

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  
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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  
寺井 勝
- (2) 株式会社ベネシス研究開発本部 平尾 豊

### A. 研究目的

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ている。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。

本研究では、川崎病におけるIVIG療法の作用機序の解明と、新しい治療標的分子の探索を目的として、(1)IVIG療法前後での川崎病患者の末梢血中の免疫細胞の遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイで解析する、(2)対照発熱患者の遺伝子発現プロファイルも解析して、川崎病患者で特異的に、治療前後で発現が有意に変動した遺伝子を抽出し、(3)遺伝子発現と蛋白発現量を照合した上で、これらの蛋白の発現量変化と川崎病患者の臨床経過との関連を解析する、さらに(4)これらの蛋白の産生制御に対するIgGの作用について解析する、また(5)川崎病初期にみられる血管透過性の亢進と組織液貯留に対する免疫グロブリンの作用について解析する、以上の5点を目的とした。

### B. 研究方法

#### (1) マイクロアレイ解析

川崎病急性期の患者4名から、IVIG療法の前後に静脈血を採取した。遠心分離により単核球(PBMC)を、ネガティブセクションによりモノサイトとT細胞を各々精製し、各分画からRNA

を抽出して Affymetrix 社の GeneChip™ (HG-U133A) を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。また、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。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) および Affymetrix 社の Globin Reduction プロトコールに従って RNA を精製し、GeneChip™ (HG-U133 Plus) で遺伝子発現プロファイルを解析した。統計解析には、遺伝子発現解析ソフト GeneSpring™ (Agilent Technologies 社) を用いた。(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。血清中の S100 カルシウム結合蛋白 S100A8/A9 の濃度は ELISA で測定した。

## (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 22 例 (IVIG 反応例 10 例、IVIG 不応例 12 例) の川崎病患者 (計 40 検体) の凍結保存血清を使用して血管内皮細胞機能への影響を調べた。また、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て、ELISA で VEGF-D 値を測定した。

## (4) 培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) による管腔形成能

マトリゲルでコートしたプレート上でヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC、Clonetics 社) を培養し、形成された血管長の合計を画像解析にて定量評価した。

## (5) インビトロ HUVEC 透過性実験

HUVEC をトランスウェルの上層に播種し、FITC-dextran および患者血清や血管透過性刺激物質を upper chamber に加え、2 時間後に lower chamber に漏れ出た FITC-dextran を蛍光吸光度計にて測定し、透過率を算出した。

## (6) 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た。

## (7) 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。F(ab')<sub>2</sub> 画分の精製は、市販の静注用 intact IgG 溶液を 100mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) で透析処理後、ペプシンで 37℃ 24 時間酵素処理を行い、PBS (pH7.4) で再度透析処理後、プロテイン A 処理を行い、非吸着画分を分取し 10 万カットの濃縮膜にて濃縮した。また、市販の静注用 intact IgG 溶液を 5mM リン酸緩衝液 (pH8.0) にて透析後、システイン、EDTA およびパペイン (100 μg/mL) で 37℃ 24 時間酵素処理を行った後、10mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) で透析し、50%飽和硫酸沈殿物を蒸留水に溶解した。蒸留水にて透析処理 (5℃) を行うと Fc は結晶化する。結晶化 Fc を集め溶解・結晶化を繰り返して精製 Fc 画分とした。

## (8) 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, R<sup>3</sup>-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 1, 4, 24 時間後 (サイトカイン mRNA の定量) に細胞を回収した。

## (9) 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)、BD PhosFlow Perm III solution (BD Bioscience 社)、PE 標識抗リン酸化 STAT1, 3, 5 の各抗体 (BD Bioscience 社) を用い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らないように配慮した。

### C. 研究結果

#### (1) 川崎病患者の末梢血単核球における遺伝子発現プロファイル

末梢血単核球 (PBMC) を対象とした遺伝子発現解析では、IVIG療法によって2倍以下に発現が低下したものが85個、2倍以上に増加したものが4個だった。さらに末梢血から精製されたモノサイトを対象とした遺伝子発現解析では、IVIG療法後に有意に発現が2倍以下に低下した遺伝子が131個、2倍以上に増加した遺伝子が67個見出された。18個の遺伝子が、両方の解析において抑制的に制御された。これらの遺伝子の中には、細胞外に分泌されて血管拡張作用を示すアドレノメデュリン (ADM) や血管内皮細胞に働いて炎症惹起作用を示すS100A8、S100A9、S100A12などのS100カルシウム結合蛋白ファミリー、さらにFCGR1A、FCGR3A、CCR2などの細胞表面受容体の遺伝子が含まれており、リアルタイムPCRでもその抑制が確認された。同時に測定したTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子の発現量は、IVIG療法後も有意な低下はみられなかった。

#### (2) S100カルシウム結合蛋白の血中濃度：

上記の18個の遺伝子の中から、S100A8/A9ヘテロダイマーの血漿中濃度をELISAで定量した。その結果、S100A8/A9ヘテロダイマーは、急性期の川崎病患者で他の有熱対照患者と比べて有意に上昇しており、IVIG療法後に有意に低下することが見出された。IVIG療法不応例ではS100A8/A9ヘテロダイマーの低下が少ない傾向がみられた。

#### (3) PAXgene™ システムを用いた末梢血全血での遺伝子発現プロファイル

IVIG療法反応例4名、不応例5名および発熱対照患者6名について、グロビン mRNA を除いた全血レベルでの遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、(1) IVIG療法反応良好な患者では、1092個の遺伝子プローブが治療の前後で有意に発現量が変動した。また、IVIG療法前の遺伝子発現プロファイルに限って上記の3群間で

の違いを比べると、(2) 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、(3) 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。(1)～(3)の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抽出した。

#### (4) 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

抽出された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。その結果、IVIG療法前の川崎病患者の9サンプル、IVIG療法後も有熱状態が持続した不応例の9サンプル、および解熱した患者の12サンプルは、各々別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分類された以外は、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、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。

#### (5) 全血マイクロアレイ解析の確認

リアルタイムRT-PCRを用いてDNAマイクロアレイ解析の結果を確認した。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についてリアルタイムRT-PCRを行った。その結果、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。さらに、プローブ遺伝子 (A～C) について、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蛋白量を解析した。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、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治療反応群よりも有意に高かった。

(6) 川崎病患者血清による HUVEC 管腔形成能および細胞間透過性への影響

HUVEC の管腔形成能は、IVIG 療法不応例の血清を添加すると障害されたが、健常小児ならびに有熱疾患対照血清、IVIG 反応例の患者血清では障害されなかった。また、IVIG 不応例の治療後血清を添加すると、細胞間透過率は健常小児例ならびに有熱疾患例の対照血清添加時と比べて、有意に亢進した ( $p < 0.005$ )。患者血清を soluble-VEGFR1 あるいは VEGFR2-I とともに前処理することにより、血清の透過性亢進作用は各々有意に ( $p=0.016$ ,  $p=0.0047$ ) 抑制された。

精製 IgG、ペプシン処理化 IgG、BSA を種々の濃度 ( $0.1 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ ) で添加し HUVEC への影響を調べた。単層培養へ  $1000 \mu\text{g/ml}$  の高濃度で添加すると、どの成分でも細胞間透過性がわずかに抑制されたが、各成分間に有意差は認めなかった。またインビトロ管腔形成能への影響は認められなかった。

(6) HUVEC における活性化 p38 MAPK の発現と阻害剤による機能障害の抑制

川崎病患者血清存在下での HUVEC における活性化 p38 MAPK の発現についてウェスタンブロット法を用いて検討した。治療前血清にて刺激した HUVEC では、活性化 p38 MAPK が強く発現していた。IVIG 反応例の治療後血清で刺激すると、p38 MAPK の活性化は減少したが、IVIG 不応例の治療後血清で刺激しても、HUVEC の p38 MAPK の活性化は減少しなかった。さらに、IVIG 不応例の血清刺激によって亢進していた HUVEC 透過率は、PD98059 による前処置では有意の変化はみられなかった ( $p=0.28$ ) が、SB203580 による前処置では有意に抑制された ( $p=0.027$ )。また、HUVEC 管腔形成能も、PD98059 による前処置では有意の変化はみられなかった ( $p=0.17$ ) が、SB203580 による前処置では有意に改善され健常血清添加時と同程度に回復レベルにまで亢進した ( $p=0.002$ )。

(7) 川崎病患者の血清 VEGF-D 値と患者剖検心筋組織における VEGF-D 発現

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 ( $p=0.012$ )。また、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。

(8) 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 産生の亢進と STAT 蛋白のリン酸化

IVIG 療法前後の患者血清、および対照発熱患者血清を添加して、冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) からの GAPDH、IL-6、IL-8、G-CSF、VEGF、E-Selectin、SOCS3 の mRNA 産生量を比較した。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。また、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、2 年度以降は、採血後の遺伝子発現への影響を最小限に抑えること、好中球を含む免疫細胞全体のプロファイルを把握することを目指して、新しい解析システム (PAXgene<sup>TM</sup> および Globin 吸収プロトコール) を導入して全血の遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、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。このうち FCGR1A、FCGR3A、S100A9 の3つの遺伝子について、今回川崎病患者では初めて、蛋白レベルでの IVIG 療法後の発現抑制を証明した。さらに、S100A8/A9 ヘテロダイマーの血漿中濃度は、他の熱性疾患対照患者と比べても急性期の川崎病患者で有意に高く、IVIG 療法後に急速に低下する点が注目された。

全血における遺伝子発現プロファイルの解析では、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を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の候補として236個の遺伝子プローブが同定された。このうち、5種類のプローブ遺伝子(A~E)はリアルタイムPCRの結果もマイクロアレイ解析の結果と一致していた。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。また、フローサイトメトリーを用いて3種類の遺伝子プローブの蛋白量の測定を行った結果、1つのプローブ遺伝子Aが、治療前および治療後の両方の時点で治療不応群で有意に高い発現量を示し、IVIG 療法に対する川崎病患者の治療反応性を予測できる可能性が示された。

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、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す病態に重要な役割を担っていると考えられる。さらに、VEGF ファミリー蛋白のひとつである、VEGF-D の血中濃度は、IVIG 療法の直後に有意に上昇し、

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。急性期の川崎病患者剖検心筋組織での発現も認められ、川崎病血管炎の修復過程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の添加により、冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) での IL-6、IL-8、G-CSF、VEGF、E-selectin、SOCS3 の mRNA 産生誘導がみられた。IL-6、G-CSF mRNA の産生誘導は IVIG 療法前の血清で有意に強く、局所で産生された炎症性サイトカインによる炎症増幅サイクルの存在が推測された。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、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 p38 MAPK 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. Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene-expression profiling of the effect of high-dose intravenous immunoglobulin in patients of Kawasaki Disease. *J Immunol*, 2005, 174: 5837-5845.
2. Nomura I, Abe J, Noma S, Saito H, Gao B, Wheeler G, Leung D. Adrenomedullin is highly expressed in blood monocytes associated with acute Kawasaki disease: a microarray gene expression study. *Pediatr Res*. 2005, 57: 49-55.
3. 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).

4. 阿部 淳. 川崎病の病因と病態. *小児科診療*. 2006, 69:975-980.
5. 寺井勝, 安川久美, 浜田洋通. 急性期管理:  $\gamma$ -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. Abe J, Terai M, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H. DNA Microarray Analysis of Kawasaki Disease Patients Treated with High-dose Intravenous Immunoglobulin Infusion. 12th Int Congr Immunol, Montreal, Canada. Jul 4-8, 2004.
2. 東 浩二、江畑亮太、遠山貴子、本田隆文、安川久美、寺井 勝. 急性期川崎病冠動脈瘤患者にみられるインビトロ血管内皮細胞管腔形成不全のメカニズム 第 52 回日本心臓病学会、京都、日本、Sep.13-15, 2004
3. Higashi K, Ebata R, Honda T, Yasukawa K, Toyama T, Jibiki T, Hamada H, Kanazawa M, Terai M. Impairment of serum angiogenic activity in acute Kawasaki Disease: 8th International Kawasaki Disease Symposium, San Diego, CA, USA, Feb.17-20, 2005
4. Abe J, Jibiki T, Noma S, Nakajima T, Saito H, Terai M. Gene-expression profiling of the effect of high-dose intravenous immunoglobulin in patients of Kawasaki Disease. 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research. Tokyo, Japan. Nov 24-26, 2005.
5. 東 浩二、寺井 勝 川崎病と p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) 第 53 回日本心臓病学会、大阪、日本、Sep.19-21, 2005
6. Higashi K, Ebata R, Honda T, Yasukawa K, Hamada H, Terai M. In vitro endothelial cell dysfunction induced by serum from patients with Kawasaki disease is modulated by p38 mitogen activated protein kinase. American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, TX, USA, Nov.12-16, 2005
7. 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
8. 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

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.

9. 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