

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591397

研究課題名（和文）川崎病の効果的治療法の開発と病因究明：分子遺伝学的基盤とプロテオーム解析

研究課題名（英文）Development and the etiology investigation of the effective cure of the Kawasaki disease: Molecular genetic base and proteome analysis

研究代表者

石井 正浩 (ISHII MASAHIRO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90222950

研究成果の概要（和文）：難治性川崎病に対する初期治療として免疫グロブリン療法とステロイドパルス療法の併用が臨床的に効果的であることが無作為前方視的比較試験により証明された。同時に、この効果的治療法のメカニズムを分子遺伝学的手法により検証した。また、難治性川崎病の層別化スコアの有効性が分子遺伝学的研究で検証された。治療開始が遅れた例に対する治療法の開発を行った。病因に関しては何らかのウイルス感染が関わっている事が示唆され、継続的に研究中である。

研究成果の概要（英文）：It was proved that combination of immunoglobulin therapy and steroid pulse therapy was clinically effective as primary care for the intractable Kawasaki disease by a randomness prospective competitive examination. I inspected the mechanism of this effective cure by molecular genetic technique at the same time. In addition, the effectiveness of the stratification score of the intractable Kawasaki disease was inspected in a molecular genetic study. I developed the cure for the example which start of therapy was late for. It is suggested that some kind of viral infection affects it about the etiology and is studying it continuously.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：小児循環器学

1. 研究開始当初の背景

川崎病は、我が国で最初に報告された乳幼児の熱性・発疹性の疾患であるが、全身の中小動脈の血管炎であり、約3%に冠動脈瘤を形成する。川崎病児の約4%が虚血性心疾患へ進展する。難治性川崎病の効果的治療法の開

発として、予測スコアによる患児の層別化における遺伝子発現の相違を解析し分子遺伝学的基盤に基づく患児の背景を解析する。予測スコアで重症と規定した川崎病患児に対して、ステロイドおよび免疫グロブリン治療もしくは単独免疫グロブリン治療または免

疫グロブリン治療と抗サイトカイン療法を組み合わせを行い治療前後の遺伝子発現の相違より効果判定しより効果的治療法を開発する。咽頭細菌層をプロテオミクス解析することにより原因細菌およびそれらが産生する毒素を同定する。

2. 研究の目的

DNA マイクロアレイ法を用いて、患児の遺伝子発現の背景と冠血管炎の予後および合併症の関連を検討する。また、現在行っている重症度スコアを用いた治療法の無作為選択の効果の検討（免疫グロブリン、副腎皮質ホルモン、および抗サイトカイン薬）と遺伝子発現の変化をDNA マイクロアレイ法により検討する。また、それぞれの治療の組み合わせによる遺伝子発現の差によりより良い治療の組み合わせを検討する。つまり、最強で最良の免疫グロブリンを中心とした治療レジメを開発する。川崎病児の咽頭細菌叢のタンパクをプロテオミクス解析を用いて網羅的に解析する。病原細菌の膜タンパクならびに産生毒素タンパク質を蛍光標識二次元ディフュージョン電気泳動法およびiTRAQ(Isotope Tag for Relative andによる定量プロテオーム解析により同定する。

3. 研究の方法

(1) 患者の層別化および治療法に関する研究を主体に行う。川崎病急性期の患者を対象とする。我々の臨床データによる申請者らが作成した免疫グロブリン治療効果の予測スコアである久留米スコア (J Pediatr 2006;149:237-240) にて、重症と認められた川崎病患者 40 例および軽症川崎病患者 40 例を対象とする。

(2) 同様に川崎病急性期例 80 例の遺伝子の発現を解析し効果的治療法を開発する。冠動脈瘤を発症した 40 例と後遺症を生じなかった 40 例を対象とする。冠動脈障害を生じた患者の治療前後の遺伝子発現と後遺症を生じなかった川崎病患者の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法を用いて解析しその違いを確認する。発現が異なった遺伝子をリアルタイム PCR を用いて同定する。心血管後遺症の発現をエンドポイントとし、分子遺伝学的解析により効果を判定し心血管後遺症を以下に発生しないかという効果的治療法を開発する。

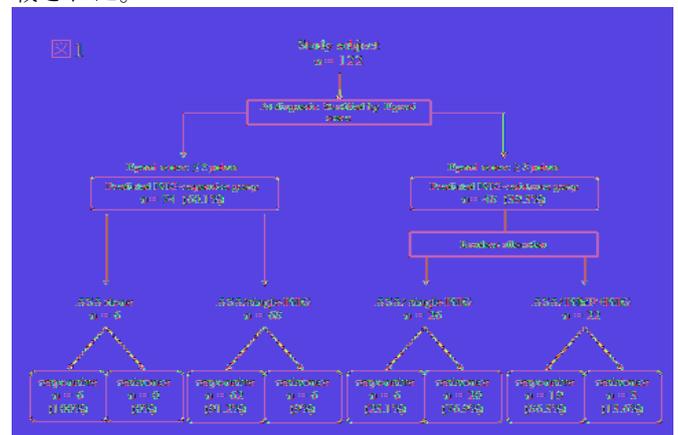
4. 研究成果

①難治性川崎病に対する効果的治療法
川崎病は、自己完結型の疾患であるため、重症度の層別化を行い難治性川崎病を識別し、それぞれの患者の重症度に適した治療を行う必要がある。我々は 256 人の川崎病児を用

いて重症度の層別化スコア江上スコアを作成した (J Pediatr 2006)。

Egami score 1 点, 診断病日 4 日以内, 年齢 6 ヶ月未満, 血小板数 30 万以下, CRP 8mg/dl 以上, 2 点, ALT 80IU 以上 とし 3 点以上を特異度 78% 鋭敏度 76% で難治性川崎病と予測した。Egami score を用いて難治性川崎病と診断した患者を初期治療として免疫グロブリン療法を単独におこなった群とステロイドパルス療法を併用した群にて無作為前方視的比較試験を行った。治療効果は治療終了後 36 時間の時点での解熱とした。結果は図 1 に示すようにステロイドパルス療法併用群で治療効果が有意差を持って優れていた。また、冠動脈における影響はステロイドパルス療法併用群で有意差を持って少なかった (図 2)。この結果は 2012 年の Pediatrics 誌に掲載された。

診断が遅延した症例に対する治療法の開発
米国心臓病学会の川崎病に関するガイドラインでは第 9 病日以内に治療を開始することが望ましいと推奨されている。現実には、11 病日を過ぎて初診となる患者も存在する。それらの患者について第 20 回川崎病の全国調査にて得られた 23337 名を対象に検討した。初回免疫グロブリン治療が 11 病日から 20 病日に行われた 164 例に二次調査を行った (図 3)。治療開始が遅い群では不全型川崎病が有意差を持って多かった (表 1)。治療前後において炎症反応の改善は同等であった (表 2)。1 病日以降に開始の IVIG は、持続する炎症の改善には 9 病日以内に開始された例と同様に有効であったが、当然のことながら冠動脈障害の予防には不十分であった (表 4)。そのため、川崎病が強く疑われる症例では、できるだけ早期に IVIG を開始すべきと考えられた。この結果は 2012 年の Pediatrics 誌に掲載された。



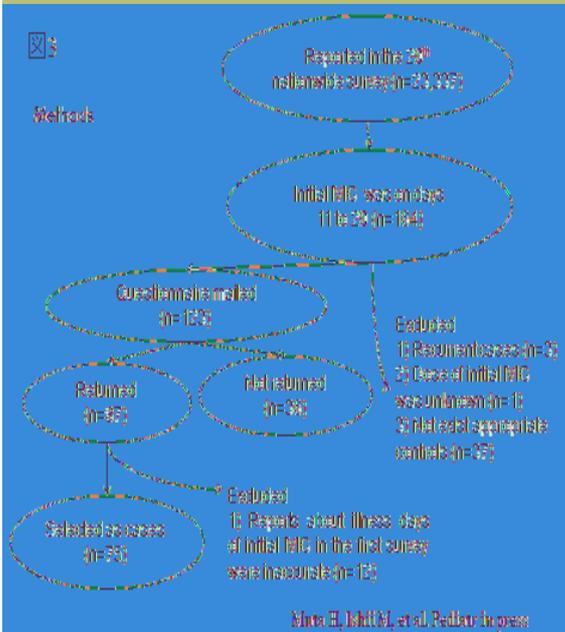
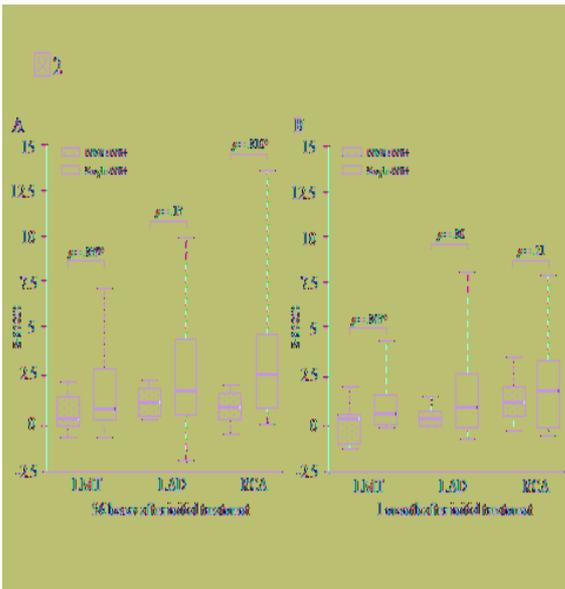


表1 Characteristics of studied patients

	Late	Conventional	p
Sex (M/F)	1:0	1:0	Matched
Age (m)	12 (2-25)	13 (3-37)	.7
Incomplete cases	51%	17%	<.001
Day of first hospital visit (d)	7 (2-20)	4 (1-7)	<.001
Illness day of initial IVIG (d)	13 (11-20)	5 (4-8)	<.001
Total dose of initial IVIG (mg/kg/day)	2,000 (1,000-2,045)	2,000 (1,000-2,045)	1.0

表2 Fractional changes of laboratory parameters

	Late	Conventional	p
WBC	-0.31 ± 0.23	-0.40 ± 0.30	.07
% neutrophil	-0.37 ± 0.37	0.41 ± 0.22	.4
Hb	0.01 ± 0.03	-0.02 ± 0.07	.06
Ht	-0.007 ± 0.24	0.20 ± 0.43	.001
ALP	0.09 ± 0.70	-0.06 ± 0.51	.2
T-Bil	-0.03 ± 0.54	-0.57 ± 0.20	<.001
Alb	-0.05 ± 0.11	-0.12 ± 0.09	<.001
Na	0.0009 ± 0.02	0.02 ± 0.02	<.001
CRP	-0.50 ± 0.43	-0.53 ± 0.23	.7

表3 Coronary artery outcomes

	Late	Conventional	p
Coronary findings			
Positive initial IVIG	49%	3%	<.001
After initial IVIG (4- within 1 day)	49%	13%	<.001
>1 day	27%	1%	<.001
Coronary findings who died in disease period (C&L before IVIG)			
After initial IVIG (4- within 1 day)	5%	5%	1.0
>1 day	5%	1%	.3

表4

免疫グロブリン単剤で抑制したmRNAのカテゴリー	p	メチルpredニソバルスで抑制したmRNAのカテゴリー	p
Positive regulation of I-κB kinase/ NF-κB cascade	<0.001	Apoptosis	<0.001
Immune response	<0.001	Inositol phosphate phosphorylation	<0.001
Regulation of I-κB kinase/ NF-κB cascade	<0.001	Ubiquitin cycle	<0.001
Response to post, pathogen or parasite	<0.001	Protein amino acid phosphorylation	<0.001
Apoptosis	<0.001	Glutathione metabolism	<0.001
Costimulatory in immune response		Costimulatory in immune response	
Positive regulation of cytokine production	<0.001	B cell activation	<0.001
Neutrophil activation	<0.001	B cell differentiation	0.0017
Positive regulation of TNF α signaling	<0.001	Natural killer cell differentiation	0.0029
Regulation of cytokine production	0.0012	Positive regulation of activated T cell proliferation	0.028
Positive regulation of IL1β secretion	0.0012	Cytotoxic T cell degranulation	0.044

p-value: calculation by Fisher's exact test

Ogata S, Ishii M, et al. Pediatr Res 2009

②効果的治療法の分子遺伝学的基盤に関する研究

マイクロアレイを用いて、重症度の層別化スコアである Egami スコアの分子遺伝学的基盤を検証した。その結果、臨床的層別化スコアの重症度と RNA 発現には、良好な関係が認められた (図 4)。免疫グロブリン療法とステロイドパルス療法を併用した群で 5249 個の RNA が抑制され、免疫グロブリン療法単独群では 254 個の RNA の抑制であった (図 5)。有意差を持ってステロイドパルス療法併用群で多くの RNA の抑制が認められた。抑制された遺伝子を表 3 に示す。炎症に関連が深い遺伝子が多く抑制されている。免疫グロブリン不応予測群の炎症機序には、好中球・単球系のみではなく、T/B 細胞、NK 細胞の関連が強いと示唆された。免疫グロブリンは、好中球・単球活性を抑制する一方で、メチルプレドニンは T/B 細胞、NK 細胞を含む、広範囲な免疫細胞を抑制した。この結果は 2009 年の Pediatric Research 誌に掲載された。

図4

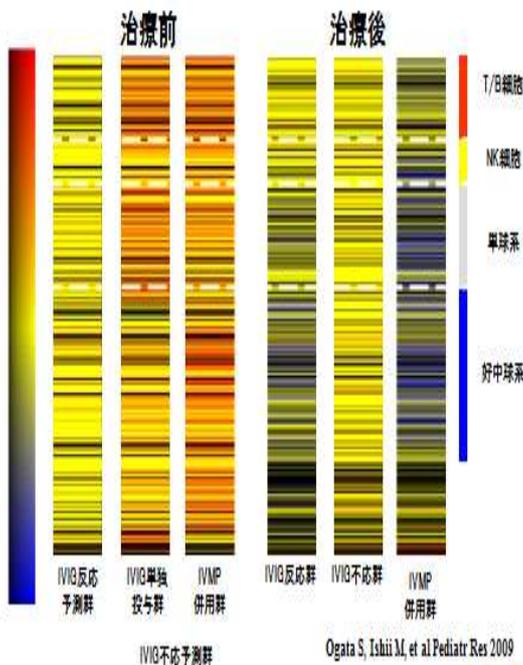
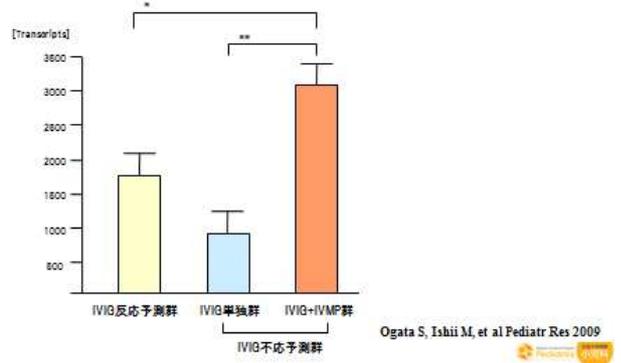


図5



考察

- 免疫グロブリン不応予測群の炎症機序には、好中球・単球系のみではなく、T/B細胞、NK細胞の関連が強いと示唆された
- 免疫グロブリンは、好中球・単球活性を抑制する一方で、メチルプレドニンはT/B細胞、NK細胞を含む、広範囲な免疫細胞を抑制した

③病因に関する研究

咽頭ぬぐい液のプロテオーム解析により、15例中2例で特異なウイルスが同定できた。しかし、このウイルスの病原性が明確でなく多くの幼児が罹るウイルス感染症の物と一致したため現在、継続的に検討している。難治性川崎病に対する初期治療として免疫グロブリン療法とステロイドパルス療法の併用が臨床的に効果的であることが無作為前方視的比較試験により証明された。同時に、この効果的治療法のメカニズムを分子遺伝学的手法により検証した。また、難治性川崎病の層別化スコアの有効性が分子遺伝学的研究で検証された。治療開始が遅れた例に対する治療法の開発を行った。病因に関しては何らかのウイルス感染が関わっている事が示唆され、継続的に研究中である。

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 16 件)

- ① Muta H, Ishii M, Yashiro M, Uehara R, Nakamura Y. Late intravenous immunoglobulin treatment in patients with Kawasaki disease *Pediatr* 2012;129:e291-e297
- ② Ogata S, Ogihara Y, Honda T, Kon S, Akiyama K, Ishii M. Corticosteroid pulse combination therapy for refractory Kawasaki disease: a randomized trial *Pediatr* 2012;129:e17-e23
- ③ Nakahata Y, Tomita H, Kimura S, Ando H, Honda T, Takanashi Ishii M. Percutaneous bilateral pulmonary artery banding using re-expandable covered stent; Preliminary animal study. *Kitasato Medical Journal* 2011;41:165-169
- ④ Honda T, Ogata S, Ishii M. Incomplete Kawasaki disease: early findings consist of congestive heart failure due to valvular heart disease *Heart Asia* 2011;3:92
- ⑤ Kimura S, Nakahata Y, Honda T, Ando H, Ogata S, Akiyama K, Ogihara Y, Ishii M. Noninvasive assessment of pulmonary vascular resistance and pressure in patients with congenital heart disease: a new method using M-mode echocardiography *J Echocardiogr* 2011;9:137-141

〔学会発表〕 (計 24 件)

- ① Ishii M, Ogata S, Honda T, Ogihara Y: The efficacy and safety of new strategy for refractory Kawasaki disease. Annual meeting of the association for European Pediatric cardiology 2011, 5, 20. Spain/Granada
- ② 石井正浩 川崎病成人期の問題点と治療 パネルディスカッション 小児心疾患の再診治療 第 59 回日本心臓病学会 2011 神戸
- ③ 石井正浩, 緒方昌平, 扇原義人, 本田崇: 難治性川崎病に対する初期治療としての免疫グロブリンとステロイドパルスの併用療法が冠動脈病変に与える影響: 前視法的検討. 第 31 回日本川崎病学会学術集会 2011, 10, 1 横浜.
- ④ 牟田広実, 石井正浩, 屋代真弓, 上原里程, 中村好一: 川崎病患者における 11~20 病日に開始された免疫グロブリンの治

療効果. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011, 8, 14 東京.

- ⑤ Ishii M. Cardiovascular problems and management of Kawasaki disease. USCD Grandround 2011, 11, 12 San Diego
- ⑥ Ishii M, Ogata S, Ogihara Y, Sato K, Ebato T. Clinical utility of a new strategy for preventing coronary artery lesions in refractory Kawasaki disease patients: a randomized prospective study The 10th International Kawasaki Disease Symposium 2012 Kyoto
- ⑦ Sato K, Inagaki H, Kon S, Ogihara Y, Soeda Y, Iwanami N, Nonoyama M, Minoura K, Ishii M. The immune dynamics of Kawasaki disease and vaccination The 10th International Kawasaki Disease Symposium 2012 Kyoto
- ⑧ Ogata S, Ueda K, Tremouler A, Ogihara Y, Ishii M, Burns JC. Use of z-score to compare coronary artery outcomes between the US and Japan The 10th International Kawasaki Disease Symposium 2012 Kyoto
- ⑨ Ishii M. Percutaneous coronary intervention for Kawasaki disease. Keynote Lecture III The 10th International Kawasaki Disease Symposium 2012 Kyoto

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 正浩 (ISHII MASAHIRO)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 9022950

(2) 研究分担者

中畑 弥生 (NAKAHATA YAYOI)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 20306591
木村 純人 (KIMURA SUMITO)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 40365151