

## 論文の要旨

申請者 吉田裕輔

### 研究論文題目

川崎病の病態への好中球細胞外トラップの関与

#### 1 目的

川崎病 (Kawasaki disease : KD) において好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs) 形成が亢進しているかを解析し、KD 血管炎の病態における NETosis の関与を検討する。

#### 2 対象ならびに方法

KD 診断基準を満たした KD 群 : 37 例および、発熱および内服薬の無い健常児コントロール群 : 5 例を対象とした。

(1) KD 急性期群、KD 回復期群、健常児コントロール群の臨床データを統計学的に比較した。

(2) 末梢血から単離した好中球に、同日に採取した同症例の血清を加え、*in vitro* において 4 時間培養した。培養後、好中球の免疫蛍光染色を実施し、蛍光顕微鏡によって NETs の有無を観察した。

また、NETs 形成の定量的解析として下記 3 つを実施し、統計学的に比較した。

(3) 蛍光顕微鏡による NETs を認めた視野数のカウント。

(4) リアルタイム PCR による培養上清中の Cell-free DNA (cfDNA) の定量。

(5) ELISA 法による培養上清中の好中球エラスターゼ (Neutrophil elastase : NE) /DNA 複合体の定量。

#### 3 結果

(1) KD 急性期群では、KD 回復期群・健常児群と比較して白血球数・好中球数・CRP などの炎症反応が有意に高値であった。KD 回復期群と健常児群の比較では有意差は無く、KD 回復期の臨床データは十分改善していた。健常児群に炎症徴候は認めなかった。

(2) 顕鏡し得た KD 急性期群 : 20 例中 19 例に、細胞外に糸状に染色された DNA を認めた。また、Myeloperoxidase (MPO) ・NE が DNA と同様に糸状に染色された。Merge 画像においてそれらは完全に一致しており、NETs 形成と判断した。同様の構造部は KD 回復期群では 26 例中 9 例のみで認め、健常児コントロール群では全ての症例で認めなかった。

(3) KD を認めた視野数カウントの比較では、KD 急性期群 / 健常児群 (P=0.0002)、KD 急性期群 / KD 回復期群 (P=0.0029)、KD 急性期群 / 回復期

群の対応性のある2群間比較 ( $P < 0.0001$ ) において、KD 急性期群が有意に高値であった。KD 回復期群/健常児群の比較では、有意差を認めなかった ( $P = 0.2441$ )。

- (4) 培養上清中の cfDNA の定量では、KD 急性期/回復期の対応性のある2群間比較においてのみ KD 急性期が有意に高値だった ( $P = 0.0206$ )。KD 急性期群/健常児群 ( $P > 0.999$ )、KD 急性期群/KD 回復期群 ( $P = 0.0604$ )、KD 回復期群/健常児群 ( $P = 0.3736$ ) のいずれの比較でも有意差は認めなかった。
- (5) 培養上清中の NE/DNA 複合体の定量では、KD を認めた視野数カウントと同様に、KD 急性期群/健常児群 ( $P = 0.0282$ )、急性期群/KD 回復期群 ( $P = 0.0048$ )、KD 急性期/回復期の対応性のある2群間比較 ( $P = 0.0302$ ) において、KD 急性期群が有意に高値であった。KD 回復期群/健常児群 ( $P = 0.6248$ ) は有意差を認めなかった。

#### 4 考 察

KD の病態において NETs が関与するとした報告は国内外ともに無い。本研究により、KD 急性期の末梢血好中球は NETs 形成が亢進していることが判明した。また KD 回復期においても、臨床データは改善しているにもかかわらず、NETs 形成が亢進している症例を認めた。この状態がいつまで持続するかは今後の解析が必要である。

KD における血管炎の病態は未だ不明な点が多いが、これまでの報告から、なんらかの因子によって機能的に活性化された KD 急性期の好中球から分泌された NE などの抗菌タンパクによる血管内皮細胞障害が、KD 血管炎の病態や冠動脈病変形成に深く関与していることが示唆されている。NETs 形成は KD 血管炎の発症において、NE 放出を介して、あるいは、クロマチンに含まれる DNA やヒストンがもつ細胞障害性による直接的な血管内皮細胞への障害などによって関与している可能性が考えられる。したがって NETs の解析は、KD の原因究明や治療法の新規発見に貢献し、結果として KD 合併症の低減、ひいては KD 症例の予後改善に寄与する可能性がある。

#### 5 結 論

KD の末梢血好中球を *in vitro* にて培養し NETs 形成を観察した。NETs のカウント、培養上清中の cfDNA および NE/DNA 複合体の定量では、KD 急性期において NETosis が亢進していることが示唆された。KD における血管炎の病態には、NETs 形成が深く関与していると考えられた。