

201128212A

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

炎症性動脈瘤形成症候群の新規診断バイオマーカーの開発と

診断基準の作成に関する研究

平成23年度 総括・分担報告書

研究代表者 今中 恭子(吉田 恭子)

平成24(2012)年 3月

(公開日 平成24年7月31日)

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

炎症性動脈瘤形成症候群の新規診断バイオマーカーの開発と

診断基準の作成に関する研究

平成23年度 総括・分担報告書

研究代表者	今中 恭子(吉田 恭子)	三重大学大学院医学系研究科	准教授
研究分担者	阿部 淳	国立成育医療研究センター研究所	室長
研究分担者	白石 公	国立循環器病研究センター	部長
研究分担者	松下 竹次	国立国際医療研究センター	医長
研究分担者	廣江 道昭	国立国際医療研究センター	医師
研究分担者	須田 憲治	久留米大学医学部	准教授
研究分担者	吉兼 由佳子	福岡大学筑紫病院	講師
研究分担者	橋本 淳一	福岡大学筑紫病院	助教
研究分担者	市田 薔子	富山大学大学院医学薬学研究	准教授
研究分担者	三谷 義英	三重大学大学院医学系研究科	准教授
研究分担者	青木 浩樹	久留米大学循環器病研究所	教授
研究分担者	吉村 耕一	山口大学大学院医学系研究科	准教授
研究協力者	大熊 喜彰	国立国際医療研究センター	医員
研究協力者	植田 初江	国立循環器病研究センター	部長
研究協力者	富田 幸子	東京女子医科大学	助教

平成24(2012)年 3月
(公開日 平成24年7月31日)

目 次

I.	総括研究報告-----	1
	炎症性動脈瘤形成症候群に関する調査研究	
	今中恭子	
II.	分担研究報告	
	1. 炎症性動脈瘤形成症候の新しいバイオマーカー-----	7
	候補分子の有用性に関する研究	
	松下竹次・廣江道昭・須田憲治・市田露子・三谷義英・阿部 淳・	
	大熊喜彰	
	2. 炎症性動脈瘤形成症候群動物モデルに関する研究 -----	14
	吉兼由佳子・橋本淳一・青木浩樹・吉村耕一	
	3. ヒト冠動脈瘤の組織学的解析 -----	19
	白石 公・植田初江・富田幸子	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	22
	(資料) 班会議プログラム-----	26
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	28

炎症性動脈瘤形成症候群に関する調査研究

研究代表者：今中 恭子（三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学 准教授）

研究要旨

炎症性動脈瘤形成症候群は全身性急性汎血管炎に続発し、大動脈や、冠動脈など血管壁の破壊、不可逆的な著しい拡張をおこす。ほとんどが小児期に発症し、川崎病に合併することが多い。特に冠動脈に瘤を形成すると生命予後に直結する重篤な疾患であるが、動脈瘤の形成を防止する根本的な治療法はもとより、形成を予知する指標すら確立していない。本研究班では、冠動脈瘤を形成する全身性炎症疾患患者の実態調査を行って診断基準を策定し、動脈の炎症・瘤形成の病態を解明することを目的として、新しい病態マーカーの開発と、新しい動物モデルの確立を行った。

分担研究者

阿部淳	国立成育医療研究センター研究所・室長
白石公	国立循環器病研究センター・部長
松下竹次	国立国際医療研究センター・医長
廣江道昭	国立国際医療研究センター・医師
須田憲治	久留米大学医学部・准教授
吉兼由佳子	福岡大学筑紫病院・講師
橋本淳一	福岡大学筑紫病院・助教
市田露子	富山大学大学院医学薬学研究部・准教授
三谷義英	三重大学大学院医学系研究科・准教授
青木浩樹	久留米大学循環器病研究所・教授
吉村耕一	山口大学大学院医学系研究科・准教授

研究協力者

大熊喜彰	国立国際医療研究センター・医員
植田初江	国立循環器病研究センター・部長
富田幸子	東京女子医科大学・助教

A. 研究目的

炎症性動脈瘤形成症候群は全身性急性汎血管炎に続発し、大動脈や、冠動脈など血管壁の破壊、不可逆的な著しい拡張をおこす。ほとんどが小児期に発症し、川崎病に合併することが多い。免疫グロブリン治療の普及により、川崎病に合併する冠動脈瘤発症数は減少したが、免疫グロブリン不応性川崎病や、免疫グロブリンに反応しても冠動脈瘤が形成される症例が存在し、今なお、年間約100人が冠動脈瘤を発症する。さらに、川崎病とは診断されない全身性炎症疾患で冠動脈瘤を合併する症例も稀ではあるが明らかに存在し、現在、我が国全体で3万程度の患者がいると推定される。いずれの場合も、動脈瘤形成を予知する指標はなく、また、いつ

たん動脈瘤が形成されると、根治療法はなく、抗凝固療法の継続が必要である。特に冠動脈に瘤を形成すると小児期に心筋梗塞の原因となって生命予後に直結するだけでなく、遠隔期に動脈硬化の進行を促進する可能性が危惧され、成人への移行期医療が大きな問題となっている。従って、動脈の炎症・瘤形成の病態を解明し、それに基づいた動脈瘤形成予知マーカーおよび画期的な治療法の開発が急務である。

我々は、新しい病態マーカー候補分子として、細胞外マトリックスタンパクの一つ、テネイシンCに注目した。テネイシンCは正常では発現しないが活動性炎症に伴って特異的に発現し、その血中濃度は心筋梗塞や心筋炎・拡張型心筋症の予後予測に有用な炎症マーカーである。本研究班では、冠動脈瘤を形成する全身性炎症疾患患者の実態調査と、冠動脈病変の病勢を評価し動脈瘤形成を予知するバイオマーカーの探索を目的とし、特に、候補分子の一つテネイシンCの有用性を評価した。そのために、川崎病を含む小児有熱疾患「炎症性動脈瘤形成症候群」患者の過去の症例の血清、病理サンプルを用いた後ろ向き研究、新規患者登録による前向き研究、および理論的裏付けのために動物モデルを用いたシミュレーション実験を行い、「炎症性動脈瘤形成症候群」と

いう新たな疾患概念を導入して、診断基準を策定し、新しい病勢マーカーおよび治療効果判定マーカーの開発とそれに基づいた個別最適化治療法を可能にすることにより患者の予後を改善し、本邦における特に小児医療の質の向上を最終目的とする。

B. 研究方法

1. 後ろ向き研究

1-1. 血中バイオマーカー測定: 三重大学、国立国際医療研究センター、国立成育医療研究センター、久留米大学、富山大学に入院した発熱症例のうち、倫理申請で利用の承認が得られ、臨床経過、画像診断による血液サンプルが保存されている川崎病患者の血中テネイシンC値をELISA法で測定し、血中濃度の経時的変化、投薬歴、治療反応性、冠動脈瘤形成との相関の解析を行った。冠動脈拡大および瘤を認めた症例を冠動脈病変(Coronary Artery Lesion: CAL) (+)群とし、CAL(-)群は冠動脈病変を認めなかった症例と30日以内に系の正常化を認める一過性拡大の症例とした。また、初回治療で超大量免疫グロブリン療法(IVIg)を行ったが、不応もしくは再燃のため追加治療を必要とした症例をIVIg不応群とした。初回治療において標準治療であるIVIg+アスピリン

にステロイドなどを追加した症例は除いた。相関の有無は Student の t 検定、Mann-Whitney の検定、 χ^2 乗検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありとした。

1-2. ヒト冠動脈瘤病変組織：国立循環器病研究センターおよび東京女子医大で保存している冠動脈拡張、瘤形成のみられた川崎病剖検標本で HE, Elastica VanGieson 染色および、テネイシン C、MMP-9、CD68、 α -平滑筋アクチンを免疫組織染色し、炎症細胞浸潤、弾性線維破壊などの組織像と対比した。

2. 前向き研究

三重大学、国立国際医療研究センター、国立成育医療研究センター、国立循環器病センター、久留米大学、福岡大学、富山大学からなる多施設共同体制で、対象となる患者のほとんどが厚生労働省川崎病研究班作成改定5版ガイドラインに従った治療をける現状に即すため、便宜上、粘膜、皮膚病変、冠動脈病変の有無により有熱入院患者を分類して登録し、可能な限り、治療前、(初回)治療開始後2日、第10-14病日、第30病日に採血、超音波検査を行った。

3. 動脈炎／動脈瘤マウスモデル

カンジダ・アルビカンス標準株保存菌液

を培養、集菌、0.5N KOH 溶液で煮沸してアルカリ抽出液とした。4週令の C57BL/6 系オスマウスにカンジダ抽出液 2mg, 4mg を腹腔内5日間連続投与、4週おきに2クール行い、初回投与後8週後に犠牲死させ、大動脈とその主要分枝、心臓、冠動脈を肉眼観察した後、4%パラホルムアルデヒドを定圧還流固定した。大動脈、心臓を摘出し、パラフィン標本を作製した。炎症細胞浸潤 (HE 染色)、弾性線維破壊の解析、テネイシン C の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本臨床試験の実施に際し、患者および家族に対して説明資料を参考に説明し、自由意思による同意を文書で得た。なお、同意書は保管し、同意年月日を症例記録に記載した。本試験は「ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則」および「臨床研究に関する倫理指針—厚生労働省告示」の精神に基づき、被験者の人権および福祉を守り、試験の科学的な質と信頼性および安全性を確保するために GCP 基準を遵守のうえ実施する。三重大学、国立国際医療研究センター、福岡大学、久留米大学、富山大学は厚生省倫理規定に基づき所属施設内に倫理委員会がすでに設置されており、かつ、本研究は事前に各施設での倫理委員会で倫理面からの審

査を受けた。血液検体のセキュリティに関しては、識別コード記載した連絡表と採血管により連結可能な匿名化するシステムを構築した。マウス実験は、福岡大学、山口大学、三重大学の指定された管理区域内で行うこととしており、生命倫理・安全対策に対する取り組みが確保されている。本実験計画は、指針に基づき各大学動物実験委員会承認された。

C. 研究結果

1. 後ろ向き研究

1-1. 血中バイオマーカー測定 140 症例（439 検体）が登録された。

7 例が 30 日以内に正常化する冠動脈の一過性拡大を示した。また、107 例は大量免疫グロブリン療法 IVIG 反応群、25 例が不応群に分類された。

血中テネイシン C 値：血中濃度は急性期に有意に高値を示し、回復期に低下した(図 1A)。他のバイオマーカーとの比較としてテネイシン C と CRP の相関の解析を行ったが、有意な相関は認めなかった

冠動脈病変とテネイシン C 値：治療前、初回治療後（第 9-15 病日）、回復期、いずれの時期においても、CAL(+)群では CAL(-)群よりも TNC 値が高い傾向を示したが、有

意差は認められなかった。CAL を形成した症例のうち 2 例は、初回治療前、9~15 病日、回復期の 3 点で全てテネイシン C を測定できたが、経時変化の特徴は明らかではなかった。

IVIG 不応群のうち 12 例でテネイシン C 値を 3 点で測定できた。10 例は IVIG 反応群同様、回復期にかけて減少したが、2 例で 9~15 病日あるいは回復期にテネイシン C 値が上昇を認めた。

ヒト冠動脈瘤病変組織 川崎病発症 79 日あるいは 1 年 3 ヶ月後に急性心筋梗塞で死亡した 1 才の患者 2 症例の剖検標本で、冠動脈組織変化およびテネイシン C の組織発現を解析した。冠動脈は径約 1 cm に拡張し、中膜に平滑筋の残存はみられたが、弾性線維の断裂、消失が顕著であり、1 年 3 ヶ月後に死亡した症例では、膠原線維が形成され癒痕化していた。内腔には、新生内膜が形成され、器質化を伴う比較的古い血栓、および、死因の急性心筋梗塞原因となった新鮮血栓形成がみられた。しかし、いずれも、血管壁にはマクロファージ、リンパ球など炎症細胞浸潤は、MMP9 の発現はほとんどみられなかった。また、テネイシン C は血栓の器質化に伴う血管新生に伴って、わずかな発現が見られるのみであった。

D. 考察

2. 前向き研究

フローチャートに従い、有熱入院患

者を分類して登録

している。①、②、

③は

従来の川崎病

(不全型を含む)

に、④は非川崎

病に相当する。登録症例について、心エコー

および採血を行った。平成 23 年 12 月 21 日

現在、①、②、③あわせて 32 例の患者を登録

した。平成 24 年 3 月末日まで登録を継続し

た。

3. 動脈炎／動脈瘤マウスモデル

カンジダ抽出液 4mg 投与群では 6 例中 4 例

で大動脈病変、総腸骨動脈、頸動脈に肉眼的

に瘤様病変を認めた。組織所見では、強い

血管周囲結合織炎および血管壁全層に強い

炎症細胞浸潤、中膜弾性線維の断裂、破

壊像がみられたが、この時期には内腔の拡大

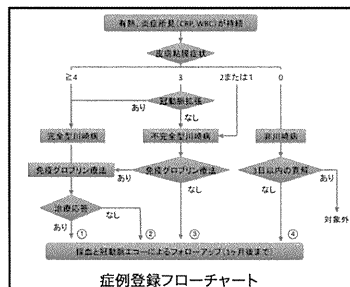
はみられなかった。投与量 2mg (6 匹)

ではモデル作成中に 1 匹死亡し、残り 5 匹

は大動脈に肉眼的に著変を認めなかったが、

組織学的には 3 例に大動脈に汎血管炎を認

め、2 例で冠動脈起始部に血管周囲結合織炎、



新生内膜形成を伴う汎血管炎、中膜弾性線維の断裂、破壊を認めた。

E. 結論

血中テネイシン C 濃度は、川崎病急性期に

高値を示し、回復期に低下したが、CRP と

の相関は認められなかった。従って、テネ

イシン C は単なる炎症マーカー以上の新た

な病態マーカーと考えられた。興味深いこ

とに、冠動脈瘤を形成する症例や、超大量

免疫グロブリン療法不応例は、テネイシン

C 値が高い傾向にあったが、いずれも、症

例数が少なく有意差は得られなかったため、

さらなる症例の蓄積が必要である。特に、

川崎病治療法の進歩に伴い重度冠動脈病変

を形成する症例は減少しているため、バイ

オマーカーの有用性評価には、今後、冠動

脈径変化との相関の解析が重要であろう。

また、血管病変部位でのテネイシン C の発

現は動物モデルでは認められたが、今回入

手できたヒト剖検症例はすでに組織学的に

は回復期にあり、テネイシン C の発現はず

で消失していたと考えられる。現在、川

崎病急性期死亡率は非常に低く、ヒト剖検

組織を用いた解析は困難になっており、治

療法の開発だけでなく病態解析、新しい診

断法の有用性評価のためには、動物モデル

の併用が必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamoto, H. and Imanaka-Yoshida, K. *Matricellular Proteins: New Molecular Targets To Prevent Heart Failure. Cardiovasc Ther.* Epub ahead of print (2011)
- 2) Kobayashi, N., Odaka, K., Uehara, T., Imanaka-Yoshida, K., Kato, Y., Oyama, H., Tadokoro, H., Akizawa, H., Tanada, S., Hiroe, M., Fukumura, T., Komuro, I., Arano, Y., Yoshida, T., and Irie, T. Toward In vivo Imaging of Heart Disease Using a Radiolabeled Single-Chain Fv Fragment Targeting Tenascin-C. *Anal Chem.* 83, 9123-30 (2011)
- 3) Kimura T, Yoshimura K, Aoki H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Morikage N, Endo H, Hamano K, Imaizumi T, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M. Tenascin-c is expressed in abdominal aortic aneurysm tissue with an active degradation process. *Pathol Int.* 61:559-564 (2011)
- 4) Suzuki, H., Kanamaru, K., Shiba, M., Fujimoto, M., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., and Taki, W. Cerebrospinal fluid tenascin-C in cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol.* 23: 310-7 (2011)
- 5) 廣江道昭, 吉田利通, 今中恭子. *Matricellular 蛋白とバイオマーカー. 呼吸と循環* 59: 1063-1070, 2011
- 6) 吉田利通, 今中—吉田恭子. 病理診断医になじみのある疾患関連分子 解説編 TNC(tenascin-C). *病理と臨床* 29 (臨時増刊号) ;414-417, 2011
- 7) 吉田利通, 今中—吉田恭子. 病理診断医になじみのある疾患関連分子 診断編 TNC(tenascin-C). *病理と臨床* 29 (臨時増刊号) ;418-422, 2011

2. 学会発表

木村泰三、吉村耕一、青木浩樹、今中恭子、吉田利通、青沼和隆、廣江道昭、今泉勉、松崎益徳. テネイシン C は大動脈解離を予防する分子的ショックアブソーバーである。第 43 回日本結合組織学会学術大会、2011 年 11 月 17-18 日、東京

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

炎症性動脈瘤形成症候の新しいバイオマーカー候補分子の有用性に関する
研究

研究分担者：

松下竹次 国立国際医療研究センター・医長
廣江道昭 国立国際医療研究センター・医師
須田憲治 久留米大学医学部・准教授
市田露子 富山大学大学院医学薬学研究部・准教授
三谷義英 三重大学大学院医学系研究科・准教授
阿部淳 国立成育医療研究センター研究・室長

研究協力者：

大熊喜彰 国立国際医療研究センター・医員

研究要旨

炎症性動脈瘤形成症候群は全身性急性汎血管炎に続発し、大動脈や、冠動脈など血管壁の破壊、不可逆的な著しい拡張をおこす。ほとんどが小児期に発症し、川崎病に合併することが多い。特に冠動脈に瘤を形成すると生命予後に直結する重篤な疾患であるが、動脈瘤の形成を防止する根本的な治療法はもとより、形成を予知する指標すら確立していない。今回、炎症性動脈瘤の新しい病態バイオマーカー候補分子として、細胞外マトリックスタンパク、テネイシン C に注目し、前向き研究、および後ろ向き研究を行い、動脈瘤形成予知マーカーとしての臨床的有用性について検討した。

A. 研究目的

炎症性動脈瘤形成症候群は全身性急性汎血管炎に続発し、川崎病に合併することが多い。特に、冠動脈に瘤が形成されると、急性期の破裂をきたしたり、亜急性期あるいは遠隔期に心筋梗塞の原因となり生命予後に直結する。免疫グロブリン治療の普及により、川崎病に合併する冠動脈瘤発症数は減少したが、免疫グロブリン不応性川崎病や、免疫グロブリンに反応しても冠動脈瘤が形成される症

例が存在するが、現在、有効な動脈瘤形成予知マーカーはなく、新しい診断法の開発が急務である。冠動病変の病勢を評価し動脈瘤形成を予知するバイオマーカーの探索を目的とし、候補分子の一つテネイシン C の有用性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 後ろ向き研究

1-1. 血中バイオマーカー測定：三重大学、国

立国際医療研究センター、国立成育医療研究センター、久留米大学、富山大学に入院した発熱症例のうち、倫理申請で利用の承認が得られ、臨床経過、画像診断による血液サンプルが保存されている川崎病患者の血中テネイシン C 値を国立校再医療センターで Human Tenascin-C Large (FNIII-C) Assay Kit - IBL (タカラバイオ)を用いて ELISA 法で測定し、血中濃度の経時的変化、投薬歴、治療反応性、冠動脈瘤形成との相関の解析を行った。冠動脈拡大および瘤を認めた症例を冠動脈病変 (Coronary Artery Lesion: CAL) (+)群とし、CAL(-)群は冠動脈病変を認めなかった症例と 30 日以内に系の正常化を認める一過性拡大の症例とした。また、初回治療で超大量免疫グロブリン療法 (IVIg) を行ったが、不応もしくは再燃のため追加治療を必要とした症例を IVIg 不応群とした。初回治療において標準治療である IVIg+アスピリンにステロイドなどを追加した症例は除いた。相関の有無は Student の t 検定、Mann-Whitney の検定、 χ^2 乗検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありとした。

2. 前向き研究

三重大学、国立国際医療研究センター、国立成育医療研究センター、国立循環器病セ

ンター、久留米大学、福岡大学、富山大学からなる多施設共同体制で、対象となる患者のほとんどが厚生労働省川崎病研究班作成改定5版ガイドラインに従った治療を受ける現状に即すため、便宜上、粘膜、皮膚病変、冠動脈病変の有無により有熱入院患者を分類して登録し、可能な限り、治療前、(初回)治療開始後2日、第10-14病日、第30病日に採血、超音波検査を行った。

(倫理面への配慮)

本臨床試験の実施に際し、患者および家族に対して説明資料を参考に説明し、自由意思による同意を文書で得た。なお、同意書は保管し、同意年月日を症例記録に記載した。本試験は「ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則」および「臨床研究に関する倫理指針—厚生労働省告示」の精神に基づき、被験者の人権および福祉を守り、試験の科学的な質と信頼性および安全性を確保するために GCP 基準を遵守のうえ実施した。三重大学、国立国際医療研究センター、福岡大学、久留米大学、富山大学は厚生省倫理規定に基づき所属施設内に倫理委員会がすでに設置されており、かつ、本研究は事前に各施設での倫理委員会で倫理面からの審査を受けた。血液検体のセキュリティに関しては、識別コード記載した連絡表と採血

管により連結可能な匿名化するシステムを構築した。

C. 研究結果

【研究結果】

1. 後ろ向き研究

1-1. 登録症例

140 症例（439 検体）が登録された。患者背景を表 1 に示す。

Characteristics	
年齢 中央値 [範囲]	24か月 [2 - 84]
性別	男: 77, 女: 63
診断病日 中央値 [範囲]	5日 [2 - 15]
免疫グロブリン大量療法(IVIG) 不応性	Responder: 107 Non-Responder: 25
冠動脈病変 (Coronary Artery Lesion: CAL)	なし: 128 一過性拡大: 7 拡大: 1 瘤: 4

表 1

診断病日の中央値は 5 日だった。107 例は大量免疫グロブリン療法(IVIG)反応群、25 例が不応群だった。

7 例が 30 日以内に正常化する冠動脈の一過性拡大、5 例が瘤を形成した。

1-2. 血中テネイシン C 値

治療開始前、9~15 病日、回復期の 3 点に関して血中テネイシン C 値を測定できた症例は 58 例だった。血中テネイシン C 値は急性期に有意に高値を示し、回復期に低下した (図 1)。

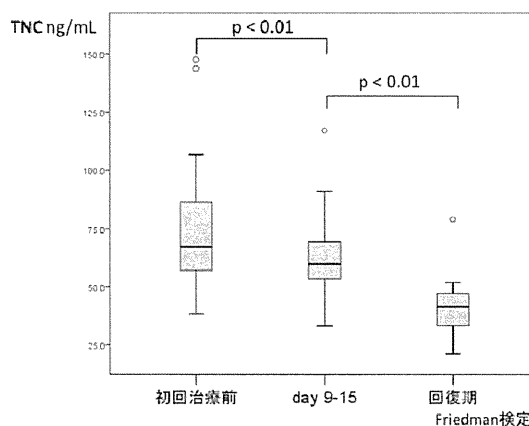


図 1

他のバイオマーカーと比較として、CRP・WBC・好中球%・BNP との相関の解析を行ったが、統計学的に有意な相関は認められなかった (図 2 A~D)。

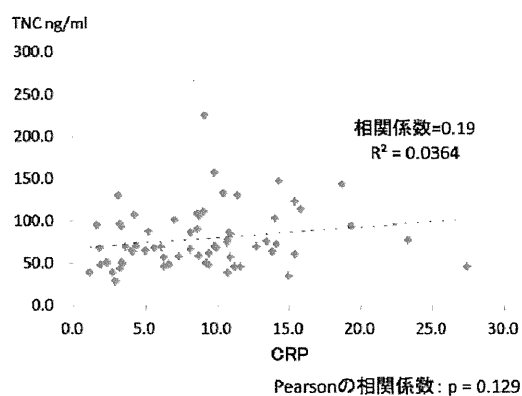


図 2A. 血中TNC値とCRP

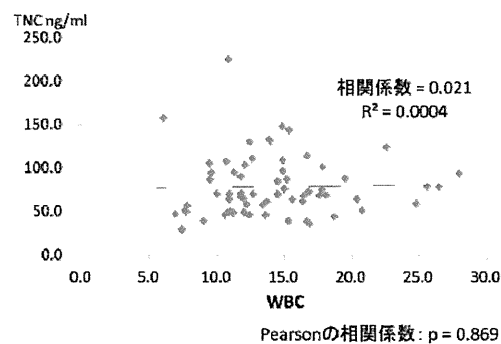


図 2B. 血中TNC値とWBC

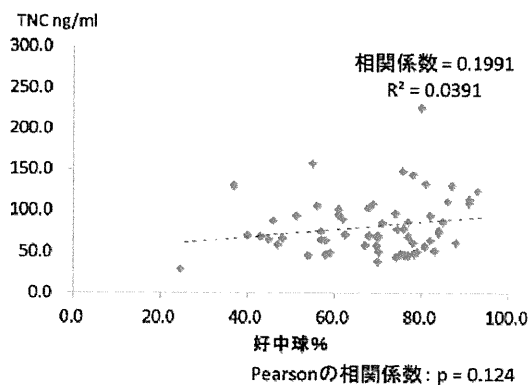


図2C. 血中TNC値と好中球%

1-3. 冠動脈病変とテネイシン C 値

① 冠動脈病変 (CAL) の定義として 1984 年の厚生省の基準(5歳未満:冠動脈径 3mm 以上を拡大とする、5歳以上:冠動脈径 4mm 以上を拡大とする、もしくは正常と思われる周辺冠動脈径の 1.5 倍以上) を用いた場合

Seg 1, Seg 5, Seg 6 のいずれかが上記基準を満たしたとき CAL(+)とした。

初回治療前、第 9-15 病日、回復期、いずれの時期においても、CAL(+)群と CAL(-)群において TNC 値に統計学的有意差はなかった (図 3)。

1-4. 免疫グロブリン大量療法 (IVIg) 不応性の予測とテネイシン C 値

IVIg 不応例 (non-Responder 群) では、IVIg 反応例 (Responder 群) に比べて TNC 値が高く推移し、特に初回治療前にその傾向が強く見られたが、統計学的有意差は認められなかった (図 7)。

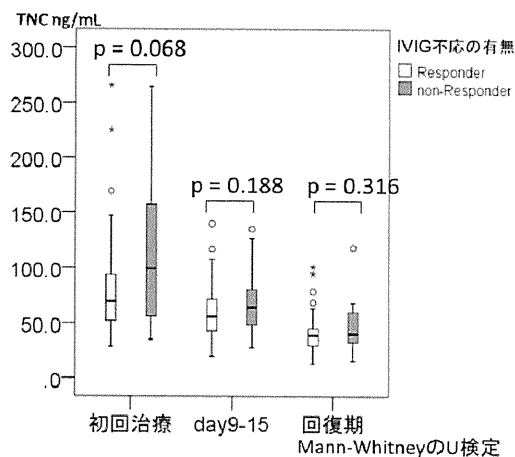
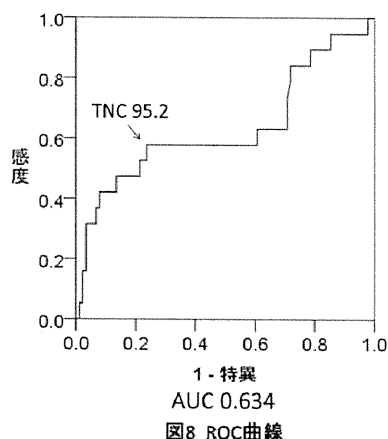


図7

non-Responder 群のうち 12 例でテネイシン C 値を 3 点で測定できた。10 例は Responder 群同様、回復期にかけて減少したが、2 例で第 9~15 病日あるいは回復期にテネイシン C 値が上昇した。

初回治療前の TNC 値を用いて IVIg 不応性を予測する場合、TNC 95.2ng/mL を cut off 値とすると感度 58%、特異度 76%、曲線化面積 (AUC) 0.634 だった (図 8)。



1-5. 診断病日とテネイシン C 値

川崎病と診断された病日が 3 日以内の群 (早期診断群) と 4 日以降の群 (通常診断群) のテネイシン C 値を比較したが統計学的有

意差は認めなかった (図 9)。

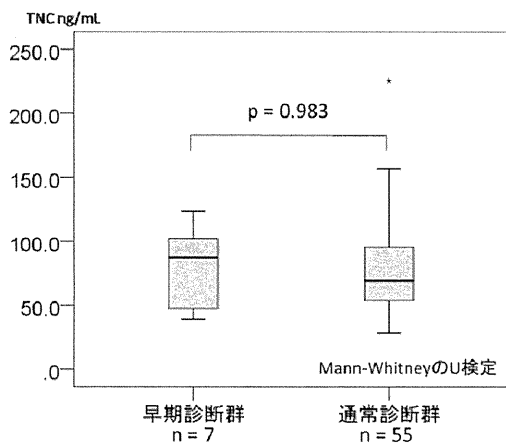
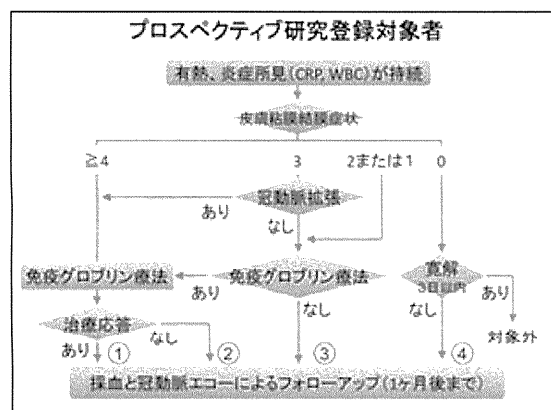


図9

2. 前向き研究

下記フローチャートに従い、有熱入院患者を分類して登録している。①、②、③は従来の川崎病（不全型を含む）に、④は非川崎病に相当する。



登録症例について、心臓超音波検査および採血を行った。平成 24 年 3 月 31 日現在、①+②+③ が 45 症例、④が 15 症例登録された。

D. 考察

【考察】

本研究の患者背景（年齢、性別、診断病日）

は、第 21 回川崎病全国調査と同様の傾向だった。初回 IVIG に不応を示した症例の割合と CAL 発生頻度も全国調査と同様だった（本研究 vs 全国調査、IVIG 不応性: 18.9% vs 19.1%、CAL 発生頻度: 3.6% vs 3.0%）。

血中テネイシン C 値

血中テネイシン C 値は、明らかに川崎病急性期に高値を示し、回復期に低下したが、CRP や WBC などの炎症を示すバイオマーカーとの相関は認められなかった。従って、テネイシン C は単なる炎症マーカー以上の新たな病態マーカーと考えられた。川崎病急性期に BNP が上昇することが知られているが、テネイシン C 値との相関は見られなかった。

CAL とテネイシン C 値

CAL の定義として 1984 年の厚生省基準を用いた場合でも z score > 2 の基準を用いても、CAL(+)群と CAL(-)群において TNC 値に統計学的有意差はなかった。CAL 形成症例が少ないことが影響したと考える。興味深いことに、どちらの基準を用いても CAL を形成した症例では第 9~15 病日もしくは回復期にかけてテネイシン C 値の上昇が見られた。理由として、テネイシン C は心筋

細胞と周囲結合組織の接着性を緩め、MMP (matrix metalloproteinase) の発現・活性をあげ、炎症反応を増強する作用を持つため、過度な発現が組織の脆弱性をきたすとされており、そのため一般に CAL を形成に冠動脈が発生するといわれている第 9～15 病日にテネイシン C 値が上昇したと考える。症例数を増やしてプロスペクティブに検討する必要がある。

IVIG 不応性の予測とテネイシン C

non-Responder 群では Responder 群に比べて、統計学的有意差は認めないもののテネイシン C 値が高く推移し、特に初回治療前にその傾向が強く見られた。初回治療前の TNC 値を用いて初回 IVIG 不応性を予測する場合、TNC 95.2ng/mL を cut off 値とすると感度 58%、特異度 76%、AUC 0.634 で初回 IVIG 不応性を予測できる結果となった。

先行研究の初回 IVIG 不応性の予測スコアとして群馬スコア¹⁾があるが、本研究の登録症例のうち 81 例で検討することができたが、5 点を cut off 値とした場合、感度 31%、特異度 75%という結果だった。群馬スコアに TNC 値を加えることでより精度の高い予測スコアの作成の可能性が示唆された。

血管炎の進行に伴って冠動脈の血管構造が破壊され遠心性拡大をきたすことを考えると、より早期に炎症を鎮静化することが冠動脈病変の発生の抑制につながるため、より精度の高いリスクスコアの作成は重要である。「治療開始前の TNC 値は IVIG 不応性の有無によって異なる」との仮説を証明する場合、 $\alpha=0.05$ 、検出力を 0.8 とすると必要なサンプル数は 2 群で 400 症例となる。

診断病日とテネイシン C 値

一般的に早い病日に川崎病と診断される症例は、重症度が高いと考えられているが、早期診断群と通常診断群の初回治療前のテネイシン C 値に統計学的有意差を認めなかった。検討症例数が少ないことや、テネイシン C が炎症マーカー以上の病態を示すバイオマーカーである可能性が影響したと考ええる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suda K, Tahara N, Kudo Y, Yoshimoto H, Iemura M, Ueno T, Kaida H, Ishinashi M, Imaizumi T. Persistent coronary arterial inflammation in a patient long after the onset of Kawasaki disease. *Int. J. Cardiol* 154, 193-4
- 2) Kishimoto S, Suda K, Teramachi Y, Nishino H, Kudo Y, Ishii H, Iemura M,

Takahashi T, Okamura H, Matsuishi T. Increased plasma type B natriuretic peptide in the acute phase of Kawasaki disease. *Pediatr Int* (in press)

- 3) Suda K, Iemura M, Nishiono H, Teramachi Y, Koteda Y, Kishimoto S, Kudo Y, Itoh S, Ishii H, Ueno T, Tashiro T, Nobuyoshi M, Kato H, Matsuishi T. Long-term prognosis of patients with kawasaki disease complicated by giant coronary aneurysms: a single-institution experience. *Circulation* 123; 1836-42
- 4) 廣江道昭, 吉田利通, 今中恭子. Matricellular 蛋白とバイオマーカー. *呼吸と循環* 59: 1063-1070, 2011
2. 学会発表
- 1) 阿部淳. 川崎病の急性期治療におけるバイオマーカー. 第 10 回九州川崎病研究会特別講演, 佐賀. 2011 年 5 月 28 日.
- 2) 阿部淳. 川崎病の基本から見直す: 川崎病の原因追求の歴史. 第 31 回日本川崎病学会教育講演, 横浜. 2011 年 9 月 30-10 月 1 日.
- 3) 益田博司, 小穴慎二, 土田尚, 石黒精, 阪井裕一, 伊藤秀一, 賀藤均, 齋藤昭彦, 阿部淳. インフリキシマブ療法を行った川崎病患者の冠動脈合併症とサイトカインの検討. 第 114 回日本小児科学会, 東京. 2011 年 8 月 12-14 日
- 4) 服部淳, 益田博司, 小穴慎二, 阪井裕一, 伊藤秀一, 賀藤均, 阿部淳. 追加治療を要した川崎病不全型の 4 例の臨床的検討. 第 31 回日本川崎病学会, 横浜. 2011 年 9 月 30-10 月 1 日.
- 5) Hamada H, Suzuki H, Abe J, Onouchi Y, Suzuki Y, Terai M, Hata A. Inflammatory cytokine profiles under cyclosporine treatment for refractory Kawasaki disease. *Orland, FL. USA. 2011 年 11 月 13-15 日*
- 6) T. Kobayashi, T. Saji, T. Otani, K. Takeuchi,

T. Nakamura, H. Arakawa, T. Kato, T. Hara, K. Hamaoka, M. Miura, Y. Nomura, S. Fuse, F. Ichida, M. Seki, A. Morikawa.

Significance of Primary Therapy With Intravenous Immunoglobulin Plus Prednisolone For Severe Kawasaki Disease: Result From Japanese Multicenter Randomized Clinical Trial. The 84th Scientific sessions of AHA. *Orland, FL. USA. 2011 年 11 月 13-15 日*

- 7) Y. Mitani. E. Tsuda. H. Kato. S. Ogawa. Y. Nakamura. K. Takahashi. M. Ayusawa. T. Kobayashi. F. Ichida. M. Matsushima. M. Kamata. T. Higaki. K. Suda. H. Ohashi. H. Yokoi. K. Hamaoka: Acute Coronary Syndrome in Adults with a History of Kawasaki Disease: A Japanese Nationwide Survey. The 84th Scientific sessions of AHA. *Orland, FL. USA. 2011 年 11 月 13-15 日*
- 8) 齋藤和由、高崎一朗、廣野恵一、渡辺一洋、小澤綾佳、市田露子、宮脇利男. 急性期川崎病の流血中末梢血単核球細胞におけるマイクロ RNA による mRNA の発現制御の可能性. 第 75 回日本循環器学会学術集会、2011 年 8 月 2 日、東京
- 9) 大熊喜彰 Unresolved issues in Kawasaki disease patients with giant aneurysm-problem of long-term follow up -第 10 回国際川崎病シンポジウム, 2012 年 2 月 7—10 日, 京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

炎症性動脈瘤形成症候群動物モデルに関する研究

研究分担者：

吉兼由佳子（福岡大学）
橋本淳一（福岡大学）
青木浩樹（久留米大学）
吉村耕一（山口大学）

研究要旨

炎症性動脈瘤形成症候群は全身性急性汎血管炎に続発し、大動脈や、冠動脈など血管壁の破壊、不可逆的な著しい拡張をおこす。ほとんどが小児期に発症し、川崎病に合併することが多い。特に冠動脈に瘤を形成すると生命予後に直結する重篤な疾患であるが、動脈瘤の形成を防止する根本的な治療法はもとより、形成を予知する指標すら確立していない。本研究班では、動脈の炎症・瘤形成の病態を解明することを目的として、新しい動物モデルの樹立を試みた。

A. 研究目的

炎症性動脈瘤形成症候群は全身性急性汎血管炎に続発し、大動脈や、冠動脈など血管壁の破壊、不可逆的な著しい拡張をおこす。特に冠動脈瘤は心筋梗塞の原因の一つとなる重篤な疾患であり、多くは川崎病に合併する。しかしながら、現在、冠動脈瘤形成を予知する有効な診断法はなく、冠動脈病変の病態を評価し、動脈瘤形成を予知するバイオマーカーの開発が急務である。そのためには、川崎病を含む小児有熱疾患「炎症性動脈瘤形成症候群」患者の過去の症例を用いた後ろ向き研究、新たに入院する患者のサイトカイン測定や心臓超音波検査所見を含めた前

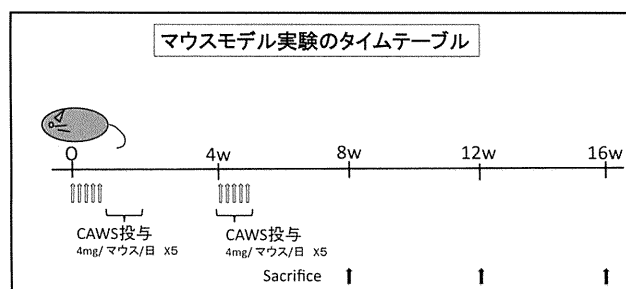
向き研究による実際の臨床での有用性の検証と、同時に、理論的裏付けのために動脈の炎症・瘤形成の病態におけるテネイシン C の分子動態の解析が必要である。しかしながら、血管炎・動脈瘤患者検体は入手が著しく制限されたため、動物モデル実験の対比動物モデルの併用が必須である。今回我々は、マウス炎症性動脈瘤形成症候群モデルを樹立することを目的とした。さらに、新しいバイオマーカーとして細胞外マトリックス分子の一つ、テネイシン C に注目し、このモデルを用いたシミュレーション実験を行うことを目的とした。

B. 研究方法

I マウス血管炎・動脈瘤形成のための至適カンジダ・アルビカンス菌体抽出法および投与菌量の決定

カンジダ抽出液の精製：Takahashi ら方法(Takahashi K. et al. Inflamm.Res 2004: 53:72-77)に従い、カンジダ・アルビカンス標準株保存菌液をサブロー寒天培地にて 48 時間培養し、集菌、洗菌後、0.5N KOH 溶液で煮沸し抽出液を得、1N HCL 溶液でアルカリ抽出液 (*Candida albicans* water-soluble fraction: CAWS)とし、3 日間透析後 PBS にて 100mg/ml に調整した。

投与条件：村田らの方法に従い（村田久雄 川崎病の実験モデル 日本臨床 1983; 41: 115-119）、C57BL/6 系、オス、4 週令マウスの腹腔内に、CAWS 2mg, 4mg, 10mg, 20mg/マウス（各群 n=6）、5 日間連続腹腔内投与を 4 週おき 2 クールおこなった。



初回投与 8 週後に犠牲剖検し、至適投与量を決定した。その結果に基づき、CAWS 投与量を 4mg/マウスに決定し、初回投与後、

8 週 (n=6), 12 週 (n=7), 16 週 (n=7) で心臓から採血した後、犠牲死させた。

II 血管病変の形態学的解析

4%パラフォルムアルデヒドで定圧環流固定し、開胸・開腹して大動脈を主要分枝まで露出し、実体顕微鏡下で観察した。その後、心臓および上行-胸部-腹部大動脈から左右総腸骨動脈まで広範囲に摘出した。一部の個体は、下行大動脈から逆行性に墨汁+ゼラチン混合液を注入する墨汁-ゼラチン法に加え、尿素、グリセロール、トリトン X-100 からなる溶液 ScaIeA2 を用いて心筋組織を透明化した後、冠動脈を実体顕微鏡下で観察した。さらに、パラフィン切片を作成し、HE 染色, EVG 染色、テネascin C (TNC), α 平滑筋アクチンに対する免疫組織染色を行った。

III 血中 TN-C の測定

犠牲剖検時に採血して血清を分離し、Human Tenascin-C Large (FNIII-B) Assay Kit - IBL (タカラバイオ)を用いて ELISA 法で測定した。

【結果】

I マウス血管炎・動脈瘤形成のための至適 CAWS 投与菌量

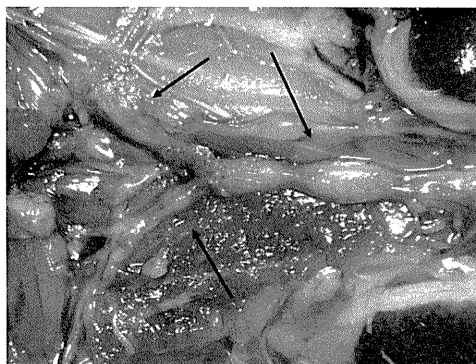
マウス 1 匹あたり、CAWS 2mg 投与群では

CAWS 投与中に 1 匹死亡し、残り 5 匹で肉眼的組織的解析をし得た。3 例で大動脈病変が見られた。4mg では 6 匹中 4 例に肉眼で大動脈の瘤状変化をみ止めたが、肉眼的に冠動脈病変は見られなかった。10mg (6 匹) では投与開始翌日あるいは翌々日に全マウスが死亡し、20mg (6 匹) では投与開始翌日に全マウスが死亡したため、解析は行わなかった。以上の結果より以降の実験においてカンジダ抽出液投与量は 4mg で行うものとした。

II-1 大動脈病変

CAWS 投与開始、8 週後で 6 例中 4 例で、12 週後には 7 例中 4 例、16 週後には 7 例中 6 例に、肉眼的に、腹部大動脈に数珠状につながる瘤および総腸骨動脈、腎動脈分岐部、頸動脈に瘤形成を認めた。

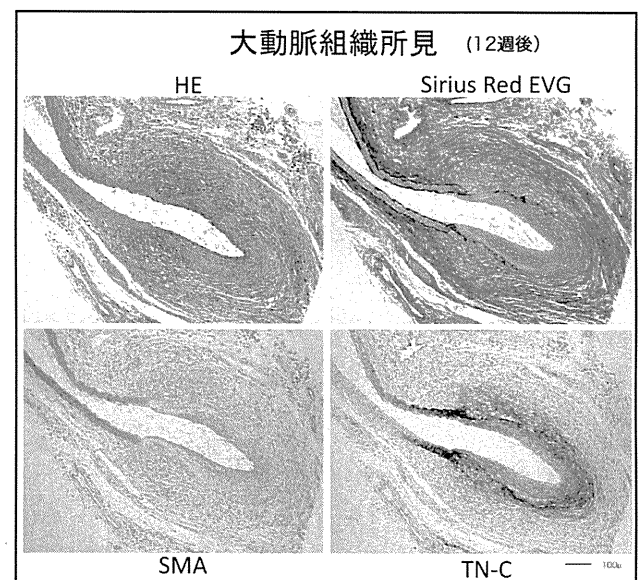
大動脈肉眼所見



→ 頭側

8 週後の組織所見では、強い血管周囲結合組織炎および血管壁全層の強い炎症細胞浸潤、中膜平滑筋細胞は壊死、消失し、弾性線維も断片化、消失していた。TN-C は炎症によ

り破壊された血管壁全層に沈着し、特に、瘤病変頸部の中膜残存平滑筋に強い発現が見られた。12, 16 週後の組織像では、徐々に膠原線維量が増加し、血管壁構造の破壊・癒痕化の進行が見られたが、マクロファージを主体とする強い炎症細胞浸潤は持続し、TN-C の発現も持続していた。内腔の拡大はみられなかった。

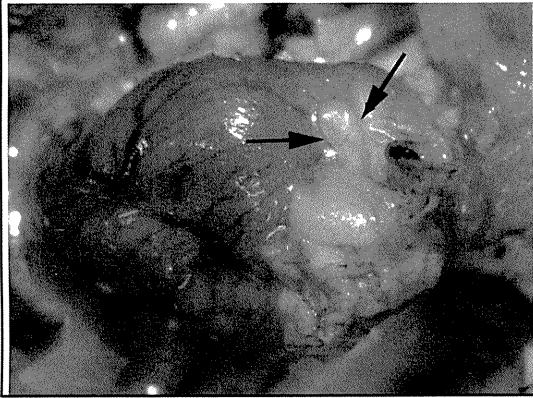


II-1 冠動脈病変

4 週目の摘出心で Scale 法を試みたが、墨汁-ゼラチン法のみで冠動脈を肉眼で充分観察され、Scale 処理後、組織に多少のアーチファクトを認めたため、Scale 法は不要と判断し、以降は墨汁-ゼラチン法のみ行った。

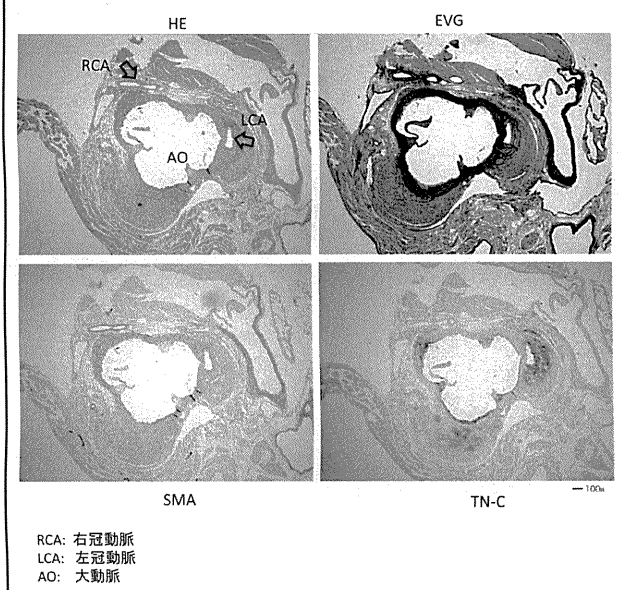
12 週後の 7 例中 1 例で、肉眼的に左冠動脈起始部から主幹部にかけて明らかな瘤形成を認めた (次ページ図矢印)

冠動脈瘤



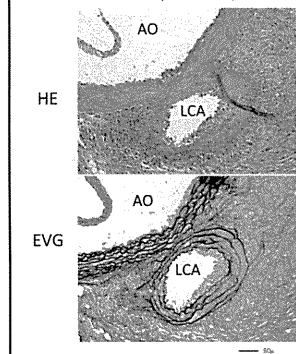
組織学的には、大動脈起始部病変から連続する、強い炎症細胞浸潤、新生内膜形成、中膜平滑筋細胞の壊死、弾性線維の断裂、

大動脈および冠動脈起始部の組織所見



直線化を認め、病変部の血管壁および周囲結合織に TN-C の発現沈着を認めた。さらに、肉眼的に瘤形成を認めなかった 18 例中 2 例にも同様の組織学的変化を認めた。

冠動脈起始部 (拡大)



III 血中 TN-C 値

血中 TN-C 値は個体差が大きく有意差は得られなかったが、コントロールに比べ CAWS 投与マウスは高値を示す傾向が見られた。

D. 考察

今回 CAWS 投与によって作成したマウスモデルでは 70-80%の個体に、腹部大動脈およびその主要分枝分岐部に、強い汎血管炎を認めた。冠動脈病変は 19 例中 3 例と頻度は高くなかったが、大動脈起始部から波及する汎血管炎と血管壁の著しい構造破壊を認めた。肉眼的には瘤と認められたのは、実際には血管壁および周囲結合織の炎症性肥厚であり、血管内腔の拡大はみられなかったが、組織学的には、ヒト川崎病急性期の冠動脈瘤組織と類似した所見を示し、炎症性動脈瘤形成症候群のマウスモデルとして用いることができると思われる。また、今回の我々のモデルでは CAWS 投与開始後 8 から 16 週目まで血管壁に強い炎症が持続し、それに伴って、病変部に TN-C の発現、沈着が見られた。従って、TN-C が動脈瘤形成に直結する血管壁の活動性炎症を反映する指標となると思われた。また今回は測定できた血清テネイシン C の検体数が少なく、血管病変の病態と正確な比較を行うことはできなかったが、TN-C 本モデルを用いたシミュレーシ