

表3 抗狭心薬、抗心不全薬、虚血発作治療薬

薬品名	投与量	副作用と注意点
抗狭心薬		
ニフェジピン (アダラート)	0.2-0.5 mg/kg/回、1日3回 (5と10 mg/カプセル) 成人量 30 mg/日、分3	低血圧、めまい、頭痛、 心機能低下時注意
ニフェジピン徐放剤 (アダラートCR、 アダラートL)	0.25-0.5 mg/kg/日、1-2回/日 (最大3 mg/kg/日) (CR 20 mg/錠、L 10と20 mg/錠) 成人量 40 mg/kg、分1(Lは分2)	同上
アムロジピン (ノルバスタ)	0.1-0.3 mg/kg/回、1日1-2回 (最大0.6 mg/kg/日)(2.5と5 mg/錠) 成人量 5 mg/日、分1	同上
ジルチアゼム (ヘルベッサール)	1.5-2 mg/kg/日、3回/日 (最大6 mg/日)(30 mg/錠) 成人量 90 mg/日、分3	同上
抗心不全薬		
メトプロロール (セロケン)	0.1-0.2 mg/kg/日、分3-4から開始、 1.0 mg/kg/日まで増量(40 mg/錠) 成人量 60-120 mg/日、分2-3	低血圧、心機能低下、 徐脈、低血糖、気管支 喘息
カルベジロール (アーチスト)	開始量 0.08 mg/kg/日、 平均維持量 0.46 mg/kg/日 成人量 1日10-20 mg/日、分1	同上
エナラプリル (レニベース)	0.08 mg/kg/回、1日1回 (2.5と5 mg/錠) 成人量 5-10 mg/日、分1	低血圧、紅斑、タンパ ク尿、咳嗽、高K血症、 過敏症、浮腫
シラザプリル (インヒベース)	0.02-0.06 mg/kg/日、分1-2(1 mg/錠) 成人量 0.5 mg/日、分1で開始、漸増	同上
虚血発作治療薬		
硝酸イソソルビド (ニトロール)	舌下 1/3-1/2 錠/回(5 mg/錠) 経口 0.5 mg/kg/日、分3-4 成人量 1-2 錠/回(舌下) フランドルテープ S 1/8-1枚 成人量 (40 mg/枚)1枚/回 徐放剤(ニトロールR、フランドル錠) 0.5-1 mg/kg/回 成人量 2 錠/日(20 mg/錠)	低血圧、頭痛、動悸、 めまい、紅潮
硝酸薬 NTG		
ニトログリセリン (ニトロペン)	舌下 1/3-1/2 錠/回(0.3 mg/錠) 成人量 1-2 錠/回	同上

(小児での安全性、有効性は確立されていないので成人量を参考とする。)

の判定にも有用である。

動脈バイパス手術が有用である。

2) 冠動脈バイパス術

a) グラフト開存率

内科的治療が無効で、PCIの適応がない症例には、有茎動脈(主として内胸動脈)を用いた冠

内胸動脈および右胃大網動脈を用いたグラフトの開存率は、近年では術後1-3年では91-

XV

川崎病の診断・治療の現状

98%と極めて良好である。12歳以上の術後20年での内胸動脈グラフト開存率は92.8%となっている。近年(1994-2006年)では12歳以下の症例でも術後10年の内胸動脈グラフト開存率は94.4%と大変良好である。

b) 術後の生活、問題点

術後には運動時の左室機能の改善が認められている。術後20年を経過し、生存率は98.4%、心イベントフリー生存率は78.1%と良好な結果を得ている。術後15年での全国データでは突然死回避率は内胸動脈バイパス術群で94.3%となっている。

c. 急性心筋梗塞に対する初期(内科的)治療

1) 治療の一般の方針

小児における急性心筋梗塞の治療方針は、成人の場合と同様に急性期死亡率の減少と長期予後の改善である。川崎病既往の小児例においてみられる急性心筋梗塞は冠動脈の血栓性閉塞に起因するため、成人と同様にできるだけ早期に再灌流に向けた血栓溶解療法あるいはPCIを開始することが、急性期治療として重要となる。

a) 再灌流療法

(1) 血栓溶解療法

川崎病に伴う急性心筋梗塞の多くが冠動脈瘤の血栓性閉塞に起因するものであることから、現状では血栓溶解療法の臨床的意義は高い。ACC/AHAガイドラインでは血栓溶解療法の適応は発症後12時間以内とされている。

血栓溶解薬の小児に対する投与量の基準値は定まっていないので、投与に際しては症例ごとに慎重に判断する必要がある。静脈投与での再開通率は70-80%、冠動脈投与を追加すると10%程度再開通率が上がるといわれる。

●静脈内投与:

UK: 1-1.6万単位/kg(最大96万単位)を30-60分間で点滴。

組織型プラスミノゲン・アクチベータ(t-PA)

○アルテプラゼ(アクチバシン注[®]、グルトバ注[®]): 29-43.5万単位/kg、総投与量の10%を1-2分で静注し、残りを60分間で点滴静注。

○モンテプラゼ(クリアクター注[®]): 2.75万単位/kgを2-3分間で静注。

○パミテプラゼ(ソリナーゼ注[®]): 6.5万単位を1分で静注。

●冠動脈内注入(ICT):

UK: 0.4万単位/kgを10分間で注入、最大4回まで。

なお、再発防止のための抗凝固・抗血小板療法が重要である。

6. 経過観察

内科的経過観察の時期、観察期間についての現時点での我が国における明確な方針は見いだせない。急性期に冠動脈病変の合併がない既往者に対しては生活・運動面での制限は必要なく、学校生活管理指導表は、発症後5年以上経過していれば「管理不要」としてよい。経過観察の目安は、発症後1カ月、2カ月、6カ月、1年後、および5年後とする。一方、急性期より冠動脈障害が認められた既往者(一過性も含む)に対しては個々の重症度による。

なお、日本川崎病研究会(現日本川崎病学会)では、2003年に「川崎病急性期カード」を作成した。川崎病急性期の医療情報(臨床症状、治療内容、心血管合併症など)を記録し、患者またはその家族が保持し、発病初期のデータが必要となった際にその一助とする(図1)。

7. 成人期の対応、循環器内科医との連携

現在、成人期に達した川崎病患者の治療・予後について、エビデンスレベルの高い科学的に検討されたデータはなく、その取り扱いに関してスタンダードなものはない。

a. 診断

成人期における対象者は一過性を含む冠動脈障害を有する者である。成人期では体表面心エコーでは冠動脈病変の正確な評価が困難である症例が多く、以下のような非侵襲的な冠動脈病変の評価法または、CAGが必要となる。

- ・運動負荷心電図
- ・運動または薬物による負荷心筋シンチ
- ・ホルター心電図

川崎病急性期カード	
氏名: 性別: 男 女 生年月日: 西暦 年 月 日 発症日: 西暦 年 月 日 発症時年齢: 歳 月 入院日: 西暦 年 月 日 退院時: 西暦 年 月 日	臨床症状 (1) 発熱 あり (日間) なし (2) 両眼結膜の充血 あり なし (3) 口唇の紅腫・皸舌 あり なし (4) 不定形発疹 あり なし (5) 急性浮腫・掌趾の紅斑 あり なし (6) 指先からの腫脹 あり なし (7) 頸部リンパ節腫大 あり なし その他の症状:
このカードには川崎病にかかった時の症状、治療内容、心臓合併症の有無など重要な医学的記録が記載されています。母子手帳などにはさき、紛失しないよう保管していただき、必要なきにご利用ください。	主な治療 (1) アスピリン あり なし (2) 免疫グロブリン あり なし (3) 高野皮質ホルモン あり なし (4) その他の薬剤の使用:
医療機関名・住所・電話番号・主治医名など 記載日 年 月 日 日本川崎病研究会監修	冠動脈エコー所見 (1) : 退院時 右冠動脈: 異常なし 一過性拡大・拡大・瘤・巨大瘤 左冠動脈: 異常なし 一過性拡大・拡大・瘤・巨大瘤 冠動脈エコー所見 (2) : 発病1~2か月後 右冠動脈: 異常なし 一過性拡大・拡大・瘤・巨大瘤 左冠動脈: 異常なし 一過性拡大・拡大・瘤・巨大瘤 その他の心臓合併症: なし あり 特記事項

図1 川崎病急性期カード

- ・経食道心エコー
- ・MRCA
- ・MDCT

b. 治療

1) 小児期に冠動脈瘤のない症例

小児期に冠動脈瘤のない症例では、アスピリンなどの抗血小板薬の内服は中止しても構わない。

2) 小児期より冠動脈瘤があるが無症状の症例

小児期より冠動脈瘤があるが無症状の症例では、原則的にはアスピリンなどの内服が必要である。また、肥満の防止や禁煙の推進など生活習慣の改善だけでなく、糖尿病、脂質異常症、高尿酸血症といった冠危険因子に対する予防と適切な治療が必要である。

3) 成人期に狭心症、心筋梗塞、心不全および重症不整脈のある症例

川崎病由来ではない場合と同様の治療が必要である。アスピリンのほかに、抗血小板薬、抗狭心薬、利尿薬などの抗心不全薬、抗不整脈薬を必要とする場合がある。運動負荷心電図や核

医学的検査などで虚血が証明されれば、適当なPCIを行う。

4) 川崎病既往の不明な成人冠動脈瘤症例

基本的には若年成人で冠動脈瘤のある症例に対しては、上記2)または3)に従う。

c. 若年者冠動脈瘤・心筋梗塞と川崎病

石灰化を伴った冠動脈瘤による心筋梗塞や心血管症状のある若年成人者を見たら、幼少時に川崎病の既往があるか確認するべきである。

d. 成人型心筋梗塞との比較

川崎病の病理所見では、著明な動脈硬化にもかかわらず、高度の粥状動脈硬化病変はみられない。したがって現在のところ、川崎病血管炎後遺症が粥状動脈硬化の促進因子か否かは不明である。川崎病心後遺症者の冠動脈瘤のリモデリングは、川崎病発症数年後も継続し、内膜増生と新生血管が認められる所見は、若年動脈硬化患者の所見と異なる。

e. 小児科医と循環器内科医との連携

小児科での経過観察後、成人した症例に関しては、その臨床経過と検査所見を内科と小児科で共有することが必要である。

XV

川崎病の診断・治療の現状

特集 川崎病の本態にせまる—古くて新しい研究から—

II. 検査にせまる (検査結果から本態にせまる)
冠循環

小川 俊一 日本医科大学小児科

要旨 冠循環は他の臓器・組織と違い、収縮期ではなくおもに拡張期に血液が心筋に灌流される。冠動脈壁は絶えずメカニカルストレスを受けている。とくに、血流に起因する剪断応力 (shear stress) が血管内皮細胞機能を調節し、冠循環を制御している。巨大冠動脈瘤内やその末梢、有意な狭窄性病変の末梢でのshear stressは有意に低下し、血管内皮細胞機能の低下による血栓形成や心筋虚血の合併が危惧される。さらに画像上、epicardial coronary arteryには問題がなくても微小循環障害を合併している場合があり注意を要する。

Key words 冠循環, shear stress, 血管内皮細胞, 微小循環

はじめに

冠循環は他の臓器および組織における循環動態と異なっていることを十分に認識しておく必要がある。小児期の冠循環障害で一番問題となるのは、川崎病の際の血管炎に合併する冠動脈障害によるものである。最近の免疫グロブリンを中心とする急性期治療の効果により冠動脈障害は減少傾向にあるが、第20回の川崎病全国調査結果からみてもいまだに冠動脈後遺症として、2.3%に冠動脈拡大、1.0%に冠動脈瘤、0.35%に巨大冠動脈瘤、さらに0.06%に冠動脈狭窄が認められている。川崎病における冠動脈障害の特徴は、急性期から回復期に認められる冠動脈瘤を主体とする拡張性病変と、回復期以降に認められる狭窄性病変であり、狭窄性病変はおもに冠動脈瘤の入口部や出口部、さらに瘤間や、まれに冠動脈瘤内に出現する。冠動脈後遺症を伴った多くの症例の冠動脈枝に拡張性病変、狭窄性病変および閉塞性病変が複数混在して認められ、これが1枝に限らず複

数枝に認められること、さらに、小児期には側副血行路が形成されやすいことなどが相まって、より複雑な冠血行動態を呈する (図1)。したがって、このような複雑な冠循環動態を十分に把握することが、適切な治療戦略を構築するうえで非常に重要となる。

本稿では、基本的な冠循環の話、冠循環に及ぼす血行力学的要因、冠循環動態の評価法、末梢冠



図1 冠動脈後遺症
A: 冠動脈瘤, B: 狭窄性病変, C: 完全閉塞後の再疎通

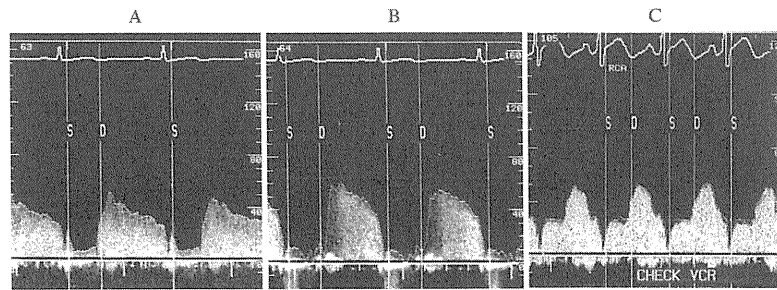


図2 冠動脈枝別の血流パターン
A: LAD flow pattern, B: LCX flow pattern, C: RCA flow pattern
LAD: 左前下行枝, LCX: 左回旋枝, RCA: 右冠動脈

循環, 冠循環障害に伴う臨床の諸問題につき概説する。

冠循環の基礎

冠循環は, 収縮期には末梢冠動脈が心筋収縮に伴い狭窄・閉塞するため末梢血管抵抗がきわめて高くなり血流量は減少し, その分, 拡張期に多くの血液が流れるため, 他の臓器・組織と違い, おもに拡張期に血液が灌流される。したがって, 心筋壁厚に差がある右室と左室では冠動脈の血流のパターンに違いが認められる。まず心筋壁の厚い左冠動脈では, 収縮期には心筋収縮により心筋内細小動脈や毛細血管が圧迫され血流が途絶するため, 血流速度は低下ないし停止する。ところが拡張期には, 心筋の弛緩に伴い血管に対する圧迫が解除され急速に血流が再開するため, 血流速度は収縮期に比しはるかに大きく, 拡張期に優位のパターンを呈する(図2)。一方, 右冠動脈はその灌流支配領域が狭く, おもに左室の下壁や心筋壁厚の薄い右室を主体に灌流しているため収縮期にも血液が流れやすい。そのため, 左冠動脈に比し収縮期の血流成分も大きくなる(図2)。しかし, 右室圧増高に伴う右室心筋肥大や右冠動脈が左室心尖部領域を灌流するようなタイプでは収縮期血流量は低下し, 左冠動脈と同様の拡張期優位の血行動態を呈することもある。

さらに, 心筋への血液灌流には心外膜側心筋と心内膜側心筋との間で大きな差異が認められる。心内膜側心筋の細動脈は収縮期血流阻止効果が強く, 流れはほとんど拡張期に限定したものであるのに反し, 心外膜側心筋の細動脈では収縮期・拡張期にわたり血流が認められる。これが心内膜側に心筋虚血が惹起されやすい原因の一つとなる。

成人の冠血流量は冠動脈灌流圧が60~130 mmHgの範囲においては自己調節能によりほぼ一定に保たれている²⁾。しかし, 冠動脈灌流圧が60 mmHg以下に低下すると直線的に減少し, 20 mmHgにて血流量は0となる。したがって, 右房圧が20 mmHg以上の血行動態にならない限り冠動脈灌流圧は右房圧の影響を受けない。小児での正常灌流圧に関する確たるデータはないが, 成人に比し有意に低いことが予想される。とくに乳幼児で顕著であり, 50 mmHg程度までは自動調節能が働くのではないかと推察する。つまり, 拡張期圧が50 mmHg以下の状態が長期に持続することにより, 心筋虚血が惹起される可能性を示唆する。

冠循環に及ぼす血行力学的要因

血管は血流や血圧を介して絶えずメカニカルストレスを受けている。血管内皮細胞には, 血流に起因する剪断応力(shear stress)と血圧の変化による伸展張力(cyclic strain)が作用する。中でも,

冠循環を制御しているもっとも重要な因子はshear stressである。血管内皮細胞はshear stressとcyclic strainの両方の影響を, また, 血管平滑筋細胞はcyclic strainの影響を受ける。

Shear stressの低下は血管内皮細胞機能を低下させ, 本来, 血管内皮細胞が有している血管収縮・拡張作用, 抗血栓作用, 抗線維化作用, 抗炎症作用, 抗動脈硬化作用, 抗酸化作用, 抗接着作用などを減弱させ, 病的状態を惹起する。とくに冠動脈瘤内では, 臨床で, 抗血栓作用の低下による血栓形成および, それに伴う心筋梗塞が大きな問題となる。shear stressの低下は血管内皮細胞を通してプロスタグランジン₂や一酸化窒素(NO)の産生障害^{3,4)}を惹起し, 血小板凝集能を亢進させる。また, 組織因子(tissue factor:TF)活性⁵⁾やhuman protease-activated receptor-1の発現の増加を促し⁶⁾, トロンボモジュリンの発現を抑制することなどにより凝固能を亢進させる⁷⁾。さらに, shear stressの低下に伴う組織プラスミノゲンアクチベータ(tissue-type plasminogen activator:t-PA)の産生障害⁸⁾や, プラスミノゲンアクチベータインヒビター-1(plasminogen activator inhibitor-1:PAI-1)の産生亢進により線溶系は抑制される。血小板凝集能および凝固能の亢進, 線溶系の抑制などにより, 容易に血栓が形成される。

Shear stressが血管内皮細胞に影響を及ぼす機序についても徐々に解明されてきており, 現在までにshear stressのセンシングにかかわるメカノセンサー部位として, K⁺・Ca²⁺イオンチャネル⁹⁾¹⁰⁾, 細胞膜表面に分布するグリコカリックス¹¹⁾, G蛋白共役受容体¹²⁾, 血小板内皮細胞接着-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1:PECAM-1)¹³⁾, 一次線毛¹⁴⁾などが報告されている。

一方, cyclic strainにかかわるセンシングでは, SAイオンチャネル(stretch-activated ion channel)が中心的な役割をはたしている¹⁵⁾。

冠循環動態の評価法およびその臨床応用

超音波プローブを装着したガイドワイヤーによりshear stressやCFR(coronary flow reserve)を算出し臨床に供することは, 障害された冠循環動態を評価するうえで有効である。一方, 高感度圧センサーを装着したガイドワイヤーによる冠動脈内圧の測定も血行動態を把握するうえで重要であるが, 本稿ではその詳細は割愛する。

1. shear stress

ドブラガイドワイヤーは直径0.014インチのガイドワイヤーの先端に周波数15 MHzの超音波プローブを装着し, 約28°の角度から発信された超音波パルスドブラビームが血流速度シグナルを検出する。ドブラガイドワイヤーより得られる時間平均血流速度(time-averaged peak flow velocity, 以下APVと略す)¹⁶⁾, および冠動脈造影またはIVUS(intravascular ultrasound)から得られる血管径を用いて, 以下のようにshear stressの近似値を求めることが可能である。

$$\text{Shear stress} \approx (4 \times \mu \times \text{APV}) / R$$

$$[\mu (\text{血液粘度}) = 3 \text{ cp} (\text{cp} = 0.003 \text{ Pa} \cdot \text{sec}, 1 \text{ Pa} = 10 \text{ dyne/cm}^2)^{17)}, R: \text{血管の半径}]$$

なお, ドブラガイドワイヤーを用いて血流速度を正確に測定するためには, 超音波ビームの方向と血流方向を可能な限り平行にすることが重要である。計測できる血流速度は血管のほぼ中央部での値であり, 血管壁近傍では中央部よりも低下している。したがって, 算出したshear stressは血管中央部での値であり, 実際の血管壁に影響を及ぼすshear stressの値はより低い値となる。

2. 冠動脈障害部位の違いによるshear stressの検討

Shear stressが低下するのは冠動脈瘤内, とくに瘤径の大きい巨大冠動脈瘤内, 巨大冠動脈瘤遠位部および有意な狭窄性病変の遠位部などである。

表1 瘤内における血流パターン、時間平均血流速度 (APV), shear stress

	n	血流パターン	APV (cm/秒)	shear stress (dyne/cm ²)
小冠動脈瘤群	44	100% pulsatile	23.1 ± 3.8	42.2 ± 5.1
中冠動脈瘤群	36	77.8% pulsatile 22.2% turbulent	18.5 ± 4.6	38.6 ± 7.8
巨大冠動脈瘤群	21	4.8% pulsatile 95.2% turbulent	8.6 ± 2.8*	4.2 ± 2.8*

*: p < 0.05 vs. 他冠動脈瘤群

表2 瘤の末梢における血流パターン、時間平均血流速度 (APV), shear stress

	n	血流パターン	APV (cm/秒)	shear stress (dyne/cm ²)
小冠動脈瘤群	43	100% pulsatile	23.5 ± 3.2	48.3 ± 4.9
中冠動脈瘤群	34	77.8% pulsatile 22.2% turbulent	19.2 ± 3.8	43.8 ± 5.9
巨大冠動脈瘤群	18	4.8% pulsatile 95.2% turbulent	10.2 ± 3.2*	12.1 ± 3.2*

*: p < 0.05 vs. 他冠動脈瘤群

1) 冠動脈病変の認められない部位における shear stress

冠動脈枝別に APV と冠動脈内径より shear stress を算出した。なお、血液粘度は一定であるのものとに算出した。枝別に有意差はなく、全対象枝における shear stress は 56.8 ± 6.8 dyne/cm² であった¹⁸⁾。平均値 + 2標準偏差値より、この方法による健常冠動脈での shear stress の基準値は 40 dyne/cm² 以上と設定した。しかし、これはあくまでも血管中央部における血流速度から導き出した値であり、血管壁に近い部位での血流速度はより低い値であり、本来の shear stress もこの値よりもっと低い値であることが予想される。生理的には、動脈内皮には 20 dyne/cm² 前後、静脈内皮には 1 ~ 6 dyne/cm² 前後の shear stress が作用している。

2) 大きさの違う冠動脈瘤内における shear stress

小冠動脈瘤群 (5歳未満では内径 4 mm 未満, 5歳以上では近傍の健常内径の 1.5 倍未満), 中冠動脈瘤群 (5歳未満では内径 4 mm 以上 8 mm 以下, 5歳以上では近傍の健常内径の 1.5 倍以上 4 倍未満), 巨大冠動脈瘤群 (5歳未満では内径 8 mm 超, 5歳以上では近傍の健常内径の 4 倍以上) で比較検討

してみると、巨大冠動脈瘤内では有意に shear stress の低下が認められた。さらに、巨大冠動脈瘤内では全例ともに flow pattern は乱流であり、shear stress のベクトルにも大きな影響が及ぼされ血管内皮細胞機能をさらに低下させる要因となる¹⁸⁾(表1)。

3) 拡張病変より遠位部における shear stress

瘤の末梢で画像上、健常血管と思われる部位における shear stress を検討してみると、瘤内と同様に瘤の末梢でも小冠動脈瘤群、中冠動脈瘤群に比し巨大冠動脈瘤群では有意に shear stress は低下し、末梢部位における血管内皮細胞機能の低下が強く示唆された¹⁸⁾(表2)。

以上のことから、巨大冠動脈瘤が存在することにより、有意な狭窄性病変を合併していなくてもその遠位部の血管内皮細胞機能は低下していることが予想される。さらに、狭窄性病変を合併すれば内皮細胞機能の低下はより増悪する。

4) 有意狭窄病変の末梢における shear stress

負荷心筋シンチグラム所見から、狭窄性病変を心筋虚血を伴う冠動脈狭窄群 (虚血群) と心筋虚血を伴わない狭窄群 (非虚血群) に分類し、shear stress を算出して比較検討した。虚血群は全例、90% 以上の狭窄度を有していた。一方、非虚血群

表4 冠動脈枝別の末梢血管抵抗

冠動脈枝	症例数	冠内圧 (安静時) (mmHg)	APV (安静時) (cm/秒)	血管抵抗 (安静時) (mmHg)	冠内圧 (負荷時) (mmHg)	APV (負荷時) (cm/秒)	血管抵抗 (負荷時)
左前下行枝群	35	67.8 ± 7.2	23.3 ± 4.0	2.91 ± 0.52	55.6 ± 6.1	56.7 ± 5.6	0.98 ± 0.23
回旋枝群	28	65.9 ± 5.8	23.7 ± 3.9	2.78 ± 0.48	56.1 ± 5.1	58.8 ± 5.5	0.95 ± 0.34
右冠動脈群	39	69.3 ± 7.8	24.2 ± 3.8	2.88 ± 0.43	58.5 ± 4.2	59.1 ± 6.8	1.00 ± 0.36

APV: 時間平均血流速度

表3 狭窄性病変の末梢部における時間平均血流速度 (APV), shear stress

	n	APV	shear stress
虚血群	31	13.2 ± 3.4*	14.3 ± 2.8*
非虚血群	43	48.7 ± 4.8	39.7 ± 5.4

*: p < 0.05 vs. 非虚血群

の中には当該冠動脈が90%以上の狭窄性病変を有している症例が5例 (11.6%) 含まれていたが、これらの症例では十分な側副血行路の発達が認められている。小児では有意な狭窄性病変に伴い、早期に側副血行路が出現する場合が多く、このような症例の狭窄性病変の評価は形態学的評価だけでは十分ではない。表3に示すように、虚血群における shear stress は非虚血群に比し有意に低下し、かつ、基準値を逸脱していた。shear stress の低下は血管内皮細胞機能の低下を意味し、狭窄部より末梢部位における冠循環動態の障害を示唆する。

末梢冠循環動態の評価

冠動脈血流量・冠動脈内圧比より末梢血管抵抗を算出することが可能である。冠血流量は冠血流速度とよく相関するので、APV・平均冠動脈内圧比より一種の末梢血管抵抗を算出することが可能である。圧およびドブラセンサが装着されたワイヤー (ComboWire[®], VOLCANO corporation) を用いて、冠動脈造影 (coronary angiography: CAG) にて異常の認められなかった冠動脈枝を対象に、安静時および血管拡張時の末梢血管抵抗を算出した。安静時は 4.0、血管拡張時は 2.0 をこの方法での末梢血管抵抗の基準値として設定し、これを上回る値を異常値とした (表4)。

冠循環障害を合併した患者の臨床における諸問題

川崎病による冠動脈障害に伴い、臨床的な諸問題が惹起される。大きく分けて、冠動脈瘤を主体とする拡張性病変に認められる血栓形成と有意な狭窄性病変 (閉塞性病変を含む) に認められる心筋虚血である。

1. 冠動脈瘤内での血栓形成

冠動脈瘤径が大きければ大きいほど瘤内の血流速度は低下し、血流パターンも拍動流から乱流に変わり、それに伴い shear stress は低下する。川崎病の急性期には血小板数の増加および血小板機能の亢進が持続し、血液の面からみれば凝固しやすい状態となる。そのうえ、血管の炎症による血管内皮細胞機能の低下、さらに、瘤の形成という冠動脈形態の変化に伴う shear stress の低下による血管内皮細胞機能障害が加わり、血栓が容易に形成されやすい状態となる。血栓には、high shear stress 下 (狭窄性病変) で形成される血小板を中心とした動脈血栓と、low shear stress 下 (冠動脈瘤内) で形成されるトロンビン生成亢進によるフィブリン形成が主体となって形成される静脈血栓とに大別される。瘤内で認められるのは静脈血栓であり、これはアスピリンを主体とする抗血小板療法では十分ではなく、ワルファリンによる抗凝固療法が必要となる。ワルファリンの適応は、瘤の最大径ばかりでなく形態も大いに考慮しなくてはならないが、shear stress の面からみれば 6 mm 以上の冠動脈瘤に対してはワルファリン療法 [プロトロンビン時間/国内標準比 (prothrombin time/

international normalized ratio:PT/INR):1.6~2.5]が必要となる場合がある。また、瘤内に浮遊血栓が形成された場合には血栓溶解療法の適応となる。瘤径が大きい場合には超音波心断層法などによる経時的な経過観察が重要となる。

2. 狭窄性病変に伴う心筋虚血

川崎病の回復期以降、冠動脈瘤の入口部、出口部および瘤内に狭窄性病変(閉塞性病変を含む)が出現することがある。これは、障害された冠動脈内膜の増殖により拡大部分を修復しようとする血管再構築の際に、内膜の過増殖により出現するものと考えられる。これらの部位は病変形成後数年の経過で石灰化が出現し、症例によっては血管が全周性に石灰化病変に覆われることも少なくない。有意な狭窄性病変部位では、血流速度の増加および血管径の縮小により shear stress は亢進する。一方、狭窄部位の数mm遠位部では血流速度はきわめて低下し、flow pattern も乱流となり、shear stress は低下する。さらに内圧も低下し、cyclic strain も低下することが予想され、これによる血管内皮細胞および血管平滑筋細胞機能への悪影響も示唆される。血流速度の低下は血流量の低下を意味し、灌流圧の減少と相まって心筋への血液灌流量は有意に低下し、心筋虚血が惹起される。

心筋虚血を伴う狭窄性病変の解除には、発症より数年以内の症例で有意な石灰化を伴っていないれば経皮的古典的バルーン血管形成(plain old balloon angioplasty:POBA)が、一方、発症より数年以上経過し有意な石灰化を伴っていればロータブレータが有用である¹⁹⁾²⁰⁾。POBAおよびロータブレータを施行した際、必要に応じてステントの挿入を行うことがあるが、適応となるのはおおむね中学生以降と考える。なお、有意な心筋虚血を合併し、かつ、カテーテル治療の適応にない症例では冠動脈バイパス(coronary artery bypass grafting:CABG)術が考慮される。

3. 末梢冠循環障害に伴う心筋虚血

病初期に冠動脈拡張(小瘤を含む)が認められ、その後、画像上 regression したと診断された冠動脈枝における末梢血管抵抗を検討した。54枝を対象に検討した結果、安静時における末梢血管抵抗は全例正常範囲内であったが、末梢血管充血時には54例中7例において異常が認められた。そのうち3枝では数年後の検査においても異常値を呈し、さらに、これらの症例では負荷心筋シンチグラムにて心筋虚血の存在が認められた²¹⁾。このことは、epicardial coronary artery が拡張後に画像上 regression するような症例でも、微小循環障害は約5%に残存することを意味する。健常と思われる epicardial coronary artery の症例でも微小冠循環障害が存在するという報告もある²²⁾。したがって、瘤を形成するような強い血管障害が残存する冠動脈枝では、微小循環障害を有する確率はさらに高いことが危惧される。微小循環障害の原因は定かではないが、微小血栓、血管炎に伴う微小血管障害などによることが推察される。

4. 遠隔期における冠動脈障害部位以外の血管内皮細胞機能

冠動脈に後遺症を合併せずに治癒する多くの川崎病患者の遠隔期の血管内皮細胞機能が、健常者と同じかどうか問題となっている。冠動脈障害を合併した患者では障害病変部での血管内皮細胞機能の低下のみならず、画像上、健常と思われる部位でも血管内皮細胞機能は低下しているとの報告が散見される²³⁾²⁴⁾。今後、さらなる検討が必要であるが、障害を受けた部位以外でも内皮細胞機能が低下していることが推察され、このような症例では成人期に至り、生活習慣病の合併などによる粥状動脈硬化の発症が危惧される。

おわりに

川崎病およびその後遺症の本態は血管内皮細胞および、その血管平滑筋細胞の傷害にあると考えられる。今後、基礎および臨床研究を重ねその秩序を

明らかにし、さらに、ナノテクノロジーを用いた傷害細胞への直接的な治療法の導入なども視野に入れて治療戦略を構築していく必要がある。

文 献

- 1) 中村好一 全国調査成績から見た最近の川崎病の動向, 小児内科 41:9-13, 2009
- 2) Reuleau J, Boerboom LE, Surjadhana A et al.: The role of autoregulation and tissue diastolic pressure in the transmural distribution of left ventricular blood flow in anesthetized dogs. *Circ Res* 45:804-815, 1979
- 3) Alshihabi S, Chang Y, Fragos J et al.: Shear stress-induced release of PGE₂ and PGI₂ by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:808-814, 1996
- 4) Papadaki M, Tilton RG, Eskin SG et al.: Nitric oxide production by smooth muscle cells: modulation by fluid flow. *Am J Physiol* 273:H6616-H6626, 1998
- 5) Grabowski EF, Reiningger AJ, Petteuti PG et al.: Shear stress decreases endothelial cell tissue factor activity by augmenting secretion of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:157-162, 2001
- 6) Papadaki M, Ruef J, Nguyen KT et al.: Differential regulation of protease activated receptor-1 and tissue plasminogen activator expression by shear stress in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83:1027-1034, 1998
- 7) Malek AM, Jackman R, Rosenberg RD et al.: Endothelial expression of thrombomodulin is reversibly regulated by fluid shear stress. *Circ Res* 74:852-860, 1994
- 8) Ueba H, Kawakami M, Yaginuma T: Shear stress as an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation: Role of transforming growth factor- β 1 and tissue-type plasminogen activator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1512-1516, 1997
- 9) Olesen SP, Clapham DE, Davies PF: Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 331:168-170, 1988
- 10) Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A et al.: P2X₄ receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H285-H292, 2000
- 11) Yao Y, Rabodzey A, Dewey CF Jr.: Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1023-H1030, 2007
- 12) White CR, Frangos JA: The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1459-1467, 2007
- 13) Tzima E, Irani-Tehrani N, Kisses WB et al.: A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437:426-431, 2005
- 14) Hierck BP, Van der Heiden K, Alkemade FE et al.: Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress. *Dev Dyn* 237:725-735, 2008
- 15) Ando J, Yamamoto K: Vascular mechanobiology-endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J* 73:1983-1992, 2009
- 16) Ogawa S, Ohkubo T, Fukazawa R et al.: Estimation of myocardial hemodynamics before and after intervention in children with Kawasaki disease. *J Am Coll* 43:653-661, 2004
- 17) Dinner U: Properties of flowing blood. *Cardiovascular Fluid Dynamics*, Dinner U ed., CRC Press, Boca Roton, 23-54, 1981
- 18) 小川俊一: レオロジーから見た冠状動脈の血流動態特性. 日児誌 113:1769-1778, 2009
- 19) Ogawa S, Fukazawa R, Ohkubo T et al.: Silent myocardial ischemia in Kawasaki disease: evaluation of percutaneous transluminal coronary angioplasty to coronary arterial stenosis in Kawasaki disease. *Circulation* 96:3384-3389, 1997
- 20) 横井宏佳: カテーテル治療. 日本臨牀 66:373-379, 2008
- 21) Ogawa S, Fukazawa R, Kamisago M et al.: Estimation of myocardial ischemia caused by coronary micro circulatory disturbance after Kawasaki disease. *Eur Heart J* 29 (Suppl.):78-79, 2008
- 22) Muzik O, Paridon SM, Singh TP et al.: Quantification of myocardial blood flow reserve in children with a history of Kawasaki disease and normal coronary arteries using Positron Emission Tomography. *J Am Coll Cardiol* 28:757-762, 1996
- 23) Mitani Y, Okuda Y, Shimpō H et al.: Impaired endothelial function in epicardial coronary arteries after Kawasaki disease. *Circulation* 96:454-461,

1997

24) Yamakawa R, Ishii M, Sugimura T et al.: Coronary endothelium dysfunction after Kawasaki disease: Evaluation by intracoronary injection of acetylcholine. J Am Coll Cradiol 31:1074-1080, 1998

著者連絡先

〒113-8603 東京都文京区千駄木1-1-5
日本医科大学附属病院小児科
小川俊一

第9回鳥取大学小児神経学入門講座・第30回米子セミナーのお知らせ

会 期 平成23年9月23日(金)～24日(土)

会 場 鳥取大学医学部臨床講義棟・ほか

小児神経学 ①小児の神経変性疾患の鑑別
入門講座 大野耕策(鳥取大学医学部脳神経小児科)

②小児てんかんの治療
平岩里佳(東部島根医療福祉センター)

③脳波の読み方
前垣義弘(鳥取大学医学部脳神経小児科)

④学習障害、とくに発達性読み書き障害の診療
小枝達也(鳥取大学地域学部)

⑤よくみる小児神経疾患の画像
金崎佳子(鳥取大学医学部放射線科)

⑥小児のリハビリテーション
北原 侑(鳥取県立総合療育センター)

⑦グループレクチャー

⑧教育講演「小児の認知機能に関する生理学的研究：刺激や解析法の工夫を通じて歩んできたこと」
桶垣真澄(国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所の障害研究部)

米子セミナー ①症例検討会(演題募集)
②画像検討会(演題募集)

事務局 鳥取大学医学部脳神経小児科 担当：近藤麻子
TEL 0859-38-6777 FAX 0859-38-6779
URL : http://www.med.tottori-u.ac.jp/dcn/
E-mail : neuropediatrics_tottori@yahoo.co.jp

特集 川崎病の本態にせまる—古くて新しい研究から—

Ⅳ. 予後にせまる(研究結果から本態にせまる)
血管病変の機能的後遺症

八幡 倫代 濱岡 建城 京都府立医科大学小児循環器・腎臓病学

要 旨 川崎病汎血管炎は急性期を過ぎると炎症自体は鎮静化される。形態的に冠動脈障害を残さなかった場合、血管は一見、何事もなかったかのような表情をわれわれにみせる。しかし近年、心血管後遺症のない川崎病既往児の遠隔期においても血管の機能低下が存在することが報告されるようになった。血管の機能的後遺症が示す川崎病の本態は、その既往自体が血管を障害し続けるサイレントキラーの一種といえるだろう。

Key words 血管内皮細胞、動脈硬化、一酸化窒素(NO)、内皮依存性血管拡張能(%FMD)、脈波伝播速度(PWV)

血管機能について

血管はおもに、最内層を覆う一層の扁平な血管内皮細胞と中膜の血管平滑筋細胞、そして外膜から構成されている。このうち、単なるバリアと見なされていた血管内皮細胞は最近、血液の流動性や血液凝固、血管修復やリモデリング、トーンズ制御、その他、炎症や免疫など多くの生命活動に関係する多機能性の細胞であることが判明してきた(図1)。そして、その内皮細胞からのシグナルを受け取り、つねに応答してトーンズを変化させ循環状態を保っているのは血管平滑筋細胞である²⁾。したがって血管機能を論じる際には、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の両者の働きにより変化を生じる指標に注目することになる。そのため現時点では、血管トーンズや拡張・収縮能を評価することが、血管機能評価としてもっとも適切な方法であろう。

対して以前より行われてきた定量的冠動脈造影法や、末梢動脈の機能検査としてすでに認知されており、近年、川崎病にも応用されるようになって注目を集めている内皮依存性血管拡張能(%flow mediated dilatation, 以下%FMDと略す)、脈波伝播速度(pulse wave velocity, 以下PWVと略す)などがある。以下、それぞれの検査について、その原理と川崎病における検討結果を述べる。

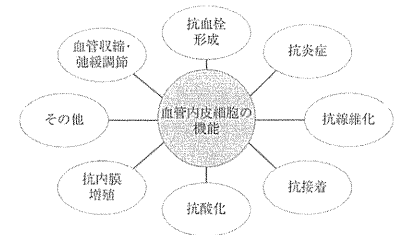


図1 血管内皮細胞の多機能性

血管の評価方法はさまざまである(図2)が、そのうちの機能評価としては、川崎病の冠動脈に

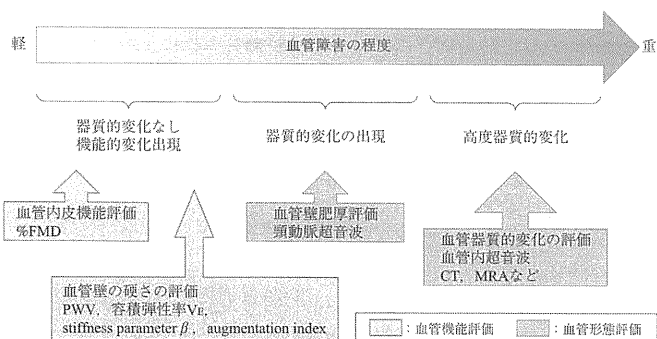


図2 血管障害の程度の評価方法
FMD: flow mediated dilatation, PWV: pulse wave velocity

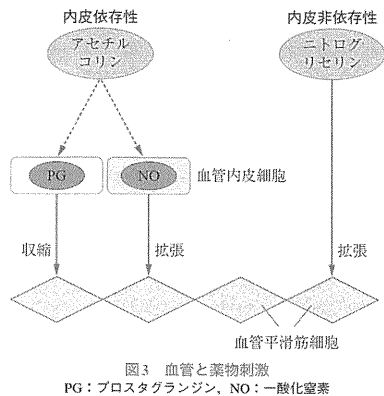


図3 血管と薬物刺激
PG: プロスタグランジン, NO: 一酸化窒素

ため、両者の区別をもって総合的な評価を行うが、内皮依存性血管拡張薬としてはアセチルコリンを、内皮非依存性拡張薬としてはニトログリセリンを用いるのが一般的である。

アセチルコリンは内皮細胞でのNO産生を介して間接的に血管拡張に働く。しかし障害された内皮細胞では、プロスタグランジン産生を促して間接的に血管を収縮させる。一方で、ニトログリセリンは直接血管平滑筋に働き血管を拡張させる(図3)。

したがって両薬剤で血管が拡張した場合は正常、アセチルコリンで収縮しニトログリセリンで拡張した場合は内皮機能障害、アセチルコリンで収縮しニトログリセリンで拡張障害を認めた場合は内皮機能障害も伴う平滑筋機能障害と判定する(表1)。

冠動脈障害を伴う症例において内皮機能障害を認めた報告は多く^{31,4)}、見解は一致しているが、冠動脈障害を伴わない症例における内皮機能は正常であったとの報告もある^{31,4)}。

内皮依存性血管拡張能 (%FMD)

前腕を駆血し、のちに生じる反応性充血により上腕動脈を通る血流速度が増加する。血流速度の

増加はズリ応力の増加につながるが、この物理的な力を感知して内皮細胞はNOを合成する。合成されたNOは血管平滑筋細胞に作用して血管を拡張させる。現在は上腕動脈の拡張を超音波検査により計測し、安静時に対する駆血解除後の血管径増加率を%FMDとして評価する方法がとられている⁵⁾。健康成人でのFMDは10%以上であり、糖尿病、喫煙、脂質異常症、加齢などの血管内皮細胞障害因子を抱えるグループでは低下することが報告されている⁶⁾。

われわれは、高血圧、脂質異常症、糖尿病、肥満、喫煙などの動脈硬化危険因子を有しない、成人期に達した川崎病既往例を対象に、反応性充

血後の%FMDおよび硝酸イソソルビド口腔内投与後の内皮非依存性拡張能 (endothelium-independent dilatation: %EID) の測定を行った。川崎病既往成人例において%FMDは有意に低下しており(図4-A)、とくに、冠動脈病変を有する例で%FMDの低下は著明であった(表2)。しかし%EIDは、川崎病既往例とコントロール群との間に有意差は認めなかった(図4-B)。

brachial-ankle PWV

動脈内の脈波は、心臓の自動収縮により押し出される血液の拍動により発生する。血液は血管壁を押し広げ、しなやかな拍動とともに末梢血管へ流れていく。しかし血管壁が硬い場合、血管をうまく押し広げることができず、動脈壁による拍動の吸収は低下して脈波の伝播が早くなる。したがって、PWVは血管のしなやかさを反映しており、血管の硬さの指標として血管機能評価の一つにあげられる⁷⁾。

表1 血管内皮機能と薬物反応

アセチルコリン	ニトログリセリン	内皮機能評価
→	→	正常
↓	→	低下
↓	↓	正常もしくは低下 + 平滑筋機能低下

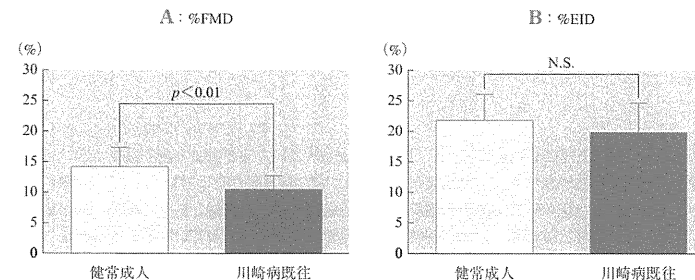


図4 川崎病既往成人と健康成人における血管機能の比較検討
川崎病既往例: 35例 (平均27.0歳、川崎病発症後平均24.1年)、健康成人例: 36例 (平均25.5歳)
A: 内皮依存性血管拡張能 (%FMD)、B: 内皮非依存性拡張能 (%EID)

表2 川崎病既往各群における血管機能および動脈硬化進展の比較検討

	冠動脈病変を有する群 (n=9)	一過性冠動脈病変を認めた群 (n=6)	冠動脈病変をもたない群 (n=20)	分散分析 (ANOVA)
%FMD (%)	8.8 ± 2.2 *1 *2	9.6 ± 2.1 *1	11.5 ± 2.8 *1	p < 0.05
%EID (%)	18.1 ± 4.5	21.4 ± 1.9	19.6 ± 4.7	N. S.

*1: p < 0.05 vs control group, *2: p < 0.05 vs group C

PWVも%FMDと同様に、血管内皮細胞障害因子を抱えるグループでは高値を示すことが報告されている⁹⁾。川崎病における検討では、コントロールと比して川崎病既往グループで上腕-足首脈波伝播速度 (brachial-ankle PWV:baPWV) は明らかに高値を示しており、大動脈の進展性が低い可能性が指摘されている⁹⁾。

おわりに

以上のように、冠動脈障害を残さなかった川崎病既往例における血管機能低下については、いまだ合意には至っていない。しかし冠動脈障害を残した症例において、形態的に問題のない血管での機能低下が指摘されている。では、冠動脈障害を残さなかった症例の血管と冠動脈障害を残した症例の形態的に問題のない血管との違いはどこにあるのか、両者ともに急性期炎症に耐え、一見何事もなかったかのようにその場を乗り切った血管である。急性期血管炎の激しさの程度や個体の炎症に対する反応性・抵抗性の違い、さらには血管構造の強さの個体差など、白黒の線引きをするにはあいまいな違いしか残らない。

病理学的にはどうであろうか。瘤を残した冠動脈では強い動脈硬化性の病変がみられることは以前より明らかにされている¹⁰⁾。また、明らかな形態異常を認めない血管においても、かつて血管炎が存在したことをうかがわせる瘢痕や内膜肥厚を有するといった事実は、MRIや血管内超音波などの検査技術が発達するにつれて明らかにされてきた¹⁰⁾¹¹⁾。しかし、炎症の瘢痕のみを残した、肉眼的にいわゆる「問題のない」血管がいずれは粥状動脈硬化に進展するのかわかるかどうかについては、成人川崎病既往例の病理学的検索が行われていない現在においてはやはり不明のままである。

その一方で、血管の機能低下はさまざまな炎症反応と酸化ストレスの悪循環をひきおこし動脈硬化につながるという概念は、すでに広く受け入れられている¹²⁾¹³⁾。血管の機能低下の原因は、ひと

まずは血管内皮細胞の種々の機能を鑑みれば内皮細胞障害と考えてよいであろう。一般的に内皮細胞障害因子と考えられているものは、高血圧、糖尿病をはじめ、男性、加齢、肥満、喫煙、運動不足、脂質異常症、酸化ストレス、遺伝子などである。この因子に川崎病既往が入るかどうか、そこが論点である。全身性の激しい血管炎という川崎病の特有の病態から、川崎病既往が早発動脈硬化の危険因子となるのではないかと以前より危惧されてきた。最近、徐々にそれらしき報告は増加しており⁹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、われわれの%FMDに関する検討もこの危惧を後押しするものであった。

ならば、川崎病既往例の遠隔期フォローの改革が必要ではないのか。現在でも心血管障害を伴わない川崎病のフォローは非常に曖昧であり、発症から2~5年でフォローが打ち切られることが多い。川崎病の既往歴をもつ子どもたちが成長し、前述のような内皮細胞障害因子をさらに抱えると、動脈硬化へ、さらには心血管イベントへより近づくことは間違いない。もっとも問題視される川崎病既往例の遠隔期突然死を回避するために、長期フォローがどれほど重要であるかは明白である。

川崎病の発見から約50年の歳月が経ち、当初の川崎病既往児たちが中年へとさしかかる時期である。突然死からの検索により川崎病の既往が掘り起こされる現在の形は早々に終りにすべきであろう。川崎病既往を早発動脈硬化の危険因子として警鐘をならすことで、今後、遠隔期フォローの確実化を図り、1人でも多くが救命されることを期待したいところである。

文 献

- 1) Michiels C: Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196:430-443, 2003
- 2) Félétou M, Köhler R, Vanhoutte PM: Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep* 12:267-275, 2010
- 3) Mitani Y, Okuda Y, Shimpo H et al.: Impaired endothelial dysfunction in epicardial coronary arteries after Kawasaki disease. *Circulation* 96:454-461, 1997
- 4) Yamakawa R, Ishii M, Sugimura T et al.: Coronary endothelial dysfunction after Kawasaki disease: evaluation by intracoronary injection of acetylcholine. *J Am Coll Cardiol* 31:1074-1080, 1998
- 5) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al.: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 39:257-265, 2002
- 6) Benjamin EJ, Larson MG, Keys MJ et al.: Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 109:613-619, 2004
- 7) Munakata M, Ito N, Nunokawa T et al.: Utility of automated brachial ankle pulse wave velocity measurements in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 16:653-657, 2003
- 8) Munakata M, Nunokawa T, Tayama J et al.: Brachial-ankle pulse wave velocity as a novel measure of arterial stiffness: present evidences and perspective. *Curr Hypertens Rev* 12:223-234, 2005
- 9) Niboshi A, Hamaoka K, Sakata K et al.: Endothelial dysfunction in adult patients with a history of Kawasaki disease. *Eur J Pediatr* 167:189-196, 2008
- 10) Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S: Pathological study of postcoronary arteritis in adolescents and young adults: with reference to the relationship between sequelae of Kawasaki disease and atherosclerosis. *Pediatr Cardiol* 22:138-142, 2001
- 11) Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Komatsu K et al.: Active remodeling of the coronary arterial lesions in the late phase of Kawasaki disease: immunohistochemical study. *Circulation* 101:2935-2941, 2000
- 12) Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M et al.: Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation J* 73:411-418, 2009
- 13) Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ et al.: Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circulation J* 74:213-220, 2010
- 14) Fukazawa R, Ogawa S: Long-term prognosis of patients with Kawasaki disease: at risk for future atherosclerosis? *J Nippon Med Sch* 76:124-133, 2009
- 15) Gupta-Malhotra M, Gruber D, Abraham SS et al.: Atherosclerosis in survivors of Kawasaki disease. *J Pediatr* 155:572-577, 2009

著者連絡先

〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上路
梶井町465
京都府立医科大学小児循環器・腎臓病学
八幡倫代

特集 川崎病の本態にせまる—古くて新しい研究から—

I. 病態にせまる (研究成果から本態にせまる)
サイトカインネットワークから

はら とし ろう 原 寿 郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 (小児科)

要旨 川崎病の高サイトカイン血症は、その病態に重要な役割をはたしている。末梢血単核球ではおもに自然免疫系分子の発現が亢進し、S100A9, S100A12などのユニークなサイトカインを産生している。炎症性サイトカインの由来は血管組織と推定され、ヒト冠動脈内皮細胞やマウスを自然免疫受容体リガンドで刺激することにより、サイトカイン産生と川崎病類似の冠動脈炎を誘導させることを明らかにした。今後、新たな診断・治療・予防戦略の確立へとつながると考えられる。

Key words 血管内皮増殖因子, S100蛋白質, damage-associated molecular pattern molecule, Nod-like受容体

はじめに

川崎病は原因不明の全身性の血管炎で、高サイトカイン血症を呈する。川崎病では、TNF(tumor necrosis factor)- α , IL (interleukin)-1 β , IFN (interferon)- γ など炎症性サイトカインをはじめ、さまざまなサイトカイン、ケモカイン、増殖因子が上昇することが明らかになっている。それらサイトカイン、ケモカインや増殖因子には川崎病の病態、冠動脈瘤の発症に深く関係するものがあり、川崎病の病因を考えるうえでも重要である¹⁾²⁾。

血中サイトカイン・ケモカイン・増殖因子

急性期に上昇している血清中サイトカインではIL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α などが、ケモカインではCCL2(MCP-1), CCL5(RANTES)などが、また細胞増殖因子では血管内皮増殖因子

(vascular endothelial growth factor, 以下 VEGF と略す)や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, 以下 HGF と略す)などが報告されている³⁾。

1. 血管内皮増殖因子 (VEGF)

VEGFの産生細胞として、マクロファージ、平滑筋細胞などの多様な正常細胞の報告がある。VEGFは血管内皮細胞の増殖をはじめとした血管新生過程の促進、血管透過性の亢進作用を有することから、川崎病の四肢末端の浮腫性病変の病態との関連が推定されている³⁾⁴⁾。また、VEGFは単球・マクロファージの遊走、活性化にも関与していると報告されており、血中VEGFやHGFの高値は冠動脈瘤のリスクファクターであるという報告がある⁵⁾⁶⁾。

2. S100蛋白質ファミリー

S100蛋白質ファミリーは、カルシウムを結合することによりさまざまな細胞機能の調節に関与する多機能蛋白質である。ヒトではS100A (21種), S100B, S100G, S100P, S100Zの25種のメンバーにより構成される。そのうちS100Aに属す

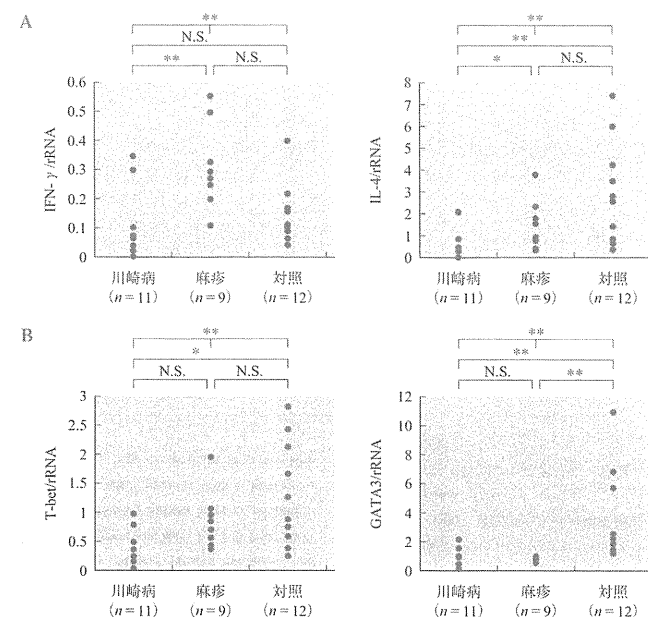


図1 川崎病患者末梢血単核球におけるTh1, Th2サイトカイン、転写因子の発現 (文献12)より引用
A: Th1サイトカイン (interferon- γ), Th2サイトカイン (interleukin-4)の発現
B: Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3) 転写因子の発現
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N.S.有意差なし

るS100A8, S100A9, S100A12はおもに活性化した単球/好中球により分泌され、サイトカインとして働き炎症と深く関係することが知られている⁷⁾。これらの濃度は川崎病急性期の全身の血管炎の重症度や免疫グロブリン (intravenous immunoglobulin 以下, IVIG と略す) 療法に対する反応性など、川崎病をモニターするうえで有用なマーカーとなるとの報告がある。また川崎病急性期において、S100蛋白質ファミリーが血管内皮細胞と結合し、組織傷害を及ぼしている可能性が示唆されている^{8)~10)}。

末梢単核球からのサイトカイン産生

従来、炎症性サイトカインをはじめとした多くのサイトカインは、活性化した単球やT細胞に由

来すると考えられていたが¹¹⁾、実際、それらがサイトカインを産生しているかどうかは検索されていなかった。われわれが川崎病急性期における患者の末梢血単核球中のTh1/Th2関連遺伝子発現を調べたところ、末梢血単核球ではIFN- γ , IL-4のTh1/Th2サイトカインの発現は低下しており、かつそれを誘導する転写因子であるT-bet/GATA-3の発現も低下していた (図1)¹²⁾。活性化したT細胞はすぐに末梢から組織に移行するという考えもあったので、末梢血を用いた研究の限界とも解釈された。しかし、活性化マーカーの中で早期に発現するCD69を用いて末梢血単核球を調べたところ、活性化されているのは自然免疫に関与する $\gamma \delta$ T細胞, NK細胞が主体で、獲得免疫に関与する $\alpha \beta$ T細胞の活性化はわずかであった。このよ

うな事実から、活性化したT細胞がすぐに末梢から組織に移り消えているのではないことを確信し、さらに末梢血単核球をDNAマイクロアレイで解析した。

川崎病患者の末梢血単核球のDNAマイクロアレイデータをパスウェイ解析すると、T細胞受容体シグナル経路、B細胞受容体シグナル経路などの獲得免疫の経路はすべて抑制され、Toll-like 受

容体経路、NK細胞関連細胞傷害性経路などの自然免疫系とサイトカイン経路の一部が活性化されていた(表1)¹³⁾。川崎病患者末梢血単核球でのサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子の発現を調べると、従来、単球由来と考えられていた炎症性サイトカインの発現上昇はほとんどなく、damage-associated molecular pattern molecule (以下、DAMPと略す)であるS100A9とS100A12、HGFなど特殊

なサイトカインのみが2倍以上上昇していた(表2)¹³⁾。

当初、HGFは肝細胞に特異的な増殖因子と考えられていたが、さまざまな上皮系細胞や血管内皮細胞などの増殖も促進することが明らかになった。HGF産生細胞としては線維芽細胞、平滑筋

細胞などが知られており、HGFの産生誘導因子の一つがIL-1やTNF- α などの炎症性サイトカインである。最近、注目されているHGFの作用としては血管新生促進作用があげられる。このことから、HGFは単なる増殖促進因子ではなく、その他にもさまざまな作用を有する多機能性因子で

表1 川崎病急性期の末梢血単核球のDNAマイクロアレイデータのパスウェイ解析 (文献13)より引用)

pathway name	input genes in pathway			impact factor	corrected gamma P value
	total	up	down		
antigen processing and presentation	7	0	7	51.621	2.01E-21
phosphatidylinositol signalling system	2	0	2	35.807	1.04E-14
circadian rhythm	3	0	3	22.942	2.60E-09
T cell receptor signalling pathway	14	0	14	18.903	1.23E-07
Toll-like receptor signalling pathway	14	6	8	18.526	1.76E-07
natural killer cell-mediated cytotoxicity	14	4	10	14.664	6.71E-06
ribosome	11	0	11	13.743	1.59E-05
apoptosis	10	3	7	13.426	2.13E-05
MAPK signalling pathway	17	4	13	10.964	2.07E-04
cytokine-cytokine receptor interaction	16	7	9	9.511	7.78E-04
Fe epsilon RI signalling pathway	8	3	5	9.323	9.22E-04
B cell receptor signalling pathway	7	0	7	8.690	0.00163044

表2 川崎病急性期の末梢血単核球に発現しているサイトカイン・ケモカイン遺伝子 (文献13)より引用)

遺伝子名	遺伝子機能	同義語	GenBank	fold difference
interleukin 1 beta	immune response	IL-1B	NM_000576	0.3
interleukin 2	immune response	IL-2	NM_000586	0.7
interleukin 4	regulation of immune response	IL-4	NM_000589	0.4
interleukin 6	inflammatory response	IL-6	NM_000600	0.5
interleukin 8	immune response	IL-8	NM_000584	0.2
interleukin 10	immune response	IL-10	NM_000572	0.8
tumour necrosis factor	inflammatory response	TNF	NM_000594	0.9
interferon gamma	regulation of immune response	IFN- γ	NM_000619	0.9
chemokine (C-C motif) ligand 2	inflammatory response	CCL2 (MCP1)	NM_002982	1.1
chemokine (C-C motif) ligand 4	immune response	CCL4 (MIP1B)	NM_002984	0.6
chemokine (C-C motif) ligand 5	immune response	CCL5 (RANTES)	NM_002985	0.4
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	immune response	CSF3	NM_172220	1.0
vascular endothelial growth factor A	cytokine activity	VEGFA	NM_001025366	0.4
hepatocyte growth factor	protein binding	HGF	NM_000601	2.8
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	inflammatory response	S100A9	NM_002965	3.9
S100 calcium binding protein A12	inflammatory response	S100A12	NM_005621	3.5

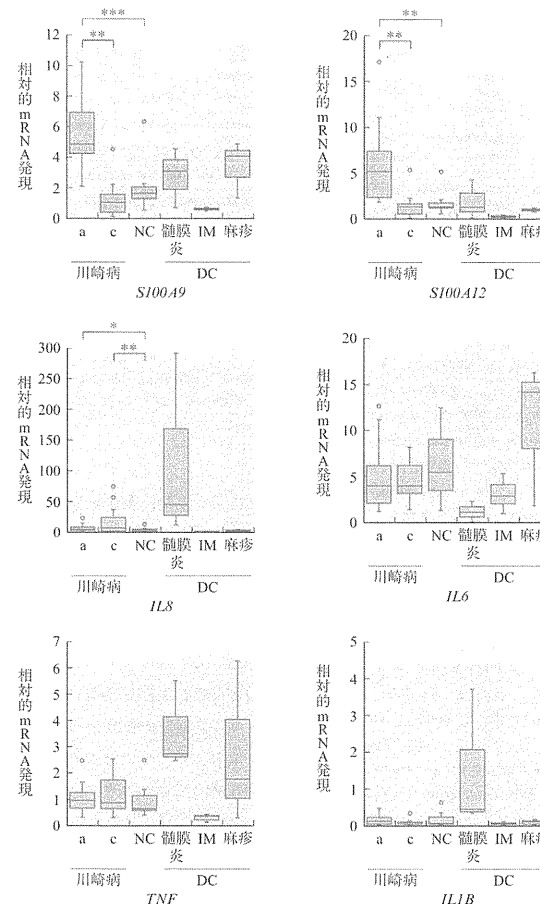


図2 定量的RT-PCR法による川崎病患者の主要サイトカイン遺伝子の発現解析 (文献13)より引用

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, a: acute phase, c: convalescent phase, NC: 正常コントロール, DC: 疾患コントロール, IM: 伝染性単核球症

あることがわかる。

マイクロアレイ解析のデータを裏づけるために、六つの主要なサイトカイン (S100A9, S100A12, IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β) の遺伝子発現について、定量的RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)法を用いて川崎病患者と正常対照 peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) において解析を行った。S100A9やS100A12遺伝子発現レベルは、川崎病回復期に比べ急性期で有意に高値を示した(図2)¹³⁾。IL8遺伝子発現レベルは正常対照に比べ、川崎病急性期および回復期でわずかながら上昇していた。TNF, IL1B, IL6遺伝子の発現レベルは、正常対照に比べ川崎病急性期や回復期で有意な上昇は認められなかった。また、川崎病患者の全血のDNAマイクロアレイデータにおいても、自然免疫系やS100A12遺伝子の発現上昇が認められている¹⁴⁾。

ヒト血管組織からのサイトカイン産生

川崎病は全身性の血管炎なので、血管内皮細胞、平滑筋細胞などからサイトカイン・ケモカインが産生され川崎病の病態に大きくかかわっていると考えられるが、いまだ証明はされていない。

川崎病モデルマウスにおける血管組織からのサイトカイン産生

自然免疫系の Toll-like 受容体, Nod-like 受容体 (以下, NLR と略す), RIG-I like 受容体, C-type lectin 受容体などは、その病原体がもつ固有の構造を認識する pattern-recognition 受容体 (PRRs) である。われわれは自然免疫にかかわるさまざまなリガンドでヒト冠動脈内皮細胞を刺激したところ、NLR のリガンドでサイトカイン産生が増加することがわかった。さらに、NLR リガンドをマウスに皮下投与あるいは内服投与したところ、好中球、マクロファージを中心とした増殖性肉芽腫様炎症像を特徴とする川崎病類似の冠動脈炎を発症することがわかった (図3)。このリガンドは単球を軽度活性化するのみで、獲得免疫系のリンパ球はほとんど活性化しない。NLR リガンドを投与したマウスを解析したところ、本モデルマウスにおける冠動脈炎発症メカニズムは、まずリガンドが冠動脈構成細胞に直接作用し、IL-6 や CCL2, CLL5 などのサイトカイン・ケモカインを放出するとともに接着分子を発現し、それにより炎症細胞の誘導をひきおこし、浸潤炎症細胞からさらに大量のサイトカイン・ケモカインなどが放出され、炎症が増幅されて冠動脈炎が発症すると考えられた¹⁵⁾。

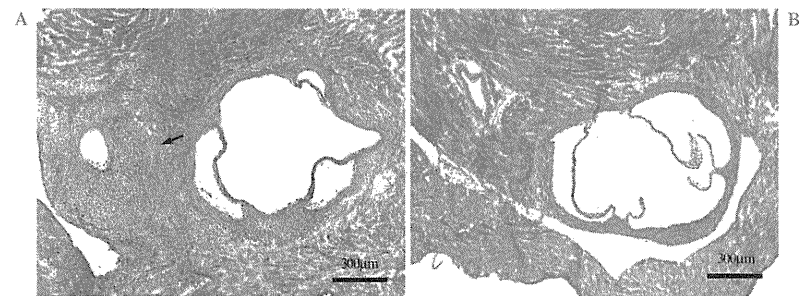


図3 NLR リガンドを用いた冠動脈炎モデル (A: NLR リガンド投与マウス, B: コントロールマウス)
→: 冠動脈に著明な細胞浸潤が認められる

今後

川崎病の高サイトカイン血症は、その免疫病態に重要な役割をはたしている。末梢血単球は川崎病において活性化していると考えられているが、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1 β) でなく DAMPs である S100A9, S100A12 などのユニークなサイトカインを産生していた。川崎病の高サイトカイン血症の由来は多くは末梢血単球ではなく血管組織と推定され、NLR リガンドを用いた川崎病モデルマウスにより再現できた。微生物由来 NLR リガンドがなんらかの刺激により大量産生され川崎病を発症する可能性が推定されており、現在、川崎病特異的物質の構造解析中である。今後、病因の解明、新たな治療戦略の確立へとつながると考えられる。

文献

- 1) 寺井 勝: 川崎病. 小児科 49:2191-2196, 2008
- 2) 阿部 淳: 川崎病の病態肥育-サイトカインと免疫異常の関与. 小児内科 41:26-29, 2009
- 3) Terai M, Yasukawa K, Narumoto S et al.: Vascular endothelial growth factor in acute Kawasaki disease. Am J Cardiol 83:337-339, 1999
- 4) Yasukawa K, Terai M, Shulman ST et al.: Systemic production of vascular endothelial growth factor and *fms*-like tyrosine kinase-1 receptor in acute Kawasaki disease. Circulation 105:766-769, 2002
- 5) Ohno T, Igarashi H, Inoue K et al.: Serum vascular endothelial growth factor: a new predictive indicator for the occurrence of coronary artery lesions in Kawasaki disease. Eur J Pediatr 159:424-429, 2000
- 6) Ohno T, Yuge T, Kariyazono H et al.: Serum hepatocyte growth factor combined with vascular endothelial growth factor as a predictive indicator for the occurrence of coronary artery lesions in

Kawasaki disease. Eur J Pediatr 161:105-111, 2002

- 7) Sedaghat F, Notopoulos A: S100 protein family and its application in clinical practice. Hippokratia 12:198-204, 2008
- 8) Ye F, Foell D, Hirono KI et al.: Neutrophil-derived S100A12 is profoundly upregulated in the early stage of acute Kawasaki disease. Am J Cardiol 94:840-844, 2004
- 9) Ebihara T, Endo R, Kikuta H et al.: Differential gene expression of S100 protein family in leukocytes from patients with Kawasaki disease. Eur J Pediatr 164:427-431, 2006
- 10) Foell D, Ichida F, Vogl T et al.: S100A12 (ENRAGE) in monitoring Kawasaki disease. Lancet 361:1270-1272, 2003
- 11) 古川 漸, 古賀まゆみ: 川崎病における高サイトカイン血症と単球の微細構造. Mol Med 33:1062-1069, 1996
- 12) Kimura J, Takada H, Nomura A et al.: Th1 and Th2 cytokine production is suppressed at the level of transcriptional regulation in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 137:444-449, 2004
- 13) Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T et al.: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 160:246-255, 2010
- 14) Popper SJ, Shimizu C, Shike H et al.: Gene-expression patterns reveal underlying biological processes in Kawasaki disease. Genome Biol 8:R261, 2007
- 15) Nishio H, Kanno S, Onoyama S et al.: Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31:1093-1099, 2011

著者連絡先

〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1
九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野
(小児科)
原 寿郎

Nod1 Ligands Induce Site-Specific Vascular Inflammation

Hisanori Nishio, Shunsuke Kanno, Sagano Onoyama, Kazuyuki Ikeda, Tamami Tanaka, Koichi Kusuhara, Yukari Fujimoto, Koichi Fukase, Katsuo Sueishi and Toshiro Hara

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011, 31:1093-1099; originally published online February 17, 2011

doi: 10.1161/ATVBAHA.110.216325

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
<http://atvb.ahajournals.org/content/31/5/1093>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2011/02/17/ATVBAHA.110.216325.DC1.html>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Nod1 Ligands Induce Site-Specific Vascular Inflammation

Hisanori Nishio, Shunsuke Kanno, Sagano Onoyama, Kazuyuki Ikeda, Tamami Tanaka, Koichi Kusuhara, Yukari Fujimoto, Koichi Fukase, Katsuo Sueishi, Toshiro Hara

Objective—The goal of this study was to investigate the effects of stimulants for a nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing (NLR) protein family on human artery endothelial cells and murine arteries.

Methods and Results—Human coronary artery endothelial cells were challenged in vitro with microbial components that stimulate NLRs or Toll-like receptors. We found stimulatory effects of NLR and Toll-like receptor ligands on the adhesion molecule expression and cytokine secretion by human coronary artery endothelial cells. On the basis of these results, we examined the in vivo effects of these ligands in mice. Among them, FK565, 1 of the nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)-1 ligands induced strong site-specific inflammation in the aortic root. Furthermore, coronary arteritis/valvulitis developed after direct oral administration or ad libitum drinking of FK565. The degree of the respective vascular inflammation was associated with persistent high expression of proinflammatory chemokine/cytokine and matrix metalloproteinase (*Mmp*) genes in each tissue in vivo by microarray analysis.

Conclusion—This is the first coronary arteritis animal model induced by oral administration of a pure synthetic Nod1 ligand. The present study has demonstrated an unexpected role of Nod1 in the development of site-specific vascular inflammation, especially coronary arteritis. These findings might lead to the clarification of the pathogenesis and pathophysiology of coronary artery disease in humans. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1093-1099.)

Key Words: coronary artery disease ■ immune system ■ Kawasaki disease ■ pathology ■ coronary arteritis ■ inflammation

Germ-line encoded pattern-recognition receptors of the innate immune system sense exogenous microbial components and endogenous danger signals to protect the host.¹⁻⁴ The pattern-recognition receptors include Toll-like receptors (TLRs), retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors, the leucine-rich repeat-containing (NLR) protein family, and as-yet-undefined pattern-recognition receptors that recognize double-stranded DNA.^{1,3} The TLR, RIG-I-like receptor, and NLR families consist of 10 (human), 3, and more than 20 members, respectively.^{1,3,4}

In the cardiovascular system, endothelial cells are usually the first among the structural cells to sense microbial components through pattern-recognition receptors. Human endothelial cells express functional innate immune receptors, such as TLRs and NLRs.^{5,6} There is a line of evidence that activation of TLRs, especially TLR4 and TLR2, contributes to the development and progression of cardiovascular diseases, including atherosclerosis, cardiac dysfunction in sepsis, and congestive heart failure.⁷ With respect to NLRs, only a limited number of studies have shown that human endothelial cells express functional NLRs, nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) and NOD2. *Chlamydomonas pneumoniae* and *Listeria monocytogenes* elicited NOD1-

dependent interleukin (IL)-8 production in endothelial cells.^{8,9} A selective NOD1 ligand, FK565, but not a selective NOD2 ligand, muramyl dipeptide (MDP), induced nitric oxide synthase-II protein/activity and vascular hyporeactivity ex vivo and shock in vivo.¹⁰

Because innate immunity has been suggested to be involved in the pathogenesis or pathophysiology of cardiovascular diseases in adults,⁷ as well as vasculitis in Kawasaki disease (KD) in children,¹¹ we have investigated the effects of stimulants for innate immune receptors, especially TLRs and NODs, on human artery endothelial cells in vitro and murine arteries in vivo. We found the stimulatory effects of pure NOD1 and NOD2 ligands on coronary artery endothelial cells in vitro and the induction of coronary arteritis by oral or parenteral administration of a pure selective NOD1 ligand with or without a microbial component in mice in vivo. This evidence indicates a possible linkage between an innate immune receptor, NOD1, and cardiovascular disorders.

Methods

Histological Evaluation

All organs were isolated using a Leica M500 ophthalmology microscope. Cryostat sections were used for the correct detection of 3 aortic valve cusps in these studies.

Received on: September 14, 2010; final version accepted on: February 1, 2011.

From the Departments of Pediatrics (H.N., S.K., S.O., K.I., T.T., T.H.) and Pathophysiological and Experimental Pathology (H.N., K.S.), Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka; Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Kitakyushu (K.K.); Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan (Y.F., K.F.); Japan Society for the Promotion of Science (T.H.), Tokyo, Japan.

Correspondence to Toshiro Hara, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan. E-mail harat@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp

© 2011 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.216325

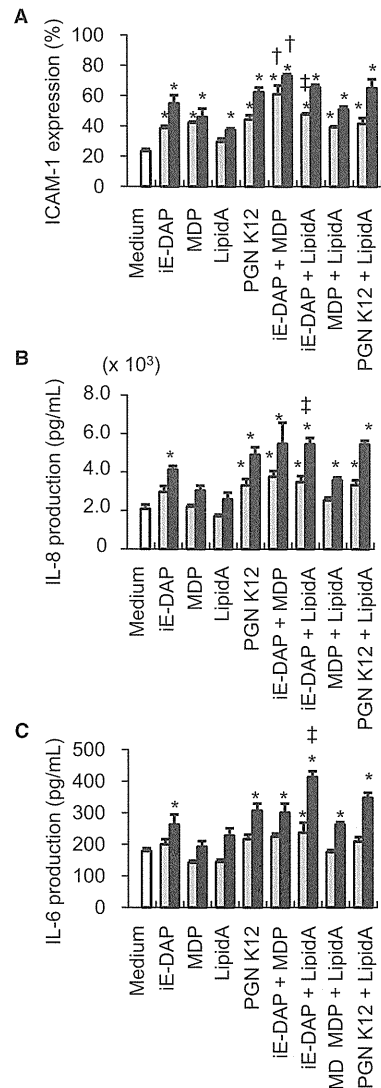


Figure 1. Effects of innate immune stimulants on HCAEC. HCAEC (1×10^4 cells) were incubated with NOD1, NOD2, TLR, and other stimulants in various combinations. ICAM-1 expression

Severity of coronary arteritis was assessed by the cross-section with 3 aortic valve cusps as described,¹² defined as follows: - indicates no inflammatory infiltration in the whole layer (from intima to adventitia) of nearest coronary arteries from aorta or in the aorta; + indicates that less than one third of the circumference showed inflammatory infiltration in the whole layer; 2+, between one third and two thirds; 3+, more than two thirds.

For a detailed description of methods, please see the supplemental materials, available online at <http://atvb.ahajournals.org>.

Results

NOD Ligands Enhance Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression and Cytokine Production by Human Coronary Artery Endothelial Cells In Vitro

To investigate the direct effects of innate immune stimulants on the endothelial cells, human coronary artery endothelial cells (HCAEC) were challenged in vitro with microbial cell wall components that stimulate TLRs and NLRs. After preliminary time course studies (data not shown), we analyzed the effects of each reagent on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) expression and cytokine secretion by HCAEC on day 3. Significant ICAM-1 expression and IL-8 secretion were induced by a pure synthetic Nod1 ligand, γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP); a pure synthetic Nod2 ligand, MDP; a pure synthetic TLR4 ligand, lipopolysaccharide (LPS) lipid A; and a TLR2 ligand, peptidoglycan from *Escherichia coli* K12 in HCAEC (Figure 1). Because synergistic effects of NLR and TLR ligands were observed in human cells,¹³ we analyzed the effects of various components in combination on HCAEC. Enhanced ICAM-1 expression and cytokine production were observed by combined stimulation with pure synthetic iE-DAP plus MDP or iE-DAP plus lipid A in HCAEC. No release of IL-1 β , IL-10, tumor necrosis factor- α , or IL-12p70 was observed by any combination in HCAEC (data not shown). These results clearly demonstrate that pure synthetic Nod1 and Nod2 ligands and TLR ligands activate human artery endothelial cells in vitro.

To rule out possible secondary effects of NOD stimulation on the day 3 experiment, we performed experiments on day 1 as well. Similar additive effects were observed between NOD1 and TLR4 ligands on day 1 (Supplemental Figure IA). In addition, NOD1 small interfering RNA completely inhibited additive effects of NOD1 and TLR4 ligands on day 1 experiments (Supplemental Figure IB). Thus, the additive effect between NOD1 and TLR4 ligands appeared to be not secondary but primary.

Nod1 Ligands Induce Site-Specific Inflammation In Vivo in Mice

Based on these in vitro results, we examined the in vivo effects of a pure synthetic Nod1 ligand (FK565), MDP, LPS, peptidoglycan from *E. coli* K12, and another bacterial com-

(A) and IL-8 (B)/IL-6 (C) production in the culture supernatants were investigated in triplicate on day 3. The concentrations of stimulants are as follows: iE-DAP, MDP, and peptidoglycan from *E. coli* K12 (PGN K12), 1 (gray bars) or 10 (black bars) μ g/mL; lipid A 10 (gray bars) or 100 (black bars) ng/mL. Data are presented as mean \pm SD. * $P < 0.01$ compared with medium, † $P < 0.01$ compared with either iE-DAP or MDP, ‡ $P < 0.01$ compared with either iE-DAP or lipid A (Dunnett test).

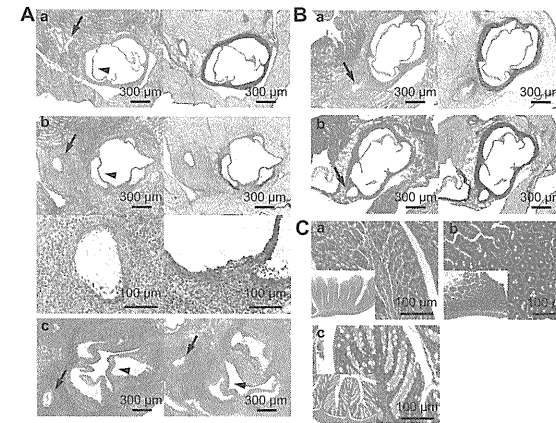


Figure 2. Histopathologic changes after administration of Nod1 ligand in BALB/c, SCID, and Nod1 knockout mice. A, a, Cross sections with 3 aortic valve cusps of a BALB/c mouse treated with 100 μ g of LPS IP 4 times (Supplemental Table IA). Severity of coronary arteritis: grade 0. Left, hematoxylin and eosin stain; right, elastic Van Gieson stain. b, Grade 3+ coronary arteritis/valvulitis of the mouse subcutaneously challenged by FK565 (500 μ g) with LPS priming weekly 4 times. Upper panels, hematoxylin-eosin stain (left) and elastic Van Gieson stain (right); magnification, $\times 40$. Lower panels, coronary artery (left) and aortic valve (right) in hematoxylin-eosin stain; magnification, $\times 200$. c, Grade 3+ coronary arteritis and valvulitis of FK565-orally administered mouse without LPS priming (left, 100 μ g once a day, 6 days/week, 4 weeks; right, tap water ad libitum, 120 μ g/day, 4 weeks), hematoxylin-eosin stain; magnification, $\times 40$. Coronary arteritis and aortitis including valvulitis were histopathologically characterized by panarteritis with dense inflammatory infiltrate. Neither aneurysmal dilatation nor thrombus was associated. Control mice did not show any vasculitis by either tap water ad libitum or oral administration of water alone. Coronary artery and aortic valves are indicated by arrows and arrow heads, respectively. B, SCID mice (a) and Nod1^{-/-} mice (b) were treated with FK565 with LPS priming, as shown in Supplemental Table IB. Grade 3+ coronary arteritis/valvulitis and no coronary arteritis/valvulitis are shown in SCID mice and Nod1^{-/-} mice, respectively. Shown are hematoxylin-eosin stain (left) and elastic Van Gieson stain (right). Coronary artery is indicated by arrows. C, Oral administration of FK565 (100 μ g for 6 consecutive days) after LPS priming induces no inflammation in the gut mucosa. a, Stomach (magnification: large panel, $\times 200$; small panel, $\times 40$). b, Small intestine (magnification: large panel, $\times 200$; small panel, $\times 100$). c, Colon (magnification: large panel, $\times 200$; small panel, $\times 100$).

ponent or bacteria (zymosan, OK432) on the artery endothelial cells in mice. As a Nod1 ligand, FK565 was mainly used for in vivo studies instead of iE-DAP or FK156, because FK565 is generally most effective among Nod1 ligands and showed stronger effects on HCAEC (Supplemental Figure II). ICAM-1 expression and cytokine production by HCAEC were enhanced by the combined addition of LPS (Figure 1), and priming with LPS upregulated the expression levels of TLR gene, resulting in the enhancement of innate immune response to peptidoglycan in mice.¹⁴ Therefore, BALB/c mice were intraperitoneally primed with or without LPS, and 24 hours later, each reagent was injected 4 times at an interval of 1 week (Supplemental Table IA). Subcutaneous injection of MDP, peptidoglycan from *E. coli* K12, zymosan, or OK432 with LPS priming or LPS priming alone did not induce any cellular infiltration in the arteries (Supplemental Table IA and Figure 2Aa). On the other hand, when mice were subcutaneously injected by FK565 (500 μ g) with LPS priming, diffuse cellular infiltration was observed in the aortic root, including aortic valves and the origin of coronary arteries in all mice (Figure 2Ab). The histopathologic features of this coronary arteritis model were characterized by panarteritis with dense inflammatory infiltrate consisting mainly of neutrophils and macrophages (Supplemental Figure III) and not associated with fibrinoid necrosis, similar to those in the acute phase of KD,¹⁵ which is an acute febrile illness of childhood characterized by the occurrence of vasculitis, especially coronary arteritis and valvulitis. This model did not show coronary aneurysm, but the rupture of elastic fiber in coronary artery was observed, just as in KD. Formation of

neither thrombus nor granuloma was recognized in aortic and coronary lesions of all experimental mice. MDP, by itself, did not induce coronary arteritis at 500 μ g, but the enhancement of the effect of Nod1 agonist by MDP became apparent when MDP was added to suboptimal doses of FK565 (200 and 100 μ g). Vascular inflammation was not observed in pulmonary, celiac, renal, or other arteries, whereas mild cellular infiltration was observed in other parts of aorta and in common carotid and subclavian arteries (data not shown). Subcutaneous injection of iE-DAP or FK156 induced a slight inflammatory reaction (data not shown), whereas that of FK565 induced highly reproducible and remarkable inflammation in the aortic root, indicating that the effects of Nod1 agonists vary greatly in vivo, depending on the chemical structure of Nod1 agonist used. FK565 administration induced arteritis of the similar severities and frequencies in other strains, such as C57B/6, DBA/2, CD1, CBA/J, and CH3 (data not shown). Severe combined immunodeficiency (SCID) mice developed weaker but significant arteritis, suggesting a partial involvement of acquired immunity in the inflammation induced by a pure Nod1 ligand, whereas no arteritis was observed in Nod1-knockout mice (Supplemental Table IB and Figure 2B).

As FK565 is highly stable and effective by parenteral and oral routes,¹⁶ FK565 was orally administered (Supplemental Table IC). All BALB/c mice showed coronary arteritis/valvulitis after oral administration of 6 days (100 μ g/day) per week of FK565 with LPS priming, and the severity of coronary arteritis/valvulitis increased with the duration of the administration. Even in the absence of LPS priming, 4 of 5 mice developed severe

ICAM-1 expression and CCL2/IL-8 production in HCAEC, suggesting a possible role of these bacterial components in the pathogenesis of vasculitis.

In addition, coronary arteritis was induced in vivo in mice by selective Nod1 ligands, FK565, FK156, and iE-DAP. Nod2 ligand showed a significant effect on the development of coronary arteritis when the FK565 dose was suboptimal. The induction of coronary arteritis by Nod1 ligand was enhanced by various microbial components, such as TLR4 ligand (LPS). These findings can be explained by synergistic effects of Nod1 ligands with TLR agonists to produce inflammatory cytokines.¹⁹

The pathological findings of Nod1 ligand-induced coronary arteritis in mice were consistent with those of human coronary artery lesions in acute-phase KD, which showed edema and a dominant infiltration of neutrophils with some macrophages and lymphocytes at early stages (until 9 days after KD onset).²⁰ No animal models of coronary arteritis have been reported with a pure or synthetic reagent.

On the basis of the fact that a Nod1 agonist, FK565, is very stable against temperature and acid,¹⁶ coronary arteritis was successfully induced by oral administration of FK565. This is the first coronary arteritis animal model induced by oral administration of a pure synthetic Nod1 ligand. Absorption site of FK565 is not clear, but it is possible that gut mucosa is a major site because there were no great differences in the efficiencies of the induction of coronary arteritis between direct oral administration of FK565 solution and ad libitum drinking of FK565-containing tap water.

Nod1 stimulants include *meso*-DAP and *meso*-L-anthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, iE-DAP, L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP (TriDAP), FK156, FK565, GlcNAc-(β 1 to 4)-(anhydro)MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP, bacterial extracts (*Bacillus* species, *Bacillus anthracis* spores, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*), and live microbes (*S. flexneri*, *Helicobacter pylori*, enteroinvasive *E. coli*, *Pseudomonas* species, *Chlamydia* species, *L. monocytogenes*).^{4,21–24} Nod1 agonists are considered to be derived from peptidoglycans of most Gram-negative and some Gram-positive bacteria²⁵ and *Chlamydia*.^{4,21,22} although major natural Nod1 stimulants produced by bacteria remain unknown.²⁶ Biologically active peptidoglycan fragments are released during growth by Gram-negative bacteria (*E. coli* breaks down nearly 50% of its peptidoglycan every generation).²⁷ As peptidoglycan is constantly turned more than²⁷ and partly translocated across the gut mucosa into the circulation,²³ NOD1 agonists in water-soluble or water-insoluble (lipophilic) forms,²⁶ together with various microbial components, may be released from normal or pathological microbiota, which contains 10¹⁴ microbes, which are estimated to weigh 1 kg in an adult human, in the gastrointestinal tract, airways, genitourinary tract, ducts of exocrine glands, and skin.^{28–30}

Site-specific vascular inflammation was not related to Nod1 expression levels but appeared to be due to a site-specific production of chemokine/cytokine by respective vascular structures, because ex vivo organ culture in the presence of FK565 showed a site-dominant production of CCL2 and IL-6, as shown in Figure 4. It is likely that higher expression levels of chemokine and *Mmp* genes in vivo FK565-treated aortic root than in

ex vivo FK565-treated one by microarray analysis suggested an amplification of inflammation by the migration of inflammatory cells in a site-specific manner.

The site-specific nature of arterial inflammation in response to Nod1 ligand might be explained by a difference in the expression levels of certain molecules involved in Nod1 signaling pathway, such as receptor interacting protein-2, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor- κ B, and their inhibitors or activators.^{1,3,4} Among them, A20 (tumor necrosis factor- α -induced protein 3) is a candidate because it is a negative regulator of TLR and NLR signaling via nuclear factor- κ B³¹ and is significantly related to intestinal innate immunity, including LPS tolerance.^{32,33} Considering that oral administration of Nod1 ligand does not induce inflammation in gut mucosa or in many arteries, such as pulmonary artery, it is possible that a certain Nod1-specific regulatory mechanism, such as A20, is responsible for the inhibition of Nod1 signaling.^{31,34} Further study is going on to identify which molecule in Nod1 signaling pathway is responsible for the site-specific effect of Nod1 ligand by the extensive comparison of inflammatory and noninflammatory tissues and the use of knockout or transgenic mice.

The present study has been the first to demonstrate an unexpected role of Nod1 in the development of site-specific vascular inflammation, especially coronary arteritis and valvulitis. These findings might lead to clarification of the pathogenesis and pathophysiology of coronary artery and valvular lesions in KD in children and coronary artery disease in adults.

Acknowledgments

The authors are thankful to H. Fujii and C. Arimatsu for technical assistance, J. Kishimoto for statistical analyses, and T. Sasazuki for critical discussions of the manuscript.

Sources of Funding

This work was supported by grants from the Japan Society for the Promotion of Science and from the Health and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

Disclosures

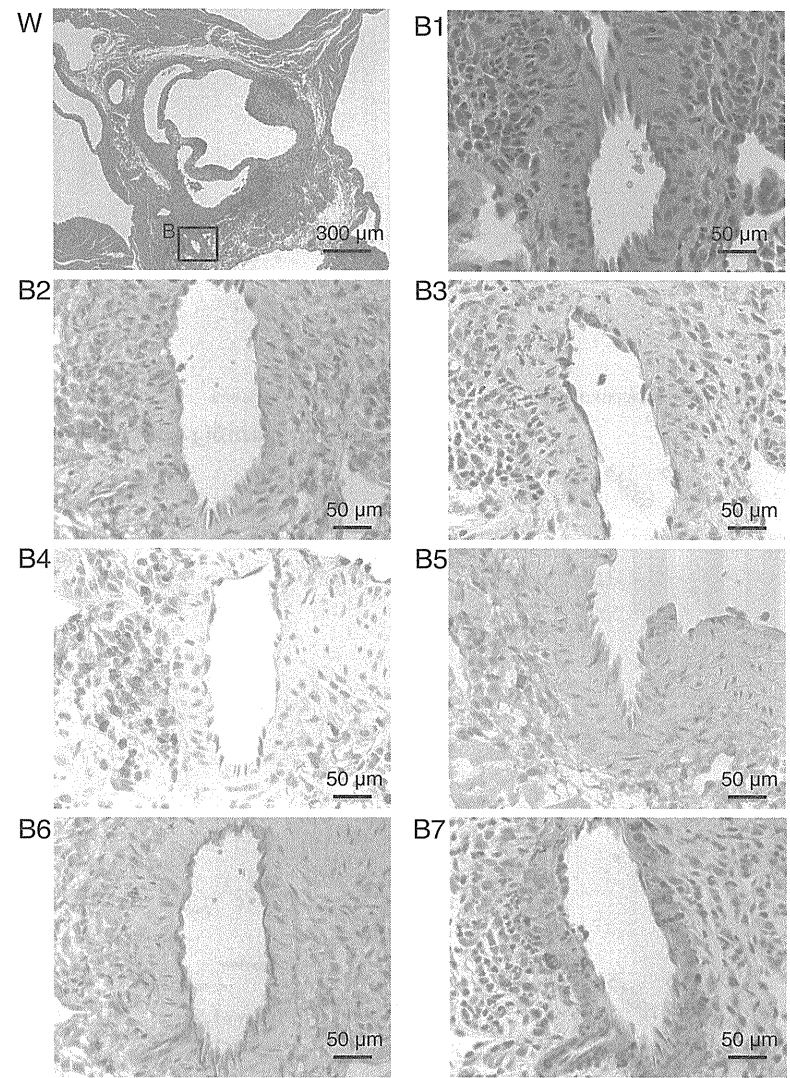
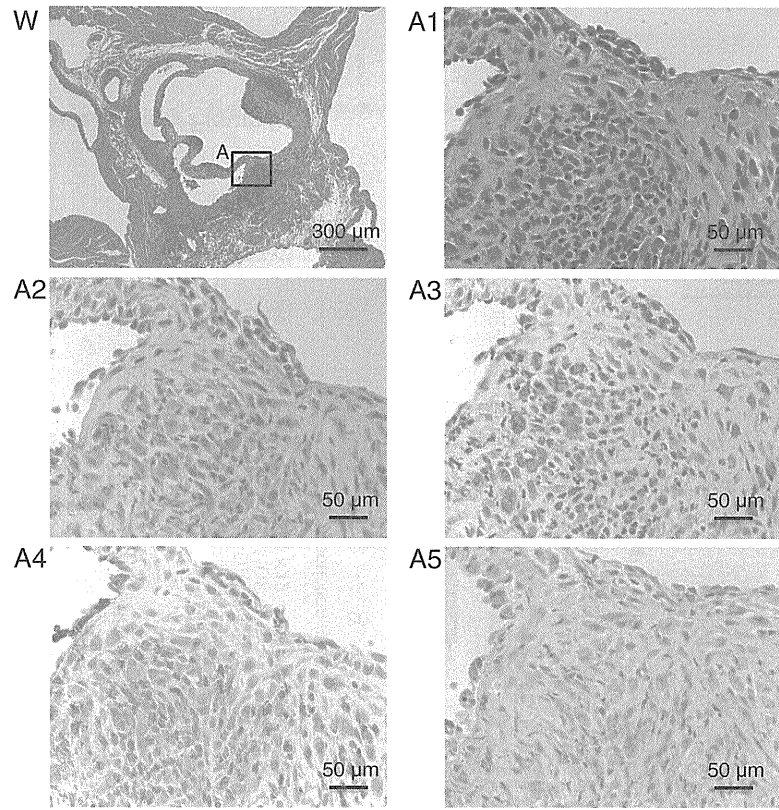
None.

References

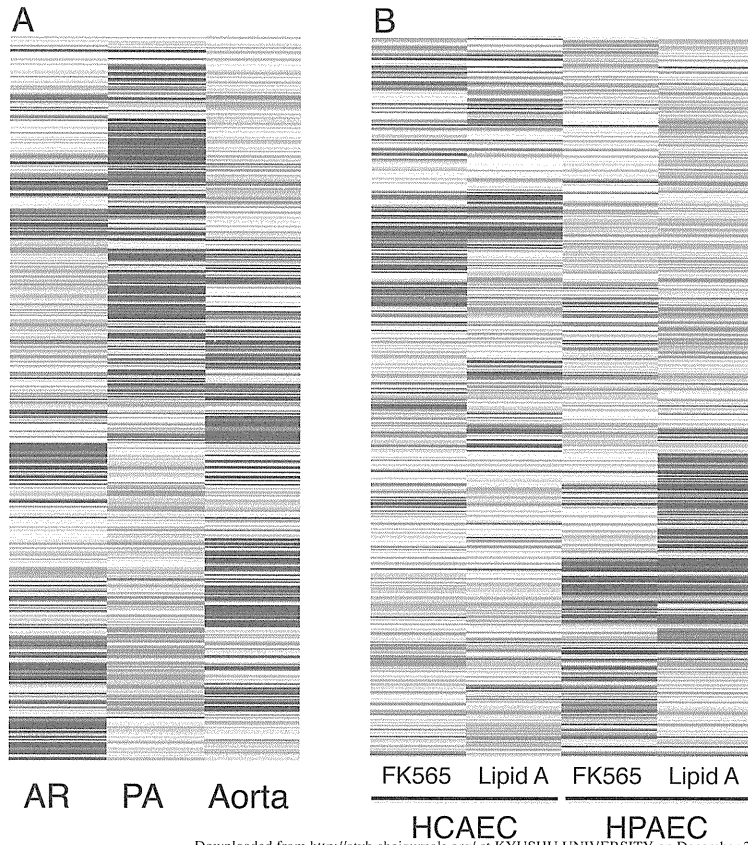
- Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21:317–337.
- Geddes K, Magalhães J, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8:465–479.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140:805–820.
- Williams A, Flavel RA, Eisenbarth SC. The role of NOD-like receptors in shaping adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:34–40.
- Mitchell JA, Rytzel B, Quesniaux VF, Cartwright N, Paul-Clark M. Role of pattern-recognition receptors in cardiovascular health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:1449–1452.
- Opitz B, Eitel J, Meixnerberger K, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost*. 2009;102:1103–1109.
- Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4:444–454.
- Opitz B, Förster S, Hocke AC, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Krüll M. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydia pneumoniae*. *Circ Res*. 2005;96:319–326.
- Opitz B, Püschel A, Beermann W, Hocke AC, Förster S, Schmeck B, van Laak V, Chakraborty T, Suttorp N, Hippenstiel S. *Listeria monocytogenes*

- activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol*. 2006;176:484–490.
- Cartwright N, Murch O, McMaster SK, Paul-Clark MJ, van Heel DA, Rytzel B, Quesniaux VF, Evans TW, Thiemeermann C, Mitchell JA. Selective NOD1 agonists cause shock and organ injury/dysfunction in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:595–603.
- Ikedo K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizano Y, Hijikata A, Ohara T, 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.
- Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 1987;68:231–240.
- Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*. 2005;73:7967–7976.
- Matsuda N, Yamazaki H, Takano K, Matsui K, Takano Y, Kemmotsu O, Hattori Y. Priming by lipopolysaccharide exacerbates acute lung injury and mortality in responses to peptidoglycan through up-regulation of Toll-like receptor-2 expression in mice. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:1065–1075.
- Kawasaki T. Kawasaki disease. *Proc Jpn Acad Ser B*. 2006;82:59–71.
- Mine Y, Yokota Y, Wakai Y, Fukada S, Nishida M, Goto S, Kuwahara S. Immunoreactive peptides, FK-156 AND FK-565: I: enhancement of host resistance to microbial infection in mice. *J Antibiot*. 1983;36:1045–1050.
- Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, Carmeliet P, Iruela-Arispe ML. VE-cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn*. 2006;235:759–767.
- Csiszar A, Labinskyy N, Jo H, Ballabh B, Ungvari Z. Differential pro-inflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H569–H577.
- Park JH, Kim YG, Shaw M, Kaneganti TD, Fujimoto Y, Fukase K, Inohara N, Núñez G. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol*. 2007;179:514–521.
- Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S, Wakayama M, Yokouchi Y. Neutrophil involvement in the damage to coronary arteries in acute stage of Kawasaki disease. *Pediatr Int*. 2005;47:305–310.
- Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*. 2006;7:1250–1257.
- Franchi L, Warner N, Viani K, Núñez G. Function of NOD-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*. 2009;227:106–128.

- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med*. 2010;16:228–231.
- Praditpa AR, Fujimoto Y, Hasegawa M, Inohara N, Fukase K. Characterization of natural human nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (NOD1) ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment. *J Biol Chem*. 2010;285:23607–23613.
- Hasegawa M, Yang K, Hashimoto M, Park JH, Kim YG, Fujimoto Y, Núñez G, Fukase K, Inohara N. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J Biol Chem*. 2006;281:29054–29063.
- Hasegawa M, Kawasaki A, Yang K, Fujimoto Y, Masumoto J, Breukink E, Núñez G, Fukase K, Inohara N. A role of lipophilic peptidoglycan-related molecules in induction of Nod1-mediated immune responses. *J Biol Chem*. 2007;282:11757–11764.
- Cloud-Hansen KA, Peterson SB, Stabb EV, Goldman WE, McFall-Ngai MJ, Handelsman J. Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:710–716.
- Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 2010;140:859–870.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3:431–438.
- Taskalová-Hogenová H, Stepanková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Ledínová-Zádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Fanda DP, Borovská D, Reháčková Z, Sínková J, Hofmann J, Draštic P, Kokesová A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2004;93:97–108.
- Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Núñez G, Inohara N. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- κ B activation. *EMBO J*. 2008;27:373–383.
- Wang J, Ouyang Y, Guner Y, Ford HR, Grisham AV. Ubiquitin-editing enzyme A20 promotes tolerance to lipopolysaccharide in enterocytes. *J Immunol*. 2009;183:1384–1392.
- Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, Kadota C, Moriyama I, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y. A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signaling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2009;139:185–198.
- Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsunatsu O, Advincula R, Lee B, Shifrin N, Malynn BA, Ma A, Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J Exp Med*. 2008;205:451–464.



Supplementary Figure III



Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> at KYUSHU UNIVERSITY on December 20, 2011

Supplementary Figure IV

Supplementary Table I. Induction of coronary arteritis by microbial reagents.

A

Reagents	Dose (/mouse)	Administration route	Priming (LPS ip)	Number of Administration	Severity of CA	Incidence of CA+No./	SI score
None	-	-	20 or 50µg/w	4 times	-,-,-	0/3	0
None	-	-	100µg/w	4 times	-,-,-	0/3	0
Zymosan	500µg/w	sc	20µg	4 times	-,-,-	0/3	0
OK432	1KE/w	sc	20µg	4 times	-,-,-	0/3	0
PGN K12	500µg/w	sc	20µg	4 times	-,-,-	0/3	0
MDP	500µg/w	sc	20µg	4 times	-,-,-	0/3	0
FK565	500µg/w	sc	20µg	4 times	3+, 3+, 3+	3/3	9
FK565	500µg/w	sc	-	4 times	+,-,-	1/3	1
FK565	200µg/w	sc	20µg	4 times	+,-,-	1/3	1
FK565	100µg/w	sc	20µg	4 times	-,-,-	0/3	0
FK565+MDP	500µg, 500µg/w	sc	20µg	4 times	3+, 3+, 3+	3/3	9
FK565+MDP	200µg, 200µg/w	sc	20µg	4 times	3+, 2+,-	2/3	5
FK565+MDP	100µg, 100µg/w	sc	20µg	4 times	+,-,-	2/3	2

B

Mouse	Reagent/ Dose (/mouse)	Administration route	Priming (LPS ip)	Number of Administration	Severity of CA	Incidence of CA+No./	SI score
SCID	-	-	-	4 times	-,-,-	0/3	0
SCID	FK565/ 500µg/w	sc	-	4 times	2+, +,-,-	2/5	3
SCID	FK565/ 500µg/w	sc	+	4 times	3+, 2+, +, +, +	5/5	8
Nod1 ^{-/-}	-	-	+	4 times	-,-,-	0/3	0
Nod1 ^{-/-}	FK565/ 500µg/w	sc	+	4 times	-,-,-,-	0/5	0

C

Reagents	Dose (/mouse)	Administration route	Priming (LPS ip)	Duration of Administration	Severity of CA	Incidence of CA+No./	SI score
-	-	-	+	4 w	-,-,-,-	0/5	0
FK565	25µg x 6 times/w	po	+	1 w	+,-,-,-	2/5	2
FK565	50µg x 6 times/w	po	+	1 w	-,-,-,-	0/5	0
FK565	100µg x 6 times/w	po	+	1 w	2+, 2+, +, +, +	5/5	7
FK565	100µg x 6 times/w	po	+	2 w	3+, 3+, 2+, 2+, +	5/5	11
FK565	100µg x 6 times/w	po	+	3 w	3+, 3+, 2+, 2+, 2+	5/5	12
FK565	100µg x 6 times/w	po	+	4 w	3+, 3+, 3+, 3+, 2+	5/5	14
FK565	100µg x 6 times/w	po	-	4 w	3+, 3+, 3+, 2+,-	4/5	11

Panel A shows the incidence and severities of coronary arteritis (CA) in response to various microbial reagents. BALB/c mice were primed with or without LPS, and 1 day later the mice were subcutaneously challenged with each reagent. Injections were repeated weekly, and mice were sacrificed 1 week after the last administration. Panel B shows the incidence and severities of CA in SCID or Nod1^{-/-} mice. Each mouse was primed with or without LPS ip priming (10µg; dose reduction due to high sensitivity), and 1 day later challenged with with or without sc FK565 (500µg). Injections were repeated weekly, and mice were sacrificed 1 week after the last administration. Panel C shows the induction of CA by various doses and durations of oral administration of FK565 with or without LPS ip priming (20µg). BALB/c mice were primed with or without LPS and 1 day later challenged with oral administration of FK565 for 6 consecutive days (1 week course). Administration was repeated for 1 to 4 weeks. Mice were sacrificed 1 day after last administration. No vasculitis was observed in NOD1^{-/-} mice after oral administration of FK565. ip = intraperitoneal; sc = subcutaneous; po = per os; w: week, KE = Klinische Einheit units; OK432 = penicillin-killed streptococcus pyogenes; PGN = peptidoglycan. SI score is calculated by the summation of severity scores of all mice in each experiment.

Supplementary Table III. Top 10 genes expressed in aortic root *ex vivo* and HCAEC *in vitro* stimulated with FK565.

A						B						
Category	Gene Symbol	Rank	AR	PA	Aorta	Category	Gene Symbol	Rank	HCAEC		HPAEC	
									FK565	Lipid A	FK565	Lipid A
All	Gm4022	1	28.3	0.7	1	All	UBD	1	70.3	6.4	43.9	0.7
	Gm3727	2	26.7	1.2	1.1		PRMT8	3	31.5	1.8	1.1	0.5
	Ccl5	3	25.8	32.7	22.3		PRRX1	4	20.8	2.4	0.2	0.5
	Krt42	4	20.3	0.8	0.6		SH3GL2	5	14.3	1.0	0.8	1.6
	Gm7225	5	20.2	1.0	1.0		CES1	6	14.3	0.9	1.4	2.3
	Gm4477	6	18.7	1.3	0.9		PRM1	7	13.2	2.3	1.0	0.9
	Prlr	7	17.9	2.1	1.0		C1orf81	8	12.3	1.0	0.7	1.3
	Gm15761	8	17.3	1.0	4.8		CCL2	9	10.5	3.1	5.3	2.9
	Gm7732	9	16.7	1.1	1.0		PAMR1	10	10.5	0.8	0.5	0.6
	Gm7877	10	16.5	0.4	0.6		GNPTAB	11	9.6	2.8	2.2	1.0
Chemokine/ cytokine	Ccl5	3	25.8	32.7	22.3	Chemokine/ cytokine	CCL2	9	10.5	3.1	5.3	2.9
	Ccl22	45	11.0	1.0	0.7		CCL5	41	6.0	6.3	4.5	2.9
	Kllf	86	9.3	1.9	1.2		CSF2	43	5.8	2.1	0.8	3.9
	Osm	113	8.7	3.6	0.9		LTB	58	5.4	0.8	6.8	1.9
	Il1b	392	5.6	0.9	0.7		IL29	124	4.2	1.3	0.3	0.3
	Il6	417	5.5	1.9	1.5		IL5	252	3.3	1.7	8.0	1.5
	Cxcl10	638	4.7	0.8	0.4		CCL20	427	2.9	2.0	1.4	1.6
	Ccl2	880	4.1	4.5	2.1		CXCL3	446	2.9	2.7	1.5	1.2
	Il12b	1227	3.6	3.1	0.7		IL6ST	453	2.9	1.8	1.7	0.5
	Cxcl16	1451	3.3	2.2	4.6		CXCL9	476	2.9	1.0	1.2	1.0
Mmp	Mmp3	1322	3.5	2.2	2.0	MMP	MMP9	30	6.7	1.1	0.9	1.5
	Mmp27	5397	1.9	1.6	5.0		MMP3	600	2.7	2.5	1.5	0.8
	Mmp7	5453	1.9	1.0	2.6		MMP10	1675	2.0	1.6	2.4	1.6
	Mmp12	7387	1.6	2.0	1.2		MMP13	1862	2.0	1.9	2.8	0.6
	Mmp10	8276	1.5	0.7	0.9		MMP28	2800	1.8	1.2	0.7	1.1
	Mmp19	10649	1.4	0.4	2.0		MMP23B	4671	1.5	1.1	0.8	0.9
	Mmp15	12572	1.3	0.7	2.5		MMP25	5844	1.5	0.5	1.8	1.5
	Mmp11	13380	1.3	2.1	0.6		MMP12	7211	1.4	1.2	2.5	1.3
	Mmp24	17089	1.1	1.2	0.9		MMP16	7467	1.4	0.8	1.0	1.2
	Mmp20	17299	1.1	1.2	1.4		MMP27	11675	1.2	1.6	1.2	1.1
Cam	Vcam1	1331	3.5	6.1	8.7	CAM	ICAM1	53	5.6	2.0	4.4	1.5
	Pecam1	2742	2.5	0.7	1.5		MADCAM1	921	2.4	1.2	1.0	1.4
	Icam1	3917	2.2	3.1	2.6		VCAM1	1323	2.2	2.0	0.9	1.2
	Selp	6266	1.8	3.3	1.5		CD34	1996	2.0	1.8	1.7	3.6
	F11r	8175	1.6	1.4	1.2		CD58	4737	1.5	1.3	1.0	0.8
	Pvr2	10882	1.4	0.7	0.4		F11R	12407	1.2	0.9	1.0	0.6
	Jam3	10972	1.4	0.6	1.2		JAM3	20960	1.0	1.2	0.9	1.2
	Jam2	13969	1.2	1.3	1.2		ICAM3	24950	1.0	1.0	1.0	1.0
	Icam2	15417	1.2	1.8	1.0		ICAM2	25082	1.0	0.9	1.0	1.0
	Cd34	16883	1.1	1.8	1.9		JAM2	27109	0.9	0.9	1.3	0.8

A. Top 10 genes in the all, Chemokine/cytokine, Mmp and Cam categories are listed among the genes of which expression levels were enhanced in aortic root *ex vivo* cultured for 24 hours with FK565 (10µg/mL) compared with those without stimulation by microarray analysis. Numbers in rank refer to the order of the gene expression levels in all categories. Data are expressed as fold changes of the respective gene expression levels after FK565 stimulation. Selection of the genes in each category is described in Supplementary Table II. Gene full names are as follows. Gm4022, predicted gene 4022; Gm3727, predicted gene 3727; Krt42, keratin 42; Gm7225, predicted gene 7225; Gm4477, predicted gene 4477; Prlr, prolactin receptor; Gm15761, predicted gene 15761; Gm7732, predicted gene 7732; Gm7877, predicted gene 7877; Ccl22, chemokine (C-C motif) ligand 22; Kllf, kit ligand; Osm, oncostatin m; Il1b, interleukin 1 beta; Il12b, interleukin 12b; Cxcl16, chemokine (C-X-C motif) ligand 16; Pecam1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; F11r, F11 receptor; When 2 or more genes were picked up by different probes, only one with the highest rank is included in the list. AR: aortic root, PA: pulmonary artery, Aorta: arch portion of aorta. Microarray analysis data are shown in Supplementary Fig. IVA.

B. Top 10 genes in the all, Chemokine/cytokine, human matrix metalloproteinase (MMP) and human cell adhesion molecule (CAM) categories are listed among genes of which expression levels were enhanced in HCAEC after 24 hours stimulation with FK565 (10µg/mL) *in vitro* compared with those without any reagent by microarray analysis. Numbers in rank refer to the order of the gene expression levels in all categories. Data are expressed as fold changes of the respective gene expression levels after stimulation. Selection of the genes in each category is described in Supplementary Table II. Gene full names are as follows. UBD, ubiquitin D; PRMT8, protein arginine methyltransferase 8; PRRX1, paired related homeobox 1; SH3GL2, SH3-domain GRB2-like 2; CES1, carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1); PRM1, protamine 1; C1orf81, hypothetical protein LOC647215; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; PAMR1, regeneration associated muscle protease; GNPTAB, N-acetylglucosamine-1-phosphatase, alpha and beta subunits; CCL5, chemokine (C-C motif) ligand 5; CSF2, colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage); LTB, lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3); IL29, interleukin 29 (interferon, lambda 1); IL5, interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil); CCL20, chemokine (C-C motif) ligand 20; CXCL3, chemokine (C-X-C motif) ligand 3; IL6ST, interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor); CXCL9, chemokine (C-X-C motif) ligand 9; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; MADCAM1, mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1; VCAM1, vascular cell adhesion molecule 1; CD34, CD34 molecule 1; CD58, CD58 molecule; F11R, F11 receptor; JAM3, junction adhesion molecule 3; ICAM3, intercellular adhesion molecule 3; ICAM2, intercellular adhesion molecule 2; JAM2, junction adhesion molecule 2. When 2 or more genes were picked up by different probes, only one with the highest rank is included in the list (Rank 2 is UBD). Microarray analysis data are shown in Supplementary Fig. IVB.