

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1症例ではIFXは無効であり巨大瘤が残存した。

IFXは、TNF α 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. 研究発表

1. 論文発表

Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease.
Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K, Takada H, Kusuhara K, Hara T.

Hum Immunol. 70: 468-71, 2009

Cardiovascular complications associated with chronic active Epstein-Barr virus infection.

Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Ikeda K, Yamaguchi K, Nomura A, Takada H, Abe Y, Hara T:

Pediatr Cardiol. 30: 274-81, 2009

FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages.

Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD:

J Biol Chem. 27: 8548-56, 2009

Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome.

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

J Exp Med. 206: 1291-301, 2009

Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. Clin Exp Immunol. 160: 246-55, 2010

- Muneuchi J, Ishimura M, Takada H, Hoshina T, Utsunomiya R, Ikeda K, Yamaguchi K, Ohga S, Kusuhara K, Hara T : Incomplete Kawasaki disease in a patient with chronic granulomatous disease. *Pediatr Int.* 52: e134-6, 2010
- Takada H, Nomura A, Ishimura M, Ichiyama M, Ohga S, Hara T: NEMO mutation as a cause of familial occurrence of Behçet's disease in female patients. *Clin Genet.* 78: 575-9, 2010
- Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 54: 299-306, 2010
- 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
- Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T: Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants. *Pediatric Blood & Cancer.* 56: 267-272, 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- γ 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

Ohga S, Ishimura M, Yoshimoto G, Miyamoto T, Takada H, Tanaka T, Ohshima K, Ogawa Y, Imadome K, Abe Y, Akashi K, Hara T:

Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood.

J Clin Virol. 51: 31-7, 2011

Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T:

Genetic contribution of vascular endothelial growth factor pathway to the severity of retinopathy of prematurity.

J Perinatol. 31: 439-43, 2011

Kinjo T, Ohga S, Ochiai M, Honjo S, Tanaka T, Takahata Y, Ihara K, Hara T: Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants.

Early Hum Dev. 87: 439-43, 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

Makimura M, Ihara K, Kojima-Ishii K, Nozaki T, Ohkubo K, Kohno H, Kishimoto J, Hara T:

The signal transducer and activator of transcription 5B gene polymorphism contributes to the cholesterol metabolism in Japanese children with growth hormone deficiency.

Clin Endocrinol. 74: 611-7, 2011

Iwayama M, Kira R, Kinukawa N, Sakai Y, Torisu H, Sanefuji M, Ishizaki Y, Nose Y, Matsumoto T, Hara T:

Parental age and child growth and development: child health check-up data.

Pediatr Int. 53: 709-14, 2011

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 κ -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, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada

H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease.

The 6th Congress of Asian Society of Pediatric Research. April 15-18, 2010, Taipei, Taiwan

Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease.

The Fukuoka International Symposium on Perinatal Medicine (FISPM). August 21, 2010, Fukuoka, Japan

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 7th 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 7th Congress of Asian Society of Pediatric Research, April 30-May 3, 2011, Denver

池田和幸、山口賢一郎、高田英俊、水野由美、原寿郎：

川崎病の包括的研究1. 急性期病態と自然免疫の関連

第112回日本小児科学会学術集会
2009.4.17-19 奈良

池田和幸、山口賢一郎、原寿郎：

川崎病の包括的解析2. 自然免疫系受容体ligandによる内皮細胞の刺激

第112回日本小児科学会学術集会
2009.4.17-19 奈良

池田和幸、山口賢一郎、田中珠美、水野由美、土方敦司、小原 収、山村健一郎、高田英俊、楠原浩一、原寿郎：

川崎病急性期病態と自然免疫の関連

第8回九州川崎病研究会 2009.5.16 福岡

池田和幸、山口賢一郎、高田英俊、水野由美、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29回日本川崎病学会 2009.10.16-17
名古屋

村田憲治、長友雄作、永田 弾、山村健一郎、池田和幸、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

第461回日本小児科学会福岡地方会
2010.10.9 福岡

池田和幸、山村健一郎、永田弾、松尾知子、水野由美、原寿郎：

Host genetic factorと臨床データを組み合わせた新たな冠動脈病変(CAL)予測法の

開発

第9回九州川崎病研究会 2010.5.22 長崎

池田和幸、山村健一郎、永田弾、松尾知子、水野由美、原寿郎：

Host genetic factorと臨床データを組み合わせた新たな冠動脈病変(CAL)予測法の開発

第46回日本小児循環器学会総会・学術集会
2010.7.7-9 千葉

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、小原収、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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【2010年度】

別刷参照 (Clin Exp Immunol. 2010)

【2011-2012年度】

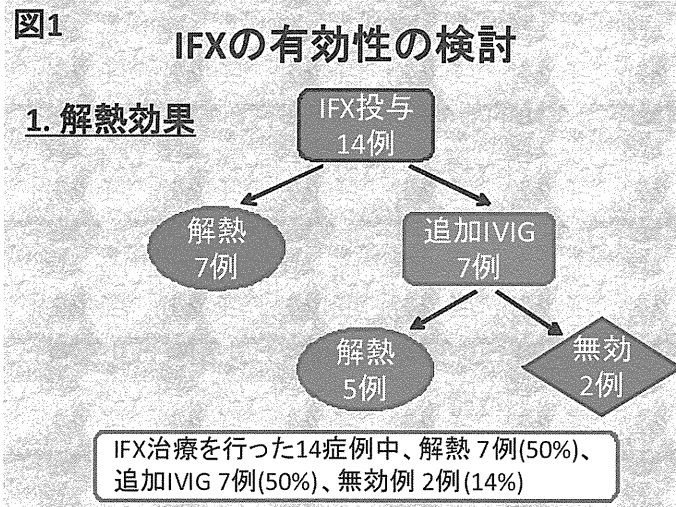


図2 2. IFX投与病日でのCAL残存の比較

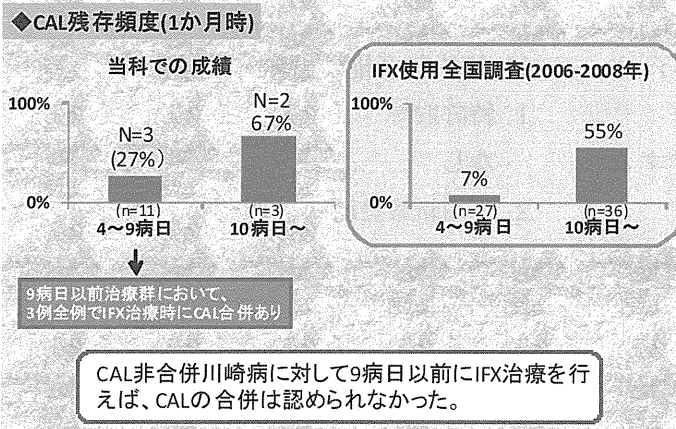
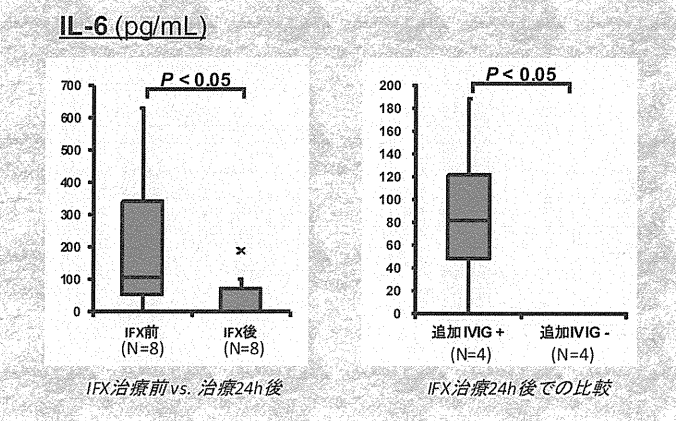


図3 IFX治療前後のサイトカインの変化①



1. 難治性川崎病における血管内皮細胞特異的のサイトカインの動態

2. 川崎病急性期における miRNA による NF- κ 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

分担研究者	市田 落子	富山大学医学部小児科	准教授
研究協力者	廣野 恵一	富山大学医学部小児科	助教
研究協力者	齋藤 和由	富山大学医学部小児科	助教
研究協力者	高崎 一朗	富山大学遺伝子実験施設	助教

1. 難治性川崎病における血管内皮細胞特異的のサイトカインの動態

研究要旨：

【背景】川崎病は小中動脈を中心とした全身の血管炎であり、特に冠動脈が傷害される。免疫グロブリン大量療法 (IVIG) は、最も有効な川崎病の治療法であり、冠動脈病変 (CAL) の合併率を減少させたが、冠動脈病変は川崎病を発症した10%に認められ、15%はIVIGに抵抗性の難治の川崎病であり、新たな治療法の確立が望まれている。川崎病急性期には様々なサイトカインの活性化が報告され、なかでも炎症性サイトカインであるTumor necrosis factor-alpha (TNF- α) は発症早期に高値を示し、炎症機転の中心的な役割を果たすと考えられている。一方、川崎病は、自然免疫の爆発的な活動を特徴とし、中でも、Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) の一つであるMRP8/MRP14やS100A12は、血管内皮細胞のパターン認識受容体により認識され、シグナル経路から、様々な炎症性サイトカインを誘導し、川崎病では、冠動脈病変を含めた血管炎の重要なマーカーであることを我々は明らかにしてきた。インフリキシマブはTNF- α モノクローナル抗体であり、TNF- α を介して引き起こされる慢性関節リウマチやクローン病といった炎症性疾患において、有効な治療薬であることが報告されてきている。近年、川崎病においても、IVIG無効、メチルプレドニンパルス療法 (IVMP) の患者に対するインフリキシマブの投与例の報告が散見されてきている。

【目的】IVIG無効、IVMP無効の難治川崎病において、インフリキシマブを投与し、炎症性サイトカインとDAMPの動態の解析を行い、インフリキシマブの血管炎に対する作用機序を明らかにした。

【方法】対象は、平成15年から平成18年に発症した11人の川崎病患者(男6人、5人)で、年齢は3ヶ月から7歳5ヶ月(中央値3.8歳)であった。対象の患者は、すべて診断基準を満たし、IVIG療法またはIVMP療法が無効であった。インフリキシマブ投与前後の血液を採取し、ELISA法を用いて、soluble TNF- α receptor (sTNFR)、interleukin(IL)-6、vascular endothelial

growth factor (VEGF)、myeloid-related protein (MRP) 8/MRP14、S100A12、soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE)の動態を検討した。また健常群33例および川崎病IVIG反応群18例とIVIG不応群14例についても動態を解析し、インフリキシマブ投与群と比較検討を行った。

【結果】インフリキシマブ投与例11例中8例が、投与後に臨床症状の改善が認められた。3例はインフリキシマブ投与後も臨床症状が改善せず、炎症反応が遷延し、IVMPの再投与およびサイクロフォスファミドの投与を余儀なくされた。11例中4例において、冠動脈病変を認められたが、インフリキシマブ投与前より冠動脈病変が認められていた。IVIG反応群ではIVIG投与前において、STNFR、IL-6、VEGF、MRP8/MRP14、S100A12は健常群との比較では有意に高値であったが、IVIG投与後に有意に低下した。IVIG不応群ではIVIG投与前後に、STNFR、IL-6、VEGF、MRP8/MRP14、S100A12は有意に高値を示し続けた。インフリキシマブ投与例ではSTNFR、IL-6はインフリキシマブ投与前に有意に高値を示し、投与後に低下したが、MRP8/MRP14およびS100A12はむしろインフリキシマブ投与後に増加し、VEGFは変化なく高値を示し続けた。

【結論】インフリキシマブは難治川崎病における有効な治療法のひとつであることが示された。またインフリキシマブ治療によりMRP8/MRP14やS100A12といったPAMPおよびVEGFが抑制されなかったことは、全身の炎症機転はインフリキシマブにより抑制されても、局所の血管炎は抑制されないことが示唆され、冠動脈病変の悪化を十分に阻止できない可能性が示された。そのため、難治川崎病においては、インフリキシマブを早期投与することで、単球・マクロファージの活性化を抑え、血管炎の進展を防止することが望ましいと思われた。

2.川崎病急性期におけるmiRNAによるNF- κ 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(R²=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- κ 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- κ 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、本研究を施行する際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(R2=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-κB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

- 1) Hirono K, Saito K, Ichida F, Saji T et al. The efficacy of infliximab treatment and dynamic changes of inflammatory cytokines in patients with refractory Kawasaki disease. *Pediatric Res* 2009 Jun;65(6):696-701.
- 2) 佐地 勉、鈴木啓之、市田落子、小林 徹。川崎病急性期治療の最前線。 *Pharma Medica*, 2009;27:3:167-175

- 3) 廣野恵一、市田落子：『川崎病のすべて』インフリキシマブ療法 石井正浩他編 *アクチュアル小児科* 中山書店 東京、2009:112-115
- 4) 廣野恵一、市田落子：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
- 5) 廣野恵一、市田落子 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
- 6) 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, Keiichi Hirono, Keijirou Ibuki, Hirokazu Kanegane, Fukiko Ichida, and Toshio Miyawaki. S100 proteins could not be suppressed by infliximab treatment in refractory Kawasaki disease. 5th World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery. 22.Jun 2009, Cairns, Australia
2. Keiichi Hirono, Yasushi Kemmotsu, Toho, Kazuyoshi Saito, Keijirou Ibuki, Hirokazu Kanegane, Fukiko Ichida, Tsutomu Saji, Toshio Miyawaki. S100 Proteins Could Not Be Suppressed By Infliximab Treatment In Refractory Kawasaki Disease. American Heart Association, Basic Cardiovascular

- Sciences Conference. 2009. 20. July 2009. Las Vegas. USA
3. 齋藤和由、伊吹圭二郎、小澤綾佳、渡辺一洋、廣野恵一、上勢敬一郎、金兼弘和、市田路子、宮脇利男. 「難治性川崎病に対してシクロスポリンAが奏効した3症例」第23回日本小児科学会富山地方会、2009年6月28日、富山
 4. 中村常之、秋田千里、太田邦雄、廣野恵一、田村知史、西尾夏人、畑崎喜芳、上勢敬一郎、西田公一、石原靖紀、酒詰忍. 北陸地区の川崎病急性期治療の現状. 第45回日本小児循環器学会総会・学術集会、2009年7月15日、神戸
 5. 齋藤和由、廣野恵一、伊吹圭二郎、小澤綾佳、渡辺一洋、上勢敬一郎、市田路子、宮脇利男. 「シクロスポリンAを投与した難治性川崎病3症例におけるサイトカインの検討」第29回 日本川崎病学会 2009年10月17日、名古屋
 6. 齋藤和由、廣野恵一、伊吹圭二郎、渡辺一洋、市田路子. 川崎病急性期におけるmicroRNAによる炎症の制御機構 第46回日本小児循環器学会・学術集会 2010.7.9 浦安
 7. 齋藤和由、高崎一朗、伊吹圭次郎、小澤綾佳、渡辺一洋、廣野恵一、ニールボールス、市田路子、宮脇利男. 川崎病急性期の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について 第30回日本川崎病学会・学術集会 10.10.2010 京都
 8. Kazuyoshi Saito, Ichiro Takasaki, Keiichi Hirono, Keijiro Ibuki, Kazuhiro Watanabe, Neil E. Bowles, Fukiko Ichida, Toshio Miyawaki. MicroRNAs May Control MRNA Networks In Circulating PBMCs During The Acute Phase Of Kawasaki Disease The 83th Scientific sessions of AHA 2010, Chicago 2010.11.17
 9. 市田路子. 「 γ -グロブリン不応例の予測・層別化とそれに対する治療戦略」免疫グロブリン不応例に対する抗サイトカイン療法. 第113回日本小児科学会学術集会. シンポジウム2010.4.24 盛岡
 10. Saito K, Hirono K, Ibuki K, Kanegane H, Ichida F, Miyawaki K and Kemmotsu Y. S100 proteins could not be suppressed by infliximab treatment in refractory Kawasaki disease. APPCS 2010.7.7 Urayasu
 11. 齋藤和由 難治性川崎病に対するシクロスポリンAの効果および作用機序の検討 第14回川崎病治療懇話会 2010.7.9 浦安
 12. Kazuyoshi Saito, Ichiro Takasaki, Keiichi Hirono, Keijiro Ibuki, 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
 13. 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

14. 齋藤和由、高崎一郎、廣野恵一、渡辺一洋、小澤綾佳、市田露子、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
15. 齋藤和由、高崎一郎、渡辺一洋、小澤綾佳、市田露子、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のプロトコルの検証に寄与することはできなかったが、今後の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としてさらに発展させていきたい。

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その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。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究

に関する倫理指針」に則って行われた。試料提供機関は各々の施設の倫理委員会に研究計画を申請してその承認を得た。これまでに中核となる施設(群馬大学医学部小児科、理化学研究所横浜研究所、日本医科大学小児科、九州大学医学部小児科、東邦大学医学部小児科)で研究計画の倫理審査が終了し承認が得られた。今後さらに、運営委員の所属する施設を中心としてIRB申請を加速する予定である。

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アム(英語名: Japan Kawasaki Disease Genome Consortium)」が結成された。コンソーシアム規約を参考資料1に示す。本コンソーシアムは、「川崎病の疫学やゲノムに対する知識を深め、川崎病の発症や重症化をより有効に予測し予防するための新しい研究計画を立案するために協力すること(規約第3条)」、および「川崎病DNAバンクを設置して遺伝に関する共同研究を推進すること(同4条)」を目的とする。さらに、共同研究を行う上で必要な機密保持や参加施設の権利と義務、知的財産権保護についても一定の合意に達した(同7～9条)。本コンソーシアムは2010年2月から2015年3月まで活動する予定である。

(2) DNA検体の収集と保存

DNA検体の収集と保存の方法を参考資料2のフローチャートに示す。DNA検体の収集と保存の体制は計画に沿って整えられたが、RAISE Studyの中間解析後に新規患者のエントリーが停止されたため、研究期間中の新規DNA検体の収集は行われなかった。尚、参加施設で保存されている川崎病患

者の既存検体について調査したところ、約2,000名分のDNA検体がコンソーシアムでの研究に使用可能であることが分かった。

(3) DNA検体バンクの運用と研究プロジェクトの策定

新規DNA検体が得られなかったため、DNA検体バンクの運用はまだ行われていない。既存のDNA検体を用いた2つの研究プロジェクトが開始された。一つは、コンソーシアム参加機関である東邦大学およびその他の医療機関において収集された川崎病患者を解析対象としたゲノムワイド関連解析で、研究協力者らにより理化学研究所において実施した。この研究により新たな川崎病罹患感受性ローカスの候補が複数ヶ所見出された。もう一つは、中核施設でコンソーシアム発足以前に収集された川崎病患者のDNA検体を用いた候補遺伝子探索型のSNP解析である。既存検体を提供した施設が独自に見出した関連SNPや、前述のゲノムワイド関連解析により見出された候補遺伝子について、これまでに得られた知見をSNP解析で検証する試みを進めている。

D. 考察

多因子遺伝疾患では、個々の遺伝因子が疾患感受性などへ与える影響はそれほど大きくはなく、集団遺伝学的手法を用いて統計学的有意差を検出するためには多数(数百～数千またはそれ以上)の患者およびコントロール検体を解析する必要がある。これまで川崎病の遺伝的背景についての研究では、世界で最も川崎病罹患率が高く患者数も多いわが国の貢献が大きかった。しかし、近年他のアジア諸国や欧米においても川崎病の重要性と遺伝的要因に対する関心が高まっており、論文も多数報告されてい

る。欧米を中心として、国際コンソーシアムを組織して大規模なゲノムワイド関連解析を行おうとする動きも見られる。

本研究は、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発案され、川崎病遺伝コンソーシアムが結成されるに至った。治療効果やCAL合併などの臨床上の問題の遺伝的背景について探索するためには、疾患感受性についての関連解析以上に大規模な集団を対象とした研究が必要である。さらに、このような臨床病型に関連する遺伝因子は集団の異質性(Heterogeneity)の影響を受けやすいと考えられる。本研究で結成された川崎病遺伝コンソーシアムの利点の一つは、異質性の少ない日本で検体を収集できることであり、もう一つは、治療内容と効果、さらに統一された診断基準で決定された冠動脈病変などの正確な臨床情報が付加された検体を収集できることである。これは日本の川崎病の疫学的な特徴を生かした試みであり、世界的に見ても貴重なDNA検体バンクになることが期待される。今後、コンソーシアムへの新規参加機関のリクルートおよびIRB申請へのサポートを継続してすすめる予定である。

本研究は、RAISE Studyそのものが中間報告段階で早期に成果を上げたために、当初の予定通りの患者検体を収集することができなかった。しかし、DNA検体の収集と保存の体制を計画通りに整えることができたし、参加施設で保存されていた既存検体を用いた候補遺伝子探索型のSNP解析が進行中であることなど、遺伝研究を協働して進めるための「インフラ」を整えるという目的は達せられたと考えている。

E. 結論

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、検体の収集・保存のシステムを構築した。結果的にRAISE Studyのプロトコルの検証に寄与することはできなかったが、今後の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としてさらに発展させていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 阿部淳: 川崎病の病因. スーパー抗原. 「小児科臨床ピクシス9: 川崎病のすべて」石井正浩編. 中山書店. 東京. 32-33. 2009.
2. 阿部淳: 川崎病と遺伝. マイクロアレイからみた病因と病態. 「小児科臨床ピクシス9: 川崎病のすべて」石井正浩編. 中山書店. 東京. 50-53. 2009.
3. 阿部淳: 川崎病.in 「総合小児科診療のための小児科学レビュー2010」(五十嵐隆 監修). 総合医学社. 東京. 226-232, 2010.
4. Ebata R, Abe J, Yasukawa K, Hamada H, Higashi K, Suwazono Y, Saito H, Terai M, Kohno Y. Increased production of vascular endothelial growth factor-D and lymphangiogenesis in acute Kawasaki disease. *Circulation J.* 2011; 75:1455- 1462.

2. 学会発表

1. 阿部淳. 川崎病の診断と治療のバイオマーカーを探して. 第29回日本川崎病

- 学会. 2009年10月. 名古屋
2. 小林徹, 阿部淳, 尾内善広, 小川俊一, 深澤隆治, 原寿郎, 池田和幸, 荒川浩一, 佐地勉: 川崎病遺伝コンソーシアムの設立にむけて. 第29回日本川崎病学会. 2009年10月. 名古屋
 3. 阿部淳, 尾内善広, 小川俊一, 深澤隆治, 小林徹, 池田和幸, 佐地勉. 川崎病遺伝コンソーシアムの設立にむけて. 第46回日本小児循環器学会, 浦安. 7月7-9日, 2010. 4. 阿部淳. 川崎病の病因解明の最前線(セミナー講演). 第30回日本川崎病学会, 京都. 10月10-11日, 2010.
 5. Fukuda S, Oana S, Sakai H, Kato H, Ito S, Saito A, Abe J, Ito R, Takayama JI. Development of coronary artery abnormalities associated with persistence of non-fever symptoms in Kawasaki disease. Peiatric Academic Societies 2010 Annual Meeting. Vancouver, Canada. May 1-4, 2010.
 6. Fukuda S, Oana S, Sakai H, Kato H, Ito S, Saito A, Abe J, Sakamoto N, Takayama JI. Which biomarkers are associated with non-response to initial IVIG and development of coronary artery abnormalities in children with Kawasaki disease? Peiatric Academic Societies 2011 Annual Meeting. Denver, USA. Apr30 – May3, 2011.
 7. Fujimaru T, Ito S, Oana S, Kato H, Saito A, Abe J. Changes in serum cytokine levels during plasma exchange in patients with refractory Kawasaki disease. Peiatric Academic Societies 2011 Annual Meeting. Denver, USA. Apr30 – May3, 2011.
 8. 阿部淳. 川崎病の急性期治療におけるバイオマーカー. 第10回九州川崎病研究会, 佐賀. 5月28日, 2011.
 9. 益田博司, 小穴慎二, 土田尚, 石黒精, 阪井裕一, 伊藤秀一, 賀藤均, 齋藤昭彦, 阿部淳. インフリキシマブ療法を行った川崎病患者の冠動脈合併症とサイトカインの検討. 第114回日本小児科学会, 東京. 8月12-14日, 2011.
 10. 阿部淳. 川崎病の基本から見直す: 川崎病の原因追求の歴史. 第31回日本川崎病学会, 横浜. 9月30-10月1日, 2011.
 11. 服部淳, 益田博司, 小穴慎二, 阪井裕一, 伊藤秀一, 賀藤均, 阿部淳. 追加治療を要した川崎病不全型の4例の臨床的検討. 第31回日本川崎病学会, 横浜. 9月30-10月1日, 2011.
 12. Hamada H, Suzuki H, Abe J, Onouchi Y, Suzuki Y, Terai M, Hata A. Inflammatory cytokine profiles under cyclosporine treatment for refractory Kawasaki disease. American Heart Association 2011 Annual Meeting. Orlando, USA. Nov13-15, 2011.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

川崎病遺伝コンソーシアム規約

第1条(名称)	7
第2条(緒言)	7
第3条(目的)	7
第4条(プロジェクト)	7
第5条(組織構成)	7
第6条(研究資金)	8
第7条(機密保持)	8
第8条(参加機関の本プロジェクトにおける権利及び義務)	9
第9条(知的財産権)	9
第10条(研究成果の公開)	9
第11条(罰則)	10
第12条(期間)	10
第13条(解釈)	10
第14条(変更)	10
第15条(細則)	10

第1条(名称)

本コンソーシアムは、「川崎病遺伝コンソーシアム(英語名: Japan Kawasaki Disease Genome Consortium)」と称する。

第2条(緒言)

この規約はおのこの施設間で、あるいは参加施設総体として川崎病の基礎研究および応用研究を共同で進める際を守るべき原則を定めるものである。我々の目標はこれらの研究の成果が川崎病患者における現在の治療法向上と新規治療法や診断方法の開発へと結びつくようにすることである。

第3条(目的)

- (1) 川崎病遺伝コンソーシアム参加施設は川崎病の病態、治療、免疫、遺伝に関する共同研究を行う。個々の研究実施計画や目的、研究費獲得その他の具体的条件については個別に書面を作成して合意事項を記すこととする。
- (2) 参加施設は川崎病の疫学やゲノムに対する知識を深め、川崎病の発症や重症化をより有効に予測し予防するための新しい研究計画を立案するために協力する。
- (3) 参加施設はコンソーシアム内での共同作業を通じてお互いの専門性が補完的にまた互恵的に生かされるよう努力する。

第4条(プロジェクト)

川崎病遺伝コンソーシアムは平成23年3月までは厚生労働科学研究費を用いて実施される「重症川崎病患者に対する免疫グロブリンと免疫グロブリン・プレドニゾロン初期併用療法のランダム化比較試験」に付随する研究として行われる。平成23年4月以降は公的機関・団体などから得た資金を運営費として用いてプロジェクトを継続運営する。参加施設は代表者を通じて定期的に話し合い、以下の分野あるいはこれ以外の分野での共同研究を行う。

- (1) 川崎病の遺伝に関する共同研究およびその結果を疫学や臨床で確認すること。
- (2) 川崎病DNAバンク(仮称)を設置し、遺伝子の保存と管理を行うこと。
- (3) コンソーシアムで合意された他の事項について調査すること。
- (4) 参加施設の研究者達の研究報告をインターネットや e-mail、ニュースレターなどを通じて紹介、主要な研究結果を学会や臨床家、社会、政策立案者に向け広報すること。

第5条(組織構成)

本プロジェクトの推進を目的に設置する委員会及び事務局等の組織は以下のとおりとする。なお各組織における規則及び各組織相互の関係等については、別途各組織の設置要項等で定める。

(1) 代表者

コンソーシアムを組織、統括し参加施設のとりまとめを行う。平成23年3月までは東邦大学医療センター大森病院小児科佐地勉を代表者とし、平成23年4月以降は運営委員会で代表者を選出する。

(2) 運営委員会

本プロジェクト全体の推進に資することを目的として、基本方針・基本計画の策定等を行う。また参加機関間の研究成果の相互利用、事業推進に関する協議調整、本プロジェクトに関連するシンポジウムなど対外的な活動の企画をおこなう。運営委員会は必要に応じてワーキンググループ等を設置することができる。初期運営委員を付表に示す。また運営委員会は代表者の選出、運営委員のメンバー変更、顧問の委託を行うことができる。顧問は運営委員会の方針に対し助言を行うことができる。

(3) 事務局

本プロジェクトの進捗報告等のとりまとめ、コンソーシアムから委託された検体の収集、管理をおこなう。また臨床情報の収集、データプロバイダーへの検体配布も実施する。具体的な事務局運営方針については別途運営委員会にて決定する。平成23年3月までは群馬大学大学院小児科学分野に事務局を設置し、平成23年4月以降は運営委員会で協議し、事務局を新たに設置することとする。

第6条(研究資金)

各参加機関における本プロジェクトの研究活動に関して発生する費用については、以下の経費により負担するものとする。

- (1) 厚生労働科学研究費・文部科学研究費などの公的資金
- (2) 日本川崎病研究センターからの助成金
- (3) 各自で獲得する助成金や寄付金

第7条(機密保持)

本プロジェクトの活動によって他の参加機関から得た情報であって、当該情報提供元たる参加機関が機密と指定するものを、当該情報提供元たる参加機関の同意なく本プロジェクト外の第三者に提供しないこととする。また本プロジェクトの活動によって他の参加機関から得た機密情報について、本プロジェクト以外の目的に使用しないこととする。本プロジェクト外の第三者との間で機密情報の開示者あるいは受領者となる場合は、必要に応じて開示者と受領者との間で機密保持契約を締結することとする。ただし下記のいずれか一つにでも該当する情報については、本条における機密とは扱わないものとする。

- (1) 開示した参加機関の故意又は過失によらないで公知となった情報(ただし、他の公知の情報の集積から推認される情報は公知情報に含めない)で、書面で立証できるもの。
- (2) 機密とした参加機関の開示より前に、他の参加機関により既に知得されていた情報であって、