

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860809

研究課題名(和文) アミノ基特異的誘導体化LC-MS分析による川崎病のバイオマーカー検出

研究課題名(英文) Biomarker detection of Kawasaki disease by LC-MS analysis of amino group derivatization

研究代表者

楠田 剛 (KUSUDA, Takeshi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90710533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：KD血清でHCAECを刺激したところ、炎症性サイトカインを産生した。3期間に採取したKD血清をLC-MSで分析、脂溶性分画に特異的分子を同定した。第1期の特異的分子はin vitroのバイオフィーム由来のMAMPs(セレウス菌、偽結核菌と黄色ブドウ球菌)と、第2,3期はin vivoで形成されたバイオフィーム由来のMAMPs(第2期:セレウス菌、第3期:枯草菌/セレウス菌/偽結核菌と黄色ブドウ球菌)と同じパターンであった。セレウス菌、枯草菌、偽結核菌と黄色ブドウ球菌のバイオフィーム抽出物もHCAECから炎症性サイトカインを産生した。これらのKD特異的分子の一部はIgGに結合した。

研究成果の概要(英文)：KD samples elicited proinflammatory cytokine responses from human coronary artery endothelial cells(HCAECs). By LC-MS analysis of KD serum samples collected at 3 different periods, we detected a variety of KD-specific molecules in the lipophilic fractions. Serum KD-specific molecules showed m/z and MS/MS fragmentation patterns almost identical to those of MAMPs obtained from the biofilms formed in vitro (common MAMPs from *Bacillus cereus*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Staphylococcus aureus*) at the 1st study period, and from the biofilms formed in vivo (common MAMPs from *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*/*Bacillus cereus*/*Yersinia pseudotuberculosis* and *Staphylococcus aureus*) at the 2nd and 3rd periods. The biofilm extracts from *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Staphylococcus aureus* also induced proinflammatory cytokines by HCAECs. By the experiments with IgG affinity chromatography, some of these serum KD-specific molecules bound to IgG.

研究分野：新生児

キーワード：川崎病 バイオフィーム 偽結核菌 セレウス菌 枯草菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 川崎病とバイオマーカー

川崎病は乳幼児に好発する熱性疾患であり、適切に治療を行っても数%に冠動脈瘤を形成し、心筋梗塞に至ることもある。川崎病の罹患者数は年々増加傾向にあり、年間 13000 人にも及ぶが、発熱した小児を診察する際、川崎病かどうか鑑別に苦慮することが少なくない。しかしながら川崎病の病因は未だ不明であり診断に有用なバイオマーカーも存在しない。

(2) 自然免疫 Nod1 リガンドによる川崎病類似冠動脈炎マウスモデルの完成

近年、当研究室では川崎病の発症に対する自然免疫の関与を世界で初めて明示した (K. Ikeda, et al. *Clin Exp Immunol.* 2010, H. Nishio, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011)。更に、動脈硬化に対しても自然免疫の関与があるという実験結果を得ている。これらは自然免疫、なかでも Nod1 (nucleotide-binding oligomerization domain 1) に因るものである。マウスに Nod1 リガンドを短期間大量投与、もしくは長期間少量投与すると川崎病類似の血管炎、動脈硬化が惹起された。つまり、感染、もしくはヒトの“常在細菌叢”から放出された NOD1 リガンドが受容体に結合し、川崎病や動脈硬化の炎症を惹起すると推定される (図 1)。

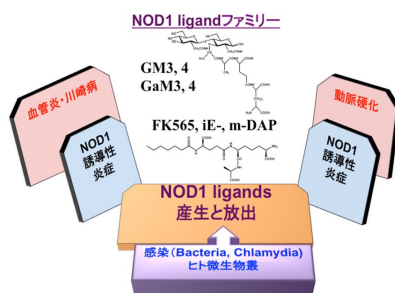


図1 川崎病発症とNOD1リガンドガイドラインモニタリング

この常在細菌叢で産生されるペプチドグリカンのうち、FK565 等の低分子物質が NOD1 リガンドとして機能したという事実は、ペプチドグリカン及びその代謝物が川崎病、さらには動脈硬化といった血管炎を診断することができるバイオマーカー候補物質であることを強く示唆する。

(3) 当研究室におけるバイオマーカーの検索

これまで、ペプチドグリカン及び代謝物を川崎病バイオマーカー (つまり Nod1 リガンド) として捉え、川崎病患者の血清及び尿についての質量分析法 (LC-MS) を適用し検討してきたが、以下の事由により確定分析までには至っていない。

検出感度が悪い: Nod1 リガンドはいずれも log P 値がマイナスであり、高極性、低分子物質のため、極めて MS 検出のためのイオン化効率が低い。

LC での分離が悪い: 高極性であるが故に、

LC 分離部での溶出が早く、また血液マトリックスによるバックグラウンドノイズが大きくなるため、LC-MS 分析が得意とする高選択的分析の適用が困難。

従って、NOD1 リガンド説を実証するためには、多量の被験者試料と多段階の前処理工程が必要であった。

(4) “高感度” TNBS アミノ基誘導体化の導入

少量 (血液、尿ともに 50 μ L 以下を目標) かつ pg/mL 以上の高検出感度を達成するために、Nod1 リガンドがいずれも第 1 アミノ基を有することに着目し、近年報告された“高感度” TNBS アミノ基誘導体化 LC-MRM-MS/MS 法を適用する (図 2) (C.Hashimoto et al. *Anal. Chem.* 2013)。

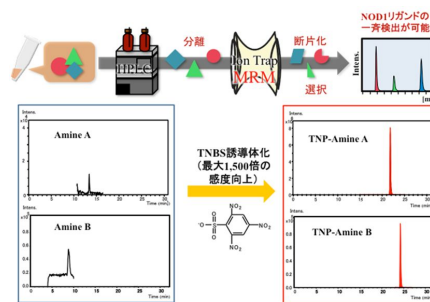


図2 TNBS誘導体化LC-MRM-MS/MS法

TNBS 誘導試料の直接 MS 分析を達成し、連続分析を行うためのクリーンアップ LC-MS/MS システムを構築し、誘導体化 MS 分析法の簡便化と頑健性の確保を目指す。

2. 研究の目的

川崎病の原因が未だ不明な中、その診断に苦慮することが少なくない。我々は自然免疫受容体 NOD1 リガンドがマウスに川崎病類似の血管炎を惹起する事を明らかにしている。この事は細菌叢で産生されるペプチドグリカン及びその代謝物が川崎病のバイオマーカー候補物質であることを示唆している。しかし質量分析計での患者検体の解析では、感度が低くその検出に至っていない。本研究では患者検体中の NOD1 リガンドを誘導体化することにより高感度に検出し、川崎病の診断、更には病態の解明につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 検体

2010 年 6 月から 2014 年 3 月に、九州大学病院、福岡市立こども病院、川崎医科大学附属病院あるいは倉敷中央病院に入院した患者を対象とし、KD117 名、疾患コントロールとしての他の熱性疾患 (DC) 101 名および正常コントロール (NC) 5 名を用いた。それらを採取時期で第 1 期から 3 期に分けた。

(2) 検体採取

血液検体の採取は、免疫グロブリン大量療法 (IVIg) の前後に行った。また歯、舌、鼻腔と直腸 (便) のバイオフィルムを採取した。

(3) 脂質の抽出

酢酸エチルを用いて脂溶性と水溶性分画に分けた。

(4)細胞刺激とサイトカイン分析

ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) を培養し刺激24 時間後に上清を回収しそのサイトカインを分析した。

(5)LC-MS による分析

Dionex Acclaim サーフアクトカラムを用いた LC-MS にて解析した。

(6)スライドガラスからのバイオフィーム抽出

培養液を取り除いた後、培養したチューブとスライドガラスを酢酸エチルの存在下にボルテックスをかけた。その酢酸エチルを抽出し蒸発させ、得られたペレットを 100%メタノールに溶解した。

(7)IgG アフィニティクロマトグラフィー

様々なアフィニティカラムを用いて結合実験を行った。

4. 研究成果

(1)in vitro での KD 患者血清による HCAEC の活性化

HCAEC を血清で刺激したところ、KD 患者では明らかに多くの IL-8 と IL-6 を産生させた。脂溶性と水溶性に分けても両分画で KD 検体はより多くの IL-8 と IL-6 を産生させた (図 3)。

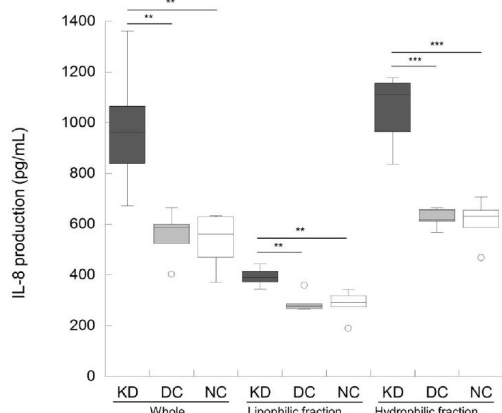


図 3 血清による HCAEC 刺激

(2)血清中の KD 特異的分子は in vitro のバイオフィーム由来の MAMPs と構造が共通である

KD 患者血清の脂溶性分画と水溶性分画を LC-MS で解析した結果、数多くの KD 特異的分子が存在した。ところで *Yersinia* (*Y.*) *pseudotuberculosis* に感染した児はしばしば KD を発症するとの報告がある。更に、*Bacillus* (*B.*) *cereus* と *B. subtilis* は KD 患者から分離された 2 大芽胞形成菌であったことから、これらは風に運ばれてくる KD の引き金としての環境因子である可能性がある。LC-MS で解析した結果、脂溶性分画中の 5 つの KD 特異的分子が *Y. pseudotuberculosis* と *B. cereus* 由来の MAMPs とほとんど一致したパターンを示していた。それらは KD 患者血清中に 100%の特異

度と 9.3-48.8%の感度で認めた。それらのうち少なくとも 1 つが 76.7%の KD 患者で認められた。全ての KD 血清特異的分子は IVIG 治療後に減少した (図 4 は 5 つのうちの 1 つ、 $m/z=1531.8$)。

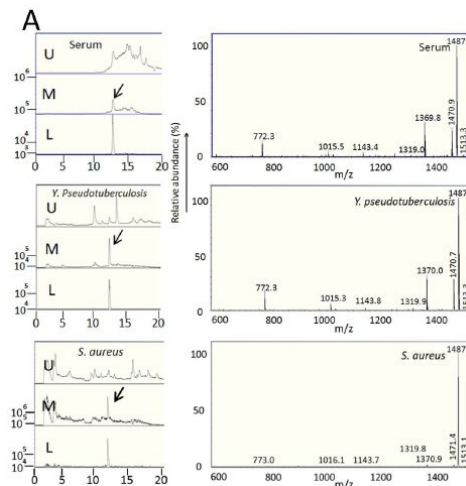


図 4 KD 特異的物質の質量分析計を用いた測定 (第 1 期)

次に MAMPs 産生の為の適切な培養条件を調べたところこれらの細菌は、脂質の存在下、特にバターの存在下でのバイオフィーム形成条件で MAMPs を再現性良く産生することが分かった。

(3)KD 血清特異的分子は in vivo バイオフィーム由来の MAMPs と構造が類似している

第 2 期では第 1 期で検出された 5 つの KD 特異的 MAMPs は検出されなかった。微生物由来の糖脂質中のオリゴサッカライドの数とその長さ、位置、飽和度や水溶性部位の位置は環境や菌の違いで変化することが知られているため、それぞれの KD 患者の in vivo のバイオフィームを LC-MS で解析した。その結果第 2 期の KD 患者 12 人のうち 10 人 (83.3%) に 4 つの KD 血清特異的分子を認め、これらは in vivo バイオフィーム (歯、舌、鼻と便) と一致していた。

第 3 期では 3 つの KD 特異的分子を検出し、それらは KD 患者の in vivo バイオフィームと MS/MS パターンが一致していた。KD 血清特異的分子の 3 つのうち 2 つはそれぞれ *S. aureus* 由来、*B. subtilis*、*B. cereus* もしくは *Y. pseudotuberculosis* 由来の MAMP と MS/MS パターンが一致していた。実際、*B. subtilis* と *S. aureus* は患者から検出された。3 つの KD 特異的 MAMPs のうち少なくとも 1 つを 11 人の KD 患者中 10 人 (90.9%) で認めた。LC-MS による解析により、第 1、2 と 3 期に認められたそれぞれ 5、4、3 個の KD 特異的 MAMPs は、106 人の対照群では検出されなかった (図 5 は第 2 期の $m/z=695.0$)。

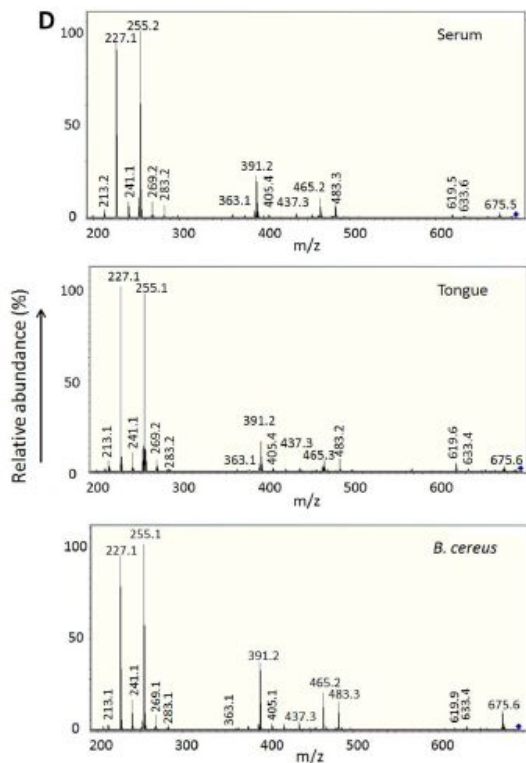


図5 KD 特異的物質の質量分析計を用いた測定 (第2期)

(4) IgG セファロースはいくつかのKD 血清特異的 MAMPs に結合する

ある微生物由来の糖脂質が様々な IgG に結合したという報告がある。そこで我々は様々な種類の IgG アフィニティカラムを用いて KD 特異的 MAMPs の IgG 結合活性を調べたところ主に Fab の抗原非結合部位を介して IgG に結合していた (図6)。

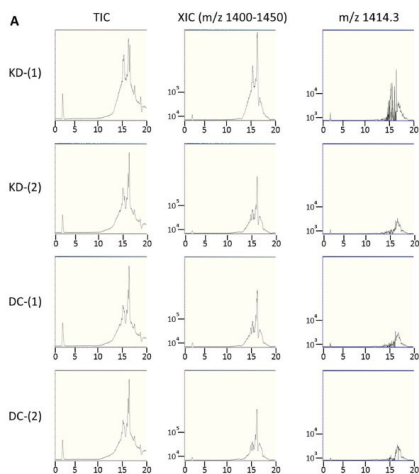


図6 IgG に結合する KD 特異的物質

(5) 様々な菌由来の in vitro バイオフィルムの MAMPs の解析

我々は様々な菌由来の培養上清や in vitro のバイオフィルムによる HCAEC の刺激活性を調べた。すると *B. cereus* (9 株中 9 株)、*B. subtilis* (5 株中 2 株)、*Y.*

pseudotuberculosis (4 株中 4 株)、*Pseudomonas aeruginosa* それに *S. aureus* 由来のバイオフィルム抽出物で刺激すると、HCAEC から有意に多くの IL-8 と IL-6 産生が認められ、特にバターを入れて培養した際に顕著であった。*B. cereus*、*B. subtilis*、*Y. pseudotuberculosis*、*P. aeruginosa* と *S. aureus* 由来のバイオフィルム抽出物を HPLC で分画して解析すると、5 つ全ての菌で同じ分画に HCAEC 刺激活性を認めた (図7)。

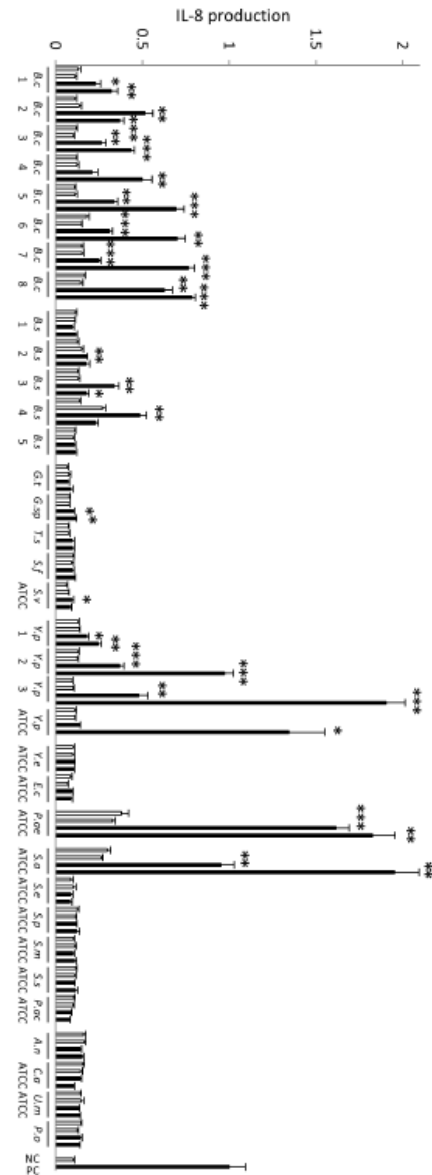


図7 様々な微生物由来バイオフィルムによる HCAEC 刺激

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1件)

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T. Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated

molecular patterns in the biofilms.
PLoS One. 査読有, 9(11), 2014: e113054.
DOI: 10.1371/journal.pone.0113054

〔学会発表〕(計4件)

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Tanaka T, Hara T

Microbe-associated molecular patterns in Kawasaki disease.

Controversies in Rheumatology & Autoimmunity (CORA 2015).

Mar 12, 2015. Sorrento, Italy

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Saito M, Tanaka T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T

Serum KD-specific microbe-associated molecular patterns are derived from in vitro and in vivo biofilms.

11th International Kawasaki Disease Symposium. Feb 4, 2015. Hawaii USA

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Hara T

Identification of Kawasaki disease-specific molecules in the sera as microbe-associated molecular patterns.

11th International Kawasaki Disease Symposium. Feb 3, 2015, Hawaii, USA

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Hara T
Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) in the biofilms: A possible cause of Kawasaki disease.

The 34th Annual Meeting of the Japanese Society of Kawasaki Disease. Oct 31, 2014
Tokyo. 学術総合センター

〔図書〕(計0件)

〔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

楠田 剛 (KUSUDA, Takeshi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90710533

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: