

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860843

研究課題名(和文)川崎病血管炎におけるHMGB1の果たす役割の検討

研究課題名(英文)Roll of HMGB1 and innate immune system in vasculitis of Kawasaki disease

研究代表者

平田 陽一郎(HIRATA, Yoichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40447397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病モデルマウスをもちいて、炎症性サイトカインであるHMGB1の果たす役割を検討した。抗HMGB1中和抗体の投与により、冠動脈炎が有意に抑制されたことや、血清炎症サイトカインが有意に低下したことなどを示した。また免疫染色により冠動脈血管炎の病変局所においてHMGB1が強く発現していることも示した。これらことから、モデルマウスにおける血管炎の発症にHMGB1を含む自然免疫系が関与していることが示唆された。今後さらに検討をすすめ、川崎病血管炎における自然免疫系の果たす役割を明らかにし、新たな治療法の確立に役立てるように研究を続ける予定である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roll of HMGB1 in vasculitis of Kawasaki disease using CAWS-induced mouse model. Treatment by anti-HMGB1 antibodies significantly reduced the inflammation score of vasculitis, and also reduced the level of IL-6 in CAWS-treated mice. We also revealed that HMGB1 is highly expressed in the lesion of vasculitis of mice using immunohistochemistry. We elucidated that HMGB1 plays a critical roll in the vasculitis of the murine model of Kawasaki disease.

研究分野：小児循環器学

キーワード：川崎病 血管炎 冠動脈 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

川崎病は5歳以下の小児に好発する急性の全身性血管炎をきたす症候群である。川崎病による冠動脈合併症は小児の後天性心疾患の中で最も頻度の高いものであり、標準的治療である高容量ガンマグロブリン療法が確立された現在でも、治療不応例が13-23%程度に認められ、巨大冠動脈瘤を形成する症例が1%程度に認められる。川崎病の血管炎における免疫反応については多くの研究があるが、その機序にはいまだに不明な点が残されている。

2. 研究の目的

HMGB1(High-mobility group box 1)は、核内においてDNAの立体構造の維持や転写活性の調節に重要な役割を果たすDNA結合蛋白として同定された。しかし近年、これが細胞死に伴って細胞から放出され、炎症性サイトカインとして働くことが明らかとなった。壊死細胞から分泌されたHMGB1は、自己免疫疾患・腫瘍・外傷性や出血性ショック・ウイルス感染・虚血/再還流傷害など、生体の様々な侵襲に対する応答分子として重要な役割を果たすことが徐々に明らかにされつつある。しかし、HMGB1の血管リモデリングに関する詳細なメカニズムは不明なままである。

これらの分泌されたHMGB1と細胞内での各種の反応をつなぐ受容体としては、Toll-like receptors(TLRs: Toll様受容体)などが想定されている。TLRsは、各種の病原体に対する最初の防御システムである自然免疫経路で重要な役割を果たす。生体が病原体などの脂質・タンパク・核酸などから構成されるpathogen-associated molecular patterns (PAMPs)を認識するのはpattern recognition receptors (PRRs)と呼ばれる各種の受容体であるが、その中でも中心的な役割を果たすのがTLRとされている。これまでに川崎病血管炎とTLRに関連する自然免疫系の関与についての検討は多くない。我々の研究グループでは、ヒト冠動脈疾患患者において、血管周囲脂肪組織における慢性炎症が、血管内リモデリングと関連していることを報告してきた。この研究を行う中で我々は川崎病血管炎における血管壁での慢性炎症のメカニズムに興味を持ち、炎症性メディエーターとしてのHMGB1に着目しその役割を明らかにすることを本研究の目的とした。この研究によって、川崎病血管炎の病態が明らかとなれば、高容量ガンマグロブリン製剤よりも疾患特異的で有効な治療法を開発したり、冠動脈炎をおこしうる重症患者を明確に予測できる有用な臨床マーカーとしてHMGB1を使用することが可能となるなど、実際の臨床において有用な情報が得られる可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1)まず、HMGB1と血管リモデリングの関連をあきらかにするために、マウス大腿動脈ワイヤー傷害モデルを用いた検討を行った。傷害されたマウスの大腿動脈周囲に抗HMGB1中和抗体を、ゼラチンハイドロゲルを用いて局所に慢性投与し、新生内膜肥厚の程度を検討した。またHMGB1の受容体であるTLR(Toll like receptor)の欠損マウスを用いて同様の実験を行った。また骨髄移植モデルを用いて同様の検討を行った。

(2)次に川崎病モデルマウスを用いた検討を行った。野生型C57BL/6オスの4週令マウスを使用した。CAWS(Candida albicans water-soluble fraction)2mg/doseを5日間連続してマウスに腹腔内投与することにより川崎病類似血管炎モデルを作成した。コントロール群にはPBSおよび要請コントロールとして、臨床でも使用されているメチルプレドニゾロンを投与した。

投与前、投与後1週間、4週間の時点で、マウスから血清および心臓のサンプルを採取して解析を行った。冠動脈周囲の炎症細胞浸潤や病変の広がり の程度を評価し、inflammation score およびExtent of lesionとして数値化して評価をおこなった。また得られた切片を抗HMGB1抗体を用いて免疫染色を行い、HMGB1タンパクの発現部位を評価した。

採取した血清ではIL-2、IL-6、IL-10、MCP-1、TNF- α などの炎症性サイトカインの濃度をELISA kitを用いて測定した。

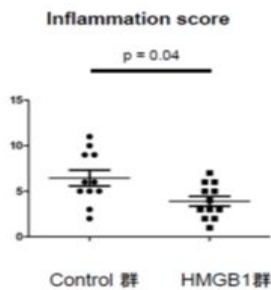
傷害後血管のリモデリングには、新生内膜および血管周囲のマクロファージが重要な役割を果たすことを、すでに我々のグループが報告している。そこでmacrophage cell lineであるRAW264.7 cellを用い、培養液にHMGB1およびTLRのリガンドであるLPS、CpG-ODNなどを添加し、炎症性サイトカインであるIFN- γ /TNF- α /IL-1などの濃度をELISA kitを用いて測定した。またこれらの反応系に抗HMGB1中和抗体も添加し、反応系の一部を阻害することにより、経路の詳細を検討した。

4. 研究成果

(1)抗HMGB1中和抗体の慢性投与により、ワイヤー傷害後の新生内膜の増殖が有意に抑制されることを見出した。またTLR9欠損マウスでは同様の抑制効果が認められなかったことなどから、骨髄由来細胞におけるTLR9の存在およびHMGB1によって惹起される慢性炎症が、血管リモデリングに重要な役割を果たすことを明らかにした。(Hirata Y, et al. Atherosclerosis, 2013)

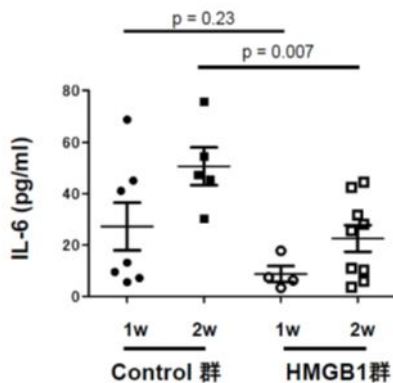
(2)CAWSを用いた川崎病モデルマウスの実験系を立ち上げ、これまでに報告されていたものと同様の冠動脈炎モデルを作成すること

に成功した。これらの川崎病モデルマウスに抗 HMGB1 抗体を投与すると病変の重症度を有意に抑制した。



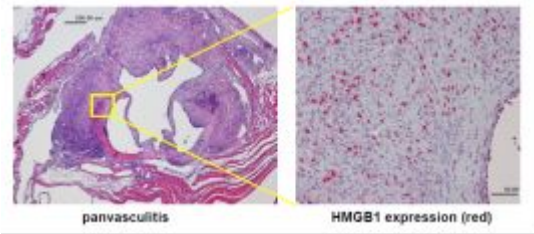
同時に陽性コントロール群として投与したメチルプレドニゾロン群では、Extent of lesion/inflammation score ともにコントロール群よりも増悪する結果が得られた。これは川崎病患者に対してステロイドを安易に投与すると、冠動脈合併症の頻度がかえって増加するというこれまでの臨床結果に比較的合致する結果であり、非常に興味深い結果であるといえる。ヒトで現在標準的治療法として確立しているガンマグロブリン製剤の大量投与方法を試みるにはいたっていないが、抗 HMGB1 抗体の投与が臨床でも効果を示す可能性を期待させる結果であった。

またこれらのマウスの血清サイトカインを解析したところ、HMGB1 中和抗体投与群で炎症性サイトカインである IL-6 が有意に抑制されていたことが明らかとなった



これらの炎症性サイトカインの抑制効果は、メチルプレドニゾロン投与群よりも優れており、副作用の多いステロイド投与治療ではなく、HMGB1 特異的な治療が十分な効果を上げる可能性を示唆するものであった。

また冠動脈炎症局所の病理切片を用いた免疫染色を行ったところ、HMGB1 が強く発現しておりかつ細胞核から細胞質へ放出されており炎症性メディエーターとして機能していることが考えられた。



以上の結果から、川崎病血管炎モデルマウスにおいて、抗 HMGB1 中和抗体の投与が病変形成抑制効果を持つことが示された。

これらのことから、さらに検討を進めるため、TLR 欠損マウスにおいて同様の検討を行っている。現在検討の途中であり有意な結果は得られていないが、TLR 欠損マウスにおいては、CAWS による川崎病モデルマウスの反応がコントロールマウスと比較して変化している結果は得られており、引き続き検討を行っている。また RAW264.7 cell line をもちいた in vitro の実験系でも検討を加えたが、残念ながら、vivo で得られた炎症抑制効果を十分に説明できるだけの結果は、現時点では得られていない。研究期間および研究費の点で実験がまだ不十分であり論文公表には至っていないが、本研究に続く検討を行うため、引き続き科学研究費基盤 C を申請し受理されたため研究を継続しているところである。

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 1 件)

Hirata Y, Kurobe H, Higashida M, Fukuda D, Shimabukuro M, Tanaka K, Higashikuni Y, Kitagawa T, Sata M. HMGB1 plays a critical role in vascular inflammation and lesion formation via toll-like receptor 9. *Atherosclerosis*. 2013 Dec;231(2):227-33. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

第 17 回東京小児医学研究会 (2014 年 2 月) 川崎病血管炎における HMGB1 の果たす役割の解析 (川崎病モデルマウスを用いて)

第 1 回本郷小児循環研究会 (2014 年 2 月) 東大小児科における川崎病に関する基礎・臨床研究の現況

第 50 回日本小児循環器学会 (2014 年 7 月) 川崎病における HMGB1 の果たす役割の検討 (モデルマウスを用いて)

第 35 回日本炎症・再生医学会 (2014 年 7 月) 川崎病血管炎における HMGB1 の果たす役割の解析 (モデルマウスを用いて)

第 1 回日本血管生物医学学会若手会 (2015 年 2 月) 川崎病血管炎における自然免疫系の果たす役割の検討

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
平田陽一郎 (HIRATA, Yoichiro)
東京大学医学部附属病院・講師
研究者番号：40447397

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし