

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461624

研究課題名(和文)川崎病発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidate the mechanism how Kawasaki disease vasculitis occur

研究代表者

深澤 隆治 (Fukazawa, Ryuji)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80277566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は乳幼児が罹患する血管炎であり、その原因は未だ不明である。本研究は川崎病血管炎発症の機序を川崎病モデルマウスを用いて解明するものである。Candida Albicans Water Soluble Fraction (CAWS)およびNod-1 LigandであるFK565を用いて川崎病類似血管炎を作成した。抗マウスIL-1によりCAWS血管炎発症が抑制され、これまでの研究と併せてCAWS血管炎成立にはIL-1とTNFが重要な役割を担うことが判明した。一方FK565による血管炎では、CAWS血管炎に比し冠動脈により強い血管炎が生じ、血清IL-1濃度と血管炎重症度が相関していた。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is systemic vasculitis mainly affected infant and its etiology is still unknown. This study tries to elucidate the mechanism how KD vasculitis is induced, using KD model mouse. We used Candida Albicans Water Soluble Fraction (CAWS) and Nod-1 ligand, FK565, to induce vasculitis. Anti-mouse IL-1 antibody attenuated the occurrence of vasculitis caused by CAWS. Together with preliminary data, IL-1 and TNF played very important roles for inducing CAWS vasculitis. On the other hand, FK565 induced more severe vasculitis in coronary arteries, and the severity of vasculitis significantly correlated with serum IL-1 concentration.

研究分野：小児循環器

キーワード：川崎病 マウス血管炎 CAWS Nod-1 FK565

1. 研究開始当初の背景

川崎病は乳幼児を中心に年間1万5千人以上が新規に罹患する原因不明の血管炎で、その約3%が冠動脈後遺症を残し、成人に至るまで様々な医療が必要となる疾患である。川崎病血管炎の発症機序はいまだ不明であるが、自然免疫の異常がその発症に深くかかわっていることが次第に明らかになりつつある。

川崎病の動物モデルは *Candida Albicans* Water Soluble Fraction (CAWS)を用いたもの、*Lactobacillus* を用いたもの、Nod-1 Ligand を用いたものなどが報告されている。我々はこれまで CAWS を用いた川崎病類似血管炎マウスにおいて、血管炎発症に何が必要かを解析し、Tumor Necrosis Factor (TNF) パスウェイの重要性を解明している。

2. 研究の目的

我々の研究は、川崎病モデルマウスと川崎病臨床症例を通じて、川崎病の発症機序を解明し、その根本的治療に寄与することを目的とする。CAWSによる川崎病血管炎モデルマウスを用いて川崎病発症のメカニズム解明を目指す。我々がこれまで解明したTNFパスウェイよりも上位のパスウェイに何が関与するのか、その発症のメカニズムを詳細に検討する。また、CAWSによる川崎病血管炎モデル以外にもNod-1 Ligandを用いた血管炎モデルを作成し、血管炎発症のメカニズムと血管炎のフェノタイプの比較を行い、川崎病血管炎発症においては何が必要なのかを検討する。

3. 研究の方法

川崎病類似血管炎は、4~5週齢のCC57BL6/JにLipopolysaccharide 20 μ gを腹腔投与した後、CAWS 0.5mgを5日間連続腹腔内投与、もしくはNod-1 LigandであるFK565 0.5mgを週2日4週にわたり皮下注射することで作成することができる。これらの川崎病モデルマウスを用いて、組織および血清サイトカインを評価することで血管炎の評価

を行った。また、抗マウス IL-1 β 抗体を用いて CAWS 血管炎が抑制されるかどうかを検討した。

血管炎の評価は組織学的に、また血清の炎症性サイトカインを評価することで行った。

組織学的評価

血管炎の評価は、組織学的に行った。CAWSまたはFK565投与終了後4週でマウスを屠殺し、心臓組織をホルマリン固定し、パラフィンに包埋、薄切後 Hematoxylin-Eosin 染色を行い、血管炎を観察した。左右冠動脈、大動脈左冠尖、右冠尖、無冠尖の5カ所まで血管炎の強さを、3点：全層性血管炎、2点：内膜+外膜の血管炎、1点：内膜の血管年と評価し、CAWS血管炎とFK565血管炎を比較した。また、CAWS血管炎における抗マウス IL-1 β 抗体の血管炎抑制効果に関しては、大動脈起始部の炎症での炎症細胞浸潤の面積を求め血管炎の抑制の程度を比較した。

血清中のサイトカイン評価

CAWSまたはFK565投与後4週でマウスを屠殺する際に採血を行い血清を分離した。マウス血清中サイトカインの測定は BIO-RAD Bio-Plex ProTM Mouse Cytokine Standard Group 23-Plex を用いて行った。測定はマニュアルに従って行い、23種のサイトカインが測定された。Interleukin (IL) -1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL9、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-17、Eotaxin、Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)、Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (G-MCS)、Interferon-Gamma (IFN γ)、Keratinocyte-derived Cytokine、Monocyte Chemotactic Activating Factor、Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α)、MIP- β 、Regulated upon Activation Normal T-Cell Expressed and Presumably Secreted (RANTES)、TNF α を測定した。

4. 研究成果

(1) 抗マウス IL-1 β 抗体による血管炎抑制効果

IL-1 β 阻害剤の投与により CAWS 血管炎は阻害剤の Dose dependent に有意に抑制された。また、血清サイトカインにおいても抗マウス IL-1 β 抗体の用量依存性に炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、TNF α が抑制されていた。(Figure 1)

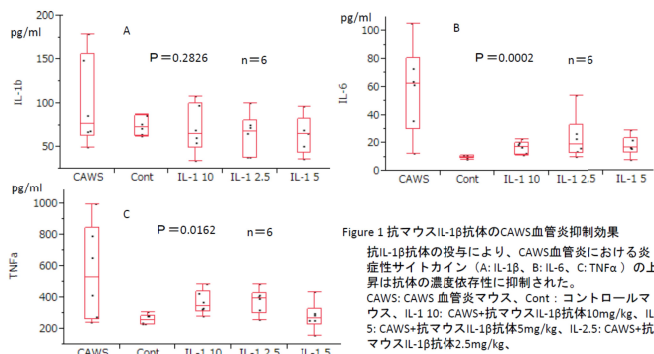


Figure 1 抗マウスIL-1 β 抗体のCAWS血管炎抑制効果
抗IL-1 β 抗体の投与により、CAWS血管炎における炎症性サイトカイン (A: IL-1 β 、B: IL-6、C: TNF α) の上昇は抗体の濃度依存性に抑制された。
CAWS: CAWS 血管炎マウス、Cont: コントロールマウス、IL-1 10: CAWS+抗マウスIL-1 β 抗体10mg/kg、IL-1 5: CAWS+抗マウスIL-1 β 抗体5mg/kg、IL-1 2.5: CAWS+抗マウスIL-1 β 抗体2.5mg/kg。

(2) CAWS による血管炎と Nod1 Ligand (FK565) による血管炎の相違

CAWS 血管炎において血管炎は大動脈起始部に特に強く生じていたが、FK565 による血管炎においては、より左右の冠動脈に血管炎は強く生じていた。(Fig 2)

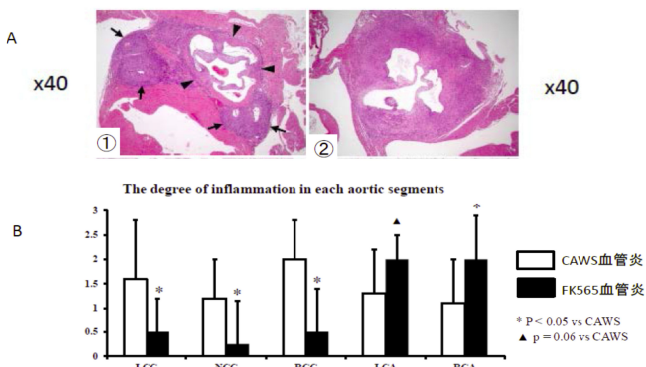


Figure 2 CAWS血管炎とFK565血管炎の血管炎の分布の違い
A: 大動脈起始部の組織像 ①FK565血管炎 ②CAWS血管炎 CAWS血管炎では炎症細胞浸潤が大動脈起始部に著明であるのに対し、FK565血管炎では炎症細胞浸潤は左右の冠動脈により強く生じている。
B: 炎症細胞が浸潤した面積を左冠尖(LCC)領域、無冠尖(NCC)領域、右冠尖(RCC)領域、LCA領域、RCA領域に分けて比較すると、FK565血管炎では有意に冠動脈に強い炎症細胞浸潤をきたしていることがわかる。

また、血管炎の程度(炎症性細胞の浸潤した面積で評価)の評価では、CAWS 血管炎では血中 TNF α の濃度と強く相関していた($r=0.95$, $p<0.001$)。一方、FK565 血管炎では、血中 IL-1 β の濃度と血管炎の程度が相関していた($r=0.71$, $p=0.05$) (Figure 3)

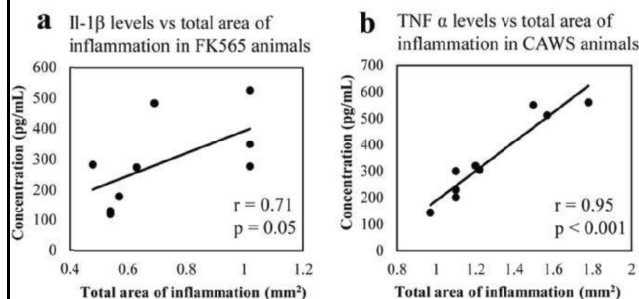


Figure 3 血管炎の程度と血清サイトカインの比較

炎症性細胞の浸潤面積と血清サイトカインレベルとの相関を検討したところ、FK565 血管炎では炎症細胞浸潤面積と血清IL-1 β に有意な相関を、またCAWS血管炎では炎症細胞浸潤面積と血清TNF α との間に有意な相関を認めた。

さらに、血中サイトカインプロファイルでは、CAWS 血管炎では、IL-6、IL-13、G-CSF、INF- γ 、TNF α が Control に対して上昇していたのに対して、FK565 血管炎ではそれらのサイトカインの上昇は認めず、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-5、RANTES が Control に比べ高値となっていた。(Table)

Table CAWS血管炎とFK565血管炎における血清サイトカインプロファイル

	Control	CAWS	FK565
IL-1 α	11.1 \pm 5.2	14.8 \pm 7.0	27.9 \pm 14.1*
IL-1 β	79 \pm 55	87 \pm 52	324 \pm 85*
IL-5	7.8 \pm 1.1	9.0 \pm 4.0	13.6 \pm 8.8*
IL-6	8.8 \pm 7.7	84 \pm 35†	8.7 \pm 2.8*
IL-13	66 \pm 130	252 \pm 125†	64 \pm 31†
G-CSF	53 \pm 12	126 \pm 12†	50 \pm 8*
INF- γ	6.2 \pm 3.7	23 \pm 12†	15.6 \pm 10
RANTES	20 \pm 6.8	17 \pm 5.7	36.8 \pm 26.1*
TNF α	101 \pm 47	414 \pm 120†	130 \pm 59*

† P < 0.05 vs Control
* P < 0.05 vs CAWS

これらの結果は、川崎病血管炎モデルと言われている CAWS 血管炎、FK565 血管炎とも血管炎成立には自然免疫が重要な役割を担っていることが判明した。しかしながら、同じ自然免疫を介する血管炎であっても、血管炎のフェノタイプは異なり、発現するサイトカインのパターンも異なることが示唆された。川崎病は血管炎のフェノタイプからはFK565による血管炎に類似しているが、川崎病に発現するサイトカインは、むしろCAWSによる血管炎に類似している。このことから、CAWS 血管炎、FK565 血管炎が川崎病血管炎のモデル

ルそのものであるとは言い難いが、自然免疫異常に由来する血管炎として、川崎病血管炎と近似するものと考えられる。これらの血管炎発症を抑制する薬剤が、川崎病治療にも有用であることが期待される。

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 4件)

1. Ohashi R, Fukazawa R, Watanabe M, Hashimoto K, Suzuki N, Nagi-Miura N, Ohno N, Shimizu A, Itoh Y. Characterization of a murine model with arteritis induced by Nod-1 Ligand, FK565: a comparative study with a CAWS-induced model. *Mod Rheumatol* 2017; Feb2: 1-19
doi: 10.1080/14397595.2017.1287150
2. Variations in ORA11 Gene Associated with Kawasaki Disease. 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. *PLoS One*. 2016 Jan 20;11(1):e0145486. doi: 10.1371/journal.pone.0145486. eCollection 2016.
3. Diagnostic potential of antibody titres against *Candida* cell wall β -glucan in Kawasaki disease. Ishibashi K, Fukazawa R, Miura NN, Adachi Y, Ogawa S, Ohno N. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jul;177(1):161-7. doi: 10.1111/cei.12328.
4. 阿部正徳、深澤隆治 慢性疾患児の一生を診る 川崎病に合併した冠動脈後遺症 小

児内科 48 1484-87 2016

[学会発表](計 9件)

1. Fukazawa R, Hamaoka K, Saji T, Kato H, Suzuki E, Ayusawa M, Miura M, Kobayashi T, Ogawa S. Cardiac death and myocardial infarction on Kawasaki disease with giant coronary aneurysm: Analysis of recent nationwide survey in Japan. European Society of Cardiology Congress. 2014 August Barcelona Spain
2. Watanabe M, Ogawa S, Fukazawa R, Ohkubo T, Katsube Y, Kamisago M, Ikegami E, Abe M, Akao M. Histological and rheological evaluation at coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. European Society of Cardiology Congress. 2014 August Barcelona Spain
3. Gutierrez NG, Kahn AM, Shirinsky O, Lyskina GA, Fukazawa R, Ogawa S, Burns JC, Marsden AL. Thrombotic risk assessment in Kawasaki disease patients with coronary aneurysm using transluminal attenuation gradient analysis. International Kawasaki Disease Symposium. 2015 February Honolulu USA
4. Fukazawa R, Hamaoka K, Saji T, Kato H, Suzuki E, Ayusawa M, Miura M, Kobayashi T, Ogawa S. Fate of Kawasaki disease giant aneurysm: Analysis of the last 10 years nationwide survey. International Kawasaki Disease Symposium. 2015 February Honolulu USA
5. 深澤隆治、渡邊誠、橋本康司、林美雪、阿部正徳、池上英、大久保隆志、赤尾見春、上砂光裕、勝部康弘、小川俊一 巨大冠動脈瘤を有する川崎病既往者における成人期の問題点 第 50 回日本小児循環器学会学術集会 2014 7 月 岡山
6. 深澤隆治、渡邊誠、阿部正徳、池上英、赤尾見春、上砂光裕、勝部康弘、小川俊一

Candida Albicans Water Soluble Fraction (CAWS) による血管炎は川崎病モデルといえるのか？第 34 回日本川崎病学会学術集会 2014 10 月 東京

7. 鈴木伸子、深澤隆治、渡邊誠、橋本佳亮、赤尾見春、上砂光裕、勝部康弘、小川俊一 TNF は Candida Albicans Water Soluble Fraction (CAWS) による血管炎を惹起するために必須である 第 35 回日本川崎病学会学術集会 2015 10 月

8. 深澤隆治、渡邊誠、橋本佳亮、池上英、赤尾見春、阿部正徳、上砂光裕、勝部康弘、三浦典子、大野尚人、小川俊一 Candida Albicans Water Soluble Fraction (CAWS)血管炎川崎病モデルと川崎病との類似点・相違点 第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2015 7 月東京

9. 鈴木伸子、深澤隆治、橋本佳亮、渡邊誠、赤尾見春、上砂光裕、勝部康弘、阿部正徳、三浦典子、大野尚人、小川俊一 Candida Albicans Water Soluble Fraction によるマウス川崎病血管炎モデルにおいて Tumor Necrosis Factor Alpha は中心的役割を果たす 第 52 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2016 7 月東京

〔図書〕(計 5 件)

1. 深澤隆治 今日の小児治療指針 第 16 版 9 免疫疾患・膠原病 川崎病(冠動脈病変を除く) 医学書院 2017 1006

2. 深澤隆治 小児疾患診療のための病態生理 2 改定第 5 版 VII リウマチ性疾患とその周辺疾患：川崎病 東京医学社 2015 1071

3. 深澤隆治 小児科臨床ピクシス 9 川崎病のすべて 第 6 章心臓血管後遺症 巨大冠動脈瘤：自然歴 中山書店 2015 261

4. 深澤隆治 小児科臨床ピクシス 9 川崎病のすべて 第 6 章心臓血管後遺症 巨

大冠動脈瘤：抗凝固療法 中山書店 2015 261

5. Fukazawa R. Kawasaki Disease, Part IV Diagnosis and Examinations, Promising Biomarkers in Kawasaki Disease and Acute Coronary Ischemia. Springer 2017 552

〔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

深澤隆治 (Fukazawa Ryuji)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80277566

(2)研究分担者

大橋隆治 (Ohashi Ryuji)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：000328783

研究分担者

小川俊一 (Ogawa Shunichi)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：50194436

(3)連携研究者

大野尚人 (Ohno Naohito)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80152213

(4)研究協力者

()