

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790757

研究課題名（和文） 急性期川崎病患者における Toll-Like Receptor シグナル伝達の解析

研究課題名（英文） Analysis of Toll-like receptor signal transduction in acute Kawasaki disease.

## 研究代表者

小林 徹 (KOBAYASHI TOHRU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50431713

研究成果の概要（和文）：急性期川崎病患者の Toll-like receptor シグナル伝達分子の遺伝子発現量を検討した。川崎病患者においては CD14・IRF7・CREB3・IL1RL1 の発現が亢進しており、TLR6・TICAM2・UBE2N・TLR9・LBP の発現は逆に低下していた。

研究成果の概要（英文）：We examined gene expressions of Toll-like receptor signal transduction in acute phase of Kawasaki disease. In Kawasaki disease, gene expression of CD14, IRF7, CREB3, and IL1RL1 was stimulated. On the other hands, gene expression of TLR6, TICAM2, UBE2N, TLR9, LBP was repressed.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児循環器学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科

キーワード：川崎病、Toll-like receptor、遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

川崎病は小児科医の川崎富作先生が1967年に初めて報告した小児期に好発する血管炎症候群で、現在先進国において後天性心疾患の最大の原因である。川崎病に対する新たな治療戦略の開発や病態解明、原因究明は急務の課題である。過去に様々な病因説が唱えられてきたが、EBウイルスやブドウ球菌を除く多くの候補は川崎病の一部の患者から分離されたにすぎないこと、またいずれの候補も他の研究者による再現性が確認されていないことは、単一の感染症から川崎病が発生する仮説

の限界を如実に示している。

近年自然免疫応答を誘導する重要な分子として Toll-Like Receptor (TLR) が注目されている。TLRは外界から生体内に異物が侵入してきた際、免疫担当細胞が最初に抗原を認識する際に必須の受容体であり、2005年に Lehmanらがノックアウトマウスを用いた川崎病類似血管炎モデルにおいて、TLR 2と MyD88 が血管炎成立に必須であることを報告した。多種多様な病原体がいずれも川崎病発症に関与すると仮定すれば、もともと患者側に存在している TLR の反応性の異常により、多種多様の病原体によって血管炎が惹起されるとい

た説を十分説明することが可能である。そこで今回我々は「川崎病は多種多様の病原体への感染を契機に、Toll-Like Receptorの機能的異常によって血管炎が成立する」といった仮説を立てた。仮説を証明するため急性期川崎病患者単核球からmRNAを抽出し、TLRのシグナル伝達を網羅的に解析することによって、川崎病発症につながる病因、病態について検討を行う。

## 2. 研究の目的

TLRのシグナル伝達を網羅的に解析することによって、川崎病発症につながる病因、病態について検討を行うこと。

## 3. 研究の方法

急性期川崎病患者全血より単球をMACSを用いて分離し保存する。Taq Man Assayを用いて単球のmRNAを抽出後、mRNAをcRNAに合成する。得られたcRNAをHuman TOLL-LIKE RECEPTORS PATHWAYを用いてToll-like receptorシグナル伝達に関連する分子の発現を解析する。今回解析するのは以下の分子である。

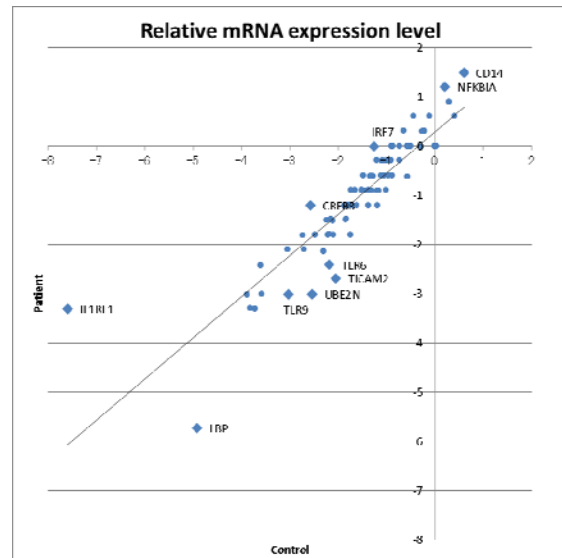
HPRT1、GUSB、TLR4、NFKBIA、TLR3、PIK3CA、TLR7、CD14、RELA、TLR9、JUN、MYD88、MAPK14、NFKB2、TLR2、NFKB1、MAPK8、TLR1、TLR5、TLR6、IRF7、PIK3CB、PIK3CD、TLR8、RELB、IRF3、IRAK4、IRAK1、MAPK9、CREB1、RAC1、IRAK2、MAP3K7、IKBKE、CHUK、TBK1、PIK3R1、IRAK3、MAP2K6、MAPK12、RIPK2、NFKBIB、MAPK11、RIPK1、MAP2K3、NFKBIE、TICAM1、MAP3K3、TANK、TOLLIP、MAP2K7、PIK3C2A、IKBKB、RELLBP、IKBKG、ATF2、TIRAP、SIGIRR、IL1RL1、BTK、MAPK10、PIK3C2B、TRAF6、PIK3R2、RIPK3、MAPK13、PIK3R3、PIK3C3、LY96、PIK3C2G、PIK3R4、MAP3K7IP1、UBE2N、RNF216、PIK3R5、CREB3L4、CREB3、TLR11、ATF4、UBE2V1、ECSIT、TICAM2、TLR13、MAP3K7IP2、TLR12、TLR10、BTK、IRF7、LY96、IRF3、CD14、LBP

正常成人の全血より単球を分離し、同様に

Toll-like receptorシグナル伝達に関連する分子の発現を網羅的に解析、川崎病患者と比較検討する。

## 4. 研究成果

川崎病患者と正常コントロールとの遺伝子発現量の比を下図に示す。



川崎病患者においてはCD14、IRF7、CREB3、IL1RL1の発現が亢進していることがわかる。一方、TLR6、TICAM2、UBE2N、TLR9、LBPの発現は逆に低下していた。

今回家族の同意を得て収集できたサンプルは少数であったため、今後症例数を増やしさらなる検索を進める。

## 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6件)

1. Seki M, Kobayashi T, Kobayashi T, Morikawa A, Otani T, Takeuchi K, Ayusawa M, Tsuchiya K, Yasuda K, Suzuki T, Shimoyama S, Ikeda K, Ishii Y, Arakawa H. External Validation of a Risk Score to Predict Intravenous Immunoglobulin Resistance in Patients With Kawasaki Disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:145-7. 査読有
2. Fuse S, Kobayashi T, Arakaki Y, Ogawa S, Katoh H, Sakamoto N, Hamaoka, Saji

- T. Standard method for ultrasound imaging of coronary artery in children. *Pediatr Int*, 2010;52:876-882. 査読有
3. 小林徹、佐地勉 【フローチャートでみる私の処方】 循環器疾患の処方 川崎病(心合併症を含む) 小児科臨床 2010; 63(4):618-622. 査読無
  4. 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;28:498-502. 査読有
  5. 小林徹、市田路子、鈴木啓之、佐地勉 川崎病急性期治療の最前線—冠動脈瘤を作らない治療オプション— *Parma Medica*, 2009;27(3):167-175. 査読無
  6. 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 2009;41(1):69-72. 査読無
- [学会発表] (計 18 件)
1. 小林徹 ゼロから始まった RCT —川崎病: RAISE Study での工夫— 第 37 回小児臨床薬理学会 Plenary Lecture 2010. 11. 2. 東京
  2. 小林徹、小林富男、荒川浩一 IVIG 不応予測モデル —群馬のリスクスコア— 第 30 回日本川崎病学会シンポジウム 2010. 10. 11. 京都
  3. 小林徹、小川俊一、濱岡建城、市田路子、阿部淳、鮎沢衛、三浦大、加藤太一、佐地勉 重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用療法の有用性を検討する RAISE Study 第 46 回日本小児循環器学会総会学術集会 2010. 7. 8. 舞浜
  4. 小林徹 免疫グロブリン・プレドニゾロン併用療法 第 113 回日本小児科学会学術集会 分野別シンポジウム 2010. 4. 24. 盛岡
  5. 小林徹 患者背景・一般的な血液検査所見からの免疫グロブリン不応例の予測 第 113 回日本小児科学会学術集会 分野別シンポジウム 2010. 4. 24. 盛岡
  6. Tohru Kobayashi, Tsutomu Saji. Corticosteroid and Infliximab: Novel Therapies for Severe Kawasaki Disease 第 74 回日本循環器病学会 Meet the Experts 2010. 3. 6. 京都
  7. 小林徹、阿部淳、尾内善広、小川俊一、深澤隆治、原寿郎、池田和幸、荒川浩一、佐地勉. 川崎病遺伝コンソーシアムの設立にむけて. 第 29 回日本川崎病学会. 2009. 10. 18. 名古屋
  8. 小林徹、佐地勉、菌部友良、森川昭廣、濱岡建城、原寿郎、小川俊一、市田路子、阿部淳、野村裕一、三浦大、井上佳也、荒川浩一. 重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用療法の有用性を検討する RAISE Study—研究デザインと進捗状況— 第 29 回日本川崎病学会. 2009. 10. 17. 名古屋
  9. Tohru Kobayashi, Tomio Kobayashi, Akihiro Morikawa, Tsutsuya Otani, Mitsuru Seki, Keiji Tsuchiya, Tomohiro Takeda, Hirokazu Arakawa. External validation of a risk score to predict intravenous immunoglobulin resistance in patients with Kawasaki disease. 5th World congress of pediatric cardiology and cardiac surgery. Cairns, Australia, June 23 2009
  10. 小林徹、佐地勉、森川昭廣、市田路子、

- 小川俊一、野村裕一、三浦大、荒川浩一。  
小児大規模臨床試験実施に当たっての  
課題—RAISE Study での準備を通して—  
第 112 回日本小児科学会学術集会。  
2009. 4. 19. 奈良
11. 小林徹、佐地勉、森川昭廣、小川俊一、  
市田路子、野村裕一、三浦大、荒川浩一  
川崎病に対する新規治療法を開発する  
ための多施設共同無作為化比較試験  
(RAISE Study) 第 35 回日本小児臨床  
薬理学会 2008 年 12 月 6 日 東京
  12. Shinya Shimoyama, Tohru Kobayashi,  
Yoshinari Inoue, Kazuo Takeuchi,  
Tomio Kobayashi, Yasunori Okada,  
Kazushi Tamura, Takeshi Tomomasa,  
Tetuya Otani, Hirokazu Arakawa and  
Akihiro Morikawa. A new scoring  
system to predict intravenous  
immunoglobulin unresponsiveness in  
patients with Kawasaki disease. 14<sup>th</sup>  
World Congress on Heart Disease, The  
International Academy of Cardiology  
Annual Scientific Sessions 2008  
Toronto, Canada, 28 July, 2008.
  13. Tohru Kobayashi, Yoshinari Inoue,  
Tetsuya Otani, Tomio Kobayashi, Kazuo  
Takeuchi, Tsutomu Saji, Tomoyoshi  
Sonobe, Shunichi Ogawa, Masaru Miura,  
Mitsuru Seki, Kentaro Ikeda, Yoichiro  
Ishii, Takahiro Suzuki, Shinya  
Shimoyama, Akihiro Morikawa. 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
  14. Mitsuru Seki, Tohru Kobayashi,  
Yoshinari Inoue, Mamoru Ayusawa,  
Takahiro Nakamura, Tomio Kobayashi,  
Kentaro Ikeda, Yoichiro Ishii,  
Takahiro Suzuki, Shinya Shimoyama and  
Akihiro Morikawa. 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
  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・プレドニゾン  
初期併用療法の効果 第 111 回日本小  
児科学会総会・学術集会 2008 年 4 月  
26 日、東京
  16. Tomio Kobayashi, Tohru Kobayashi,  
Makoto Shinohara, Katsuhiko Sone,  
Kentaro Ikeda, Takahiro Suzuki,  
Shinya Shimoyama, Mitsuru Seki,  
Yasunori Okada. Adverse effects from  
corticosteroids therapy for acute  
phase Kawasaki disease. 9<sup>th</sup>  
International Kawasaki Disease  
Symposium. Taipei, Taiwan, 12 April,  
2008.
  17. Takahiro Suzuki, Tohru Kobayashi,  
Yoshinari Inoue, Tetsuya Otani, Tomio  
Kobayashi, Kazuo Takeuchi, Mitsuru  
Seki, Kentaro Ikeda, Yoichiro Ishii,  
Shinya Shimoyama, Morikawa Akihiro.  
Risk stratification in the decision to  
include prednisolone with intravenous  
immunoglobulin in primary therapy of  
Kawasaki disease. 9<sup>th</sup> International  
Kawasaki Disease Symposium. Taipei,  
Taiwan, 12 April, 2008.

18. Tohru Kobayashi, Yoshinari Inoue, Kazuo Takeuchi, Yasunori Okada, Tomio Kobayashi, Kazushi Tamura, Takeshi Tomomasa, and Akihiro Morikawa. A simple risk score to predict intravenous immunoglobulin non-responders in patients with Kawasaki disease. 9<sup>th</sup> International Kawasaki Disease Symposium. Taipei, Taiwan, 11 April, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 徹 (KOBAYASHI TOHRU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50431713