

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860821

研究課題名(和文) シクロスポリンAとIVIgに対する免疫応答の相違分析による難治性川崎病の病態解明

研究課題名(英文) Functional mechanism of IVIG and cyclosporin A therapy for IVIG-resistant Kawasaki disease

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病患児のIVIg施行前後、シクロスポリンA(CsA)内服前後に、フローサイトメトリーで、pSTAT3、pSTAT5の平均蛍光強度(MFI)の測定と、realtime RT-PCR法で、遺伝子発現量の測定を行った。CsA投与群で、pSTAT3のMFIが有意に低下、初回IVIg奏功群(1st群)で、IVIg投与後、pSTAT3のMFIが低下、pSTAT5のMFIが上昇した。CsA投与後にNFATc1、c2の遺伝子発現量が上昇し、1st群で、IVIg投与後にNFATc1、c2の発現量が上昇した。JAK-STAT経路、NFAT経路が、川崎病の急性期の免疫応答に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peripheral blood samples were obtained just before and after the initial course of IVIG, additional IVIG, and CsA therapy for patients with Kawasaki disease. To evaluate the NFAT pathway and activation of the JAK-STAT pathway, we examined the gene expression of cytokines and intracellular signal transducers using real-time RT-PCR and pSTAT3 and pSTAT5 using flow cytometry. In the CsA group, expression of mRNAs for NFATc1 and c2 was significantly increased, whereas the mean fluorescence intensity (MFI) of pSTAT3 was decreased after CsA treatment. In the group responsive to initial IVIG, the MFI of pSTAT3 was decreased, and that of pSTAT5 was increased, after IVIG. In patients with refractory KD, CsA exerts effects on the activity of the JAK-STAT pathways and NFAT pathway.

研究分野：小児循環器学

キーワード：川崎病 シクロスポリンA 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 川崎病の治療と病態

川崎病(KD)は、乳幼児に好発する原因不明の全身の中・小動脈の血管炎であり、循環血液中の炎症性サイトカインの上昇が認められる。一般にKDの治療にはガンマグロブリン静注療法(IVIG)が用いられ、冠動脈瘤形成等の後遺障害の回避に一定の有効性がある。しかし、約20%は、初回IVIGが無効で、追加の治療が必要となる、難治性KDである。追加の治療法として複数の薬剤が使用されているが、当教室のSuzukiらは、T細胞活性化の細胞内シグナル伝達経路である Nuclear factor of activated T cells (NFAT)経路を抑制するシクロスポリン A (CsA) が有効であるとの報告 (Pediatr Infect Dis J. 30(10):871-6,2011) を行った。川崎病急性期治療のガイドライン (日小循誌 2012) への記載も行われ、現在では国内外の複数の施設でCsAが用いられ、良好な治療成績をおさめている。

最近、当教室のSuzukiらは難治性KD罹患児の急性期において、炎症性サイトカインであるインターロイキン-2 (IL-2) の受容体である、可溶性インターロイキン-2受容体 (sIL-2R) とインターロイキン-6 (IL-6) の血中濃度が有意に上昇するとの報告をした (Pediatr Int 52(5):785-9,2010)。ヒトにおける免疫系には、主に、細胞性免疫と、液性免疫の両者が存在するが、IL-2は細胞性免疫を惹起する重要なサイトカインであり、一方でIL-6は液性免疫を活性化させる。すなわち、KDに罹患すると、体内の免疫系では、細胞性免疫、液性免疫の活性化の両者が関与していることが考えられる。

(2) 炎症性サイトカインの細胞内シグナル伝達物質の測定

上述の如く、末梢血血清中の炎症性サイトカインを測定することで、自己免疫の活性化が予想されるが、各種T細胞、B細胞、マクロファージ、好中球等の免疫担当細胞の何れの細胞が有意に活性化されているか、難治性川崎病において各種の治療により何れの細胞の活性が抑制されたのかを評価することはできない。そこで、細胞内シグナル伝達物質のフローサイトメトリー法(FCM)による測定を行い、各細胞の活性を測定し、同時に real time RT-PCR法を用いて、炎症性サイトカインのシグナル伝達経路に参与するタンパク質の遺伝子発現量を計測し、KDの病態解明を目指すこととした。

IL-2はT細胞膜表面に存在する受容体に結合し、受容体タンパク質と会合している JAK1/3 が活性化され、細胞内で引き続き Signal Transducer and Activator of Transcription(STAT) 5の活性化をもたらす。STAT5は核内へ移行し、以降の免疫応答を引き起こす。一方で、IL-6が細胞膜表面の受容体に結合すると

JAK1/3が活性化され、引き続き STAT1/3が活性化され、核内へ移行し、転写活性化を引き起こす。すなわち、KD罹患児の急性期、治療過程において、FCMで細胞内シグナル伝達物質として各STATを測定することで各免疫担当細胞の活性化の状態を把握することができる。

本研究では、KD罹患児の治療過程において、IVIG前後、難治性川崎病においては、その後のCsA投与前後(次ページ治療プロトコル参照)において、STAT3,5の炎症反応に関係のある細胞内シグナル伝達物質の測定および炎症性サイトカインシグナル伝達物質の遺伝子発現量の測定を行う。特に、IVIG施行時とCsA投与時の応答の差異を明確化し、臨床経過や遺伝子多型との関連性を検討し、難治性KDにおける重症度、病態を解明することを大きな目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、難治性KDの病態を解明する目的で、3年間で以下の課題を中心として研究をすすめた。

- (1) KD罹患児の治療前、IVIG後、CsA投与前後の末梢血でFCMを用いて細胞表面マーカーCD3, 4, 8, 16bを測定し、各細胞群の細胞内シグナル伝達物質STAT3, 5の平均蛍光強度を測定する。
- (2) KD罹患児の治療前後でのシグナル伝達物質の変化を測定するために、末梢血からRNAを抽出し、realtime RT-PCR法を行い、STAT3, 5, IL2, IL6, SOCS1, SOCS3, NFATc1, NFATc2などのシグナル伝達物質の遺伝子発現量の測定を行う。
- (3) 上記の測定結果、臨床データに対して統計解析を行い、難治性KDの病態解明を行う。

3. 研究の方法

KD診断基準を満たし、本大学附属病院小児科にて入院加療を行う患児から、書面での同意を得て、血液検体、臨床データを頂く。血液検査を行うタイミングは、下記の治療プロトコル図に従い、加療が遂行される経過中であり、治療に必要な採血の時期である。よって、患児にいたずらに苦痛を与えるものではない。また、血液検体量はそれぞれ0.5~2.0mlであり、貧血等の不利益を与えるものでもない。

- (1) フローサイトメトリー法を用いた細胞内シグナル伝達物質の測定
下記治療プロトコルでの治療前、IVIG投与後、CsA投与前後の患児からEDTA採血を行

う。採血後3時間以内に、本学法医学教室に現有するBD Accuri™ C6 フローサイトメーターを用い、細胞表面マーカー (CD3, CD4, CD8, CD16b) を測定し、T細胞、B細胞、好中球の同定を行う。同時に、BD Phosflow T cell Activation Kit を用いて、細胞内シグナル伝達物質 (STAT3, STAT5) を染色し、各細胞群での平均蛍光強度の測定を行う。集積したFCMデータは、FCM解析ソフトFlow Jo™を用いて、解析を行う。

(2) 末梢血中の炎症性サイトカインシグナル伝達物質の遺伝子発現量の定量

KD 急性期の薬物治療前後でのシグナル伝達物質の変化を測定するために、KD 罹患児の末梢血から、QIAGEN PAXgene® Blood RNA kit を用いてRNAを抽出し、本研究室に現有しているTakara Thermal Cycler Dice™を用いてrealtime RT-PCR法を行い、STAT1, 3, 5, IL2, IL6, SOCS1, SOCS3, NFATc1, NFATc2などのシグナル伝達物質のRNA定量を行う。

(3) 難治性KDの病態解明

臨床データの収集

今回の研究に同意を得たKD罹患児の臨床経過、各種血液検査データを収集する。

発症年齢・性別・川崎病の家族歴

血液検査データ (WBC数、白血球分画、血小板数、CRP、各種電解質、sIL-2R等)

初回IVIG、追加IVIG治療への反応

4. 研究成果

2014年4月から2015年度で、計画通りの検体数を獲得することができ、FACSの検討で、CsA投与症例群 (CsA群) で、pSTAT3(CD3+, CD16b+)のMFIが共に有意に低下した。また、初回IVIG奏功群 (1st群) で、IVIG投与後に、pSTAT3(CD3+, CD16b+)のMFIが低下し、pSTAT5(CD16b+)のMFIが上昇した。1st群と追加IVIG奏功群 (2nd群) の比較で、初回IVIG後、1st群でNFATc1発現量が高値であった。

realtime RT-PCR法を用いた検討で、CsA投与後にNFATc1, c2, IFN γ , IL4の遺伝子発現量が有意に上昇し、PRV1, SOCS3のRNA発現量が低下した。また、1st群で、IVIG投与後にSTAT3, 5A, 5Bの遺伝子発現量が低下し、NFATc1, NFATc2の発現量が上昇していた。また、1st群と2nd群の初回IVIG投与後の比較で、PRV1, SOCS3, IL10, p38, STAT3は前者で有意に低値、NFATc1は前者で有意に高値であった。

JAK-STAT経路、NFAT経路が、川崎病の急性期治療時の免疫応答に関与していることが示唆された。

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3件)

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. doi:10.1371/journal.pone.0145486. eCollection 2016. (査読あり)

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. Can J Cardiol. 2014 Aug;30(8):956.e7-9. doi:10.1016/j.cjca.2014.04.028. (査読あり)

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 Epidemiol. 2014;24(5):427-34. (査読あり)

[学会発表] (計2件)

Functional mechanism of cyclosporin A therapy for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. Nobuyuki Kakimoto, Hiroyuki Suzuki, Tomohiro Suenaga, Takashi Takeuchi, Shoichi Shibuta, Jun Abe, Norishige Yoshikawa. 11th International Kawasaki Disease Symposium, Feb. 3-6, 2015, Honolulu, Hawaii

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 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 第50回日本小児循環器学会総会・学術集会 2014/7/3 岡山市

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣本 信幸 (KAKIMOTO, Nobuyuyki)

和歌山県立医科大学医学部・助教

研究者番号：90614412

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし