

Week 4 (n=236)

0.05 (0.02-0.2)

0.07 (0.02-0.16)

0.72

---

IVIG=intravenous immunoglobulin. PSL=prednisolone.

Data are mean±SD or median with interquartile range.

P values were calculated with the Mann-Whitney U test, except those for % neutrophil, hematocrit, blood glucose, and total cholesterol, which were calculated with the two-sample t-test.

Figure 1. Enrolment, randomization, and follow-up of study patients.

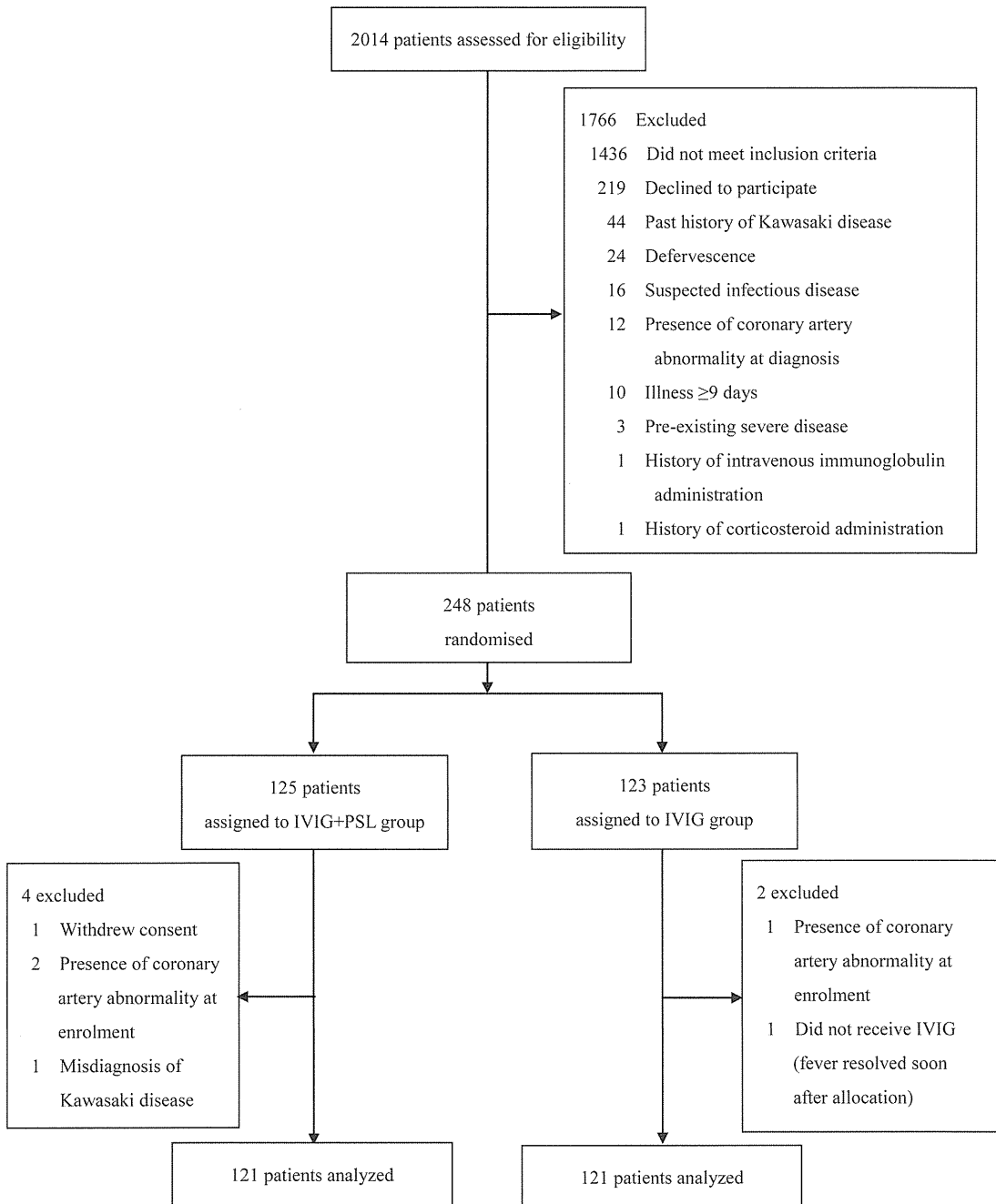
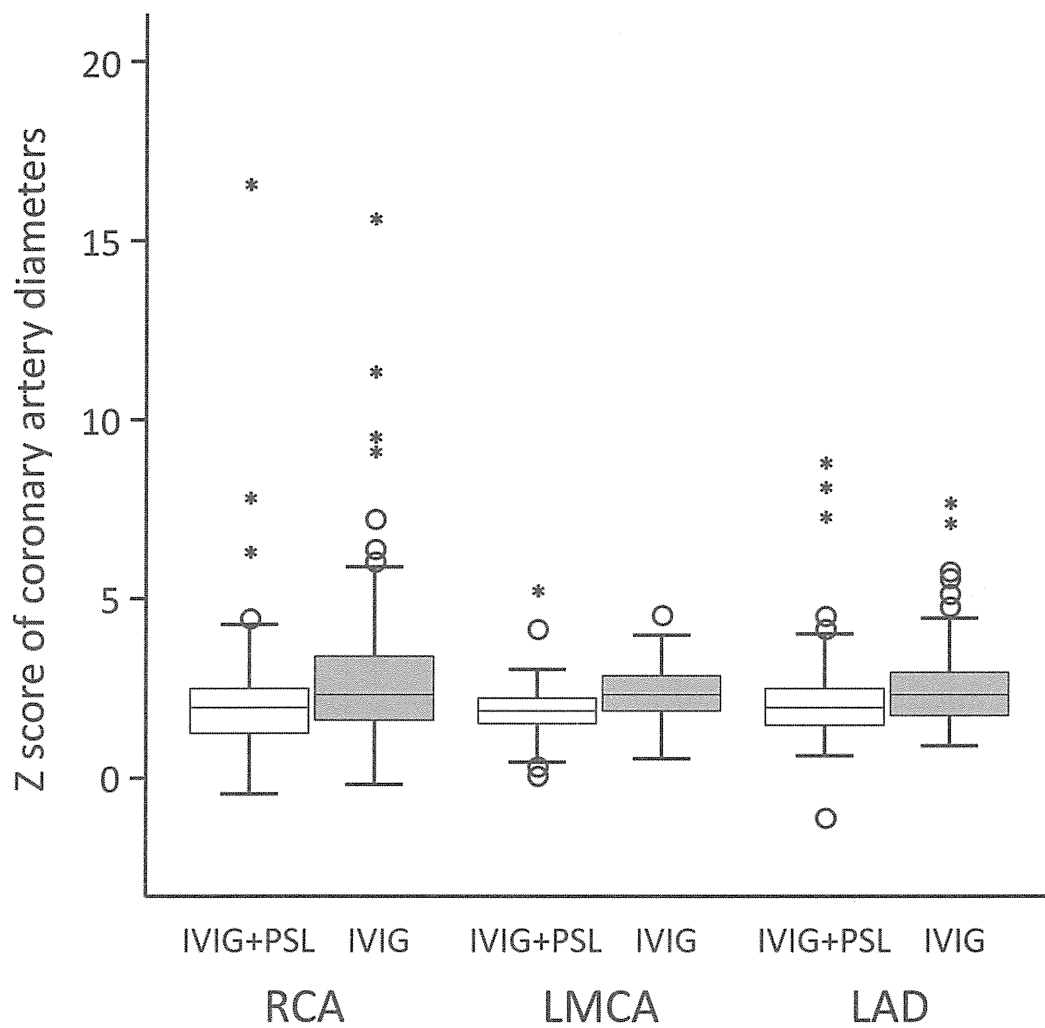


Figure 2: Maximum Z score of each coronary artery



## Figure Legend

### Figure 1

IVIG=intravenous immunoglobulin. PSL=prednisolone. The entrance criterion was a risk score of 5 points or higher, which explains why most of the 1,436 patients were not eligible to participate in the study. Three patients were excluded after randomization because echocardiograms of the coronary artery at enrolment were classified as abnormal in a centralized review of echocardiography data. Patients assigned to the IVIG group received IVIG 2 g/kg with aspirin 30 mg/kg/day until they were afebrile, followed by aspirin 3–5 mg/kg/day until 2 months after onset. Patients in the IVIG+PSL group received the same IVIG regimen, plus PSL (2 mg/kg/day, in 3 divided doses) given by intravenous injection in 5 days. If fever resolved, PSL was changed to oral administration. When C-reactive protein level normalized ( $\leq 0.5$  mg/dL), doses of PSL were tapered over 15 days, in 5-day steps, from 2 to 1 to 0.5 mg/kg/day.

### Figure 2

IVIG=intravenous immunoglobulin. PSL=prednisolone. RCA=right proximal coronary artery. LMCA=left main coronary artery. LAD= Proximal left anterior descending artery. The boxplot shows the median and the IQR. Error bars show the largest and smallest values that were not outliers. Circles represent values that are more than 1.5 box-lengths from the 25th and 75th percentiles (outliers). Asterisks show values that are more than 3.0 box-lengths from the 25th and 75th percentiles (extreme values). Circles and asterisks represent individual patients.

## 重症川崎病患者における免疫グロブリン+プレドニゾロン初期併用療法 不応例の検討

分担研究者 荒川浩一 群馬大学大学院小児科学分野 教授  
研究協力者 小林 徹 群馬大学大学院小児科学分野 助教

研究要旨：RAISE studyで免疫グロブリン+プレドニゾロン(IVIG+PSL)療法に登録された症例を対象に治療抵抗例に関連する患者背景・血液検査結果を抽出した。IVIG+PSL群のうち、17例が治療抵抗例であった。治療抵抗例では有効例に比べ総ビリルビン、ASTが有意に高値であり、Na、総コレステロールが有意に低値であった。リスクスコア点数は全く同等であり、白血球数、BNP、CRP値はIVIG群と異なり治療抵抗例でより低値な傾向であった。今後大規模前向きコホート研究を実施し、本仮説が検証されることが望まれる。

### A. 研究目的

川崎病は小児期に好発する原因不明の血管炎症候群であり、無治療では高率に冠動脈病変(CAL)を合併することが知られている。また、治療抵抗例や冠動脈病変合併例では冠動脈病変合併頻度が上昇することが知られている。

平成20年度より重症川崎病患者に対する新たな多施設共同前方視的無作為化比較試験(RAISE Study)が開始された。RAISE Studyによって重症川崎病患者に対する免疫グロブリン(IVIG) +プレドニゾロン(PSL)初期併用療法が標準的治療であるIVIG療法に比べ冠動脈病変形成抑制と治療抵抗例抑制に優れていることが前方視的に証明された。一方でIVIG+PSLで解熱しない症例や再発熱を来した症例も少数例ながら散見された。これらIVIG+PSL不応例がどのような因子に関連しているかは明らかに

なっていない。

そこで本分担研究ではRAISE Studyに登録された患者データをサブ解析し、IVIG+PSL不応例に関連する因子を見出すことを目的とした。

### B. 研究方法

対象患者は2008年9月29日～2010年12月2日までの期間にRAISE Studyに登録された248例中、最終解析に至ったIVIG+PSL群121症例とIVIG群121症例の計242症例。

各群間における登録前血液検査結果と患者背景と臨床予後(治療抵抗例)との関連をMann-WhitneyのU検定、もしくはFisherの直接確率法にて検定した。両側検定で $P < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

### C. 研究結果

IVIG群における治療抵抗例(初期治療不

応例・再燃例)と有効例との治療前患者背景・血液検査結果を表1に示す。IVIG群121症例のうち、52例(40%)が治療抵抗例であった。治療抵抗例では有効例に比べ好中球%、総ビリルビン、BNP、リスクスコア点数が有意に高値であった。

IVIG+PSL群における治療抵抗例と有効例との治療前患者背景を表2に示す。IVIG+PSL群のうち、17例が治療抵抗例であった。治療抵抗例では有効例に比べ総ビリルビン、AST、総コレステロールが有意に高値であり、Naが有意に低値であった。リスクスコア点数は全く同等であり、白血球数、BNP、CRP値はIVIG群と異なり治療抵抗例でより低値な傾向であった。

IVIG+PSL群における治療抵抗例予測の予測効率を検証するためのROC曲線下の面積を算出した。ROC曲線下の面積は総ビリルビン 0.78 (95%信頼区間0.66-0.91)、Na 0.28 (95%信頼区間0.12-0.44)、総コレステロール 0.34 (95%信頼区間0.21-0.47)、AST 0.63 (95%信頼区間0.47-0.79)であった。

#### D. 考案

本検討により、IVIG+PSL抵抗例に関連する因子として総ビリルビン、Na、総コレステロール、ASTの4因子が関連していることが明らかとなった。中でも総ビリルビン値、Naは治療抵抗例に強く関連しており、8割近い精度でIVIG+PSL抵抗例を予測することが可能であった。治療抵抗例を早期に抽出し、その上でどのような治療戦略をとるべきかが問題となる。川崎病治療における初期治療不応例に対してはIVIG投与がゴールドスタンダードであると言われている。しかしコントロールスタディーが存在

しないためエビデンスレベルは低く、現治療抵抗例に対してどのような追加療法を、もしくは更に強力な初期治療強化療法検討する必要があると考えられる。

一方IVIG+PSL群とIVIG群との治療抵抗例に関連する因子の差は興味深い。治療反応性に関連すると報告されている因子のうち、CRP、白血球数、BNPはIVIG+PSL療法有効例に比べ抵抗例でより低値であり、既知の報告とは異なる傾向にあった。実際PSLを追加療法として使用し巨大冠動脈瘤を形成した過去のケースシリーズでは治療開始前のCRPは5 mg/dL前後と低値であった。今回のデータベースでは治療抵抗例の症例数が17例と少なかったため本検討で結論を出すことはできないが、テーラーメイド医療に向けた一つの仮説を提供しているようにも思える。今後前向きコホート研究で検討すべきテーマであろう。

#### E. 結論

IVIG+PSL治療抵抗例に関連する因子を検討し、治療抵抗例では有効例に比べ総ビリルビン、ASTが有意に高値であり、Na、総コレステロールが有意に低値であることを見いだした。白血球数、BNP、CRP値はIVIG群と異なり治療抵抗例でより低値な傾向であった。今後大規模前向きコホート研究を実施し、本仮説が検証されることが望まれる。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobayashi T, Saji T, Otani T,

- Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Fukazawa R, Ogawa C, Furuno K, Tokunaga H, Takatsuki S, Hara S, Morikawa A, RAISE Study Group Investigators. Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease: a prospective, randomised, open, blinded-endpoint trial. The LANCET, in press.
2. 小林徹、小林富男、荒川浩一. 川崎病急性期治療の進歩. 循環器内科. 69(4):324-329
2. 学会発表
1. Kobayashi T, Saji T, Otani T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Morikawa A, The RAISE Study Investigators. Efficacy of Primary Therapy With Intravenous Immunoglobulin Plus Prednisolone for Severe Kawasaki Disease - Results From a Japanese Multicenter Randomized Clinical Trial. American Heart Association Scientific Session 2011, Orlando, Miami, USA, Nov 14, 2011
2. Kobayashi T, Kobayashi T, Ishii Y, Seki M, Ikeda K, Shimoyama S, Suzuki T, Arakawa H. The association between serum cytokines/chemokines and a risk score in the acute phase of Kawasaki Disease. International Congress on Coronary Heart Disease 2011, Venice, Italy, Oct 25, 2011.
3. 小林徹、小林富男、石井陽一郎、関満、池田健太郎、下山伸哉、鈴木尊裕、荒川浩一. 急性期川崎病患者における血清サイトカイン・ケモカイン値とリスクスコアとの関連. 第114回日本小児科学会学術集会. 2011.8.14. 東京
4. 小林徹、佐地勉、大谷哲也、竹内和夫、中村哲也、荒川浩一、加藤太一、原寿郎、濱岡建城、小川俊一、三浦大、野村裕一、布施茂登、市田露子、鮎沢衛、阿部淳、森川昭廣、RAISE Study Investigators. 重症川崎病患者に対する免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用投与は冠動脈予後と臨床経過を改善する. 第38回日本小児臨床薬理学会. 2011.11.3. 大津
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 川崎病血管炎発症における酸化ストレスの一次的関与に関する実験的検討

研究分担者 濱岡 建城 京都府立医科大学 小児循環器・腎臓科 教授

**研究要旨：**川崎病血管炎のモデル動物として用いられるCandida albicans water-soluble fraction (CAWS) 投与マウスの酸化ストレス動態を測定し、血管炎発症機序における酸化ストレスの関与について検討した。その結果、酸化ストレスの指標であるROMはCAWS投与後1日で有意に高値を示し、抗酸化力の指標であるBAPは投与7日後に上昇傾向を示した。血管組織への炎症性細胞の浸潤は投与7日後で認められることから、川崎病血管炎発症に酸化ストレスが一次的に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

動脈硬化性病変への進展に、酸化ストレスが強く関与していることは既に知られており、炎症と相互に作用し増幅されるため血管炎を主体とする川崎病においても、その関与が疑われていた。これまで、我々は臨床学的な検討を重ね、川崎病血管における酸化ストレスの存在を確認し報告してきた。酸化ストレスは、活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)の生成系と消去系のバランスが崩れた状態であることから両者を評価することが必要であると考え、川崎病急性期症例におけるそれぞれの指標を測定した。その結果、IVIG不応群の消去系指標が、奏功群とは異なる動きを示し、IVIGの反応性を予測する指標となり得る可能性が示唆された。このように、川崎病の病態においても酸化ストレスは重要な役割を果たしていると推測される。

近年、血管外膜繊維芽細胞のNADPH oxidaseに由来するROSが血管平滑筋細胞の増殖、血管新生、内皮機能に影響を与え、

動脈硬化における血管リモデリングに重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。前述のとおり、動脈硬化の発症・進展メカニズムには、炎症および酸化ストレスが互いに増悪因子として働き、血管内皮障害も加わり悪循環が形成されて進行していくが、その起点は明らかにされていない。

そこで、川崎病血管炎における酸化ストレスの病因論的関与を解明する目的で、川崎病血管炎モデルマウスを用いた基礎研究を計画した。

### B. 研究方法

マウスはCAWSに対する感受性が高いとされるDBA/2を用いた。モデル作成は大野らが確立した方法に従い、CAWS 4mg/mouseを5日間腹腔内に投与して血管炎を誘発し、CAWS投与前、投与1日後、7日後および14日後の酸化ストレスを測定した。

酸化ストレスは、ウイスマー社製酸化ストレス自動測定器を使用した。酸化ストレスの指標としてreactive oxygen



metabolites (ROM)をd-ROMs test、抗酸化力の指標としてbiological antioxidant potential (BAP)をBAP testを用いて測定した。

### C. 研究結果

CAWS投与後の体重(図1)および心重量(図2)に、有意な変化は認められなかった。

CAWS投与1日後のROMは、投与前と比較して有意に高値を示し、7日後には低下した(図3)。

一方、BAPはCAWS投与1日後では変化しなかったが、7日後で上昇傾向を示した(図4)。

### D. 考察

これまで、川崎病急性期における酸化ストレスの関与を臨床学的検討から報告してきたが、血管炎発症機序における酸化ストレスの病因論的関与について明らかではなかった。酸化ストレスと炎症は密接に関わり合い、相互に増悪因子となり得るが、どちらが起点であるのかということは解明されていない。

今回、CAWS投与マウスにおいて、投与後1日ですでにROMが投与前と比較して有意に高値を示した。血管炎の発症を、炎症性細胞の血管外膜側からの浸潤とするならば、今回用いたDBA/2ではCAWS投与後7日前後でそれらが認められることから、血管において酸化ストレスは炎症より早く起こっている可能性が示唆された。

また今回BAPは、CAWSの投与直後では変化せず、7日後で上昇し14日後にはCAWS投与前のレベルに戻った。CAWSの投与により上昇したROMがBAPの上昇が見られた7日後には低下したことから、

ROS生成系の亢進により消去系である抗酸化機構が活性化され、その結果、ROS生成系の亢進が抑えられたと考えられる。

以上のことから、川崎病血管炎において酸化ストレスは炎症より先に起こり、炎症の起点となっている可能性が考えられる。今後はさらに酸化ストレス動態の詳細を解明し、血管炎発症抑制に向けた検討が必要であると考えられる。

### E. 結論

川崎病血管炎の発症機序において、酸化ストレスが一次的に関与している可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

鈴木千夏、八幡倫代、濱岡亜希子、藤井麻衣子、中村明宏、三浦典子、濱岡建城. 川崎病血管炎発症における酸化ストレスの一次的関与について. 第25回近畿小児科学会 2012年3月11日 京都

### H. 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

图1 体重变化

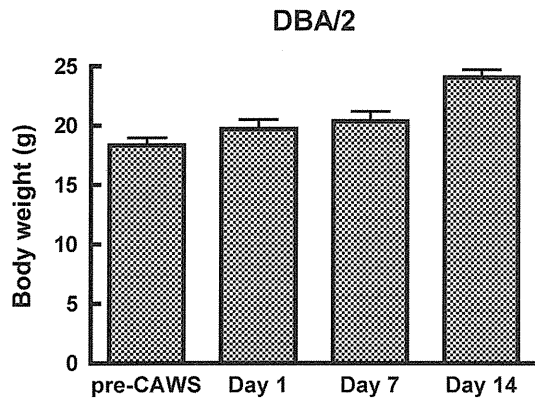


图2 心重量变化

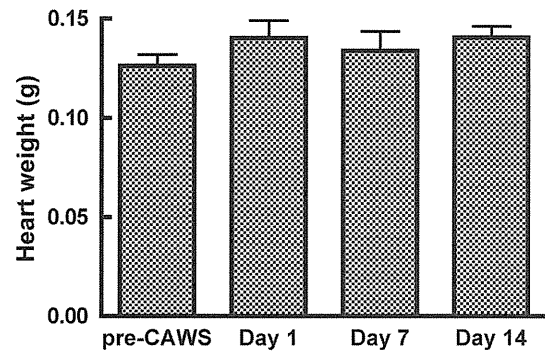


图3 ROM

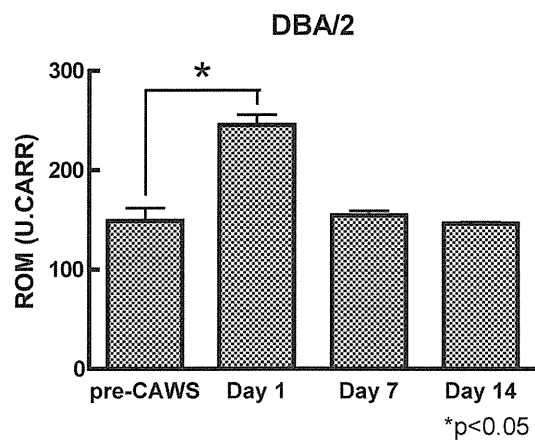
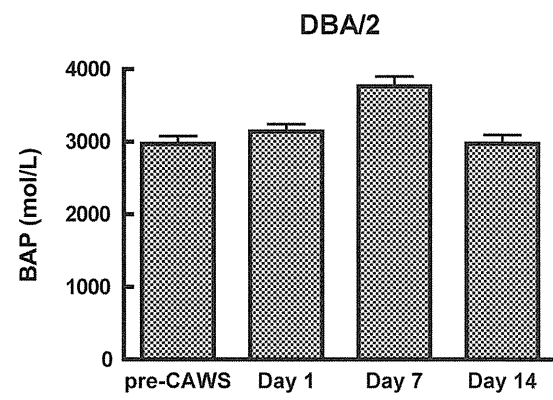


图4 BAP



## ガンマグロブリン不応川崎病に対する Infliximab の有効性の検討

研究分担者：原 寿郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学教授）

研究協力者：池田和幸（九州大学大学院医学研究院成長発達医学診療講師）

山村健一郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学特任助教）

永田 弾（九州大学大学院医学研究院成長発達医学臨床助教）

松尾知子（九州大学大学院医学研究院成長発達医学技術補佐員）

水野由美（福岡市立こども病院・感染症センター小児感染症科部長）

研究要旨：川崎病は乳幼児に好発する原因不明の急性熱性疾患で全身の血管炎を特徴とする。無治療ではおよそ4人に1人の割合で冠動脈病変(CAL)を合併することが知られている。作用機序は未だ不明だが、ガンマグロブリン超大量療法(IVIG)が臨床症状や炎症マーカーの改善、CALの抑制に有効であることが報告されており、標準的な治療法として広く使用されている。しかし、10-20%はIVIGにより解熱しないIVIG不応例であり、これらIVIG不応例のうち約30%と高率にCALを合併することが報告されており、その治療法の確立が急務となっている。本邦ではIVIG不応川崎病に対して、2005年以降Infliximab(IFX)が試用されており、当科でも2009年以降、国立成育医療センター主導の治験に参加している。

今回、当科で経験したIVIG不応川崎病に対するIFXの有効性と、IFX投与前後での血清サイトカインの変化について、昨年度報告分に症例を追加して検討を行った。

### A. 研究目的

IVIG不応川崎病に対するIFXの有効性と、IFX投与前後での血清サイトカインの変化を検討した。

血清サイトカインはBDTM Cytometric Bead Array human inflammation kitを用いて、IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-12p70を測定した。

### B. 研究方法

対象は、2008年1月から2011年5月に当科へ入院したIVIG不応（計3-4g/kg）川崎病14例（男10例、女4例）、年齢10か月～9歳10か月（中央値4歳6か月）。IFXの有効性の検討は、1.解熱効果(IFX投与後24時間で検討)、2.IFX投与病日での比較により行っ

(倫理面への配慮)

当院倫理委員会において川崎病患者における検体採取については既に承認されている(課題名：川崎病の遺伝的・非遺伝的背景因子に関する研究。第313-04号)。研究用の検体採取の同意を得られた患者について検体採取を行った。

## C. 研究結果

1. 解熱効果；14例中解熱 7例(50%)、追加IVIG 7例(50%)。追加IVIGを行った7例のうち、解熱が5例、無効が2例。1例がJIAへ移行し、1例は微熱が遷延し巨大瘤を形成した(図1)。
2. IFX投与病日でのCAL残存(1か月時)の比較；9病日以前治療群(n=11)では3例(27%)でCALが残存した。3例のうち、全例でIFX治療時に既にCALの形成が認められた。10病日以降治療群(n=3)では2例(67%)にCAL残存が認められた(図2)。

### 【サイトカイン測定】

#### ① IFX治療前後の変化(図3)

まず、IFX治療前と治療24時間後のサイトカインの変化を比較検討した(n=8)。IL-6は治療前 0.0-628.1 pg/ml (median 80.3)、治療後0.0-188.5 pg/ml (median 0)とIFX治療により有意に低下した。さらに、IFX治療後に追加IVIGを要した症例(IVIG +群, n=4)と、追加IVIGが不要だった症例(IVIG -群, n=4)について比較検討した。IFX治療24時間後の血清サイトカインを用いて両群を比較したところ、血清IL-6値は、IVIG+群 0.0-188.5 pg/ml (median 80.3)、IVIG -群 0.0-0.0 (median 0.0)であり、IVIG -群に比較して、IVIG +群で有意に高値を示した。

#### ② 他のサイトカインの変化

血清IL-8値は、IFX治療前後で有意な変化は示さなかった。TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-12p70、IL-1 $\beta$ はIFX治療前後ともに検出感度以下だった。

## D. 考察

IFXの解熱効果についての検討では、半数の症例(7例)で追加IVIGを要した。当科でのIFXの投与病日は中央値 第8病日(range 7-12病日)であり、汎血管炎が完成すると考えられている第10病日までの解熱を目標としているため、当科での解熱効果判定はIFX投与後24時間に設定している。

IFX治療後の心後遺症については、IFX投与時点で14例中8例において既にCALを認めたが、IFX投与により7例で自然退縮した(CAL最大径 2.9-4.2mm)。一方、8病日で6mmのCALを認めた症例(n=1)ではIFXは無効であり巨大瘤が残存した。

IFXは、TNF $\alpha$ を抑制することにより、その下流であるIL-6の産生や炎症反応、CAL形成を抑制すると考えられている。先行研究では、IVIG不応川崎病に対するIFX療法により、IL-6が治療前後で減少したと報告された(Saji T. et al. J Pediatr. 2006)。本研究では血清IL-6を測定することにより、IFX単回では解熱が得られない症例を予測できる可能性が示唆された。

## E. 結論

CAL非合併川崎病に対して9病日以前にIFX治療を行えば、良好な予後が期待できる。さらに、IFXの治療効果判定にIL-6が有用である可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R,

Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T:

Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan.

J Clin Immunol. 31: 968-76, 2011

Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T:

Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan.

J Clin Immunol. 31: 309-14, 2011

Eljaafari FM, Takada H, Tanaka T, Doi T, Ohga S, Hara T:

Potent induction of IFN- $\gamma$  production from cord blood NK cells by the stimulation with single-stranded RNA.

J Clin Immunol. 31: 728-35, 2011

Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, Fujimoto Y, Fukase K, Sueishi K, Hara T:

Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31: 1093-99, 2011

Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y:

Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation

of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells.

J Exp Med. 208: 235-49, 2011

Yamamura K, Ihara K, Ikeda K, Nagata H, Mizuno Y, Hara T:

Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease.

Int J Immunogenet, in press

Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S:

Quantification of  $\kappa$ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects.

J Allergy Clin Immunol. 128: 223-225, 2011

## 2. 学会発表

Ikeda K, Yamamura K, Nagata H, Matsuo T, Mizuno Y, Hara T: Genetic analysis of gene polymorphisms related to Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery lesions.

The 7<sup>th</sup> Congress of Asian Society of Pediatric Research, April 30-May 3, 2011, Denver

Yamamura K, Ihara K, Nagata H, Ikeda K, Mizuno Y, Hara T:

Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of development of coronary artery lesion in patients with Kawasaki disease  
The 7<sup>th</sup> Congress of Asian Society of Pediatric Research, April 30-May 3, 2011, Denver

山村健一郎、井原健二、永田弾、池田和幸、水野由美、原寿郎：

Lewis式・ABO式血液型抗原と川崎病疾患感受性の解析  
第10回九州川崎病研究会 2011.5.28  
佐賀

池田和幸、山村健一郎)、永田弾、松尾知子、水野由美、原寿郎：

ガンマグロブリン不応川崎病に対するInfliximabの有効性の検討  
第47回日本小児循環器学会総会・学術集会 2011.7.6-8 福岡

山村健一郎、井原健二、永田弾、池田和幸、水野由美、原寿郎：

Lewis式・ABO式血液型抗原と川崎病疾患感受性の解析  
第114回日本小児科学会 2011.8.12-14  
東京

池田和幸、山口賢一郎、田中珠美、水野由美、土方敦司、小原收、高田英俊、楠原浩一、原寿郎：

川崎病急性期末梢血単核球におけるユニークな活性化状態  
第12回川崎賞受賞講演(第31回日本川崎

病学会・学術集会) 2011.9.30 横浜

池田和幸、山村健一郎)、永田弾、松尾知子、水野由美、原寿郎：

ガンマグロブリン不応川崎病に対するInfliximabの有効性の検討  
第31回日本川崎病学会・学術集会 2011.9.30-10.1横浜

二宮崇仁、池田和幸、長友雄作、名西悦郎、永田弾、山村健一郎、土居岳彦、高田英俊  
原寿郎：

周期性発熱症(PFAPA)の経過中に川崎病を発症した一例  
第466回日本小児科学会福岡地方会例会 2011.10.8 福岡

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

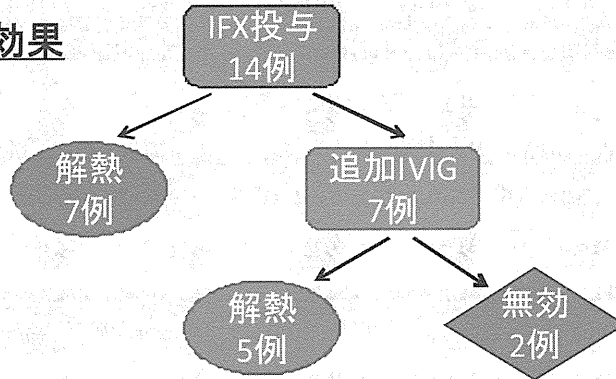
#### 3. その他

なし

図1

## IFXの有効性の検討

### 1. 解熱効果

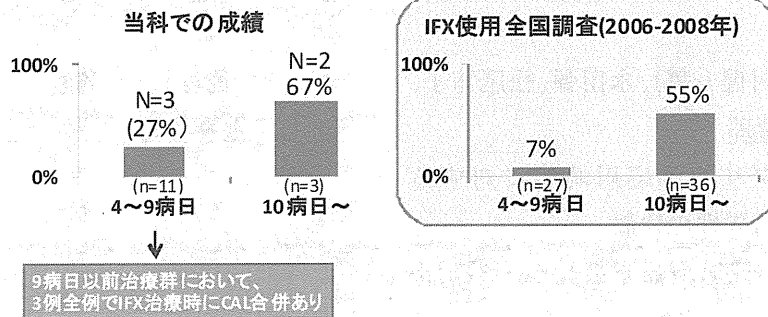


IFX治療を行った14症例中、解熱7例(50%)、追加IVIG 7例(50%)、無効例 2例(14%)

図2

### 2. IFX投与病日でのCAL残存の比較

#### ◆CAL残存頻度(1か月時)

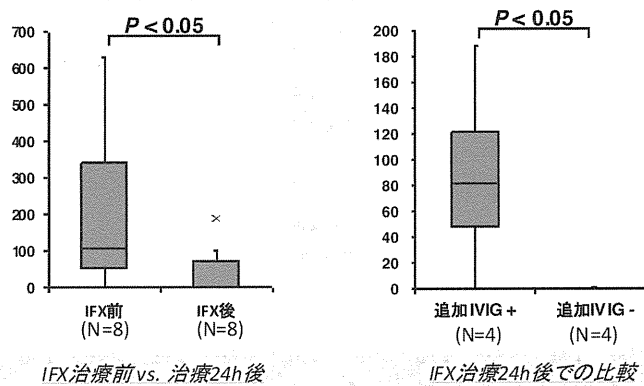


CAL非合併川崎病に対して9病日以前にIFX治療を行えば、CALの合併は認められなかった。

図3

### IFX治療前後のサイトカインの変化①

#### IL-6 (pg/mL)



## 川崎病急性期における miRNA による NF- $\kappa$ B を中心とした 自然免疫応答による炎症の制御機構の解明

研究分担者	市田 露子	富山大学小児科	准教授
研究協力者	齋藤和由	富山大学小児科	助教
	高崎 一朗	富山大学遺伝子実験施設	助教

### 研究要旨：

【背景】 川崎病はその発症に免疫学的な問題が大きく関与していると考えられている。我々はその病態の進展に microRNA (miR) が重要な役割を担っていると仮定し、急性期川崎病に関与する miR を明らかにし、messenger RNA (mRNA) との関連を検討することにした。

【対象と方法】 対象は急性期川崎病患者4名、川崎病以外の熱性疾患患者6名および健常対照群6名。方法は末梢血から単核球細胞を分離し、mRNA および miR の microarray を治療前後で施行した。データは GeneSpring GX 11.0 software および Ingenuity Pathways Analysis tools を用いて解析した。

### 【結果】

#### 1) miR に関して

全847miRのうち、川崎病に特異的と考えられるmiRは以下の5種あり、治療前、コントロールと比較して、miR-93, miR-877は発現が有意に低下、miR-92b, miR-182, miR-296-5pは発現が有意に亢進していた。治療後、これら5種のmiRの発現はすべて正常化した。

#### 2) miR と mRNA の関係

川崎病特異的に変化した5種のmiRとの関連が報告されている、治療前後で有意に変化したmRNAは12種であった。これらのうち、miR-93によって制御されていると報告のあるVEGFAの発現も治療によって正常化した。miR-93とVEGFAの発現を調べると強い負の相関を認めた ( $R^2=0.9683$ )。

#### 3) VEGFA の ELISA

さらに、同患者の血清中VEGFAの値をELISAキットによって測定すると、VEGFAの mRNA と同様、治療により速やかに低下し、VEGFA と強い正の相関を示した。

### 【結論】

川崎病急性期における流血中の人末梢血単核球細胞におけるmiRの変化の同定を試みたところ、川崎病に特異性が高いと考えられる5種のmiR (miR-93, miR-877, miR-92b, miR-182, miR-296-5p) が同定された。miR-93はVEGFAの発現を調節し、川崎病冠動脈病変における重要なシグナル伝達系を担っていると考えられた。



## A. 研究目的

川崎病は1967年に日本の川崎富作博士により、小児急性熱性皮膚粘膜リンパ節症候群 (Acute febrile mucocutaneous lymphnode syndrome: MCLS) として報告された。川崎病の本態は主に中小動脈を中心とする小児期の全身性血管炎症候群であり、特に冠動脈を傷害するが、その病態は明らかではない。しかし、その発症の機序には自然免疫応答が深く関与していると考えられている。

標準的な治療は、大量免疫グロブリン静脈投与 (IVIG) およびアスピリン内服の併用である。

川崎病の合併症としては、冠動脈瘤があり、全体として、およそ10-18%の川崎病罹患児が冠動脈瘤を合併する。これらの冠動脈瘤はたとえ乳幼児であっても心筋梗塞の誘因となりえ、本疾患の最も重要な予後既定因子として知られている。

川崎病の病因と病態の仮説に関して、現在はなんからの感染や環境因子を引き金としてNF- $\kappa$ Bなどを介する高サイトカイン血症が起こり、これらが遺伝的素因や免疫の異常制御により修飾を受け、川崎病を発症すると考えられている。我々はこれまで、この高サイトカイン血症に注目し、以下のサイトカイン及び冠動脈病変に関する研究1) - 3) を続けてきた。

### 1) VEGFに関する研究→冠動脈瘤形成に関係するのは、単核球とVEGFである。

- ・ Neutrophils and mononuclear cells express VEGF in acute Kawasaki disease. (Pediatric Research 2001)

### 2) 血管内皮細胞に関する研究 →冠動脈瘤形成に重要なのは、単核球とiNOSである。

- ・ Enhanced iNOS Expression in Leukocytes and Circulating Endothelial Cells Is associated with the Progression of Coronary Artery Lesions in Acute Kawasaki Disease. (Pediatr Research 2004)

### 3) S100蛋白に関する研究→S100蛋白が冠動脈炎の進展に関係する

- ・ S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. (Lancet 2003)
- ・ Profound S100A12 expression in early stage of Acute Kawasaki Disease. (Am J Cardiol 2004)
- ・ MRP 8 /14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. (Blood 2005)
- ・ Profound Expression of MRP 8 /14 in Acute Kawasaki Disease. (J Am Coll Cardiol 2006)
- ・ The efficacy of infliximab treatment and dynamic changes of inflammatory cytokines in patients with refractory Kawasaki disease. (Pediatr Res 2009)

更に、最近、NF- $\kappa$ B のsignalingはmicroRNA (miR) によるネガティブフィードバック機構によって制御されている (Cancer Biol 2008) という報告がなされた。

miRは18-25個の塩基からなる小さなnoncoding RNAであり、目的とするmRNAの3' untranslated regions (3' UTR) に結合し、遺伝子発現を転写後レベルで抑制する機能性RNAである。ヒトの遺伝子は800以上の異なるmiRをコードし、各臓器において発現

プロファイルを変化させ、遺伝子発現の調節を行っている。川崎病は免疫学的な問題が発症に関与していると考えられているが、これまで川崎病におけるmiRの関与に関する報告はない。

そこで、我々は川崎病の急性期において、その発症や血管病変の進展にmiRが重要な役割を担っていると仮定し、急性期川崎病に関与するmiRを明らかにし、messenger RNA (mRNA) との関連を検討することにした。

## B. 研究方法

我々は急性期川崎病患者4名、川崎病以外の熱性疾患患者(ウイルスまたは細菌感染症)6名および年齢、性別を合わせた健常対照群6名から末梢血単核球細胞を分離し、mRNAおよびmiRのmicroarrayを施行した。川崎病患者はすべて標準治療に反応した患者とし、治療前、治療開始後2-4日および7-10日に全血4mlを採取した。データはGeneSpring GX 11.0 softwareおよびIngenuity Pathways Analysis toolsを用いて解析した。(倫理面への配慮)研究過程で得られたデータおよび実験結果は匿名化した。また、本研究を施行するには当院の倫理委員会にて承認を得た。

## C. 研究結果および D. 考察

### 1) miRに関して

全847miRのうち、健常対照群と有意差のあったmiRは9種(発現亢進6種 低下3種)であった。更に熱性疾患群と比較し、川崎病に特異的と考えられるmiRは以下の5種あり、治療前、コントロールと比較して、miR-93, miR-877は発現が有意に低下してお

り、miR-92b, miR-182, miR-296-5pは発現が有意に亢進していた。治療後、これら5種のmiRの発現はすべて正常化した。

### 2) mRNAに関して

解析された54680種の遺伝子のうち、669種(1.22%)は治療前、有意に発現が亢進あるいは低下していた。これらのうち、144個(23.3%)は治療後に正常化した。本研究のmRNA発現プロファイルはこれまで川崎病で報告されている結果と同様であった。

### 3) miRとmRNAの関係

川崎病特異的に変化した5種のmiRとの関連が報告されている治療前後で有意に変化したmRNAは12種であった。これらのうち、miR-93によって制御されていると報告のあるVEGFAの発現も治療によって正常化した。miR-93とVEGFAの発現を調べると強い負の相関を認めた( $R^2=0.9683$ )。一方、当初仮定していた自然免疫に関与するmiRおよびNF- $\kappa$ Bの有意な変化は認められなかった。

### 4) VEGFAのELISA

さらに、同患者の血清中VEGFAの値をELISAキットによって測定すると、VEGFAのmRNAと同様、治療により速やかに低下し、VEGFAと強い正の相関を示した。

## E. 結論

川崎病急性期における流血中の人末梢血単核球細胞におけるmiRの変化の同定を試みたところ、川崎病に特異性が高いと考えられる5種のmiR(miR-93, miR-877, miR-92b, miR-182, miR-296-5p)が同定された。miR-93はVEGFAの発現を調節し、川崎病冠動脈病変における重要なシグナル伝達系を担っている可能性が考えられた。

他の4種のmiRの機能に関しては現在検討中である。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

廣野恵一、市田路子：EBMに基づく難治性川崎病の治療戦略：インフリキシマブ治療とそのメカニズム『EBM小児疾患の治療』五十嵐隆監修 中外医学社154-157, 2011

廣野恵一、市田路子 川崎病血管炎の病態 特集/川崎病の諸問題 「循環器内科」2011 ; 69 : 399-406

Hirono K, Ichida F. Possible new role of vascular endothelial growth factor-d during the acute phase of kawasaki disease. Circ J. 2011 May 25;75(6):1324-5

### 2. 学会発表

- 1) Kazuyoshi Saito, Ichiro Takasaki, Keiichi Hirono, Keiji Ito, Kazuhiro Watanabe, Neil E. Bowles, Fukiko Ichida, Toshio Miyawaki. MicroRNAs May Control MRNA In Circulating PBMCs During The Acute Phase Of Kawasaki Disease The 45th Annual Meeting for the Association for European pediatric cardiology, Granada, Spain 2011.5.20
- 2) 谷一宏、齋藤和由、伊吹圭二郎、小澤綾佳、渡辺一洋、市田路子、宮脇利男、大高慎吾、日隈智憲、深原一晃、芳村直樹.

川崎病後急性心筋梗塞により形成された左室瘤に対し、冠動脈バイパス術と左室形成術を施行した5歳男児例の術後1年の経過. 第47回日本小児循環器学会. 2011.7.7福岡

- 3) 齋藤和由、高崎一朗、廣野恵一、渡辺一洋、小澤綾佳、市田路子、宮脇利男 第75回日本循環器学会学術集会 急性期川崎病の流血中末梢血単核球細胞におけるマイクロRNAによるmRNAの発現制御の可能性 2011.8.2 横浜
- 4) 齋藤和由、高崎一朗、渡辺一洋、小澤綾佳、市田路子、宮脇利男 第114回日本小児科学会学術集会 急性期川崎病の流血中末梢血単核球細胞におけるマイクロRNAによるmRNAの発現制御の可能性～miR-93によるVEGFAの制御～ 2011.8.14東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得	なし
実用新案登録	なし
その他	なし

## 治療効果に影響する遺伝因子解析システムの構築

分担研究者	阿部 淳	国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部免疫療法研究室	室長
研究協力者	尾内善広	千葉大学大学院公衆衛生学	講師
	小林 徹	群馬大学大学院小児科学分野	助教

研究要旨：RAISE Studyプロトコルの治療効果と遺伝因子との関連について検討することを目的として川崎病遺伝コンソーシアムを結成した。RAISE Studyにエントリーした川崎病患者や、研究参加施設でフォロー中の川崎病既往患者からDNA検体を収集・保存するシステムを構築した。結果的にRAISE Studyプロトコルの検証に寄与することはできなかったが、今後このシステムを治療研究や病因研究に活用するとともに、遺伝子解析の共同研究を実施するためのプラットフォーム作りをさらに進める予定である。

### A. 研究目的

川崎病の病因には複数の遺伝的要因と環境要因（感染因子を含む）が関与することが、疫学的な特徴から推測される。さらに、遺伝的要因が免疫グロブリン大量静注療法（IVIg療法）への反応性に関与することが証明されている。本研究では、RAISE Studyの治療プロトコルにおいて、治療効果に影響する可能性のある遺伝因子を事後的に検出して影響を評価するシステムを構築することを目的とした。具体的には、国内の川崎病研究者が協力して遺伝研究を行う共同体（コンソーシアム）を結成し、DNA検体を保存、運用できるようにすることを目標とした。

### B. 研究方法

(1) RAISE Study の参加施設を中心として、川崎病の遺伝子研究を協働して進

める「川崎病遺伝コンソーシアム」を組織する。

- (2) RAISE Studyにエントリーした患者および参加施設でフォロー中の川崎病既往患者に対して、本疾患における遺伝子研究の必要性とDNA保存の有用性について書面による説明を行い、同意が得られた患者から採血しDNAを抽出して保存するシステムを構築する。
- (3) すでに疾患感受性あるいは心後遺症の発生との関連が報告されている遺伝因子、あるいはコンソーシアム内で新たに合意された遺伝因子について、遺伝子多型解析や機能解析を行い、治療効果への影響を検討する。

### C. 研究結果

(1) 研究共同体の設立  
2010年2月に「川崎病遺伝コンソーシ