

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006 年～2008 年

課題番号：18591164

研究課題名 (和文) 川崎病血管炎における血管平滑筋細胞特異自己抗原の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of specific auto-antigens of vascular smooth muscle cell in the vasculitis of Kawasaki disease.

研究代表者 鈴木啓之 和歌山県立医科大学・医学部・准教授
80196865

研究成果の概要：

ヒト冠動脈由来血管平滑筋細胞の培養細胞由来のタンパク lysate を用い、SDS-PAGE で二次元タンパク電気泳動を行い、川崎病患児急性期血清を用いて抗原抗体反応を行った。予備実験で陽性反応が予想された 70kDa 付近に陽性スポットを確認した。この陽性スポットを分離し、N-末端アミノ酸分析を実施した。その結果、自己抗原の候補タンパクが 2 種同定された。この 2 種のタンパクについて ELISA システム構築のため抗原性の高い構造部分について解析を進めている。抗原性の高い部分に対する川崎病急性期患児の抗体保有について検討できる状況になった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,700,000	0	1,700,000
平成 19 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 20 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児循環器

1. 研究開始当初の背景

川崎病は、病理組織学的には全身性の血管炎であり、特に冠動脈に血管炎が強く生じて血管壁の破壊から冠動脈瘤の形成に至るとされる。しかし、川崎病で、どのような機序で血管炎を発症し、血管壁が破壊されるのかは、ほとんど解明されていない。

川崎病血管炎が全身性の血管炎であることから、その発症機序に液性因子の関与を疑ってきた。一方、我々は、川崎病急性期患児の末梢血の T 細胞レセプターのレパートリ

ーを分析し、Vβ2 と Vβ6.5 の有意な活性化を見出し、川崎病発症に SPE-C が関与する可能性を報告した (Pediatr Res 53:403-410, 2003)。スーパー抗原暴露から血管炎発症に至る過程に、非特異的に活性化される多数の T 細胞クローン中に、血管構築タンパク成分を自己抗原とした自己抗体産生を誘導するクローン (auto-reactive T 細胞) を持つ小児に川崎病血管炎を発症する可能性を考え、川崎病以外の原因で死亡した小児の病変のない冠動脈組織と川崎病急性期患児の血清を

用いて間接蛍光抗体法で検討した。その結果、中膜平滑筋細胞のみが明瞭に染色され、血管平滑筋細胞 (VSMC) に対する自己抗体が川崎病患児に存在することを見出し、VSMC を用いた Western Immunoblot でも 70kDa タンパクに対する IgA, IgM 分画の自己抗体の存在を明らかにし、川崎病に特異的であることを報告した (Eur J Pediatr 161:324-329, 2002)。この成果は、川崎病血管炎発症において液性因子である抗血管平滑筋抗体が関与していることを示唆するものである。

2. 研究の目的

川崎病における血管炎の発症機序の解明が大きな目的である。

1) 培養ヒト冠動脈由来血管平滑筋細胞 (VSMC) を用いた二次元タンパク電気泳動後にウェスタンブロットを行い、川崎病急性期 (入院時) 患児血清を用いて免疫スクリーニングし、2) 反応陽性スポットのタンパクを分離して、N-末端アミノ酸分析から VSMC への自己抗体に対応する特異自己抗原タンパクを同定し、VSMC の特異自己抗原・自己抗体系の川崎病血管炎発症、進展における役割や早期診断への有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

短期培養 (5-7 日間) したヒト冠動脈由来血管平滑筋細胞のタンパク lysate を収集し、脱塩キットを用いて精製した後、SDS-PAGE で二次元タンパク電気泳動を行った。2 枚同時に行い、一方は Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を、他方は Immobilon membrane (BI0-RAD) に電氣的に転写し、川崎病急性期患児の血清で免疫反応 (IgA, IgM) を行い陽性反応を示すタンパクと CBB 染色を行って得たタンパクスポットと比較検討する。免疫反応陽性を示すスポット (70kDa 付近) を分離し、N-末端アミノ酸分析を行い、自己抗原タンパクを同定する。

4. 研究成果

自己抗原の候補タンパクが 2 種同定された。この 2 種のタンパクについて ELISA システム構築のため抗原性の高い構造部分について解析を進めている。抗原性の高い部分に対する川崎病急性期患児の抗体保有について検討し、これらの 2 種の候補タンパクが自己抗原かどうか確認する予定である。

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 7 件)

1. Suenaga T, Suzuki H, Shibuta S, Takeuchi T, Yoshikawa N. Detection of multiple superantigen genes in stools of patients with Kawasaki disease. J Pediatr. in press, 2009
2. 末永智浩、鈴木啓之、渋田昌一、武内 崇、吉川徳茂、南 孝臣、上村 茂：高度に肝逸脱酵素の上昇を来した川崎病急性期症例の臨床的検討. 日本小児科学会雑誌 2008; 112(10):1543-1547
3. 南 孝臣、吉益 哲、濱 武継、泉 鉦吉、坊岡美奈、矢田菜穂子、宮脇正和、末永智浩、渋田昌一、武内 崇、鈴木啓之、吉川徳茂：川崎病様症状を呈した EB ウイルス感染症の 2 例 Prog Med 2008; 28:1656~1661
4. 鈴木啓之：難治性川崎病に対する新しい治療法 医学のあゆみ 2007; 222(11) : 867-870
5. 井出 岳、南 孝臣、泉 鉦吉、濱 武継、宮脇正和、吉益 哲、番 浩、末永智浩、渋田昌一、武内 崇、鈴木啓之、吉川徳茂：同時期に川崎病と類似症状をていした一卵性双生児 Prog Med 2007; 27:1536~1539
6. 末永智浩、鈴木啓之、武内 崇、渋田昌一、吉川徳茂、山家宏宣、野田英作、番浩、南 孝臣：2003 年~2006 年の川崎病ガンマグロブリン大量療法不応症例の検討. Prog Med 27:1596~1600, 2007
7. 梶皮谷朋子、赤井美津代、渋田昌一、武内 崇、鈴木啓之、吉川徳茂：IVIG 療法不応

例へのステロイドパルス療法後に神経症
状を呈した川崎病の一例

Prog Med 26:1605~1608, 2006

[学会発表] (計 12 件)

1. 鈴木啓之、渋田昌一、武内 崇、末永智浩、
南 孝臣、吉川徳茂 : IVIG 不応に対して
シクロスポリンを使用した 9 例の検討.
第 28 回日本川崎病研究会 2008.10. 札幌
2. 鈴木啓之、荻野廣太郎、中村好一、上原里
程、屋代真弓、柳川 洋: 川崎病急性期治
療にステロイド投与を受けた症例の冠動
脈障害(CAL)発生の分析 -第19回川崎病
全国調査資料および 2 次調査資料からの
検討- 第 44 回日本小児循環器学会
2008.7. 福島
3. Hiroyuki Suzuki, Tomohiro Suenaga,
Shoichi Shibuta, Takashi Takeuchi,
Norishige Yoshikawa, Takaomi Minami :
Investigation of T cell activation in
Kawasaki disease patients unresponsive to
intravenous immunoglobulin treatment.
Ninth International Kawasaki Disease
Symposium 2008.4, Taipei, Taiwan
4. Hiroyuki Suzuki, Hirotarō Ogino, Yosikazu
Nakamura, Ritei Uehara , Mayumi Yashiro,
Hiroshi Yanagawa : Analysis of the
development of coronary arterial lesions in
patients receiving steroid treatment in the
acute phase of Kawasaki disease(KD), based
on data from the first and second
investigations in the 19th nationwide survey
of KD in Japan. Ninth International
Kawasaki Disease Symposium 2008.4,
Taipei, Taiwan
5. Tomohiro Suenaga, Hiroyuki Suzuki,
Shoichi Shibuta, Takashi Takeuchi,
Norishige Yoshikawa, Takaomi Minami :
Detection of superantigen genes in stools
of patients with Kawasaki disease.
Ninth International Kawasaki Disease
Symposium 2008.4, Taipei, Taiwan
6. 南 孝臣、吉益 哲、濱 武継、
泉 鉦吉、坊岡美奈、矢田菜穂子、宮脇
正和、末永智浩、渋田昌一、武内 崇、
鈴木啓之、吉川徳茂 : 川崎病様症状を呈
した EB ウイルス感染症の 2 例 第 32
回近畿川崎病研究会 2008. 3. 大阪
7. 末永智浩、鈴木啓之、渋田昌一、武内 崇、
吉川徳茂、南 孝臣 : 川崎病急性期患児の
便中スーパー抗原遺伝子の検討
第 27 回日本川崎病研究会 2007. 10. 東京
8. 鈴木啓之、武内 崇、渋田昌一、末永智浩、
南 孝臣、吉川徳茂 : γ グロブリン大量療
法不応症例における T 細胞活性化の検討
第 43 回日本小児循環器学会総会
2007.7. 東京
9. 末永智浩、鈴木啓之、武内 崇、渋田昌
一、吉川徳茂、山家宏宣、野田英作、
番 浩、南 孝臣 : 2003 年~2006 年の
川崎病ガンマグロブリン大量療法不応
症例の検討. 第 31 回近畿川崎病研究会
2007. 3. 大阪
10. 末永智浩、鈴木啓之、渋田昌一、武内 崇、
吉川徳茂、南 孝臣 : 年長児に発症した
川崎病の臨床的検討. 第 26 回日本川崎
病研究会 2006. 10. 大阪

11. 鈴木啓之、武内 崇、洪田昌一、末永智浩、
南 孝臣、吉川徳茂：シクロスポリンが有効であった難治性川崎病の2例
第42回日本小児循環器学会総会
2006.7. 名古屋

12. 南 孝臣、鈴木啓之、武内 崇、洪田昌一、
末永智浩、吉川徳茂：右冠動脈低形成例に回旋枝末梢の冠動脈瘤を生じた川崎病の2例。第42回日本小児循環器学会総会
2006.7. 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木啓之
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
80196865

(2) 研究分担者

武内 崇
和歌山県立医科大学・医学部・講師
10246522

南 弘一
和歌山県立医科大学・医学部・講師
60301438

吉川徳茂
和歌山県立医科大学・医学部・教授
10158412

(3) 連携研究者

該当なし