

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461616

研究課題名(和文) 非受容体型チロシンキナーゼPYK2を分子標的とする川崎病新規治療法の開発

研究課題名(英文) Non-receptor type, proline-rich protein tyrosine kinase 2 (Pyk2) is a possible therapeutic target for Kawasaki disease

研究代表者

中村 明宏 (Nakamura, Akihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：50313854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は小児にみられる原因不明の血管炎で、しばしば冠動脈瘤などの心血管後遺症を伴う。私たちは本研究で、マウス川崎病様血管炎の発症に非受容体型プロリンリッチチロシンキナーゼ2(pyk2)が関与することを明らかにした。Pyk2ノックアウト(KO)マウスは起炎物質CAWSで誘導される同血管炎に抵抗性を示すとともに、CAWS刺激したpyk2KOマウスでは、血管新生抑制作用を有するCXCL9および10が長期にわたり高値を示すことがわかった。Pyk2-KOマウスでは炎症応答に関わる微小血管の新生が抑制されることにより、血管炎に抵抗性を示す事が示唆される。Pyk2は川崎病治療の分子標的として期待出来る。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease is a pediatric vasculitis whose etiology remains elusive. On the basis of experimental study with mouse model for KD, we report here that non-receptor type proline-rich tyrosine kinase 2 (pyk2) might be involved in the pathogenesis of KD. Pyk2-KO mice were resistant to candida albicans extract (CAWS)-induced KD-like vasculitis. Two angiostatic chemokines, CXCL9 and 10 were increased in response to stimulation with CAWS. Considering that neo-angiogenesis is associated with KD-like murine vasculitis, sustained increase of these chemokines might be involved in resistance of pyk2 KO-mice to the vasculitis. Overall, pyk2 might be a promising therapeutic target for KD.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 動物モデル protein kinase

1. 研究開始当初の背景

川崎病は、小児にみられる全身性血管炎で、しばしば冠動脈瘤に代表される心血管後遺症を伴う。その原因および発症機序はあきらかでないが、最近の研究から感染等を契機とする免疫応答の制御異常の関与が示唆されている。非受容体型プロリンリッチチロシキナーゼ 2(pyk2)は免疫応答や炎症に関わる様々なシグナル伝達経路を構成する酵素として知られている。川崎病血管炎の発症機序に同分子が重要な役割を担うならば、pyk2は川崎病の新規な治療標的として期待出来る。私たちはすでに川崎病動物モデルを用いた実験系を確立しており、本疾患におけるpyk2の役割を *in vitro*, *in vivo* の両面から調べることが可能であることから、本研究を立案した。

2. 研究の目的

川崎病血管炎における非受容体型プロリンリッチチロシキナーゼ Pyk2 の関与を明らかにし、さらにその治療標的としての可能性を検証する。

3. 研究の方法

川崎病マウスモデルは大野らの方法に準じて、*C. albicans* 水溶性抽出物(CAWS)を野生型およびPyk2 ノックアウト(Pyk2-KO)マウスの腹腔内に反復投与して作成した。投与してから4週間後に血管炎の有無および重症度をHE, 好中球浸潤、テネシンCの発現をもとに評価した。CXCL9および10をはじめとする血中サイトカインはサイトカインアレイおよびELISAにより分析した。STATsの活性化の分析は *in vitro* で分化させた骨髄細胞由来マクロファージを材料として行った。Pyk2-KOマウスはFukai, Matobaらより供与を受けた。

4. 研究成果

CAWSを投与した野生型マウスの60%で冠動脈分岐部を含む大動脈起始部に著明な好中球浸潤と浮腫状変化を主体とする炎症像を認め、CAWS投与したPyk2-KOマウスのうち血管炎を発症した個体は1例もなく、Pyk2が

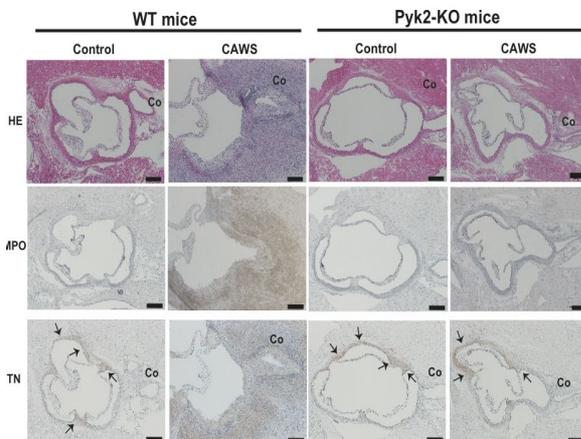


Fig 1. CAWS 投与マウスの大動脈起始部の病理組織化学的検討

(Suzuki Cet al. Clin Immunol 2017)

川崎病血管炎発症に必須であることが示唆された (Fig1 および 2)。

血清のサイトカインアレイおよびELISA

解析から、CAWS投与したPyk2-KOマウスでは血清CXCL9および10レベルが長期にわたり高値を示す事が判明した(Fig.3)。

Okamoto-Hamaoka Aらは、マウス川崎病様血管炎は炎症初期より外膜側の微小血管の新生が起こることを見だし、炎症細胞浸潤の経路としての役割を考察しているが、CXCL9および10は強力な血管新生抑制作用を

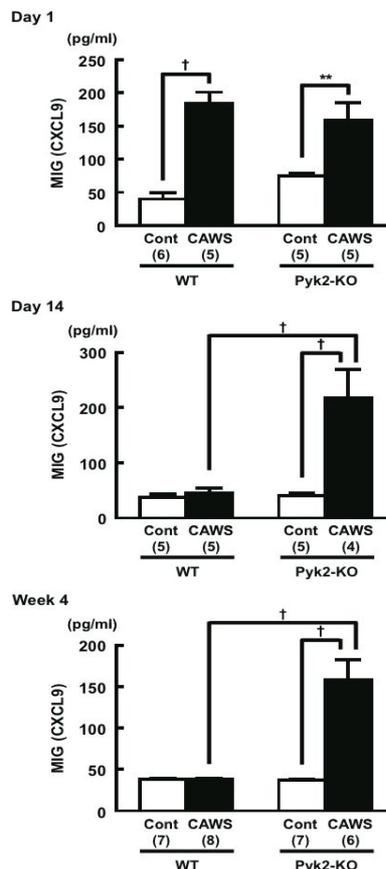


Fig.3 CAWS 投与後の血中CXCL9レベルの経時変化

(Suzuki C et al. Clin immunol 2017)

有することが知られている。ゆえにこれらのケモカインは血管新生を抑制することで血管炎発症を抑制している可能性がある。事実、CAWS投与pyk2-KOマウスでは新生血管の増生は認められなかった。

本マウスモデルにみられる血管炎以外の

特徴として脾腫が知られている。Pyk2 は脾臓マージナルゾーン B 細胞(MZB)の分化に必須であることから、血管炎発症と MZB の関連について脾臓摘除マウスを用いて調べた。CAWS 投与により脾摘マウスにおいても正常対照群マウスと同様に血管炎を発症した。ゆえに pyk2-KO マウスの血管炎抵抗性は同マウスの MZB 欠損に起因するものではないと考えられる。

CXCL9 および CXCL10 の発現は Jak/STAT 系の制御下にあることが知られている。野生型および pyk2-KO マウス由来マクロファージを用いて CAWS 刺激による STATs の活性化を in vitro 系で比較した。その結果、CAWS 刺激に伴う STAT3 のリン酸化は Pyk2KO マウス由来マクロファージで有意に抑制されていた。STAT3 はこれらケモカインの発現に対して抑制的に働くと報告されていることから、Pyk2-KO マウスでは CAWS 刺激で誘導された CXCL9 および CXCL10 の発現に対する負の調節が十分でないことで、結果としてこれらのケモカインの血中濃度の持続的な高値につながっている可能性が考えられる。

川崎病マウスモデルにみられる血管炎とヒトの川崎病で分子機序の共通点についてはさらなる研究が必要であるが、同マウスモデルの示す血管炎病態はヒトの川崎病のそれと共通する病理学的に特徴をもつ。Pyk2-KO マウスは少なくとも生存に影響を与えるような表現型を示さないことを考えると、Pyk2 は川崎病治療の分子標的候補のひとつとして有望と考えられる。低酸素誘導性肺高血圧モデルをはじめいくつかの病態動物モデルで Pyk2 の関与が明らかになりつつある。今後、Pyk2 に高い特異性をもつ阻害物質の開発に期待したい。

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 4 件)

Suzuki C, Nakamura A*, Miura N, Fukai K, Ohno N, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Fujii M, Yoshioka A, Kuchitsu Y, Ikeda K, Hamaoka K*.

Non-receptor type, proline-rich protein tyrosine kinase 2 (Pyk2) is a possible therapeutic target for Kawasaki disease. Clin Immunol.2017; 179: 17-24. (査読あり)

Asada D*, Itoi T, Nakamura A, Hamaoka K. Tolerance to ischemia reperfusion injury in a congenital heart disease model. Pediatr Int. 2016 ;58:1266-1273. (査読あり)

Fujii M, Tanaka H*, Nakamura A, Suzuki C, Harada Y, Takamatsu T, Hamaoka K. Histopathological Characteristics of

Post-inflamed Coronary Arteries in Kawasaki Disease-like Vasculitis of Rabbits. Acta Histochem Cytochem. 2016 ;49:29-36. (査読あり)

Fukai K, Nakamura A, Hoshino A, Nakanishi N, Okawa Y, Ariyoshi M, Kaimoto S, Uchihashi M, Ono K, Tateishi S, Ikeda K, Ogata T, Ueyama T, Matoba S*. Pyk2 aggravates hypoxia-induced pulmonary hypertension by activating HIF-1 α . Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015 ;308:H951-9. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

鈴木千夏、中村明宏、沖垣光彦、八幡倫代、岡本亜希子、吉岡綾子、池田和幸、三浦典子、大野尚仁、濱岡建城 血管新生抑制をターゲットとした川崎病治療の可能性～川崎病モデル動物を用いた検討 第 36 回日本川崎病学会学術集会.2016.9.30-10.1. ワークピア横浜. 横浜

中村明宏、三浦典子、鈴木千夏、大野尚仁、濱岡建城 マウス川崎病血管炎の発症における P-selectin の関与 36 回日本川崎病学会学術集会.2016.9.30-10.1. ワークピア横浜. 横浜

Suzuki C, Nakamura A, Okigaki M, Miura N, Ohno N, Yahata T, Okamoto A, Yoshioka A, Kuchitsu Y, Ikeda K, Hamaoka K. Involvement of Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) in Kawasaki disease-like murine vasculitis.

49th Annual meeting of European Paediatric and Congenital Cardiology.May20-23 2015,Prague Congress Centre, Prague. Czech Republic.

鈴木千夏、中村明宏、沖垣光彦、八幡倫代、岡本亜希子、吉岡綾子、池田和幸、三浦典子、大野尚仁、濱岡建城 川崎病血管炎の IP-10 産生経路における Proline-rich tyrosine kinase 2 の関与について 第 35 回日本川崎病学会学術集会 2015.10.9-10.10 鹿児島県医師会館 鹿児島市

中村明宏、亀谷富由樹、三浦典子、鈴木千夏、大野尚仁、濱岡建城 マウス川崎病様血管炎における抗ミトコンドリア自己抗体の役割 第 35 回日本川崎病学会学術集会 2015.10.9-10.10 鹿児島県医師会館 鹿児島市

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

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〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 中村 明宏
(NAKAMURA, Akihiro)
京都府立医科大学大学院医学研究科・博士
研究員
研究者番号：50313854

(2)研究分担者 濱岡 建設
(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
(削除：平成 28 年 3 月 22 日)