

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 江波戸 孝輔



論 文 題 目

研究

## 川崎病に対する免疫学的、臨床的評価

指 導 教 授 承 認 印

石井正浩



## 研究 1

「A comprehensive analysis of massive peripheral blood mononuclear cells samples in Kawasaki disease」

(川崎病における PBMCs の網羅的解析～川崎病の immuno profile～)

氏 名 江波戸 孝輔

### 研究目的

川崎病 (KD) は小児期特有に発症する中小型の血管を中心とした血管炎である。未だ原因が不明な疾患であり、その病態には自然免疫の異常が関連していると考えられているが、一方で獲得免疫の関与については不明な点が多い。免疫学的な病態評価のために末梢血単核球 (PBMCs) を用いた様々な研究が行われているが、いずれの研究も各サブセットに特化したものばかりであり、PBMCs の網羅的な解析は行われていない。そこで今回我々は KD の PBMCs を網羅的に解析し、その活性化状態を経時的に評価し、宿主側の炎症制御機構の特徴の把握を試みた。

### 研究方法

2015 年 4 月から 2016 年 4 月に北里大学病院、海老名総合病院、相模原協同病院で入院加療された完全型 KD 63 症例を対象とした。KD 群においては診断時 (acute)、初回治療後 (subacute) の血液を採取し、NIH が提唱するヒト PBMC サブセット標準化プ

ロトコールを参考に FACS (8 colors) 解析を行った。対照群は 3 日間以上の発熱を有した熱性疾患患者 21 例 (FC)、健常児 21 例 (HC) を用いており、検体は当院受診時に血液を採取する。

採取した全ての検体は 24 時間以内に PBMCs を抽出し、あらかじめ準備しておいた 8 color の蛍光抗体で染色をする。その後 4%PFC を使用して染色したサンプルを固定し、固定後 24 時間以内に FACS 解析を行う。

今回の研究は北里大学病院倫理委員会により承認され、全ての患者または両親から同意を得た。

評価項目：単球/NK 細胞/樹状細胞、B 細胞、T 細胞 (CD4、CD8、Th1/2/17、Treg)

FACS 解析：FACS Verse (Becton Dickinson® [Franklin Lakes, NJ, USA])、flow cytometers Flow Jo software program (Tree Star® [Ashland, OR, USA])

統計解析：the Prism software program for Windows, version 7 (San Diego, CA, USA)。

解析結果は median・IQR で表記しており、各データの比較は Mann-Whitney U-test を用いており、群ごとの評価に関しては two-sided  $\chi^2$  test を使用しており、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

KD 群は日本川崎病研究センターによる「診断の手引き」による診断基準を満たした完全型である。

## 研究結果

単球/NK 細胞/樹状細胞：non classical mono および classical mono が FC に比べて KD 急性期に優位に高値であった。

B 細胞：細胞数は KD 急性期に高値であるが、早期活性化マーカーである CD69<sup>+</sup>では有意差は認めなかった。その他のサブクラスの評価においても明らかな有意差は認めなかった。

T 細胞：細胞数は KD 急性期で FC と比べると低値であるが CD69<sup>+</sup>T 細胞は FC に比べて高値、HLA-DR<sup>+</sup>T 細胞では有意差はなかった。CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞の細胞数は各々 KD 急性期で少ない傾向にあるが、CD69<sup>+</sup>T 細胞の割合は優位に高値であった。Th サブセットに関しては Th1/Th2/Th17 では割合に関して FC との差はないものの、Th17 は KD 急性期で FC に比べ上昇傾向にあり CD69<sup>+</sup>Th17 が FC より有意に高値であり、KD の急性期から亜急性期にかけて HLA-DR<sup>+</sup>Th17 が有意に上昇していた。

Th サブセットのバランスは一様ではなく大きく 3 つのパターンが存在していた。

## 考察

既知の報告では classical mono/non-classical mono cell が KD 急性期で上昇することが知られている。KD は好中球、単球を主体とした血管炎であることが知られており、今回の結果はそれを裏付けるものと考えられる。

一方、B 細胞に関しては急性期における細胞数の上昇はあるもののそれ以外のサ



ブセットにおける有意差は認められず病態に与える影響に関しては不明な点が多い。KD は Th2 優位の病態と考えられており、児の IgE 値が高いことも指摘されており B 細胞との関連性を無視することはできない。そのため今後、クラススイッチの評価、B 細胞の増殖、分化に關与する BAFF/APRIL、濾胞性 T 細胞などの B 細胞に關与する因子との相互的な評価が必要と考える。

今回の結果で最も特徴的で興味深いのは T 細胞である。T 細胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 細胞は細胞数では FC に比べ低下傾向にはあるものの CD69<sup>+</sup>T 細胞は優位に上昇している事より少なくとも KD の炎症早期での活性化をしていることが示唆された。

また、Th サブセットの分布において特徴的だったのは Th17 である。Th17 は IL-6 などの炎症性サイトカインにより誘導される細胞であり、IL-17 などの炎症性サイトカインを産生し好中球、単球の炎症部位への誘導を引き起こし好中球優位の強力な炎症を起こすことが知られている。既知の報告では KD の急性期において Th17 が上昇することが知られており、IL-6 そして IL-17 といったサイトカインが上昇することも報告されている。今回の解析では Th17 の活性化マーカーの推移が非常に重要と考えている。早期活性化マーカーである CD69<sup>+</sup>Th17 が急性期に上昇し、晩期活性化マーカーである HLA-DR<sup>+</sup>Th17 が亜急性期に上昇するという活性化マーカーの推移からも明らかに Th17 が時系列的にも活性化しており、その病態における関与が示唆される。しかし、Th17 の異常をきたす高 IgE 症候群の症例でも KD を発症したという報告がある事より Th17 の関与は絶対条件ではない可能性がある。

また、今までは Th1/Th2 のバランスに関しては IL-4 産生 Th2 が多く IFN- $\gamma$  産生 Th1 が少ないという報告より Th2 優位の病態として考えられていたが、今回の検討ではそのような様な分布ではないことがわかった。その分布には大きく 3 タイプあるが、その immune-phenotype と臨床症状、検査データとの関連性に関して現在更なる解析を行っているところである。

#### 結語

KD は 1 つの病態として考えられるものではなくいくつかの immune-phenotype が存在することが示唆された。また、その炎症病態の 1 つに Th17 の関与が強く関わっていることが示唆された。

## 研究 2

# 「The clinical utility and safety of a strategy for the treatment of refractory Kawasaki disease」

(難治川崎病に対する治療指針の臨床的有効性と安全性の検討)

氏 名 江波戸 孝輔

### 研究目的

現在、川崎病 (KD) 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 (CAA) 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 25% 存在し、様々な追加治療が検討されている。IVIG 不応例は CAA のリスクファクターであることから IVIG 不応の KD 症例に対しては初期治療の強化療法また、追加治療が必要とされる。

2000 年以降に Egami score、Kobayashi score、Sano score などの IVIG 不応予測スコアが開発されるようになり、不応予測例に対して初回治療の IVIG にステロイド治療を併用する強化療法が行われるようになった。当院では過去に Egami score を使用し難治 KD 症例に対して IVIG にステロイドパルス療法 (IVMP) を併用 (IVIG+IVMP) する初回治療に対する強化療法の有効性を報告した。そして当院では難治 KD 症例に対する追加治療も含めた統一プロトコールを用いて 2007 年から急性

期治療をおこなっている。

そこで今回当院で行なっている Egami score 3 点以上の難治川 KD 症例に対する IVIG+IVMP 併用療法の有効性と安全性、及び統一プロトコールによる治療戦略の有効性について検討した。

## 研究方法

2007 年 4 月から 2016 年 4 月の間に当院に KD として入院加療をされた 365 例のうち、Egami score 3 点以上の難治 KD 症例 71 例を対象とした。

各治療による有害事象の有無、診断時、治療後 1 カ月、治療後 1 年時の冠動脈障害の有無について検討した。

冠動脈障害の評価：American Heart Association(AHA)、厚生労働省が定めた双方の基準を参考に評価をした。

AHA:Z-score<2.5：正常、Z-score  $2.5 \leq <5$ ：拡張、Z-score  $\geq 5$ ：瘤

厚生労働省：冠動脈径が 4mm 以上は瘤、8mm 以上は巨大冠動脈瘤

治療プロトコール：1<sup>st</sup> therapy は IVIG+IVMP、2<sup>nd</sup> therapy は IVIG、3<sup>rd</sup> therapy は BCG 接種から 6 ヶ月未満の場合は血漿交換療法(PE)、6 ヶ月以上経過している場合はインフリキシマブ (IFX) を行い、IFX 不応例に対しては 4th therapy として PE を行う。全例診断時からアスピリン (30mg/kg/day) の内服を行う。

診断基準：日本川崎病研究センターによる「診断の手引き」を使用。

治療不応の定義：治療終了後 36 時間の時点で発熱を有する症例とした。

## 研究結果

1<sup>st</sup> therapy では 71 例中 58 例 (81.6%) が治療に反応しており、2<sup>nd</sup> therapy では 13 例中 9 例 (69.2%) が反応していた。3<sup>rd</sup> therapy では 3 例が IFX、1 例が PE を行った。4<sup>th</sup> therapy は 1 例が IFX 不応例であり PE を行い反応している。

冠動脈障害は診断時に Z-score が 2.5 以上 5 未満の症例が 18 例いたが、治療終了 1 ヶ月後では 13 例、治療終了 1 年後では 6 例と低下しており、いずれの時期においても Z-score 5 以上をきたす CAA の症例は 1 人もいなかった。また、厚生労働省が定めた基準を満たす CAA の症例は 1 人もいなかった。

治療における有害事象では IVMP における急性期の副作用（徐脈、高血圧、低体温）を認めたが、いずれも一過性で 24 時間以内に自然に消退した。IFX、PE における有害事象は認めなかった。

## 考察

### 1：有害事象

IVIG+IVMP での急性期の有害事象を認めていたが、いずれの症例も一過性であり 24 時間以内に自然に改善している。IFX、PE に対してもあきらかな有害事象はなく投与、

管理ができていることがわかった。以上より当院での難治 KD における統一プロトコールの安全性が示された。

## 2：統一プロトコールの有効性

IVIG 単独療法では 20-25%程度が不応例であることが知られている。今回 IVIG 不応が予測された症例に対して初回治療として IVIG+IVMP を行なった結果として約 80%の児が有効であった。また、2<sup>nd</sup> therapy までの有効性で判断すると約 9 割の児に効果があることが示された。以前に我々が報告した以上の症例数での再評価であったが初回治療の強化療法としての IVIG+IVMP の有効性を再度確認することができた。

KD の治療自体は初回治療で完結するのではなく的確に不応例を判断し、的確な時期に追加治療を投与する統一されたプロトコールが有効であることが示された。

## 3：冠動脈病変について

今回の研究では診断時、治療後 1 ヶ月、治療後 1 年と遠隔期に渡り冠動脈病変の評価を行なっているが、いずれの時期にも CAA の児はおらず、また、診断時に 18 例いた拡張症例も徐々に退縮傾向になっており冠動脈病変に関しても当院の治療戦略の有効性を示す結果と考えられる。

## 結語

Egami score3 点以上の難治 KD 症例に対する当院での治療戦略の有効性と安全性が示された。