

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 扇原 義人



論 文 題 目

「難治川崎病の病態および新規治療薬インフリキシマブ療法の  
生物学的機序の解明」

指 導 教 授 承 認 印

石井正浩



# 難治川崎病の病態および新規治療薬インフリキシマブ療法の 生物学的機序の解明

氏 名 扇原 義人

川崎病は 1967 年に我が国より報告されたが、未だ原因不明の急性熱性疾患である。

本学位研究では胸水を認めた難治川崎病の病態および新規治療薬インフリキシマブの生物学的機序の解明を目的として、研究Ⅰ．胸水貯留を合併した川崎病における血中 VEGF 濃度の検討、研究Ⅱ．免疫グロブリン療法不応川崎病に対するインフリキシマブ療法の白血球中 mRNA 発現解析を行った。

## 研究Ⅰ．胸水貯留を合併した川崎病における血中 VEGF 濃度の検討

【背景】急性期に胸水貯留を来した川崎病 5 例を経験した。胸水の発症は、血管内皮炎による血管透過性亢進が関与すると考えられるが、その病態についての詳細な検討報告はない。近年、血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor（以下 VEGF）が川崎病の急性期に上昇し、胸水を発症した川崎病で高値を示すことが報告された。

【目的】胸水合併の川崎病 5 例の臨床的特徴及び VEGF の推移を解析し、その病態について検討する。

【方法】2007 年から 2010 年に北里大学病院で川崎病の診断で入院し、経過中に胸水を合併した 5 症例を対象とした。各症例についての臨床像や経過について比較検討した。また WBC、CRP、Alb、Plt、Na、D-Dimer についての入院時、胸水貯留時、退院時の推移を追い、VEGF は胸水貯留時と胸水消失時に測定した。

【結果】6 カ月から 4 歳 6 カ月、5 例全てが男児例であった。診断時、1 例はすでに冠動脈の

拡張を認めた。胆嚢炎、関節炎、痙攣重積など様々な合併症を認めた。5 症例全てが初回治療に不応であり免疫グロブリン、ステロイド、インフリキシマブなど様々な追加治療を必要とした。胸水は第 7 から第 10 病日、初回治療後または追加治療後に出現を認めた。胸腔穿刺を施行した 1 例は漏出性胸水であった。WBC、CRP、D-Dimer は胸水貯留時に高値を示した。Plt、Aib は胸水貯留時に低値を示し、特に Alb は全てが 2.1g/dL 以下と著明な低値を認めた。胸水貯留時と退院時でいずれも有意差を認めた。胸水貯留時 VEGF 値  $1371 \pm 1151$  pg/ml、消失時  $870 \pm 574$  pg/ml であった。有意差は認めなかったが、胸水貯留が著明な 2 例で著しい VEGF 値の減少を認めた。

【考察】胸水を合併する川崎病は血管炎の程度が強く、様々な合併症を認め、治療に難渋する症例であった。低アルブミン血症による膠質浸透圧の低下が胸水の原因と考えられ、VEGF が関与する可能性が考えられた。

## 研究Ⅱ. 免疫グロブリン療法不応川崎病に対するインフリキシマブ療法の白血球中 mRNA 発現解析

【背景】現在、川崎病に対する免疫グロブリン療法 (IVIG) 導入により炎症を早期に鎮静化させ冠動脈瘤の発症を予防することが可能となった。しかし未だ IVIG 不応例が約 10-20% 存在し、様々な追加治療が検討されている。IVIG 不応例は冠動脈瘤のリスクファクターであることから IVIG 不応の川崎病症例に対しては確固たる追加治療が必要とされる。2005 年に難治川崎病症例に対して、TNF  $\alpha$  に対するモノクローナル抗体であるインフリキシマブ (IFX) 投与の報告がされて以降、全患者の約 1% に IFX の投与が行われている。しかしその分子遺伝学的な治療効果を検討した報告はない。

【目的】IVIG 不応の川崎病症例に対する IFX 療法の白血球 mRNA 発現変動を解析し分子生物学的機序を検証する。

【方法】2007-2012 年に北里大学病院に川崎病の診断で入院し、初回 IVIG、追加 IVIG 療法に不応で 3rd 治療として IFX を受け反応を認めた 8 例 (IFX 群) を対象とした。IFX で特異的に

変動した因子を抽出するために初回 IVIG で反応を認めた 6 例 (IVIG 群) を対象群とした。各治療の前後の白血球中 mRNA 発現についてマイクロアレイにより網羅的解析を行い、両群を比較することで IFX で特異的に変動する Signaling pathway 解析や transcripts の抽出を行った。

【結果】全 54,675probes 中、1,388probes が IFX 治療前後で有意に変動を示した。内 645 probes が IVIG 群でも同様な変動を認め、743 probes が IFX 群において特異的に変動を示した。IFX の治療前後で有意に低下した 975 probes に対して pathway 解析を行ったところ、Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)、Toll-like receptor (TLR) などの自然免疫や IL-1、IL-6、TNF  $\alpha$ 、IL-17 など炎症性サイトカイン、MMP 関連の pathways を、また上昇した 413 probes においては TGF  $\beta$  関連の pathway を認めた。IVIG 群で変動した probes 群における pathways と比較すると、IFX 群では NOD、MMP や TGF  $\beta$  関連 pathways がより強く変動することが確認された。

次に IFX でより強く変動した transcripts を抽出するために、IFX 治療前後で低下した 465 probes の内、IVIG 群で反対に上昇を認めた 50 probes を抽出した。これら 50 probes の中から TNF  $\alpha$  の刺激により誘導され、川崎病血管炎や IVIG 抵抗性に関連する peptidase inhibitor-3 (PI3)・matrix metalloproteinases-8 (MMP8)・chemokine receptor-2 (CCR2)・pentraxin-3 (PTX3)を検出した。これら 4 transcripts の遺伝子発現を独立コホートの IFX 反応 9 症例で qRT-PCR を用いて確認したところ、IFX 治療前後で有意に低下を認めた (PI3,  $P = 0.008$ ; MMP8,  $P = 0.012$ ; CCR2,  $P = 0.008$ ; PTX3,  $P = 0.038$ )。

#### 【考察】

1. IFX は IL-1、IL-6、TNF  $\alpha$ 、IL-17 など川崎病の主要な炎症性サイトカインの pathway を制御した。

IL-1、IL-6、TNF  $\alpha$ 、IL-17 などの炎症性サイトカインは川崎病血管炎、冠動脈瘤形成、IVIG 抵抗性に重要な役割を果たす。これら炎症性サイトカインに関する pathway は IVIG 群のみならず IFX 群においても有意に制御されることが確認された。また IVIG 不応例では IL-1 pathway に関する transcripts の発現が報告されており、IL-1 の抑制は難治川崎病の新しい治療のタ

ーゲットとして注目されている。IFX 投与がこれら川崎病血管炎に関与する主たるサイトカインシグナルの pathways 制御に関与することは IFX 投与が IVIG と同様の作用をもつと同時に IVIG では十分に制御することができない因子をより強力に制御する作用を持つことが示された。

## 2. IFX は IVIG と比較し NOD、MMP や TGF $\beta$ などの pathway をより強力に変動させた。

最近の研究により NOD-like receptor や TLR が川崎病発症に大きく関与すると考えられている。動物モデルにおいて NOD の mRNA の発現が抗 TLR 抗体や抗 TNF 抗体により制御されたことから TNF  $\alpha$  遮断における自然免疫の制御が証明されている。IFX による TNF  $\alpha$  の特異的制御が川崎病急性期に関与する自然免疫活性を抑制する可能性があると考えられた。MMP は様々な細胞から分泌され細胞外基質を分解する蛋白である。川崎病患者では MMP 遺伝子多型が冠動脈瘤形成に関与すると報告される。川崎病急性期には弾性板破壊の起因となる MMP 遺伝子の発現や血清レベルでの上昇も報告されている。TGF  $\beta$  はサイトカインや MMP 分泌機能を持つ筋線維芽細胞への分化誘導や T 細胞分化調節など炎症過程を制御するに重要な因子で、川崎病血管炎や冠動脈瘤形成に関与するとされる。

IFX は川崎病血管炎や冠動脈瘤に関わる NOD、MMP や TGF  $\beta$  を制御することが示された。

## 3. IFX は川崎病血管炎や IVIG 抵抗性に関与する PI3、MMP8、CCR2、PTX3 を有意に抑制した。

PI3 は別名 skin-derived antileukoproteinase (SKALP)、elafin や trappin-2 としても知られており、過度の炎症を防ぐセリンプロテアーゼ阻害剤である。好中球の遊走や NF  $\kappa$  B の活性、さらに組織破壊の原因となる好中球エラスターゼを抑制する作用をもつ。IFX による TNF  $\alpha$  遮断はこれらの過程を介し炎症を制御している可能性が考えられた。MMP8 は TNF  $\alpha$  の刺激により好中球から分泌される。近年 MMP8 の遺伝子発現が IVIG 不応症例で高値であることが報告された。IFX による特異的 TNF  $\alpha$  の抑制がこの IVIG 不応に関与する MMP8 を抑制する可能性が示唆された。CCR2 は単球の走化因子である MCP-1 の受容体である。MCP-1 は川崎病急性期に上昇し IVIG 投与により抑制されること、また CCR2 は川崎病モデルマウスにおける冠動脈瘤発症に重要であることが報告されている。PTX3 は炎症マーカーとして一般的な

CRP と同様に pentraxin family に属する。IL-6 の刺激により肝臓から分泌される CRP とは異なり、PTX3 は  $\text{TNF } \alpha$  や IL-1 の刺激により主に血管内皮より分泌される。PTX3 は川崎病 IVIG 不応症例で高値であることや川崎病と同じく血管炎を病態とする高安病において病勢の Biomaker となりうるということが報告されている。川崎病血管炎に対する IFX 療法は、IVIG では制御困難なこれら様々な因子をより強力に抑制する可能性が示された。

【結語】 IVIG 不応の難治川崎病症例に対する IFX 投与による  $\text{TNF } \alpha$  遮断は、川崎病血管炎に関する Pathway や IVIG 不応に関する因子を制御することが示された。