

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（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の新規診断法の確立に関する研究
－川崎病等小児有熱疾患患者の前向き研究－

研究分担者： 阿部 淳（国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部 室長）
松下 竹次（国立国際医療研究センター小児科 医長）
廣江 道昭（国立国際医療研究センター循環器内科 医師）
白石 公（国立循環器病研究センター小児循環器 部長）
佐地 勉（東邦大学医療センター大森病院小児科学 教授）
武田 充人（北海道大学大学院医学研究科小児発達医学分野 助教）
市田 路子（富山大学大学院医学薬学研究部小児科学 准教授）
須田 憲治（久留米大学医学部小児科学 准教授）
吉兼 由佳子（福岡大学医学部小児科学 講師）

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のひとつテネイシン C に注目して前向き研究を行い、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の多くは川崎病に合併する。川崎病は乳幼児に好発する self-limited な筋型動脈炎を主とする全身性血管炎である。未だ病因は不明であり、本疾患に特徴的な症状(5 日以上続く発熱、両側眼球結膜の充血、口唇の紅潮・いちご舌、不定型発疹、四肢末端の硬性浮腫、非化膿性頸部リンパ節腫脹)に基づいて症候群として診断される。無治療では約 25%に冠動脈病変(CAL)を生じ、現在では先進国における後天性心疾患最大の原因であることが知られている。血管炎の進行に伴い、冠動脈の血管構造が破壊され遠心性の拡大を来すという病理学的な機序を考えると、より早期に血管炎を鎮静化させ、冠

動脈のリモデリングを抑制することが CAL 発生を抑制するために重要である。最新の第 21 回川崎病全国調査の結果、2010 年日本国内で 12755 名(男:7266 人、女:5489 人)の川崎病患者が発生し、少子化が急速に進行しているにもかかわらず川崎病患者数は右肩上がりに増加しており、CAL を合併した患者は未だ 3%前後に見られている。CAL(特に巨大冠動脈瘤)を合併すると、血栓性閉塞による心筋梗塞および突然死の予防のため永続的な抗凝固療法薬の内服が必要となるため、CAL 形成を如何にして防ぐかは大きな課題である。

テネイシン C(TN-C)は細胞外基質糖タンパクのひとつであり、胎児期の形態形成や癌浸潤、創傷(炎症)治癒、組織再生などに伴って、限定された部位に一過性に発現する。成人領

域では、急性心筋梗塞や拡張型心筋症の心室リモデリングを予測するバイオマーカーとして用いられている。我々は TN-C の炎症および組織リモデリングを表現する性質に着目し、保存検体を用いて川崎病症例の TN-C を測定し、免疫グロブリン大量療法 (IVIG) に反応した症例よりも IVIG に不応性を示した症例では初回治療前の血清 TN-C 値が有意に高かったことを発表した。つまり、川崎病においても TN-C は病勢・重症度と相関する可能性があることを示した。これを実証するため前向き研究を行った。

炎症マーカーとしての TN-C

川崎病初期治療は、IVIG やステロイドなどを加えた初回強化療法などが行われているが、いずれも不応・再燃例が存在する。冠動脈瘤形成を防ぐために、川崎病急性期治療においては第 8~9 病日に治療が奏功していることが望ましく、初期治療不応例・再燃例には迅速に追加治療を行う必要がある。しかし、初回治療不応例・再燃例でも CRP などの炎症マーカーは初回治療開始後に改善していることが多く、追加治療の決定に寄与し真に病勢を評価するバイオマーカーは今のところ存在しない。TN-C が川崎病の病態マーカーとなる可能性を検討した。

リモデリングマーカーとしての TN-C

川崎病における CAL 形成は、血管炎の進行に伴い、冠動脈の血管構造が破壊され遠心性の拡大を来すといわれている。しかし、臨床現場において、臨床症状が強く著明な炎症反応上昇を認めたにもかかわらず治療後に CAL 形成を認めなかった症例や、臨床症状に乏しく炎症反応上昇も僅かであったにもかかわらず治療後に CAL を形成した症例をしばしば経験する。これは、炎症による血管構造の破壊を修飾（保護的もしくは促進的）している因子の存在を意味する。CAL 形成における TN-C が果たす役割を明らかにすることを目的とした。

B . 研究方法

1. 後ろ向き研究

検体採取施設（計 15 施設）

国立国際医療研究センター、福岡大学附属病院、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

炎症マーカーとしての TN-C

2011 年 8 月~2013 年 5 月に共同研究施設に入院した川崎病症例のうち、初回治療前・後で血清 TN-C 値を測定できた 79 例を対象とした。2nd line therapy 以降の追加治療を必要としなかった群 (Add(-)群: n=56) と必要とした群 (Add(+)群: n=23) において、代表的な炎症マーカーである白血球数・好中球%・CRP と TN-C 値を初回治療前後で比較した。川崎病急性期治療は「川崎病急性期治療のガイドライン (2012 年改訂版)」と各共同研究施設の方針に従った。TN-C 測定は IBL 社の Human Tenascin-C Large (FN III-C) Assay Kit を用いてサンドイッチ法による EISA にて行った。

(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、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。

C . 研究結果

【研究結果】

炎症マーカーとしての TN-C

患者背景を表 1 に示す。

	Add (-) 群	Add (+) 群	p value
症例数	56	23	
年齢, median [range]	28か月 [2 - 120]	27か月 [4 - 93]	0.646
性別	男: 35, 女: 21	男: 19, 女: 4	0.081
診断(治療開始)病日, median [range]	4.5日 [2 - 8]	4日 [1 - 7]	0.480
有熱期間, median [range]	5日 [2 - 10]	7日 [2 - 13]	0.003
小林スコア, median [range]	3 [0-8]	4 [0-10]	0.034
治療, n			
ASAのみ	17	6	
IVIg + NSAIDs	24	8	
初回強化療法	15	9	
再燃した病日		8日 [4-19]	
冠動脈病変, n (%)			
なし	52 (92.9)	19 (82.6)	
あり	4 (7.1)	4 (17.4)	0.167

Add(+)群は Add(-)群と比較して小林スコア¹⁾が高く、そのため有熱期間が長かった。

Add(+)群の再燃した病日は中央値 8 日だった。有意差はなかったが、Add(+)群で CAL 形成が多い傾向にあった。

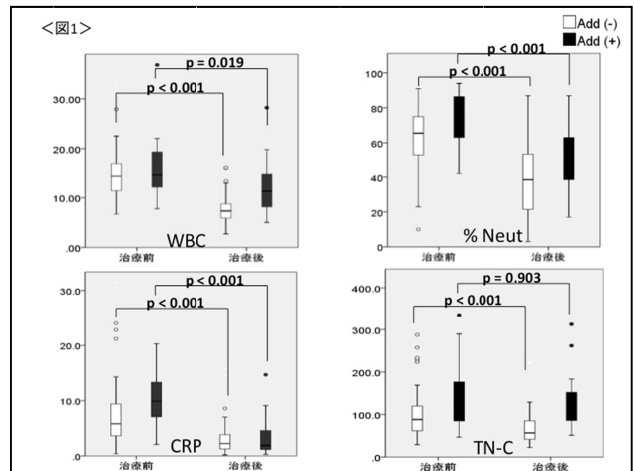
治療検査前検査データの比較を表 2 に示す。

< 表 2 >

	Add (-) 群 n = 56	Add (+) 群 n = 23	p value
WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$	14.3 [6.7 - 33.2]	14.6 [7.8 - 36.8]	0.337
Neut, %	66 [10 - 91]	71 [42 - 94]	0.016
Plt, $\times 10^4/\mu\text{L}$	31.3 [18.8 - 46.1]	31.4 [18.6 - 64.9]	0.658
Alb, g/dL	3.7 \pm 0.3	3.7 \pm 0.3	0.771
T-bil, mg/dL	0.6 [0.3 - 3.9]	1.0 [0.2 - 4.6]	0.345
AST, IU/L	40 [20 - 464]	46 [18 - 811]	0.197
ALT, IU/L	21 [10 - 585]	27 [6 - 656]	0.202
Na, mEq/L	134.6 \pm 2.7	134.0 \pm 3.7	0.393
CRP, mg/dL	5.8 [0.4 - 31.4]	9.9 [2.1 - 20.3]	0.013
TN-C, ng/mL	88.1 [29.1 - 287.7]	119.5 [46.6 - 335.1]	0.014

Add(+)群は Add(-)群に比較して、治療前の Neut%・CRP 値、そして血清 TN-C 値が有意に高かった。

代表的な炎症マーカーである白血球数・好中球%・CRP と TN-C 値の初回治療前後の推移を図 1 に示す。



Add(-)群では治療前後で WBC・Neut%・CRP・TN-C 全てが有意に低下したのに対し、Add(+)群では治療前後で WBC・Neut%・CRP は有意に低下したが、TN-C は低下しなかった。

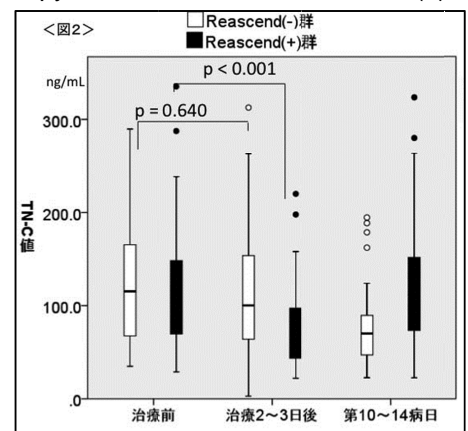
リモデリングマーカーとしての TN-C

両群の患者背景を表 3 に示す。

	Reascend (-) group	Reascend (+) group	p
症例数	39	35	
年齢, median [range]	31か月 [4 - 120]	28か月 [2 - 99]	0.782
性別	男: 29, 女: 10	男: 22, 女: 13	0.286
診断病日, median [range]	4日 [2 - 7]	5日 [1 - 8]	0.136
有熱期間, median [range]	6日 [3 - 13]	5日 [2 - 10]	0.551
初回治療, n			
ASAのみ	9	12	0.286
IVIg + NSAIDs	15	16	0.528
強化された初回治療	15	7	0.083
2 nd line therapy施行	15	7	0.083

年齢、性別、診断病日は両群において差はなかった。2nd line therapy を行われた症例が Reascend(-)群に多い傾向が見られた。

両群の TN-C 値の推移を図 2 に示す。



Reascend(+)群では初回治療により TN-C 値が有意に低下したが、Reascend(-)群では治療による TN-C の低下が見られなかった。

両群の血液検査データの比較を表 4 に示す。

<表4>			
	Reascend (-) group	Reascend (+) group	p
WBC	14.8 [7.8 - 36.8]	13.4 [6.7 - 27.9]	0.080
Neut%	69.5±16.1	63.2±14.3	0.083
Plt	30.3 [18.6 - 49.8]	33.7 [17.2 - 64.9]	0.600
Alb	3.6 [2.9 - 4.4]	3.8 [3.1 - 4.1]	0.678
T-bil	0.7 [0.3 - 4.6]	0.6 [0.2 - 4.6]	0.012
AST	41 [18 - 811]	35 [20 - 677]	0.267
ALT	24 [8 - 656]	19 [6 - 585]	0.172
Na	134 [126 - 138]	136 [129 - 142]	0.002
CRP	7.1 [1.8 - 31.4]	7.3 [0.4 - 21.2]	0.475
CRP (第10~14病日)	0.25 [0.03 - 3.53]	0.23 [0.01 - 1.71]	0.770

Reascend(-)群において、初回治療前の T-bil が高値、血清 Na 値が低値だった。第 10~14 病日の CRP 値に関しては、両群に差はなかった。

CAL 形成は Reascend(-)群に 7 例(17.9%)、Reascend(+)群に 1 例(2.9%)発生し、統計学的有意差を認めた(p=0.040)。

D. 考察

炎症マーカーとしての TN-C

代表的な炎症マーカーである白血球数・好中球%・CRP 値は、2nd line therapy を必要とした群でもしなかった群でも初回治療後に低下した。しかし、TN-C 値は 2nd line therapy を必要としなかった群では治療後に有意に低下したが 2nd line therapy を必要とした重症川崎病症例では低下しなかった。つまり、川崎病急性期において、血清 TN-C 値は活動性炎症の指標となる可能性が示唆された。過去に炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、Crohn 病）²⁾や関節リウマチ³⁾において治療前の血清 TN-C 値は超音波上の関節破壊の指数と良く相関していたことが報告されていることから、炎症マーカーとしての TN-C には疾患特異性はないと思われる。川崎病でみられる高サイトカイン血症は NF- κ B 活性化が極めて重要であること⁴⁾、ヒト樹状細胞由来の単球を LPS で刺激すると TN-C が産生さ

れるがその産生経路に NF- κ B が強く関与していること⁵⁾、関節炎モデルマウスにおいて、TN-C は TNF \cdot IL-6 \cdot IL-8 などのサイトカインと分泌を促進すること⁶⁾から考えると、川崎病急性期において NF- κ B が活性化することでマクロファージから種々のサイトカインが放出され繊維芽細胞などが TN-C を産生し、その TN-C が再度マクロファージに作用することで高サイトカインを助長していることが考えられた。

リモデリングマーカーとしての TN-C

第 10~14 病日に TN-C 値の再上昇を認めた群と認めなかった群で CAL 発生に有意な差を認めた理由として以下の 2 点が考えられた。

TN-C 値の再上昇がなかった群では、治療前後で血清 TN-C 値の統計学的に有意な低下が得られなかった。

第 10~14 病日に TN-C が再発現した。

に関しては、TN-C が再上昇しなかった群では初回治療により TN-C 値が低下しておらず炎症を制御できていなかったことが推定された。に関しては、急性期に炎症に伴って発現した TN-C が治療後、炎症の沈静化を反映して減少するが、修復期に再び発現して冠動脈拡大に対し保護的に働いた可能性が考えられた。TN-C は Matrix metalloproteinase (MMP)にて切断されることが知られているが⁷⁾、川崎病亜急性期において TN-C が MMP により切断され、露出したタンパクが冠動脈の血管構造の破壊に対し保護的に働いたと考えている。

E. 結論

テネイシン C は川崎病など、小児有熱性疾患に伴う動脈瘤形成の新しい病態診断マーカーとして有用であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oharaseki T, Yokouchi Y, Yamada H, Mamada H, Muto S, Sadamoto K, Miura N, Ohno N, Saji T, Naoe S and Takahashi K. *The role of TNF-alpha in a murine model of Kawasaki disease arteritis induced with a Candida albicans cell wall polysaccharide.* **Mod Rheumatol.** 24: 120-8, 2014
- 2) Ogata S, Tremoulet AH, Sato Y, Ueda K, Shimizu C, Sun X, Jain S, Silverstein L, Baker AL, Tanaka N, Ogihara Y, Ikehara S, Takatsuki S, Sakamoto N, Kobayashi T, Fuse S, Matsubara T, Ishii M, Saji T, Newburger JW and Burns JC. *Coronary artery outcomes among children with Kawasaki disease in the United States and Japan.* **Int J Cardiol.** 168: 3825-8, 2013
- 3) Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Naoe S and Saji T. *Kawasaki disease: basic and pathological findings.* **Clin Exp Nephrol.** 17: 690-3, 2013
- 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) Suda K, Kishimoto S, Takahashi T, Nishino H, Okamura H, Teramachi Y, Yokoyama T, Yasukawa H, Ohbu K, Imaizumi T, Matsuishi T. *Circulating myeloid dendritic cell is decreased in the acute phase of Kawasaki disease.* **J Clinic Experiment Cardiol** (in press).
- 6) Teramachi Y, Suda K, Ogawa S, Kamiyama H and Hamaoka K. *Flying with giant coronary aneurysms caused by Kawasaki disease.* **Int J Cardiol.** 168: 4964-5, 2013

2. 学会発表

- 1) 大熊喜彰、今中恭子、廣江道昭、松下竹次、阿部淳、市田蒔子、白石公、須田憲治、三谷義英、吉兼由佳子。血中テネイシン C 値は川崎病の活動性炎症の指標になりうる。第 49 回小児循環器学会総会・学術集会, 東京, 2013 年 07 月 11 日
- 2) 大熊喜彰、今中恭子、廣江道昭、松下竹次、阿部淳、市田蒔子、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

- 3) Okuma Y, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Matsushita T, Abe J, Ichida F, Shiraishil, Suda K, Mitani Y, Yoshikane Y. *Tenascin-C as a novel predictor of unresponsiveness to high-dose intravenous immunoglobulin and coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease.* Annual Meeting of European Pediatric Cardiology, London, UK, May 23, 2013
- 4) Matsui M, Okuma Y, Matsushita T. A severe case of Kawasaki disease refractory to plasma exchange that responded to a combination of pulsed methylprednisolone and plasma exchange. the 5th Congress of the Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society. New Delhi, India on March 6-9, 2014

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

研究協力者:

- 大熊喜彰 (国立国際医療研究センター小児科)
 松井基浩 (国立国際医療研究センター小児科)
 三谷義英 (三重大学大学院医学系研究科 小児科学)
 菅沼栄介 (東海大学医学部小児科学)
 河村陽一 (防衛医科大学校小児科学)
 加藤太一 (名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学)
 古野憲司 (福岡市立こども病院・感染症センター)
 関満 (群馬県立小児医療センター循環器科)
 土屋恵司 (日本赤十字社医療センター 第一小児科)
 布施茂昇 (NTT 東日本札幌病院小児科)