

201441006A

厚生労働科学研究費委託費

難治性疾患等実用化研究事業

川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 原 寿郎

平成27年3月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等実用化研究事業（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業（免疫アレルギー疾患実用化研究分野）））による委託業務として、国立大学法人九州大学 総長 久保千春 代理人 産学官連携本部長 若山 正人が実施した平成26年度「川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発」の成果を取りまとめたものです。

## 川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発

### 目 次

I 委託業務成果報告（総括）	3
川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発	
原 寿郎	
II 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 季節性、地域性による PAMPs/MAMPs の相違と治療効果に関する疫学的観点からの研究	11
中島康貴、西尾壽乗、原 寿郎	
九州大学病院小児科	
2. 川崎病におけるバイオフィルム制御薬クラリスロマイシンの臨床効果に関する検討	
—多施設共同ランダム化比較第 II 相試験—に関する研究	14
西尾壽乗 <sup>1) 2)</sup> 、名西悦郎 <sup>1)</sup> 、大野拓郎 <sup>3)</sup> 、尾上泰弘 <sup>4)</sup> 、高橋保彦 <sup>5)</sup> 、水野由美 <sup>6)</sup> 、波多江健 <sup>7)</sup> 、中山秀樹 <sup>8)</sup> 、大淵典子 <sup>9)</sup> 、原 寿郎 <sup>1)</sup>	
1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野	2) 九州大学病院グローバル感染症センター
3) 大分県立病院小児科	4) 国立病院機構小倉医療センター小児科
5) JCHO 九州病院小児科	6) 福岡市立こども病院感染症科
7) 福岡赤十字病院小児科	8) 国立病院機構福岡東医療センター小児科
9) 山口赤十字病院小児科	
3. 川崎病特異的 PAMPs/MAMPs 受容体の解析に関する研究	17
今井崇史 <sup>1) 2)</sup> 、永田雅大 <sup>1)</sup> 、村田憲治 <sup>2)</sup> 、山崎 晶 <sup>1)</sup>	
1) 九州大学生体防御医学研究所 分子免疫学分野	2) 九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野
4. iPS 細胞由来血管内皮細胞を用いたガンマグロブリン不応川崎病の病態解明	20
池田和幸 <sup>1) 2)</sup> 、天久朝廷 <sup>2)</sup> 、松井 敏 <sup>2)</sup> 、八幡倫代 <sup>1)</sup> 、岡本亜希子 <sup>1)</sup> 、鈴木千夏 <sup>1)</sup> 、朽津有紀 <sup>1)</sup> 、渡辺 亮 <sup>2)</sup> 、長船健二 <sup>2)</sup> 、濱岡建城 <sup>1)</sup>	
1) 京都府立医科大学大学院医学研究科小児循環器・腎臓学	2) 京都大学 iPS 細胞研究所
5. 急性期川崎病の病因・病態と病勢に関わる新しいサイトカイン(Midkine)の役割に関する研究	25
佐地 勉 <sup>1)</sup> 、高月晋一 <sup>1)</sup> 、小林 徹 <sup>2)</sup>	
1) 東邦大学医療センター大森病院小児科	2) トロント小児病院
6. 川崎病患者の末梢血、咽頭スワブ、直腸スワブのメタゲノム解析	27
阿部 淳 <sup>1)</sup> 、中林一彦 <sup>2)</sup> 、江畑亮太 <sup>3)</sup> 、黒田 誠 <sup>4)</sup>	
1) 国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部	2) 周産期病態研究部
3) 千葉大学大学院小児病態学	4) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
7. 抗 TNF- $\alpha$ 製剤による CAWS 誘導血管炎抑制機序の組織学的解析	30
高橋 啓、大原関利章	
東邦大学医療センター大橋病院病理診断科	

8. 疫学データから見た川崎病の病因論に関する研究	33
中村好一、牧野伸子 自治医科大学公衆衛生学教室	
9. 川崎病遺伝コンソーシアムの確立と運営	36
荒川浩一 <sup>1)</sup> 、関 満 <sup>1)</sup> 、小林 徹 <sup>2)</sup>	
1) 群馬大学大学院小児科学分野	2) The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada
10. 川崎病急性期における miRNA による炎症の制御機構の解明に関する研究	39
廣野恵一、市田落子 富山大学医学部小児科	
11. 多施設共同による川崎病の発症および重症化の遺伝的背景に関する研究	42
尾内善広 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学	
III 学会等発表実績	49
IV 研究成果の刊行物・別刷	55

# I. 委託業務成果報告（総括）

## 総括研究報告

川崎病の病因・病態解明に基づく新規治療・予防法の開発

研究代表者 原 寿郎

九州大学大学院医学研究院 成長発達医学 教授

### 研究要旨

本研究班では、未だ解明されていない川崎病の病因となる物質を解明し、それに対する根本的治療の開発へ向けた今までにない研究である。以下の2つの内容を重点項目として、川崎病患者・家族への医療貢献を行っていく。

1. 病原体関連分子パターン（PAMPs）を放出するバイオフィルムに対する抑制を考慮した新たな治療・予防法の確立

1) 季節性、地域性によるPAMPsの相違と治療効果に関する疫学的検討

北部九州・山口の主要病院、さらに全国（京都、東京、群馬、富山）の施設から、川崎病患者・正常コントロールの血清、舌・歯拭い液を回収し、共通物質の有無および季節性について検討を行うため検体収集を行った。その一部を解析し、川崎病特異的物質PAMPsを検出した。

2) バイオフィルムに作用する治療法・予防法の検討

バイオフィルム制御薬としてクラリスロマイシンに着目し、『川崎病におけるバイオフィルム制御薬クラリスロマイシンの臨床効果に関する検討－多施設共同ランダム化比較第II相試験－』を2014年11月より開始した。症例蓄積期間を6か月（延長2か月）、目標症例を各群50症例、合計100症例とし、8施設と共同研究を行っている。

3) 川崎病特異的PAMPsによる川崎病発症機序の解明

川崎病特異的PAMPsの受容体を検索すべく、まず自然免疫リガンドを発現させたレポーター細胞を23種類作製した上で、*Y. pseudotuberculosis*のバイオフィルムから得られたPAMPsを含む抽出液でその細胞を刺激し解析を行ったところ、ある自然免疫リガンド発現細胞に特異的に反応をしていることがわかった。今後、その下流経路を解析することにより、新規治療法の可能性について考察していく。

2. PAMPsを分解するオートファジー（ゼノファジー）を促進する新たな治療法の確立

当教室において開発した川崎病類似冠動脈炎モデルマウスを用いて、オートファジー促進薬であるラパマイシンによる冠動脈炎抑制効果を確認した。現在、ヒト冠動脈内皮細胞を用いたオートファジーの誘導について検討を行っている。

### 研究者分担者

山崎 晶・九州大学生体防御医学研究所教授

濱岡 建城・京都府立医科大学大学院医学研究科教授

佐地 勉・東邦大学医療センター大森病院小児科教授

小川 俊一・日本医科大学小児科教授

阿部 淳・国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部室長

高橋 啓・東邦大学医学部教授

中村 好一・自治医科大学教授  
荒川 浩一・群馬大学医学研究科教授  
市田 露子・富山大学大学院医学薬学研究部准教授  
尾内 善広・千葉大学大学院医学研究院准教授  
西尾 壽乗・九州大学病院グローバル感染症センター診療講師

## A. 研究の目的

川崎病は 1960 年代に日本人が見出した疾患であるが未だ原因は不明であり、また日本人での罹患率が世界一高く現在も年々増加傾向にある。また先進国の小児の後天性心疾患において最も頻度が高く、小児期の冠動脈疾患の重要な原因の一つに位置づけられている。しかし川崎病に特異的な診断法が確立されてないため、特に不全型、非定型例の診断は非常に困難である。そのため、病因の究明と診断・治療法の確立が待たれている。

我々は、マウスへの自然免疫パターン認識受容体の一つである Nod1 のリガンド投与が、川崎病類似の冠動脈炎を惹起したという研究結果から、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて川崎病患者検体を網羅的かつ詳細に検索し、川崎病特異的に出現する物質を患者血中に同定した。そして、便からエルシニア菌が検出された川崎病患者血清を調べ、エルシニア菌由来病原体関連分子パターン(PAMPs)と同一の物質を同定した。また、川崎病の流行と風との関連の報告(Rodó et al.2011)に基づき、患者の上気道から検出された、空気中に飛散するとされる芽胞形成菌(6種類)を調べたところ、その中の2種から川崎病特異物質と同一の芽胞形成菌由来のPAMPsを同定した。さらにそれらがバイオフィーム形成条件でかつバターの存在下で大量に産生され、同時に血管内皮細胞活性化作用を有することを見出した。加えて、IgG アフィニティカラムが川崎病特異的 PAMPs を結合したことから、臨床的に大量免疫グロブリン療法が有効である科学的根拠が証明された(Kusuda et al. PloS One 2014)。

以上の結果を基に、本研究では、まず川崎病特異的物質を全国レベルで検索・同定し、それがどのようにヒトの血管、特に冠動脈に作用しているかを細胞実験・動物実験で証明していく。また、その川崎病特異的物質がバイオフィームから放出されていると考えられるため、バイオフィームに着目した川崎病の新規治療法について、臨床試験を行う。さらに、川崎病特異的物質 PAMPs を消化するオートファジー(ゼノファジー)に着目し、臨床試験へむけた基礎実験を行い、川崎病の病因に対する根本的治療へ向けた研究を行う。現在、川崎病の中心的治療である免疫グロブリン投与は高価であり、10 数%の症例で不応例が存在するため、その根本的な治療開発は医療経済的にも貢献出来る。さらには、発症頻度が先進国の中でも高い日本において、予防法の可能性についても考察していく。

## B. 研究方法

本研究は、未だ解明されていない川崎病の病因となる物質を解明し、それに対する根本的治療の開発へ向けた今までにない研究である。以下の2つの内容を重点項目として、川崎病患者・家族への医療貢献を行っていく。

### 1. PAMPs を放出するバイオフィームに対する抑制を考慮した新たな治療・予防法の確立

#### 1) 季節性、地域性による PAMPs の相違と治療効果に関する疫学的検討

北部九州・山口の主要病院、さらに全国(京都、東京、群馬、富山)の施設から、川崎病患者児・熱性

疾患コントロールの血清、舌・歯拭い液を回収し、共通物質の有無および季節性について検討を行う。

具体的には、まず各患児から得られた血清を脂溶性・可溶性物質に分離し、特に脂溶性物質について液体クロマトグラフィー質量分析法による解析を行い、川崎病患者に特異的物質の有無を検索した。

さらに、舌・歯拭い液をバイオフィーム形成条件で培養し、その培養液とその患者の血清中の特異的物質の一致について検討を行った。

## 2) バイオフィームに作用する治療法・予防法の検討

川崎病特異的物質は *Y. pseudotuberculosis* などの細菌をバイオフィーム形成条件下で培養することにより検出されることから、川崎病の発症にバイオフィームの関与が考えられ、さらに免疫グロブリン治療中でも放出されると考え、バイオフィーム形成を抑制することにより、川崎病の症状の早期回復、予後の改善を期待できると仮説を立てた。

そこで、バイオフィーム制御薬としてクラリスロマイシンに着目し、『川崎病におけるバイオフィーム制御薬クラリスロマイシンの臨床効果に関する検討—多施設共同ランダム化比較第 II 相試験—』を 2014 年 11 月より開始した。

対象者は 4 か月以上、6 歳未満の川崎病患者で、無作為に表樹治療群もしくは介入治療群に割り付ける。標準治療群では免疫グロブリン製剤とアスピリン投与を行い、介入群ではこれらに加えてクラリスロマイシンを併用する。研究期間は 6 か月を予定している。

さらに、*Mycoplasma pneumoniae* や *Chlamydia pneumoniae* は川崎病の原因として報告が散見するが、その根拠は抗体検査などによるもので、病原体の検出などの証明ができていない。この臨床研究で使用するクラリスロマイシンは、これらの病原体の治療薬として用いられることから、本臨床研究では治療前に咽頭拭い液を回収し、これらの病原体の有無についても検討を行う。

## 3) 川崎病特異的 PAMPs による川崎病発症機序の解明

川崎病特異的物質はバイオフィーム中の脂溶性成分に含まれており、自然免疫受容体のうち C 型レクチン受容体が脂溶性物質と結合することが最近報告されていることから、C 型レクチン受容体レポーター細胞を用いて検索を行った。

C 型レクチン受容体レポーター細胞は自然免疫受容体とその下流で活性化する転写因子の制御下で発現する GFP の遺伝子が組み込まれており、川崎病特異的 PAMPs を含有するバイオフィーム抽出物および細菌を用いて、GFP 発現をフローサイトメトリーで測定した。GFP 発現の高いレポーター細胞を同定し、自然免疫受容体を同定した。

## 2. PAMPs を分解するオートファジー（ゼノファジー）を促進する新たな治療法の確立

当教室において開発した自然免疫受容体 Nod1 リガンド誘導川崎病類似冠動脈炎モデルマウスを用いて、オートファジー促進薬であるラパマイシンによる冠動脈炎抑制効果を評価した。

さらにヒト冠動脈内皮細胞を用いて、Nod1 リガンドにより誘発されるサイトカイン産生をラパマイシンにより抑制できるかについても検討を行った。

その他、各研究分担者により川崎病の病因・病態に関する研究を実行した。

### （倫理面への配慮）

本研究に必要とされる患者試料を得るにあたっては、各研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得ている。患者試料の採取に当たっては、遺伝子解析その他の医学研究に供すること、結果は本人が特定できるような形では公表しない事など、患者・代諾者の理解を求め、経緯を書面に残している。

## C. 研究結果

### 1. PAMPs を放出するバイオフィームに対する抑制を考慮した新たな治療・予防法の確立



## 1) 季節性、地域性による PAMPs の相違と治療効果に関する疫学的検討全国調査の解析結果

川崎病の大きな特徴の一つとして、季節性および地域性が挙げられる。季節性については、1月に患者が多発し、夏頃にも患者の増加が見られ、その一方で10月には減少する。また、地域性については、諸地域での患者多発が各地で報告されている。

今回は、全国のうち、北部九州・山口（福岡県、大分県、山口県）から得られた検体を中心に解析を行った。すると、川崎病患者血清に特異的に見られる物質が解析した15症例中13例に検出された。さらに、その患者の舌・歯拭い液にも同じ物質が検出され、PAMPsと推測される物質は3種類であった。また、それらの物質は以前に報告した物質とは違う新規物質であった。

以前、我々が報告した論文(Kusuda et al. PloS One 2014)において、その季節毎に川崎病特異的物質が違うことを報告し、今回もそれを支持する結果が得られた。これは、川崎病の季節性を説明できる結果とも言える。

今後は、全国規模での解析を行うことで、地域毎の川崎病特異的物質の違いについて検討を行い、川崎病の疫学的特徴について解明していく。また、川崎病特異的物質を検出した症例の治療反応性を調べることで、今後、川崎病特異的物質に着目した治療方針、予後の解析が行えると考えられた。

## 2) バイオフィームに作用する治療法・予防法の検討

『川崎病におけるバイオフィーム制御薬クラリスロマイシンの臨床効果に関する検討—多施設共同ランダム化比較第II相試験—』を2014年11月より開始した。2015年4月15日を研究期限とし、目標症例数が登録されなかった場合にはさらに2か月間の延長を行う予定である。中間解析は行わない。

川崎病の治療としてバイオフィームに着目した研究は世界初であり、現在の標準治療である免疫グロブリン投与で解熱しない不応症例を減らすことができれば、免疫グロブリンが高価であることを考えると、医療経済的にも多大な貢献できると考えられる。

また、バイオフィーム抑制効果を治療ターゲットとしており、再発・再燃を防ぐ可能性もあると考える。

さらに、この臨床試験により川崎病の原因として挙げられている *Mycoplasma pneumoniae* や *Chlamydia pneumoniae* の関与について新しい知見が得られると考えられる。

## 3) 川崎病特異的 PAMPs による川崎病発症機序の解明

川崎病特異的 PAMPs の受容体として C 型レクチン受容体に着目し、レポーターアッセイを行ったところ、C 型レクチン受容体と各種細菌のバイオフィーム抽出物脂溶性成分に強い反応性を示すことが分かった。今後は受容体との結合性についての詳細な解析、さらにその下流のシグナル解析を行うことで、その経路を遮断する新規治療の可能性について検討していく。

## 2. PAMPs を分解するオートファジー（ゼノファジー）を促進する新たな治療法の確立

オートファジー亢進効果をもつラパマイシン（mTOR 阻害薬）を Nod1 リガンド誘発川崎病類似冠動脈炎モデルに投与したところ、冠動脈炎は惹起されなかった。さらに、オートファジー抑制効果があるバフィロマイシン A1 をこのモデルマウスに投与したところ冠動脈炎は悪化した。以上から、mTOR 阻害薬が新たな治療法の可能があると考え、今後、細胞実験やマウスを用いたさらなる基礎研究を行っていく。

## D. 考察

1967年に川崎富作先生が川崎病を世界に報告して以来様々な研究が行われてきており、川崎病の研究は頻度の高い日本において世界をリードしていると言っても過言ではない。しかし、病態や治療について様々な研究が行われてきた一方で、すべての川崎病の症例やその疫学的特徴について説明可能な原因については未だに解明されていない。

2014年にKusudaらが川崎病の疫学的特徴を説明しうる原因論を発表した。それは川崎病の原因を微生物で考えるのではなく、様々な微生物から放出されるPAMPsという微小な物質を原因と考えるというものであった。本研究でも、川崎病患者で特異的なPAMPsを同定しており、それが報告通り、川崎病患者発生時期によって違っていた。

そのPAMPsは細菌がバイオフィーム形成時に放出されるということから、バイオフィームを制御することにより、川崎病特異的PAMPsが抑制され、冠動脈炎の惹起を抑制すると考え、『川崎病におけるバイオフィーム制御薬クラリスロマイシンの臨床効果に関する検討—多施設共同ランダム化比較第II相試験—』を開始し、現在、症例蓄積中ではある。川崎病が小児後天性心疾患で最も頻度が高い点、高価な免疫グロブリンという点などを鑑みれば、この結果がもたらす影響は社会的に大きいと考えられる。

川崎病の原因が未だ解明されていないため、その病態解析は川崎病の病態形成過程であるのか結果であるのかは全く不明であった。本研究班ではその川崎病特異的物質PAMPsからどう川崎病の冠動脈炎を惹起していくかについて解析することにより、川崎病の発症機序を時系列で評価できると考える。今後は、川崎病特異的PAMPsをどう認識し、どういう炎症惹起経路で冠動脈炎を発症するかについて詳細に検討していく。

現在の川崎病標準的な治療である免疫グロブリンは免疫調節機能の他、Kusudaらの報告ではPAMPsを吸着する作用も指摘されている。この川崎病PAMPsを吸着などで減少させることが、川崎病の根本的治療法と考えるが、そこで着目したのは、オートファジー(ゼノファジー)という生体機能である。このオートファジーはPAMPsを消化することができるため、川崎病の根本的治療として理想的と考えられる。また、オートファジー亢進薬であるmTOR阻害薬は免疫抑制作用も有しており、免疫抑制剤による治療も行われている川崎病にとっては有望な治療法とも言える。今後は、そのmTOR阻害薬の臨床

応用にむけた基礎実験を行い、川崎病の病因・病態解明に基づく治療法を目指していく。

#### E. 結論

川崎病の病因・病態に基づく新規治療のため研究を、2014年度より多角的に開始した。今後とも、川崎病の患者の理想的治療そして予防法の開発について継続して研究を行う。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

巻末に記載のとおり。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### I. 研究危険情報

なし。

#### J. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

## 季節性、地域性による PAMPs/MAMPs の相違と治療効果に関する疫学的観点からの研究

中島 康貴、西尾 壽乗、原 寿郎

九州大学病院小児科

### 研究要旨

川崎病は乳幼児に見られる熱性疾患で、冠動脈病変を来すことにより小児の後天性心疾患の最も多い原因となっている。当教室より自然免疫受容体の合成リガンド FK565 により冠動脈炎が引き起こされることと、川崎病患者血清中に特異的に見られる物質が、細菌由来物質または、患者由来生体バイオフィーム中の物質と一致し、PAMPs/MAMPs (Pathogen/Microbe-associated molecular patterns) と推測されることが報告されている。上記研究において、川崎病患者血清中に見られる PAMPs は川崎病への罹患時期により異なっていた。そこで、川崎病患者の血清及び生体バイオフィームを同様に質量分析で解析し、季節性及び地域性による PAMPs の相違及び、治療反応性の相関について検討を行った。まず、川崎病群 15 例、対照群 9 例を用いて検討したところ、川崎病患者血清中に特異的に見られる物質を新たに発見し、その一部は患者生体バイオフィーム由来の物質と共通したものであった。今後検体数を増やして、具体的な解析を行っていく予定である。

### A. 研究目的

川崎病は乳幼児に見られる熱性疾患であり、冠動脈病変を来すことで小児の後天性心疾患の最も多い原因となっている。本疾患の病因は不明であるが、当教室の研究で PAMPs/MAMPs である自然免疫受容体の合成リガンド FK565 によりマウスで冠動脈炎を生じた。また、川崎病患者血清中に特異的に見られる物質が、バイオフィーム形成条件下で産生された細菌由来物質または、患者由来生体バイオフィーム中の物質と一致し、PAMPs/MAMPs と推測されることも示された。それらの PAMPs/MAMPs は患者の川崎病罹患時期により異なっていた。そこで、PAMPs/MAMPs の季節性及び地域性による相違と、治療反応性との相関を明らかにすることで、病態の解明及び治療不応群の予測をめざすことを目的とする。

### B. 研究方法

当院及び関連病院、全国の共同研究施設を受診した川崎病患者群 200 例及び感染症による発熱のために受診した対照群 200 例において、血清及び舌・歯拭い液を採取する。検体は-20℃以下で保存する。採

取した検体を有機溶媒と混合し、脂溶性部分を抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)を行った。LC-MS は、陽イオンモード及び陰イオンモードの双方を用い、m/z の目標値は 600 及び 1100 とした 2 通りで施行した。LC-MS のデータ解析は、解析ソフト Dataanalysis 及び Profileanalysis を使用した。Profileanalysis を使用した解析では、対照群と比較し、平均値が 2 倍以上で、t 検定の結果  $p < 0.05$  のものから、川崎病患者血清中に特異的に見られる物質を探索した。次に、特異的物質のうち、川崎病患者由来の舌・歯拭い液中でも同じ物質が見られ PAMPs/MAMPs と推測される物質を探索した。(倫理面への配慮)

本研究はヒト検体を用いるため、検体量及び採取時の苦痛には十分配慮を行った。また、個人情報の保護のため、採取した検体及び個人情報は採取施設で連結可能匿名化を行った。

### C. 研究結果

共同研究施設で、検体採取のための倫理委員会への申請等の手続きを行い、検体の採取を開始した。今年度は当施設に検体が到着済の川崎病群 15 例、対

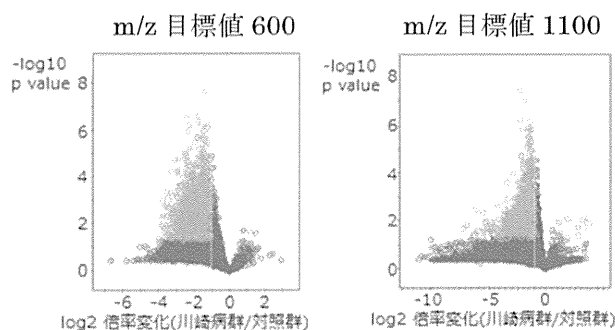
照群 9 例の解析を行った。従来の精製法では、陽イオンモード及び陰イオンモード双方での解析により、川崎病群 15 例中 13 例に川崎病患者血清中に特異的に見られる物質を検出した。それらの特異物質の中に、川崎病患者の舌・歯拭い液中にも同じ物質が検出され、PAMPs/MAMPs と推測される物質は 3 種類であった。その 3 種類の特異物質のいずれかが検出された川崎病患者は 15 例中 3 例であった(表 1)。

表 1 川崎病患者特異的 PAMPs/MAMPs

m/z	520.5	748.5	821.6
症例1	+	-	-
症例2	-	-	-
症例3	-	-	-
症例4	-	-	-
症例5	-	-	-
症例6	-	-	-
症例7	-	-	-
症例8	-	-	-
症例9	-	-	-
症例10	-	-	-
症例11	-	-	-
症例12	-	-	-
症例13	-	+	-
症例14	-	-	+
症例15	-	-	-

今回検出された川崎病患者特異的 PAMPs/MAMPs はいずれも以前当科で検討した PAMPs/MAMPs とは異なる新規物質であった。従来の精製法を改良し、川崎病群 11 例と対照群 6 例の解析を Profileanalysis を用いて行った。対照群と比較し平均値が 2 倍以上で、t 検定で  $p < 0.05$  となった物質は、陽イオンモードと陰イオンモードのいずれも m/z の目標値を 1100 とした時に、多く検出された(図 1)。そのうち、m/z の目標値を 1100 とした LC-MS で、陽イオンモードで検出された m/z=1396.5 及び陰イオンモードで検出された m/z=1127.5 のいずれかが全ての川崎病症例で検出された(表 2)。

図 1 LC-MS で検出された物質の Volcano plot  
陽イオンモード



陰イオンモード

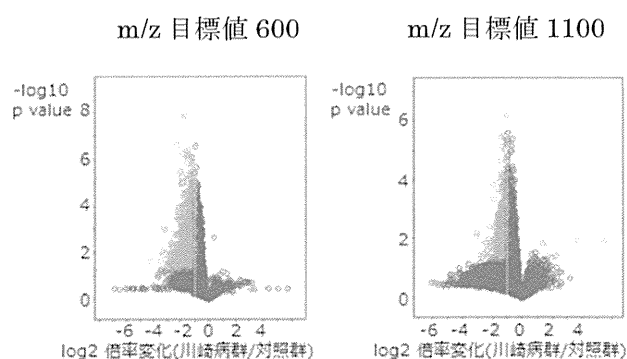


表 2 川崎病患者特異的物質

m/z	1127.5	1396.5
症例1	-	+
症例2	+	-
症例3	+	-
症例4	-	+
症例5	+	+
症例6	-	+
症例7	-	+
症例8	+	+
症例9	+	-
症例10	-	+
症例11	+	+

#### D. 考察

PAMPs/MAMPs と推測される物質が、今回の川崎病患者血清中から検出されており、症例の集積により季節や地域による差異や治療反応性について解析可能と考えられる。

## E. 結論

川崎病患者において今回の検討でも PAMPs/MAMPs と考えられる物質が検出された。今後検体収集後、地域性、季節性に関する検討や治療反応性の検討を行っていく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms.

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T.

PLoS One. 2014; 9: e113054.

### 2. 学会発表

Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H:

Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome.

16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies Oct 29-Nov 1, 2014, Prague, Czech Republic

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Hara T:  
(Evening symposium)

Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) in the biofilms: A possible cause of Kawasaki disease

The 34th Annual Meeting of the Japanese Society of Kawasaki Disease Oct 31, 2014, Tokyo

楠田 剛, 中島康貴, 西尾壽乗, 原 寿郎:

川崎病患者検体における自然免疫受容体 NOD1 活性物質の検出とその構造解析

第 18 回川崎病治療懇話会 2014.7.3 岡山

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 川崎病におけるバイオフィーム制御薬クラリスロマイシンの臨床効果に関する検討 —多施設共同ランダム化比較第 II 相試験—に関する研究

西尾壽乗<sup>1) 2)</sup>、名西悦郎<sup>1)</sup>、大野拓郎<sup>3)</sup>、尾上泰弘<sup>4)</sup>、高橋保彦<sup>5)</sup>、水野由美<sup>6)</sup>、波多江健<sup>7)</sup>、中山秀樹<sup>8)</sup>、大淵典子<sup>9)</sup>、原 寿郎<sup>1)</sup>

- 1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野
- 2) 九州大学病院グローバル感染症センター
- 3) 大分県立病院小児科
- 4) 国立病院機構小倉医療センター小児科
- 5) JCHO 九州病院小児科
- 6) 福岡市立こども病院感染症科
- 7) 福岡赤十字病院小児科
- 8) 国立病院機構福岡東医療センター小児科
- 9) 山口赤十字病院小児科

### 研究要旨

川崎病の病態には自然免疫系が深く関与している。また、われわれは川崎病患者の血清や上気道検体から菌由来の病原体／微生物関連分子パターン（PAMPs/MAMPs）と同一の物質を同定し、それらがバイオフィーム形成条件で大量に産生されることを見出した。これらの知見より、バイオフィームを抑制することが川崎病悪の新規治療法となる可能性があると考え、抗バイオフィーム薬であるクラリスロマイシンを用いて臨床試験を行うこととした。本試験は小児川崎病患者を対象とし、無作為に標準治療群もしくは介入治療群に割り付ける。標準治療群では免疫グロブリン製剤とアスピリン投与を行い、介入治療群ではこれらに加えてクラリスロマイシンを併用する。主要評価項目は治療開始後の有熱期間であり、副次評価項目は冠動脈病変や血液検査データ、有害事象などである。本試験は 8 施設による多施設共同試験で予定登録数は各群 50 例である。登録期間は 2014 年 10 月から 2015 年 4 月までの 6 か月間を予定している。2015 年 2 月時点で 30 例程の症例登録があり、引き続き症例の集積を進めている。

### A. 研究目的

川崎病は無治療では約 25%に冠動脈瘤を生じ、先進国での小児後天性心疾患の原因として最も頻度が高い。しかし未だその原因は不明で、特異的な診断法や治療法は確立されていない。

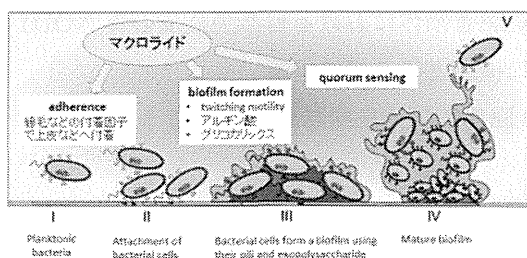
現在の川崎病の標準的治療はアスピリンや免疫グロブリン製剤投与であるが、現在でも少数の死亡例のほか、心障害の合併例が認められる。また、血液製剤である免疫グロブリン製剤の医療費や感染症のリスクなどの欠点が指摘されている。

われわれは川崎病の発症に自然免疫が深く関わっていることを報告してきた。また、川崎病患者から菌由来病原体関連分子パターン（PAMPs/MAMPs）と同一の物質を同定し、それらがバイオフィーム形成条件で大量に産生されることを見出した。これらの

知見を総合すると、PAMPs/MAMPs 産生に重要なバイオフィーム形成を抑制することが川崎病の新規治療法となる可能性があると考えられる。

そこで、バイオフィームに対する抑制効果が証明されているクラリスロマイシンを用いて、川崎病患者を標準的治療群およびマクロライド併用群に割り付け、発熱期間や冠動脈への影響を調査することとした。川崎病患者に対し、従来の標準的治療に加えてバイオフィーム制御薬であるクラリスロマイシンを併用投与することで、川崎病の後遺症である冠動脈病変の抑制や有熱期間の減少につなげることができれば、国民の健康増進や医療費の増大抑制に大きく寄与することが期待される。

## 背景 マクロライドとバイオフィルム



バイオフィルム制御薬であるクラリスロマイシンが、川崎病に有効であるかをランダム化臨床試験で検討する。

図 1 バイオフィルムへのマクロライドの有効性

## 試験のシェーマ

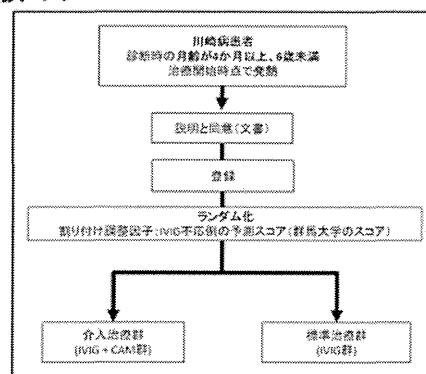


図 3 本試験のシェーマ

## 本試験で期待される治療ポイント

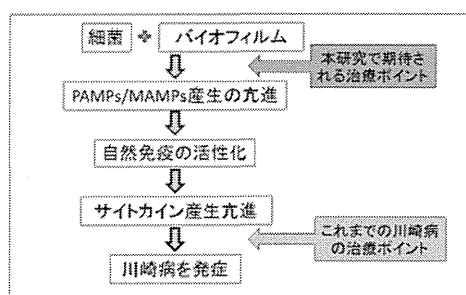


図 2 本試験で期待される治療ポイント

## B. 研究方法

本臨床試験は 4 か月以上、6 歳未満の川崎病患者で試験の同意を書面で得た症例を対象とし、無作為に標準治療群もしくは介入治療群に割り付ける。標準治療群では免疫グロブリン製剤とアスピリン投与を行い、介入治療群ではこれらに加えてクラリスロマイシンを併用する。主要評価項目は治療開始後の有熱期間であり、副次評価項目は冠動脈病変や血液検査データ、有害事象などである。本試験は 8 施設による多施設共同・非盲検無作為比較試験で予定登録数は各群 50 例、両群で計 100 例である。登録期間は 2014 年 10 月から 2015 年 4 月までの 6 か月間を予定し、症例登録やデータ管理・統計解析は外部機関（一般社団法人 九州臨床研究支援センター）に委託した。

(倫理面への配慮)

本試験に関係するすべての研究者等はヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針に従って本試験を実施している。試験への登録に際しては、担当医師は患者代諾者もしくは本人に、試験の内容や期待される効果や予期される有害事象、費用負担や補償、プライバシーの保護などに関する説明を十分に行ったうえで、患者代諾者の自由意志で行っている。

## C. 研究結果

九州大学病院での倫理委員会承認（2014 年 10 月 15 日、26046 番、第 760 号）後、各施設において倫理委員会の承認を得た。試験開始に先立ち、臨床試験保険に加入した（損害保険ジャパン日本興亜 No.35-140-2、2014 年 10 月 20 日・2015 年 6 月 14 日）うえで、2014 年 10 月 20 日から本試験への症例登録を開始した。順次症例の登録を得ており、現在（2015 年 2 月 6 日時点で 28 例の登録を得ている。これまでに本試験に伴う重篤な有害事象の発生は見られていない。

## D. 考察

小児川崎病患者において、標準的治療よりも標準的治療にクラリスロマイシンを併用した治療が優れているかについて、ランダム化比較試験で検討している。本試験は第 2 相臨床試験であり、有効性が認め



られた際にはさらに規模を拡大して第 3 相試験を行い検証する予定である。

## E. 結論

川崎病患者に対するクラリスロマイシンの有効性について、多施設でのランダム化比較試験を実施中である。現在までに 30 症例弱の登録を得ており、2015 年 6 月までに計 100 症例の登録を目標に引き続き患者集積を行う。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms.

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T.

PLoS One. 2014; 9: e113054.

### 2. 学会発表

Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H:

Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome.

16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies Oct 29-Nov 1, 2014, Prague, Czech Republic

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Hara T: (Evening symposium)

Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) in the biofilms: A possible cause of Kawasaki disease

The 34th Annual Meeting of the Japanese Society of Kawasaki Disease Oct 31, 2014, Tokyo

楠田 剛, 中島康貴, 西尾壽乗, 原 寿郎 :

川崎病患者検体における自然免疫受容体 NOD1 活性物質の検出とその構造解析

第 18 回川崎病治療懇話会 2014.7.3 岡山

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

# 川崎病特異的 PAMPs/MAPMs 受容体の解析に関する研究

今井 崇史<sup>1,2)</sup>、永田 雅大<sup>1)</sup>、村田 憲治<sup>2)</sup>、山崎 晶<sup>1)</sup>

1) 九州大学 生体防御医学研究所 分子免疫学分野

2) 九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野

## 研究要旨

川崎病患者群の血清中の脂溶性分子と鼻腔、歯などから採取したバイオフィルムの脂溶性分子との間に液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) で相同性が確認されている。そこで、川崎病発症に PAMPs/MAMPs (pathogen/microbe associated molecular patterns) が関与し、自然免疫受容体を介して炎症性サイトカインを惹起し川崎病の病態に寄与していると考え、自然免疫受容体のシグナル伝達経路下流にあるアダプター分子欠損マウスおよび自然免疫受容体のレポーター細胞を用いて解析を行った。脂溶性成分を認識するとされる C 型レクチン受容体のうち、ある一部の受容体が川崎病特異的にみられる PAMPs/MAMPs を含有するバイオフィルムの脂溶性成分に対し反応性を示した。以上から、川崎病特異的 PAMPs/MAMPs の受容体が C 型レクチン受容体であることが示唆され、今後さらにそのシグナル解析を行うことで、新たな治療法のターゲットとなる分子を検索していく。

## A. 研究目的

川崎病患者血清中とその患者の鼻腔、咽頭、舌、便から採取したバイオフィルム中に液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) で同様の数値を示す分子を同定し、それらは特定の細菌バイオフィルム由来の物質 (PAMPs/MAMPs) であるとの報告がある。そこで、それらの細菌バイオフィルム中の PAMPs/MAMPs が自然免疫を活性化させ冠動脈炎の形成に寄与している可能性を考え、本研究ではその PAMPs/MAMPs に対する自然免疫受容体の検索および炎症惹起への機序を明らかにする。

## B. 研究方法

1) 自然免疫受容体のシグナル伝達経路下流にあるアダプター分子欠損マウスを用いた探索

まず、野生型の骨髄由来樹状細胞を川崎病特異的にみられる PAMPs/MAMPs を含有するバイオフィルム/細菌で刺激し、培養上清中サイトカインを測定する。次に、自然免疫シグナル伝達経路のボトルネックとなり、自然免疫受容体の数に比べると比較的限定されるアダプター分子の欠損マウスを用いて

(図 1)、その骨髄由来樹状細胞にも同様に刺激し、培養上清中サイトカインを測定する。そして、サイトカイン産生に野生型と差の生じるアダプター分子欠損型を同定し、自然免疫シグナル伝達経路を同定する。同定されたシグナル伝達経路の上流にある自然免疫受容体の中から川崎病患者者に特異的な PAMPs/MAMPs に反応する受容体を絞り込む。

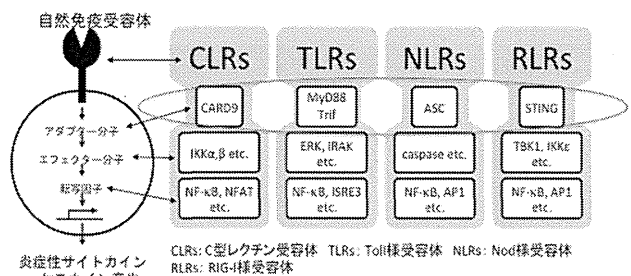
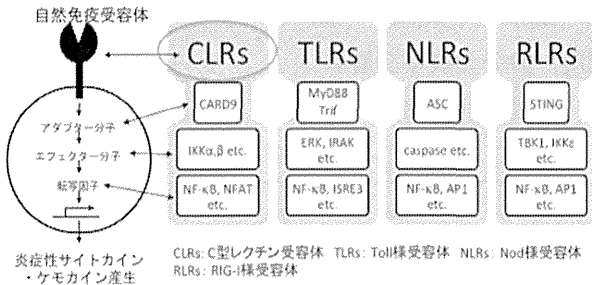


図1: アダプター分子と自然免疫シグナル伝達経路

2) 自然免疫受容体のレポーター細胞を用いた探索

川崎病特異的にみられる PAMPs/MAMPs はバイオフィルム中の脂溶性成分に含まれていると報告された。また自然免疫受容体のうち C 型レクチン受容体は脂溶性物質と結合することが最近報告されてお

り、C型レクチン受容体レポーター細胞を用いて検索を行う。(図2)

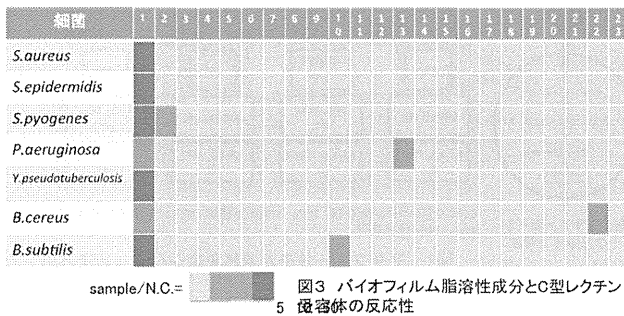


C型レクチン受容体レポーター細胞株は自然免疫受容体とその下流で活性化する転写因子の制御下で発現する蛍光タンパク質 GFP の遺伝子が組み込まれているため、リガンド認識を GFP の蛍光として可視化することができる。

川崎病特異的にみられる PAMPs/MAMPs を含有するバイオフィーム/細菌を用いて C型レクチン受容体レポーター細胞を刺激し、GFP 発現をフローサイトメトリーで測定する。GFP 発現の高いレポーター細胞を同定し自然免疫受容体を同定する。

### C. 研究結果

方法 2)によりスクリーニングを行ったところ、特定の C型レクチン受容体と各種細菌のバイオフィームの脂溶性成分に強い反応性を示すことが分かった。(図3)



### D. 考察

バイオフィームの脂溶性成分に反応するものと反応しないものがあり C型レクチン受容体による反応性スクリーニングの実験系は機能した。これらの方法により川崎病特異的にみられる PAMPs/MAMPs を含有するバイオフィーム/細菌に対する自然免疫受容

体の検索が可能であることが分かった。

今後は、薄層クロマトグラフィーを用いた PAMPs/MAMPs の解析、C型レクチン受容体の下流シグナルの解析を行い、新しい治療ターゲットとなりうる分子を検索していく。

### E. 結論

ある特定の C型レクチン受容体が川崎病特異的にみられる PAMPs/MAMPs を含有するバイオフィームに反応する可能性が示唆され、川崎病の病態形成における自然免疫系の寄与が考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms.

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T.

PLoS One. 2014; 9: e113054.

#### 2. 学会発表

Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H: Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome.

16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies Oct 29-Nov 1, 2014, Prague, Czech Republic

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Hara T: (Evening symposium)

Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) in the biofilms: A possible cause of Kawasaki disease

The 34th Annual Meeting of the Japanese Society  
of Kawasaki Disease Oct 31, 2014, Tokyo

楠田 剛, 中島康貴, 西尾壽乗, 原 寿郎 :  
川崎病患者検体における自然免疫受容体 NOD1 活性  
物質の検出とその構造解析  
第 18 回川崎病治療懇話会 2014.7.3 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし