

厚生科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

分担研究報告書

川崎病のサーベイランスとその治療法に関する研究

転写因子 NF- $\kappa$ B の胴体と免疫グロブリン療法の効果

分担研究者 古川 漸 山口大学医学部小児科

研究協力者 松原知代、市川高志

研究主旨 川崎病（KD）末梢血中の CD3+T 細胞と CD14+単体/マクロファージ細胞において、多くの炎症に関わるサイトカインの転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化について検討した。ウェスタンブロット法とフローサイトメトリー法による解析で、急性期に CD14+細胞で強く、CD3+細胞で弱く NF- $\kappa$ B の活性化を認めた。免疫グロブリン療法により CD14+細胞の NF- $\kappa$ B 活性化率が有意に低下した。KD では転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化の主体は単球/マクロファージの細胞分画にあり、免疫グロブリン療法によりその活性化が抑制されることを明らかにした。

A. 研究目的

川崎病（KD）では、単球/マクロファージの活性化により、tumor necrosis factor- $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）をはじめとする多くの炎症性サイトカインが産生され、病態形成に深く関与していることが明らかになった。TNF- $\alpha$ 、インターロイキン1（IL-1）、IL-6などの炎症性サイトカイン、IL-8、monocyte chemoattractant protein-1などのケモカイン、E-selectin、vascular cell adhesion molecule-1、intercellular adhesion molecule-1などの接着分子の発現・産生に、転写因子 NF- $\kappa$ B が関連している。NF- $\kappa$ B は細胞質に不活性な状態で存在し、活性化を抑制する蛋白 I $\kappa$ B の分解消滅により、速やかに核内に移行し、特異的な DNA 配列に結合し活性化する。NF- $\kappa$ B の活性化によりサイトカイン遺伝子の転写が始まり、サイトカインの産生が行われる。本研究は KD における転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を免疫担当細胞別に解析することである。

B. 研究方法

対象は KD10 名（平均 1.9 歳）。方法はウェスタンブロット法とフローサイトメトリー法を用いた。

ウェスタンブロット法

KD 患児の末梢血から比重遠心法で単核球を分離し、Magnetic Cell Sorting により CD3 + T 細胞と CD14 + 単球/マクロファージ細胞を各々回収し、核内内容を抽出し、蛋白濃度を測定した。蛋白量を揃えたサンプルを電気泳動し、ゲル内の蛋白を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜を抗 NF- $\kappa$ B-p65 抗体と反応させ、発色反応後 X 線フィルムに暴露現像し、NF- $\kappa$ B 活性化を解析した。

フローサイトメトリー法

患児の末梢血を CD3、CD14 で PE 標識し、permeabilization buffer を添加した。マウス IgG3 抗 NF- $\kappa$ B 核局在シグナルモノクローナル抗体を反応させた後、FITC 標識抗マウス IgG3 抗体を加え、フローサイトメトリーで NF- $\kappa$ B 活性化を解析した。

統計学的解析

各群間の有意差の検定には Wilcoxon の符号順位検定を用いた。

C. 研究結果

ウェスタンブロット法の結果を図 1 に示す。CD3

+細胞、CD14+細胞とも急性期は回復期に比してNF-kBが活性化していた。またCD3+細胞に比し、CD14+細胞がより活性化していた。

フローサイトメトリー法の結果を図2に示す。ウェスタンブロット法の結果と同様に急性期ではCD3+細胞、CD14+細胞ともNF-kBの活性化がみられ、CD14+細胞でより強く活性化がみられた。免疫グロブリン療法(1g/kg×2日間)によりCD14+細胞のNF-kB活性化率は有意に低下した(p<0.05)(図3)。

#### D. 考察

KDの急性期に末梢血CD14+細胞内でNF-kBの活性化が強く見られたことから、急性期に上昇する多くのサイトカインの起源は単球/マクロファージが主要と考えた。KDにおける免疫グロブリン療法の有効性の機序の一つとしてCD14+細胞のNF-kB活性化抑制作用が示唆された。

#### E. 結論

KDでは急性期に末梢血CD3+T細胞、CD14+単球/マクロファージ細胞で転写因子NF-kB活性化がみられ、その主体は単球/マクロファージの細胞分画にあった。免疫グロブリン療法は単球/マクロファージのNF-kB活性化を低下させた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsubara T et al : Decreased interferon-gamma-producing T cells in patients with acute Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 116 : 554-557 , 1999.

2) Ichiyama T et al : -Melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kB activation and in experimental brain inflammation. Exp Neurol 157 : 359-365 , 1999.

##### 2. 学会発表

1) 片山久美子ほか : 川崎病末梢血のmonocyte/macrophage subpopulationについての検討. 第102回日本小児科学会学術集会.

2) 有賀史郎ほか : 川崎病における末梢血単球/マクロファージの免疫電顕による検討. 第102回日本小児科学会学術集会.

3) 市山高志ほか : 川崎病における末梢血細胞の転写因子NF-kB活性化の検討. 第19回日本川崎病研究会.

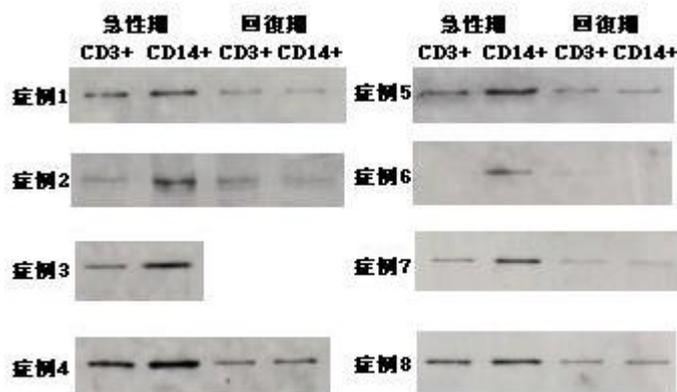


図1. 末梢血細胞のNF-kB活性化(ウェスタンブロット法)

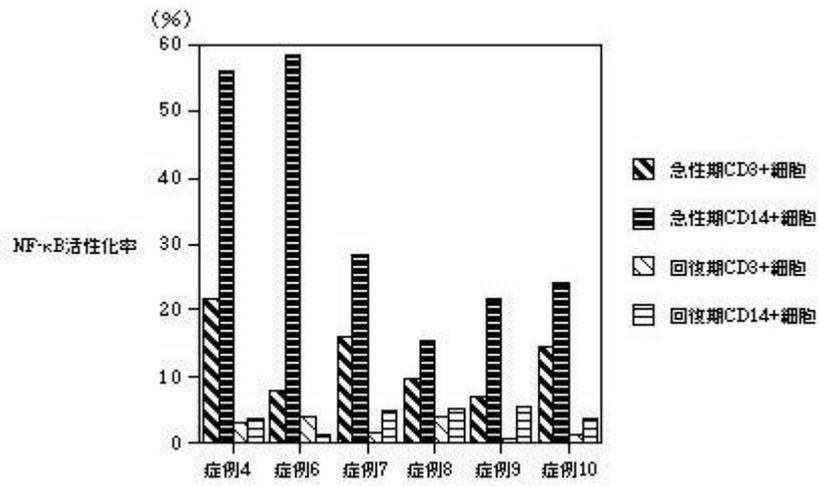


図2. フローサイトメトリー法によるNF-κB活性化率

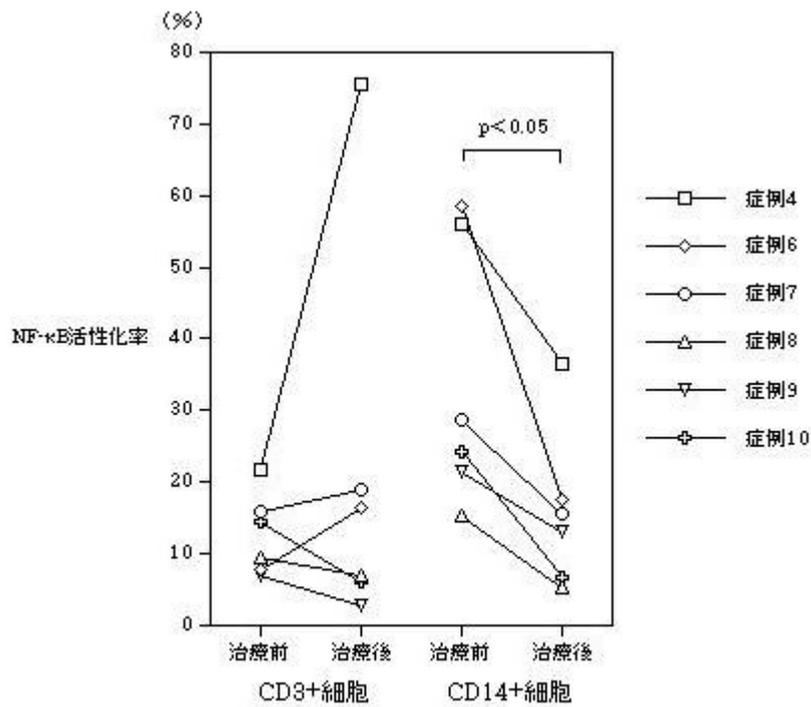


図3. NF-κB活性化に対する免疫グロブリン療法の影響