

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：87122

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04877

研究課題名(和文) 小児血管炎患者の血清中PAMPsの自然免疫受容体の解明による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy through the clarification of innate immune receptor for PAMPs in children with vasculitis

研究代表者

原 寿郎 (Hara, Toshiro)

地方独立行政法人福岡市立病院機構福岡市立こども病院(臨床研究部)・臨床研究部・院長

研究者番号：40150445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)を用いて川崎病患者特異的に出現する物質を患者血清中に同定した。抽出法・解析法の改良によりPAMPsと考えられる川崎病特異的物質を網羅的包括的LC-MSを行うことにより川崎病特異物質を高感度、高特異度で検出可能となった。網羅的包括的LC-MSで計10回独立に測定し、2回以上有意であった分子群を特定した。その分子群を4地区で測定したところ不全型1例を除くすべてで検出した。また一部の川崎病特異物質と冠動脈病変との関連も見られた。一部の特異物質は分子構造もほぼ同定された。

研究成果の概要(英文)：With the improvement of extraction method and by the comprehensive high resolution LC-MS analysis of 10 independent KD samples, we selected KD-specific molecules with levels significantly higher than those of controls at least in 2 different periods.

We prospectively analyzed these molecules in 7 independent KD clusters. The KD-specific molecules were detected in all, except for one incomplete case. Some KD-specific molecules were significantly associated with the degree of inflammation, and the formation of coronary artery lesions. Some of the KD-specific molecules showed MS/MS fragments similar to those of biofilm products from *Yersinia pseudotuberculosis*. KD-specific molecules appear to be involved in the pathophysiology of KD and the development of coronary artery lesions.

研究分野：臨床免疫

キーワード：自然免疫 川崎病 PAMPs

1. 研究開始当初の背景

小児の血管炎の大部分(日本人の99%以上、白人の95%以上: Gardner-Medwin et al. Lancet 2002)は川崎病とIgA血管炎(HSP)で、未だ原因が不明である。川崎病は現在でも年々増加傾向にあり2012年の患者数は約1万4000人である。この2疾患はそれぞれ冠動脈炎から冠動脈瘤・心筋梗塞、HSP腎炎から慢性腎症きたす場合があり、これらの疾患の病因・病態解明は新規診断・治療法の開発につながりその予後の改善に大きく貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

自然免疫系 Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)単独による、獲得免疫系を介さない血管炎の存在を明らかにし、小児2大血管炎、川崎病とHenoch-Schönlein紫斑病:HSP(IgA血管炎)患者血清から世界で初めてPAMPsを同定した。そこで川崎病特異的分子、HSP特異的分子とm/z, MS/MSが同一のPAMPsをそれぞれ微生物から抽出精製し、高感度マスペクトロメトリーとMRIで解析し構造を決定する。血管炎惹起能を有する川崎病特異的分子、HSP特異的分子の受容体をそれぞれ同定する。その受容体の抑制物質を調べる系を確立し、治療・予防法の開発の足掛かりとする。これらの疾患の病因・病態解明はその予後の改善に大きく貢献すると考えられる。

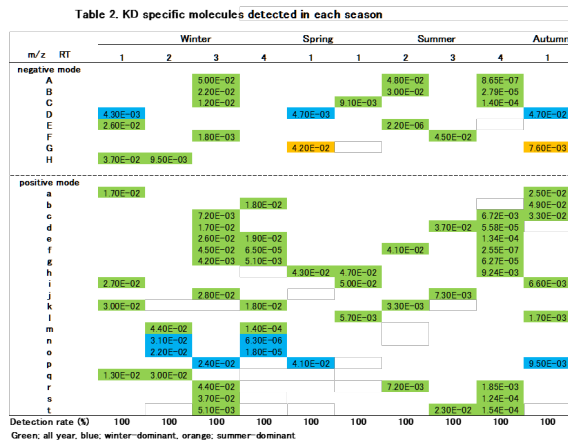
3. 研究の方法

小児血管炎患者由来PAMPsをHPLCで部分精製しNMRを用いて構造解析を行う。PAMPsの受容体を同定するために、作製済みの自然免疫受容体ライブラリーの中から候補受容体を探索する。この中に目的受容体が存在しない場合は、自然免疫受容体の下流で働くアダプター分子の欠損マウスを用いて下流シグナル経路を特定し、その分子からボトムアップ方式で受容体を絞り込む。さらに網羅的な方法として、ヒト血管内皮腫細胞にshRNAライブラリーを導入して、PAMPsに反応しなくなるクローンを選抜することにより、下流分子を特定する。最終的には、特定した自然免疫受容体候補の欠損マウスを作製し、小児血管炎患者由来PAMPsに対する反応性が消失するかを検討する。さらに同定された受容体を抑制できる物質を探す。

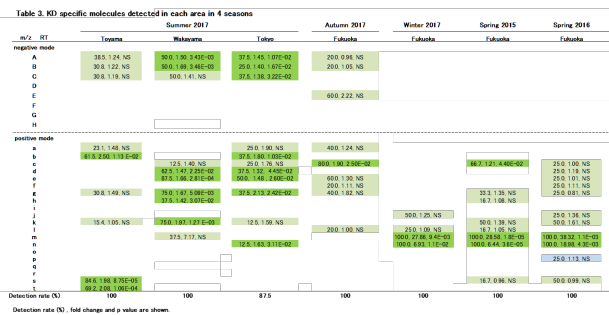
4. 研究成果

我々は、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)を用いて川崎病、IgA血管炎患者特異的に出現する物質を患者血清中に同定した。川崎病患者特異的物質はエルシニア菌や空中微生物由来の病原体関連分子パターン(PAMPs)と同一の物質であった。抽出法・解析法の改良によりPAMPsと考えられ

る川崎病特異的物質を網羅的包括的LC-MSを行うことにより川崎病特異物質を高感度、高特異度で検出可能となった。網羅的包括的LC-MSで冬4回、春1回、夏4回、秋1回、計10回独立に測定し、2回以上有意であった分子群を特定した(Table 2)。



その分子群を富山、和歌山、東京、福岡で測定したところ不全型1例を除くすべてで検出した(Table 3)。



また一部の川崎病特異物質と炎症反応の程度、IVIg抵抗性、冠動脈病変との関連も見られた。

A. Neutrophil				B. CRP			
≥11000/μl		<11000/μl		≥7 mg/dl		<7 mg/dl	
p value		p value		p value		p value	
molecule e				molecule e			
Positive	28	19	7E-04	Positive	32	15	0.01
Negative	15	43		Negative	24	34	
molecule g				molecule g			
Positive	30	20	2E-04	Positive	34	16	0.006
Negative	13	42		Negative	22	33	
C. IVIG responsiveness				D. Coronary artery lesion			
molecule b		IVIg responsive		IVIg resistant		p value	
positive		25	1	0.003			
negative		54	25				
molecule n, s or t		CAL+		CAL-		p value	
positive		23	36	6E-04			
negative		4	42				

Yersinia pseudotuberculosis 感染が川崎病の発症に関与するのはごく一部であるが、一方 *Yersinia pseudotuberculosis* 感染の約10%に川崎病を合併する。一部の特異物質は *Yersinia pseudotuberculosis* バイオフィルム由来の分子とMS/MS解析で同一であり分子構造もほぼ同定された。その自然免疫受容体の候補分子はあるもののまだ同定には至ってない。

自然免疫系 Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)単独による、

獲得免疫系を介さない血管炎の存在を明らかにし、小児2大血管炎、川崎病とHenoch-Schönlein 紫斑病: HSP(IgA 血管炎)患者血清から世界で初めてPAMPsを同定した。さらに川崎病特異的分子のm/z, MS/MSから高感度マスマスペクトロメトリーで解析しPAMPsの構造を決定することができた。

PAMPs・DAMPsと考えられる物質は川崎病急性期に特異的に患者検体に検出され、川崎病の流行、季節変動、増加傾向(衛生環境の改善による細菌叢の未熟性、抗生物質の使用、食事の欧米化と関連する可能性)、罹患年齢の特徴、ヒト-ヒト感染がない、などの疫学的特徴と、抗生物質不応、グロブリン有効などの臨床的特徴を説明可能である。自然免疫受容体を介する場合、病原体は単一である必要はない。

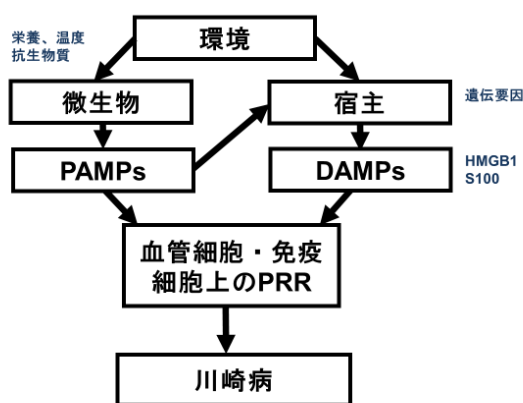


図1. 川崎病の自然免疫機構を介する発症機構(仮説)

これらの疾患の病因・病態解明はその予後の改善に大きく貢献すると考えられる。

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 2件)

1. Murata K, 13人, Nishio H, Yamasaki S, Hara T. Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signalling pathway in a murine model of **Kawasaki disease**. Clin Exp Immunol. 2017; 190:54-67. doi: 10.1111/cei.13002.

2. Nanishi E, Nishio H, 他 19人, Hara T. Clarithromycin Plus Intravenous Immuno globulin Therapy Can Reduce the Relapse Rate of **Kawasaki Disease**: A Phase 2, Open-Label, Randomized Control Study. J Am Heart Assoc. 2017;6(7). pii: e005370. doi: 10.1161/JAHA.116.005370.

3. Sugitani Y, Furuno K, Sueishi K, Hara T. Macrophages and cytotoxic T cells infiltrate the destructed mitral tissue in Kawasaki disease. BMJ Case Rep. 2018

Feb 2;2018. pii: bcr-2017-223584. doi: 10.1136/bcr-2017-223584.

[学会発表](計 4件)

1. Hara T, Motomura Y, Nanishi E, Nakashima Y, Nishio H. Innate immunity-mediated **vasculitis**: A new pathogenic mechanism. 10th Frontiers in Immunology Research 2017 International Conference, Island of Crete, Greece, July 1-4, 2017

2. Nanishi E, Nishio H, Takada H, Yamamura K, Ohga S, Hara T. Clarithromycin plus intravenous immunoglobulin therapy can reduce the relapse rate of **Kawasaki Disease**: a phase 2, open-label, randomized control study. 10th Frontiers in Immunology Research 2017 International Conference, Island of Crete, Greece, July 1-4, 2017

3. Mizuno Y, Sagawa K, Furuno K, Lee S, Kuraoka A, Onoyama S, Matsuzaki H, Hara T: Cardiovascular sequelae of **Kawasaki disease** at a single hospital between 1982 and 2016. The 13th Congress of the Asian Society for Pediatric Research. Oct. 6-8, 2017, Hong Kong, China

4. Hara T. The pathogenesis/pathophysiology of **Kawasaki disease**: a keynote address. The 12th International Kawasaki Disease Symposium. Yokohama, June 12-15, 2018

[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

原 寿郎 (Hara Toshiro)
福岡市立こども病院・臨床研究部・院長
研究者番号: 40150445

(2) 研究分担者

山崎 晶 (Yamasaki Sho)
九州大学生体防御医学研究所・教授
研究者番号: 40312946

(3) 研究分担者

宮本 智文 (Miyamoto Tomofumi)

九州大学薬学研究院・准教授
研究者番号：40182050

(4)研究分担者

西尾 壽乘 (Nishio Hisanori)
九州大学病院・助教
研究者番号：00507783