

炎症性動脈瘤形成症候群の新規診断法の確立に関する研究

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修復再生病理学 研究教授・
三重大学マトリックスバイオロジー研究センター センター長）

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候補として、テネイシン C の有用性評価と、動物モデルを用いて分子病態解析ならびに治療シミュレーションによる新しい治療法の開発を行った。

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）
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）
白石公（国立循環器病研究センター 部長）
佐地勉（東邦大学医療センター大森病院 教授）
武田充人（北海道大学大学院医学研究科 助教）
市田路子（富山大学大学院医学薬学研究部
准教授）
須田憲治（久留米大学医学部 准教授）
吉兼由佳子（福岡大学医学部 講師）
吉村耕一（山口大学大学院医学系研究科
特任准教授）
青木浩樹（久留米大学循環器病研究所 教授）

研究協力者

高橋啓（東邦大学医療センター大橋病院 教授）
大熊喜彰（国立国際医療研究センター 医員）
松井基浩（国立国際医療研究センター）
三谷義英（三重大学大学院医学系研究科
准教授）

菅沼栄介（東海大学医学部 講師）
河村陽一（防衛医科大学校 助教）
加藤太一（名古屋大学大学院医学系研究科
講師）
古野憲司（福岡市立こども病院 医員）
関満（群馬県立小児医療センター 部長）
土屋恵司（日本赤十字社医療センター 副部長）
布施茂登（NTT 東日本札幌病院小児科 医長）

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し、ほとんどが小児期に発症する。川崎病に合併することが多く、無治療の川崎病症例では約 25%に冠動脈瘤を合併する。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、いっ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、一般に、正常ではほとんど発現しないが活動性炎症に伴って特異的に発現する。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であり、日本循環器学会の「拡張型心筋症並びに二次性心筋症の診療に関するガイドライン(JCS2011)」では、成人心筋疾患の炎症およびリモデリングのマーカーとして推奨されている。本研究班では、平成 23-24 年度に川崎病患者 140 例の後ろ向き研究を行い、血清テネイシン C 値が瘤形成の病勢マーカーになるという予備的結果を得て、平成 24 年7月に「炎症性動脈瘤の診断方法」として特許出願を行った。本研究では、その知見に基づき、冠動脈瘤を形成する全身性炎症疾患として、川崎病およびその関連疾患の症例登録を行い、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、特に、候補分子としてテネイシン C の有用性を評価し、その分子機能を解明して新しい治療法の開発を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

平成 23 年度の成果に基づき、I.川崎病等小児有熱疾患患者の前向き研究、II.ヒト冠動脈瘤形成急性期における組織学的検討、III.マウスモデルを用いた分子機能解析と新規治療法の開発の大きく3

つに分けて、研究を行った。

I. 川崎病など小児有熱疾患患者の前向き研究

平成23年度平成 23 年度「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」班の枠組みを拡大し、国立国際医療研究センター、福岡大学附属病院のほか、新たに釧路赤十字病院、群馬県立小児医療センター、北見赤十字病院、釧路赤十字病院、済生会滋賀県病院、天使病院、東海大学大磯病院、東海大学八王子病院、名古屋第一赤十字病院、日鋼記念病院、福岡こども病院、北海道社会保険病院、NTT 東日本札幌病院を追加して症例登録を行った。

II. ヒト冠動脈瘤形成急性期における組織学的検討

平成 23 年度研究班で検討できなかった川崎病急性期の冠動脈瘤形成過程の病理組織変化について東邦大学大橋病院に保存されていた剖検標本を用いて テネイシン C の発現を免疫組織染色で評価し織像と対比した。

III.マウスモデルを用いた基礎研究

III-1炎症性動脈瘤モデルマウスのJNK阻害剤による治療

カンジダ・アルピカンス標準株の菌体抽出物質を、マウス C57BL/6 雄の腹腔内に投与して、川崎病類似汎血管炎モデルマウスを作成した。JNK 阻害薬を投与し、治療効果について評価した。

III-2 動脈瘤形成におけるテネイシン C の分子機能の解析

テネイシン C ノックアウトマウスおよび野生型マウスの腹部大動脈瘤周囲に塩化カルシウム塗布による炎症惹起と AngiotensinII の全身投与を組み合わせた強い血行力学負荷モデルを作成し、血管壁の破壊と動脈瘤形成、発現遺伝子プロファイルを対比した。さらに、大動脈由来培養平滑筋細胞にテネイシン C を作用して遺伝子発現変化を PCR array で検討した。

(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の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で承認された。

C. 研究結果

I. 川崎病等小児有熱疾患患者の前向き研究

川崎病急性期において、血清テネイシン C は、現在炎症マーカーとして用いられている白血球数・好中球%・CRP 値同様、活動性炎症の指標となる可能性が、確認された。

また、第2病日より第10-14病日に血中テネイシン C の再上昇した群は動脈瘤形成の頻度が低く、動脈瘤形成の予知マーカーになる可能性が示唆された。

II. ヒト冠動脈瘤病変組織

川崎病急性期の冠動脈瘤形成途中のヒト剖検症例を用いて組織変化およびテネイシン C 発現様式を解析することができた。急性期には炎症細胞浸潤部に一致して、また、炎症細胞が消褪し血管径の拡張が明らかになる瘤形成期には中膜でのテネイシン C 発現が確認された。

III. マウスモデルを用いた基礎研究

III-1 JNK 阻害剤による炎症性動脈瘤モデルマウスの治療

カンジダ・アルピカンス標準株の菌体抽出物質により、人川崎病と類似した組織像を示す血管病変を生じ、JNK 阻害剤は、病変の進行を明らかに阻害した。

II-2 動脈瘤形成におけるテネイシン C の分子機能の解析

炎症と AngiotensinII の組み合わせにより胸部大動脈に強い血行力学負荷をかけると、テネイシン C の発現が亢進し、テネイシン C 欠損マウスでは、その部分に血管壁の解離と瘤形成がみられ、テネイシン C が血管壁に保護的に作用することが明らかになった。

D. 考察

前向き研究によるテネイシン C の有用性評価については、研究協力者・施設をふやすことができたため、本症候群の関連疾患である川崎病の症例登録および検体収集は、予定数を超えて進行中である。しかしながら、本研究班が対象とする瘤形成症例について、統計学的有意差を得るためにはさらに数を増やす必要があり、川崎病患者として母数をふやした大規模研究が必要である。また本年度、川崎病急性期の冠動脈瘤形成途中のヒト剖検症例を用いて組織変化およびテネイシン C 発現様式を解析することができた。ヒト疾患の病態解析のためには、患者由来組織の解析が必須であることは言うまでもないが、現在、川崎病急性期死亡率は非常に低く、新たなヒト検体はほとんど得られない。組織検体の入手が著しく制限される心血管疾患では、希少なヒト病理検体と動物モデル、特に遺伝子改変動物を用いたモデル実験とを対比し統合して解析する必要がある。今回我々の確立した炎症性動脈瘤モデルマウスの組織変化、およびテネイシン C 発現は、ヒト剖検例の組織所見との類似点が極めて多く、新しい診断法の有用性評価や治療法のためのシミュレーション実験のみならず、詳しい病態解析やそれにもとづいた新しい治療法の開発にも極めて有用と思われる。これらの結果は、関連

疾患である日本川崎病学会の平成25年度学術集会のシンポジウムで発表し、学会内にワーキンググループを作ってガイドライン策定を行う予定で現在準備中である。炎症性動脈瘤形成症候群は、日本人によって発見され、本邦の小児の後天性循環器疾患として最も多い川崎病ときわめて関連の強い疾患であり、冠動脈瘤予知診断法の確立の社会的意義は非常に大きい。単に川崎病に合併症する動脈瘤として捉えるのではなく、成人に発症する大動脈瘤もふくめて広く炎症と動脈瘤形成を新しい疾患概念で捉えなおす、学術的な視点を提供する潜在性を有する。また、診断マーカー候補分子である、テネイシンCの分子機能解析は、炎症から組織修復とその破綻という分子病態とその制御機構についても学術的な大きな成果につながる事が期待される。

E. 結論

班代表として、細胞外マトリックステネイシンCの冠動脈瘤形成病勢を評価し動脈瘤形成を予知するバイオマーカーとしての有用性を臨床的評価、病理組織学的解析し、また、その分子機能を明らかにすることにより、新規診断治療法の開発を目指す動物シミュレーションモデル確立の調整・統括を行った。さらに日本川崎病学会および小児循環器病学会との連携をはかり、さらに大規模臨床研究とそれに基づいた診断ガイドライン作成の準備を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imanaka-Yoshida K, Yoshida T and Miyagawa-Tomita S. *Tenascin-C in development and disease of blood vessels*. *Anat Rec* (in press)
- 2) Kimura T, Shiraiishi K, Furusho A, Ito S, Hirakata S, Nishida N, Yoshimura K,

Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Miyamoto T, Ueno T, Hamano K, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M, Imaizumi T and Aoki H. *Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice*. *Sci Rep*. 4: 4051, 2014

- 3) 今中恭子. 心血管疾患におけるテネイシンCの機能—診断と治療への応用. **医学のあゆみ** 248: 529-534, 2014
- 4) Nozato T, Sato A, Hirose S, Hikita H, Takahashi A, Endo H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Aonuma K and Hiroe M. *Preliminary study of serum tenascin-C levels as a diagnostic or prognostic biomarker of type B acute aortic dissection*. *Int J Cardiol*. 168: 4267-9, 2013
- 5) Nakajima Y and Imanaka-Yoshida K. *New insights into the developmental mechanisms of coronary vessels and epicardium*. *Int Rev Cell Mol Biol*. 303: 263-317, 2013
- 6) Fujimoto M, Suzuki H, Shiba M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S and Taki W. *Tenascin-C induces prolonged constriction of cerebral arteries in rats*. *Neurobiol Dis*. 55: 104-9, 2013

2. 学会発表

- 1) 今中恭子. 第33回日本川崎病学会・学術集会、シンポジウム「基礎研究と臨床の対話—川崎病研究における translational research」
Tenascin-C -炎症性動脈瘤形成の疾患活動性を評価する新しい病態マーカー. 富山、2013年9月27日
- 2) 吉兼由佳子、古賀允久、長環、吉村耕一、今中恭子、橋本淳一、上田誠、山本由美子、青木浩樹、広瀬伸一. JNK抑制による川崎病冠動脈瘤予防薬の開発—汎血管炎モデルマウスを用いた検討. 第33回日本川崎病学会・学術集会、富山、2013年9月27日
- 4) 大熊喜彰、今中恭子、廣江道昭、松下竹次、阿部淳、市田露子、佐地勉、白石公、須田憲治、

三谷義英、吉兼由佳子. ヒト冠脈動脈病変進行においてテネイシンCは血管保護的に働く可能性がある. 第33回日本川崎病学会・学術集会、富山、2013年9月27日

なし

3. その他

なし

- 5) 今中恭子. 心筋組織構築改変における matricellular タンパクの役割と その臨床応用. 第102回日本病理学会総会、シンポジウム「炎症・免疫機構の新機軸と疾病の病理」、札幌 2013年6月8日
- 6) 今中恭子. 血管壁の成熟と病態における Matricellular タンパクの役割. 第91回に本生理学学会大会、シンポジウム「ストレスに対する血管応答制御の分子機構」 熊本. 2013年3月 16-18日
- 7) Kyoko Imanaka-Yoshida. Significant roles of matricellular protein in tissue reorganization. 第65回日本細胞生物学会大会 Symposium “Molecular mechanism of cell migration and extracellular reorganizaion in disease and tissue regeneration.”, 名古屋, 2013年6月19-21日
- 8) Imanaka-Yoshida K. Extracellular matrix remodeling in vascular development and disease. *The 7th Takao International Symposium on Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*, Tokyo, 2013. July 14.15
- 9) Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C in cardiovascular tissue injury and repair. *FASEB science research conference: “Matricellular proteins in development, health, and disease.”* Vermont, U.S.A., July 31, 2013

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1 特許取得

特願 2012-168018号(2012年7月30日出願)
発明の名称: 炎症性動脈瘤の診断方法 発明者: 今中恭子(吉田恭子), 吉兼由佳子、大熊喜彰、松下竹次、市田露子、須田憲治、三谷義英、吉田利通

2. 実用新案登録