

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08330

研究課題名(和文)川崎病におけるCD69-MyI9システムを介した血管炎進展とその制御

研究課題名(英文)Roles of CD69-MyI9 system for vasculitis in Kawasaki disease

研究代表者

濱田 洋通(Hamada, Hiromichi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10453789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本人小児に多い原因不明の病気、川崎病では心臓冠動脈瘤を合併することが最も重要な後遺症である。川崎病では血小板が活性化されるが、そこから分泌されるMyI9が他の小児熱性疾患に比して有意に上昇しており、MyI9の受容体CD69を持つ炎症細胞が血管内に誘導されていた。さらに川崎病で亡くなった児の心臓組織ではMyI9が血栓や血管壁に発現しており時間経過とともに分布が変化していた。冠動脈炎誘発マウスモデルでは冠動脈組織において先にMyI9が発現しその後炎症細胞浸潤が認められた。これら結果から活性化血小板からMyI9が放出され血管壁に炎症細胞が誘導されることが川崎病血管炎の機序の一部と示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性炎症性疾患の川崎病において、動脈瘤を起こす血管炎症の機序の一部を解明した。川崎病の最大の合併症である冠動脈瘤を予防する特異的な治療の開発につながる成果である。現在の標準治療である血漿分画製剤にかわる治療薬の開発ができれば、子ども達の健康に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In Kawasaki disease (KD), which is a disease of unknown cause that is common in Japanese children, coronary aneurysm is the most important complication. In KD patients, platelets in the blood are activated, and MyI9 derived from them is elevated compared to other febrile diseases, and inflammatory cells carrying the MyI9 receptor CD69 are recruited in the blood. Furthermore, in the heart tissue of a child who died of KD, MyI9 was expressed in blood clots and blood vessel walls, and its location changed with the course of the disease. In mouse model of coronary arteritis, MyI9 was first expressed in the coronary artery tissue, followed by inflammatory cell infiltration. These data suggest a part of the mechanism of vascular inflammation that causes aneurysm.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 血小板 血管炎 小児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

川崎病は未だ原因不明の小児の急性血管炎である。炎症の中心は中動脈で、無治療だと25%に最大の合併症である冠動脈病変(CAL)を遺す。標準治療を行っても現在、8%にCALを遺す。川崎病の原因は単一でなく、感染症、ワクチン、火傷など様々な契機で小児の免疫系が過剰に反応し動脈炎が起これと考えられている。しかし、なぜ炎症の焦点が血管なのか、慢性炎症でなく一峰性経過で自然収束するのか、これらの時間的空間的な問題には答えられていない。

2016年、白血球の活性化マーカーとして知られてきたCD69のリガンドがミオシン軽鎖 α (MyI9)であることがわかり、CD69・MyI9システムが喘息や好酸球性肺炎などの気道炎症に関与していることが報告された。MyI9は血小板に豊富に存在しており、血小板活性化によって血中に多量に放出されることがわかっている。MyI9は血管内で網状構造(MyI9 Nets)を形成する。MyI9 NetsにCD69陽性細胞がトラップされ、局所で増殖し活性化血小板により傷害された内皮細胞間隙から血管壁に侵入する。

川崎病の臨床経過は血小板と関連が深い。急性期は血小板数がダイナミックに変動する。病初期に血小板数がより減少する症例が重症例であることが知られており、重症度スコアには血小板数が入っている。一方、病日2週~4週の回復期にはその数は一過性に急激に増加する。発症数ヶ月間は機能が亢進することも種々の報告から証明されており、標準治療薬アスピリンの内服期間の根拠になっている。

以上の背景から、血小板活性化がCD69-MyI9システムを介して動脈瘤形成に関与するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

川崎病血管炎におけるCD69-MyI9システムに関与を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 川崎病患者の血中MyI9濃度の測定

川崎病患児76名の治療前、初回治療後、退院前後、回復期における血液中MyI9濃度を測定した。小児熱性疾患16名についても測定し比較検討した

2) 川崎病患者血小板からのMyI9放出の検討

川崎病患児9名、健康者5名の血小板含有血漿を抽出し、100 μ Lづつ2つに分けて片方にトロンビン刺激を行い、両者の血漿中MyI9濃度を測定、比較した。刺激なしを分母、刺激有を分子として濃度比を算出した。

3) 川崎病患者末梢血CD69陽性細胞の検討

川崎病患児6名の血液中CD69陽性単球数を治療前と回復期でFACS(蛍光活性セルソーター)により測定した。

4) 川崎病剖検組織におけるMyI9発現の検討

3名の川崎病剖検心臓組織(川崎病罹患14日目、1年後、2年後)と、外傷死した小児の心臓組織を用いて、MyI9の発現を免疫組織染色で検討した。

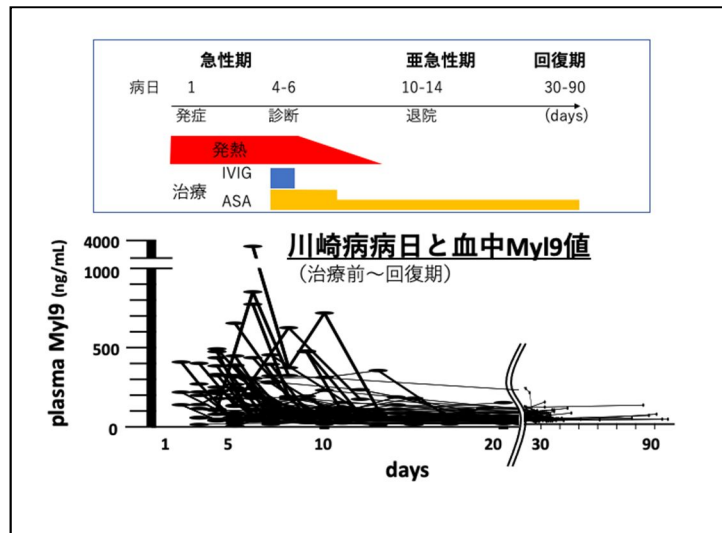
5) 冠動脈炎モデルにおけるMyI9の発現と浸潤炎症細胞の観察

乳酸菌毒素(*Lactobacillus casei*:ATCC 11578, 以後LCWE)腹腔内投与による冠動脈炎誘発モデルにおいて、経時的にMyI9の発現と炎症細胞の浸潤の関係を観察した。

4. 研究成果

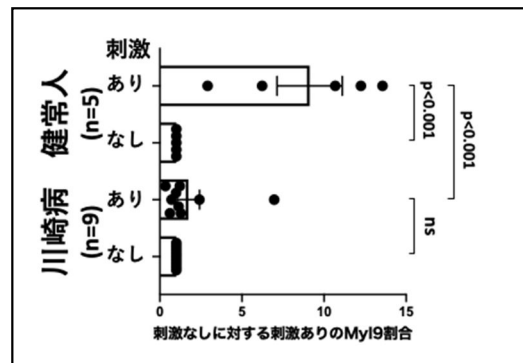
1) 血液中 MyI9 濃度を測定では、川崎病で血液中 MyI9 濃度は急性期に著しく高く、回復期に低下した(右)。

急性期の濃度は他の熱性疾患小児に比して有意に高値であった($p=0.016$)。また、初回治療前後で治療反応症例(responders)は MyI9 濃度が有意に低下していたが($p<0.001$)、治療不応例(non-responders)では同等であった(有意差なし)。冠動脈瘤の有無と血液中 MyI9 濃度に有意な差を認めなかった。



2) 川崎病患者および健康者の血小板含有血漿を抽出し、トロンピン刺激を行い、刺激のあり・なしで血漿中 MyI9 濃度を測定、比較した実験を下に示す。

健康者コントロールではトロンピン刺激によって血小板から放出される MyI9 は約 10 倍に増加するが、川崎病急性期の患児では刺激してもほとんど増加しなかった(右)。つまり、川崎病では血小板がトロンピン刺激したと同様に活性化されたか、すでに MyI9 を放出しきっていることが示唆された。



3) 川崎病患者および健康小児の血液中 CD69

陽性単球数を治療前と回復期で FACS (蛍光活性セルソーター) により測定した。

健康小児では血液中 CD69 陽性単球は少なかったが($3.34\% \pm 0.35\%$; 平均 \pm 標準誤差)、川崎病急性期では、CD69 陽性の割合は有意に多く ($10.53\% \pm 2.34\%$)、回復期には減少した($4.42\% \pm 0.87\%$)。

4) 3名の川崎病剖検心臓組織(川崎病罹患 14 日目、1 年後、2 年後)と、外傷死した小児の心臓組織をコントロールとして、MyI9 の発現を免疫組織染色で検討した。

Elastica Van Gieson 染色で、3 症例で弾性板構造が不明瞭で血管構造の破壊を認め、瘤内には血栓を認めた。急性期症例では主に血栓内に、遠隔期症例では血管壁に MyI9 の発現を認めた。

急性期の強拡大では血栓は血小板が多く存在する白色血栓と、赤血球が多く存在する赤色血栓とにわけられ、MyI9 は白色血栓に一致し強く発現していた。また、白色血栓周囲および血管壁にかけて有核細胞を多数認めた。蛍光免疫染色では、冠動脈瘤血管壁で、MyI9 の発現は非常に弱く、平滑筋における染色も不均一だった。

遠隔期症例の強拡大では血栓の一部、血管壁に MyI9 の発現を認めたが、HE 染色では有核細胞は乏しく、炎症は収束しているものと考えられた。蛍光免疫染色では、MyI9 は平滑筋

が染色されている部分に加えて、局所的に強く染色されている箇所も認められた。急性期症例の所見と合わせると、MyI9 は急性期炎症誘導に作用し、炎症収束後に破壊された血管壁に、結果として留まった可能性が示唆された。

5) 冠動脈炎モデルにおける MyI9 の発現と浸潤炎症細胞の観察

心血管病変における MyI9 発現を評価するために、冠動脈炎の LCWE 誘発マウスモデルを使用した。このモデルでは生後 5 週のオスの野生型 (WT) マウスに LCWE を腹腔内注射し、心臓組織を収集して LCWE 注射の 14 日後まで、経時的に検討した。コントロール マウスと比較して、LCWE 注射は冠動脈の周りに大規模な炎症細胞浸潤をもたらした。冠動脈の炎症の広がり判断するために、最も近位の部分から最も遠位の部分まで冠動脈にまたがる 5 つの連続した組織切片を準備した。炎症は冠動脈の遠位側よりも近位側でより顕著だった。心臓組織切片の免疫組織化学染色により、LCWE 注射後に冠動脈に浸潤する多くの炎症細胞が CD69 を発現していた。さらに、血管平滑筋細胞 (VSMC) に存在する収縮性タンパク質である α -平滑筋細胞アクチン (α -SMA) の強度は、LCWE 投与の 14 日後に炎症を起こした冠動脈で有意に減少した。次に、MyI9 の発現を調べた。興味深いことに、MyI9 の発現はコントロールと LCWE を注入したマウスの両方で冠動脈で検出されたが発現パターンはまったく異なっていた。LCWE を注入したマウスでは、MyI9 は大規模な細胞浸潤が観察される炎症を起こした冠動脈の周囲に広く広がっていた。一方、健康なコントロール マウスでは、MyI9 の発現は冠動脈壁の α -SMA の発現パターンと完全に重複していた。定量分析により、冠動脈周囲領域における MyI9 発現強度は、コントロールマウスよりも LCWE 注入マウスで有意に高かった。また、MyI9 の発現が先でその後に炎症細胞の浸潤が見られた。

(考察)

研究結果から川崎病血管炎の炎症誘導に CD69-MyI9 システムが関与していることを始めて示した。血漿 MyI9 値は川崎病の病勢を反映したこと、血漿 MyI9 値は川崎病に比較的特異的で、鑑別を要する小児熱性疾患では上昇が軽度であったことから、川崎病の鑑別診断に有用な検査となる可能性がある。また、川崎病急性期患者の血小板は性質が変化し、血中に MyI9 を放出している可能性があった。加えて、既報と同様、川崎病の患者血液中の CD69 陽性単球は増加しており回復期に健常者と同様に低下していた。これらの結果は川崎病において活性化血小板から MyI9 が放出され、CD69 陽性細胞を集積している間接的証拠となると考えている。

川崎病の心臓組織の検討では、まず、動脈の中膜 (平滑筋層) に MyI9 は定常的に発現していることがわかった。川崎病急性期においては血栓にその発現が著しく強く、その他に血管内膜と外膜側に MyI9 の発現が見られた。平滑筋由来の MyI9 が血管構造破壊に伴って流出したのか、血小板由来の MyI9 が病態により関与しているのか、断定はできなかった。しかし、血栓における MyI9 の発現は非常に強く、発症 1 年、2 年の組織では血管壁における発現がメインだった。このことから血小板由来の MyI9 が炎症細胞を誘導し血管壁にむけて細胞浸潤が起こっている可能性を考えている。

乳酸菌毒素 (*Lactobacillus casei* :ATCC 11578) 投与によるマウス冠動脈瘤モデルにおいて、MyI9 の発現が先でその後炎症細胞の浸潤が見られた。マウス冠動脈瘤モデルは、ヒト川崎病とその成因が一致しているとは言えないが、血管炎組織における CD69-MyI9 システムの直接関与を裏付けるために重要な実験と考えている。

血液中 MyI9 値による川崎病の診断や治療判定、特に冠動脈瘤の合併予測が可能かは、診療の上で重要なポイントになる。さらなる検討は意義があると考える。

【付記】

この研究は千葉大学研究倫理委員会の承諾を得て行った。研究者の企業等との利益相反はない。研究の内容は下記論文において公表した。特に結果 3,4,5 については論文の図を参照されたい。

Kobayashi H, Kimura MY, Hasegawa I, Suganuma E, Ikehara Y, Azuma K, Ito T, Ebata R, Kurashima Y, Kawasaki Y, Shiko Y, Saito N, Iwase H, Lee Y, Noval Rivas M, Arditi M, Zuka M, Hamada H, Nakayama T. Increased Myosin light chain 9 expression during Kawasaki disease vasculitis. *Front Immunol* 2023; 13:1036672.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Johnson TA, Hamada H, Onouchi Y, et al	4. 巻 66
2. 論文標題 Association of anIGHV3-66 gene variant with Kawasaki disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 475 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00864-z	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 該当する

1. 著者名 Fukazawa R, Hamada H, Kimura T, et al	4. 巻 84
2. 論文標題 JCS/JSCS 2020 Guideline on Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1348 ~ 1407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-1094	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 Suzuki Junko, Abe Kota, Matsui Takuya, Honda Takafumi, Yasukawa Kumi, Takanashi Jun-ichi, Hamada Hiromichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Kawasaki Disease Shock Syndrome in Japan and Comparison With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in European countries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 9:625456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2021.625456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Yu, Matsui Takuya, Abe Kota, Honda Takafumi, Yasukawa Kumi, Takanashi Jun-ichi, Hamada Hiromichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Aspirin Dose and Treatment Outcomes in Kawasaki Disease: A Historical Control Study in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 8:249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2020.00249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ae Ryusuke、Shibata Yoshihide、Kosami Koki、Nakamura Yosikazu、Hamada Hiromichi	4. 巻 239
2. 論文標題 Kawasaki Disease and Pediatric Infectious Diseases During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pediatrics	6. 最初と最後の頁 50 ~ 58.e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpeds.2021.07.053	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 Takasago Satoshi、Sakai Aiko、Sugiyama Masaya、Mizokami Masashi、Hamada Hiromichi、Ishizaka Yukihito、Miyoshi-Akiyama Tohru、Matsunaga Akihiro、Ueno Mikako、Shichino Hiroyuki、Mizukami Ayumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Case Report: Changes in Cytokine Kinetics During the Course of Disease in a Japanese Patient With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 702318-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2021.702318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Hironobu、Kimura Motoko Y.、Hasegawa Ichita、Suganuma Eisuke、Ikehara Yuzuru、Azuma Kazuhiko、Ito Toshihiro、Ebata Ryota、Kurashima Yosuke、Kawasaki Yohei、Shiko Yuki、Saito Naoki、Iwase Hiroto、Lee Youngho、Noval Rivas Magali、Arditi Moshe、Zuka Masahiko、Hamada Hiromichi、Nakayama Toshinori	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased Myosin light chain 9 expression during Kawasaki disease vasculitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1036672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1036672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥主健太郎、小林弘信
2. 発表標題 血漿My19測定は川崎病の診断に有用である
3. 学会等名 第59回日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔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	小林 弘信 (Kobayashi Hironobu) (50729019)	千葉大学・医学部附属病院・医員 (12501)	

	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 協力者	中山 俊憲 (Nakayama Toshinori)	千葉大学・学長	
研究 協力者	木村 元子 (Kimura Motoko)	千葉大学・大学院医学研究院実験免疫学・教授	
研究 協力者	池原 譲 (Ikehara Yuzuru)	千葉大学・大学院医学研究院腫瘍病理学・教授	
研究 協力者	岩瀬 博太郎 (Iwase Hirotaro)	千葉大学・大学院医学研究院法医学・教授	
研究 協力者	尾内 善広 (Onouchi Yoshihiro)	千葉大学・大学院医学研究院公衆衛生学・教授	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	奥主 健太郎 (Okunushi Kentaro)	千葉大学・医学部附属病院小児科・助教	

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