

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09681

研究課題名(和文)川崎病血管炎における自然免疫系の果たす役割の検討

研究課題名(英文)Roll of innate immune system in vasculitis of Kawasaki disease

研究代表者

平田 陽一郎(HIRATA, Yoichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40447397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病血管炎における自然免疫系、とくにTLRの果たす役割に関する検討を行った。CAWSを野生型およびTLR欠損マウスにそれぞれ投与して血管炎の程度を評価したが、残念ながらin vivoでの統計学的有意差を検出することはできなかった。今後は、臨床疫学的知見を基に、胸腺免疫系の関与を中心に検討を続ける予定である。

研究成果の概要(英文)：We performed in vivo investigation about the role of innate immune system in vasculitis of Kawasaki disease with CAWS-treated mouse model. Unfortunately, we found no statistically significant differences between the severity score of vasculitis wild type mice and TLR- knockout mice. We decided that the role of TLR system in Kawasaki disease vasculitis is relatively modest. We are going to continue the investigation about Kawasaki disease vasculitis through the immune system of thymus and T-cells.

研究分野：小児循環器学

キーワード：川崎病 血管炎 冠動脈 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

川崎病は5歳以下の小児に好発する急性の全身性血管炎をきたす症候群である。近年、患者数は増加の一途をたどり、年間1万人の新規患者が発生する状態が続いている。川崎病による冠動脈合併症は小児の後天性心疾患の中で最も頻度の高いものであり、標準的治療法である高容量ガンマグロブリン療法が確立された現在でも、治療不応例が13-23%に認められ、巨大冠動脈瘤を形成する症例が1%程度に認められる。これらの冠動脈合併症を未然に防ぐ適切な治療法を開発することが、小児科医に課せられた急務である。

川崎病は、その発見以来多くの研究が蓄積されてきたが、いまだに病因は不明である。疫学調査の結果などから何らかの感染の関与が強く疑われるが、候補となる病原体が提示されると、それを否定する研究結果が報告される歴史が繰り返されてきた。これらは、単一の病原体が病因ではなく、患者側の免疫応答の異常が病態に関与していることを強く示唆している。一方、近年の免疫学研究の発展により、個別の病原体特異的な獲得免疫系ではなく、包括的な自然免疫系の病原体センサーに関する知見が蓄積されてきた。これまで病原体センサーは、病原体だけを特異的に認識し自己成分は認識しないと考えられてきたが、自然免疫に関係する Toll 様受容体 (Toll-like receptors :TLRs) などのセンサーは自己由来内因性リガンドにも応答し、過剰な炎症反応を呈することにより、自己免疫性疾患のみならず、慢性炎症を基盤とする腫瘍や動脈硬化などのさまざまな病態において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。哺乳類では TLR ファミリーは抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージなどに発現しており、細胞内でのシグナル経路を通じて炎症性サイトカインなどを分泌することにより、自然免疫系反応を引き起こすのみならず、引き続いて起こる受動免疫反応の引き金を引く役割を果たす。これらの背景と研究結果から申請者は、川崎病血管炎における自然免疫系、とくに TLR の果たす役割を明らかにし、川崎病における自然免疫系の果たす包括的な役割を検討することにより、病態生理の解明および新たな療法の開発に貢献することを目的として、以下の研究を計画した。

2. 研究の目的

川崎病の病因が不明であるのには様々な要因があるが、重要な点は、患者の全体的な予後がよく、剖検例から得られた病理組織の検討が不十分なことや、病勢を的確に反映する臨床的マーカーが見つかっていないことが挙げられる。これらの問題点を解決する一つの方法が、モデルマウスを用いた検討である。これまでに川崎病モデルマウスにおいて自然免疫系の役割を検討した報告は少ない。

Rosenkranz らは *Lactobacillus casei* cell wall extract (LCWE)による川崎病モデルマウスにおいて、TLR2 と MyD88 が冠動脈病変の発症に重要な役割を果たすと報告した。しかしその他の TLR については検討が不十分であり、申請者のものとはモデルが異なる。申請者が用いる *Candida albicans* water soluble fraction(CAWS)を用いた川崎病モデルマウスでは Saijo らが、C-typelectin である Dectin-2 の関与を報告しているが、TLR については十分に検討されていない。今回申請者らは、CAWS を用いた川崎病モデルマウスを使って、川崎病血管炎において、TLR を Keyreceptor とする自然免疫系の役割について検討する。具体的には、すでに確立されている各種 TLR 欠損マウスや MyD88 欠損マウスを用いて川崎病類似血管炎を惹起させる。また、LPS, HMGB1, CpG-ODN などを投与することにより、これらの反応がどう変化するかを詳細に検討する。またマウス血清を用いて各種炎症性サイトカインや HMGB1 濃度などを測定し、血管局所のみならず、全身的な炎症性サイトカインの動態についても詳細に検討する。これらの検討によってモデルマウスにおける血管炎の病態機構が明らかとなれば、ヒトの検体を用いた更なる検討が将来的には可能になり、実際の臨床につながる研究を行うことができると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、川崎病血管炎モデルマウスを用いた検討を行う。具体的には、4週令の野生型 C57BL/6 マウスに、2mg/dose の CAWS(*Candida albicans* water soluble fraction)を5日間連続腹腔内投与すると、冠動脈周囲を中心とした全身性の血管炎が惹起される。(コントロール群には PBS を投与する。)投与前、投与後1週間、4週間の時点で、マウスから血清および心臓のサンプルを採取して解析を行う。血清では IL-2、IL-6、IL-10、MCP-1、TNF- α などの炎症性サイトカインの濃度を ELISA kit を用いて測定する。摘出した心臓をホルマリン固定して切片を作成し、HE 染色および EVG 染色を行って冠動脈病変の程度を評価する。これらの基本的なモデルマウス作成手技および解析手法に関しては、平成25年度科学研究費(若手B)を用いた研究で、申請者らの研究室において十分に確立されており、CAWS の提供に関しては、東京薬科大学薬学部免疫学教室・大野尚人教授から定期的な提供を確約されている。このモデルを用いて、以下の検討を行う。

[1] 血管炎における自然免疫系の役割を明らかにするために、CAWS 投与後の冠動脈周囲の病理切片を用い、マクロファージ、リンパ球などの免疫担当細胞の免疫染色を行う。同時に、TLR2,4,9 などとの二重染色を行うことにより、各種免疫担当細胞および TLR

の局在を明らかにする。

[2] TLR の果たす役割を検討するため、各種 TLR 欠損マウスおよび TLR の下流に位置する MyD88 欠損マウスに対して、CAWS を投与して血管炎を惹起させ、血清サイトカインおよび血管炎の重症度を評価する。血管炎の重症度評価に関しては、すでに確立されている方法に従う。これらのマウスから得られた検体をもとに、[1]と同様の実験を行う。TLR 欠損マウスについてはすでに確立されており、商業的に購入が可能である。上記[1], [2]の実験が計画通り進行しない場合には平成 28 年以降についても引き続き実験を続けるが、川崎病モデルマウスにおいて十分な結果が得られない場合には、ワイヤーによるマウス大腿動脈血管障害モデルを用いる。これは、申請者が指導を受けた徳島大学循環器内科・佐田政隆教授により開発され、傷害後の新生内膜の形成で血管リモデリングを評価する手法である。直接的な川崎病モデルではないが、川崎病の病理学的変化と酷似した病変を形成する。このため、川崎病による血管炎の類似モデルとして使用することが可能であり、申請者も十分に手技を取得している。

また、上記の実験に加えて、さらに詳細なメカニズムを検討するため、以下の invitro の実験を追加で行う。

[1]血管炎および傷害後の血管リモデリングには、新生内膜および血管周囲のマクロファージが重要な役割を果たすことを、すでに我々のグループが報告している。そこで macrophage cell line である RAW264.7 cell を用い、培養液に TLR のリガンドである LPS, CpG-ODN などを添加し、炎症性サイトカインである IFN- γ /TNF- α /IL-1 などの濃度を ELISA kit を用いて測定する。またこれらの反応系にそれらリガンドの中和抗体も添加し、反応系の一部を阻害することにより、経路の詳細を明らかにする。

[2] [1]の実験系をより生理的な条件に近付けるため、野生型および TLR 欠損マウス腹腔内から抽出したマクロファージを用いて[1]と同様の検討を行う。これらの in vitro の実験系の結果から、TLR の経路の関与が明らかとなった場合には、CAWS モデルマウスに対して、CAWS だけでなく、TLR のリガンドや中和抗体を同時に投与することにより、血管炎の病変の程度が変化するかどうかも追加で検討する。

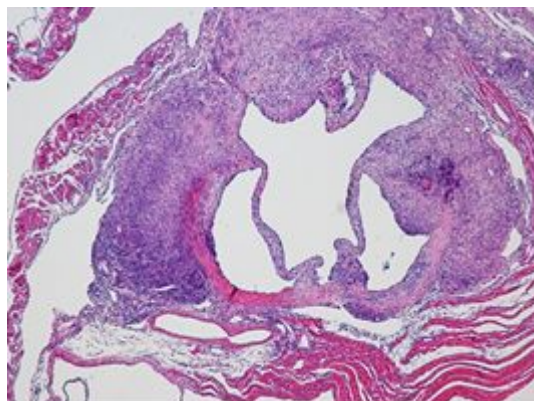
1. Ohno n, Jpn.J. Infect. Dis. 2004, 57, S9-10
2. Tanaka K, et al, Atherosclerosis, 2011; 215(2): 366-373
3. Tanaka K, et al, FASEB J, 2008; 22(2): 428-436
4. Tanaka K, et al, J Am Coll Cardiol, 2005; 46(1): 134-141
5. Takahashi K, et al, Mod Rheumatol, 2010; 20: 160-167
6. Henmi H, et al, 2000, Nature 408:

740-745

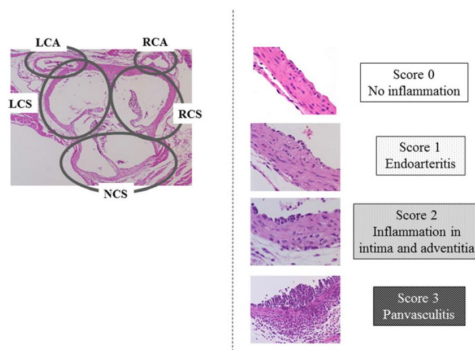
7. Sata M, et al. JMCC 32 (2000) 2097-2104.
8. Takaoka M, et al. Circ Res 105 (2009) 906-911.
9. Higashikuni Y, et al. Hypertens Res. 2012; 35(1): 62-69
10. Higashikuni Y, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012; 32(3): 654-661
11. Higashikuni Y, et al. J Am Heart Assoc. 2013; 2(6); e000267
12. Inuzuka R, et al. Heart. 2014; 100(3): 247-253
13. Inuzuka R, et al. Ann Thorac Surg. 2013; 96(4):1435-1441
14. Inuzuka R, et al. Pediatr Cardiol. 2013; 34(1):95-104

4. 研究成果

まず上述した方法に従って、川崎病モデルマウスの実験系を確立し、病理切片を解析することに成功した。具体的には、大動脈基部において炎症細胞の浸潤と血管構造の破壊が認められた。(図)

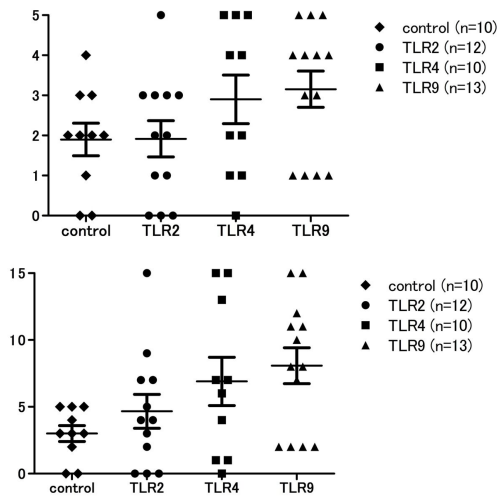


これらの病変を定量的に評価するために、図 2のごとく、病変の浸潤の程度を score0 から 3 にて評価し、病変の広がりをもつ 3つの大動脈弁基部および左右の冠動脈基部の 5つの部分の血管数で評価することにより、Inflammation score および Extent of lesion として数値化した。(図) (Oharaseki et al, 2013)

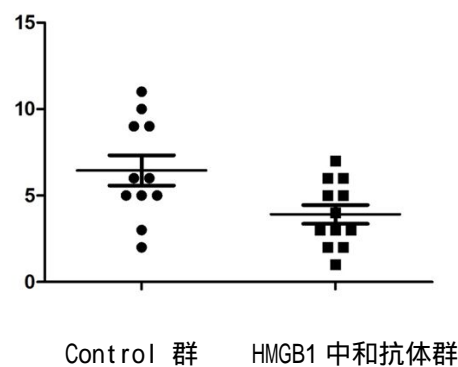


これらの評価方法を元に、野生型マウスに

続いて、TLR 欠損マウスにおいて、CAWS を投与することにより血管炎を作成し評価したところ、TLR2, 4, 9 の欠損モデルマウスにおいては、野生型マウスと比較して病変の広がり、病変の重症度ともに有意な差を認めることができなかった。(図)

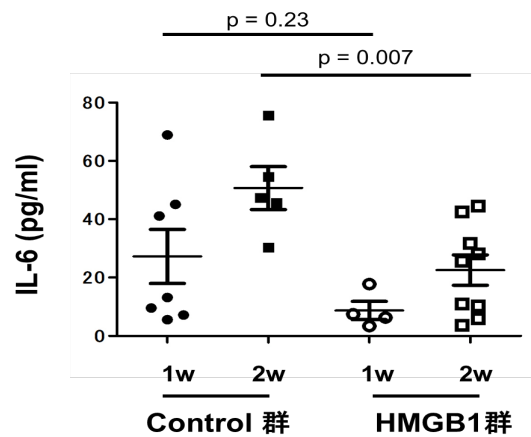


これらの結果から、CAWS を用いた川崎病血管炎モデルマウスの実験系においては、TLR 受容体の関与の可能性は低いものと考えざるを得なかった。そこで、以前にマウス動脈ワイヤー傷害モデルにおいて関与が明らかとなっていた HMGB1 の関与を検討することとした。具体的には、CAWS モデルによって野生型マウスに血管炎を誘発するプロトコルにおいて、HMGB1 中和抗体を投与することにより血管炎の病勢が変化するかどうかを検討した。(図)

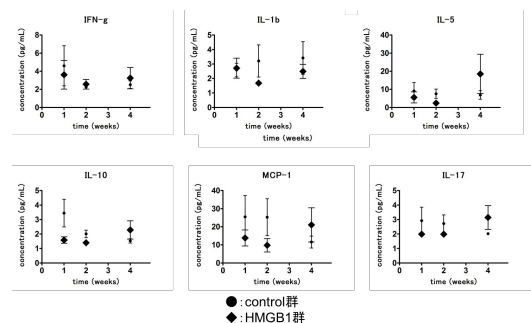


すると、上記のように、HMGB1 中和抗体投与群において、control 群とくらべて inflammation score が有意に低下していることが確認された。このことは、川崎病血管炎モデルにおいて、HMGB1 が少なくとも急性期における血管病変形成に重要な役割を果たしていることを示唆する結果であると考えられた。臨床的に、川崎病急性期の患者に HMGB1 中和抗体を大量に投与することは、副作用などの面から、実現には時間がかかることが十分に予想される。そこで、この HMGB1 中和抗体による病変抑制のメカニズムを

討するため、投与後、1週間、2週間、4週間でのマウス血清を採取し、Multiplex cytokine panel を用いて、炎症性サイトカインの動態を網羅的に検討することとした。(図)



すると、上図のように HMGB1 中和抗体投与分においては、投与後1週および2週の時点で主要な炎症性サイトカインの一つである IL-6 の濃度が有意に抑制されていることが確認された。その他の炎症性サイトカインの経時的な動向を図に示す。



これらの炎症性サイトカインの動向を観察すると、投与後2週目の炎症の極期と思われるタイミングにおいては、投与前と比較して低下しているものが多く、4週目においては逆に投与前より上昇している者が多かったが、残念ながら一定の傾向や有意差を確認することはできなかった。

以上の研究結果をまとめると、まず CAWS 川崎病モデルにおいては、TLR 受容体系の関与する可能性は低いと考えざるを得なかった。また HMGB1 の中和抗体投与によって病変の重症度が抑制されたことから、少なくとも CAWS モデルにおいては、HMGB1 は一定の治療効果が認められた。これらのことから、川崎病血管炎における自然免疫系の関与について、さらなる検討の継続が必要と考えられた。今後は、川崎病の発症年齢が1歳前後の幼児に集中しているという疫学結果をかんがみ、免疫学的な「成熟過程」に着目し、胸腺免疫

系の成熟に注目して、臨床・基礎の両面から検討を継続する予定である。また川崎病患者の検体を多施設共同研究によって多数集積することにより、臨床的な免疫学的特徴をさらに詳細に検討することにより、基礎研究への示唆を得るべく研究を継続する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

川崎病急性期におけるステロイド併用療法とサイトカインの動態、平田陽一郎、田中優、進藤考洋、犬塚亮、横山美貴、西本創、生井良幸、小田洋一郎、稲富淳、岡明 第 52 回日本小児循環器学会学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部附属病院小児科のHPにおいて、研究成果を発表している。

<http://square.umin.ac.jp/ped/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平田 陽一郎 (HIRATA, Yoichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40447397