

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591199

研究課題名（和文） 川崎病治療戦略を意識した血清サイトカインと細胞外蛋白基質代謝の解析

研究課題名（英文） Analyses of serum cytokine and metabolism of extra-cellular protein matrix for purpose of making a therapeutic strategy for Kawasaki disease.

研究代表者

荒川 浩一（ARAKAWA HIROKAZU）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50272232

研究成果の概要：群馬大学で行われた無作為化比較試験保存血清を用い、細胞外マトリックス分解酵素・サイトカイン・ケモカイン等の測定を行い重症度(リスクスコア)との関連を検証した。結果リスクスコア点数はIL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、ICAM-1、MMP3と有意に相関していた。また、初期治療開始2日目のIL-6、IL-10、G-CSF、ICAM-1はIVIG群に比べIVIG+PSL群が有意に低値であった。MMP-3は他のmarkerとは逆にIVIG+PSLによる介入で高値にIVIG+PSL療法はより速やかに血管炎をdown-regulationすることによって予後改善に寄与している可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：川崎病、循環器学

1. 研究開始当初の背景

川崎病は、乳幼児期に発症する原因不明の全身性炎症性疾患で、欧米に比較し、日本での発生頻度が高いことが知られている。近年の少子化にもかかわらず、日本国内の発生数は年々増加しており、現在日本人で後天性心疾患最大の原因であることが知られている。免疫グロブリン超大量療法（IVIG）が標準的な治療方法として広く行われているが、IVIGで解熱しない治療不応例は15～20%存在する。追加治療には、

IVIG、ステロイド、ウリナスタチン、血漿交換療法などが試みられているが、発症した患者のうち約5%は適切な治療を行っても心後遺症を残す。現在も、病態解明とともにより有効な初期治療、追加治療についての議論がなされている。

川崎病急性期の治療にステロイドを使用すべきかどうかについては未だに議論がある。我々は、以前より、IVIG・ステロイド併用療法の有効性を検討し、臨床データを集積してきた（J Pediatr Pract,

1987;50:1175-1180) (J Pediatr 1999;135:465-469)。そのような背景の中、群馬大学関連 13 病院の協力のもと群馬川崎病研究班を結成し、約 5 年をかけて前方視的多施設共同治療研究を行い、IVIG とステロイドの初期併用投与が、IVIG 単独投与よりも、臨床所見の改善と心後遺症の発生抑制に有効であることを報告した (J Pediatr 2006; 149: 336-341)。

一方、ステロイドには易感染性や白内障、骨粗鬆症、糖尿病などの副反応を生じる可能性がある。また、IVIG とステロイド初期併用療法で治療を受ける患者は入院期間が延長してしまうといったデメリットもある。そのため、全ての症例ではなく IVIG 療法が有効でないと予想される重症川崎病患者に限って IVIG・ステロイド初期併用療法を行う事が出来れば risk/benefit balance に優れた治療を行うことが可能となる。我々は 750 例の患者の臨床データをもとに、IVIG 不応例を予測するリスクスコアを作成した (Circulation 2006;113:2606-2612)。本リスクスコアを使用して初期治療の層別化を行うことが出来るようになれば川崎病患者の予後向上に寄与できると考えられる。

しかしながら川崎病の血管炎に付随しておこるサイトカインストーム、内皮細胞障害マーカー、細胞外マトリックス分解酵素などの biomarker とリスクスコア点数、治療法による差異はいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

IVIG 単独療法と IVIG・ステロイド併用投与、この異なった治療がもたらす病態への影響を明らかにする。MMP は、川崎病急性期の血清中上昇が報告されている顆粒球エラス

ターゼや炎症性サイトカイン (IL-1・, TNF-)により活性化するが、ステロイドは、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生抑制作用を有する。すなわち、ステロイド併用投与により炎症性サイトカインが速やかに減少すると、間接的に MMP の活性化は抑制される可能性がある。治療研究に参加した患者の血清中サイトカイン・ケモカイン濃度、蛋白分解酵素と抑制系の量的均衡を検討する。

治療前血清中サイトカイン・ケモカイン濃度と治療反応性の関連および予測性を明らかにする。川崎病冠動脈後遺症合併例においては、IL-6 や IL-8 といった炎症性サイトカイン濃度が治療前は高く、その後も非合併例に比べ高く推移することが報告されている。治療介入前の検体を用いて、サイトカイン・ケモカイン濃度を測定し、治療反応性との関連を検討することにより、治療前川崎病重症度の予測に結びつくかを検討を行い、我々が報告したリスクスコアとの関連について解析をする。また治療法によるサイトカイン・ケモカイン濃度の推移に違いがあるかを検討する。

3. 研究の方法

対象患者は 2000 年 8 月～2005 年 3 月までの期間に群馬県立小児医療センターにて初期治療を受けた 32 例とした。32 例中 31 例は先行研究である無作為化比較試験で IVIG 群 (18 症例) と IVIG+PSL 群 (13 症例) にランダム割り付けを行われた。残りの 1 症例は家族の希望 IVIG+PSL 群の治療を行った。全症例の代諾者より書面による informed consent を得た。

IVIG 群は免疫グロブリン 1g/kg×2 日間とアスピリン 30mg/kg/day の併用療法とした。IVIG+PSL 群は IVIG 群の治療に加え、病初期よりプレドニゾン 2mg/kg/day を静注で投与、全身状態改善後内服に変更し、CRP 陰性

化後 15 日間かけて漸減中止するプロトコールとした。

対象患者は①初期治療開始前 (Pre) ②IVIG 終了後 24~36 時間 (Post) ③IVIG 終了後 2~3 週 (Conversant) で血液検査を行い一般血算・生化学・血清検査を行った。残血清は速やかに -80°C に血清保存し、保存血清は BioPlex suspension array system を用いて、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、TNF α 、IFN γ 、G-CSF、MCP-1、MIP-1 α を、ELISA 法にて MMP-3、TIMP-1、ICAM-1 を測定した。

IVIG 抵抗例を初期治療開始前に予測するリスクスコアを表 1 に示す。IVIG 投与前までのデータを用いて 7 つの変数の総和をリスクスコア点数として計算した。川崎病診断前に複数回血液検査が施行されている場合、AST、CRP、好中球%は最高値を、Na、血小板数は最低値を代表値とした。スコア点数 5 点以上を IVIG 抵抗例高リスク患者と定義した。

統計学的検討は対応のない連続変数には Mann-Whitney の U 検定を、対応のある連続変数には Wilcoxon の順位和検定を用いた。リスクスコアと各パラメーターとの関連は Spearman の相関分析を行った。検定は全て両側とし、 $P<0.05$ を統計学的に有意とした。

4. 研究成果

<臨床転帰と各パラメーターとの関連>

IVIG 群 18 例中 4 例が治療抵抗例 (全例初期治療不応) であり、そのうち 3 例が冠動脈病変を合併していた。一方、IVIG+PSL 群では 14 例中 2 例が治療抵抗例 (全例再燃) であり、そのうち 1 例が冠動脈病変を合併していた。

治療抵抗例では治療有効例に比べ、IL-6、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、MMP-3、リスクスコア点数が統計学的有意に高値であったが、リスクスコア点数がもっともよく関

連していた (表 2)。

これらの結果から治療抵抗例の予測にリスクスコアがもっとも適していることが示唆された。

<リスクスコアと各パラメーターとの関連>

リスクスコア 5 点以上を高リスク患者、4 点以下を低リスク患者と定義し、2 群間で初期治療開始前の各種パラメーターに差があるか検討を行った。結果高リスク患者では低リスク患者に比べ IL-6、IL-7、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、MMP-3、ICAM-1 が有意に高値であった (表 3)。また、リスクスコア点数と各パラメーターとの相関分析では IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、ICAM-1 とリスクスコア点数が統計学的に有意な関連を認めた (表 4)。

<初期治療別・経時的変化>

上記検討で統計学的有意差があった IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-17、G-CSF、MIP-1 α 、MMP-3、ICAM-1 の初期治療別・経時的変化をそれぞれ解析した。IL-6、IL-10、IL-17、G-CSF、ICAM-1 は IVIG 群、IVIG+PSL 群共に初期治療開始後前値に比べ低下していったが、IL-6、IL-10、G-CSF、ICAM-1 は IVIG 群に比べ IVIG+PSL 群においてより早期に低値となっていた。

一方、MMP-3 は他の Biomarker とは違った特徴的な経過をたどった。Pre の血清中 MMP-3 は IVIG 群に比べ IVIG+PSL 群で低い傾向にあったが (25.1 ± 23.2 vs 18.0 ± 13.3 , $P=0.323$)、Post における血清 MMP-3 濃度は逆に高い傾向となった (19.2 ± 14.0 vs 28.9 ± 20.1 , $P=0.106$)。Pre との前後比を計算すると、Post/Pre (0.91 ± 0.34 vs 1.71 ± 1.02 , $P=0.002$)、Conversant/Pre (0.75 ± 0.50 vs 1.25 ± 0.61 , $P=0.006$) のいずれにおいても IVIG 群に比べ IVIG+PSL 群では有意に高値であった。

MMP-3 の inhibitor である TIMP-1 は MMP-3 とほぼ同様の time course をとったため、MMP・TIMP アンバランスの指標とされる MMP-3/TIMP-1 比はいずれの時点でも統計学的な有意差を認めなかった。

これらの結果からはリスクスコア点数が高いことと、サイトカイン・ケモカイン・内皮細胞障害・細胞外マトリックス分解酵素の血清中濃度亢進に関連があることが示唆された。サイトカイン・ケモカインの産生亢進が川崎病の血管炎成立と重症化に密接な関係があることから、リスクスコアは川崎病血管炎の重症度を反映していることが想定される。また IVIG+PSL 療法は IVIG 療法に比べより早期にサイトカイン・ケモカインの産生を抑制することによって血管炎を鎮静化させ、内皮細胞障害を抑制するといった作用機序があることが推測される。一方 MMP-3 の産生を亢進することによって冠動脈病変の形成を促進してしまう可能性を完全に否定できないため、ステロイドの投与方法や投与時期について詳細な検討を行い、より必要性が高い患者にしぼってステロイド投与を行う治療戦略を今後開発していく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kobayashi T, Inoue Y, Otani T, Morikawa A, Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T, Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Arakawa H. Risk stratification in the decision to include prednisolone with intravenous immunoglobulin in primary therapy for Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2009, in Press. 査読有
2. 小林徹, 小林富男, 荒川浩一. ガンマグロブリン不応例の予測と層別化、小児内科, 41:69-72, 2009、査読無
3. 小林徹, 井上佳也, 森川昭廣. 無効例の予測および層別化、日本臨床, 66 :332-337, 2008、査読無
4. Inoue Y, Kobayashi T, Morikawa A. Treatment of Kawasaki disease. *N Engl J Med*. 2007;356:2746-2747、査読有
5. Kobayashi T, Kimura H (他 5 名、1 番目 7 番目)、Increased CD11b expression on polymorphonuclear leucocytes and cytokine profiles in patients with Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 2007 ;148:112-8、査読有
6. Kobayashi T, Inoue Y, Tamura K, Morikawa A, Kobayashi T. External validation of a scoring system to predict resistance to intravenous immunoglobulin. *J Pediatr*. 2007; 150:e37、査読有

[学会発表] (計 25 件)

1. 小林徹. 免疫グロブリン不応例に対する治療戦略、香川川崎病講演会 2008.11.15. 高松
2. 小林徹. 川崎病に対する新たな治療戦略—RAISE Studyの概略—、第 27 回名古屋大学大学院セミナー、2008.10.31. 名古屋
3. 小林徹. 川崎病初期治療の層別化ステロイド治療、第 6 回栃木川崎病研究会 2008.10.24. 宇都宮
4. 池田健太郎、石井陽一郎、小林富男、小林徹. シクロスポリンが著効したガンマグロブリン、プレドニゾン療法不応の 2 例、第 28 回日本川崎病研究会 2008.10.18、札幌
5. 小林徹、小林富男、岡田恭典、渡邊正之、鈴木尊裕、下山伸哉、池田健太郎、石井陽一郎、荒川浩一. IVIG抵抗例に対する追加治療としてのプレドニゾン投与

- は予後を改善するか、第 29 回日本川崎
病研究会シンポジウム、2008.10.18. 札
幌
6. 小林徹. 川崎病初期治療の層別化とステ
ロイド治療の可能性、埼玉川崎病講演会
2008.9.12、さいたま市
 7. 小林徹. 川崎病初期治療の層別化とステ
ロイド治療の可能性、第 4 回静岡川崎病
研究会、2008.8.9. 静岡
 8. Shimoyama S, Kobayashi T, Inoue Y,
Takeuchi K, Kobayashi T, Okada Y,
Tamura K, Tomomasa T, Otani T, Arakawa
H, Morikawa A. A new scoring system
to predict intravenous immunoglobulin
unresponsiveness in patients with
Kawasaki disease. 14th World Congress
on Heart Disease, The International
Academy of Cardiology Annual
Scientific Sessions 2008. 28 July,
2008. Toronto, Canada,
 9. 小林徹. 川崎病初期治療の層別化とステ
ロイド治療の可能性、第 10 回群馬川崎
病研究会、2008.7.16. 前橋
 10. 小林徹. 川崎病初期治療の層別化とステ
ロイド治療の可能性、第 44 回日本小児
循環器学会学術集会、2008.7.4、郡山
 11. 小林徹. 川崎病とステロイド治療 二水
会学術講演会、2008.6.3、熊谷
 12. Kobayashi T, Inoue Y, Otani T,
Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T,
Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Seki M,
Ikeda K, Ishii Y, Suzuki T, Shimoyama
S, Morikawa A. Risk stratification in
the decision to include prednisolone
with intravenous immunoglobulin in
primary therapy of Kawasaki disease.
Pediatric Academic Society
2008. Honolulu, Hawaii, USA, 4 May,
 - 2008
 13. Seki M, Kobayashi T, Inoue Y, Ayusawa
M, Nakamura T, Kobayashi T, Ikeda K,
Ishii Y, Suzuki T, Shimoyama S,
Morikawa A. External Validation Of A
Risk Score To Predict Intravenous
Immunoglobulin Unresponsiveness In
Patients With Kawasaki Disease,
Pediatric Academic Society 2008,
Honolulu, Hawaii, USA, 4 May, 2008
 14. 小林徹. 川崎病患者における免疫グロブ
リン抵抗例の予測と治療層別化の可能
性、第 111 回日本小児科学会学術集会、
2008.4.27、東京
 15. 小林徹、井上佳也、岡田恭典、小林富男、
田村一志、関満、池田健太郎、石井陽一
郎、荒川浩一、森川昭廣. 川崎病患者の
層別化と免疫グロブリンプレドニゾロ
ン初期併用療法の効果、第 111 回日本小
児科学会学術集会、2008.4.26、東京
 16. Kobayashi T, Kobayashi T, Shinohara M,
Sone K, Ikeda K, Suzuki T, Shimoyama
S, Seki M, Okada Y. Adverse effects
from corticosteroids therapy for acute
phase Kawasaki disease. 9th
International Kawasaki Disease
Symposium. 12 April, 2008. Taipei,
Taiwan.
 17. Suzuki T, Kobayashi T, Inoue Y, Otani
T, Kobayashi T, Takeuchi K, Seki M,
Ikeda K, Ishii Y, Shimoyama S,
Morikawa A. Risk stratification in the
decision to include prednisolone with
intravenous immunoglobulin in primary
therapy of Kawasaki disease. 9th
International Kawasaki Disease
Symposium. 12 April, 2008. Taipei,
Taiwan.

18. Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, Okada Y, Kobayashi T, Tamura K, Tomomasa T, Morikawa A. A simple risk score to predict intravenous immunoglobulin non-responders in patients with Kawasaki disease. 9th International Kawasaki Disease Symposium. 11 April, 2008. Taipei, Taiwan.
19. 小林徹. 免疫グロブリン抵抗例の予測と治療層別化、奈良川崎病講演会 2008. 3. 23、奈良
20. 小林徹. 免疫グロブリン抵抗例の予測と治療層別化、第 5 回信州川崎病フォーラム、2008. 1. 19、松本
21. Kobayashi T, Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, Okada Y, Tamura K, Tomomasa T, Morikawa A. Prediction of intravenous immunoglobulin non-responders in patients with Kawasaki disease. 7th International Congress on Coronary Artery Disease. Venice, Italy, Oct 9, 2007.
22. Ishii Y, Kobayashi T, Inoue Y, Kobayashi T, Okada Y, Takeuchi K, Tamura K, Tomomasa T, Ikeda K, Seki M, Shimoyama S, Suzuki T, Morikawa A. Stratified selection of primary therapy based on a risk score in Kawasaki disease: Benefit of intravenous immunoglobulin and prednisolone. 7th International Congress on Coronary Artery Disease. Venice, Italy. Oct 9, 2007,
23. 小林徹、小林富男、池田健太郎、井上佳也、岡田恭典、渡邊正之、関 満、鈴木尊裕、下山伸哉、石井陽一郎. リスクスコアは免疫グロブリン 2g/kg単回療法に適用可能か?、第 43 回日本小児循環器学会総会・学術集会、2007. 7. 5、東京
24. 小林徹、井上佳也、岡田恭典、友政剛、田村一志、小林富男、篠原真、森川昭廣. リスクスコアを用いた川崎病患者の層別化とステロイド初期投与の有用性、第 110 回日本小児科学会学術集、2007. 4. 22、京都
25. 小林徹、小林富男、池田健太郎、井上佳也、田村一志、岡田恭典、友政剛、森川昭廣. 重症川崎病に対するガンマグロブリンステロイド初期併用療法の効果、第 110 回日本小児科学会、2007. 4. 22、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 浩一 (ARAKAWA HIROKAZU)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50272232

(2) 研究分担者

森川 昭廣 (MORIKAWA AKIHIRO)
群馬大学・名誉教授
研究者番号：40125878

小林 徹 (KOBAYASHI TOHRU)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：50431713