

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田 恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井 洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇 祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和 行文 …… 576

免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索

所属 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部
研究者 阿部 淳

研究要旨 免疫グロブリン大量静注療法の作用機序を明らかにすることを目的として、川崎病患者末梢血における遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。また急性期患者血清による血管内皮細胞機能の障害作用について解析した。治療効果予測に向けたマーカー蛋白、および内皮細胞機能障害に関与する因子を抽出した。

分担研究者

- (1) 千葉大学大学院医学研究院小児病態学
安川 久美
- (2) 株式会社ベネシス研究開発本部 平尾 豊

A. 研究目的

北里柴三郎、Emil Behring による破傷風およびジフテリア抗血清の発見以来、免疫グロブリンは種々の病原微生物感染における治療薬として用いられてきた。免疫グロブリンの病原微生物感染における防御作用の機序として考えられる経路には、(1) 細菌、ウイルスの増殖に対する特異抗体を通じた中和作用、(2) 細菌、ウイルスが産生する毒素に対する特異抗体を通じた中和作用、(3) 抗原抗体複合体を形成することによる貪食殺菌能の増強(オプソニン効果)、(4) 同じく抗原抗体複合体を形成することによる抗体依存性細胞障害活性の増強、などがあげられる。一方、感染症以外の分野でも、とくに自己免疫性疾患を中心として、免疫グロブリンのもつ種々の免疫修飾作用を期待した治療法が試みられるようになった。これらの治療の理論的根拠としては、(1) 免疫グロブリンのFc部分がマクロファージのFc受容体をブロックする、(2) マクロファージやリンパ球の抑制型Fc受容体に結合して細胞の活性化をおさえる、(3) 活性化された血清中の補体が非特異的に細胞傷害を起こすのをおさえる、(4) 自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体としてはたらく、などがあげられる。現在、特発性血小板減少性紫斑病、川崎病、ギラン・バレー症候群の3疾患に対して、免疫グロブリン大量静注療法(IVIG療法)の臨床効果が確認され保険適用が承認されているが、各々の疾患における免疫グロブリンの作用機序は必ずしも明らかではない。本研究では、乳幼児に好発する全身性血管炎である川崎病に的を絞って、IVIG療法の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

川崎病における免疫グロブリン大量静注療法の目的は、“急性期の強い炎症反応を可能な限り早期に終息させ、結果として合併症である冠動脈瘤の発症頻度を最小限にすること”(川崎病急性期治療のガイドライン、日本小児循環器学会学術委員会、2003)である。実際に、川崎病急性期治療におけるIVIG療法の有効性は確立しており、冠動脈瘤の発生率の低下が報告されている。しかしIVIG療法の作用機序には未だ不明の部分が多く、治療不応例も少なからず存在する。これらの治療不応例から冠動脈瘤の発生する頻度が高いこと、不応例に対する代替療法も未だ確立していないことから、IVIG療法の作用機序の解明が早急に求められている。

昨年度までの研究で、川崎病患者の末梢血単核球(PBMC)および精製したモノサイトでは、IVIG療法により多彩な生理活性を有する多くの遺伝子が抑制的に制御されていることを明らかにした。なかでも、S100A9、S100A12などのS100カルシウム結合蛋白ファミリーや活性型ガンマグロブリン受容体(FCGR1A、FCGR3A)など、主としてモノサイト・マクロファージで発現される遺伝子発現がIVIG療法後に著名に低下することを明らかにした。さらに、PAXgene™システムやAffymetrix社のGlobin Reductionプロトコルを用いて、静脈血全血における遺伝子発現プロファイルを解析するシステムを構築し、IVIG療法前、IVIG療法後、発熱対照患者群の遺伝子発現プロファイルを解析し、主成分分析(PCA)によって3つの群が明瞭に区分できることを示した。

本年度は以上の結果に基づいて、(1) IVIG療法不応の川崎病患者と、対照としての種々の熱性疾患患者の全血レベルでの遺伝子発現プロファイルを解析し、不応例に特異的なパターンを明らかにすること、(2) IVIG不応症例の血管内皮細胞の機能障害についてさらに検討し、炎症修復およびリンパ管新生に働く因子について解析する

こと、(3) IVIG 療法前後での川崎病患者血清が冠状動脈血管内皮細胞からの炎症性サイトカイン産生などに及ぼす影響について検討し、IVIG 療法で使用される濃度の精製 IgG による影響と比較すること、以上の3点を柱として研究をすすめた。

B. 研究方法

(1) マイクロアレイ解析

急性期の川崎病患者9名 (IVIG 反応例4名、不応例5名) から IVIG 療法の前後に静脈血を採取した。また対照として発熱が3日以上持続した同年齢の患者9名から静脈血を採取した。PAXgene™ Blood RNA Kit (BD Biosciences) を用いて直ちに細胞を融解し、プロトコールに従って RNA を抽出した。さらに Affymetrix 社の Globin Reduction プロトコールに従って網状赤血球由来のグロビン mRNA を除去した。精製された RNA から cRNA を合成し、GeneChip™ (HG-U133 Plus, Affymetrix 社) および遺伝子発現解析ソフト GeneSpring™ (Agilent Technologies 社) を用いて網羅的に遺伝子発現プロファイルを解析した。(研究協力者: 斎藤博久、国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部長)。

(2) マイクロアレイ解析の確認

急性期の川崎病患者55名 (IVIG 反応例40名、不応例15名) から IVIG 療法の前後に静脈血を採取した。マイクロアレイ解析で用いたのと同じ PAXgene™ システムおよび Globin Reduction プロトコールによって RNA を精製し、リアルタイム RT-PCR により特異的な遺伝子発現量を測定した。また一部の患者では、同時に採血された静脈血を用いて、血球細胞表面の抗原量をフローサイトメトリーで定量した。

(3) 川崎病患者血清

千葉大学付属病院にて入院加療を行った46例 (冠動脈正常例36例、冠動脈瘤合併例10例) の川崎病患者の凍結保存血清を使用した。ELISA 法にて IVIG 前後 (計92検体) の VEGF-D 値を測定した。

(4) 川崎病患者剖検心筋組織

急性期川崎病患者の剖検心筋組織を使用して、抗ヒト VEGF-D 抗体を用いて免疫組織染色を行い、急性期川崎病における VEGF-D 産生細胞の同定を行った。また、急性期および遠隔期川崎病患者の剖検心筋組織を使用して、リンパ管内皮細胞に対する特異的抗体 (clone D2-40) を用いて免疫組織染色を行い、リンパ管を同定した。画像解析装置を用いてリンパ管内腔の断面積を

計測し、急性期死亡例と遠隔期死亡例との比較検討を行った。

(5) 各種 IgG 標品の精製

市販の静注用 intact IgG 溶液を透析処理して蒸留水に置換した後、50,000MW 膜 (Sartorius 社、VIVASPIN CONCENTRATOR) を用いて遠心分離濃縮を行い、IgG20%濃度とした。標品の精製度は TSKG3000SW XL カラム (東ソー) を用いて HPLC ゲルろ過分析により確認した。LimulusHS-J SingleTest (Wako)により標品への LPS の混入は 50pg/ml 以下であることを確認した。

(6) 血管内皮細胞の刺激培養

ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC, Cambrex 社) は、5% FCS および種々の増殖因子 (Hydrocortisone, hEGF, R³-IGF-1, VEGF, hFGF-b) を含む EGM-2 培地 (Cambrex 社) を用いて 6well 平底プレート上でコンフルエントになるまで培養した。さらに培養液中の FCS 濃度を 0.1% として一晩培養した後、患者血清を最終濃度が 10% となるように添加して 15 分後 (リン酸化蛋白の免疫染色)、あるいは 4 時間後 (サイトカイン mRNA の定量) に細胞を回収した。

(7) mRNA の定量

血清添加の直前 (0 時間) および 1.5、4、24 時間後に各 well に細胞溶解液 (RNeasy*, Qiagen) を加え、RNeasy* Mini Kit を用いて RNA を抽出した。得られた totalRNA (1.0~2.0 μg) から逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、GAPDH、IL-6、IL-8、G-CSF、VEGF、E-Selectin、SOCS3 の各 mRNA 量を、特異的 primer を用いたリアルタイム RT-PCR により測定した。

(8) リン酸化 STAT 蛋白の免疫染色と定量

0.1% の FCS 濃度で一晩培養した HCAEC を 10% の患者血清を添加して 15 分間刺激培養した。0.025% Trypsine/0.01% EDTA 溶液の存在下で培養プレートから剥離し、BD Cytotfix solution (BD Bioscience 社) で 10 分間固定した。さらに BD PhosFlow Perm III solution (BD Bioscience 社) を加えて氷上に 30 分間静置し細胞膜を permeabilize した後、PE 標識抗リン酸化 STAT1, 3, 5 の各抗体 (BD Bioscience 社) を加えて細胞内リン酸化蛋白の免疫染色を行った。蛍光強度は FACSCalibur フローサイトメーター (BD Bioscience 社) を用いて定量した。

(倫理面への配慮)

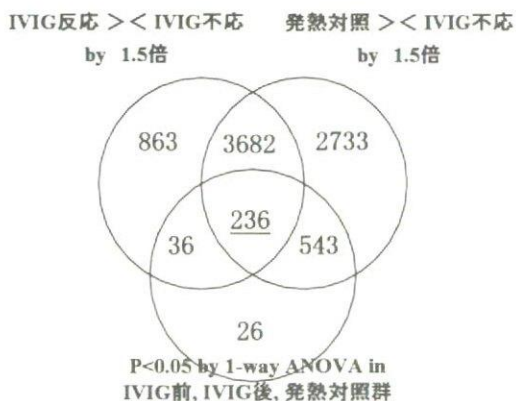
臨床検体を用いる遺伝子発現プロファイル解析の研究計画については国立成育医療センターの倫理審査を受け承認された。また臨床検体の採取および臨床情報の提供に当たっては、研究協力者の所属する各機関における倫理委員会の承認を得た。

川崎病患者および健常者の血清の採取ならびに研究計画については千葉大学大学院医学研究院の倫理審査委員会の承認を得た。本研究の目的及び医学的貢献について代諾者に十分に説明した上で、各所属機関における倫理規定に合わせて検体採取の同意を得た。また検体情報を記号化することにより、患者名などの個人情報が出漏しないように配慮した。

C. 研究結果

(1) PAXgene™ システムを用いた末梢血全血での遺伝子発現解析

昨年度に引き続き、本年度さらに、IVIG 療法不応例 5 名および発熱対照患者 4 名について遺伝子発現プロファイルを解析した。IVIG 療法前の時点で、治療反応群と治療不応群との間で有意に発現量の異なる遺伝子プローブを抽出することを目的として、治療反応群 4 名、治療不応群 5 名、発熱対照群 6 名、計 15 名分の遺伝子発現プロファイルを用いて 1-way ANOVA 解析を行った。その結果、3 群間で有意 ($p < 0.05$) に発現量が異なる 8649 個の遺伝子プローブを抽出した。この中で、治療反応群と比べて不応群において発現量が 1.5 倍以上あるいは 3 分の 2 以下だった遺伝子プローブが 4817 個、発熱対照群と比べて治療不応群において発現量が 1.5 倍以上あるいは 3 分の 2 以下だった遺伝子プローブが 7194 個見出された。昨年度の解析で抽出された、IVIG 療法後に発現量が有意に変動した遺伝子プローブ 1092 個と合わせて、以下の 3 つのカテゴリーによって、8649 個の遺伝子プローブを分類した (図 1)。

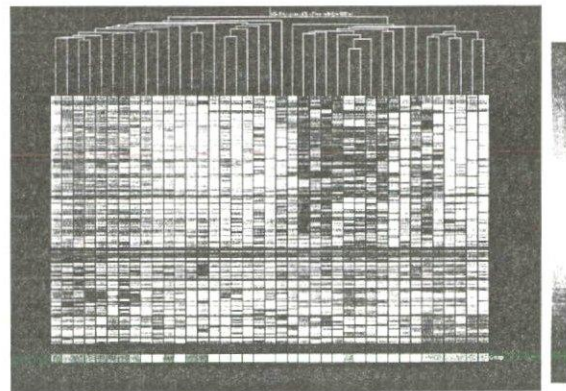


以上の結果から、3つのカテゴリーを全て満たす 236 個の遺伝子プローブを、川崎病急性期に特徴的であり、かつ IVIG 療法に対する応答性に関連する可能性のある遺伝子群として選択した。内訳は、IVIG 不応群において発現が亢進していた遺伝子が

179 個、逆に IVIG 反応群において発現が亢進していた遺伝子が 57 個である。

(2) 抽出されたマーカー遺伝子プローブ群による患者プロファイルの分類

(1) で選択された 236 個の遺伝子プローブを用いて、川崎病患者 9 名 (IVIG 反応例 4 名、不応例 5 名) の IVIG 療法前後での遺伝子発現プロファイル計 25 サンプル、および発熱対照群 9 名の遺伝子発現プロファイル計 14 サンプルを分類し、樹状図を作成した (図 2)。



その結果、IVIG 療法前の川崎病患者の 9 サンプル (樹状図下方に赤いブロックで示した)、IVIG 療法後も有熱状態が持続した不応例の 9 サンプル (樹状図下方のピンク色のブロック)、および解熱した患者の 12 サンプル (樹状図下方の黄色のブロック) は、各々同一グループとして別々の分枝上に分類された。これに対して、発熱対照患者群の有熱期の 9 サンプル (樹状図下方の緑色のブロック) は、2 サンプルが有熱期の川崎病患者群、1 サンプルが解熱後の患者群と同じ分枝上に各々分類された以外は、まとまったひとつの集団を形成した。川崎病患者群に分類された 2 サンプルは、急性期のトキシックショック症候群患者 2 名から得られたものだった。

(3) DNA マイクロアレイ結果の確認

DNA マイクロアレイ解析の結果を確認するために、リアルタイム RT-PCR を用いて mRNA を定量した。急性期の川崎病患者 47 名 (IVIG 反応例 32 名、不応例 15 名) の静脈血から抽出した RNA を用いて、アノテーションが明確で、免疫機能との関連が深い 6 種類のプローブ遺伝子 (A~F)、および代表的な 3 種類のサイトカイン、IL-1b、IL-6、IL-10 について、各々特異的なプライマーを作成してリアルタイム RT-PCR を行った。GAPDH の mRNA との相対比を IVIG 反応群と IVIG 不応群とで比較した。結果を表 1 に示す。

解析した 9 種類の遺伝子のうち、プローブ遺伝子 (A~F) および IL-1b、IL-10 の mRNA (GAPDH との比) は IVIG 療法後に有意に低下したが、IL-6 の

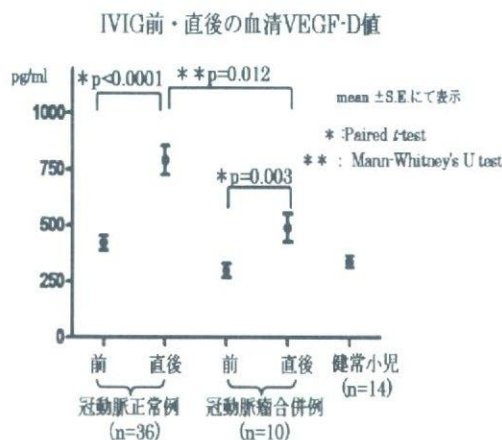
mRNA量はIVIG療法後も低下しなかった。また、プローブ遺伝子(A~E)およびIL-1b、IL-10は、IVIG療法前およびIVIG療法後の両方の時点で、治療不応群での発現量が治療反応群よりも高かった。1個の例外はあったが、マイクロアレイの結果がほぼ再現された結果だった。

表 1

	/GAPDH	反応群	不応群	p値
遺伝子A	治療前	83.6	286.2	<.0001
	治療後	5.1	29.3	<.0001
遺伝子B	治療前	15.5	29.3	.003
	治療後	7.8	13.5	.002
遺伝子C	治療前	18.7	28.9	.02
	治療後	4.1	11.4	.004
遺伝子D	治療前	40.6	60.1	.02
	治療後	8.9	37.3	.0001
遺伝子E	治療前	17.8	133.6	.001
	治療後	2.5	6.0	.0001
遺伝子F	治療前	11.5	12.2	.08
	治療後	6.9	8.4	.12
IL-1b	治療前	10.6	16.9	.03
	治療後	2.6	8.6	<.0001
IL-6	治療前	67.5	54.3	.27
	治療後	66.9	64.0	.78
IL-10	治療前	3.84	7.17	.04
	治療後	1.56	4.85	.003

リアルタイムPCRの結果が実際の蛋白量にも反映しているかについても検討した。急性期の患者53名(IVIG反応例40名、不応例13名)から採血した静脈血を用いて、蛍光標識抗体による免疫染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。その結果、プローブ遺伝子AおよびCはIVIG療法の前後で蛋白発現量が有意に低下したが、プローブ遺伝子BはIVIG療法による蛋白発現量の有意の変動は認められなかった。さらに、IVIG反応群とIVIG不応群とを比較すると、プローブ遺伝子Aだけが治療前および治療後の両方の時点で、治療不応群での蛋白発現量が治療反応群よりも有意に高かった。

(4) 川崎病患者の血清 VEGF-D 値



急性期川崎病患者の血清中の VEGF-D 濃度は IVIG 直後に IVIG 前と比べて有意に ($p < 0.0001$) 上昇した。さらに IVIG 直後の VEGF-D 値を冠動脈瘤合併例と冠動脈正常例とで比較すると、瘤合併例では正常例に比べて VEGF-D 濃度は有意に低かった ($p = 0.012$) (上図参照)。

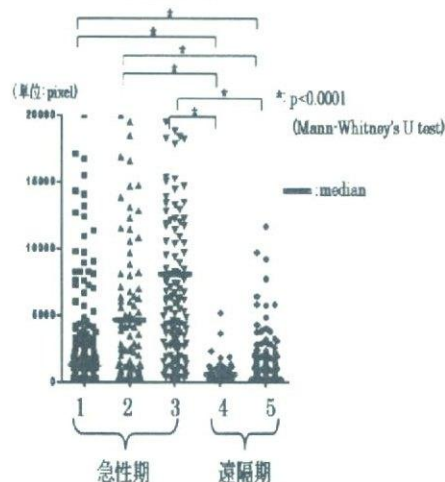
(5) 急性期川崎病患者剖検心筋組織における VEGF-D 発現細胞

急性期川崎病患者剖検心筋組織では、冠動脈血管内皮細胞および平滑筋細胞、リンパ管内皮細胞、心筋、浸潤マクロファージに VEGF-D 蛋白の発現を認めた。

(6) 川崎病患者剖検心筋組織でのリンパ管断面面積の計測

急性期心筋組織では遠隔期に比べリンパ管拡張を認めた(下図参照)。

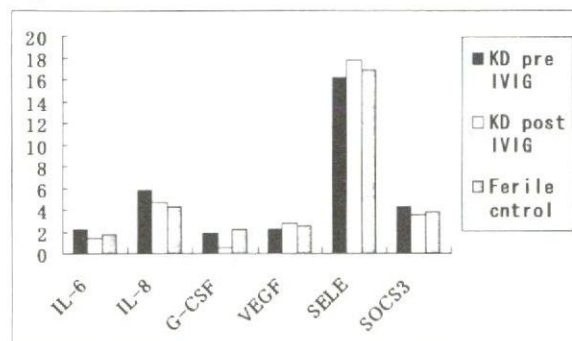
川崎病剖検心筋組織でのリンパ管断面面積の検討
(体表面積補正)



(7) 患者血清刺激後の冠動脈血管内皮細胞(HCAEC)における各種 mRNA 産生の亢進

牛胎仔血清を除いた HCAEC の培養液中に IVIG 療法前の患者血清 ($n=12$)、IVIG 療法後の患者血清 ($n=12$)、および対照発熱患者血清 ($n=12$) を最終 10% になるように添加して、各々最高値をとる時間帯の各種炎症性蛋白の mRNA 量を測定し、GAPDH との比を刺激前 (0 時間) からの増加率として計算した。IVIG 療法前後の患者血清を添加した後の mRNA 産生亢進を比べると、IL-6 および G-CSF の mRNA 産生は IVIG 療法前の血清添加の方が IVIG 療法後の血清添加と比べて有意に (各々 $p = 0.0001$, $p = 0.01$, paired t test) 亢進していた。反対に E-selectin の mRNA 産生は IVIG 療法後の血清添加の方が IVIG 療法前の血清添加と比べて有意に ($p = 0.01$) 亢進していた。IL-8、VEGF および SOCS3 の mRNA は IVIG 療法前

後の血清添加で有意の産生量の差はみられなかった。



(8) 患者血清刺激後の HCAEC における STAT 蛋白のリン酸化

HCAEC を 10% の患者血清で刺激した後のシグナル関連蛋白のリン酸化の状態を観察するために、細胞膜をエタノール固定して可溶化し、細胞質内および核内のリン酸化蛋白を、蛍光標識した特異抗体で検出した。抗 STAT1-P、抗 STAT3-P、抗 STAT5-P の各抗体について検索したが、患者血清添加後に有意の蛍光強度の変化がみられたのは抗 STAT3-P 抗体だけだった。

HCAEC に結合した抗 STAT3-P 抗体の平均蛍光強度 (MFI) は、IVIG 療法前の患者血清添加では 24.5 (n=5)、IVIG 療法後の患者血清添加では 16.6 (n=5) であり、IVIG 療法前の患者血清は療法後の患者血清と比べて有意 (p=0.02, paired t test) に HCAEC の STAT3 蛋白のリン酸化を誘導した。

D. 考察

IVIG 療法の作用機序として様々な仮説が提唱されてきたが、その内容は適応となる疾患ごとに異なっている。このように多様な生理活性をもつ生物製剤の治療ターゲットを同定するためには、遺伝子発現プロファイルのような網羅的な解析法が適していると考えられる。本研究では、川崎病の患者末梢血中の免疫細胞における遺伝子発現プロファイル DNA マイクロアレイで解析し、IVIG 療法の前後や対照発熱患者の遺伝子発現プロファイルと比較することにより、発現の変動する遺伝子を網羅的に捕捉すること、抽出された遺伝子の機能解析を通じて IVIG 療法の作用機序を明らかにすることを目標とした。

初年度は川崎病患者の末梢血から分離した単核球 (PBMC) および精製モノサイトの遺伝子発現プロファイルを解析したが、昨年度は、採血後の遺伝子発現への影響を最小限に抑えること、また好中球を含む免疫細胞全体の遺伝子発現プロファイルを把握することを目標として、新しい解析システム (PAXgene™ および Globin 吸収プロトコ-

ル) を導入して全血の遺伝子発現プロファイルを解析した。IVIG 療法の前後で有意に発現変動する遺伝子群が多数見出され、網羅的アプローチの有効性が確認された。と同時に、IVIG 療法が実際に患者の免疫細胞において多彩な生理活性を修飾することが実証された。注目すべき点は、IVIG 療法によって発現変動した遺伝子の大半が抑制的に制御されていたことである。外界からのシグナル受容体、糖・脂質代謝に働く酵素、細胞外に分泌される生理活性蛋白、転写調節因子など多彩な機能の遺伝子発現が抑制されていた。また、多くの遺伝子が主としてモノサイトで発現されるものであったことが特徴のひとつだった。

本年度は、昨年度に引き続き PAXgene™ を用いて、IVIG 療法不応の川崎病患者および発熱対照患者の静脈血全血における遺伝子発現プロファイルを解析した。IVIG 療法反応群、不応群、発熱対照群の 3 群間で遺伝子発現プロファイルと比較することにより、IVIG 療法に対する応答性の差を治療前の段階で予測することが可能なマーカー遺伝子群を同定することを試みた。3 群間の ANOVA 解析で抽出された 236 個の遺伝子プローブは、その選択の過程から、(1) IVIG 療法反応群の川崎病患者では、治療によってその発現量が有意に変動し、(2) IVIG 療法不応群の川崎病患者では、治療前からその発現量は IVIG 療法反応群と比べて高いあるいは低い、(3) 発熱対照の患者群と治療前の川崎病患者群とでは、その発現量に有意差がある、という特徴を有するはずである。マイクロアレイ解析に付随する問題点として、今回抽出された遺伝子群が、真に患者末梢血球細胞での発現パターンを反映しているか否かについては、個々の遺伝子についてリアルタイム PCR で確認する必要がある。実際に試みた、6 種類のプローブ遺伝子 (A~F) のリアルタイム PCR の結果では、1 つのプローブ遺伝子 F の発現量がマイクロアレイ解析の結果とは一致しなかった。しかし、他の 5 種類のプローブ遺伝子 (A~E) はすべて (1)~(3) の特徴を満たしていたので、マイクロアレイ解析自体の整合性は保たれていると考えた。これら 236 種の遺伝子の細胞生物学的な機能や主な産生細胞の種類などの詳細な解析はこれから行う予定である。遺伝子産物間の直接あるいは間接的な相互作用や、細胞機能における連関などのパスウェイを明らかにすることで、IVIG 療法の作用機序を明らかにする情報が得られるのではないかと期待している。さらに、これら 236 種の遺伝子の発現制御に関わる共通の転写因子を検索することにより、IVIG 療法の作用において重

要なシグナル伝達経路も明らかにできるのではないかと期待している。

図2に見る通り、抽出された236個の遺伝子プローブの中には、IVIG療法反応群では治療後に発現量が激減するのに対して、IVIG療法不応群では治療後も発現量がやや減少するだけで、追加のIVIG投与やステロイド療法などにより初めて反応群と同じレベルまで発現量が減少するものが多くみられた。このような挙動を示す3種類のプローブ遺伝子(A~C)について、フローサイトメトリーによる蛋白量の測定を行った。3種類のうちの2つでは、確かにIVIG療法前後で細胞表面の蛋白量の減少がみられたが、mRNA量と蛋白量とが相関しないもの(遺伝子B)もあった。治療効果判定のためには、蛋白量測定の方がmRNAの定量よりも簡便かつ短時間でできるため、抽出された遺伝子プローブの中から有意に蛋白量も変動するプローブを検索する試みを続ける必要がある。今回試行した中では、プローブ遺伝子Aだけが、治療前および治療後の両方の時点で、治療不応群での蛋白量が有意に高かった。これについては、IVIG療法に対する川崎病患者的治療反応性を予測する前向き研究を、今後すすめる予定である。

川崎病血管炎で惹起される血管内皮細胞障害とその障害修復の機序についての研究では、昨年度までに、IVIG療法の不応症例から得られた治療後血清には、HUVECの血管透過性を亢進させ、さらに管腔形成を低下させる作用があること、これらの作用は可溶性VEGF-R1やVEGF-R2I、さらにp38MAPK阻害剤などでHUVECを前処理することにより抑制されることを明らかにした。VEGFは、IVIG療法不応症例にみられる強い血管透過性亢進を来たす病態に重要な役割を担っていると考えられたため、今年度はさらに、VEGFファミリー蛋白のひとつである、VEGF-Dの川崎病の病態における役割について検討した。VEGF-Dはリンパ管新生作用を有し、炎症反応などにおける組織修復に関与すると考えられている。

血清中のVEGF-D濃度は、IVIG療法の直後に有意に($p < 0.0001$)上昇し、さらに冠動脈瘤合併例では冠動脈正常例に比べて上昇幅が有意に低かった($p = 0.012$)。血管炎の修復過程にVEGF-Dが関与し、その産生が多い場合は炎症が速やかに消退し、瘤形成に至らない可能性が考えられた。さらに、急性期の川崎病患者剖検心筋組織の免疫組織染色を行い、冠動脈の血管内皮細胞および平滑筋細胞、リンパ管内皮細胞、心筋、浸潤マクロファージにVEGF-D蛋白の発現を認めた。川崎病血管炎の局所では、VEGF-Dを発現す

る様々な細胞が存在し、炎症修復に働いている可能性があると考えられた。

IVIG療法前後の川崎病患者血清が冠状動脈血管内皮細胞(HCAEC)に与える影響について調べるために、今年度はさらに、HCAECにおけるIL-6、IL-8、G-CSF、VEGF、E-selectin、SOCS3のmRNA産生誘導について検討した。IVIG療法前の川崎病患者血清および発熱対照患者血清は、患者間での変動はあるものの、いずれもHCAECにおけるIL-6、IL-8、G-CSF、VEGF、E-selectin、SOCS3のmRNA産生を誘導した。ペア血清による解析では、IL-6、G-CSF、E-selectinの3種類においてのみIVIG療法前後での誘導量に有意差が認められた。IVIG療法で使用される濃度(最終濃度20mg/ml)の精製IgGの添加では、上記6種類のmRNA量にIgG無添加HCAECと比べて有意差は認められなかった。したがって、IVIG療法後の川崎病患者血清でIL-6、G-CSFの産生誘導能が低下した理由は、血清中の炎症性サイトカイン濃度がIVIG療法後に低下したためか、あるいは高濃度のIgGがこれらの炎症性刺激に対するHCAECの感受性を低下させたためと考えられる。高濃度IgGが、HCAECの炎症感受性を低下させる直接作用を有するの否か、その分子メカニズムについては、今後の検討が必要である。

E. 結論

急性期の川崎病患者においてIVIG療法前後での遺伝子発現プロファイル解析を行い、治療経過に並行して変動するマーカー遺伝子群を抽出した。IVIG療法不応例ではマーカー遺伝子群の発現抑制が弱く、IVIGの追加投与やステロイド療法による臨床症状の改善とともに発現レベルは低下した。これらのマーカー遺伝子群のオントロジー検索からIVIG療法の作用機序を推測すると共に、治療効果予測に向けたマーカー蛋白の前向き調査研究を今後すすめる予定である。

またIVIG療法不応症例の血清によって惹起される血管内皮細胞の細胞間透過性の亢進および管腔形成能の低下には、血清中のVEGFやVEGF-D、血管内皮細胞のp38MAPKの活性化など、種々の因子が関与する可能性が示された。血管内皮細胞からのIL-6やG-CSFなどの産生誘導を通じて炎症サイクルが拡大する可能性も考えられた。今後の川崎病の治療戦略を考える上での有用な所見が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Higashi K, Terai M, Hamada H, Honda T, Kanazawa M, Kohno Y. Impairment of angiogenic activity in the serum from patients with coronary aneurysms due to Kawasaki disease. *Circulation*, (in press).
2. 阿部淳. 川崎病の病因と病態. *小児科診療*. 2006, 69:975-980.
3. 寺井勝, 安川久美, 浜田洋通. 急性期管理: γ -グロブリン治療の基礎と臨床. *小児科診療*. 2006, 69:989-993.

2. 学会発表

1. 阿部 淳. 川崎病のトランスクリプトーム解析. 第6回小児心血管分子医学研究会, 東京. 1月6日, 2006
2. 阿部 淳, 江畑 亮太, 野村 伊知郎, 地引利昭, 斎藤 博久, 寺井 勝. 遺伝子発現プロファイルによる IVIG 療法の効果判定. 第26回日本川崎病研究会, 大阪. 10月14-15日, 2006.
3. 東 浩二, 浜田 洋通, 江畑 亮太, 遠山貴子, 本田 隆文, 安川 久美, 寺井 勝. p38mitogen-activated protein kinase 阻害剤による治療の可能性. 第26回日本川崎病研究会, 大阪. 10月14-15日, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社