

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2019B-2

課題名：川崎病による心後遺症合併ゼロを目指した研究実施基盤体制の構築

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター研究所  
(所属・職名 氏名) 免疫アレルギー・感染研究部免疫療法研究室・室長  
松田 明生

(研究成果の要約)

本研究は、川崎病による心後遺症合併ゼロを出口とし、

- (1) 多施設共通のデータベースに基づく大規模な情報・資料収集
- (2) 川崎病遺伝コンソーシアムを活用した川崎病の疾患感受性、及び治療反応性に関する遺伝薬理学的情報
- (3) 冠動脈血管内皮細胞に対する抗炎症メカニズム及び不応メカニズム解明に基づいた分子情報

これら3つの異なるアプローチによる川崎病研究成果から得られる情報を有機的に連動させて解析し、精密医療の実現に資する制度の高い予測モデル構築、及びそのための研究実施体制の構築を目的としている。2019年度は、川崎病遺伝コンソーシアムをプラットフォームとして約2100の詳細な臨床情報が付随したDNA検体を収集し、利用可能な状態に整理した。しかし2019年度はGWAS解析が進捗しなかったため、2020年度に実施するとともに、より大量の検体について解析するべく大型研究費獲得を目指している。また、日本川崎病学会および他施設と共同で急性期・遠隔期レジストリを現在運用しており、レジストリから導出された結果に基づいて2019年5月に川崎病の診断手引きの改定(改定6版)を実施した。さらに北米のチームとも連携をとり、急性期治療ガイドラインならびに遠隔期治療ガイドラインの改定作業中である。基礎研究では、冠動脈血管内皮細胞(HCAEC)を用いたin vitro川崎病IVIG不応モデルの確立し、そのモデルを用いて転写因子C/EBP活性化がIVIG不応性獲得に必須であること、さらにIVIG不応性を解除する物質について東北大学化合物ライブラリー(約6400種)を用いて探索し、上位40種の候補物質を絞り込んだ。また、特に重症川崎病の初期治療におけるIVIGとステロイド薬併用療法の有用性の根底にある分子メカニズムの一部を明らかにした。本研究主任者・分担研究者を含めた成育医療研究センターを中心に組織した川崎病研究ボード(KDボード)の定期的な開催を開始し、情報共有および課題解決等に関するディスカッションの体制を構築した。

### 1. 研究目的

本研究の目的:本研究は、川崎病による心後遺症合併ゼロを出口とし、

- (1) 多施設共通のデータベースに基づく大規模な情報・試料収集
- (2) 川崎病遺伝コンソーシアムを活用した川崎病の疾患感受性、及び治療反応性に関する遺伝薬理学的情報
- (3) 冠動脈血管内皮細胞に対する抗炎症メカニズム及び不応メカニズム解明に基づいた分子情報

これら3つの異なるアプローチによ

る川崎病研究成果から得られる情報を有機的に連動させて解析し、精密医療の実現に資する精度の高い予測モデル構築、及びそのための研究実施体制の基盤構築を目的とする。

### 2. 研究組織

| 研究者    | 所属施設     |
|--------|----------|
| 松田 明生  | 研究所      |
| 小林 徹   | 臨床研究センター |
| 浦山 ケビン | 研究所      |

## 3. 研究成果

本年度の研究は、研究目的(1)～(3)達成のため、各研究分担者がそれぞれの研究分担課題を遂行するとともに、本研究主任者・分担研究者を含めた成育医療研究センターを中心に組織した川崎病研究ボード (KD ボード) の活用を開始した。本年度より KD ボードを月 1 回 (通常第一火曜日) 定期的開催し、情報共有および課題解決等に関するディスカッションの体制を構築した。

- (1) 多施設共通のデータベースに基づく大規模な情報・試料収集
- (2) 川崎病遺伝コンソーシアムを活用した川崎病の疾患感受性、及び治療反応性に関する遺伝薬理学的情報

川崎病遺伝コンソーシアムをプラットフォームとして約 2100 の詳細な臨床情報が不随した DNA 献体を収集し、利用可能な状態に整理した。今後、大型研究費が獲得でき次第 GEAS による解析を実施する予定である。日本川崎病学会や他施設と共同で急性期・遠隔期レジストリを現在運用中である。レジストリから導出された結果に基づき、令和元年 5 月に川崎病の診断の手引きの改定 (改定 6 版) を実施した (<http://www.jskd.jp/info/pdf/tebiki201906.pdf>)。さらに北米のチームとも連携を取り、急性期治療ガイドラインならびに遠隔期治療ガイドラインの改定作業中である。

- (3) 冠動脈血管内皮細胞に対する抗炎症メカニズム及び不応メカニズム解明に基づいた分子情報

今年度は、以下の 3 点について研究を実施し、一定の成果を得た。

- (イ) 冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) における IVIG 不応に重要な役割を果たす分子の同定
- (ロ) HCAEC における IVIG 不応を解除する物質の探索
- (ハ) 川崎病急性期におけるステロイド薬

## 結果(イ) :

主任研究者らは先行研究として冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) の培養系を *in vitro* の川崎病モデルとして用い、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  が誘導する炎症応答を IVIG が分子特異的且つ完全に抑制することを明らかにした (文献 1)。複数の臨床研究から、川崎病 IVIG 不応に IL-18 および IL-17A の関与が指摘されている。HCAEC 培養系においても TNF- $\alpha$  に少量の IL-18 (TNF- $\alpha$  : IL-18 = 100 : 1) あるいは等量の IL-17A を添加することにより IVIG による顕著な抗炎症作用が解除され、IVIG 不応性を獲得した (図 1)。すなわち、*in vitro* において臨床で起きている事象を再現する IVIG 不応川崎病モデルを確立できた。

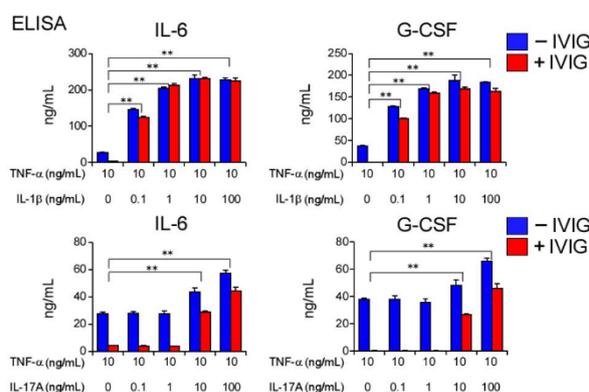


図 1 : IL-18 および IL-17A による IVIG 不応モデルの確立 (業績 1)

さらにこのモデルを用いて、HCAEC における IVIG 不応性獲得に、転写因子 C/EBP $\beta$  および C/EBP $\delta$  の IVIG 不応活性化が必須であることを明らかにした (図 2)。

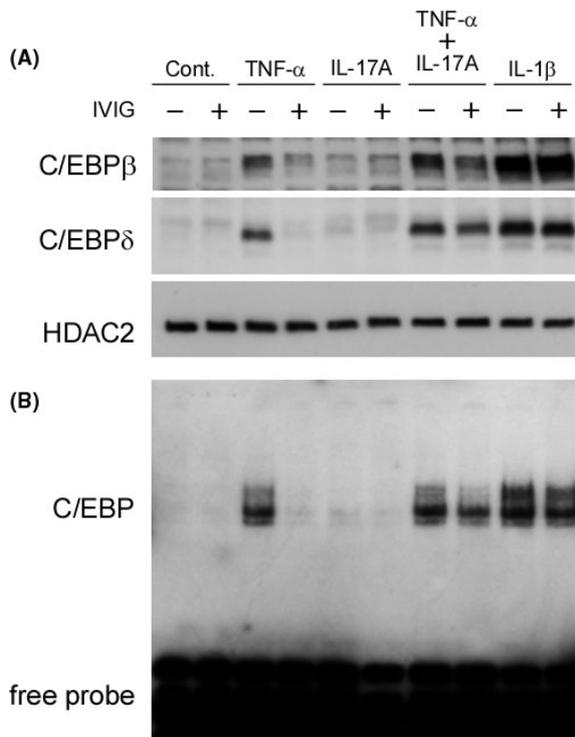


図 2 : IL-18 および IL-17A は C/EBPβ、C/EBPδ 発現 (A) および活性化 (B) を介して IVIG 不応性に関与する (業績 1)。

結果(ロ) : 以上の結果から、この *in vitro* 川崎病 IVIG 不応モデルを用いて、「IL-18 あるいは IL-17A により誘導される IVIG 不応炎症応答を C/EBP 活性化制御を介して抑制する物質が、IVIG 不応川崎病患者に対する新規治療薬候補となる」とのコンセプト (図 3) のもと、候補物質の探索を行った。探索には東北大学化合物ライブラリー (約 6400 種) を用い、1<sup>st</sup> スクリーニングは IL-18 刺激と各化合物 25 μM 添加時の G-CSF 産生量低下を ELISA 法により検討し、上位 40 種の候補化合物を絞り込んだ。

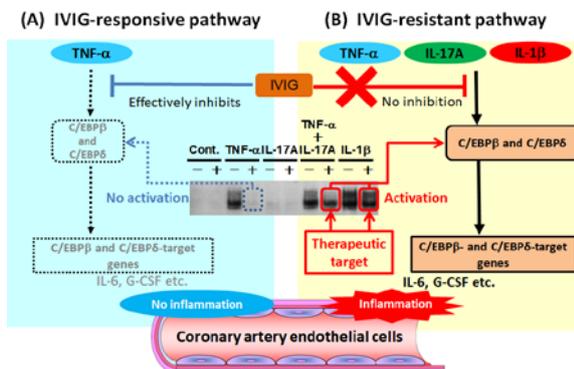


図 3 : IVIG 不応川崎病に対する新規治療薬探索のストラテジー (業績 1)

結果(ハ) :

最近の複数の臨床研究により、特に IVIG 不応が予測される重症川崎病患者に対しては、IVIG とステロイド薬の併用療法の有用性が明らかとなっているが、その有効性の詳しい分子メカニズムについては不明である。そこで今年度は HCAEC 細胞の川崎病モデルを用いて、初期治療における IVIG とステロイド薬併用療法の有用性の根底にある分子メカニズムの解明を目指した。また、HCAEC の IVIG 不応炎症応答の惹起に必須な因子の同定を試みた。

まず初めに、ステロイド薬の一つであるデキサメタゾン (DEX) は、炎症刺激により HCAEC 細胞に誘導される細胞傷害 (アポトーシス) を顕著に抑制することが分った (図 4A)。しかし、IVIG にはこのような細胞傷害抑制作用は認められなかった。DEX によるアポトーシス抑制効果は、結果的に HCAEC 細胞からの HMGB1 (図 4B) や IL-1α (data not shown) といった DAMPs 分子の放出を有意に抑制した。これらの DAMPs 分子は、川崎病の IVIG 不応に関与することが報告されているが、本研究においても、IL-1α は IL-1β と同様に、HCAEC 細胞から IVIG 不応性に G-CSF や IL-6 といった川崎病の病態に重要なサイトカイン産生を誘導した。従って、特に IVIG 不応が予測される重症川崎病患者に対して治療の初期からステロイド薬と IVIG の併用療法を施すことにより、冠動脈血管内皮細胞の炎症によるダメージを抑制し、結果的に IVIG 不応性獲得に重要な役割を果たす DAMPs 分子群の放出を予防することが、臨床的な利点の一つである可能性が示唆された。

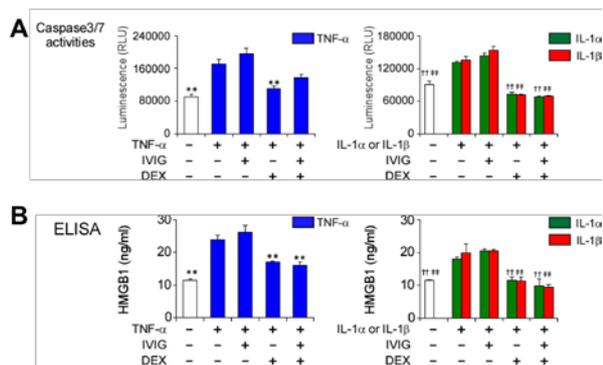


図 4：ステロイド薬による HCAEC 細胞のアポトーシス抑制 (A) および HMGB1 放出の抑制効果 (B) (業績 2)

参考文献：

- 1) Matsuda A., et al. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF-alpha-activated human coronary artery endothelial cells. *Eur J Immunol.* 2012;42:2121-2131.

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、人を対象とする医学研究に関する倫理指針を遵守して実施した。また、本研究の実施にあたり、研究内容を詳細に説明する説明同意文書を用いて患者の代諾者(家族)、もしくは本人に研究参加の同意を書面にて取得した。臨床情報は連結可能匿名化処理実施後に集団として解析を行い、定められた期間が経過した後は連結不可能匿名化処理を行う予定である。