

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
-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:吉村 耕一（山口大学大学院医学系研究科血管外科学 特任准教授）
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。病態の正確な把握と分子機序の解明、それに基づいた画期的な診断・治療法の開発には、動物実験モデルの併用が必須である。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および新規治療法として JNK 阻害薬の効果について検討した。

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、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ニン C(TN-C)の分子動態の解析が必要である。現在、川崎病急性期の死亡はほとんどないため新たな剖検材料の入手は困難であり、また、病変の主座である冠動脈組織を生検により患児から得ることは不可能である。従って、病態の正確な把握と分子機序の解明、それに基づいた画期的な診断・治療法の開発には、実験動物モデルを用いた解析が必須である。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第一の目的とした。また、臨床では異なる疾患と捉えられているが、炎症という観点から何らかの共通の分子基盤を有することが予想される高齢者の腹部大動脈瘤組織では、JNK の活性が異常に亢進し、JNK 阻害薬が大動脈瘤治療薬として注目されている。そこで本研究では我々のモデルをもちいて、JNK 阻害薬の炎症性動脈瘤抑制効果についても検討した。

B . 研究方法

マウス血管炎・動脈瘤形成のためのカンジダ・アルビカンス菌体抽出液の精製および投与方法

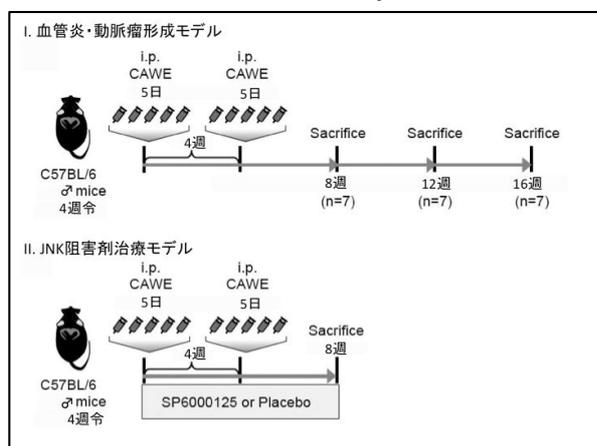
カンジダ抽出液の精製:Takahashi ら方法 (Takahashi K. et al. Inflamm.Res 2004: 53:72-77) に従い、カンジダ・アルビカンス標準株保存菌液をサブロー寒天培地にて 48 時間培養し、集菌、洗菌後、0.5N KOH 溶液で煮沸し抽出液を得、1N HCL 溶液でアルカリ抽出液 (*Candida albicans* cell wall extract: CAWE)とし、3 日間透析後 PBS にて 100mg/ml に調整した。

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、CAWE 4mg、/ マウス)、5 日間連続腹腔内投与を 4 週おき 2 クールおこない、初回投与から 8, 12, 16 週後に犠牲剖検した。

II. JNK 阻害剤投与

JNK 阻害剤 SP600125 (30mg/kg/day; Innovative, Research of America, Sarasota, FL. USA) およびプラセボのペレットを、CAWE 初回投与時にマウス背部皮下に埋め込んで投与した。



III 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てパラフィン切片を作成し、HE 染色、EVG 染色、テネイシン C (TN-C), α 平滑筋アクチン, マクロファージ (Mac3) に対する免疫組織染色を行った。

(倫理面への配慮)

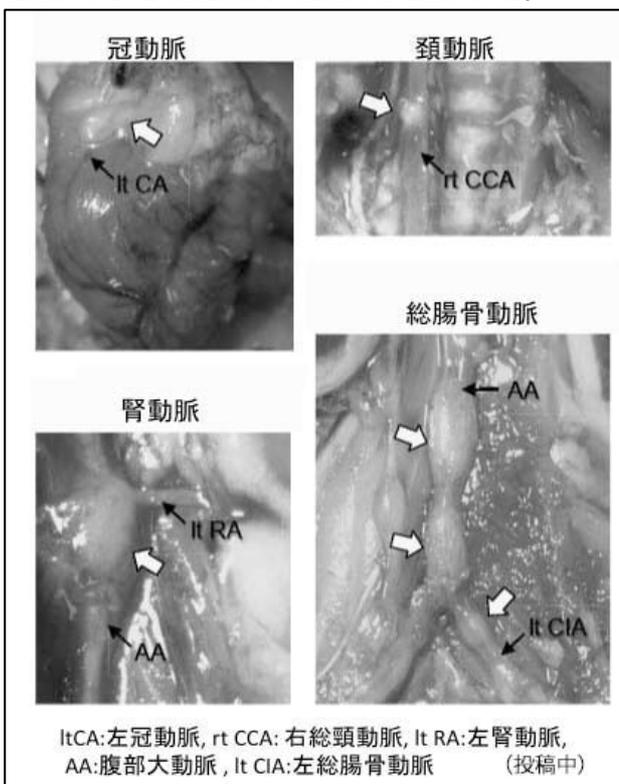
本実験計画は、山口大学、福岡大学の動物実験委員会で審査され承認された。

B. 結果

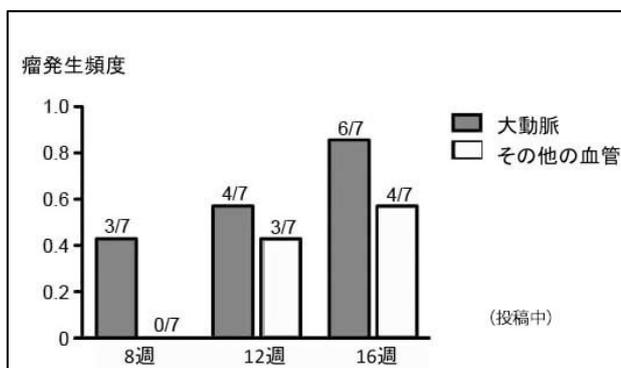
1 動脈瘤の形成

CAWE 投与により、肉眼的に、腹部大動脈に数珠状につながる瘤形成、および一部の

マウスでは総腸骨動脈、腎動脈分岐部、頸動脈および冠動脈に瘤形成を認めた。

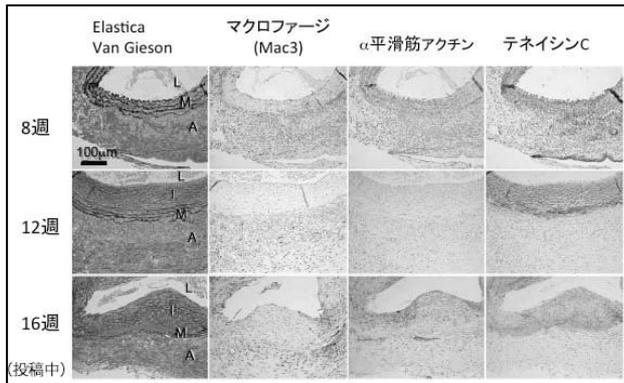


大動脈には、CAWE 初回投与後、8、12、16 週ではそれぞれ 42.9% (3/7)、57.1% (4/7)、85.7% (6/7) のマウスに大瘤形成をみとめたが、中型血管の病変発生頻度は低かった。冠動脈瘤形成は CAWE 初回投与後 12 週後の 7 例中 1 例で、16 週後の 7 例中 1 例で肉眼的に左冠動脈起始部から主幹部に認めた。



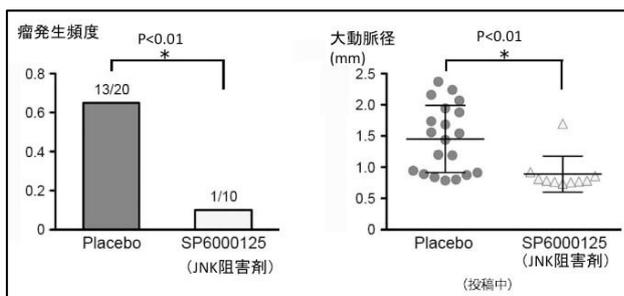
組織学的には CAWE 初回投与後 8 週後には、血管全層、特に外膜結合織にマクロファージを主体とする強い炎症細胞浸潤がみられ、中膜弾性線維の断裂と TN-C の全層性の沈着を認めた。12 週後には、炎症細胞浸潤はやや消退したが、中膜弾性線維は直線化、破壊され、平滑筋細胞

は消失、新生内膜の形成がみられた。TN-C は新生内膜と中膜に局限し、特に残存平滑筋細胞周囲に強い発現がみられた。16 週後には中膜の平滑筋細胞と弾性線維はほぼ消失して癒痕化し TN-C 沈着は肥厚した新生内膜に局限して見られた。



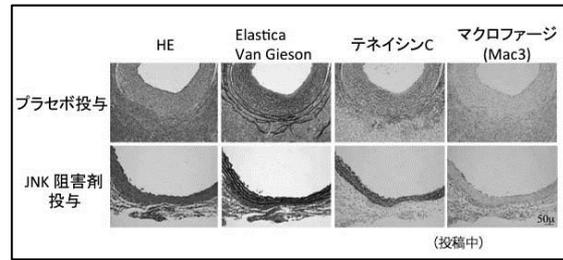
2 JNK 阻害剤による炎症性動脈瘤モデルマウスの治療

CAWE 初回投与後8週後に、プラセボ群投与群では 20 匹中に 13 例(65%)で、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と、JNK 阻害剤(SP6000125)投与群では 10 匹中に 1 匹(10%)に大動脈瘤形成を認めるのみで、発症率は有意に低く ($p<0.01$)、大動脈径も有意に小さかった ($p<0.01$)。



組織学的には、プラセボ群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がみられ、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層に強い発現が見られた。

JNK 阻害剤投与群では炎症細胞浸潤と弾性線維の破壊は軽度で TN-C 発現も中膜平滑筋層に軽度のみみられるのみであった。



D . 考察

今回 CAWE 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。冠動脈病変の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た。また、今回の我々のモデルでは CAWE 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、急性期の炎症部位、並びに瘤形成期中膜に TN-C の発現、沈着が見られ、ヒト川崎病より時間経過は長いが発現様式に類似性がみられた。従って、TN-C がヒト冠動脈瘤形成に直結する血管壁の組織リモデリングを反映する指標となると思われた。また、高齢者の腹部大動脈瘤組織では、JNK の活性が異常に亢進しているため JNK 阻害薬は、大動脈瘤治療薬として注目されている。我々の、炎症性動脈瘤モデルマウスでも、JNK 阻害薬により著明な瘤形成抑制効果が認めら、今後 JNK 阻害薬による炎症性動脈瘤症候群の治療の可能性も期待できる。

D . 結論

カンジダ・アルピカンス菌体抽出液投与により、炎症性動脈瘤形成症候群モデルマウスを作成した。JNK 阻害剤は炎症・動脈瘤形成の抑制に有効であった。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1) Nagasawa A, Yoshimura K, Suzuki R, Mikamo

- A, Yamashita O, Ikeda Y, Tsuchida M and Hamano K. *Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms*. *J Surg Res*. 183: 472-7, 2013
- 2) Yamashita O, Yoshimura K, Nagasawa A, Ueda K, Morikage N, Ikeda Y and Hamano K. *Periostin links mechanical strain to inflammation in abdominal aortic aneurysm*. *PLoS One*. 8: e79753, 2013
- 3) Kimura T, Shiraishi 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

2. 学会発表

- 1) 吉兼由佳子、吉村耕一、今中恭子、長環、古賀允久、山本由美子、青木浩樹、橋本淳一、上田誠、広瀬伸一 JNK 阻害薬による動脈瘤形成の抑制—川崎病類似汎血管炎モデルマウスを用いた検討。第 49 回小児循環器学会総会・学術集会、東京、2013 年 7 月 11 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
- 3) Yoshikane Y, Hashimoto J, Imanaka-Yoshida K, Koga M, Cho T, Yoshimura K, Yamamoto Y, Aoki H, Hirose S. Would Tenascin-C be a biomarker of Kawasaki disease-related arteritis? *The 7th Takao International Symposium on Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease, Tokyo, 2013. July 14. 15*
- 4) Yoshikane Y, Hashimoto J, Imanaka-Yoshida, K, Koga M, Cho T, Yoshimura K, Yamamoto Y,

Aoki H, Hirose S. A novel therapeutic target to control the development coronary artery aneurism due to Kawasaki disease in animal model - c-Jun N-Terminal Kinase inhibitor- *American Heart Association Scientific Session 2013, Dallas, U.S.A. Nov 16-20, 2013*

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