

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07852

研究課題名(和文) 遺伝的背景とCa<sup>2+</sup>/NFAT経路活性化に基づいた川崎病への新治療戦略構築の試み研究課題名(英文) Attempt to construct a new therapeutic strategy for Kawasaki disease based on genetic background and Ca<sup>2+</sup> / NFAT pathway activation

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症川崎病患児のIVIG前後、シクロスポリンA (CsA) 投与前後で末梢血T細胞で、STAT3活性化と、STAT3遺伝子発現量が有意に低下し、realtime RT PCRで、CsA投与後にNFATc1, c2の遺伝子発現量が共に有意に上昇し、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。JAK-STAT経路、Ca<sup>2+</sup>/NFAT経路の川崎病急性期治療時の免疫応答に関与が示唆された。また、当院で加療した川崎病患児で、疾患感受性遺伝子のITPKC, CASP3, ORA11の遺伝子多型を測定し、ITPKCのリスクアレルが、IVIG不応の重症川崎病で有意に多いという結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病の初期治療抵抗例に対する新たな治療法は国内外で模索されている。ステロイド、インフリキシマブ、血漿交換などに加えてシクロスポリンA (CsA) があるが、どの治療法もまだ確定的な状況ではない。上記したように罹患感受性や重症化に関連すると報告された7遺伝子中3遺伝子のSNPが、Ca<sup>2+</sup>/NFAT経路に関与しており、この経路が川崎病血管炎惹起メカニズムの中心的役割を持つ可能性がある。CsAはこの経路の下流のシグナル伝達に抑制的な作用ポイントを有する薬剤であり、効果が証明されたことで国内外から注目される。

研究成果の概要(英文)： The activation of STAT3 (phosphorylated STAT3) and gene expression of STAT3 were significantly decreased in peripheral blood T cells of children with severe Kawasaki disease before and after IVIG and cyclosporine A (CsA) administration. In the realtime RT PCR study, the gene expression levels of NFATc1 and c2 were both significantly increased after CsA treatment, confirming its effect on the signaling pathway of inflammatory cytokines. The JAK-STAT pathway and Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway were suggested to be involved in the immune response during acute treatment of Kawasaki disease.

In addition, we measured polymorphisms of the disease susceptibility genes ITPKC, CASP3, and ORA11 in children with Kawasaki disease treated at our hospital, and found that the risk allele of ITPKC was significantly higher in severe Kawasaki disease that was not responding to IVIG.

研究分野：小児循環器学

キーワード：川崎病 シクロスポリンA Ca<sup>2+</sup>/NFAT経路

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 川崎病の病態

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、我が国では罹患者数が増加傾向にある。KDの病態は未解明な点が多いが、当教室のSuzukiらは、IVIg不応の重症KDの急性期において、炎症関連サイトカインである可溶性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)。ヒトの免疫系には、主に、細胞性免疫と、液性免疫が存在し、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、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。IL-2はT細胞膜表面に存在する受容体に結合し、JAK1/3が活性化され、細胞内で引き続きSTAT5の活性化をもたらす。STAT5は核内で、以降の免疫応答を引き起こす。また、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、核内で転写活性化を引き起こす。一方で、Kusudaらは近年、自然免疫系が川崎病の病因に関連すると報告(PLoS One. 2014)し、川崎病の病因論に新たな問題を提起した。

### (2) 川崎病と遺伝子多型

一方、KDの宿主因子として、OnouchiらはITPKC遺伝子やCASP3遺伝子、ORAI1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連すると報告した(Nat Genet.2008, Hum Mol Genet.2010, PLoS One. 2016)。それぞれのSNPが遺伝子の活性低下を生じ、T細胞をはじめとする免疫担当細胞の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、細胞性免疫に関与するIL-2など炎症性サイトカインの産生亢進が持続する。

### (3) 川崎病の治療

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が、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。追加の治療法として当教室の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、我々の施設も主要メンバーとして、2014年5月から、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発症阻止の有効性を比較検討する、多施設共同非盲検ランダム化比較試験(第1層試験)を医師主導治療で実施した。3年間の実施期間で、群馬スコアを用いて層別化された重症KDに対して、初回治療時にIVIg投与群と、IVIg+CsA併用投与群にランダム割付を行い、CALの合併頻度についてCsAの有効性の評価を行った結果、CsAの有効性が確認され、初期強化療法としてCsAが保険収載されるに至った。

## 2. 研究の目的

KDの原因は不明である。本研究は、CsA療法を含めたKDの急性期治療の前後で、免疫担当細胞の活性化の評価に、細胞内シグナル伝達物質の活性化と、炎症性サイトカインの定量、JAK-STAT経路、NF- $\kappa$ B経路、TLR経路などの細胞内シグナル伝達経路関連物質の遺伝子発現の測定を行い、更にT細胞活性化シグナル伝達に関与するITPKC、CASP3、ORAI1の3つの遺伝子のSNPと重症度を比較検討し、KDの新たな治療戦略の構築を目指すもので、申請者らの知る限り世界で初めての試みであり、極めて独創的な研究である。KD血管炎の発症進展における細胞性免疫、液性免疫、自然免疫系の関与する経路を解明し、IVIgやCsAの作用点をも明らかにし、重症KDの病態が解明できれば、治療法に新たな道が開け、患者に多大の福音をもたらすと思われ、また国際的にも注目される。

## 3. 研究の方法

本研究では、KD症例の遺伝的背景とCa<sup>2+</sup>/NFAT経路活性化の関与メカニズムの解明目的として、KD症例の3遺伝子(ITPKC、CASP3、ORAI1)のシーケンスからSNPの有無の確認を行い、治療プロトコル(1st-, 2nd-, 3rd-, 4th-line:それぞれIVIg, IVIg, CsA, IVIg)に対する治療反応性、群馬スコアなど重症度関連臨床検査データ、炎症関連サイトカイン・細胞内シグナル伝達物質の測定を行い、Ca<sup>2+</sup>/NFAT経路活性化関連遺伝子のSNPの有無と治療反応性などの臨床情報や炎症性サイトカインとの関連性を解明し、CsAの早期使用など新たな治療戦略の構築を実現することを目指した。具体的には、

### (1) 症例から検体採取および臨床特性のデータ収集

当科で急性期治療を行うKD症例から検体収集する。初期治療(1st-line, 2nd-line, 3rd-line治療はそれぞれIVIg、IVIg、CsA)を行い、各症例の治療反応性によって初回IVIgのみで解熱し

た 1st 群、2nd-line の追加 IVIG で解熱した 2nd 群、追加 IVIG にも反応せず 3rd-line の CsA を使用した CsA 群の 3 群に分類する。(図 1) 対象患児は、当院で急性期治療を行う KD 患児 (年間 40~50 例) である。具体的な臨床データとしては、発症年齢・性別、急性期血液検査データ、治療反応性、CAL の有無を収集する。

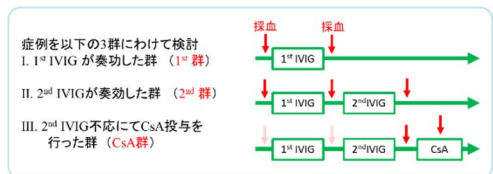


図 1 治療プロトコールとグループ化

(2) 3 遺伝子 (ITPKC 遺伝子、CASP3 遺伝子、ORAI1 遺伝子) の SNP の有無の測定  
 対象患児から EDTA 採血を行い、末梢白血球からの genomic DNA を抽出する。この DNA を鋳型として ITPKC、CASP3、ORAI1 を含む塩基を PCR で増幅した後、キャピラリーシーケンサー ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてシーケンスし、遺伝子型を決定する。

(3) 炎症性サイトカインの定量  
 末梢血血清を用い、各種サイトカインの定量を行う。採血量の軽減のために、フローサイトメーターを用い、CBA 法にて定量を行う。この方法により、50 μl の血清で一度に最大 30 種類のサイトカインタンパクの定量が可能である。IL-1, 2, 4, 6, 8, 10, 17A, 18, TNF, IFN- のサイトカインを定量する。

(4) 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  
 免疫担当細胞に対して、FCM を行い、活性化 STAT3, 5 などを測定する。対象患児の末梢血から、採血後 3 時間以内に、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を測定し、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。

(5) 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、Takara Thermal Cycler Dice™を用いて realtime PCR 法を行い、STAT3, 5, IL-1, 2, 4, 6, 8, 10, 17A, 18, TNF, IFN-, SOCS1, SOCS3, NFATc1, NFATc2, NF- B1, NF- B2, JNK, MAPK, IRAK-4, p38 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。

(6) 集積されたデータの統合・解析・報告  
 上記(1)~(6)のデータ、すなわち、臨床データ、3 遺伝子の SNP の有無、各種サイトカインの定量結果、細胞内シグナル伝達物質の活性化、サイトカイン遺伝子発現レベルの測定結果、を統合し、統計学的解析を行い、解析結果を、十分な議論を踏まえた上で、学会、学術雑誌等で情報発信する。

4. 研究成果

患者背景を図 2 に示す。治療反応性が悪かった CsA 群で冠動脈病変を認めた。

	発症年齢 中央値 (最小-最大)	男:女	1 <sup>st</sup> IVIG 施行 病日 中央値 (最小-最大)	2 <sup>nd</sup> IVIG 施行 病日 中央値 (最小-最大)	CsA 開始病日 中央値 (最小-最大)	解熱病日 中央値 (最小-最大)	冠動脈 病変
1 <sup>st</sup> 群 (n=19)	1y7m (0y5m-5y5m)	9:10	4 (3-7)	-	-	6 (4-9)	なし
2 <sup>nd</sup> 群 (n=7)	1y6m (0y9m-5y10m)	3:4	4 (4-6)	7 (6-9)	-	10 (8-19)	なし
CsA 群 (n=10)	2y4m (0y8m-4y8m)	7:3	4.5 (3-5)	7 (5-7)	8 (6-13)	11 (8-27)	3例 一過性拡大 → 退縮

図 2 患者背景

末梢血における STAT3, STAT5A, NFATc1, NFATc2, IL2, IL6 の mRNA 発現量、STAT3 及び STAT5 の活性化を図 2 に示す。治療前後のこれら遺伝子発現量、STAT3, STAT5 の活性化について、図 3 にまとめる。各群において、炎症性サイトカインの上昇と、STAT3 活性の低下、STAT5 活性の上昇を認めた。これらのことは、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。JAK-STAT 経路、Ca2+/NFAT 経路が、川崎病の急性期治療時の免疫応答に関与していることが示唆された。(図 3, 4, 5)

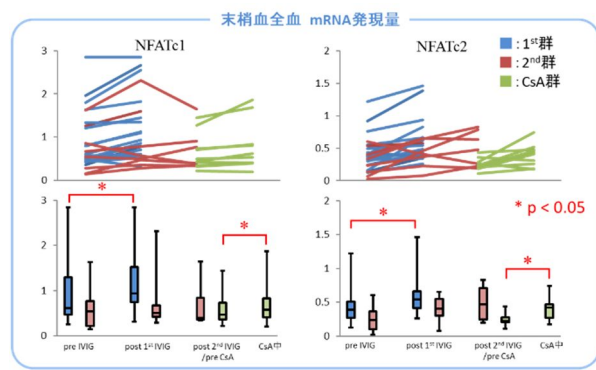


図 3 NFAT 遺伝子発現量

また、当院で加療を行った KD 患児で、疾患感受性遺伝子の ITPKC, CASP3, ORAI1 の遺伝子多型を測定し、ITPKC のリスクアレルが、2<sup>nd</sup> IVIG 不応の重症 KD で有意に多いという結果を得た。(図 6)

今後は、これらの結果を踏まえて、リスクアレルと炎症性サイトカインの関連性について検討してゆく予定である。

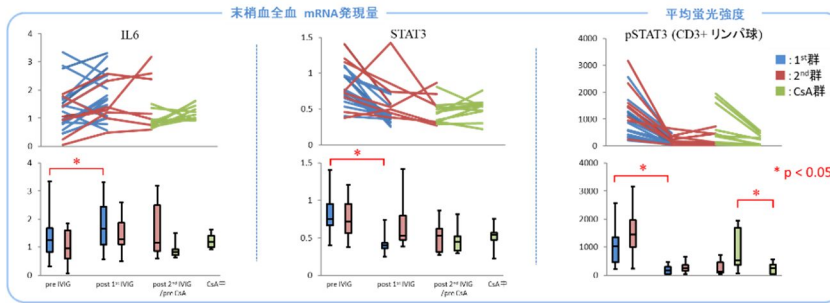


図4 IL6, STAT3 遺伝子発現量と STAT3 活性化

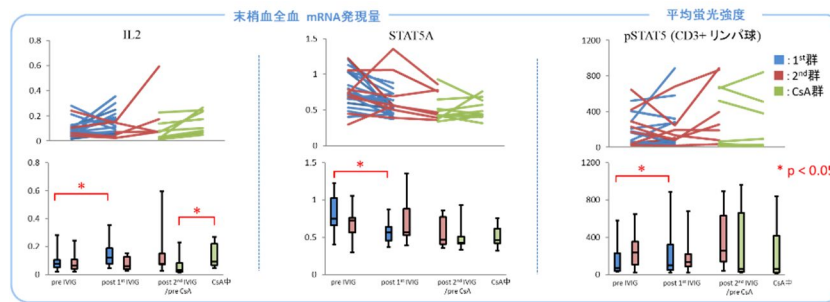


図5 IL2, STAT5 遺伝子発現量と STAT5 活性化

**ITPKC**

	2nd IVIG		合計
	奏功	不応	
GG+GC	157	33	190
CC	3	4	7
合計	160	37	197

C: リスクアレル Fisher's exact test:  $p=0.0245$   
 OR = 6.34 (95%CI: 1.35-29.68)

図6 ITPKC 遺伝子変異と 2nd IVIG の有効性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitano Naomi, Takeuchi Takashi, Suenaga Tomohiro, Kakimoto Nobuyuki, Naka Akihiro, Shibuta Shoichi, Tachibana Shinya, Takekoshi Nobuhito, Suzuki Takayuki, Tsuchihashi Tomoya, Yamano Takashi, Akasaka Takashi, Suzuki Hiroyuki	4. 巻 31
2. 論文標題 Seasonal Variation in Epidemiology of Kawasaki Disease-Related Coronary Artery Abnormalities in Japan, 1999?2017	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Epidemiology	6. 最初と最後の頁 132 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2188/jea.JE20190189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitano Naomi, Suzuki Hiroyuki, Takeuchi Takashi	4. 巻 378
2. 論文標題 Patient Age and the Seasonal Pattern of Onset of Kawasaki 's Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 2048 ~ 2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMc1804312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada Hiromichi, Suzuki Hiroyuki, Onouchi Yoshihiro, Ebata Ryota, Terai Masaru, Hanaoka Hideki, Hata Akira, Hamada Hiromichi, Takeuchi Takashi, Suenaga Tomohiro, Kakimoto Nobuyuki, et. al.	4. 巻 393
2. 論文標題 Efficacy of primary treatment with immunoglobulin plus ciclosporin for prevention of coronary artery abnormalities in patients with Kawasaki disease predicted to be at increased risk of non-response to intravenous immunoglobulin (KAIKA): a randomised controlled, open-label, blinded-endpoints, phase 3 trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Lancet	6. 最初と最後の頁 1128 ~ 1137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S0140-6736(18)32003-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 武内 崇, 末永 智浩, 垣本 信幸, 鈴木 啓之	4. 巻 38
2. 論文標題 【川崎病-診断と治療の新展開】治療薬解説 新たな選択肢、シクロスポリン	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 カレントセラピー	6. 最初と最後の頁 1013-1017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 啓之  (Suzuki Hiroyuki)  (80196865)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	
研究分担者	末永 智浩  (Suenga Tomohiro)  (70433365)	和歌山県立医科大学・医学部・講師   (24701)	
研究分担者	垣本 信幸  (Kakimoto Nobuyuki)  (90614412)	和歌山県立医科大学・医学部・助教   (24701)	
研究分担者	鈴木 崇之  (Suzuki Takayuki)  (40816691)	和歌山県立医科大学・医学部・助教   (24701)	
研究分担者	土橋 智弥  (Tsuchihashi Tomoya)  (20828488)	和歌山県立医科大学・医学部・学内助教   (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------