ishii T, Harigae H, Takai T. Tolerogenic immunoreceptor ILT3/LILRB4 paradoxically marks pathogenic auto-antibody-producing plasmablasts and plasma cells in non-treated SLE. **Int Immunol.** **28:597-604, 2016.**
 15. Takai T, Inui M. Exploring of immune inhibitory receptors that characterize pathogenic plasma cells in systemic lupus erythematosus. **Arerugi.** **66:27-31, 2017.**
 16. Metoki T, Okamoto M, Suzuki A, Kitaoka S, Miyabayashi H, Rokugo Y, Onuma R, Noguchi R, Sato T, Watanabe Y, Ohmiya S, Sato K, Nishimura H, Oshitani H, Kumaki S. Co-circulation of Enterovirus-D68, Human Rhinoviruses, and Respiratory Syncytial Virus among Children in Sendai, Japan. **Pediatr Infect Dis J.** **submitted.**
 17. Inui M, Sugahara-Tobinai A, Kumaki S, Takai T. Down-modulation of the subset of peripheral blood plasmablasts and its ILT3/LILRB4 expression in convalescent phase of patients with Kawasaki disease, manuscript in preparation.
- 〔学会発表〕(計1件)
久間木悟、乾匡範、飛内章子、三浦舞子、目時嵩也、渡邊庸平、大沼良一、野口理恵、貴

田岡節子、高井俊行．川崎病患者に対する免疫グロブリン大量療法前後における抑制性受容体 LILRB 発現の変化について．第 36 回日本川崎病学会．2016 年 10 月．横浜．

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

久間木 悟 (KUMAKI, Satoru)

国立病院機構仙台医療センター・部長

研究者番号：2 0 3 1 1 5 6 6

(2)研究分担者

高井俊行 (TAKAI, Toshiyuki)

東北大学加齢医学研究所・教授

研究者番号：2 0 1 8 7 9 1 7

乾 匡範 (INUI, Masanori)

東北大学加齢医学研究所・講師

研究者番号：8 0 4 4 3 9 8 5