
総 説

iPS細胞技術を用いた川崎病血管炎の病態解明

池田 和幸*, 細井 創

京都府立医科大学大学院医学研究科小児科学

Analysis of the Pathophysiological Mechanisms of Kawasaki Disease Vasculitis Using Induced Pluripotent Stem Cell Technology

Kazuyuki Ikeda and Hajime Hosoi

Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine
Graduate School of Medical Science

抄 録

川崎病は主に乳幼児に好発する原因不明の急性熱性疾患であり、無治療の場合には約25%の割合で冠動脈病変を合併する。およそ10~20%の割合でガンマグロブリン静注療法(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。川崎病の血管炎のメカニズムを解明するうえで、ヒト冠動脈内皮細胞あるいはヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた*in vitro*の研究が主であるが、我々はiPS細胞由来血管内皮細胞を用いた研究を行った。川崎病患者IVIG不応例2例およびIVIG反応例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細胞を樹立し血管内皮細胞(ECs)への分化誘導を行った。IVIG不応およびIVIG反応川崎病患者から誘導したiPS細胞由来ECs(iPSC-ECs)の遺伝子発現プロファイルを、RNA-sequencing(RNA-seq)解析を用いて比較検討を行ったところ、IVIG不応川崎病患者由来のiPSC-ECsにおいて、CXCL12の発現が著明に増加していた。さらに、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)では、IL-6関連遺伝子群がIVIG不応川崎病患者由来のiPSC-ECsにおいて高発現であった。IVIGに対して治療抵抗性の重症川崎病症例では、単球、マクロファージを含む多くの白血球が血管壁へ浸潤し、冠動脈壁を完全に破壊する。CXCL12は白血球の動員、接着や血管内皮細胞を介した遊走にかかわっていることから、本研究結果からは、川崎病におけるIVIG不応や重症度を解明する上でCXCL12がkey moleculeであることが示唆された。今後は、今回発見したCXCL12について、*in vitro*と*in vivo*の実験系、臨床検体を用いることにより、IVIG不応川崎病における治療標的分子としての検証を行っていく予定である。

キーワード：川崎病、ガンマグロブリン不応、iPS細胞、血管内皮細胞。

平成30年12月5日受付 平成31年1月29日受理

*連絡先 池田和幸 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上路梶井町465番地

ikedata@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.128.03.171

Abstract

Kawasaki disease (KD) is an acute febrile disorder, predominantly occurring in infants and young children. KD is characterized by systemic vasculitis, with involvement of the coronary arteries in approximately 25% of untreated KD patients. Coronary artery abnormalities, including aneurysm and myocardial infarction are highly correlated with the prognosis of KD patients. Resistance to intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment, which is observed in 10-20% of all KD patients, is a particularly high-risk factor for coronary artery abnormalities. However, the pathophysiology underlying KD and its resistance to IVIG treatment remains largely unknown. Here, we have briefly reviewed our original study on the mechanisms of IVIG resistance in KD, using a disease model of induced pluripotent stem cells (iPSCs), rather than human coronary artery endothelial cells or human umbilical vein endothelial cells. Dermal fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells from IVIG-resistant and IVIG-responsive patients were successfully reprogrammed to iPSCs by the transduction of the reprogramming factors using an episomal expression vector. Endothelial cells were then differentiated from KD patient-derived iPSCs and RNA sequencing analyses were performed to compare gene expression profiles between IVIG-resistant and IVIG-responsive patients. We found that *CXCL12* expression was critical for IVIG-resistance in KD patients. Importantly, Gene Set Enrichment Analysis also suggested that interleukin (IL)-6 signaling was involved in IVIG-resistance. The involvement of *CXCL12* and IL-6 signaling is consistent with the behavior of inflammatory cells in severe cases of IVIG resistance in KD patients, where numerous leukocytes, including monocytes and macrophages, infiltrate the vascular wall to damage the coronary arteries. Further studies are required to validate *CXCL12* and/or IL-6 signaling as therapeutic targets for IVIG resistance in KD.

Key Words: Kawasaki disease, Intravenous immunoglobulin resistance, Induced pluripotent stem cell (iPSC), Endothelial cells.

はじめに

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。世界中の60以上の国・地域から報告されているが、わが国ほど高い罹患率を示す国・地域は他にない。無治療の場合、約25%の割合で冠動脈病変 (coronary artery lesion: CAL) を合併するが、ガンマグロブリン超大量静注療法 (IVIG) によりCAL合併頻度は3~10%へ減少した。一方、10~20%の割合でIVIGにより解熱しないIVIG不応例が存在し、CALを高率に合併する。そのため、川崎病血管炎やIVIG不応のメカニズムを解明することは、川崎病の治療戦略において喫緊の課題である。

川崎病の病因について

川崎病の原因はいまだ不明であるが、病因と

しては感染要因や遺伝的要因の関与が示唆されている。その発症に流行や季節性があることから、病原性微生物の関与が疑われているが、再現性のある解析結果は得られていない。一方、ヨーロッパ諸国に比較して日本での罹患率が10~20倍と非常に高いこと、同胞例、日本人 (日系人) での発生頻度が高いことから、遺伝的要因の関与が示唆されている。全ゲノムから疾患感受性遺伝子を探索するゲノムワイドアプローチやゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study, GWAS) により、川崎病罹患感受性遺伝子として *ITPKC*, *CASP3*, *B lymphoid tyrosine kinase (BLK)*, *human leukocyte antigen (HLA)*, *CD40*, *FCGR2A* が報告された¹⁾²⁾。近年報告されたこれらの罹患感受性遺伝子は川崎病との関連が確かなものではあるものの、川崎病の病因解明には繋がっておらず、さらなる解析が必要である。

川崎病の病態について

川崎病急性期の病態は、免疫系の過剰な活性化を特徴とし、炎症性サイトカインおよびケモカインの上昇を伴う。これまでに、IL-6, IL-8, TNF- α をはじめとした炎症性サイトカイン、ケモカインが川崎病急性期の末梢血中で上昇していることが報告されてきた。

池田らは、急性期川崎病患者末梢血単核球 (PBMNC) を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、上位10遺伝子のなかに *NAIP*, *IPAF*, *S100A9*, *FCGR1A*, *granulysin* (*GCA*) などの自然免疫関連分子の発現上昇が認められた³⁾。pathway解析でも、自然免疫系に関連のあるTLRシグナル経路やNK細胞関連細胞傷害性経路が一部up-regulateされており、自然免疫関連分子が川崎病急性期病態に深く関与していることが示唆された。さらに、自然免疫受容体ligand (合成Nod1 ligand) の投与により川崎病類似冠動脈炎マウスモデルが新規に開発された⁴⁾。現在、自然免疫系を賦活化させるDamage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) の川崎病患者検体からの検出を目指して、生化学的手法による病因究明が進められている。

血管内皮細胞を用いた病態研究

川崎病の血管炎のメカニズムを解明するうえで、ヒト冠動脈内皮細胞 (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) あるいはヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) を用いた *in vitro* の研究が主であるが、最近になり、iPS細胞由来血管内皮細胞を用いた川崎病の病態研究を我々の研究室が世界で初めて行った⁵⁾。

1. HCAECやHUVECを用いた川崎病の病態研究

急性期川崎病患者PBMNCを用いたマイクロアレイ解析から、自然免疫関連分子が急性期川崎病の病態に深く関与していることが判明した³⁾。そこで、自然免疫受容体ligandによりHCAECを刺激したところ、ICAM-1の発現が有

意に上昇しIL-8の産生が著明に亢進した⁴⁾。また、川崎病患者血清によりHCAECを刺激した場合にも、IL-8産生が有意に亢進した⁶⁾。さらに、自然免疫受容体Nod1の合成ligandであるFK565の皮下投与により新たな血管炎マウスモデルが確立された⁴⁾。

上野らは、川崎病患者血清を用いてHUVECを刺激することにより、細胞障害性やhigh mobility group box protein 1 (HMGB-1, 細胞壊死に関連)、caspase-3/7 (アポトーシスに関連)の発現が著明に増加し、リン酸化Akt/Akt比 (内皮細胞の恒常性維持に関与) が減少することを示した⁷⁾。刺激したHUVECに免疫グロブリン (IG) を投与したところ、細胞障害性、HMGB-1やcaspase-3/7の発現が著明に減少し、pAkt/Akt比が増加した⁷⁾。さらに、CAL合併川崎病患者血清によりHUVECを刺激した場合、IG投与後、細胞障害性レベルが高値であり、pAkt/Akt比の増加が抑制されていた⁷⁾。IG治療による細胞保護作用が血管内皮細胞の恒常性を改善させることが示唆されている。

2. iPS細胞を用いた川崎病の病態解明

ヨーロッパ諸国に比較して日本での川崎病の罹患率が10~20倍と非常に高い疫学的な特徴から、川崎病の発症には宿主側の要因も関与していることが示唆されている。IVIG不応予測スコアにより初期治療を層別化した研究でも、治療前の遺伝子発現プロファイリングにおいて多様性を認めており⁸⁾、宿主側の要因の関与が示唆された。患者体細胞より発症に関与する遺伝情報を有する川崎病血管炎モデルを作製することで、宿主側の要因の観点からも、IVIG不応のメカニズムの解明が可能になると考えられる。

1) 川崎病患者由来iPS細胞の作製と血管内皮細胞への誘導

IVIG不応川崎病患者2例、IVIG反応川崎病患者2例を解析対象とし、患者由来皮膚線維芽細胞もしくは末梢血T細胞にエピソーム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 (Figure 1A)。作成した川崎病患者由来iPS細胞 (KD-iPSCs) は、形態がヒトES細胞に類似しており、OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-

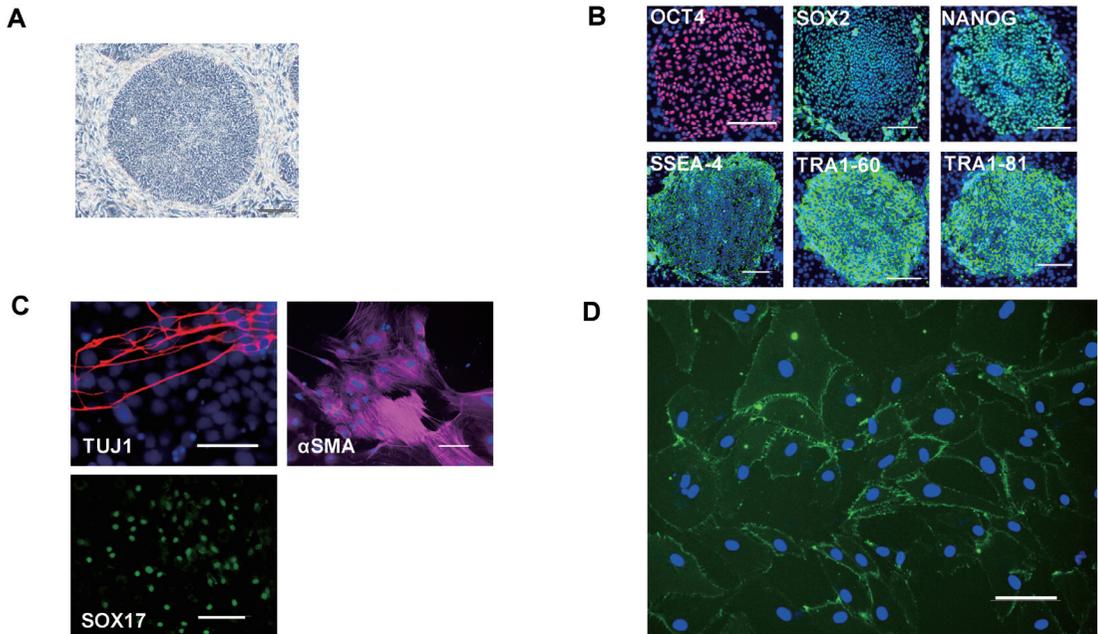


Figure 1 川崎病患者由来iPS細胞 (KD-iPSCs) の樹立と血管内皮細胞 (ECs) への誘導

A) 川崎病患者由来iPS細胞のコロニーは典型的なヒトES細胞の形態を示した。

B) KD-iPSCsにおける未分化マーカーの免疫染色 (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81)。

C) KD-iPSCsから誘導した胚様体の免疫染色。TUJ-1, alpha SMA, SOX17はそれぞれ外胚葉, 中胚葉, 内胚葉のマーカー。青色: hoechst33342による核染色。緑色: 血管内皮細胞, スケールバー, 100 μm

D) KD-iPSCsから分化誘導したECsのCD31を用いた免疫染色。青色: hoechst33342による核染色。緑色: 血管内皮細胞, スケールバー, 100 μm 。

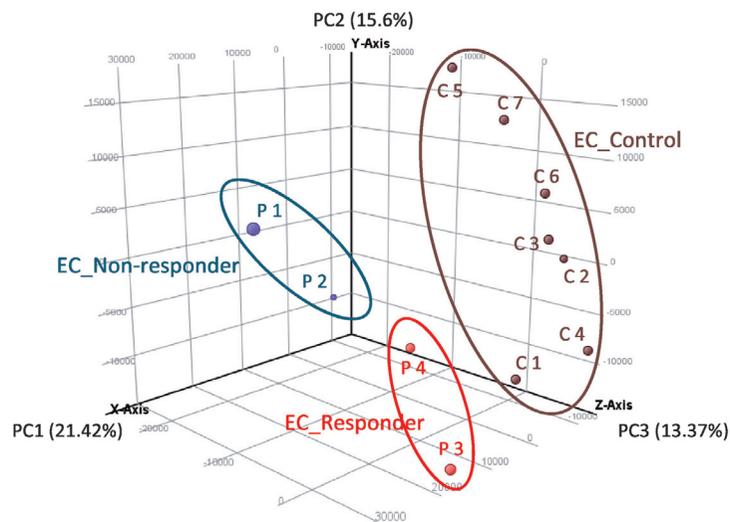


Figure 2 川崎病患者iPS細胞 (KD-iPSCs) から誘導した血管内皮細胞 (ECs) を用いた主成分分析 (Principle component analysis, PCA)

P1, P2 (青色) IVIG 不応川崎病群, P3, P4 (赤色) IVIG 反応川崎病群, C1~C7 (茶色) 健常対照群の各iPSC-ECsのRNA-seqデータを用いて得られたPCAプロット。

4, TRA1-60, TRA1-81などの未分化マーカーを発現していた (Figure 1B). また, KD-iPSCsは, 三胚葉への分化能を示し, 多分化能を有することを確認した (Figure 1C). さらに, KD-iPSCsを血管内皮細胞へ誘導した (Figure 1D)⁵⁾.

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, 「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の承認を得て行った. また, 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.

2) 主成分分析 (Principal component analysis: PCA) を用いたIVIG不応およびIVIG反応川崎病患者iPS細胞由来血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルの比較

主成分分析とは, 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である. IVIG不応川崎病群, IVIG反応川崎病群, 健常対

照群の各iPS細胞由来血管内皮細胞 (iPSC-ECs) を用いてRNA-sequencing (RNA-seq) 解析を行ったところ, 3群とも独立した遺伝子発現分布を示した (Figure 2)⁵⁾.

3) 川崎病IVIG不応に関連した病態関連候補分子としてのCXCL12

IVIG不応川崎病群, IVIG反応川崎病群, 健常対照群の各iPSC-ECsの特徴を解析する目的で, RNA-seqデータを用いてgene ontology (GO) 解析を行った. IVIG不応川崎病群とIVIG反応川崎病群の比較 (Table 1), およびIVIG不応川崎病群と健常対照群の比較解析において (data not shown), CXCL12が有意な発現変動遺伝子として抽出された⁵⁾.

4) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いたIVIG不応川崎病の病態関連遺伝子セットの抽出

GSEAとは, 今回行ったRNA-sequencing解析の結果に最も近い, 過去のマイクロアレイデータ (あるいはRNA-sequencingデータ) をデータベースから探し出す解析方法である. IVIG不応川崎病群, IVIG反応川崎病群, 健常対照群の各

Table 1 GO analysis of iPSC-ECs derived from 2 IVIG-resistant KD patients and from 2 IVIG-responsive KD patients

Term	Count	%	Genes	P Value
cell adhesion	10	12.5	LAMA2, VWF, EMCN, NLGN4Y, CD34, COL15A1, ROBO2, CXCL12 CYR61, SPON1	0.001255
biological adhesion	10	12.5	LAMA2, VWF, EMCN, NLGN4Y, CD34, COL15A1, ROBO2, CXCL12 CYR61, SPON1	0.001268
angiogenesis	5	6.25	EMCN, MEOX2, COL15A1, CXCL12, CYR61	0.002478
blood vessel morphogenesis	5	6.25	EMCN, MEOX2, COL15A1, CXCL12, CYR61	0.008681
regulation of organelle organization	5	6.25	HOXA13, DLGAP5, TMSB4Y, CXCL12, SYNPO	0.009557
chromosome organization	7	8.75	CDCA8, UTY, DLGAP5, HMG2, TSPYL5, TOP2A, KDM5D	0.010374
blood vessel development	5	6.25	EMCN, MEOX2, COL15A1, CXCL12, CYR61	0.014405
vasculature development	5	6.25	EMCN, MEOX2, COL15A1, CXCL12, CYR61	0.015614
branching morphogenesis of a tube	3	3.75	PBX1, CXCL12, CYR61	0.025836
positive regulation of cellular component organization	4	5	HOXA13, DLGAP5, ROBO2, SYNPO	0.032264
morphogenesis of a branching structure	3	3.75	PBX1, CXCL12, CYR61	0.032826
positive regulation of organelle organization	3	3.75	HOXA13, DLGAP5, SYNPO	0.040467

IVIG, intravenous immunoglobulin; KD, Kawasaki disease; iPSC-ECs, endothelial cells differentiated from induced pluripotent stem cell.

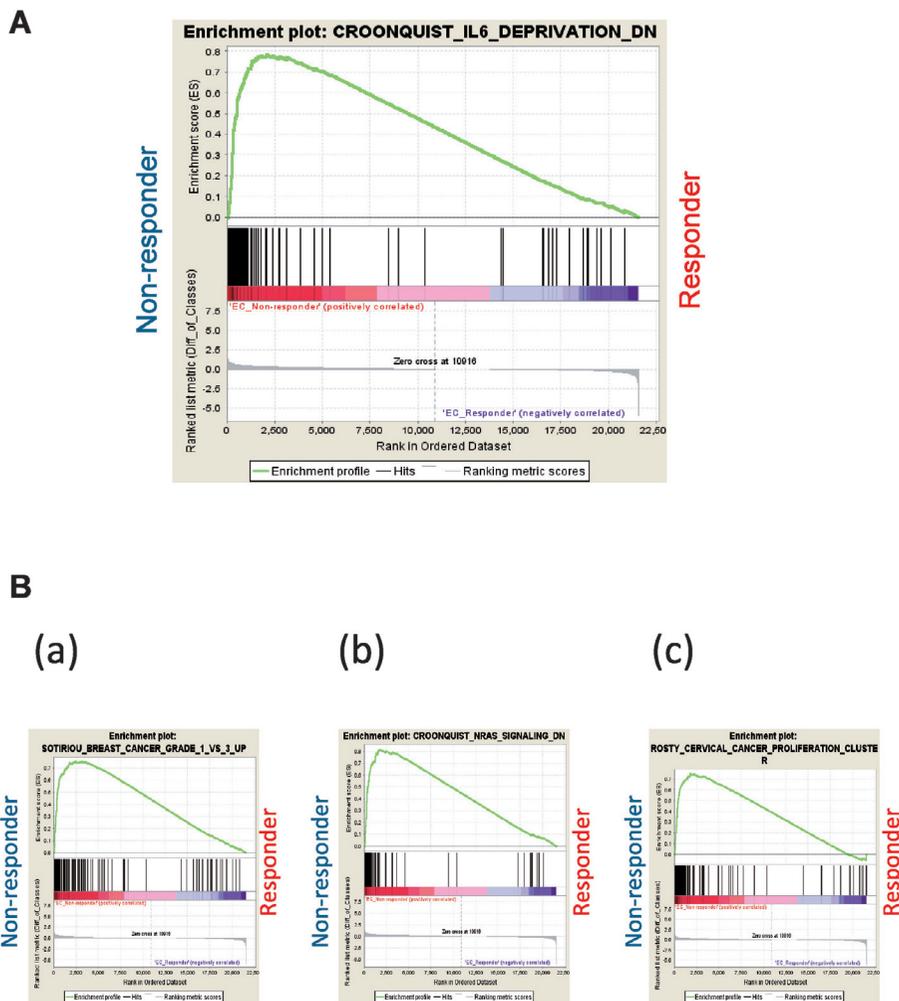


Figure 3 川崎病患者由来 iPSC 細胞 (KD-iPSCs) から分化誘導した血管内皮細胞 (ECs) を用いた Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

- (A) IVIG 不応川崎病群, IVIG 反応川崎病群の各 iPSC-ECs の RNA-seq データを用いた GSEA. より多くの黒線がパネルの左側に観察されるが, IVIG 反応川崎病群に比較して IVIG 不応川崎病群において IL-6 関連遺伝子群が高発現であることを示している.
- (B) (a) 乳癌関連遺伝子群, (b) NRAS (RAS oncogene ファミリーの一つ) 関連遺伝子群, (c) 子宮頸癌関連遺伝子群の発現が, IVIG 不応川崎病群において高発現であった.

iPSC-ECs の RNA-seq データを用いて GSEA を行ったところ, IVIG 不応川崎病群において, IL-6 関連遺伝子群の発現が有意に上昇した⁵⁾ (Figure 3A).

今回行った解析では, 乳癌, NRAS (RAS oncogene ファミリーの一つ), 子宮頸癌に関連した

遺伝子群の発現が上昇していた (Figure 3B).

5) CXCL12 と IVIG 不応川崎病の関連

CXCL12 は血管内皮細胞を含めた様々な細胞に発現しており, リンパ球, 単球, 樹状細胞, 造血幹細胞に対して強力な化学誘引物質として作用する^{9,11)}. さらに CXCL12 は, 免疫反応や炎

症反応の際に、その受容体である CXCR4 と共同して、白血球の動員や内皮細胞を介した白血球の遊走において中心的な役割を果たす¹¹⁾。血流を模倣したフローチャンバーモデルを用いた実験において、CXCL12を含めた4種のケモカインが、T細胞の ICAM-1 への接着を誘導し、1秒以内にT細胞の rolling を静止させた¹²⁾。また CXCL12 は、炎症や自己免疫応答にも影響を及ぼすと考えられている。SCID マウスモデルにおいて、CXCL12 は関節リウマチ患者由来移植滑膜へのヒト単球系細胞株 (U937) の遊走を誘導し、その作用が TNF- α 刺激よりも優れていることが示されている¹³⁾。さらに CXCL12 は、炎症細胞の動員においても部分的な役割を果たしていることが示唆されている¹⁴⁾¹⁵⁾。中枢神経系において、慢性期の多発性硬化症症例の微小血管内皮細胞や星状膠細胞に CXCL12 の発現が確認されている¹⁴⁾。また、CXCL12 の濃度勾配依存性に、TNF α や IFN- γ により事前に処理されたヒト脳微小血管内皮細胞 (HBMECs) への T リンパ球の接着が促進され、単層の HBMECs を介した T リンパ球の遊走も促進されている⁹⁾。これらの知見から、中枢神経の炎症病態において、血液脳関門を介したリンパ球の動員において CXCL12 が重要な役割を果たしていることが示唆される。

IVIG 不応の重症川崎病症例では、単球やマクロファージを含む多くの白血球が血管壁へ浸潤し、冠動脈壁を全層性に破壊する¹⁶⁾。炎症細胞の動員、接着、遊走における CXCL12 の役割を考慮すると、川崎病患者における IVIG 不応や血管炎の重症度において CXCL12 が key molecule であることが示唆される⁹⁾¹¹⁾。

しかしながら、CXCL12 がどのように IVIG 不応に関わるのかに関しては、現在のところ不明であり、今後の検討を要する。

6) IL-6 と IVIG 不応川崎病の関連

今回我々が行った GSEA 解析では、IL-6 関連遺伝子群が、IVIG 反応川崎病患者に比較して、IVIG 不応川崎病患者由来 iPSC-ECs において高発現であった⁵⁾。過去の報告では、IVIG 不応の川崎病急性期患者において、血清 IL-6 値の上昇が

示されている¹⁷⁾。また他の報告では、IVIG 反応川崎病に比較して、IVIG 不応川崎病患者において血清 IL-6 値が著明に高値であった¹⁸⁾。さらに、川崎病急性期における IVIG 治療への反応性は、血清 IL-6 値、CRP、好中球数に依存しているという報告もある¹⁹⁾。本研究は、川崎病患者、特に IVIG 不応川崎病患者由来の iPSC-ECs を用いて RNA-seq 解析を行った初めての報告である⁵⁾。過去の報告と同様に、我々の研究結果からは、IL-6 が川崎病患者における IVIG 反応性に関与していることが示唆された。しかしながら、CXCL12 と同様に、IVIG 不応にどのように関わるのかに関しては明らかではなく、今後の研究に期待したい。

7) 今後の研究の発展性

我々の研究では、CXCL12 と IL-6 が川崎病患者における IVIG 抵抗性に密接に関連していることが示された⁵⁾。今回得られた知見、ならびにこれまでの報告から血管炎進展のメカニズムについて以下のような病態仮説が考えられる²⁰⁾。ある agent が白血球を刺激して、活性化した白血球が IL-6 を含んだサイトカインを分泌し²¹⁻²³⁾、IL-6 が損傷組織において炎症を惹起し²⁴⁾、血管内皮細胞による CXCL12 の発現を促進する可能性がある²⁵⁾²⁶⁾。CXCL12 は白血球の動員および内皮細胞を介した遊走における中心的な役割を果たしている¹¹⁾。血管壁へ浸潤した炎症細胞が炎症性サイトカインや matrix metalloproteinase を分泌し、冠動脈壁が破壊される²⁰⁾。

一方、ヒトに投与される IVIG は CXCL12 や IL-6 に対する抗体を含有していることから²⁷⁾、IVIG 不応患者においては、活性化した CXCL12 や IL-6 を完全に阻害するには免疫グロブリンが不十分であることが推測される。この観点からは、CXCL12 や IL-6 の特異的阻害剤が IVIG 不応川崎病患者に有効である可能性が示唆される。

CXCL12/CXCR4 シグナル伝達経路のアンタゴニストである AMD3100 (plerixafor) は、CaCl₂ 誘導腹部大動脈瘤 (AAA) マウスモデルにおいて、大動脈壁破壊や腹部大動脈瘤形成を抑制した²⁸⁾。AMD3100 は FDA により既に承認されており、がん患者の移植において幹細胞の動員目

的で使用されている²⁹⁾。

そのため、1st lineのIVIG治療に対して不応の川崎病患者に対して、CXCL12のアンタゴニストが有効である可能性が示唆される。まずは*in vivo*での検証が必要であり、研究の準備を行っている。

一方、抗ヒトIL-6受容体モノクローナル抗体であるトシリズマブは、日本で開発され、全身型JIA患者に投与されている³⁰⁾。全身型JIAと川崎病は臨床症状や検査所見が類似する部分があり³¹⁾、IL-6の上昇もs-JIAの病態に密接に関連している³²⁾。これまでにトシリズマブを川崎病患者に投与した報告はないため、IVIG不応川崎病に対する抗ヒトIL-6受容体モノクローナル抗体の導入は意義があると考えられる。

従来は、HCAECやHUVECを用いた川崎病の研究が主流であった。しかしながら、これらの培養細胞は川崎病患者の特質を有してはおらず、川崎病の本態が全身性の血管炎であったとしても炎症を生じる血管にある程度の特異性が認められることを考慮すると、そのような研究手法は必ずしも適切とは言えない。本研究では、患者の持つ特質を有するはずのiPSCs-ECsを用いた初めての川崎病の病理病態研究であるため、私たちの独自の研究で得られた知見は、川崎病の病理病態に密接に関係する可能性は極めて高いと示唆される。しかしながら、患者由来のiPSCs-ECsを用いた研究にも限界がある。ここで得られたiPS-ECsは静脈性の内皮細胞と動脈性の内皮細胞が理論的には混在していることになるが、川崎病患者で炎症を起こし、かつ予後の上でも重要なのは冠動脈であることを考えると、冠動脈の内皮細胞を解析できることが望ましいと考えられるからである。iPS細胞から動脈性の内皮細胞を分化させた報告は散見されるが、残念ながら広く用いられている分化誘導プロトコルはまだない上、冠動脈の内皮細胞を得るための方法論は全く確立されていない。今後、iPS細胞からのより良い分化誘導方法が開発され

ることで、さらに精度の良い疾患特異的な研究が展開できるようになることを期待したい。

8) iPS細胞研究のまとめ

川崎病患者由来iPSC-ECsを用いてRNA-seq解析を行うことにより、IVIG不応の病態や川崎病の重症度に密接に関与する病態関連分子であるCXCL12を発見した。CXCL12は炎症時の血管壁における白血球の遊走に密接にかかわっていることが報告されており¹¹⁾、また重症川崎病症例ではより多くの単球、マクロファージが血管壁へ浸潤することからも¹⁶⁾、CXCL12がこれらの病態におけるkey moleculeであることが示唆された。

さらに、血清IL-6値の上昇はIVIG不応川崎病急性期患者における現象として既に報告されており¹⁷⁾、川崎病患者iPSC-ECsを用いた本研究の解析結果からも、IL-6のIVIG不応の病態への関与が示唆された。

今後の展望

今回我々は、川崎病患者の皮膚組織あるいは末梢血からiPS細胞を樹立し、血管内皮細胞への誘導に成功した。さらに、誘導した血管内皮細胞を用いたRNA-seq解析により、CXCL12がIVIG不応の病態関連候補分子であることを発見した⁵⁾。今後は、患者体細胞から誘導した内皮細胞や単球を用いて新規の疾患モデルの構築を行い、共培養実験系により得られる新たな候補分子や今回発見したCXCL12について、*in vitro*と*in vivo*の実験系、臨床検体を用いることにより、IVIG不応川崎病における治療標的分子としての検証を行っていく予定である。

謝 辞

本論文を作成するにあたりご協力いただきました京都大学iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門長船健二教授に深謝申し上げます。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, Shimizu C, Terai M, Hamada H, Honda T, Suzuki H, Suenaga T, Takeuchi T, et al: A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease. *Nat Genet* 2012; 44: 517-521.
- 2) Onouchi Y, Suzuki Y, Suzuki H, Terai M, Yasukawa K, Hamada H, Suenaga T, Honda T, Honda A, Kobayashi H, et al: ITPKC and CASP3 polymorphisms and risks for IVIG unresponsiveness and coronary artery lesion formation in Kawasaki disease. *Pharmacogenomics J* 2013; 13: 52-59.
- 3) Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 246-255.
- 4) Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, Fujimoto Y, Fukase K, Sueishi K, Hara T: Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1093-1099.
- 5) Ikeda K, Mizoro Y, Ameku T, Nomiya Y, Mae SI, Matsui S, Kuchitsu Y, Suzuki C, Hamaoka-Okamoto A, Yahata T, Sone M, Okita K, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K: Transcriptional Analysis of Intravenous Immunoglobulin Resistance in Kawasaki Disease Using an Induced Pluripotent Stem Cell Disease Model. *Circ J* 2016; 81: 110-118.
- 6) 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: Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms. *PLoS One* 2014; 9: e113054.
- 7) Ueno K, Ninomiya Y, Hazeki D, Masuda K, Nomura Y, Kawano Y: Disruption of Endothelial Cell Homeostasis Plays a Key Role in the Early Pathogenesis of Coronary Artery Abnormalities in Kawasaki Disease. *Sci Rep* 2017; 7: 43719.
- 8) Ogata S, Ogihara Y, Nomoto K, Akiyama K, Nakahata Y, Sato K, Minoura K, Kokubo K, Kobayashi H, Ishii M: Clinical score and transcript abundance patterns identify Kawasaki disease patients who may benefit from addition of methylprednisolone. *Pediatr Res* 2009; 66: 577-584.
- 9) Liu KK, Dorovini-Zis K. Regulation of CXCL12 and CXCR4 expression by human brain endothelial cells and their role in CD4+ and CD8+ T cell adhesion and transendothelial migration. *J Neuroimmunol* 2009; 215: 49-64.
- 10) Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. *Blood* 2002; 99: 2703-2711.
- 11) Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 463-473.
- 12) Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279: 381-384.
- 13) Blades MC, Ingegnoli F, Wheller SK, Manzo A, Wahid S, Panayi GS, et al. Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) induces monocyte migration into human synovium transplanted onto SCID Mice. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 824-836.
- 14) Calderon TM, Eugenin EA, Lopez L, Kumar SS, Hesselgesser J, Raine CS, et al. A role for CXCL12 (SDF-1alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. *J Neuroimmunol* 2006; 177: 27-39.
- 15) Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisakk P, Ransohoff RM, et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006; 129: 200-211.
- 16) Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S, Wakayama M, Yokouchi Y. Neutrophilic involvement in the damage to coronary arteries in acute stage of Kawasaki disease. *Pediatr Int* 2005; 47: 305-310.
- 17) Wang Y, Wang W, Gong F, Fu S, Zhang Q, Hu J, et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin resistance and coronary artery lesions in relation to Th1/Th2 cytokine profiles in patients with Kawasaki disease. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 805-814.
- 18) Hamada H, Suzuki H, Abe J, Suzuki Y, Suenaga T, Takeuchi T, et al. Inflammatory cytokine profiles during

- Cyclosporin treatment for immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. *Cytokine* 2012; 60: 681-685.
- 19) Sato S, Kawashima H, Kashiwagi Y, Hoshika A. Inflammatory cytokines as predictors of resistance to intravenous immunoglobulin therapy in Kawasaki disease patients. *Int J Rheum Dis* 2013; 16: 168-172.
 - 20) Burns JC, Glode MP. Kawasaki syndrome. *Lancet* 2004; 364: 533-544.
 - 21) Ohta K, Seno A, Shintani N, Kato E, Yachie A, Seki H, et al. Increased levels of urinary interleukin-6 in Kawasaki disease. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 647-649.
 - 22) Asano T, Ogawa S. Expression of IL-8 in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 514-519.
 - 23) Furukawa S, Matsubara T, Yone K, Hirano Y, Okumura K, Yabuta K. Kawasaki disease differs from anaphylactoid purpura and measles with regard to tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 in serum. *Eur J Pediatr* 1992; 151: 44-47.
 - 24) Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2: S3.
 - 25) Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6: 315-325.
 - 26) Mendt M, Cardier JE. Stromal-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, are constitutively expressed by mouse liver sinusoidal endothelial cells: implications for the regulation of hematopoietic cell migration to the liver during extramedullary hematopoiesis. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 2142-2151.
 - 27) Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Trapnell BC, Nakata K. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: pathogenesis and mechanisms. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 263-273.
 - 28) Michineau S, Franck G, Wagner-Ballon O, Dai J, Allaire E, Gervais M. Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 blockade by AMD3100 inhibits experimental abdominal aortic aneurysm expansion through anti-inflammatory effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 1747-1755.
 - 29) DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, Bolwell BJ, Maziarz RT, Jacobsen E, et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4767-4773.
 - 30) Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 2008; 371: 998-1006.
 - 31) Dogra S, Gehlot A, Suri D, Rawat A, Kumar RM, Singh S. Incomplete Kawasaki disease followed by systemic onset juvenile idiopathic arthritis- the diagnostic dilemma. *Indian J Pediatr* 2013; 80: 783-785.
 - 32) De Benedetti F, Massa M, Robbioni P, Ravelli A, Burgio GR, Martini A. Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1158-1163.

著者プロフィール



池田 和幸 Kazuyuki Ikeda

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科小児科学・学内講師

略歴：1998年3月 九州大学医学部卒業

1998年5月 九州大学病院小児科

2008年3月 九州大学大学院医学研究院博士課程修了

2008年4月 九州大学小児科・特任助教

2009年4月 同・助教

2011年4月 同・診療講師

2012年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科発達循環病態学・学内講師

2017年4月～現職

専門分野：小児循環器・川崎病

- 主な業績：1. Kanaya Y, Ohga S, Ikeda K, Furuno K, Ohno T, Takada H, Kinukawa N, Hara T. Maturation alterations of peripheral T cell subsets and cytokine gene expression in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Exp Immunol*, **144**: 85-93, 2006.
2. Ikeda K, Ihara K, Yamaguchi K, Muneuchi J, Ohno T, Mizuno Y, Hara T. Genetic analysis of MMP gene polymorphisms in patients with Kawasaki disease. *Pediatr Res*, **63**: 182-185, 2008.
3. Furuno K, Ikeda K, Hamano S, Fukuyama K, Sonoda M, Hara T, Sasazuki T, Yamamoto K. Onecut transcription factor OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells. *Genes Immun*, **9**: 302-308, 2008.
4. Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K, Takada H, Kusuhara K, Hara T. Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease. *Hum Immunol*, **70**: 468-471, 2009.
5. Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T. Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*, **160**: 246-55, 2010.
6. Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, Fujimoto Y, Fukase K, Sueishi K, Hara T. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**: 1093-1099, 2011.
7. Onoyama S, Ihara K, Yamaguchi Y, Ikeda K, Yamaguchi K, Yamamura K, Hoshina T, Mizuno Y, Hara T. Genetic susceptibility to Kawasaki disease: analysis of pattern recognition receptor genes. *Hum Immunol*, **73**: 654-660, 2012.
8. Yahata T, Suzuki C, Yoshioka A, Hamaoka A, Ikeda K. Platelet activation dynamics evaluated using platelet-derived microparticles in Kawasaki disease. *Circ J*, **78**: 188-193, 2014.
9. Ikeda K, Mizoro Y, Ameku T, Nomiya Y, Mae SI, Matsui S, Kuchitsu Y, Suzuki C, Hamaoka-Okamoto A, Yahata T, Sone M, Okita K, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K. Transcriptional Analysis of Intravenous Immunoglobulin Resistance in Kawasaki Disease Using an Induced Pluripotent Stem Cell Disease Model. *Circ J*, **81**: 110-118, 2016.
10. Suzuki C, Nakamura A, Miura N, Fukai K, Ohno N, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Fujii M, Yoshioka A, Kuchitsu Y, Ikeda K, Hamaoka K. Non-receptor type, proline-rich protein tyrosine kinase 2 (Pyk2) is a possible therapeutic target for Kawasaki disease. *Clin Immunol*, **179**: 17-24, 2017.

