

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

池田和幸^{1,2}、天久朝廷²、松井敏²、八幡倫代¹、岡本亜希子¹、鈴木千夏¹、朽津有紀¹、渡辺亮²、長船健二²、濱岡建城¹

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

研究要旨

【目的】iPS 細胞技術を用いて川崎病の病態を模倣する新規試験管内血管モデルを確立し、ガンマグロブリン療法(IVIG)不応の病態を解明する。

【方法】IVIG 反応患者 2 例および IVIG 不応患者 2 例から皮膚線維芽細胞あるいは末梢血 T 細胞を採取し、エピソーマルベクターを用いて初期化 6 因子を導入し iPS 細胞を作製した。樹立した iPS 細胞から血管内皮細胞 (ECs) への分化誘導は既報のプロトコールを用いた。マイクロアレイを用いて誘導した ECs の遺伝子発現解析を行った。

【結果】川崎病患者から樹立した iPS 細胞は ECs へ分化誘導が可能であった。RNA-seq データの解析では、主成分分析において IVIG 反応群、IVIG 不応群は独立した分布を示した。遺伝子セットを用いた発現解析では IL-6 関連遺伝子群が IVIG 不応群において高発現であった。

【考察・展望】ECs における IL-6 関連遺伝子セットの発現亢進は、IVIG 不応川崎病の病態に関連していることが示唆された。

A. 研究目的

川崎病は乳幼児に好発する血管炎症候群であり、いまだ原因不明である。無治療の場合、約 25%の割合で冠動脈病変を合併するが、ガンマグロブリン超大量療法(IVIG)により冠動脈病変合併頻度は 3-10%へ減少した。一方、15-20%の割合で IVIG により解熱しない IVIG 不応例が存在し、冠動脈病変を高率に合併する。

川崎病の治療戦略を考える上で、その病因解明が最も肝要であり、病因究明の試みは極めて重要と考えられる。さらに、いまだ詳細不明である IVIG 不応のメカニズムの解明も、川崎病の治療戦略において急務の課題と言える。

本研究では、IVIG 反応例および不応例川崎病患者の皮膚組織もしくは血液から iPS 細胞を樹立し、血管、免疫細胞に分化させることにより、新規の疾患モデルの構築を行う。さらに、作製された血管、免疫細胞の遺伝子発現解析を行い、IVIG 不応例の細胞

において特異的な発現を示す病態関連分子を探索する。得られた候補分子について、*in vitro* と *in vivo* の実験系、臨床検体などを用いた検証を行うことによって、新規の治療標的分子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

1. 疾患特異的 iPS 細胞の樹立、および樹立した iPS 細胞株の評価

IVIG 反応患者 2 例および不応川崎病患者 2 例から皮膚組織または末梢血 T 細胞を採取し、エピソーマルベクターを用いて初期化因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53 shRNA の 6 因子) を導入することにより、疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。樹立した iPS 細胞株の評価は、(1)ゲノム integration の解析、(2)OCT3/4 や NANOG などの未分化マーカーの発現、(3)胚様体形成法(EB 法)及び奇形腫 (Teratoma)形成法にて三胚葉への分化能の評価、(4)

罹患細胞種である血管内皮および単球への分化誘導効率、の4点を行う。

2. 川崎病特異的 iPS 細胞から分化誘導した罹患細胞種を用いた病態関連分子の探索

IVIG 反応および IVIG 不応川崎病患者 iPS 細胞および健常日本人 iPS 細胞由来の血管内皮細胞、単球のマイクロアレイによる遺伝子発現の比較解析を行う。そして、IVIG 不応川崎病患者 iPS 細胞由来の血管内皮細胞および単球にて発現が特異的に変化している分子を同定する。IVIG 反応川崎病 2 症例、不応 2 症例、健常日本人 7 名に由来する iPS 細胞について解析を行うが、各症例においても複数の細胞株で共通する分子を選択する。

次年度以降の研究手法

3. 共培養実験系を用いた病態関連分子の探索

川崎病急性期では重症例ほど単球が増加しており、血管壁への浸潤も認められていることから、単球は川崎病急性期病態に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。そこで、患者 iPS 細胞由来の単球と血管内皮細胞の共培養に、炎症性サイトカインを添加し、試験管内で病態を再現するモデル系の確立を目指す。また、IVIG 不応患者 iPS 細胞由来の単球と健常人 iPS 細胞由来の血管内皮細胞、逆に、IVIG 不応患者 iPS 細胞由来血管内皮細胞と健常人 iPS 細胞由来単球の共培養も試み、IVIG 不応患者血管内皮細胞と単球の異常を検証する。IVIG 反応川崎病患者でも同様の実験を行う。細胞の挙動や炎症性サイトカインの発現量の検討、マイクロアレイを用いて共培養にて反応する分子を探索し、IVIG 不応・病態関連分子の同定に繋げる。

4. 病態関連候補分子の in vitro での検証

川崎病の急性期病態として、血管内皮細胞において ICAM-1 の発現が上昇し、血清中の炎症性サイトカイン (TNF α , IL6, IL8 など) が上昇することが報告されている。疾患特異的 iPS 細胞由来の血管内皮細胞において同定した IVIG 不応・病態関連候補分子の siRNA、cDNA の強制発現系を構築し、ICAM-1 の発現および炎症性サイトカイン産生に与える影響

を検討し、候補遺伝子のうち血管炎の病態への関与の強く疑われる分子の絞り込みを行う。

上記の検討にて同定された病態関連分子は、その遺伝子改変マウスの作製や川崎病モデルマウスとの掛け合わせによる解析にて治療標的分子であるかを検証する研究へと発展させる。また、臨床検体 (血清、尿) 中の濃度と IVIG 反応性との相関などの検討による新規診断法の開発研究に繋げる予定である。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に関して、「川崎病特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」として京都府立医科大学倫理委員会 (京都府立医科大学学長 吉川敏一)、「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」および「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」として京都大学医学部の倫理委員会 (京都大学医学部長 光山 正雄) の承認を得た。現在、その内容を忠実に順守し、患者さんの同意・協力を得て研究を進めている。川崎病の患者およびその家族に十分説明した上で、同意を得て皮膚生検を施行した。実験結果は、患者と家族の希望によりそれぞれ開示する予定である。個人情報についても、十分配慮して研究を行っている。

C. 研究結果

平成 26 年度の研究結果

研究対象は、IVIG 反応川崎病 2 例、IVIG 不応川崎病 2 例とした。患者由来の皮膚線維芽細胞もしくは末梢血 T 細胞にエピソードベクターを用いて初期化 6 因子を導入し iPS 細胞を作製することが可能だった。

次に、川崎病患者由来 iPS 細胞における未分化マーカーの発現を確認した。OCT3/4, Sox2, Nanog などの核内転写因子、SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81 などの細胞表面抗原が同定され、川崎病患者由来 iPS 細胞が未分化状態であることを確認した。

さらに、胚様体形成法にて三胚葉への分化能を確認した。外胚葉、中胚葉、内胚葉のマーカーである TUJ-1, alpha SMA, SOX17 を用いることにより、川崎病患者由来 iPS 細胞が、外胚葉、中胚葉、内胚葉へ分化しており、多分化能を有することを確認した。

樹立した川崎病患者由来 iPS 細胞を既存の方法により血管内皮細胞へ分化誘導を行った。フローサイトメトリーにより、VE-cadherin 陽性、Flk-1 陽性の血管内皮細胞が 7.6% の割合で誘導され、免疫染色にて CD31 陽性細胞を確認した。その結果、川崎病患者由来 iPS 細胞は血管内皮細胞へ分化誘導可能と判断した。

川崎病患者由来 iPS 細胞を既存の方法により単球へ分化誘導を行った。フローサイトメトリーにより、CD45 陽性、CD14 陽性の単球が 82.5% と高効率に誘導されており、メイギムザ染色では、胞体の大きい、核に切れ込みのある単球が観察された。

さらに、誘導した単球の機能解析を行った。誘導した単球を LPS や ATP により刺激を行ったところ、IL-8, IL-6, TNFalpha の分泌が上昇しており、反応性のサイトカイン分泌能を示した。

以上から、川崎病患者由来 iPS 細胞の樹立と樹立した株の評価が完了し、研究施行に耐えうると判断した細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行う方針とした。

マイクロアレイ解析のプロトコールは以下の通りとした。健常コントロール由来血管内皮細胞 7 例、IVIG 反応例, responder 由来血管内皮細胞 2 例、IVG 不応例, non-responder 由来血管内皮細胞 2 例を対象とし、健常コントロール対川崎病 4 例 (平均)、健常コントロール対 IVIG non-responder、IVIG responder 対 non-responder で比較検討した。

iPS 細胞由来血管内皮細胞について、principal component analysis : PCA 解析 (主成分分析) を行った。PCA 解析は、多くの変数を持つデータに対して、より少ない変数に縮約することにより、データの特徴をより際立たせる方法。健常コントロール群、IVIG responder 群、IVIG non-responder とそれぞれ

独立した分布を示しており、3 群とも異なった遺伝子発現の特徴をもつことが示された。

次に、クラスター解析を行った。IVIG responder 群と non-responder 群はやや似通った遺伝子発現パターンを示していますが、健常コントロール群と川崎病群 (4 例全体) で比較すると、異なる遺伝子発現パターンを示しているのがわかった。

iPS 細胞由来血管内皮細胞について 2 倍以上発現が上昇もしくは減少する遺伝子について検討した。健常コントロール群に比較して川崎病 4 例で遺伝子発現が 2 倍以上増加している遺伝子数は 58、健常コントロール群と non-responder 群では 127 遺伝子、IVIG responder 群と non-responder 群での比較では 101 遺伝子の発現が up-regulate していた。

iPS 細胞由来血管内皮細胞における gene ontology 解析を行った。gene ontology 解析は、どのような機能を持った遺伝子が多いかを解析する方法である。健常コントロール群に比較して川崎病 4 例全例において統計学的に有意な遺伝子群を検討した。上位に抽出された遺伝子は、プロテオグリカン、コラーゲンに関連する遺伝子であり、炎症に関連するものは認められなかった。

健常コントロール群と IVIG non-responder 群を比較した gene ontology 解析では、血管発生や細胞の接着に関連した遺伝子群が上位に抽出され、高い有意差も示していた。また上位に位置する遺伝子としては、遺伝子名を伏せたが、gene X は白血球の走化性に関連しており、MMP-2 は、川崎病冠動脈瘤組織に高発現であることが報告されている。

IVIG responder 群と non-responder 群を比較した gene ontology 解析では、細胞の接着に関連する遺伝子群が最も上位に位置していた。また、白血球の走化性に関連する gene X が IVIG responder 群に比較しても non-responder 群で有意に高発現であることが示された。

次に Gene Set Enrichment Analysis (GSEA 解析) を行った。GSEA 解析は、今回行ったマイクロアレイ解析の結果に最も近いマイクロアレイデータ

を過去のデータベースから探し出す解析方法である。その結果、データベースに登録されている IL-6 関連遺伝子群（遺伝子セット）が IVIG non-responder 群において高発現であることが示された。

また、IVIG responder 群と non-responder 群を比較した GSEA 解析では、NRAS といった肺癌などの消化器癌関連遺伝子や乳癌などの他のマイクロアレイの結果とも今回の解析結果が類似していることが示された。

D. 考察

IVIG 不応川崎病患者における血清 IL-6 濃度の高値は既に報告されている。本研究の結果から、iPS 細胞由来血管内皮細胞における IL-6 関連遺伝子セットの発現亢進は、IVIG 不応川崎病の病態に関与していることが示唆された。

また、Gene X は白血球、血管内皮細胞などに発現しており、白血球の遊走を制御していることも既に報告されている。

IVIG 不応例、重症例では著明な炎症細胞浸潤が認められ、白血球から炎症サイトカイン産生が誘導されることから、Gene X は IVIG 不応の病態に関連する key molecule である可能性が示唆された。

E. 結論

血管内皮細胞における IL-6 関連遺伝子群の発現の変動は、IVIG 不応の病態に関連している可能性が示唆された。

さらに、白血球の migration に関連している Gene X は、IVIG 不応の病態や川崎病の重症度に関連している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

The involvement of the vasa vasorum in the development of vasculitis in animal model of Kawasaki disease.

Hamaoka-Okamoto A, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Nagi-Miura N, Ohno N, Arai Y, Tanaka H, Takamatsu T, Hamaoka K.

Pediatr Rheumatol Online J. 2014; 12: 12.

Platelet activation dynamics evaluated using platelet-derived microparticles in Kawasaki disease.

Yahata T, Suzuki C, Yoshioka A, Hamaoka A, Ikeda K.

Circ J. 2014; 78:188-93.

2. 学会発表

Analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease using iPS cell technology.

Ikeda K, Ameku T, Nomiya Y, Nakamura M, Mae S, Matsui S, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Suzuki C, Yoshioka A, Kuchitsu Y, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K

Eleventh International Kawasaki Disease Symposium. February 3-6, 2015, Hawaii.

Analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease using iPS cell technology.

Ikeda K, Ameku T, Nomiya Y, Nakamura M, Matsui S, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Suzuki C, Kuchitsu Y, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K

American Heart Association 2014

Nov 15-19, 2014, Chicago

「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」

池田和幸、天久朝廷、松井敏、八幡倫代、岡本亜希子、鈴木千夏、朽津有紀、渡辺亮、長船健二、濱岡建城

第 34 回日本川崎病学会学術集会 2014. 10. 31-11.1
東京

「iPS 細胞技術を用いたガンマグロブリン不応川崎
病の病態解明」

池田和幸、天久朝廷、松井敏、八幡倫代、岡本亜希
子、鈴木千夏、長船健二、濱岡建城

第 117 回日本小児科学会学術集会 2014.4.11-13 名
古屋

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

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

佐地 勉¹⁾、高月晋一¹⁾、小林 徹²⁾

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

研究要旨

川崎病 KD の病院論・原因論を考える上で種々のサイトカインの動態は極めて重要である。KD 症例から IC を得て収集された試料 (血清) を用い ELISA 法にて MK を測定した。KD 患者 (n=15 名) では入院時既に成人健常者のほぼ 2 倍近くに上昇し、さらに IVIG 投与数日後には最高で 4 倍近くに増加しているという結果が得られた。IVIG1-2 日後: mean=1291.6 ± 1119.0、IVIG 投与前: mean=530.9±468.6 (p<0.01)、7-10 日 IVIG: mean=599.4±447.3 pg/ml (p<0.05) (健常成人 cut off level: < 300pg/ml)。CRP は MK と有意に相関した (r=0.45, p<0.05)。冠動脈瘤を形成した 2 例の MK は冠動脈正常症例よりも有意に高い値と示していた。

A. 研究目的

川崎病 KD の病院論・原因論を考える上で種々のサイトカインの動態は極めて重要である。ミッドカイン (MK) は、1993 年に胚性腫瘍細胞の分化誘導時に早期発現してくる遺伝子産物として初めて cDNA cloning された、成長因子あるいはサイトカインの仲間である。

B. 研究方法

KD 症例から IC を得て、収集された試料 (血清) を東邦大学臨床検査医学の研究室に保存し、一括して ELISA 法にて MK を測定した。既存のサンプルは連結可能匿名化し、今後のサンプル収集は IC を取得後収集する事とした。IVIG 前後、ステロイド使用前、不応例に対するインフリキシマブ使用前で測定した。また病日によって、第 4-5 病日、9-10 病日、25-30 病日に測定し、その動態を RAISE score、CRP 値、TNF α 、IL-6 などのサイトカイン値、その他 risk score と対比した。

C. 研究結果

KD 患者 (n=15 名) では入院時既に成人健常者のほぼ 2 倍近くに上昇し、さらに IVIG 投与数日後には最高で 4 倍近くに増加しているという結果が得ら

れた。IVIG1-2 日後: mean=1291.6 ± 1119.0、IVIG 投与前: mean=530.9±468.6(p<0.01)、7-10 日 IVIG: mean=599.4±447.3 pg/ml(p<0.05) (健常成人 cut off level: < 300pg/ml)。CRP は MK と有意に相関した (r=0.45, p<0.05)。冠動脈瘤を形成した 2 例の MK は冠動脈正常症例よりも有意に高い値と示していた。MK はリウマチ性疾患、血管炎症候群における研究成果に乏しく、また KD における研究は始めてである。MK 自体に血管内皮細胞保護機能があり治療面で開発されることが模索されていることから興味ある物質と思われる。

D. 考察

MK はヘパリン結合性で塩基性の低分子量タンパク質であり、当初は腫瘍細胞の増殖に関与し上昇していることが判明していたが、その後脳虚血や心筋虚血時に発現上昇することが報告された。2004 年には、リウマチ性疾患の発症に大きく関与し炎症性細胞の移動を促進する作用が報告された。そこでは、アポトーシスを抑え、血管新生を促進する (2005 年 Friedrich ら) 事が明らかとなり、さらに虚血障害を受けた心筋細胞の生存を助けることも報告された。豚における虚血再灌流モデルでは心筋障害を抑える (Ishiguro、2011 年) ことも判明し、最近の報告で

は、虚血によって血管内皮細胞に発現誘導された MK は血管新生を誘導することも報告された (Weckbach ら、2012 年)。

MK は炎症、血管障害に深く関与しているが、臨床の場での研究成果に乏しく、特に血管炎・リウマチ性疾患に関する情報は少ないのが現状である。学術的には、これまでミッドカインに関するリウマチ性疾患、血管炎症候群における研究成果に乏しく、また KD における研究は始めてである。国内外においても、他に KD に関する報告は無く、新規のアイデアに基づく萌芽的・画期的な研究と考えられる。この動態をさらに明らかにすることにより、他のリウマチ性疾患や血管炎症候群との相同性・類似性が明らかとなり、病因論・原因論にも近づく結果になると予想される。また、MK 自体に血管内皮細胞保護機能があり治療面で開発されることが模索されていることから興味ある物質と思われる。

E. 結論

現時点として MK は急性期 KD において、IVIG 投与後増加し、血管障害に対しては保護的に作用しているサイトカインと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 高月晋一、楠夏子、直井和之、池原聡、中山智孝、松裏裕行、川合眞一、佐地勉: 急性期川崎病におけるミッドカインによる治療反応性の予見. 第 34 回日本川崎病学会. 2014.10. 31、東京

2) Saji T, Takatsuki S, Kenmotsu Y, Naoi K, Ikehara S, Nakayama T, Matsuura H, Kusunoki N, Kawai S: Midkine, a new functional cytokine, increased after IVIG may

protects from vascular injury in acute Kawasaki disease. 11th International Kawasaki Disease Symposium. 2015.2.3, Honolulu, Hawaii, USA

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

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

阿部 淳¹⁾、中林一彦²⁾、江畑亮太³⁾、黒田 誠⁴⁾

- 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

研究要旨

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いて川崎病患者から得られた臨床試料中の微生物由来核酸の塩基配列を網羅的に解読し、川崎病に特徴的なマイクロバイームを探索することである。今回は、急性期の川崎病7例の全血、咽頭・直腸スワブのDNAおよびcDNAライブラリーを作製してマイクロバイームを解析した。その結果、急性期患者の末梢血のDNAおよびcDNAライブラリーから、多様な細菌相同の解読リードが見出された。血液検体および直腸・咽頭スワブ検体の解析に必要なシーケンス量は各々、4Gb および1Gbであり、一検体あたりのコストは比較的安く抑えられることが分かった。今後、これらの核酸の由来や対照小児との差異について検討し、病態との関連を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

川崎病は乳幼児に好発する原因不明の血管炎であり、全患者の約4%に冠動脈瘤などの心後遺症が発生する。何らかの感染症が発症のトリガーになると推測されるが、今日まで病因となる病原体が同定されていないために特異的な診断法や治療法の開発が遅れており、病因の解明が喫緊の課題である。本研究の目的は、次世代シーケンサーやマルチプレックスPCRを用いて川崎病患者から得られた臨床試料中の微生物由来核酸の塩基配列を網羅的に解読し、川崎病に特徴的なマイクロバイームを探索すること、最終的にはこれらの情報から、川崎病の診断に応用できる微生物由来核酸の測定法を開発することである。

B. 研究方法

治療前の川崎病患者7名(男4女3、月齢20~59)から第4~5病日に末梢血および咽頭・直腸スワブを採取してDNAおよびcDNAライブラリーを作製した。全血約2.5mLの試料をPAXgene Blood RNA抽出キット(BD Bioscience)の試験管に注入し、途中から二分してRNAとDNAを同一検体から精製した。RNAはTruSeq RNA sample preparationキットを

用いて、DNAはCovaris超音波shearingシステム(M&S Instrument)でDNAを断片化した後、ChIP-Seq Library Preparationキット(NEBNext)を用いて各々ライブラリーを作製した。

咽頭および直腸スワブは、滅菌水1mLの入った滅菌試験管に室温で15分間浸した後、水溶液を2等分して-70℃で保存した。RNAはRNAeasy Micro RNA抽出キット(Qiagen)で抽出した。RNAの電気泳動パターンからヒト全血のRNAよりもフラグメント長が全体的に短いことが分かったので、通常断片化プロトコールは使用せずにTruSeq RNA sample preparationキットでライブラリーを作製した。DNAはQIAamp DNA preparationキット(Qiagen)で抽出した。ヒト全血と同様にCovaris超音波shearingシステムでフラグメントの断片化を行った後、ChIP-Seq Library Preparationキットでライブラリーを作製した。

Illumina HiSeq2000を用いて、作製した各ライブラリーの塩基配列を決定し、BWA-SWソフトウェアを用いてヒトと相同な解読リードを除去した。得られた解読リードをmegablast検索して相同な塩基配列をもつ微生物種を同定した。さらにMEGANソフトウェアを用いて、Taxonomyのさまざまな階層レ

ベルで系統分類した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は成育医療研究センターの倫理委員会において審査され、承認された(「川崎病の発症と進行に関わるマイクロバイオームの解明」受付番号437)。

C. 研究結果

咽頭スワブの DNA および cDNA ライブラリー中の細菌と相補的なリードの総数は各々、2 万~105 万本、70 万~200 万本だった。直腸スワブの DNA および cDNA ライブラリー中の細菌と相補的なリードの総数は各々、8 万~470 万本、50 万~240 万本だった。末梢血の DNA および cDNA ライブラリーから解読したリードの総数は 3,000 万~7,000 万本で、そのうち 0.7~1.0 %、0.1~0.7 %が各々ヒト以外の配列だった。細菌と相同な解読リードは各々 221~286 本、125~593 本見出された。上位の Taxonomy で分類すると、咽頭スワブでは殆どの患者で *Firmicutes* > *Proteobacteria* > *Bacteroidetes* > *Actinobacteria* の順に頻度が高かったが、直腸スワブでは個体差が大きく、*Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes* の各々が優位となる患者がほぼ等数だった。末梢血では、DNA および cDNA の2つのライブラリーともに、*Proteobacteria* = *Actinobacteria* > *Firmicutes* の順に頻度が高く、*Bacteroidetes* の頻度は最も少なかった。また属レベルで解析したところ、患者の末梢血 DNA ライブラリーでは、*Propionibacterium* の頻度が全ての患者で最も高く、検体採取時の混入がその原因と考えられた。また、口腔・咽頭の常在細菌 *Streptococcus*、直腸の常在細菌 *Escherichia* に相同な核酸が全ての患者の全血 cDNA ライブラリーから検出された。

D. 考察

川崎病のマイクロバイオーム解析は一部の研究施設で端緒が開かれたばかりである。川崎病の発症要因には感染(微生物)と体質(遺伝)の両方の因子が関与すると推測されているが、このような多因子

疾患の本態を解明する上では、マイクロバイオーム解析から有益な情報が得られる可能性がある。今回のデータ解析により、血液検体および直腸・咽頭スワブ検体の解析に必要なリードペア数は各々、2000 万ペアおよび 500 万ペア程度(シーケンス量としては 4Gb および 1 Gb)であることが判明した。一検体あたりのコストは 30,000 円および 15,000 円程度と比較的低く抑えられることが分かった。さらに多くの検体を解析してマイクロバイオーム情報を蓄積するために、今回開発した解析フローチャートを活用すべきである。

今回は、急性期の川崎病 7 例の全血、咽頭・直腸スワブの DNA ライブラリーおよび cDNA ライブラリーを作製して、マイクロバイオームを解析した。咽頭では *Streptococcus* および *Haemophilus* が、直腸では *Bacteroides* および *Escherichia* が主要な菌属だった。全血中にもこれらの菌属と相同の核酸が検出されたが、*Propionibacterium* を超える頻度の菌属は見つからなかった。

今後、急性期および回復期の川崎病患者検体、発熱および健常対照群での全血 cDNA ライブラリーのマイクロバイオーム解析を含めて、さらなる情報の蓄積が必要である。

E. 結論

急性期患者の末梢血の DNA および cDNA ライブラリーから、多様な細菌相同の解読リードが見出された。今後、これらの核酸の由来や対照小児との差異について検討し、病態との関連を明らかにする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1. 阿部淳、中林一彦、江畑亮太、黒田誠. 川崎病患者の末梢血、咽頭・直腸スワブのメタゲノム解析.

第34回日本川崎病学会. 10月31日～11月1日、
2014. 東京.

2. Abe J, Ebata R, Saito N, Okunushi K, Nakabayashi K, Kuroda M. Human oral, gut, and blood microbiota in patients with Kawasaki disease. International Kawasaki Disease Symposium 2015. Feb 3-6, 2015, Honolulu, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

抗 TNF- α 製剤による CAWS 誘導血管炎抑制機序の組織学的解析

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

研究要旨

川崎病では種々の炎症性サイトカインと血管炎との関連が報告されており、抗 TNF- α 製剤の有効性が報告されつつある。しかし、抗 TNF- α 製剤による血管炎抑制機序については不明な点が残されている。*Candida albicans* 細胞壁由来糖タンパクで誘導されるマウス系統的血管炎は、病変分布や病理組織学的特徴が川崎病血管炎と類似しており、川崎病血管炎モデルとしての評価を受けている。我々は近年、抗 TNF- α 製剤が本モデルの血管炎に対して強力な抑制効果を発揮することを報告した。本研究では、抗 TNF- α 製剤による血管炎抑制機序について病理組織学的解析を行い、内膜おける炎症抑制が作用機序のひとつであることを明らかにした。

A. 研究目的

川崎病は、血管炎症候群に含まれる小児の急性熱性疾患である。冠状動脈が高頻度に侵襲されることから小児の虚血性心疾患の主要な原因となる。これまで TNF- α や IL-1 β 、IL-6 をはじめとする種々のサイトカインと冠状動脈炎との関連が報告されてきた。免疫グロブリン経静脈的大量療法 (IVIG 療法) の有効性は確立しているが、近年 IVIG 療法不応の患児に対する追加治療として抗 TNF- α 製剤の有効性が報告されるようになった。しかし、抗 TNF- α 製剤による血管炎抑制のメカニズムやいかなる投与方法が最も効果的であるのかについては明らかにされていない。

Candida albicans 細胞壁由来の β グルカン-マンノプロテイン複合体で誘導されるマウス系統的血管炎は病変分布や病変の組織像が川崎病血管炎と類似しており川崎病血管炎モデルとして評価を受けている。本起炎物質は、TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの産生を誘導し、我々は抗 TNF- α 製剤のひとつであるエタネルセプト(ETA)が本実験の血管炎の発生を強力に抑制することを報告した。しかし、血管炎抑制メカニズムについては十分な検討ができていなかった。

本研究では、抗 TNF- α 製剤による血管炎抑制機序について病理組織学的に解析することを目的に以下の2つの実験を行った。

B. 研究方法

起炎物質：*C. albicans* を完全合成培地で培養し、培養上清中に溶出してくる β グルカン-マンノプロテイン複合体を抽出して起炎物質とした。

使用動物：マウス、C57Bl/6N、雄性、4週齢を使用した。

動脈炎誘導方法：4mg の起炎物質を 0.2ml の PBS で懸濁し、マウスの腹腔内に連続 5 日間接種した。

抗 TNF- α 製剤：これまでに有効性が確認できている ETA を使用した。1 回当たりの投与量は 20mg/kg とした。

実験 1 血管炎成立過程におよぼす ETA の影響に関する病理組織学的検討：起炎物質の連続接種終了後マウスを経時的 (6 時間、12 時間、1 日、2 日、5 日、7 日、11 日、14 日、28 日) に屠殺して汎血管炎に至る血管病変の経時的な推移について ETA を投与した群 (ETA 群) と投与しない群 (対照群) との間で比較検討した。ETA の投与スケジュールは治療効果が確認されている従来の方法に従い、3-4 日毎に皮下投与した。

実験 2 ETA の投与時期による血管炎抑制効果の病理組織学的検討：起炎物質連続接種終了直後から ETA を 2 日毎に合計 9 回投与する初期投与群と連続接種終了後 11 日(汎血管炎成立時期)から ETA を同様に投与する後期投与群、ETA を投与しない群(対照群)を設定した。起炎物質接種終了後 28 日の時点における血管病変の組織像を比較検討した。

なお、本研究は東邦大学動物実験委員会の承認を受けて行った。また動物愛護の精神に則り、使用動物数は最小限となるように配慮した。

C. 研究結果

実験 1

対照群(ETA 非投与群)では、起炎物質連続接種終了直後から内膜炎が生じ、時間の経過とともに内膜炎は拡大した。5 日では内膜炎と共に外膜に炎症細胞浸潤が見られるようになった。血管壁の全層に炎症が及ぶ汎血管炎は 11 日目から生じ、時間の経過とともに炎症は拡大、重症化していた。病変局所に浸潤している炎症細胞の主体は好中球やマクロファージであった。

一方、ETA 群では起炎物質接種後早期に生じる内膜炎が 11 日まで完全に抑制されていた。28 日では汎血管炎が生じていたが、病変範囲や炎症の程度は縮小、軽減化する傾向が見られた。

実験 2

各群の汎血管炎発生率は、対照群：50%、初期投与群：0%、後期投与群：20%であった。対照群と比較して初期投与群では血管炎発生率の有意な低下が認められたが、後期投与群では明らかな発生率の低下は認められなかった。病変の範囲や炎症の程度については、初期投与群、後期投与群ともに縮小、軽減化する傾向が見られた(有意差なし)。

D. 考察

実験 1 の結果から、内膜炎が本モデルの血管炎の初期病変であることが明らかとなった。ETA 投与群では起炎物質接種直後から生じる内膜炎が強力に抑

制されていた。さらに実験 2 でも内膜炎の発生時期に一致して集中的に ETA を投与することで汎血管炎発生率の有意な低下が認められることが明らかとなった。これらの結果から ETA は内膜炎の発生を制御することで汎血管炎の成立を抑制しているものと考えられた。しかし実験 2 では、後期投与群においても病変範囲や炎症の程度が縮小、軽減化する傾向が見られ、ETA が内膜炎以降の過程も抑制し得る可能性が残された。今後は ETA が内膜炎を抑制する機序について分子生物学的手法も加えて明らかにしていく必要があると考えられる。

現在、抗 TNF- α 製剤は IVIG 療法不応例に対する 2nd ないし 3rd line の治療薬として用いられているが、より早期に使用することで血管炎を有効に抑制できる可能性があり、本研究は川崎病血管炎に対するより効果的な治療法の確立に寄与するものと考えられた。

E. 結論

本研究によって川崎病血管炎モデルの血管炎発生には TNF- α が密接に関与していることが再確認された。抗 TNF- α 製剤によって内膜炎の発生が強力に抑制されることが明らかとなり、これが汎血管炎の発生抑制の主要なメカニズムであると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Oharaseki T, Yokouchi Y, Yamada H, Mamada H, Muto S, Sadamoto K, Miura N, Ohno N, Saji T, Naoe S, Takahashi K. The role of TNF- α in a murine model of Kawasaki disease arteritis induced with a *Candida albicans* cell wall polysaccharide. Mod Rheumatol. 2014; 24: 120-8.

2. 学会発表

1) Toshiaki Oharaseki, Yuki Yokouchi, Joji Katsuzaki, Hitomi Yamada, Fumie Ihara,

Noriko Miura, Naohito Ohno, Tsutomu Saji,
Kazuo Suzuki, Shiro Naoe, Kei Takahashi :
Anti TNF- α drug inhibits initial process of
vasculitis in animal model of Kawasaki
disease. PAS/ASPR, 2014/5/3-6 Vancouver

- 2) 大原関利章、横内 幸、榎本泰典、山田仁美、
三浦典子、大野尚仁、直江史郎、鈴木和男、高
橋 啓：川崎病類似マウス血管炎モデルとサイ
トカイン. 第 20 回 MPO 研究会、2014/11/7-8、
熱海
- 3) 大原関利章、横内 幸、榎本泰典、勝碯譲児、山
田仁美、伊原文恵、三浦典子、大野尚仁、佐地 勉、
鈴木和男、直江史郎、高橋 啓：エタネルセプト
による CAWS 誘導マウス動脈炎抑制機序の病
理組織学的検討. 第 19 回血管病理研究会、
2014/10/4、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

疫学データから見た川崎病の病因論に関する研究

中村好一、牧野伸子

自治医科大学公衆衛生学教室

研究要旨

1970年から2年に1度の頻度で実施している川崎病全国調査では、2013年に実施した第22回全国調査(2011年および2012年の2年間の患者を対象)までに約30万人の患者が登録されている。これらのデータを利用した記述疫学的観察から、川崎病の発病には(1)感染症の関与に加えて、(2)宿主側の要因が関与していることが推察された。すなわち、(1)過去3回の全国的な流行(1979年、1982年、1986年)、(2)流行の移動、(3)乳児期後半にピークがある一峰性の年齢分布、(4)地域集積性、(5)流行の季節性、(6)同胞発症例の存在、(7)小地域での関連のある発生などは感染症の関与を示唆し、(a)予防接種がない時代の麻疹や水痘に比べると低い罹患率、(b)罹患率の人種差、(c)親子例や同胞例の存在などは宿主側の要因を示唆するデータである。

A. 研究目的

川崎病については、わが国では1970年より2年に1度の全国調査が継続して実施されており、2013年に実施した第22回川崎病全国調査(2011年、2012年の2年間の患者を対象)までの全国調査で約30万人の患者発生が確認されている。しかしながらその原因や発生の機序はいまだに不明である。

川崎病の本態は全身の動脈炎であり、特に冠動脈に変化が大きく、以前は約15%~20%の患者に、近年では5%以下(第22回全国調査では2.8%)まで低下したが、冠動脈瘤、冠動脈狭窄、心筋梗塞などの心後遺症を残すことがこの疾患の大きな問題の1つとなっている。わが国のみならず、欧米においても小児の後天性心疾患の最大の原因は川崎病である。

以上のような重要な疾患であるが、原因が不明であるために確定診断の方法もなく、予防法も確立していない。これらの課題を解決するためにはまずその原因や発生機序を明らかにする必要がある。

本研究では川崎病全国調査の結果を記述疫学的に解析し、その結果より川崎病の原因や発生機序を推察する目的で実施した。

B. 研究方法

川崎病全国調査で報告されている記述疫学像を検討し、川崎病の原因や発症機序について考察を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は既存の川崎病全国調査報告書や研究論文を解析したものであり、個人情報とは全く扱わず、倫理的問題も発生しない。

C. 研究結果

川崎病の記述疫学像をまとめると、以下のようになる。

(1) 3回にわたる全国的な流行

1979年、1982年、1986年の3回、わが国では全国規模の川崎病の流行を経験した。

(2) 流行の移動

1979年の全国規模の流行では、春先から初夏にかけて西日本から東日本、北日本に流行が移動していく様子が観察された。当時は「桜前線の北上と共に川崎病の流行も北上した」といわれた。1982年の流

行は東京や大阪などの大都市で流行が始まり、これが周囲に拡大していく様子が観察された。

(3) 乳児期後半にピークがある一峰性の年齢分布
年齢別罹患率を観察すると、乳児期前半は罹患率が低く、乳児期後半にピークがあり、その後は年齢と共に罹患率は低下している。

(4) 地域集積性

小地域での患者多発は各地から報告されている。1981年の全国調査データで市町村別に罹患率を計算し、高罹患率を呈した市町村をプロットした地図では山形県では高罹患率市町村が集積しているのに対して、県境を挟んだ宮城県では高罹患率市町村は散在しているに過ぎなかった。

(5) 流行の季節性

わが国の細菌の川崎病発生の季節性は、1月に患者が多発し、夏場にも1月ほどではないが患者の増加が観察され、その一方で10月には患者数が減少している。

(6) 同胞例

川崎病には同胞発症例が存在することが知られている。同胞が川崎病を発症すると、川崎病発症のリスクは通常の10倍程度の上昇することが確認されている。また、同胞例の発症間隔を観察すると、同日発症と1週間の間隔に若干のピークがあることが明らかにされている。

(7) 親子例

最近の全国調査では患者の両親の川崎病既往の有無に関するデータを収集している。詳細な解析により、両親の一方に川崎病の既往があると、川崎病のリスクが上昇していることが判明している。

(8) 小地域での関連がある発生

たとえば1980年暮れから1981年前半にかけて沖縄県宮古島で患者が多発したが、詳細な情報収集により患者同士が何らかの繋がりがあることが判明している。

(9) 低い罹患率

川崎病の罹患率は上昇し、近年は患者が最も多発した1982年の年間罹患率よりも高くなっている。しかし、予防接種がない時代の麻疹や水痘の罹患状況（ヒトからヒトへの直接感染）と比較すると、その罹患率は低い。

(10) 罹患率の人種差

これはわが国では観察不能だが、米国のデータでは日系人>アジア系>黒人>白人の順で高い罹患率が観察されている。

D. 考察

以上のような疫学像から、川崎病発生の機序として「感受性のある宿主に対して感染症がトリガーとなって発症する」という仮説が形成される。

年次別患者数/罹患率の推移に関しては、感染症の関与と考えるのが疫学的には最も合理的である。流行の移動についても同様である。年齢別罹患率については、乳児初期は母親からの受動免疫が体内にあるために罹患率が低く、これが消失する時期に罹患率が上昇し、その後は集団免疫が確立されるために年齢と共に罹患率が低下すると考えると、説明がつく。地域集積性についても同様である。

季節性については、感染症の関与なしではわが国での状況は説明しにくい。唯一可能性があるとするれば、たとえば花粉症のような季節性のあるアレルギーによるアレルギー反応だが、川崎病の場合には感染症の関与の方が合理的であろう。また、1月と夏場にも患者数上昇があること、わが国と諸外国では患者多発の時期が異なることより、複数の異なる感染症がトリガーとなって川崎病が発症していると考えの方が合理的である。

同胞発症例や親子例、低い罹患率、人種差は宿主側の感受性の存在を示唆している。ただ、同胞例は感染症の関与も同時に示唆しており、同日発症例は同時感染、1週間のずれは潜伏期間と考えると説明がつく。

以上のように、川崎病の記述疫学像は、この疾患の発症に感染症の関与と宿主側の要因の関与が関係していることを示唆している。

E. 結論

川崎病の記述疫学像から、川崎病は「感受性がある宿主に対して感染症がトリガーとなって発症する」という仮説を形成することができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Makino M, Nakamura Y, Yashiro M, Ae R, Tsuboi S, Aoyama Y, Kojo T, Uehara R, Kotani K, Yanagawa H. Descriptive epidemiology of Kawasaki disease in Japan, 2011-2012: from the results of the nationwide survey. *Journal of Epidemiology* 2015 (in press)

2. 学会発表

中村好一. 疫学像からみた川崎病病因論へのアプローチ (イブニングシンポジウム「川崎病の病因をふたたび考える」) 第34回日本川崎病学会学術集会(東京, 2014.10.31). 第34回日本川崎病学会学術集会抄録集 2014: 42.

Nakamura Y. Lessons from epidemiologic studies of Kawasaki disease in Japan. The 11th International Symposium of Kawasaki disease (Honolulu, 2015.2.3).

H. 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の確立と運営

荒川浩一¹⁾、関 満¹⁾、小林 徹²⁾

1) 群馬大学大学院小児科学分野

2) The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

研究要旨

川崎病の発症には、疫学的な特徴により遺伝的要因に加え、感染因子を含む環境要因も複雑に関与すると考えられる。本邦における川崎病の遺伝子研究は複数の研究施設が独自に行っているのが現状であり、サンプル数など限定的なものであった。そのため、我々は、川崎病遺伝コンソーシアムを立ち上げ遺伝的解析の発展を目指すことを目的とした。現時点で参加施設が 42 施設、登録は 896 検体が集積されている。

A. 研究目的

我が国は世界で最も川崎病罹患率が高く、その標準的治療であるガンマグロブリン大量療法は高額な医療費が必要である点からも、その病態解明並びに発症予防への研究は小児医療ならびに医療経済的な面でも喫緊の課題である。

川崎病の発症には、疫学的な特徴により遺伝的要因の関与が疑われるが、さらに、感染因子を含む環境要因も複雑に関与すると考えられる。わが国は、ほぼ単一の民族で構成されるため、遺伝学的な解析に非常に適した状況であり、さらに、医療の質の高さから、諸外国と比較して充実した臨床情報の収集が見込める利点がある。ただ、現状の遺伝要因研究は国内で複数の研究施設が独自に検体を収集、解析しているが効率が良いとは言い難い。

そこで、川崎病遺伝コンソーシアムを立ち上げ遺伝的解析の発展を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

川崎病遺伝コンソーシアムは、川崎病を遺伝子の観点から、その原因を探索する目的に確立した前方視的コホート研究組織である (図 1)。

参加希望施設を川崎病遺伝コンソーシアムに登録し、以下に大別した。

①試料提供機関 (Material Provider)

②研究機関 (Data Provider)

(1) 試料提供機関

患者ならびに保護者に対して研究概要を説明し、同意取得後に連結不可能匿名化を行う。その後、血液を採取して外部委託機関に送付し、臨床情報は、コンソーシアム事務局に FAX にて提供する。

(2) コンソーシアム事務局

群馬大学小児科におき、試料提供機関からの臨床情報の収集および DNA の管理を担い、研究機関へ臨床情報を提供する。一方、試料提供機関からの血液は外部委託機関にて DNA を抽出後、コンソーシアム事務局分局である千葉大学公衆衛生に送付し、そこで DNA を管理し、研究機関へ DNA を提供する。

(3) 研究機関

研究計画書を作成したら、コンソーシアム運営委員会に申請し、そこで承認を受けた後に、臨床情報および DNA の提供を受ける。

川崎病遺伝コンソーシアム組織構成員を表に示す。

代表者
東邦大学医療センター大森病院小児科

事務局
群馬大学大学院小児科学分野(臨床情報収集・事務的業務担当)
千葉大学大学院公衆衛生学(DNA収集・検体配布担当)

運営委員
国立成育医療研究センター研究所
群馬大学大学院小児科学分野
富山大学小児科
日本医科大学小児科
千葉大学大学院公衆衛生学
名古屋大学大学院小児科学
群馬大学大学院小児科学分野
鹿児島大学大学院小児科学分野
和歌山県立医科大学小児科
東京女子医科大学八千代医療センター
京都府立医科大学小児内科
九州大学大学院小児科学
NTT東日本札幌病院小児科
東京都立小児総合医療センター循環器科

顧問
医療法人同仁会介護老人保健施設マムクオーレ
日本川崎病研究センター
日本赤十字社医療センター

佐地 勉

小林 徹、関 満
尾内 善広

阿部 淳
荒川 浩一
市田 藤子
小川 俊一
尾内 善広
加藤 太一
小林 徹
野村 裕一
鈴木 啓之
寺井 勝
濱岡 建城
原 寿郎
布施 茂登
三浦 大

尾内善四郎
川崎 富作
藺部 友良

C. 結果ならびに D. 考察

2014年11月30日現在、参加施設として、倫理委員会承認済みが42施設(今春より18施設増予定)。倫理委員会申請中/申請予定は22施設となっている。2012年12月から立ち上げ、2014年11月30日までに896検体を受領済みであり、月ごとの検体収集状況は、30~40検体となっている(図2)。

今後も参加施設の増加および登録症例数の増加を期待している。

E. 結論

川崎病遺伝コンソーシアムを立ち上げ、運営を開始している。現在までに約2年間で900検体が収集できている。通常の川崎病患者ばかりでなく、反復罹患した症例、兄弟や親子例、巨大冠動脈を来した症例など特異な経過をたどった川崎病罹患患者、およびその両親や非(未)罹患同胞等の検体採取などが行える可能性があり、川崎病の病態解明に果たす役割が非常に大きいと期待される。

F. 研究発表

1) 論文

1. Seki M, Kurishima C, Saiki H, Masutani S, Arakawa H, Tamura M, Senzaki H. Progressive aortic dilation and aortic stiffness in children with repaired tetralogy of Fallot. *Heart Vessels*. 29:83-7. 2014

2. Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 164:142-145. 2014

3. Shiba N, Ohki K, Park MJ, Sotomatsu M, Kudo K, Ito E, Sako M, Arakawa H, Hayashi Y. SETBP1 mutations in juvenile myelomonocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome but not in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 164:156-159. 2014

4. Ishii Y, Inamura N, Kayatani F, Iwai S, Kawata H, Arakawa H, Kishimoto H. Evaluation of bilateral pulmonary artery banding for initial palliation in single-ventricle neonates and infants: risk factors for mortality before the bidirectional Glenn procedure. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 19:807-811. 2014

2) 学会発表

小林 徹、川崎病急性期治療 Pros and Cons. 第117回日本小児科学会学術集会教育セミナー23. 2014
名古屋

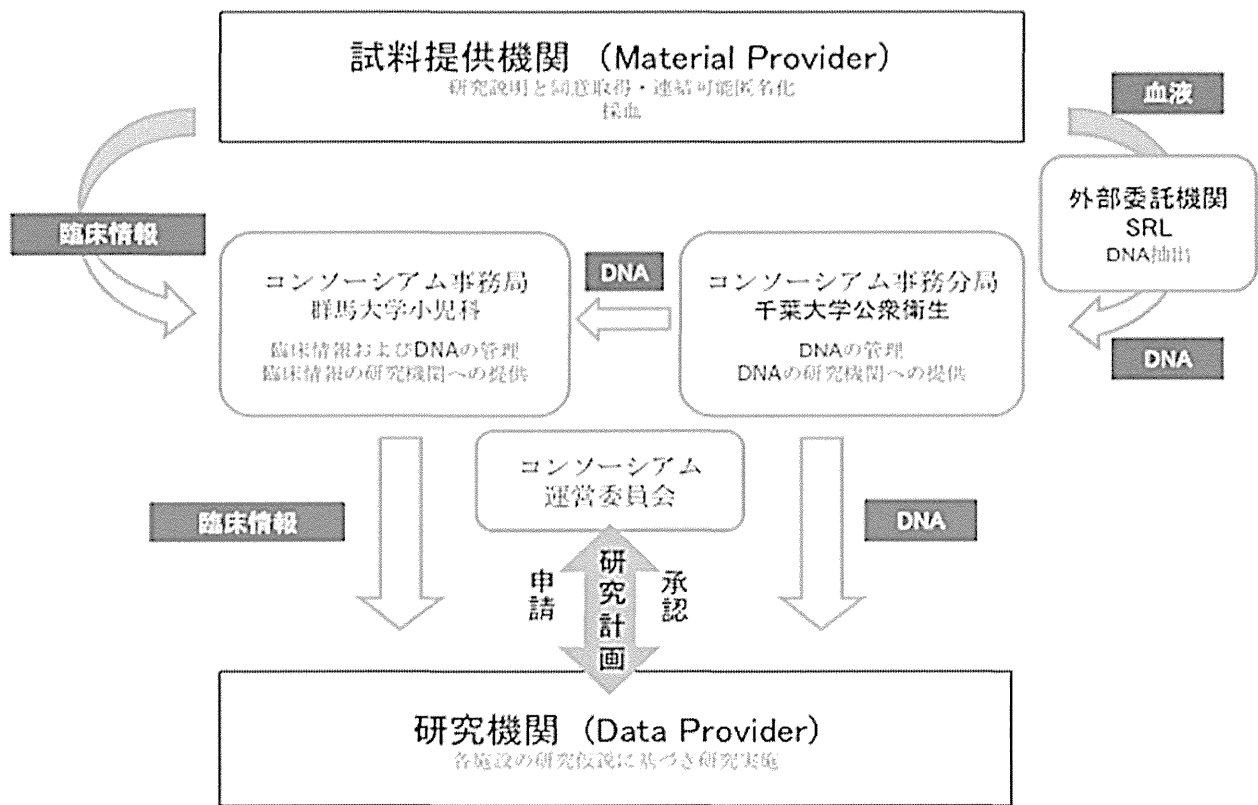


図1. 組織図

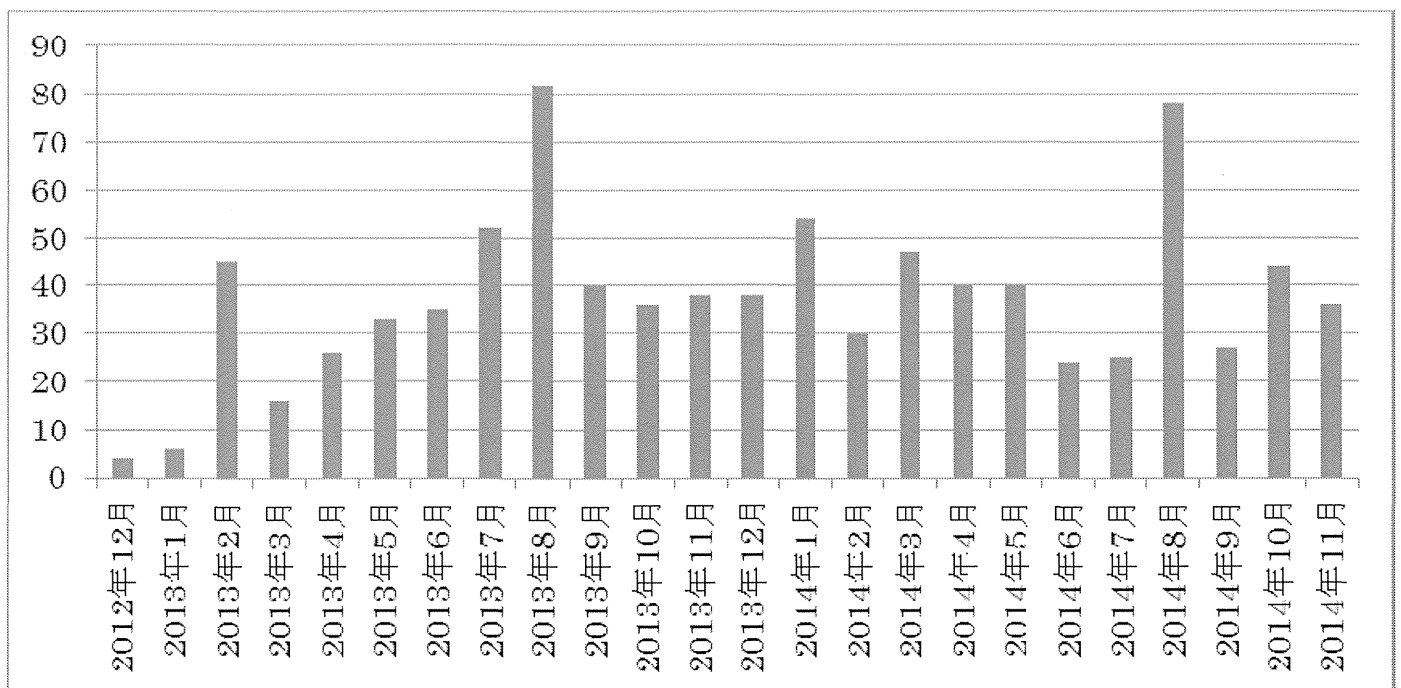


図2. 検体収集状況

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

廣野 恵一、市田 菫子
富山大学医学部小児科

研究要旨

我々のこれまでの研究により、種々のサイトカインが川崎病の血管内皮細胞の炎症および障害を引き起こし、冠動脈病変をもたらすことを明らかにしてきたが、miRNA と川崎病の関連性については今まで明らかにされていない。そこで、我々は、川崎病においても、miRNA が血管炎の発症および進展に大きな役割を持つと仮定した。本研究の目的は、川崎病急性期における miRNA による炎症の制御機構の解明することである。

川崎病急性期において、miRNA の遺伝子発現の調節は明らかではなく、本研究により急性期における miRNA の動態とその調節機構を明らかにすることで、急性期の炎症反応の進展の機序を、より上流からアプローチでき、川崎病の原因究明につながると考えた。

また、本研究により、RNA 干渉の側面からアプローチすることで、川崎病の RNA 医薬品の開発の端緒になると考えた。

A. 研究目的

川崎病は、乳幼児に発症する全身の中小動脈を主体とした血管炎であり、特に冠動脈を侵し、種々の心合併症を引き起こす。1983年に Lancet に古庄先生が川崎病の治療として、免疫グロブリン大量療法を発表されて以来、予後は劇的に改善されてきているが、今尚約 10%の治療不応例が存在し、冠動脈に後遺症を残す例も少なくない。その病態および冠動脈病変進展の機序にはいまだ不明な点が多く、根本的な治療法がない。

一方で、川崎病の免疫学的側面として、自然免疫の爆発的な活動を特徴とする。これまで、我々は、川崎病の病因および病態を解明するため、これらの Damage-Associated Molecular Pattern(DAMP) molecules である MRP8、MRP14、S100A12 と川崎病における血管内皮細胞障害に関する研究を続け、S100A12 および MRP8/MRP14 が川崎病急性期において炎症および冠動脈病変の進展機序に深く関与し(Am J Cardiol 2004, Blood 2005, J Am Coll Cardiol 2006, Arthritis Rheum 2007)、MRP8/MRP14 は Toll like receptor 4 の内因性のリガンドとして作用することを明らかにしてきた

(Pediatr Res 2009)。一方、川崎病の発症には転写因子 nuclear factor kappa B (NF- κ B)活性化に基づく高炎症性サイトカイン血症が極めて重要であるが、近年、NF- κ B を調節する microRNA(miRNA) について、解明が進められている。miRNA とは、non coding RNA の一種で、mRNA の翻訳抑制や分解に関与する。なかでも、miR-146 は NF- κ B を介して、自然免疫応答の調節を行っており、Toll-like receptor およびサイトカインのネガティブフィードバックを調節していると考えられている。

そこで、本研究の目的は、川崎病の病因および病態を解明するため、川崎病急性期における miRNA による自然免疫応答による炎症の制御機構を遺伝的素因も含めて解明することである。

B. 研究方法

実験の全体像としては、以下の 1-3 の段階を考えた。

1. miRNA と mRNA の発現の網羅的解析および遺伝子解析
2. 炎症性サイトカイン、ケモカインの解析ならびに遺伝子解析
3. 1 より同定された miRNA の機能解析