

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591561

研究課題名(和文)川崎病の冠動脈病変および治療不応例における病態特異的マーカーのプロテオミクス解析

研究課題名(英文) Identification of specific markers in in kawasaki disease patients with coronary artery lesions and in treatment-resistant kawasaki disease patients by proteomics

研究代表者

唐澤 里江 (Karasawa, Rie)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50434410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病患者でプロテオミクスを用いて冠動脈病変合併例および免疫グロブリン不応例に特異的な抗血管内皮細胞抗体の対応抗原候補蛋白をそれぞれ検出した。病態に特異的な抗血管内皮細胞抗体が検出されたことから、これらが新規病態マーカーとなる可能性が考えられた。抗Peroxi redoxin2(Prx2)抗体は川崎病患者で認められる抗血管内皮細胞抗体の1つであり、抗Prx2抗体とPrx2蛋白の両者が炎症性サイトカイン産生や接着分子の発現を介して血管傷害に関与している可能性を示した。さらにPrx2蛋白の血管内皮細胞上における主なレセプターがToll-like receptor4であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Candidate target antigens for anti-endothelial cell antibodies (AECA) specific to Kawasaki disease (KD) patients with coronary artery lesions and specific to treatment-resistant KD patients were detected by a proteomic approach, a combination of two-dimensional electrophoresis and Western blotting, respectively. We found that these specific AECA might be novel biomarkers, both in KD patients with coronary artery lesions and in treatment-resistant KD patients. Anti-Peroxi redoxin 2(Prx2) antibodies are among the AECA we detected in KD. Both anti-Prx2 antibodies and Prx2 protein increased inflammatory cytokine secretion from endothelial cells (ECs) and expression of adhesion molecule on ECs, which might result in endothelial injury. Furthermore this research identified Toll-like receptor 4 as the main receptor on ECs for Prx2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：川崎病 抗血管内皮細胞抗体 Peroxi redoxin 2 プロテオミクス 冠動脈病変 治療抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 川崎病(KD)は小児の後天性心疾患の原因の第1位で、罹患率・再発率ともに増加傾向であり患者数は20万人を超えている。その約11%に動脈瘤をはじめとする心障害が報告されている。免疫グロブリン不応例は約13-20%に存在し、高頻度に冠動脈後遺症を生じる。冠動脈病変はKDの予後因子として最も重要であり、病態解明や新規治療法の開発など早急な対応が求められる。

(2) 通常、冠動脈病変は初回治療開始以降に認められることが多く、治療開始時にその経過を予測することは不可能である。また冠動脈病変の合併を予測できる特異的マーカーもないため、初回治療含め病初期に強力な治療ができず、重度の心後遺症や著しいQOLの低下をきたす症例も稀ではない。

(3) このような状況のため、KDにおける冠動脈病変合併例および免疫グロブリン不応例を予測できる特異的マーカーに関して社会的要求が高まっており、国内外の研究が激しい。

(4) 我々はプロテオミクスを用いて抗血管内皮細胞抗体(AECA)の1つである抗 Peroxiredoxin 2 (Prx2) 抗体の陽性率がKDでは60%であり、冠動脈病変を有する症例の早期予測や免疫グロブリン療法の効果判定に有用である可能性をすでに報告している。

## 2. 研究の目的

AECAは、血管炎患者に高率に認められる自己抗体であり、疾患活動性との相関や、血管炎の病因・病態形成に關与している可能性が指摘されている。我々はプロテオミクスの手法を用いて小児血管炎の川崎病で、冠動脈病変合併例 免疫グロブリン不応例を初回治療前に予測可能なそれぞれの特異的マーカーを検出・同定する。更に、我々がすでにKD患者で報告した抗 Prx2 抗体の臨床的意義について検討する。病態特異的マーカーの検出、その診断補助用キットの開発を含めた臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

1. 我々がAECAの対応抗原と同定した Prx2 に対する自己抗体陽性率を、KD血清で評価(ELISA)し、冠動脈病変合併例および免疫グロブリン不応例でその臨床的意義について検討する。

2. プロテオミクスで、冠動脈病変合併例のKD血清と冠動脈血管内皮細胞を用いて免疫グロブリン不応例のKD血清と冠動脈血管内皮細胞および大動脈血管内皮細胞を用いて、およびのそれぞれでAECAの対応抗原候補蛋白を検出・同定し、人種差を含めその臨床的意義について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 冠動脈病変合併例に特異的なAECAの対応抗原候補蛋白スポットを17個(Molecular weight:49-100kDa, Isoelectric point:4.75-7.73) 検出した。

(2) 免疫グロブリン不応例に特異的な AECA の対応抗原候補蛋白スポットを 32 個 (Molecular weight:50-130kDa, Isoelectric point:4.10-7.40) 検出した。

(1)および(2)の結果より、病態に特異的な AECA が検出されたことから、これらが新規病態マーカーとなる可能性が考えられた。

(3) 抗 Prx2 抗体は血管内皮細胞(ECs)に結合し、炎症性サイトカインの産生や接着分子の発現を誘導することをすでに報告しているが、今回 ECs における炎症性サイトカインの産生や接着分子の発現が抗 Prx2 抗体単独刺激に比べ、Prx2 蛋白との共存下で増強することが示された。

(4) Prx2 蛋白のみを ECs に添加することで、IL-6, IL-8, GM-CSF および TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインやケモカインの産生が誘導され、その作用は特に IL-6, GM-CSF および TNF- $\alpha$  において抗 Prx2 抗体より強い傾向が示された。

(5) IL-6 および IL-8 産生では Prx2 蛋白の添加濃度に依存して、また GM-CSF および TNF- $\alpha$  では Prx2 蛋白の添加濃度が高濃度でその産生が認められた。

(6) ECs 以外の細胞として変形性関節症患者からの軟骨細胞および滑膜細胞では Prx2 蛋白の添加で両細胞から同様に炎症性サイトカインやケモカインの産生が認められ、ECs とその産生量を比較したところ、IL-6 では滑膜細胞とほぼ同様であったが、GM-CSF では滑膜細胞および軟骨細胞に

比べ増加傾向が認められた。

(7) ECs を TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインで刺激することで、Prx2 蛋白が細胞培養上清中に検出された。

(8) Prx2 蛋白の ECs 上におけるレセプターの同定を試みたところ、主に Toll-like receptor4(TLR4)であることを明らかにした。

(9) 接着分子に関しては、ECs に Prx2 蛋白を添加した場合、抗 Prx2 抗体刺激に比べ ECs 上の E-selectin および I-CAM1 の発現が高度であった。

(10) 抗 Prx2 抗体は、血管障害が起こった結果産生される自己抗体と考えられた。抗 Prx2 抗体のみでなく、Prx2 蛋白自身が血管内皮細胞傷害に関与している可能性が示された。

本研究の結果より、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

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2件)

Karasawa R, Fujieda M, Ohta K, Yudoh K.

Validation of a new biomarker in patients with Kawasaki disease identified by proteomics. Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics 2013;4:1-3, doi: 10.4172/2153-0602.1000124, 査読あり

Karasawa R. Progress and Clinical Applications in Proteomics. Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics 2012;S1:1-6, doi: 10.4172/2153-0602.S1-001, 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

Karasawa R. Novel roles for Peroxiredoxin2 as target antigens for anti-endothelial cell antibodies. Global Biotechnology Congress. June 16-19, 2014, Boston, USA.

Karasawa Rie. Pathological Roles of Peroxiredoxin 2 in Vasculitis. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. December 11-13, 2013, Makuhari Messe (Chiba-shi, Chiba).

Karasawa R., Sato T, Tamaki M, Fujieda M, Ohta K, Yudoh K. Pathological Roles of the Anti-Oxidative Enzyme Peroxiredoxin 2 in Patients with Kawasaki Disease. American College of Rheumatology. October 25-30, 2013, San Diego, USA.

唐澤里江, 佐藤淑子, 玉置真弓, 藤枝幹也, 太田和秀, 遊道和雄. 川崎病の病態形成における抗酸化酵素 Peroxiredoxin2 の機能的役割の解明. 第33回 日本川崎病学会・学術集会. 2013年9月27日 28日, 富山国際会議場(富山県, 富山市).

Karasawa R, Tamaki M, Sato T, Yudoh K. Detection of Target Antigens for Anti-Endothelial Cell Antibodies in Patients with Kawasaki Disease. HUPO 12th Annual World Congress. September 14-18, 2013, Pacifico Yokohama (Yokohama-shi, Kanagawa).

唐澤里江, 遊道和雄. 川崎病における抗 Peroxiredoxin. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2013年4月18日 20日, 国立京都国際会館(京都府, 京都市).

唐澤里江, 村田三奈子, 遊道和雄. Autoantibodies to peroxiredoxin in patients with systemic autoimmune diseases. 第56回日本リウマチ学会. 2012年4月26日 28日, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都, 港区).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

唐澤里江 (KARASAWA, RIE)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科

(研究院)・講師

研究者番号: 50434410

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

遊道 和雄 (YUDOH, KAZUO)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科

(研究院)・教授

研究者番号: 60272928