

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09696

研究課題名(和文)川崎病初期治療におけるシクロスポリンA作用メカニズムの新たな分子遺伝学的解明

研究課題名(英文)New molecular genetic examination of the mechanism of cyclosporin A in the initial treatment for kawasaki disease

研究代表者

武内 崇 (Takeuchi, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10246522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、重症川崎病(KD)を対象に初期治療としてIVIg単独療法とIVIg+シクロスポリンA(CsA)併用療法の有用性を比較する多施設共同医師主導治験を開始した。本研究は、重症KDにCsAを用いた初期治療前後における血液検体を用いて、IVIgやCsAの作用機序を解明することが目的である。当院で本治験に参加した患者数が13例となった。これらの患者の血液検体からRNA抽出と血清分離を行い、遺伝子発現量の測定を行った。また、IVIg有効群、無効群、IVIg+CsA併用療法有効群、無効群、計11例29時点で、炎症性サイトカイン(sIL-2R, IL2, 4, 6, 10, TNF等)の測定を行った。

研究成果の概要(英文)：We started a multicenter physician-led trial to compare the utility of IVIG plus cyclosporin A(CsA) combination therapy with the IVIG monotherapy as initial treatment in severe Kawasaki disease(KD). It is a purpose that this study elucidates mechanism of action of IVIG and CsA using a blood sample before and after the initial treatment with CsA for severe KD. Thirteen cases were enrolled in this trial in our hospital. We conducted RNA extraction and serum isolation from the blood sample of these patients and prepared for the measurement of the gene expression level. In total, we measured inflammatory cytokine (sIL-2R, IL2, 4, 6, 10, TNF etc.) for 11 cases 29 points, including IVIG effective cases, resistant cases, IVIG+CsA effective cases, and resistant cases.

研究分野：小児循環器

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 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

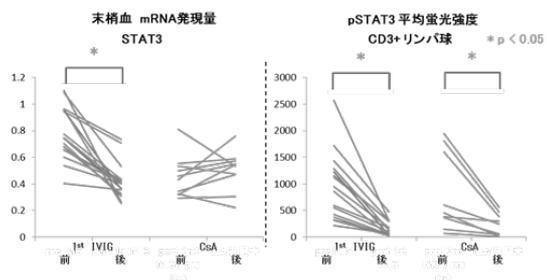
川崎病(KD)は、乳幼児に好発する原因不明の血管炎症候群であり、我が国では罹患者数が増加傾向にある。一般にKDの治療にはガンマグロブリン静注療法(IVIG)が用いられ、冠動脈障害(CAL)の回避に一定の有効性がある。しかし、約20%は、初回IVIGが無効で、追加の治療が必要となる、重症KDである。当教室のSuzukiらは、T細胞活性化の細胞内シグナル伝達経路である Nuclear factor of activated T cells (NFAT)経路を抑制するシクロスポリン A (CsA)が有効であるとの報告(Suzuki H. et al. *Pediatr Infect Dis J.* 2011)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、良好な治療成績が報告されている。これを受けて、2014年5月から、群馬スコア(Kobayashi T. et al. *Circulation.* 2006)を用いてIVIG不応が予測される重症KD患児を対象として、IVIG単独療法とIVIG+CsA併用療法のCAL発症阻止の有用性を比較検討する、多施設共同非盲検ランダム化比較試験(第層試験)を医師主導治験で開始した。

(川崎病の病態) 一方で、KDの病態は未解明な点が多く、重症KDに対してCsAがどのような免疫応答をもたらしているか不明である。最近、当教室のSuzukiらは重症KD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(IL)-2の受容体である、可溶性IL-2受容体とIL-6の血中濃度が有意に上昇するとの報告をした(*Pediatr Int.* 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(右図)。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JAK1/1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罹患者の急性期、治療過程において、フローサイトメトリー法(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。と考える。

(川崎病と遺伝子多型) 一方、KDの宿主因子として、Onouchiらはinositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C (ITPKC)遺伝子やCaspase-3 (CASP3)遺伝子の一塩基

多型(SNP)が、KD罹患感受性、IVIG反応性、冠動脈病変(CAL)発症など重症度と関与すると報告した(*Nat Genet.*2008, *Hum Mol Genet.*2010)。両遺伝子にSNPが生じてITPKC、CASP3の活性低下を生じ、T細胞のNFAT活性亢進が持続し得る状況となる。このような状況下では、細胞性免疫に關与するIL-2などの炎症性サイトカインの産生亢進が持続する。

(先行実験の結果) 本研究の先行実験として、治療抵抗性KD病児のIVIG前後、CsA投与前後共に末梢血T細胞において、STAT3の活性化(リン酸化STAT3)および、STAT3の遺伝子発現量が有意に低下し(下図)、炎症性サイトカインのシグナル伝達経路への影響が確認できた。



2. 研究の目的

本研究では、IVIG+CsA併用療法に関する第Ⅰ相試験に参加する症例に関して、IVIG+CsA併用療法施行前後における、細胞内シグナル伝達物質の活性化、各種サイトカインの定量、サイトカイン遺伝子発現レベルをIVIG単独治療群と比較検討し、CsAの作用機序を解明し、さらに、現在、未解明である重症KDの病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

IVIG+CsA併用療法に関する第Ⅰ相試験に参加する重症KD患児を対象に、急性期治療時の末梢血検体を用いて、3年間で以下の課題を中心に研究をすすめることとした。

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

対象患児からEDTA採血を行い、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、細胞内シグナル伝達物質(STAT1, 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. 炎症性サイトカインの定量

対象患児の末梢血血清を用い、各種サイトカインの定量を行う。小児であり、採血の負担

を軽減するために、フローサイトメーターを用いて、CBA 法にて定量を行う。この方法により、50 µl のわずかな血清で一度に最大 30 種類のサイトカインタンパクの定量が可能である。今回は、IL-1_β, 2, 4, 6, 8, 10, 17A, TNF, IFN- γ のサイトカインを定量する。

3. 炎症性サイトカイン・細胞内シグナル伝達物質の遺伝子発現量の定量

対象患児の末梢血から、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 PCR 法を行い、STAT1, 3, 5, IL-1_β, 2, 4, 6, 8, 10, 17A, TNF, IFN- γ , SOCS1, SOCS3, NFATc1, NFATc2 などのサイトカインおよび、細胞内シグナル伝達物質の RNA 定量を行う。

4. ITPKC 遺伝子、CASP3 遺伝子の SNP の有無の測定

対象患児から EDTA 採血を行い、末梢血白血球からの genomic DNA を抽出する。この DNA を鋳型として ITPKC (rs28493229) を含む 189 塩基および CASP3(rs72689236) を含む 302 塩基を PCR で増幅した後、キャピラリーシークエンサーABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてシークエンスし、遺伝子型を決定する。

5. 集積されたデータの統合・解析・報告

これまでに集積された臨床データ、細胞内シグナル伝達物質の活性化、各種サイトカインの定量結果、サイトカイン遺伝子発現レベルの測定結果、ITPKC 遺伝子、CASP3 遺伝子の SNP の有無を統合し、統計学的解析を行う。

4. 研究成果

2016 年 9 月時点で、本治験への患者登録が終了し、当院にて本治験に参加した患者数が 13 例となった。5 例が IVIG 単独療法群で、8 例が IVIG+CsA 群であった。これらの患者の血液サンプルから血清分離を行い、また、RNA 採取用試験管にて血液を凍結保存した。RNA の抽出、精製を行い、real time RT PCR による細胞内シグナル伝達物質 (STAT1, 3, 5, NFAT 等) の遺伝子発現量の測定の準備を行っている。また、現在、IVIG 有効群、無効群、IVIG +CsA 併用療法有効群、無効群、計 11 例 29 ポイントで、炎症性サイトカイン (sIL-2R, IL2, 4, 6, 10, TNF 等) の測定を行った。現在、経時的変化について解析中である。

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 4 件)

1. Fukazawa R, Kobayashi T, Mikami M, Saji T, Hamaoka K, Kato H, Suzuki H, Tsuda E, Ayusawa M, Miura M, Ebata R, Kobayashi T, Yashiro M, Ogawa S.:

Nationwide Survey of Patients With Giant Coronary Aneurysm Secondary to Kawasaki Disease 1999-2010 in Japan. *Circ J.* 2017 Aug 30. doi: 10.1253/circj.CJ-17-0433. [Epub ahead of print] (査読有)

2. 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 ORA11 Gene Associated with Kawasaki Disease. *PLoS One.* 20;11(1):e0145486. 2016 (査読有)
3. Suzuki H. : Cyclosporin A for IVIG non-responder. *Kawasaki Disease. Ben T Saji, et al (Eds), Part III, Medical Treatment, pp187-194, 2016, Springer Japan KK, Tokyo*
4. Kwon YC, Kim JJ, Yun SW, Yu JJ, Yoon KL, Lee KY, Kil HR, Kim GB, Han MK, Song MS, Lee HD, Ha KS, Sohn S, Ebata R, Hamada H, Suzuki H, Ito K, Onouchi Y, Hong YM, Jang GY, Lee JK; Korean Kawasaki Disease Genetics Consortium. : Male-specific association of the FCGR2A His167Arg polymorphism with Kawasaki disease. *PLoS One.* 2017 Sep 8;12(9): e0184248. doi: 10.1371/journal.pone.0184248. eCollection 2017. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. What role do the vasa vasorum play in the sequelae of coronary arterial lesions in Kawasaki disease?, Nobuyuki Kakimoto, Takashi Takeuchi, Akira Taruya, Yasushi Ino, Atsushi Tanaka, Takashi Kubo, Tomohiro Suenaga, Shoichi Shibuta, Takashi Akasaka, Hiroyuki Suzuki. The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2018/3/24.
2. 川崎病遠隔期冠動脈病変における Vasa Vasorum の分析、垣本信幸、武内崇、樽谷玲、猪野靖、田中篤、久保隆史、鈴木崇之、末永智浩、竹腰信人、立花伸也、

渋田昌一、赤坂隆史、鈴木啓之、第 37 回日本川崎病学会、2017/10/27

3. 和歌山県下における川崎病の疫学的特徴と治療の変遷に伴う冠動脈病変発生率の推移、北野尚美、武内崇、末永智浩、垣本信幸、鈴木崇之、立花伸也、渋田昌一、山野貴司、赤坂隆史、鈴木啓之、第 37 回日本川崎病学会、2017/10/27
4. 川崎病治療後における血清免疫グロブリン値の長期的推移、末永智浩、鈴木啓之、鈴木崇之、垣本信幸、武内崇、渋田昌一、立花伸也、竹腰信人、第 37 回日本川崎病学会、2017/10/27
5. 川崎病冠動脈瘤に合併した新鮮瘤内血栓に対する tissue-type plasminogen activator (t-PA) による血栓溶解療法の有用性、立花伸也、鈴木崇之、垣本信幸、末永智浩、武内崇、鈴木啓之、渋田昌一、竹腰信人、第 37 回日本川崎病学会、2017/10/27
6. Ca²⁺/NFAT 経路関連 3 遺伝子多型から見た川崎病の急性期臨床像、鈴木崇之、垣本信幸、尾内善広、立花伸也、竹腰信人、渋田昌一、末永智浩、武内崇、鈴木啓之、第 37 回日本川崎病学会、2017/10/27
7. 光線断層法 (OCT) を用いた川崎病遠隔期冠動脈病変における Vasa Vasorum の検討、垣本信幸、武内崇、樽谷玲、猪野靖、田中篤、久保隆史、末永智浩、立花伸也、渋田昌一、赤坂隆史、鈴木啓之、第 53 回日本小児循環器学会、2017/7/8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 崇 (TAKEUCHI, Takashi)
和歌山県立医科大学医学部・講師
研究者番号：10246522

(2) 研究分担者

鈴木 啓之 (SUZUKI, Hiroyuki)
和歌山県立医科大学医学部・教授
研究者番号：80196865

末永 智浩 (SUENAGA, Tomohiro)
和歌山県立医科大学医学部・助教
研究者番号：70433365

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