

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461623

研究課題名(和文)川崎病類似Nod1リガンド誘発冠動脈炎におけるオートファジー機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of autophagy in Nod1 ligand-induced coronary arteritis like Kawasaki disease

研究代表者

西尾 壽乗 (Nishio, Hisanori)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00507783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病類似Nod1リガンド誘発冠動脈炎マウスモデルでのオートファジー機構について検討を行った。まず、オートファジー亢進薬であるラパマイシンにより冠動脈炎が改善することが明らかとなった。さらに、ヒト冠動脈内皮細胞でも炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8)産生が抑制された。ラパマイシンはmTOR阻害薬の一種であり、他のmTOR阻害薬でも同様の実験を行ったところ、他のmTOR阻害薬でもマウス、細胞で同様に冠動脈炎の改善とサイトカイン産生の抑制結果が得られた。以上から、オートファジー亢進薬であるmTOR阻害薬が川崎病の新規治療法となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analysed the mechanisms of autophagy in Nod1 ligand-induced coronary arteritis, one of the mice models of Kawasaki disease we reported previously. First, we found that rapamycin, autophagy inducer, improved coronary arteritis in the mice. Furthermore, in human coronary artery endothelial cells, rapamycin decreased production of inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8. Rapamycin is one of the mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors, so we did the same experiments in vivo and in vitro by using other mTOR inhibitors. They revealed that other mTOR inhibitors also induced improvement of coronary arteritis and inhibition of cytokine production. These results showed that mTOR inhibitors, autophagy inducers, are possible new treatment with Kawasaki disease.

研究分野：小児感染免疫

キーワード：川崎病 自然免疫 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

川崎病は主に乳幼児にかかる急性熱性疾患であり、全身の血管炎を特徴とする。様々な原因因子や遺伝的素因について報告があるが、それらが川崎病すべての症例の原因として証明されていない。我々は末梢血の遺伝子発現やヒト冠動脈内皮細胞による刺激実験などから、川崎病の発症に自然免疫が大きく関わっていることを明らかにした。さらに、自然免疫の一つである Nod1 のリガンドをマウスに投与することにより、川崎病類似冠動脈炎が起こることを報告した。この冠動脈炎という部位特異性については未だ不明ではあるが、冠動脈組織がもつ内因的因子が関わっていることがわかった。

2. 研究の目的

本研究ではこの内因的因子の候補としてオートファジーに着目し、オートファジーが冠動脈炎の発症に関わっているかについて検討を行う。この検討により、川崎病発症のメカニズムの解明につながることはもちろん、川崎病の重症例の鑑別や冠動脈炎特異的治療への応用にもつながると考えられる。

3. 研究の方法

(1) オートファジーの亢進、抑制に伴う Nod1 リガンド誘発マウス冠動脈炎の病理像の検討

FK565(Nod1 リガンド)100 μ g を連日内服投与する (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011)。ラパマイシン(オートファジー亢進薬)による冠動脈炎の改善を予想し、FK565 投与期間は1週間とし、週3回ラパマイシンを投与して、冠動脈炎の改善を確認した。また、バフィロマイシン A1 (オートファジー抑制薬)による冠動脈炎の悪化を予想し、FK565 投与期間は3日間とし、連日バフィロマイシン A1 を投与して、冠動脈炎の悪化を確認した

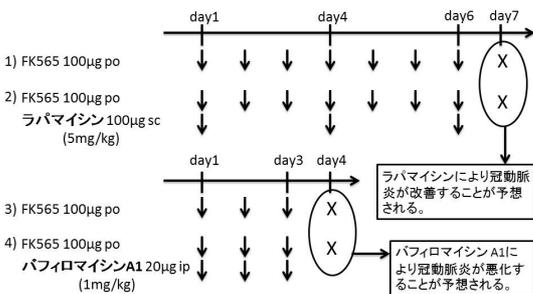


図1 オートファジー誘導・抑制による冠動脈炎改善・増悪の検討

(図1)

(2) オートファジー亢進・抑制によるヒト冠動脈内皮細胞、ヒト冠動脈平滑筋細胞からのサイトカイン放出の影響

ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) およびヒト冠動脈平滑筋細胞 (HCASMC) を 3200/well で、FK565 およびラパマイシンあるいはバフィロマイシン A1 共存下で 24 時間培養し、その上清中サイトカインをサイトカインビーズ

アレイにて測定した。

(3) 様々な mTOR 阻害薬によるサイトカイン放出の影響 (細胞およびマウス)

ラパマイシンは mTOR 阻害薬の一種であるが、その mTOR 阻害薬は多種であるため、ラパマイシン他、数種の mTOR 阻害薬を用いて上記(1)(2)を行った。

4. 研究成果

(1) オートファジーの亢進、抑制に伴う Nod1 リガンド誘発マウス冠動脈炎の病理像の検討

ラパマイシン投与により冠動脈炎は発症せず、バフィロマイシン A1 投与により冠動脈炎の悪化を認めた (図2)。ラパマイシンはオートファジー亢進作用以外にも様々な作用を持つ mTOR 阻害薬であるが、バフィロマイシン A1 により悪化を認めることから、ラパマイシンによる改善効果はオートファジー作用も大きな役割を果たしていることが示唆された。

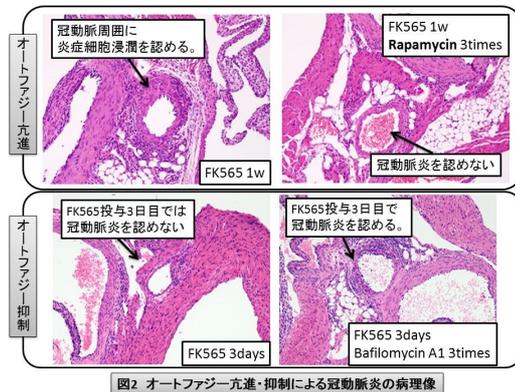


図2 オートファジー亢進・抑制による冠動脈炎の病理像

オートファジーは様々な微生物構成物質を細胞内で消化し、炎症惹起を押さえることができ、Nod1 リガンドについてもオートファジー作用により消化されることが報告されている。

川崎病が様々な微生物構成物質による自然免疫の異常な活性化から発症すると考えており (*PLoS One.* 2014)、その炎症を惹起する微生物構成物質をオートファジー亢進により消化することができ、川崎病の根本的治療となりうると考えられた。

(2) オートファジー亢進・抑制によるヒト冠動脈内皮細胞、ヒト冠動脈平滑筋細胞からのサイトカイン放出の影響

ヒト冠動脈内皮細胞に対して FK565 で刺激すると IL-6 および IL-8 の産生は上昇する。この産生をラパマイシンで抑制することができた (図3)。また、バフィロマイシン A1 ではサイトカイン産生がさらに上昇した。一方で、ヒト冠動脈平滑筋細胞ではラパマイシンによる IL-6 や IL-8 抑制作用を認めなかった。川崎病の冠動脈炎は微生物構成物質が冠動脈内皮細胞に作用して、それが様々な炎症細

胞浸潤を引き起こすと考えており (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015)、これらの結果は、実験(1)の結果がヒト冠動脈内皮細胞に対する作用である可能性を示唆する結果であった。

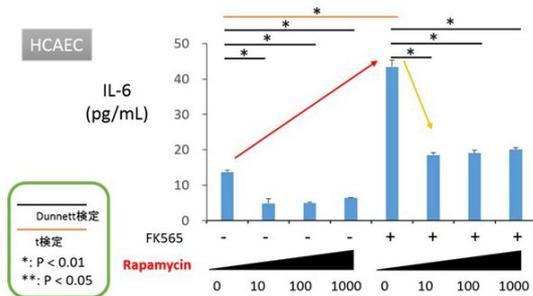


図3 冠動脈内皮細胞でのサイトカイン産生抑制効果

(3) 様々な mTOR 阻害薬によるサイトカイン放出の影響 (細胞およびマウス)

まず、ラパマイシンではなく mTOR 阻害薬 A を用いて、実験(1)と同様の実験を行ったところ、mTOR 阻害薬 A でも冠動脈炎抑制効果が得られた(図4)。

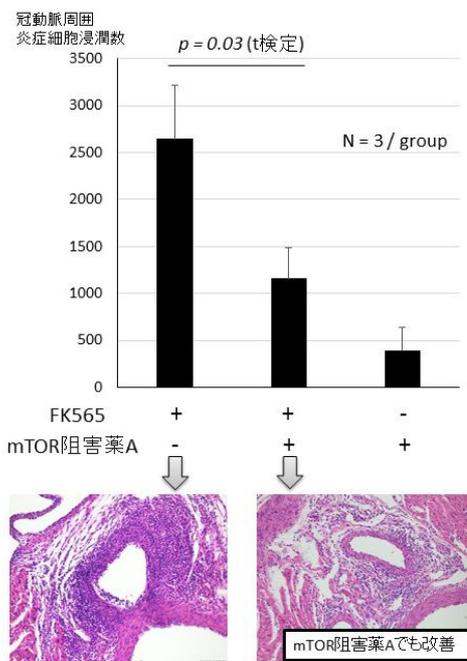


図4 他の mTOR 阻害薬での冠動脈抑制効果

さらに、細胞についても実験(2)と同様にを行ったところ、効果の差はあるものの他の mTOR 阻害薬でもサイトカイン産生抑制効果を認めた(図5)。

本研究により、オートファジーに着目した mTOR 阻害薬による川崎病治療は、病因・病態を考えた上で、根本的治療になりうると考えられた。今後はその機序についてさらに解析をすすめると同時に、新規治療法として医師主導治験に向けた準備に取り組む。

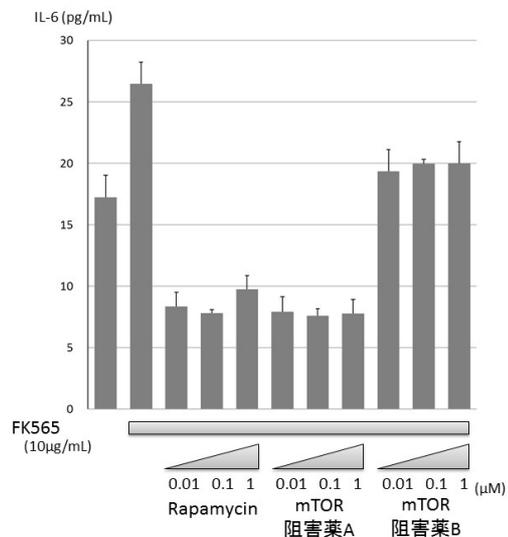


図5 他の mTOR 阻害薬でのサイトカイン産生抑制効果

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)

1. Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms.

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T.

PLoS One. 2014 Nov 20;9(11):e113054.

doi: 10.1371/journal.pone.0113054. 査読あり

2. Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis in ApoE^{-/-} mice.

Kanno S, Nishio H, Tanaka T, Motomura Y, Murata K, Ihara K, Onimaru M, Yamasaki S, Kono H, Sueishi K, Hara T.

J Immunol. 2015 Jan 15;194(2):773-80.

doi: 10.4049/jimmunol.1302841. 査読あり

3. Identification of Pathogenic Cardiac CD11c⁺ Macrophages in Nod1-Mediated Acute Coronary Arteritis.

Motomura Y, Kanno S, Asano K, Tanaka M, Hasegawa Y, Katagiri H, Saito T, Hara H, Nishio H, Hara T, Yamasaki S.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015 Jun;35(6):1423-33.

doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304846. 査読あり

4. Activation of Nod1 Signaling Induces Fetal Growth Restriction and Death through Fetal and Maternal Vasculopathy.

Inoue H, Nishio H, Takada H, Sakai Y, Nanishi E, Ochiai M, Onimaru M, Chen SJ, Matsui T, Hara T.

J Immunol. 2016 Mar 15;196(6):2779-87.

doi: 10.4049/jimmunol.1500295. 査読あり

〔雑誌論文〕(計1件)

血管と感染～自然免疫リガンドとしての微生物～

西尾壽乗、神野俊介

福岡県小児科医報. 2014.12, 査読なし

〔学会発表〕(計22件)

1. 西尾壽乗:

Nod1 リガンド刺激による川崎病様冠動脈炎発症モデル

第57回日本リウマチ学会総会・学術集会 シンポジウム 2013.4.18-20 京都

2. Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Hara T: Various microbial components enhance the frequency and severity of Nod1 ligand-induced coronary arteritis 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Kuching, Malaysia.

3. Kanno S, Nishio H, Sueishi K, Hara T: Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis. 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Kuching, Malaysia.

4. Kanno S, Nishio H, Sueishi K, Hara T: Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis. 27th Congress of International Pediatric Association. August 24-29, 2013, Melbourne, Australia

5. 西尾壽乗、原 寿郎:

川崎病の最新知見～自然免疫リガンドを用いた川崎病類似冠動脈炎モデルマウス～

第23回日本外来小児科学会 セミナー 2013.8.31-9.1 福岡

6. 神野俊介、西尾壽乗、本村良知、居石克夫、原 寿郎:

微生物と動脈硬化の関連: 動脈硬化早期における自然免疫受容体 Nod1 の寄与

第45回日本小児感染症学会 2013.10.26-27 札幌

7. 西尾壽乗:

川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルからわかること～自然免疫、オートファジー～

第6回高サイトカイン血症研究会 特別講演 2013.11.16 東京

8. 神野俊介、西尾壽乗、本村良知、居石克夫、原 寿郎:

動脈硬化早期における自然免疫受容体 Nod1 の寄与

第66回九州小児科学会 2013.11.16-17 那覇

9. 西尾壽乗:

オートファジーの制御による新たな治療法の開発～川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルマウスでの検討～

第18回川崎病治療懇話会 2014.7.3 岡山

10. 村田憲治、田中珠美、西尾壽乗、原 寿郎、矢野貴久:

カルシニューリン阻害薬の冠動脈炎に対する in vitro、in vivo での作用機序の検討

第18回川崎病治療懇話会 2014.7.3 岡山

11. 楠田 剛、中島康貴、西尾壽乗、原 寿郎:

川崎病患者検体における自然免疫受容体 NOD1 活性物質の検出とその構造解析

第18回川崎病治療懇話会 2014.7.3 岡山

12. 神野俊介、西尾壽乗、鬼丸満穂、居石克夫、原 寿郎:

動脈硬化早期における自然免疫受容体 Nod1 の寄与

第91回九大病理研究会 2014.12.13 福岡

13. Motomura Y, Kanno S, Nishio H, Hara H, Hara T, Yamasaki S:

Accumulation of cardiac CD11c+ macrophages is involved in the pathogenesis of Nod1-mediated coronary arteritis similar to Kawasaki disease.

22th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. June 2-3, 2014, Kobe, Japan

14. Motomura Y, Kanno S, Nishio H, Hara H, Hara T, Yamasaki S:

Identification Of Pathogenic Cardiac Cd11c+ Macrophages In Nod1-mediated Coronary Arteritis, A Murine Model Of Kawasaki Disease.

11th International Kawasaki Disease Symposium, February 3-6, 2015, Honolulu, U.S.A

15. Motomura Y, Kanno S, Nishio H, Hara T, Yamasaki S:

The molecular mechanism of Nod1-mediated coronary arteritis, a murine model of Kawasaki disease.

3rd International Congress on Controversies in Rheumatology & Autoimmunity, March 12-14, 2015, Sorrent, Italy

16. Inoue H, Kusuda T, Fujiyoshi J, Matsushita Y, Ochiai M, Nishio H, Takada H, Hara T:

Nod1 signaling induces intrauterine fetal growth restriction and fetal death in mice
11th Asian Society for Pediatric Research,
April 15-18, 2015, Osaka, Japan

17. Motomura Y, Kanno S, Nishio H, Hara T, Yamasaki S:
Cardiac CD11c+ macrophages are involved in Nod1-mediated coronary arteritis, a murine model of Kawasaki disease.
11th Asian Society for Pediatric Research,
April 15-18, 2015, Osaka, Japan

18. 井上普介、西尾壽乗、高田英俊、酒井康成、名西悦郎、落合正行、原 寿郎：
自然免疫受容体 Nod1 のリガンドは胎仔の血管病変を介して IUGR および IUFD を起こす
第 25 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 2015.6.5-7 東京

19. 西尾壽乗、名西悦郎、村田憲治、本村良知、松下悠紀、神野俊介、酒井康成、原 寿郎：
オートファジーの制御による新たな治療法の開発～川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルマウスでの検討～
第 19 回川崎病治療懇話会 2014.7.16 東京

20. 村田憲治、田中珠美、西尾壽乗、原 寿郎：
カルシニューリン阻害薬の冠動脈炎に対する in vitro、in vivo での作用機序の検討
第 19 回川崎病治療懇話会 2014.7.16 東京

21. 神野俊介、西尾壽乗、本村良知、居石克夫、原寿郎：
動脈硬化早期における自然免疫受容体 Nod1 の寄与
第 85 回日本感染症学会西日本地方会 2015.10.15-17 奈良

22. 井上普介、西尾壽乗、鬼丸満穂、原 寿郎：
自然免疫受容体 Nod1 のリガンドは母仔の血管病変を介して IUGR および IUFD を起こす
第 92 回九大病理研究会 2015.12.12 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：川崎病の新規治療薬としての mTOR 阻害薬

発明者：西尾壽乗、名西悦郎、原 寿郎

権利者：国立大学法人九州大学

種類：用途特許

番号：2015-161762

出願年月日：2015 年 8 月 19 日

国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 壽乗 (NISHIO, Hisanori)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00507783

(2) 研究分担者

山村 健一郎 (YAMAMURA, Kennichirou)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30532858

(3) 研究分担者

名西 悦郎 (NANISHI, Etsuro)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：40624937