

不応例予知および不全型の診断に有用性の高いバイオマーカーであると推定される。

PTX-3、およびTNFR-1いずれもELISA法により測定が行われており、可及的速やかに施行しても数時間は要するし、通常の商業ベースの測定では数時間を要する。従って現状では臨床に供することは困難である。

一方、川崎病の不全型の診断にBNP、NT-proBNPのバイオマーカーが有用と考える。不全型ではBNP、NT-proBNPともに基準値より有意に増加する症例が多く、約1時間で迅速に結果を得ることができるとも長所である。川崎病の急性期でBNP、NT-proBNPが増加する理由は、心筋炎に伴い間質の浮腫が出現し心筋細胞に物理的なストレスがかかるため、および川崎病急性期に著増する炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ などの刺激により産生が亢進する事が考えられる。川崎病の主要症状の項目数を満たしていないが、川崎病を疑った際に、BNPまたはNT-proBNPが有意に高値を呈している際には川崎病の不全型を強く疑うべきと考える。

#### E. 結論

幾種類かの心臓・血管バイオマーカーを用いることにより、川崎病の免疫グロブリン不応例および川崎病不全型を診断することが可能である。免疫グロブリン不応例、川崎病不全例では冠動脈病変の合併を高頻度に認める。従って病初期よりこれらのバイオマーカーにて診断および重症度を層別化し、各症例にマッチした川崎病の初期治療を構築することが可能になると考える。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) レオロジーから見た冠状動脈の血流動態特性  
小川俊一  
日本小児科学会雑誌 113:1769-1778, 2009 (2009年12月1日発行)
- 2) 小児科臨床ピクシス 9「川崎病のすべて」総編集 五十嵐隆、専門編集 石井正浩「巨大冠動脈瘤：トータルケア」小川俊一139 - 141, 2009中山書店(2009年7月27日発刊)
- 3) Multicenter and retrospective case study of warfarin and aspirin combination therapy in patients with giant coronary aneurysms caused by Kawasaki disease. Suda K, Kudo Y, Higaki T, Nomura Y, Miura M, Matsumura M, Ayusawa M, Ogawa S, Matsuishi T. Circ J. 73:1319-1323, 2009
- 4) Risk stratification in the decision to include prednisolone with intravenous immunoglobulin in primary therapy of Kawasaki disease. Kobayashi T, Inoue Y, Otani T, Morikawa A, Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T, Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Arakawa H. Pediatr Infect Dis J 2009;28:498-502
- 5) Long-Term Prognosis of Patients with Kawasaki Disease at Risk for Future Atherosclerosis? Fukazawa R, Ogawa S. J Nippon Med Sch. 2009;76:124-133
- 6) 川崎病冠動脈狭窄のカテーテル治療  
小川俊一

- 小児科 51:403-410, 2010 (2010年4月1日発行)
- 7) Guidelines for Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease (JCS 2008). JCS joint Working Group. Chair: Shunichi Ogawa. Circ J 74:1989-2020, 2010 (2010年9月)
- 8) Standard method for ultrasound imaging of coronary artery in children. Shigeto Fuse, Tohru Kobayashi, Yoshio Arakaki, Shunichi Ogawa, Hitoshi Katoh, Naoko Sakamoto, Kenji Hamaoka, Tsutomu Saji. Pediatrics International 2010;52:876-882
- 9) Early detection of subclinical anthracycline cardiotoxicity on the basis of QT dispersion. Uchikoba Y, Fukazawa R, Ohkubu T, Maeda M, Ogawa S. J Nippon Med Sch. 2010;77:234-243
- 10) 冠動脈疾患(下) - 診断と治療の進歩 - XV. 川崎病の診断・治療の現状  
川崎病後遺症の診断と治療のガイドラインのポイント  
小川俊一  
日本臨床 2011;69( Suppl 9): 529-535
- 11) 特集 川崎病の本体にせまる - 古くて新しい研究から - II. 検査にせまる (検査結果から本態にせまる)  
「冠循環」  
小川俊一  
小児科診療 2011;79:1163-1170
- 12) 冠動脈障害を有する川崎病既往者の冠循環動態および侵襲的治療前後の冠循環動態を考察する.  
小川俊一、落 雅美  
J Jpn Coron Assoc 2011;17:66-74
2. 学会発表
- 1) Symposium: Pediatric Cardiology “Kawasaki disease”  
Hemodynamic assessment of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease  
Ogawa S.  
17th Asian Pacific Congress of Cardiology, (2009.05.23, Kyoto)
- 2) Reduced shear stress induces senescence of vascular wall and thrombus formation in patients with giant coronary aneurysm after Kawasaki disease. Ogawa S, et al. European Society of Cardiology 2009 (2009. 9.1, Barcelona)
- 3) Results and indication of coronary artery bypass graft operation for coronary artery lesion after Kawasaki disease. Abe M, Ogawa S, et al. 5th World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery (2009.6.24, Cairns Australia)
- 4) Inositol 1,4,5-Triphosphatase 3-kinase C polymorphism associated with disease severity and coronary artery lesions in Kawasaki disease. Fukazawa R, Ogawa S, et al. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2009.3.22)
- 5) ITPKC遺伝子多型は川崎病冠動脈障害および免疫グロブリン治療の有効性と

- 6) 川崎病における血清サイトカイン、ケモカインの変化. 上砂光裕、小川俊一、他. 第45回日本小児循環器学会 (2009.7.16)
- 7) 障害を有する冠動脈の流体力学的シミュレーション. 阿部正徳、小川俊一、他. 第45回日本小児循環器学会 (2009.7.16)
- 8) 血管炎バイオマーカーPTX-3の川崎病への応用の有用性. 勝部康弘、小川俊一、他. 第45回日本小児循環器学会 (2009.7.17)
- 9) 川崎病発症時の血小板遺伝子プロファイリングによる川崎病発症にかかわる遺伝子の検索. 深澤隆治、小川俊一、他. 第29回日本川崎病学会 (2009.10.17)
- 10) 川崎病後の冠動脈障害に対する新しい画像評価：Fusion画像を用いて. 阿部正徳、小川俊一、他. 第29回日本川崎病学会 (2009.10.17)
- 11) Overview of the JCS 2008 Guidelines for Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease. Ogawa S. Meet the Expert The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.06, Kyoto)
- 12) Thrombocyte Gene Expression Profiling for Exploring Key Cytokines in Onset of Kawasaki Disease. Fukazawa R, Abe M, Kamisago M, Katsube Y, Ogawa S. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.05, Kyoto)
- 13) PTX-3, a New Biomarker for Vasculitis, Predicts Intravenous Immunoglobulin Unresponsiveness in Patients with Kawasaki Disease. Katsube Y, Akao M, Matanabe M, Abe M, Watanabe M, Kamisago M, Fukazawa R, Ogawa S. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.06, Kyoto)
- 14) Evaluation of Coronary Artery Lesions after Kawasaki Disease by New Modality: Coronary CT Angiography/SPECT Fusion Image. Abe M, Fukazawa R, Kamisagao M, Katsube Y, Ogawa S. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.06, Kyoto)
- 15) Interferon-Gamma Inducible CXC Chemokines (IP10 and MIG) Play an Important Role in the Part of Pathogenesis of Kawasaki Disease. Kamisago M, Katsube Y, Fukazawa R, Abe M, Ogawa S. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (2010.03.06, Kyoto)
- 16) Longitudinal and sequential follow-up results after percutaneous catheter intervention in patients with Kawasaki disease. Ogawa S, Fukazawa R, Kamisagao M, Ohkubo T, Abe M, Matanabe M, Hajikano M, Suzuki N, Matanabe M, Katsube Y. European Society of Cardiology Congress 2010.

(2010.08.29, Stockholm)

2. 実用新案登録：なし

17) 川崎病冠動脈障害に対する冠動脈CT/心筋SPECT:Fusion画像による評価. 阿部正徳、上砂光裕、深澤隆治、勝部康弘、小川俊一. 第46回日本小児循環器学会 (2010.07.10, 千葉)

3. その他

18) 特別企画：「成人期川崎病既往者における冠イベントの実態と病態の解明に向けて；循環器内科と小児循環器のコラボレーション」川崎病心血管後遺症の診断と治療に関するガイドライン(日本循環器学会)の概説. 小川俊一 第19回日本心血管インターベンション治療学会 (2010.08.24, 仙台)

19) Data Mining法による川崎病の遺伝子多型解析. 深澤隆治、阿部正徳、渡辺誠、菌部友良、濱岡建城、濱本邦洋、上砂光裕、勝部康弘、小川俊一. 第30回日本川崎病学会 (2010,10,10, 京都)

20) イブニングセミナー「この症例をどうする？」川崎病巨大冠動脈瘤血栓閉塞の1例. 阿部正徳、渡辺誠、大久保隆志、上砂光裕、深澤隆治、勝部康弘、小川俊一. 第30回日本川崎病学会 (2010,10,10, 京都)

21) シンポジウム「難治性川崎病の治療戦略：1 IVIG反応性の予測マーカー」バイオマーカーによる川崎病免疫グロブリン治療不応例の予測. 勝部康弘、阿部正徳、上砂光裕、深澤隆治、小川俊一. 第30回日本川崎病学会 (2010,10,11, 京都)

22)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得：なし

## 川崎病急性期における血小板由来マイクロパーティクルと 酸化ストレスの臨床学的意義

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：川崎病急性期において、動脈硬化性病変へつながる血小板活性化、酸化ストレス、炎症に関するマーカーを測定し、臨床学的意義を検討した。血小板の活性化は急性期のみならず回復期においても持続しており、IVIG不応群ではIVIG治療後も炎症が完全には鎮静化されず、酸化ストレス状態も持続していた。これらの指標は、IVIG不応の予測あるいは早期発見、また急性期治療の効果判定に有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

川崎病急性期では、広範な血管内皮障害により血小板凝集能の亢進および著名な血小板数増加が見られることが知られている。この血小板凝集能の亢進は、冠動脈瘤の形成に関与しているほか、血管病変の血栓性閉塞や動脈硬化性病変への進展においても重要な危険因子であるため、通常抗血小板療法が行われている。この血小板凝集能の亢進は、発症後3か月以上持続しているため、急性期治療ガイドラインでは、「冠動脈に障害を残さない場合でも抗血小板療法は炎症が陰性化しでも概ね3か月間は継続されるのが望ましい」とされている。

血小板が活性化され凝集に至る経路やそれに関わる因子は数多く存在するが、活性化された血小板からは、マイクロパーティクルと呼ばれる微小な膜小胞体が放出されることが知られている。この血小板由来マイクロパーティクル (Platelet-derived microparticle: PDMP) は、プロコアグulant活性を有し、その活性は血小板表面より

も50～100倍高く、凝固促進機能は活性型血小板以上に重要である可能性が示唆されている。また血管炎症に関わる機能粒子であり、血小板活性化マーカーとして、さらには血管炎症のマーカーとして有用であることが報告されている。このため、PDMPは血小板活性化動態のみならず、血管炎病態をも評価できる可能性が考えられる。さらに、白血球と血管内皮細胞の接着分子の発現を増強させ、動脈硬化発症メカニズムとの関与も報告されている。動脈硬化は、密接に関わり合う炎症と酸化ストレスに血管内皮障害が加わり三者が互いに増悪因子として働くことで動脈硬化性病変へと進展していくと考えられている。血管炎を主体とし、病変部での炎症性細胞の存在や種々のサイトカイン産生が見られる病態からみて、川崎病においても、急性期および慢性期の血管障害の病態に酸化ストレスが関与する可能性が示唆されている。

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、生成系が亢進している状態と定義される。すなわち、酸化ストレスを検討するにあたり、ROSの生成系のみならず消去系について調べる必要がある。

そこで本研究では、川崎病急性期において動脈硬化性病変につながる血小板活性化、酸化ストレスおよび炎症について検討し、それらの臨床学的意義について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 川崎病急性期における血小板活性化動態

【対象】当院と研究協力機関にて川崎病と診断された20例。うち、IVIG施行例は16例、非施行例は4例であった。

【方法】通常の採血時に、併せて本研究用血液を採取した。

治療開始直前、治療開始2日後、2週間後、発病1か月後、2か月後、3か月後、6か月後にそれぞれ採血を行い、以下の測定を行った。

- ・血小板数：本学臨床検査部に委託。
- ・PDMP: 採取した血液は、EDTA-ACD採血管を用いて血漿を遠心分離した。得られた血漿のPDMPをELISA法で測定した。なお、川崎病急性期では血小板数が大きく変動することから、血小板1万あたりのPDMP値で評価した。

### 2. 川崎病急性期における酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン動態

【対象】川崎病急性期19例。うち6例は、初回IVIG治療終了48時間後も37.5℃以下に改善せず、IVIGあるいはステロイドによる追加治療を要した。これらIVIG不良例も初回IVIG投与2週間後には解熱していた。

【方法】採血による検体採取は、IVIG治療直前、IVIG治療終了直後、IVIG治療終了2週間後に行い、それぞれ酸化ストレス指標と

してreactive oxygen metabolites (ROM)、抗酸化力指標として biological antioxidant potential (BAP)、炎症性マーカーとして高感度CRP、IL-1, 2, 6、およびTNF- $\alpha$ を測定した。結果は、IVIG治療直前におけるそれぞれの測定値を100とし、変化率を求めて検討した。

- ・ROM、BAP：ウイスマー社製フリーラジカル解析装置を用いて測定。

- ・高感度CRP、IL-1, 2, 6、TNF- $\alpha$ ：BioPlex suspension array systemを用いて測定。

(倫理面への配慮)

本研究は本学倫理委員会の承認のもとに行った。すべての研究対象者に、研究内容を十分に説明し、検体提供について自由意思で承諾を得るよう努め、書面による同意を得た。研究対象者が若年でインフォームド・コンセントを得ることが困難な場合は、保護者等からのインフォームド・コンセントを得た。また、人権保護や個人情報保護に関して十分に配慮した。

## C. 研究結果

### 1. 川崎病急性期における血小板活性化動態

一般的な急性有熱性疾患33例と比較し、治療開始前の川崎病例のPDMPは有意に高値であった(図1)。

IVIG施行例において、PDMPは施行後に有意に低下した(図2)が、IVIG非施行例ではむしろ上昇傾向を示した(図3)。

### 2. 川崎病急性期における酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン動態 (図4, 5)

IVIG奏功群のROMは、IVIG直前は明らかな高値を示し(623.5 $\pm$ 85.2 U.CARR、 $P < 0.0001$  vs. control)たが、IVIG治療直後には567.0 $\pm$ 96.1 U.CARR ( $P < 0.05$

vs. IVIG直前)に、またIVIG治療2週後には  $448.6 \pm 75.2$  U.CARR ( $P < 0.01$  vs. IVIG治療直後)へと経過とともに速やかに低下していた。

一方、IVIG不応群のROMは、IVIG直前はIVIG奏功群と同様に明らかに高値 ( $566.5 \pm 43.3$  U.CARR、 $P < 0.01$  vs. control)を示したが、IVIG初回治療直後には有意の低下を示さなかった ( $544.8 \pm 71.2$  U.CARR、n.p vs. IVIG治療直前)。しかし、IVIG初回治療2週後(追加治療後)には有意に低下していた ( $368.7 \pm 57.2$  U.CARR、 $p < 0.01$  vs. pre-IVIG and post-IVIG)。なお、IVIG奏功群とIVIG不応群の間で、IVIG治療直前の値には有意な差は見られなかった。

IVIG奏功群のBAPにおいて、IVIG治療前 ( $2689.8 \pm 225.1$  mol/L)と治療直後 ( $2695.4 \pm 280.0$  mol/L)で明らかな変動は見られなかったが、IVIG治療2週後は明らかな増加傾向を示し、IVIG治療前およびIVIG治療直後と比較して有意に高値 ( $2870.0 \pm 189.3$  mol/L、 $p < 0.01$  vs. pre-IVIG、 $p < 0.05$  vs. post-IVIG)を示した。

一方、IVIG不応群のBAPは、IVIG治療前 ( $2476.3 \pm 76.8$  mol/L)、IVIG初回治療直後 ( $2483.5 \pm 204.7$  mol/L)、IVIG治療2週後 ( $2564.6 \pm 162.9$  mol/L)で、経過中で有意な変化を認めなかった。また、IVIG不応群のBAPは対照群 ( $p < 0.01$ )およびIVIG奏功群 ( $p < 0.05$ )に比較して有意に低値を示していた。

IVIG奏功群ではROMの変動とすべての炎症性マーカーは病勢に合わせて低下していた(図6)。一方、IVIG不応群では炎症に鋭敏なマーカーであるhs-CRP、IL-6が低下しているのに反して、ROMやTNF- $\alpha$ 、

IL-1, 2は低下していなかった(図7)。

#### D. 考察

川崎病では、一般的な有熱性疾患と比較して、血小板が非常に活性化しており、急性期治療における抗血小板療法の必要性を裏付ける結果であった。

また、IVIGを施行し心血管後遺症がなかった症例の中で、急性期治療プロトコルに基づき発症から2～3か月後に抗血小板療法を中止したところ、PDMPが再上昇する症例が散見された。さらに発症後6か月が経過しても、やや高値を示す症例も見られた。そのため、川崎病血管炎で見られる血小板活性化は長期に渡り、抗血小板薬の中止時期には注意が必要である。このことから、川崎病発症から少なくとも抗血小板療法中止時期までのPDMP動態を評価することは、臨床的意義があると考えられる。また、冠動脈障害を合併した1例では、IVIG施行後も高値を維持しており、PDMPが血管炎の病態評価においても有用である可能性が示唆された。

一方、川崎病急性期におけるROS生成系の指標であるROMは、健常小児と比較して有意に高値を示した。それはIVIG治療により奏功群では、速やかに低下したが、不応群においてはIVIG初回投与による有意な変化は見られず、IVIGが直接的にROS生成を抑制しているとはいえないことが示唆された。

また、奏功群におけるIVIG治療前のROS消去系指標であるBAPは、健常小児と有意な差はなく、IVIG治療直後でも変化は見られなかったが、2週間後に上昇した。一方で、不応群におけるIVIG治療前のBAPは有意に低値を示し、IVIGによる変化も認められず、

奏功群とは明らかに異なる反応を示した。このことから、BAPがIVIGに対する反応性を予測するマーカーになり得る可能性が示唆された。また、IVIG不応群では、ROMの低下およびBAPの上昇が見られないことから、酸化ストレス状態が持続した状態にあることが予測される。酸化ストレスは炎症と相互に増悪因子として働くことは知られており、今回の検討においても、IVIG奏功群において各炎症性マーカーはIVIG治療により速やかに低下していったが、不応群においてはhs-CRPおよびIL-6は低下したものの、IL-1, 2, TNF- $\alpha$ はほとんど変化しなかった。

IVIG 不応群において IL-2 の低下が見られなかったことは、T 細胞の活性化が IVIG では抑制されなかった可能性が考えられる。川崎病急性期ではT 細胞の活性化が知られているが、IVIG の T細胞におけるNF- $\kappa$ B 活性化抑制効果は弱いとされている。そのため、近年 IVIG 不応例に対する追加治療として、免疫抑制剤であるシクロスポリンの有効性を示す報告が散見されるようになった。本研究における結果も、IVIG 不応例に対するシクロスポリンの使用について合理性を示唆している。

また、これまでに冠動脈瘤を認めた症例において TNF- $\alpha$  が有意に高値であったことが報告されている。抗 TNF- $\alpha$  抗体であるインフリキシマブは、川崎病においても2004年に初めて使用例が報告されてから、IVIG 不応例に対する有効性が次々と報告されている。今回、IVIG不応群のTNF- $\alpha$  が低下しなかったことも、議論の最中である抗 TNF- $\alpha$  療法の根拠となり得る所見と考える。

しかしながら、これら新規治療法は未だ

エビデンスに乏しく、投与方法や安全性も確立されていない。したがって、今後もさらにデータを収集し、有効性および安全性について精査していく必要がある。

本研究により、炎症性マーカー、酸化ストレス、PDMP測定の臨床的意義が示された。今後はさらに、とくにIVIG不応例に対する急性期治療において、血管障害発症・進展を阻止すべく、主要な役割を果たす炎症、酸化ストレスおよび血小板活性化の三者の悪循環を早急に断ち切り、改善するような治療が必要であると考えられる。

## E. 結論

川崎病急性期における酸化ストレス、炎症、血小板活性化の各マーカーの測定は、血管炎の病態および治療効果の評価に有用である可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Hamaoka K. Dynamics of reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential in the acute stage of Kawasaki disease. *Circ J.* 75(10): 2453-9, 2011

### 2. 学会発表

#### 国際会議

- ・ The evaluation of platelet function in Kawasaki disease using platelet-derived microparticles, 第9回国際川崎病シンポジウム, 平成20年4月10-12日. 台湾
- ・ Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Dynamics



of Oxidative Stress in the Chronic Stage of Kawasaki disease. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (Innsbruck, Austria) 2010

- ・Yahata T, Suzuki C, Hamaoka A, Fujii M, Ozawa S, Hamaoka K. Relationship between Inflammation and Oxidative Stress of Kawasaki Disease in Acute Phase. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (Granada, Spain) 2011

#### 国内会議

- ・ Evaluation of platelet function in Kawasaki disease by platelet-derived microparticles, 第44回日本小児循環器学会, 平成20年7月2-4日, 福島
- ・ Evaluation of Platelet Activation in Kawasaki Disease by Platelet-derived Microparticles, The 17th Asian Pacific Congress of Cardiology, 平成21年5月20—23日, 京都
- ・ 血小板由来マイクロパーティクルを用いた川崎病遠隔期例における血小板活性化の評価, 第45回日本小児循環器学会, 平成21年7月15—17日, 神戸
- ・ 抗血小板療法中の川崎病遠隔期症例におけるアスピリン耐性について, 第45回日本小児循環器学会, 平成21年7月15—17日, 神戸
- ・ 川崎病遠隔期症例における酸化ストレス動態, 第29回日本川崎病学会, 平成21年10月16—17日, 名古屋
- ・ 八幡倫代, 鈴木千夏, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 川崎病急性期における酸化ストレス動態. 第46回日

本小児循環器学会総会・学術集会2010年7月6日～9日, 千葉

- ・ 八幡倫代, 鈴木千夏, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 小澤誠一郎, 濱岡建城. IVIG 反応性の予測マーカー ～酸化ストレスおよび抗酸化力指標～. 第30回日本川崎病学会・学術集会 2010年10月10日11日, 京都
- ・ 八幡倫代, 鈴木千夏, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 中村明宏, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 川崎病急性期病態における酸化ストレスと炎症の関連～炎症マーカーとの関係から～. 第47回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2011年7月6日～8日, 福岡
- ・ 八幡倫代, 鈴木千夏, 濱岡亜希子, 藤井麻衣子, 小澤誠一郎, 濱岡建城. 川崎病血管炎の病態形成における酸化ストレスの関与～炎症マーカーとの関係から～. 第114回日本小児科学会学術集会, 2011年8月12日～14日, 東京

#### 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

図1 PDMP 比較 (急性有熱性疾患 vs 川崎病・治療開始前)

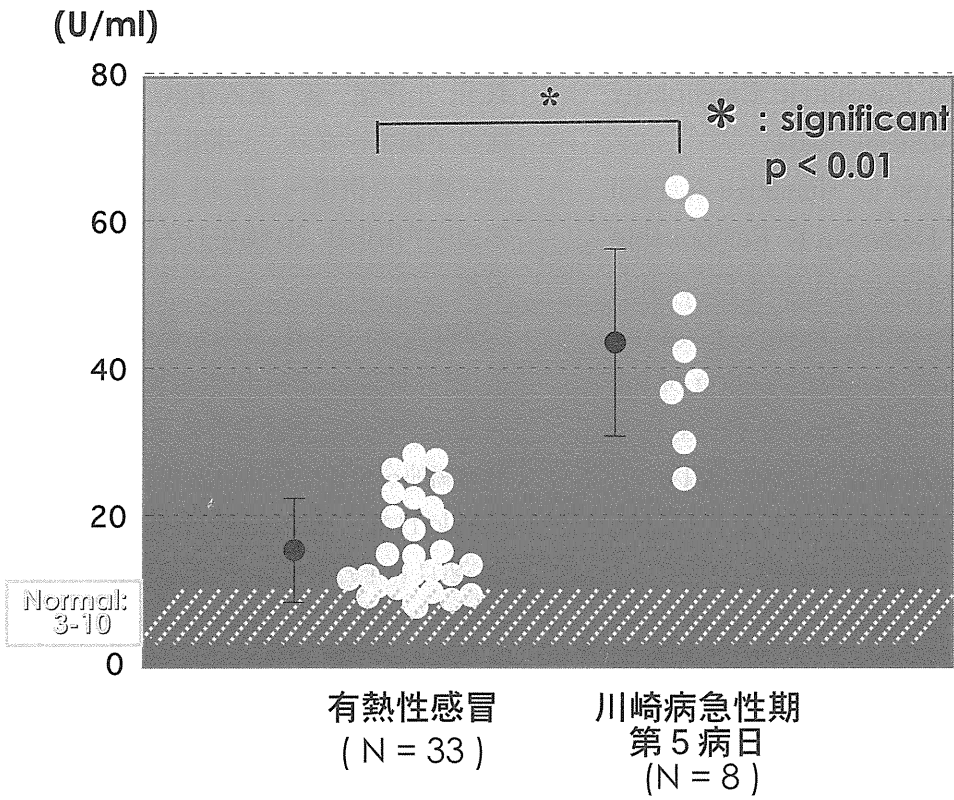


図2 IVIG 施行例の PDMP 経時的変化

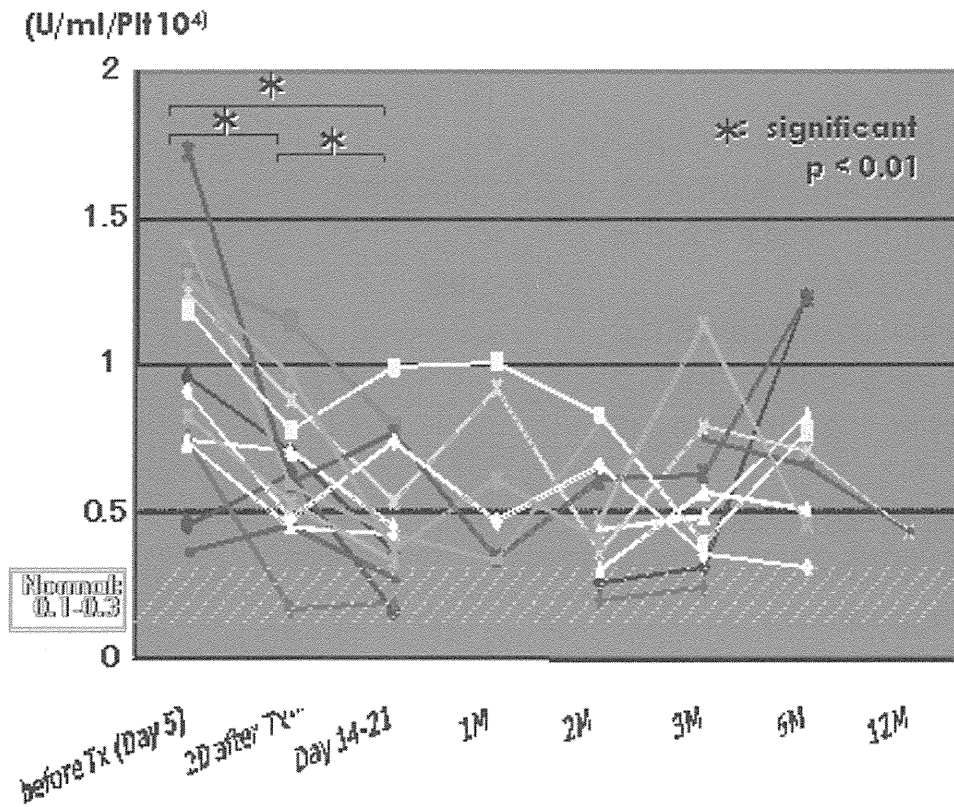


図3 IVIG 無施行例の PDMP 経時的変化

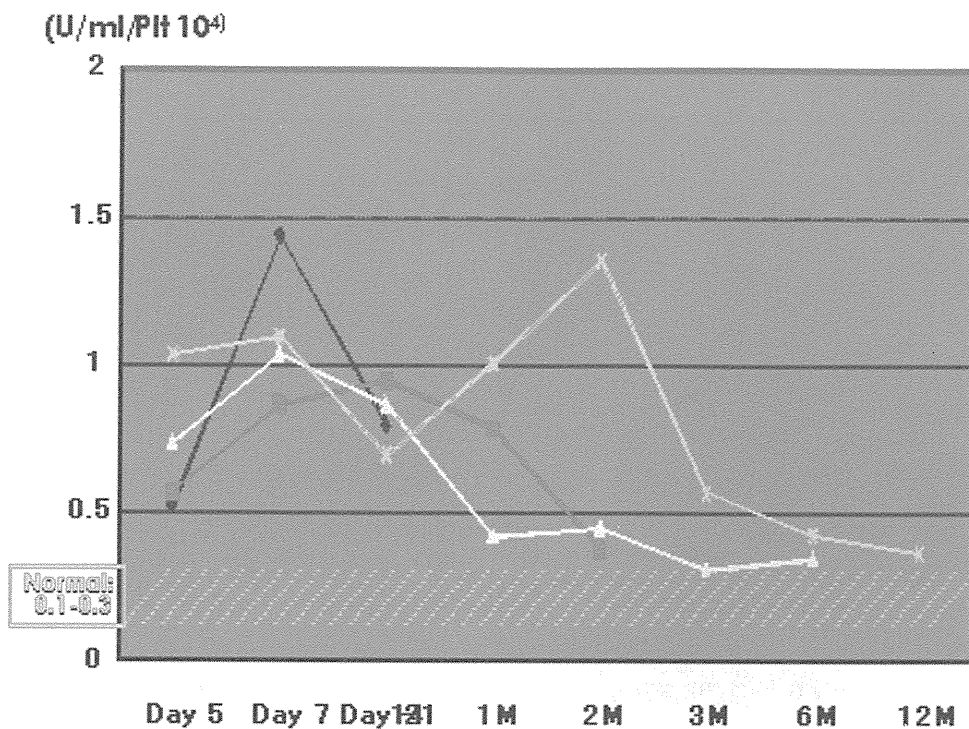


図4 IVIG奏功群および不応群におけるROM動態

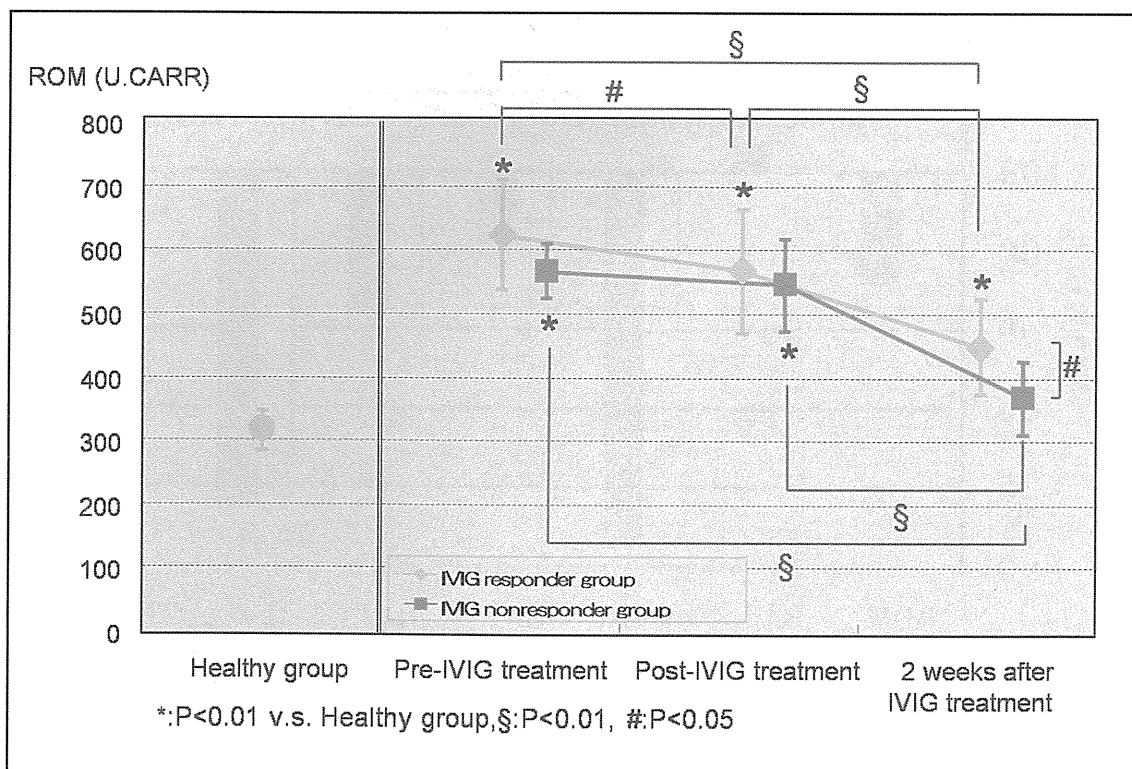


図5 IVIG奏功群および不応群におけるBAP動態

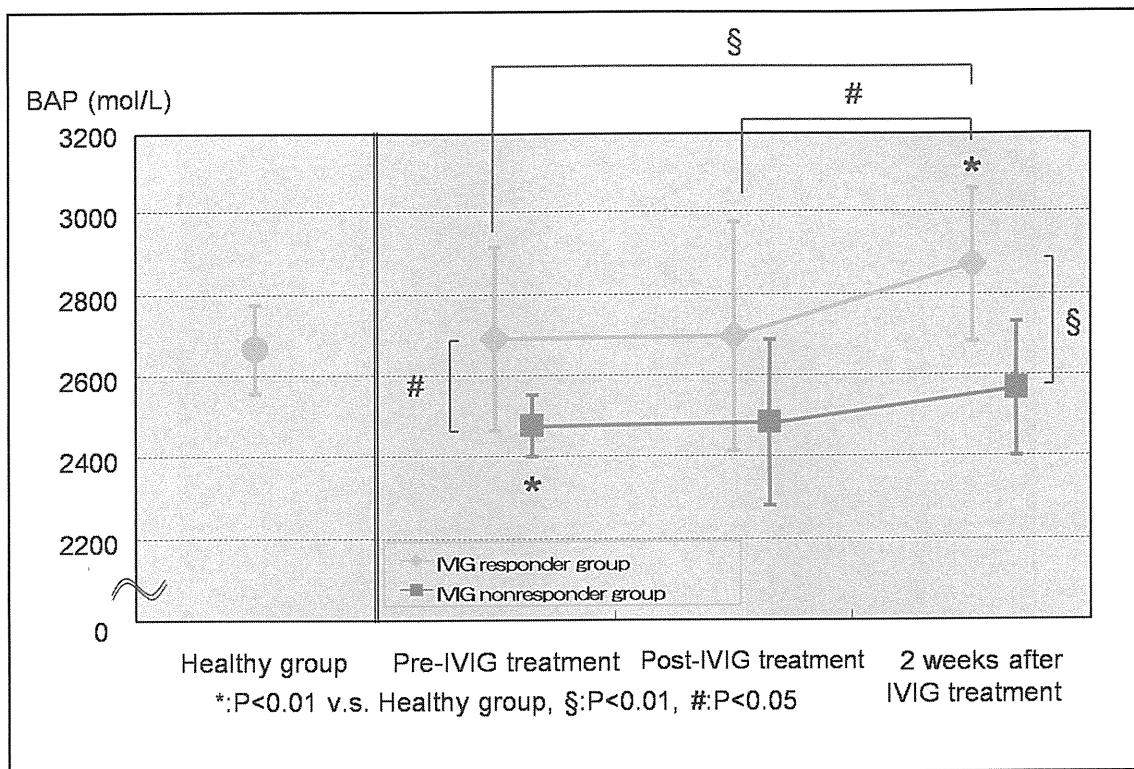


図6 IVIG奏功群におけるROM, BAP, および各炎症性マーカーの変化率

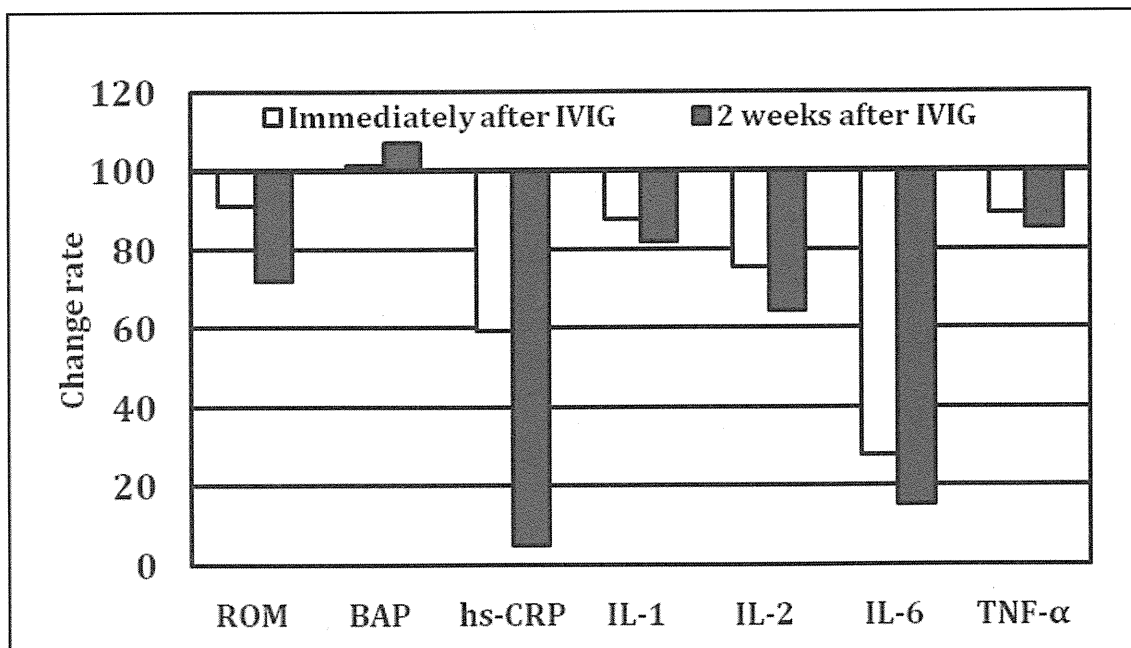
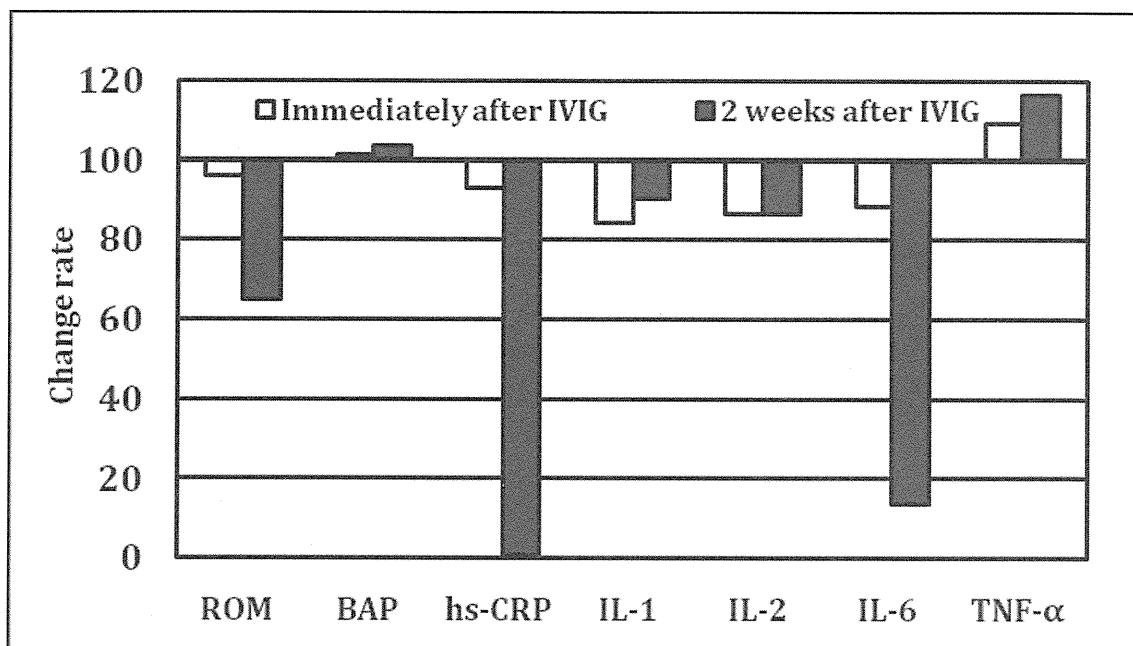


図7 IVIG不応群におけるROM, BAP, および各炎症性マーカーの変化率



厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告

2010 年度

「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」

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）  
山口賢一郎（国立病院機構小倉医療センター小児科医員）  
田中珠美（九州大学大学院医学研究院成長発達医学学術研究員）  
高田英俊（九州大学大学院医学研究院成長発達医学准教授）  
楠原浩一（産業医科大学小児科教授）  
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）  
土方敦司（理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター  
免疫ゲノミクス研究グループ）  
小原 收（理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター  
免疫ゲノミクス研究グループ グループディレクター）

2011-2012 年度

「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：

【2010年度】

川崎病急性期の病態は、血清中の炎症性サイトカインやケモカインの上昇を伴う免疫系の著明な活性化により特徴付けられるが、これら化学伝達物質の主要な産生源ははまだ解明されていない。我々は、flow cytometry, DNA Microarray解析, 定量的RT-PCR法により末梢血単核球(PBMNCs)の活性化状態について解析を行った。川崎病急性期でのNK細胞や $\gamma$   $\delta$ T細胞のCD69陽性細胞の割合は、川崎病回復期に比較して著明に高値を示した。Microarray解析により、川崎病急性期においてNAIP, IPAF, S100A9, FCGR1A, GCAの5遺伝子で発現が上昇し

ており、川崎病急性期に関連のあるpathwayが自然免疫系に密接に関連していた。急性期川崎病患者PBMNCにおけるdamage-associated molecular pattern molecule(DAMP)(S100A9, S100A12)の遺伝子発現が回復期に比較して有意に上昇していたが、TNFA, IL1B, IL6の遺伝子発現は川崎病患者と正常対照で有意差は認められなかった。川崎病患者PBMNCにおいてTNF- $\alpha$ , IL-10, INF- $\gamma$ 細胞内サイトカイン染色を行ったが、検出されなかった。これらの結果から、PBMNCはDAMP遺伝子の高発現、炎症性サイトカイン遺伝子の発現低値を特徴とするユニークな活性化状態を示し、自然免疫系が川崎病の病因、病態へ重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 【2011-2012年度】

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検討を行った。

#### 【2010年度】

##### A. 研究目的

本研究は、川崎病急性期におけるPBMNCsの活性化状態について解析することを目的とする。

##### B. 研究方法

【対象】2005年4月から2009年2月までに当院および関連病院へ入院し、川崎病と診断された51例、中央値 2.0歳 (3ヶ月-7.3歳)を対象とした。川崎病患者は、全例でアスピリン内服治療(30mg/kg/日)、免疫グロブリン静注療法(IVIG 1-2g/kg)を施行された。

flow cytometry法を用いて川崎病における免疫学的profileを検討する目的で、38例の川崎病患者について解析を行った。冠動脈病変合併例は認められなかった。まずはじめ

に、川崎病7症例、正常対照(age-matched)15例について、末梢血における活性化T, B, NK細胞の割合を解析した。CD69, HLA-DR, CD25を活性化マーカーとして用いた。これらの細胞はIVIG治療前(中央値 day5; range, day3-6)および回復期(中央値 day13: range, day13-18)で採取した。川崎病における免疫学的profileをさらに解析するために、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞、B細胞についてCD69陽性細胞の割合を解析した。

mRNA発現レベルを解析するために、5名の正常対照およびCALを合併していない川崎病3症例(中央値 4.7歳; range, 4.1-5.3歳)から治療前(day 4-5)に末梢血を採取した後、PBMNCsを分離し、cDNA microarrayを行った。

定量的RT-PCR法を用いてmRNA発現レ

ベルを解析する目的で、川崎病患者10-16症例(急性期および回復期。中央値 1.7歳；range 5か月-13.1歳)、対照症例20例(age-matched) [急性期感染症9例 (中央値 2.6歳；range, 5か月-13.1歳)：細菌性髄膜炎3例、麻疹 3例、EBウイルス感染症 3例)、正常対照 11例(中央値 5.0歳；range; 1.7-7.6歳)]から検体を採取した。

## 【手法】

### 1. Microarray解析

3万遺伝子を搭載したAceGene Human Oligo Chip 30K (Hitachi Software Engineering)を用いて、急性期川崎病患者PBMNCsについてMicroarray解析を行った。

### 2. pathway解析

急性期川崎病における免疫病態を解析するために、Microarray dataを用いてシステム生物学的approachを行った。正常対照に比較して、川崎病急性期PBMNCでの遺伝子発現が2倍以上もしくは1/2以下の遺伝子を選択した。選択された遺伝子をPathway-Expressにinputし、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathwayを用いて各pathwayの有用性を解析した。

### 3. 定量的 RT-PCR

S100A9, S100A12, TNFA, IL1B, IL8, IL6 mRNA発現レベルは、TaqMan® gene expression assays(Applied Biosystems)を用いて解析を行った。TaqMan human GAPDH (Applied Biosystems)を内在性コントロールとして用いた。全ての実験は、duplicateで行った。

### 4. flow cytometry

EDTA採血により血液検体を採取した。EPICS XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)を用いて、採取後12時間以内にCD69陽性細胞の割合について解析を行った。HLA-DR, CD25陽性細胞の割合については、採取後24時間以内で解析を行った。

細胞内サイトカイン染色では、LPSもしくはPMA + ionomycinで4時間刺激(37°C、5% CO<sub>2</sub>)を行ったものをpositive controlとした。川崎病患者末梢血の細胞内サイトカイン染色は、in vitroでの刺激を行わずに解析した。

## (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. Flow cytometry法を用いた、川崎病急性期におけるT, B, NK細胞の活性化マーカーの解析

flow cytometry法を用いて川崎病患者末梢血における活性化T, B, NK細胞について解析した。NK細胞は3つのsubtypeに分け、活性化マーカーにはCD69, HLA-DR, CD25を用いた。Figure 1aに示すように、CD69+T細胞の割合が川崎病回復期に比較して急性期で有意に高値を示したが、CD69+ B細胞の割合は急性期に比較して回復期で有意に上昇していた。また、CD56+CD16+, CD16+CD56- NK細胞におけるCD69陽性細胞の割合が川崎病回復



期に比較して急性期で有意に高値だった。

川崎病におけるT細胞の活性化をさらに解析するために、T細胞を $\alpha\beta$ 、 $\gamma\delta$ T細胞へ分けてCD69陽性細胞の割合を解析した。Figure 1b, 1cに示すように、 $\gamma\delta$ T細胞におけるCD69陽性細胞の割合が回復期に比較して急性期で有意に高値だった(中央値急性期 17.9%、回復期 7.9%,  $p < 0.0005$ )。一方、 $\alpha\beta$ T細胞については、 $\gamma\delta$ T細胞に比較して活性化は弱い傾向を示した(中央値急性期 4.5%、回復期 2.8%)。

## 2. cDNA Microarray法を用いた、川崎病患者PBMNCsの遺伝子発現解析

### 【pathway解析】

川崎病における自然免疫、獲得免疫の関与をより詳細に検討するために、cDNA Microarray法を用いて、川崎病患者PBMNCsの遺伝子発現profileについて解析した。解析の結果、正常対照に比較して、川崎病急性期患者PBMNCsで2倍以上発現の高い遺伝子が658存在した。その658遺伝子を用いてPathway解析を行ったところ、川崎病急性期と有意に相関のあるpathwayが36存在し、そのうち上位 12 pathwayを示した(Table 1)。獲得免疫に関与しているantigen processing and presentation, T cell receptor(TCR) signaling pathway, B cell receptor(BCR) signaling pathwayは、down-regulatedされていた。一方、自然免疫に関与しているToll-like receptor(TLR) signaling pathway、NK細胞関連細胞傷害性pathwaysは、一部up-regulatedしていた。

### 【マイクロアレイ解析における上位10遺伝子について】

マイクロアレイ解析の結果、正常対照に

比較して川崎病患者PBMNCsで3倍以上発現の高い遺伝子が47存在し、そのうち上位10遺伝子を示した(Table 2)。10遺伝子のうち、NLR family, apoptosis inhibitory protein(NAIP), NLRC4(IPAF), FCGR1A, grancalcin(GCA), S100A9などの自然免疫系に関与しているものが5遺伝子存在した。一方、fibrinogen-like protein 2 (FGL2), placenta-specific 8 (PLAC8), immunoglobulin superfamily, member 6 (IGSF6)などの自然免疫、獲得免疫系の双方に関連のあるものが3遺伝子存在した。

## 3. 川崎病患者におけるサイトカイン解析

### 【マイクロアレイ解析】

これまでに川崎病との関連が報告されている16遺伝子について、マイクロアレイ解析の結果からデータを抽出し、正常対照と川崎病患者PBMNCsにおける遺伝子発現の比較を行った(Table 3)。自然免疫と関連のあるS100A9 やS100A12遺伝子、またhepatocyte growth factor(HGF)遺伝子は、正常対照に比較して川崎病急性期で2倍以上、発現が高値だった。一方、ほかのサイトカイン、ケモカイン遺伝子の発現レベルは上昇していなかった。IL4, IL10, IFNG遺伝子発現レベルの減少は、定量的RT-PCR法を用いた我々の過去の報告と一致していた。

### 【定量的RT-PCR法による解析】

マイクロアレイ解析のデータを裏付けるために、6つの主要なサイトカイン(S100A9, S100A12, IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )の遺伝子発現について、定量的RT-PCR法を用いて川崎病患者、正常対照PBMNCsにおいて解析を行った。S100A9 やS100A12遺伝子発現レベルは、川崎病回

復期に比較して急性期で有意に高値を示した(Figure 2)。IL8遺伝子発現レベルは、正常対照に比較して、川崎病急性期および回復期でわずかながら上昇していた。TNF, IL1B, IL6遺伝子の発現レベルは、正常対照に比較して、川崎病急性期や回復期で有意な上昇は認められなかった。

#### 4. 細胞内サイトカイン染色

flow cytometry法を用いて、川崎病患者(急性期・回復期)PBMNCsの細胞内サイトカイン染色を行った。川崎病患者末梢血において、単球におけるTNF- $\alpha$ 、IL-10産生、T細胞におけるIFN- $\gamma$ 、IL-10産生について解析を行った。Figure 3に示すように、単球におけるTNF- $\alpha$ もしくはIL-10産生細胞の割合や、T細胞におけるIFN- $\gamma$ もしくはIL-10産生細胞の割合は、急性期(単球におけるTNF- $\alpha$ 産生細胞の割合：中央値 0.08%，range 0.04% -0.09%；単球におけるIL-10産生細胞の割合：中央値 1.27%，range 0.47% -1.31%；T細胞におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞の割合：中央値 0.02%，range 0.00% -0.03%；T細胞におけるIL-10産生細胞の割合：中央値 0.61%，range 0.35-0.69%)と回復期(単球におけるTNF- $\alpha$ 産生細胞の割合：中央値 0.05%，range 0.00% -0.08%；単球におけるIL-10産生細胞の割合：中央値 1.16%，range 0.79% -2.43%；T細胞におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞の割合：中央値0.02%，range 0.00% -0.07%；T細胞におけるIL-10産生細胞の割合：中央値 0.45%，range 0.40-0.70%)で有意な変化は認められなかった。川崎病急性期末梢血におけるこれらのサイトカインの細胞内産生は非常に少ないことが示唆された。

#### D. 考察

サイトカイン、ケモカインおよび成長因子の大量産生が川崎病の免疫病態に重要な役割を果たしている。末梢血白血球についての数多くの免疫学的研究が報告されてきたが、末梢血T細胞の活性化状態についてはいまだ議論が分かれるところである。T細胞を、自然免疫系、獲得免疫系にそれぞれ主に関与している、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞に分けて解析した論文はこれまでに報告されていない。本研究では、NK細胞と同様に $\gamma\delta$ T細胞の有意な活性化が認められたが、これまでの報告にあるように好中球や単球が川崎病において活性化していることを合わせると、川崎病急性期において自然免疫系が密接にかかわっていることが示唆された。

川崎病において、活性化したT細胞が急性期に末梢血から炎症局所へ移動して、回復期に末梢血へ戻ってくると考えられてきた。しかし、川崎病急性期患者の末梢血において、 $\gamma\delta$ T細胞とNK細胞が有意に活性化していること、また活性化した $\alpha\beta$ T細胞の割合がそれほど多くないことから、これらの細胞の活性化状態を検討するために、cDNA microarray法を用いてPBMNCs遺伝子発現解析を行った。pathway解析の結果から、獲得免疫系に関与しているTCR, BCR signaling pathwayがdown-regulateされており、自然免疫系に関連のあるTLR signaling pathway、NK細胞関連細胞傷害性pathwaysは、一部up-regulatedしていたが、大部分はdown-regulateされていた。これらの結果から、少ない割合の $\alpha\beta$ T細胞や多くの割合の $\gamma\delta$ T細胞は、TCR signaling pathwayを介してconventionalな抗原もしくはスーパー抗原により刺激されるのではなく、自然免疫系の受容体を直接介して、な

いはサイトカインsignaling pathwayを介して活性化されることが示唆された。

Microarray解析の結果、正常対照に比較して川崎病患者PBMNCsにおいて3倍以上発現の高かった上位10遺伝子のうち、5遺伝子が自然免疫系に関与しており、そのうち2遺伝子はNLR signaling pathwayに関連している分子だった。Popperらは、川崎病急性期患者から採取した、好中球を含んだ末梢血全血でのDNA Microarray解析において、自然免疫系、炎症反応、好中球の活性化、apoptosis等に関与している遺伝子の発現レベルがup-regulateされており、NK細胞やCD8陽性リンパ球に関連する遺伝子発現がdown-regulateされていたと報告した。Vermaらは、川崎病急性期において、TLR signaling pathwayなどの自然免疫系や、補体の活性化、基質-接着分子に関連する遺伝子の発現がup-regulateされていたと報告した。

末梢血単球は川崎病において活性化していると考えられているが、川崎病患者血清中で上昇しているIL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ などのサイトカインを実際に単球が産生していることを示した論文は非常に少ない。Abeらは、川崎病患者から分離した単球におけるIL6, IL8, TNF遺伝子の発現レベルは大量 $\gamma$ グロブリン療法前後で有意な変化は認められなかったと報告した。一方、単球はdamage-associated molecular pattern molecules(DAMPs) (S100A9, S100A12)などのユニークなサイトカインを産生しており、DAMPsのうちの一分子は、TNFによって活性化された内皮細胞との相互作用を介して、単球から産生されることが報告されている。本研究でのMicroarray、定量的RT-PCR法によ

る解析により、川崎病急性期、回復期、および正常対照から採取したPBMNCsにおけるIL6, IL1B, TNFA mRNAレベルは3群間で有意差は認められなかった。しかしながら、IL8遺伝子発現レベルについては、より多くのサンプルで定量的RT-PCR法により解析をした結果、川崎病急性期および回復期でIL8遺伝子の発現レベルが軽度上昇していた。このことから、末梢血単核球のうち、単球は弱く活性化していることが推測された。過去の報告では、免疫蛍光顕微鏡により細胞内IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ を解析したところ、PBMNCsのうち1-2%がサイトカイン産生細胞だったことが示されたが、我々の研究では、血液採取後速やかに解析を行ったflow cytometry法により、細胞内TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ 陽性細胞は、川崎病急性期において殆ど検出されなかった。

我々は、当研究室で独自に収集した川崎病検体において、inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinase C (ITPKC) 遺伝子が川崎病の発症と関連があることを確認したが(data not shown)、ITPKCは恐らく $\alpha\beta$ T細胞というよりはむしろ、自然免疫系の細胞や非免疫系の細胞(内皮細胞)のregulatorとして役割を果たしていることが予想される。理由としては(i) $\alpha\beta$ T細胞のうち活性化マーカーが陽性だった細胞の割合が比較的小さかったこと、(ii)獲得免疫系に関与しているpathwayが全てdown-regulateされていたこと、(iii)我々の研究室において、自然免疫系受容体遺伝子と川崎病の発症に有意な関連があることを発見し、さらに自然免疫系受容体ligandにより惹起される新しい川崎病冠動脈炎マウスモデルを確立したこと(unpublished observation)が挙げられる。

## E. 結論

川崎病急性期におけるPBMNCsは、DAMP遺伝子の高発現や、炎症性サイトカイン遺伝子の低発現といったユニークな活性化状態を示し、自然免疫系が川崎病の病因、病態に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 【2011-2012年度】

### A. 研究目的

IVIG不応川崎病では約30%と高率に冠動脈病変(CAL)を合併するため、その治療法の確立が急務となっている。本邦では2005年以降Infliximab(IFX)が試用されおり、当科でも2009年以降治験に参加している。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。

### 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。

### (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IVIG7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】

#### ①IFX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)と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。