

令和元年8月30日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10069

研究課題名(和文) mTOR阻害薬による川崎病患者血清特異的物質の炎症惹起作用抑制の検討

研究課題名(英文) The mechanism of mTOR inhibitors in the treatment of Kawasaki-disease model.

研究代表者

西尾 壽乗(Nishio, Hisanori)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00507783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は主に乳幼児に発生する急性熱性疾患であり、全身の血管炎を特徴とする。我々は、Nod1リガンド川崎病モデルマウスにおける冠動脈炎がmTOR阻害薬で改善することを見出した。mTOR阻害薬にはオートファジー亢進効果があり、川崎病患者で検出される川崎病特異的物質がオートファジーによって処理されることで炎症の沈静化に寄与する可能性を考慮して検討を行った。今回の研究ではマウスモデルやヒト冠動脈内皮細胞を用いてオートファジー機構について検討を行ったものの、mTOR阻害薬の有効性にオートファジーは直接的には関与していないことが解明された。さらなる機序の解明が、川崎病治療薬の開発につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病は主に乳幼児に発生する急性熱性疾患であり、全身の血管炎を特徴とする。我々は、川崎病の発症に自然免疫が大きく関わっていることを明らかにした。川崎病の原因はいまだに不明であるが、川崎病の疫学的特徴である季節性・地域性に関する研究では、それを証明しうる特異的物質を検出できている。我々はNod1リガンド川崎病モデルマウスにおける冠動脈炎がmTOR阻害薬で改善することを見出した。その機序を詳細に解明することができれば、画期的な新薬の開発につながると考えられる。今回の研究ではオートファジー機構について検討を行ったものの、直接的な関与は否定的であった。さらなる機序の解明が必要である。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease is an acute febrile disease characterized by systemic vasculitis in young children. We previously reported that innate immune receptor "Nod1" ligand induced coronary arteritis which resembled Kawasaki disease. We newly found that mTOR inhibitors improved the coronary arteritis in Nod1-induced KD mouse model. Several studies had shown that mTOR inhibitors increased autophagy. Here, we hypothesized that increased autophagy cleared KD-inducing molecules (such as Nod1 ligands) and improved coronary arteritis. We investigated the role of autophagy in KD model in vivo and in vitro. We found that autophagy was not involved in the treatment mechanism of mTOR inhibitors. Studying the other mechanisms of mTOR inhibitors leads to the development of the treatment of KD.

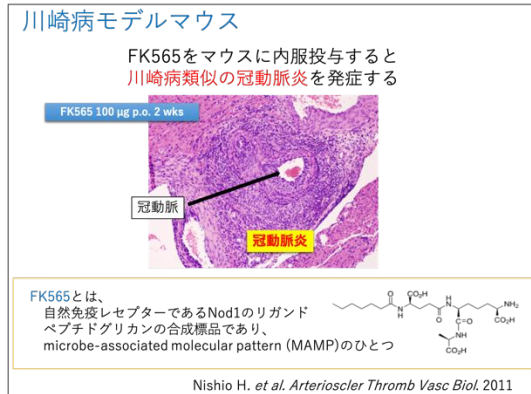
研究分野：川崎病

キーワード：川崎病 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

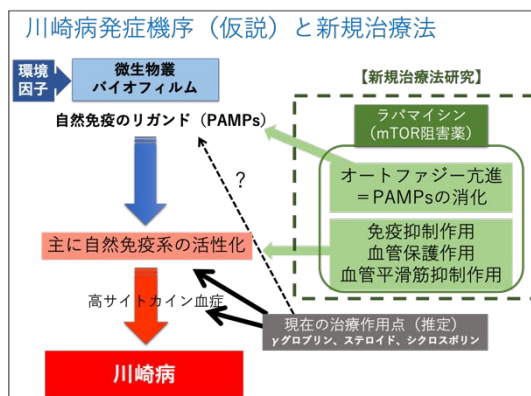
川崎病は主に乳幼児に発生する急性熱性疾患であり、全身の血管炎を特徴とする。様々な原因因子や遺伝的素因について報告があるが、それらが川崎病すべての症例の原因として証明されていない。我々は末梢血の遺伝子発現やヒト冠動脈内皮細胞による刺激実験などから、川崎病の発症に自然免疫が大きく関わっていることを明らかにした。さらに、自然免疫の一つである Nod1 のリガンドをマウスに投与することにより、川崎病類似冠動脈炎が起こることを報告した。この冠動脈炎という部位特異性については未だ不明ではあるが、冠動脈組織がもつ内因的因子が関わっていることがわかった。



川崎病の原因はいまだに不明であるが、川崎病の疫学的特徴である季節性・地域性に関する研究では、それを証明しうる特異的物质を検出できている。現在、季節・地域別に網羅的解析を行うとともに、特異的物质について構造解析を進めており、判明すれば特異的にマーカーになる可能性も考えられる(論文投稿中)。

我々は、mTOR 阻害薬の投与により Nod1 リガンド川崎病モデルマウスの冠動脈炎が改善することを見出した。mTOR 阻害薬はオートファジー亢進薬である。オートファジー機構の亢進によって川崎病特異物質が生体内で処理されれば、川崎病の病勢を早期に収束できる可能性がある。このよ

うに、mTOR 阻害薬はこれまでの川崎病治療薬とは全く異なるメカニズムによる新たな川崎病治療薬となる可能性があると考えられる。



2. 研究の目的

本モデルマウスを使って、mTOR 阻害薬の有効性およびその作用機序を明らかにする。なお先行研究で原因物質を検索していたが、一つに絞ることができず、mTOR 阻害薬作用機序に解明に専念した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤を用いてオートファジーを亢進、抑制した際の Nod1 リガンド誘発マウス冠動脈炎病理像の検討

FK565(Nod1 リガンド)100μg を連日内服投与する(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011)。ラパマイシン(mTOR 阻害薬: オートファジー亢進薬)による冠動脈炎の改善を予想し、FK565 投与期間は1週間とし、週3回ラパマイシンを投与して、冠動脈炎を評価した。また、パフィロマイシン A1 (オートファジー抑制薬)による冠動脈炎の悪化を予想し、FK565 投与期間は3日間とし、連日パフィロマイシン A1 を投与して、冠動脈炎を定量的に評価した。

続いて、検証的な実験として、FK565 (Nod1 リガンド) 100μg を day 1, 4 に皮下注射して作成する川崎病モデルマウスについても同様の実験を行った。

(2) オートファジー亢進薬・抑制薬を用いたヒト冠動脈内皮細胞、ヒト冠動脈平滑筋細胞からのサイトカイン放出の影響

ヒト冠動脈内皮細胞(HCAEC)を培養し、FK565で刺激するとIL-6やIL-8などの炎症性サイトカイン産生が亢進する。炎症性サイトカインの産生にオートファジー亢進・抑制薬がおよぼす影響をみるために、オートファジー亢進薬としてラパマイシン、テムシロリムス、レスベラトロールを、オートファジー抑制薬としてパフィロマイシン、クロロキン、ウォルトマンニン共存下で24時間培養し、その上清中サイトカインをサイトカインビーズアレイにて測定した。

(3) mTOR 阻害薬存在下・非存在下に FK565 で冠動脈内皮細胞を刺激した際のマイクロアレイ解析

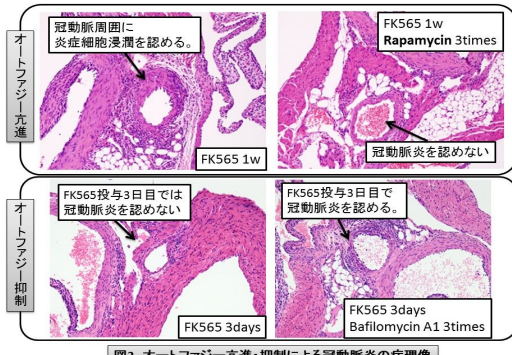
冠動脈内皮細胞に対する mTOR 阻害薬の機序を明らかにするため、HCAEC を FK565 で刺激し、mTOR 阻害薬であるテムシロリムス存在下・非存在下にオートファジー関連遺伝子の発現が変化するかを確認した。

テムシロリムス存在下・非存在下に HCAEC を FK565 で刺激した後に、経時的に細胞を回収し RNA を抽出、マイクロアレイ解析を行った。

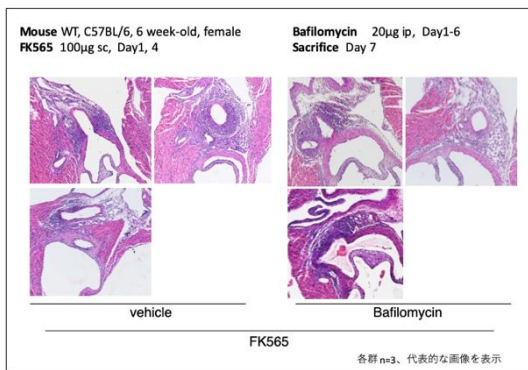
4 . 研究成果

(1) 薬剤を用いてオートファジーを亢進、抑制した際の Nod1 リガンド誘発マウス冠動脈炎病理像の検討

FK565 内服川崎病モデルにおいて、ラパマイシン投与により冠動脈炎は抑制され、バフィロマイシン A1 投与により冠動脈炎の悪化を認めた。ラパマイシンはオートファジー亢進作用以外にも様々な作用を持つ mTOR 阻害薬であるが、バフィロマイシン A1 により悪化を認めることから、ラパマイシンの有効性にはオートファジー作用が関連しているのではないかと示唆された。

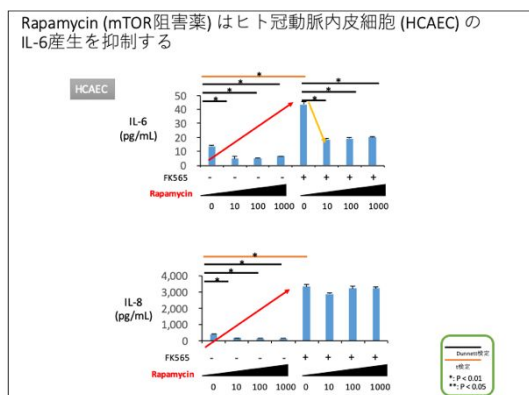


しかしながら、FK565 皮下注による川崎病モデルにおいては、ラパマイシン投与により冠動脈炎は抑制されるものの、バフィロマイシン A1 投与による冠動脈炎の悪化は認められなかった。



(2) オートファジー亢進・抑制によるヒト冠動脈内皮細胞、ヒト冠動脈平滑筋細胞からのサイトカイン放出の影響

HCAEC を培養し、FK565 で刺激すると IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカイン産生が亢進する。ラパマイシンは濃度依存的に IL-6 の産生を抑制した。

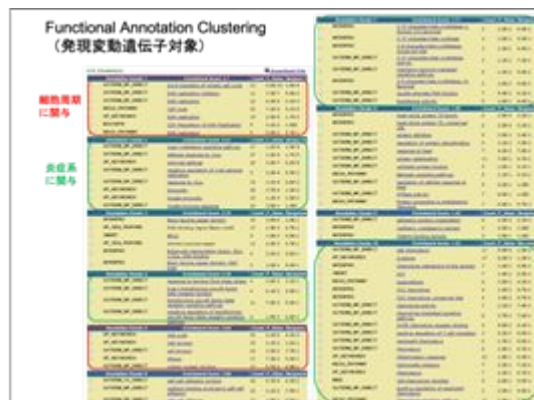
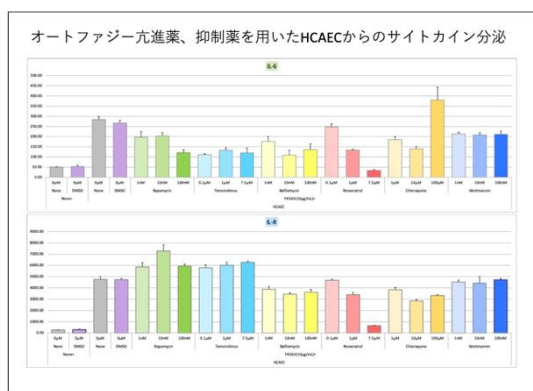


オートファジー亢進薬としてラパマイシン、テムシロリムスを、オートファジー抑制薬としてパフィロマイシン、クロロキン、ウォルトマンニン共存在下で 24 時間培養し、その上清中サイトカインをサイトカインビーズアレイにて測定した。ラパマイシンは濃度依存的に IL-6 の産生を抑制したものの、レスベラトロールも濃度依存的に抑制すること、他の薬剤では一定の傾向が認められないことが明らかとなった。

HCAEC に Nod1 リガンドにより刺激すると同時に、mTOR 阻害薬での影響について、マイクロアレイ解析を行い、HCAEC の発現を調べる。特に炎症性サイトカイン・ケモカインについて pathway 解析を行い、mTOR 阻害薬の影響について検討を行った。しかし、オートファジー関連遺伝子は抽出されず、免疫関連遺伝子であった。オートファジーや関連性が低いことが推測された。

(3) mTOR 阻害薬存在下・非存在下に FK565 で冠動脈内皮細胞を刺激した際のマイクロアレイ解析

テムシロリムス存在下・非存在下に HCAEC を FK565 で刺激した後に、経時的に細胞を回収し RNA を抽出、マイクロアレイ解析を行った。刺激後 12 時間の結果をもとに、発現が変動した遺伝子群を Functional Annotation Clustering 解析を行ったところ、発現が変動した主要な群は細胞周期もしくは炎症に関与するものであり、オートファジー関連遺伝子群の変動はほとんどなかった。



本研究により、mTOR 阻害薬による川崎病治療は、病因・病態を考えると非常に有望であるものの、その機序はオートファジー機構の調整ではない可能性が高いことが判明した。本現象の機序についてさらなる解析をすすめると同時に、新規治療法として医師主導治験に向けた準備に取り組む。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Murata K, Motomura Y, Tanaka T, Kanno S, Yano T, Onimaru M, Shimoyama A, Nishio H, Sakai Y, Oh-Hora M, Hara H, Fukase K, Takada H, Masuda S, Ohga S, Yamasaki S, Hara T:

Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signalling pathway in a murine model of Kawasaki disease.

Clin Exp Immunol. 190(1):54-67, 2017

2. Nanishi E, Nishio H, Takada H, Yamamura K, Fukazawa M, Furuno K, Mizuno Y, Saigo K, Kadoya R, Ohbuchi N, Onoe Y, Yamashita H, Nakayama H, Hara T, Ohno T, Takahashi Y, Hatae K, Harada T, Shimose T, Kishimoto J, 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.

J Am Heart Assoc. 6(7): e005370, 2017

3. Hara T, Nakashima Y, Sakai Y, Nishio H, Motomura Y, Yamasaki S:

Kawasaki disease: a matter of innate immunity.

Clin Exp Immunol. 186: 134-143, 2016

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Kanemasa H, Nanishi E, Takada T, Ishimura M, Nishio H, Yashiro M, Makino N, Nakamura Y, Hara T, Ohga S:
Two clinical expressions of juvenile idiopathic arthritis-associated Kawasaki disease: a nationwide survey in Japan
The 9th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases, Nov 10-12, 2018, Fukuoka, Japan
2. Nakashima Y, Mizuno Y, Furuno K, Hirono K, Takatsuki S, Suzuki H, Onouchi Y, Kobayashi T, Nishio H, Sakai Y, Ohga S, Hara T:
Identification and characterization of Kawasaki disease-specific molecules
The 9th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases. Nov 10-12, 2018, Fukuoka, Japan
3. Murata K, Motomura Y, Kanno S, Nishio H, Sakai Y, Takada H, Ohga S, Hara T:
Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis in a NOD1-mediated mouse model of Kawasaki disease via the MyD88 signaling pathway.
The 12th International Kawasaki Disease Symposium. Jun 12-15, 2018, Yokohama, Japan
4. Murata K, Motomura Y, Kanno S, Nishio H, Sakai Y, Takada H, Ohga S, Hara T:
Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis in a NOD1-mediated mouse model of Kawasaki disease via the MyD88 signaling pathway.
The 12th International Kawasaki Disease Symposium. Jun 12-15, 2018, Yokohama, Japan
5. Nakashima Y, Mizuno Y, Furuno K, Nishio H, Hirono K, Takatsuki S, Suzuki H, Onouchi Y, Kobayashi T, Hara T;
Kawasaki disease-specific molecules are associated with the degree of inflammation, IVIG-resistance and the formation of coronary artery lesions in Kawasaki disease,
The 12th International Kawasaki Disease Symposium. Jun 12-15, 2018, Yokohama, Japan
6. 名西悦郎、西尾壽乗、高田英俊、古野憲司、水野由美、原寿郎、大賀正一：
クラリスロマイシンは川崎病の再燃割合を低下させる - 第2相ランダム化比較試験 -
第121回日本小児科学会学術総会 2018.4.20-22 福岡
7. 村田憲治、本村良知、神野俊介、西尾壽乗、酒井康成、高田英俊、大賀正一、原 寿郎
カルシニューリン阻害薬はMyD88を介して川崎病マウスモデルのNOD1誘導性冠動脈炎を増悪させる
血管炎病因病態研究会 2018.3.3 東京
8. 中島康貴、水野由美、古野憲司、西尾壽乗、廣野恵一、高月晋一、鈴木啓之、尾内善広、小林徹、原寿郎：
川崎病特異物質（PAMPs）に焦点を当てた川崎病の新規診断法の確立
日本医療研究開発機構（AMED）免疫アレルギー疾患等実用化研究研究事業
免疫アレルギー疾患実用化研究分野「川崎病特異物質（PAMPs）に焦点を当てた川崎病の新規診断法の確立」
平成29年度班会議 2018.1.27 東京
9. 中島康貴、金政 光、村田憲治、西尾壽乗、水野由美、波多江健、市田路子、荒川浩一、佐地 勉、大野拓郎、日高靖文、齋藤光正、小林 徹、尾内善広、原 寿郎：
季節性、地域性によるPAMPs/MAMPsの相違と治療効果に関する疫学的検討
国立研究開発法人日本医療研究開発機構「川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発」平成28年度 班会議 2016.7.7 東京
10. 西尾壽乗、名西悦郎、古野憲司、原 寿郎：
バイオフィーム制御薬クラリスロマイシンの川崎病再燃抑制効果に関する検証的試験 - 多施設共同ランダム化比較第III相試験 -
国立研究開発法人日本医療研究開発機構「川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発」平成28年度 班会議 2016.7.7 東京
11. 西尾壽乗：
オートファジーの制御による新たな治療法の開発～川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルマウスでの検討～
第20回川崎病治療懇話会 2016.7.6 東京

12. 本村良知、神野俊介、西尾壽乘、山崎晶、原寿郎、大賀正一：
Nod1 誘導性川崎病モデルマウスにおける CD11c 陽性マクロファージの役割
第 36 回日本川崎病学会・学術集会 2016.9.30-10.1 横浜

13. 中島康貴、金政光、村田憲治、山村健一郎、西尾壽乘、酒井康成、水野由美、波多江健、
市田蒔子、荒川浩一、大野拓郎、日高靖文、齋藤光正、宮本智文、小林徹、尾内善広、大賀正
一、原寿郎：
川崎病特異物質（PAMPs/MAMPs）の地域性・季節性と臨床的意義
第 36 回日本川崎病学会・学術集会 2016.9.30-10.1 横浜

〔図書〕(計 4 件)

西尾壽乘 (分担)
川崎病の病因
血管炎 (第 2 版) -基礎と臨床のクロストーク-
有村義宏 編、日本臨床社 東京 2018

西尾壽乘 (分担)
Nod1 リガンド誘導冠動脈炎モデル
川崎病学
川崎病学会 編、診断と治療社 東京 2018

西尾壽乘、名西悦郎、大賀正一：
川崎病の動物モデル
臨床免疫・アレルギー科 2017, 68 巻 6 号

西尾壽乘：
「川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発」委託研究開発成果報告書
平成 27 年度 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 難治性疾患等実用化研究事業
平成 28 年 3 月

〔産業財産権〕
取得状況 (計 1 件)

名称：川崎病の新規治療薬としての mTOR 阻害薬
発明者：名西 悦郎 / 原 寿郎 / 西尾 壽乘
権利者：国立大学法人九州大学
種類：用途特許
番号：特開 2017-039719
取得年：2017
国内外の別：国内

〔その他〕
特記事項なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 珠美

ローマ字氏名：Tanaka Tamami

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：学術研究員

研究者番号 (8 桁)：60423547