

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591545

研究課題名(和文) プロテオーム法を用いた小児期炎症性疾患の発症病因に関する網羅的解析

研究課題名(英文) Exhaustive analysis about the onset etiology of the pediatric inflammatory diseases by using the proteome method

研究代表者

森 雅亮 (MORI, MASAOKI)

横浜市立大学・大学病院・准教授

研究者番号：30254204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：(1)炎症のメカニズム～サイトカイン・ストームの原因の探索～：本研究では、各種炎症性疾患において独自の蛋白質が同定できており、現在、検体数を増やして追加確認実験をおこなっている  
(2)炎症性サイトカインの働きと「サイトカイン・ストーム」の病態：本研究では、炎症性サイトカインの発現・作用機序に関わる各種蛋白の解析を行い、普遍的な蛋白を同定できた(現在英文誌に投稿中)  
(3)小児期にみられるサイトカイン・ストーム：川崎病、特発性関節炎など小児炎症性疾患ごとに、その発症機序についての検討を本研究で行い、興味深い結果が得られた。現在、検体数を増やして追加確認実験をおこなっている(現時点では、未公開)

研究成果の概要(英文)：The purposes in this study were to analyze serum proteins for both acute and convalescent phases in the patients with hypercytokinemia using the proteome method which was comprehensive protein analytical method, In this study, the following findings should be elucidated.

(1) The mechanism of inflammation -Search of the cause of the cytokine storm-

Finally, we could identify original protein in this study in various inflammatory diseases, and we are planning to increase the number of the specimens and to perform the addition tests now. (2) A function of inflammatory cytokine and condition of a patient of "cytokine storm": We analyzed various proteins about expression, action mechanism of inflammatory cytokine, and accomplish to identify universal protein (under submission to English journal). (3) Cytokine storm to be seen in childhood: We could elucidate what caused "inflammation" of children at a low age and why could a cytokine storm raise. We got the interesting results in this study.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：サイトカイン 小児炎症性疾患 プロテーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、高サイトカイン血症を呈する患者の急性期および回復期の血清蛋白を、網羅的タンパク質解析法であるプロテオーム法により解析し、それらの患者でみられる Toll-like receptor 系タンパク、Nod ファミリー・タンパクおよび炎症性サイトカイン等の患特異的蛋白質を同定し、小児期にみられる高サイトカイン血症の成因および発症機序を解明してきた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、高サイトカイン血症を呈する患者の急性期および回復期の血清蛋白を、網羅的タンパク質解析法であるプロテオーム法により解析し、それらの患者でみられる Toll-like receptor 系タンパク、Nod ファミリー・タンパクおよび炎症性サイトカイン等の患特異的蛋白質を同定し、小児期にみられる高サイトカイン血症の成因および発症機序を解明することである。また引き続き、本研究で解明された高サイトカイン血症の成因および発症機序に基づき、初期段階での臨床症状・検査所見による普遍的な早期診断の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

【平成 23 年度】・川崎病およびマクロファージ活性化症候群にみられる cytokine storm の解析

これまで当科では、川崎病急性期に血清中で炎症に関わるサイトカインの異常高値が生じ、血管内皮細胞の活性化、接着因子や凝固調節因子の異常発現を介した血管炎の病態について検討してきた。それに加えて最近、TNF- 遮断薬である infliximab が大量 - グロブリン療法不応の難治性川崎病において有効であるという報告が散見されてきており、冠動脈病変の発症を含めた本疾患の病態に TNF- が深く関与していることが示唆されている (J Pediatr 2008)。また、私たちは、全身発症型若年性特発性関節炎でも発症に IL-6 が重要な役割を果たしていることを明確にし、その治療に抗 IL-6 レセプター抗体を用いた IL-6 遮断療法が画期的効果を挙げたもたらすことを報告した (Lancet 2008)。本疾患から病態転換を起こしたマクロファージ活性化症候群が高サイトカイン血症をきたし cytokine storm をきたす典型的疾患である。

1) 炎症病態の推移に応じた炎症性サイトカイン産出のプロフィールの確定 (連携研究者: 今川)

患者の炎症極期および鎮静期の末梢白血球および血清の収集: 上記疾患群の患者家族の informed consent を取得後、患者の急性期および回復期の全血 (5ml) から末梢白血球 (105 個細胞) および血清 (100 ~ 200  $\mu$ l) を 15 ~ 20 ペア収集した。

炎症性サイトカインを主座においた免疫

学的解析: 患者末梢単核球を分離し、細胞表面マーカーや既知の免疫機能制御分子、ケモカインの発現パターンとその量的変化、Th1/Th2/Th17/Treg バランスの変化などを炎症極期および鎮静期において検討を行う。表面マーカー、ケモカインの発現パターン、Th1/Th2/Th17/Treg バランスの変化はフローサイトメトリーを用いて解析した。

2) 炎症極期あるいは鎮静期に発現しているタンパクの網羅的解析 (代表研究者: 森) ゲル電気泳動法で分離された蛋白質を、転写産物機能解析法である differential display 法にて検討して、各患児の炎症極期あるいは鎮静期に発現している特異的蛋白を検出・比較した。

患者血球、血清中蛋白質の分離精製: 患者から得られた血清を affinity column によりアルブミンおよびグロブリン除去した後、高い分離能をもつ O' Farrell の二次元電気泳動で精製した。

炎症極期、鎮静期血清の差異の検討: 炎症極期および鎮静期においてゲル電気泳動法で分離された蛋白質を differential display 法にて比較することにより、各病期に特徴的な蛋白を検出した。染色はまず Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (Quick-CBB®) (Wako 社) で行い、必要ならば次に銀染色にてより高い感度で検出状態を確認した。

LC-MS/MS 法による蛋白質の同定: ゲル上に検出された蛋白質を切り出し、トリプシンで分解した後、LC-MS/MS (液体クロマトグラフ質量分析装置) で網羅的に解析した。液体クロマトグラフィー (LC) には CapLC® (Waters 社) を、逆相カラムとしては PepMap C18 (3  $\mu$ m, 100Å) ® (LC Packing 社) を、質量分析 (MS) には QTOF® (Micromass 社) を用いた。得られたペプチドの質量および部分配列情報をデータベースで探索してゲル上に表出した蛋白質を同定した。

疾患特異的蛋白質情報のデータベース化: 得られた遺伝子情報および機能に関する情報をデータベース化した。

3) Toll-like receptor および Nod ファミリータンパクのプロテオーム解析 (代表研究者: 森)

上記の 2) ~ の方法を用いて、自然免疫の二つの認識機構である Toll-like receptor および Nod ファミリータンパク (RICK、ASC、pyrin、cryopyrin) の発現量をプロテオーム解析にて検討し、臨床症状と照合し疾患間の差異について解析した。

【平成 24 年度以降】

・インフルエンザ脳症、ウイルス関連血球貪食症候群、自己炎症症候群にみられる cytokine storm の解析: 上記に示した平成 23 年度と同様の方法で、臨床症状の異なる 3 疾患について検討した。

1) 炎症病態の推移に応じた炎症性サイトカイン産出のプロフィールの確定 (連携研究

者：今川)

患者の炎症極期および鎮静期の末梢白血球および血清の収集：患者の急性期および回復期の全血(5ml)から末梢白血球(105 個細胞)および血清(100~200 μl)を 15~20 ペア収集した。

炎症性サイトカインを主座においた免疫学的解析：細胞表面マーカーや既知の免疫機能制御分子、ケモカインの発現パターンとその量的変化、Th1/Th2/Th17/Treg バランスの変化などを炎症極期および鎮静期において検討した。

2) 炎症極期あるいは鎮静期に発現しているタンパクの網羅的解析(代表研究者：森)ゲル電気泳動法で分離された蛋白質を、differential display 法にて比較検討することにより、各患児の炎症極期あるいは鎮静期に発現している特異的蛋白質を検出し比較した。

患者血球、血清中蛋白質の分離精製

炎症極期、鎮静期血清の差異の検討：炎症極期および鎮静期においてゲル電気泳動法で分離された蛋白質を differential display 法にて比較して、各病期に特徴的な蛋白質を検出した。

LC-MS/MS 法による蛋白質の同定

疾患特異的蛋白質情報のデータベース化

3) Toll-like receptor および Nod ファミリータンパクのプロテオーム解析(代表研究者：森)

上記の2) ~ の方法を用いて、自然免疫の二つの認識機構である Toll-like receptor および Nod ファミリータンパク(RICK, ASC, pypin, cryopyrin)の発現量をプロテオーム解析にて検討し、臨床症状と照合し疾患間の差異について解析した。

4) 各種小児炎症性疾患における疾患特異的蛋白質の比較検討の総括および高サイトカイン血症の早期診断法の確立(代表研究者：森、連携研究者：横田)

上記で解明された病因・発症機序に基づいて、高サイトカイン血症の初期段階での臨床症状・検査所見を中心に置いた普遍的な早期診断法の確立を図った。

#### 4. 研究成果

(1) 炎症のメカニズム~サイトカイン・ストームの原因の探索~

炎症を惹起する要因として2種類のものが知られており、ひとつはウイルスや細菌などの pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)、他のひとつは自己細胞が apoptosis や necrosis の結果に周囲組織に放出される細胞内蛋白質、酵素、核酸などである damage-associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれている。樹状細胞やマクロファージは細胞表面に Toll-like receptor (TLR) を表出し、あるいは細胞内にも細胞内センサーを用意しており、これらの炎症惹起因子を認識する。

本研究では、各種炎症性疾患において独自の蛋白質が同定できており、現在、引き続き、検体数を増やして追加確認実験をおこなっている。

(2) 炎症性サイトカインの働きと「サイトカイン・ストーム」の病態炎症でみられる発熱、だるさ、食不振や白血球増多などの生体反応は、本来は感染防御や免疫獲得に必要な宿主防御反応であり、この生体反応には病原微生物由来の抗原や毒性物質に反応して宿主が産生する種々の内因性メディエーターが病原因子となっており、この中でも、サイトカインは炎症の病態に中心的な役割を演じている。本研究では、炎症性サイトカインの発現・作用機序に関わる各種蛋白質の解析を行い、普遍的な蛋白質を同定できた(現在英文誌に投稿中のため、詳細は未公開)。

(3) 小児期にみられるサイトカイン・ストーム

小児期の免疫疾患の中には、川崎病、インフルエンザ脳症、ウイルス関連血球貪食症候群、自己炎症症候群および全身発症型若年性特発性関節炎など、炎症性サイトカインによるサイトカイン・ストームが病態形成に濃厚に関わっている炎症性疾患が少なくない。とくに、川崎病やインフルエンザ脳症のように、好発年齢が0~1歳をピークとして5歳までを主体とした乳幼児特有の炎症性疾患が、特に自然免疫の解明とのかかわりの中で注目されてきている。何がこのような低年齢の子ども達の「炎症」を惹起し、なぜサイトカイン・ストームを起こしうるのかについての検討を本研究で行い、興味深い結果が得られた。現在、検体数を増やして追加確認実験をおこなっている(現時点では、未公開)。

#### 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7件)(うち査読7件)

- 1) Kasai K, Mori M, Hara R, et al. National survey of childhood febrile illness cases with fever of unknown origin in Japan. *Pediatr Int.* 53:401-25, 2011. doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03296.x.
- 2) Yanagimachi M, Naruto T, Mori M, et al. Association of IRF5 Polymorphisms with Susceptibility to Macrophage Activation Syndrome in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol.* 38:769-74, 2011. doi: 10.3899/jrheum.100655.
- 3) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Mori M, et al.

A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. BMC Infect Dis 2011, **11**:168 doi: 10.1186/1471-2334-11-168.

- 4) Uchimura T, Mori M, Nariai A, et al. Analysis of cases of severe respiratory failure in children with influenza (H1N1) 2009 infection in Japan. J Infect Chemother 18:59-65, 2012. doi: 10.1007/s10156-011-0284-4.
- 5) Yanagimachi M, Goto H, Mori M, et al. Association of IRF5 polymorphisms with susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. J Clin Immunol. 31:946-51,2011. doi: 10.1007/s10875-011-9583-x.
- 6) Mori M, Imagawa T, Hara R, et al. Efficacy and limitation of infliximab treatment for children with Kawasaki disease intractable to intravenous immunoglobulin therapy: report of an open-label case series. J Rheumatol. 39:864-867, 2012 doi: 10.3899/jrheum.110877.
- 7) Yokota S, Kikuchi M, Mori M, et al. An approach to the patients with cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) : a new biologic response modifier, canakinumab. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 35:23-9, 2012.

〔学会発表〕(計 7件)  
(うち招待講演7件)

- 1) 森 雅亮. 生物学的製剤の新たな展開. 第 20 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2011.2.那覇.
- 2) 森 雅亮. 大量ガンマグロブリン不応川崎病症例に対する、インフリキシマブ・血漿交換療法による「段階的治療法」の有用性. 第 47 回日本小児循環器学会総会・学術集会. 2011.7.福岡
- 3) 森 雅亮. RS ウイルス感染予防を必要とする小児に関する全国調査の解析及び今後の対策. 第 114 回日本小児科学会学術集

会. 2011.8.東京

- 4) Mori M. Plasma exchange therapy for cases refractory to IVIG treatment - from analysis in the multi-institutions in Japan -. Intern 12<sup>th</sup> Kawasaki Disease Symposium. 2012,2. Kyoto.
- 5) 森 雅亮. 一般診療における小児リウマチ性疾患の診かた・考え方. 第 115 回日本小児科学会学術集会. 2012.4.福岡
- 6) 森 雅亮. 既存治療で効果不十分な多関節に活動性を有する若年性特発性関節炎 (JIA) 患者にエタネルセプトを長期投与したときの安全性および有効性. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2012.4.東京
- 7) 森 雅亮. 小児のアフェレシス療法: 最近の動向. 難治性川崎病に対するアフェレシス療法. 第 34 回日本アフェレシス学会学術大会. 2013.11.2. 軽井沢.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 雅亮 (MORI, masaaki)  
横浜市立大学附属市民総合医療センター  
研究者番号: 30254204