

201415052A

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

炎症性動脈瘤形成症候群の病態診断および治療法選択
に関する研究

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 今中 恭子(吉田 恭子)

平成27(2015)年 3月

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

炎症性動脈瘤形成症候群の病態診断および治療法選択
に関する研究

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 今中 恭子(吉田 恭子)

平成27(2015)年 3月

目 次

I.	総括研究報告 -----	1
	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 今中恭子	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	7
III.	付録	
	班会議プログラム -----	10
	研究成果の別刷 -----	14

総括研究報告書

炎症性動脈瘤形成症候群の病態診断および治療法選択に関する研究

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することを目的として、特に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スタンパクのひとつテネイシンCに注目して有用性評価を行った。

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)

市田露子 (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)

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)

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。一度、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り、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、動脈瘤形成の予知・病態診断マーカーおよび画期的な治療法の開発が急務である。

川崎病に合併する冠動脈瘤では、その発症を予防するために、日本小児循環器学会は川崎病急性期治療のガイドライン(平成 24 年改訂版)の中で、急性期の強い炎症反応を可能な限り早期に終息させる重要性を示し、そのために、初回免疫グロブリン療法不応例を抽出してより強化した初回治療を行う事を提言している。免疫グロブリン不応性の予測には、現在、複数の臨床検査項目を組み合わせた、久留米スコア、大阪スコア、群馬スコアが用いられるが、より単純な指標となる血中バイオマーカーの確立がのぞまれる。

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。本研究班では、平成 23-24 年度に川崎病患者の後ろ向き研究と剖検例の冠動脈組織の免疫組織学的解析を行い、急性期冠動脈病変でテネイシン C の発現が上昇する事を確認し、さらに血清テネイシン C 値が動脈瘤組織での局所発現を反映して上昇し、病勢マーカーになりう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、平成 25・26 年度研究班に引き続き、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、炎症性動脈瘤形成症候群の診断基準及び治療指針を策定する事を目的とする。

B. 研究方法

平成 23-25 年度の成果に基づき、川崎病等小児

有熱疾患患者の後ろ向き研究、前向き研究を行った。

1. 後ろ向き研究

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、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 値を国立国際医療研究センターで 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。

2. 前向き研究

平成 25 年度「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」班に加え、小児循環器病学会の学術委員会申請研究として連携を測って枠組みを拡大し、国立国際医療研究センター、福岡大学附属病院のほか、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 2011 年 3 月から 2014 年 10 月まで、症例登録を行った。

(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、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

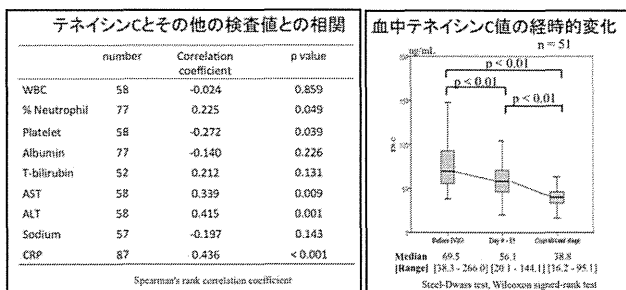
大学、国立国際医療研究センター、福岡大学、久留米大学、富山大学、北海道大学は厚生省倫理規定に基づき所属施設内に倫理委員会がすでに設置されており、かつ、本研究は事前に各施設での倫理委員会で倫理面からの審査を受けた。血液検体のセキュリティに関しては、識別コード記載した連絡表と採血管により連結可能な匿名化するシステムを構築した。

C. 研究結果

I. 後ろ向き研究

川崎病症例 106 例のうち、治療前後のテネイシン C 値を測定した 106 例(男:54 例, 女:52 例)を対象とし、初回免疫グロブリン治療で解熱を得た R 群(n=86)と追加治療を必要とした NR 群(n=20)を比較した。冠動脈病変は8例に認めた。

急性期の血清テネイシン C 値は CRP と相関がみられ、治療後有意に低下した。



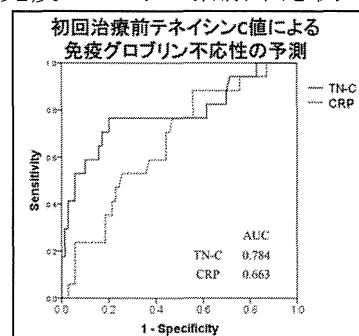
(投稿準備中)

免疫グロブリン不応群(NR 群)は反応群(R 群)に比べ、治療前のテネイシン C 値、AST が有意に高く、白血球血小板値が低かった。

	R 群 n = 86	NR 群 n = 20	p value
年齢(月)	24 [2 - 84]	21 [4 - 72]	0.424
男性, n(%)	46 (53.5)	8 (40.0)	0.277
< Laboratory data before IVIG >			
WBC, ×10 ³ /μL	13.9 [6.9 - 28.0] n = 49	10.9 [6.1 - 14.0] n = 9	0.012
Neutrophil, %	70 [25 - 93] n = 63	78 [45 - 87] n = 14	0.348
Platelet, ×10 ³ /mL	31.7 [21.0 - 58.8] n = 49	25.6 [20.7 - 46.3] n = 9	0.008
Albumin, g/dL	3.5 [2.3 - 4.9] n = 61	3.8 [1.8 - 4.3] n = 16	0.734
T-bilirubin, mg/dL	0.5 [0.3 - 2.4] n = 44	0.7 [0.5 - 4.5] n = 8	0.045
AST, IU/L	37 [17 - 801] n = 49	66 [31 - 1441] n = 9	0.010
ALT, IU/L	37 [6 - 272] n = 49	103 [7 - 764] n = 9	0.117
Sodium, mEq/L	135 [129 - 141] n = 49	134 [130 - 136] n = 8	0.078
CRP, mg/dL	8.4 [1.1 - 27.4] n = 70	10.9 [3.0 - 20.9] n = 17	0.037
TN-C, μg/mL	70.0 [28.8 - 266.0] n = 86	118.8 [46.6 - 653.4] n = 20	0.002

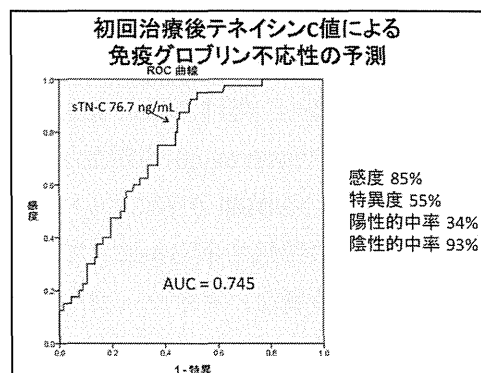
(投稿準備中)

治療前の血清テネイシン C 値をカットオフ値 95ng/mlとして追加治療の必要性をROC解析で予測すると, sensitivity70%, specificity77%、AUC0.784 に対し、CRP ではカットオフ値 6.9mg/dl で sensitivity79%、specificity52%、AUC0.663 であった。また、冠動脈病変を合併した症例は治療前テネイシン C 値が有意に高く、初回免疫グロブリン治療不応例が多かった。



2. 前向き研究

川崎病 265 例のうち、治療前後のテネイシン C 値を測定した 183 例(男:107 例, 女:76 例)を対象とし、初回治療で解熱を得た R 群(n=134)と追加治療を必要とした NR 群(n=40)を比較した。NR 群では冠動脈病変が有意に多かった。NR 群では初回治療前の%Neut, CRP, 血清テネイシン C が R 群より有意に高かった。また、R 群は初回治療前後で、WBC, %Neut, CRP、血清テネイシン C が有意に低下するのに対し、NR 群は WBC、% Neut、CRP は初回治療により低下したが、血清テネイシン C は低下しなかった。初回治療後の血清テネイシン C 値をカットオフ値 76.7ng/mlとして追加治療の必要性をROC解析で予測すると sensitivity 85%、specificity 52%、AUC 0.714 であった。



D. 考察

川崎病患者の後ろ向き研究により、急性期治療前の血中テネイン C 値が冠動脈瘤形成の予知マーカーとなりうる事が明らかになった。冠動脈瘤形成を予防するために、川崎病急性期治療のガイドライン(平成 24 年改訂版)では、初回免疫グロブリン療法不応例を早期に予測し、より強化した初回治療を行う事が提言されているが、今回の結果では、治療前の血中テネイン C 値が高い群は免疫グロブリン療法不応性の可能性が高く、血中テネイン C が強化治療必要性の指標となる事が示唆された。また、初期治療の効果の指標は解熱であるが、特にステロイド併用投与例では、発熱がマスクされるため、正確な効果判定が困難であるが、今回の前向き研究により、初回治療後の血中テネイン C 値が、初回免疫グロブリン療法の治療効果指標になりうる事も示唆された。しかしながら、現在、初期強化治療の統一プロトコールはなく、ステロイドをはじめいくつかの薬剤の組み合わせが試みられているため、本研究で対象とした症例も様々な治療を受けていたため、各治療群ごとの症例数の不足により、他の候補となる指標に対するテネイン C の優位性や、さらに、治療法の違いに基づく差、最適な治療法の選択に関して統計学的に証明するには至らなかった。また、血中テネイン C は有用ではあるが、絶対唯一の炎症性動脈瘤診断バイオマーカーではないことは、生物学的に明らかであり、2つないし3つのバイオマーカーを組み合わせで病態を正確に把握して治療法を選択する事が現実的と考えられる。

そのために、①さらに規模を拡大し、統一治療プロトコール下での全国規模の調査研究を行う、②テネイン C だけでなく、IL6 をはじめとするサイトカインや pentraxin3 等新たな冠動脈病変マーカーとされている候補分子についても同時に検討し、それぞれの特性を明らかにして正確な病態把握のための最適なバイオマーカー組み合わせを確立する事が必要である。このため、本研究班は、

2014年10月に日本川崎病学会内の「バイオマーカー小委員会」と連携し、すでに2014年4月から連携している小児循環器病学会の学術委員会申請研究班とあわせて合同研究班を組織し、これまでに本邦で発表された結果をもとに、各種バイオマーカーのエビデンス分類を行う(付録第2回班会議資料①②)とともに、1000例規模の前向き調査を開始した。

炎症性動脈瘤形成症候群は、1967年に川崎富作博士によって日本で初めて報告され、日本をはじめ先進国における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。テネイン C をはじめとする診断マーカー候補分子の確立、およびその分子機能解析は、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

細胞外マトリックステネイン C の血中濃度は冠動脈瘤形成病勢を評価して動脈瘤形成を予知し、適切な治療法選択のためのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Yoshikane Y, Koga M, Imanaka-Yoshida K, Cho T, Yamamoto Y, Yoshida T, Hashimoto J, Hirose S and Yoshimura K. *JNK is critical for the development of Candida albicans-induced vascular lesions in a mouse model of Kawasaki*

- disease. *Cardiovasc Pathol.* 24: 33-40, 2015
- 2) Suda K, Tahara N, Honda A, Iemura M, Yoshimoto H, Kudo Y, Kaida H, Abe T, Sawada K, Akashi H, Tanaka H, Fukumoto Y. *Persistent peripheral arteritis long after Kawasaki disease – Another documentation of ongoing vascular inflammation.* *Int J Cardiol.* 180:88-90, 2015
- 3) Suda K, Tahara N, Honda A, Yoshimoto H, Kishimoto S, Kudo Y, Kaida H, Abe T, Ueno T, Fukumoto Y. *Statin reduces persistent coronary arterial inflammation evaluated by serial 18fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging long after Kawasaki disease.* *Int J Cardiol.* 179:61-62, 2015
- 4) Imanaka-Yoshida K, Yoshida T and Miyagawa-Tomita S. *Tenascin-C in development and disease of blood vessels.* *Anat Rec.* 297: 1747-57, 2014
- 5) Imanaka-Yoshida K and Aoki H. *Tenascin-C and mechanotransduction in the development and diseases of cardiovascular system.* *Front Physiol.* 5: 283, 2014
- 6) Hamada K, Miura Y, Toma N, Miyamoto K, Imanaka-Yoshida K, Matsushima S, Yoshida T, Taki W, Suzuki H. *Gellan sulfate core platinum coil with tenascin-C promotes intra-aneurysmal organization in rats.* *Transl Stroke Res.* 5: 595-603, 2015
- 7) Bowles NE, Arrington CB, Hirono K, Nakamura T, Ngo L, Wee YS, Ichida F, Weis JH. *Kawasaki disease patients homozygous for the rs12252-C variant of interferon-induced transmembrane protein-3 are significantly more likely to develop coronary artery lesions.* *Mol Genet Genomic Med.* 2: 356-61, 2014
2. 学会発表
- 1) 吉兼由佳子、山口耕一、吉田利通、今中恭子. 血管炎モデルマウスを用いた川崎病動脈瘤の病態診断と治療第 102 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月 26-28 日
- 2) 横内 幸、大原関利章、勝碕譲児、榎本泰典、伊原文恵、今中恭子、高橋啓. 川崎病の心臓および冠状動脈におけるテネインシン C の発現. 第 102 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月 26-28 日
- 3) 大熊喜彰、今中恭子、廣江道昭、松下竹次、阿部淳、市田露子、白石公、須田憲治、三谷義英、吉兼由佳子. 川崎病の治療反応性・冠動脈形成を予測する新規バイオマーカー. テネインシン C の有用性について. 第 34 回日本川崎病学会・学術集会、東京、2014 年 10 月 31 日・11 月 1 日
- 4) Okuma K, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Matsushita T, Abe J, Ichida F, Saji T, Shiraishi I, Suda K, Takeda A, Mitani Y, Yoshikane Y. *Serum Tenascin-C is a potential marker for active inflammation in Kawasaki disease.* Pediatric Academic Research and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, May 3-6, 2014, Vancouver, Canada
- 5) Imanaka-Yoshida K. *Tenascin-C in cardiovascular development and tissue remodeling.* Spring Symposium “Tenascins: Defining roles in tissue homeostasis and cancer” May 12-13, 2014, Strasbourg, France
- 6) Imanaka-Yoshida K, Okuma T, Matsushita T, Hiroe M, and Takahashi K. *Tenascin-C can be a novel prognostic biomarker for Kawasaki disease.* American Heart Association's

International Kawasaki Disease
Symposium 2015. Feb. 3-6, 2015,
Honolulu, Hawaii, USA

- 7) Okuma K, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M,
Matsushita T, Abe J, Ichida F, Saji T,
Takahashi K, Shiraishi I, Suda K,
Takeda A, Mitani Y, Yoshikane Y.
*Tenascin-C as a potential biomarker for
predicting therapeutic effect in
Kawasaki disease.* American Heart
Association's International Kawasaki
Disease Symposium 2015. Feb. 3-6,
2015, Honolulu, Hawaii, USA
- 8) Yokouchi Y, Ohasraseki Y, Enomoto Y,
Naoe S, Imanaka-Yoshida K,
Takahashi K. *Tenascin-C expression in
cardiovascular lesion of Kawasaki
disease.* American Heart Association's
International Kawasaki Disease
Symposium 2015. Feb. 3-6, 2015,
Honolulu, Hawaii, USA

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

なし

3. その他

なし

班員	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
今中 恭子	Yoshikane Y, Koga M, Imanaka-Yoshida K, Cho T, Yamamoto Y, Yoshida T, Hashimoto J, Hirose S and Yoshimura K.	JNK is critical for the development of Candida albicans-induced vascular lesions in a mouse model of Kawasaki Disease	Cardiovasc Pathol	24	33-40	2015
	Imanaka-Yoshida K, Yoshida T and Miyagawa-Tomita S	Tenascin-C in development and disease of blood vessels.	Anat Rec	297	1747-57	2014
	Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y, Aonuma K and Imanaka-Yoshida K	Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation	J Am Heart Assoc	3	e001052	2014
	Imanaka-Yoshida K and Aoki H	Tenascin-C and mechanotransduction in the development and diseases of cardiovascular system	Front Physio	5	283	2014
	Hamada K, Miura Y, Toma N, Miyamoto K, Imanaka-Yoshida K, Matsushima S, Yoshida T, Taki W, Suzuki H	Gellan sulfate core platinum coil with tenascin-C promotes intra-aneurysmal organization in rats.	Transl Stroke Res	5	595-603	2014
	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, Aoki H.	Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice.	Sci Rep	4	4051	2014
阿部淳	阿部淳	川崎病とサイトカイン	日本臨床	72	1548-53	2014
	佐地勉	抗TNF- α 製剤	日本臨床	72	1641- 1649	2014

佐地勉	Chida A, Sato H, Shintani M, Nakayama T, Kawamura Y, Furutani Y, Inai K, Saji T, Matsuoka R, Nonoyama S, Nakanishi T	Soluble ST2 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide combination. Useful biomarker for predicting outcome of childhood pulmonary arterial hypertension.	Circ J	78	436-42	2014
	Oharaseki T, Yokouchi Y, Yamada H, Mamada H, Muto S, Sadamoto K, Miura N, Ohno N, Saji T, Naoe S, Takahashi K	The role of TNF- α in a murine model of Kawasaki disease arteritis induced with a <i>Candida albicans</i> cell wall polysaccharide.	Mod Rheumatol	24	120-8	2014
市田露子	Bowles NE, Arrington CB, Hirono K, Nakamura T, Ngo L, Wee YS, Ichida F, Weis JH	Kawasaki disease patients homozygous for the rs12252-C variant of interferon-induced transmembrane protein-3 are significantly more likely to develop coronary artery lesions.	Mol Genet Genomiv Med	2	356-61	2014
須田憲治	Suda K, Tahara N, Honda A, Iemura M, Yoshimoto H, Kudo Y, Kaida H, Abe T, Sawada K, Akashi H, Tanaka H, Fukumoto Y	Persistent peripheral arteritis long after Kawasaki disease - Another documentation of ongoing vascular inflammation.	Int J Cardiol	180	88-90	2015
	Suda K, Tahara N, Honda A, Yoshimoto H, Kishimoto S, Kudo Y, Kaida H, Abe T, Ueno T, Fukumoto Y	Statin reduces persistent coronary arterial inflammation evaluated by serial ¹⁸ F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging long after Kawasaki disease.	Int J Cardiol	179	61-62	2015
	須田憲治	川崎病冠動脈後遺症への対応 (1)冠動脈瘤に対する抗血栓療法	日本臨床	72	1641-1649	2014
吉村耕一	Kurabayashi M, Okishige K, Ueshima D, Yoshimura K, Shimura T, Suzuki H, Mitsutoshi A, Aoyagi H, Otani Y, Isobe M	Diagnostic utility of unenhanced computed tomography for acute aortic syndrome.	Circ J	78	1928-34	2014

青木浩樹	Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Yoshimura K, Aoki H, Tsustui H, Noda T, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M	Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	35	127-36	2015
------	---	--	-------------------------------	----	--------	------

厚生労働省難治性疾患政策研究事業「炎症性動脈瘤形成症候群の病態診断および治療法
選択に関する研究」班

日本川崎病学会「バイオマーカー検討」小委員会
第1回 合同班会議 キックオフミーティング

日時:平成26年10月31日(金)08:00～09:00

会場:学士会館3階303号室(学術集会会場隣接)

世話人:

今中恭子	三重大学
佐地 勉	東邦大学

委員

武田充人	北海道大学
関 満	群馬大学
阿部 淳	国立成育医療研究センター
益田博司	国立成育医療研究センター
大熊喜彰	国立国際医療研究センター
勝部康弘	日本医科大学
高月晋一	東邦大学
加藤太一	名古屋大学
三谷義英	三重大学
廣野恵一	富山大学
池田和幸	京都府立医科大学
吉兼由佳子	福岡大学
須田憲治	久留米大学
山村健一郎	九州大学

協議事項

日本川崎病学会「バイオマーカー」研究小委員会委員長選出
今後の活動計画

厚生労働省難治性疾患政策研究事業「炎症性動脈瘤形成症候群の病態診断および治療法
選択に関する研究」班

日本川崎病学会「バイオマーカー検討」小委員会研究班
第2回 合同班会議

日時:平成27年2月2日(月)18:00～

会場:Moanna Surfrider (Honolulu, Hawaii)

出席者:

佐治勉(東邦大学)、今中恭子(三重大学)、阿部淳(国立成育医療研究センター)、益田
博司(国立成育医療研究センター)、大熊喜彰(国立国際医療研究センター)、松下竹次
(国立国際医療研究センター)、勝部康弘(日本医科大学)、小川俊一(日本医科大学)、
高月晋一(東邦大学)、緒方昌平(北里大学) 三谷義英(三重大学)、廣野恵一(富山大
学)、池田和幸(京都府立医科大学)、吉兼由佳子(福岡大学)、楠田剛(九州大学:代
理)、須田憲治(久留米大学)

協議事項

(1)川崎病の病態診断バイオマーカーに関するエビデンス分類(資料①)

(2)研究計画

- 研究プロトコルの確定:採血ポイント、測定バイオマーカーの選定(数種類)な
どをふくむ
- 患者登録参加施設、協力施設の選定・依頼
- 全国規模での患者検体の収集(目標 1000 例)
- 患者検体の輸送、保存、バイオマーカーの測定、患者情報との比較検討

(3)次回開催予定

第2回合同班会議 資料①

以下の候補分子につき、資料②にしたがったエビデンス分類を行う。

エビデンス分類担当者と担当バイオマーカー						
バイオマーカー候補		論文実績	担当(案)	担当者	エビデンス分類担当	略記号
1	尿中8-isoprostane	TH	TH		1 北大	HO
2	Resistin	TH	TH		2 成育医療研究センター	SI
3	Adiponectin	Adipocytokineとして	TH	TH	3 国際国際医療研究センター	KI
4	Leptin		TH	TH	4 日本医科大	NM
5	高感度CRP (hs-CRP)			NM	5 東邦大	TH
6	一酸化窒素 (NO)	TH		NM	6 北里大	KZ
7	プロスタグランジンI2 (PGI2)	TH		HO	7 名古屋大	NG
8	トロンボキサンB2 (TXB2)	TH		HO	8 三重大	ME
9	ペントラキシン3 (PTX3)	NM		NM	9 富山	TO
10	エンドセリン1 (ET-1)	NM		NM	10 京都府立医大	KF
11	IL-6			SI	11 福岡大	FO
12	IL-8			SI	12 久留米大	KR
13	IL-10			KZ	13 九大	KS
14	IL-17			KZ		
15	IL-18			NG		
16	IL-1β			NG		
17	尿中β2ミクログロブリンMG(尿中β2MG)			ME		
18	インターフェロンγ (IFN-γ)			ME		
19	MCP-1			KF		
20	ICAM-1			KF		
21	血管内皮増殖因子 (VEGF)			FO		
22	procarcintonin	和歌山、鹿児島、北九州、済生会兩部、群大		FO		
23	真性多血症遺伝子1 (PRV-1)	SI	SI			
24	腫瘍壊死因子α (TNFα)	TO	TO	TO		
25	sTNFR-1		TO	TO		
26	sTNFR-2		TO	TO		
27	トロポニンT (TnT)	?	?	KS		
28	高感度トロポニンT (hs TnT)		?	KS		
29	トロポニンI (TnI)		?	KS		
30	HMGB-1	鹿児島		NM		
31	エラスターゼ	TH		KR		
32	テネイシンC	KI		KI		
33	ラミニン	TH		TH		
34	Dダイマー	KR		KR		
35	BNP			NM		
36	NT-proBNP			NM		

川崎病急性期治療のガイドライン(平成24年改訂版)より抜粋

I 序文

本来、診療ガイドライン(practical guideline)とは、その時点で最も適切な診断や治療を供与することを目的として、病気の治療などについてその根拠や手順についての最新の医学情報を専門家がまとめた指針である。しかし、一般には手順書として強制力を持つことはなく、医療現場では患者の病状の違いや治療環境・重症度などの諸事情を総合的に検討した結果、ガイドラインによって推奨された以外の治療を行わざるを得ないことも多々遭遇する。また諸外国で有用性が報告されていても、まだわが国では未承認の医薬品のため使用できない場合もある。無作為化比較試験を含む臨床研究の結果は多くの研究者により検証され、その信頼性が確認されるまでに多くの年月を要する。

エビデンスの分類

近年に作成されたガイドラインが取り上げる知見は、根拠となる臨床研究のデザインに応じて、またその有効性に応じて、二元的に分類表示される。

〈研究デザインによるレベル(クラス)〉

- Class I a: 系統的レビュー・メタアナリシス
- Class I b: 無作為化比較試験
- Class II a: 非無作為化比較試験
- Class II b: その他の準実験的研究
- Class III: 非実験的記述的研究(比較研究, 相関研究, 症例対照研究など)
- Class IV: 専門家委員会や権威者の意見

〈有効性による分類(グレード)〉

- Grade A: 強く勧められる
- Grade B: 勧められる
- Grade C: 勧められるだけの根拠が明確でない
- Grade D: 行わないよう勧められる

今回のガイドラインには、この分類を用いて根拠となる情報を表示した。

1. ガイドライン改訂の背景

静注用免疫グロブリン(IVIG)単回静注の公知承認に向けて、厚生省(当時)科学研究(大西班・香川医科大学)(平成10～12年度)「小児医薬品調査研究班」小児薬物療法における医薬品の適正使用の問題点の把握

及び対策に関する研究、循環器領域の薬剤」と日本小児循環器学会学術委員会「急性期川崎病(KD)の治療ガイドライン」でまとめられたガイドライン(以下、旧ガイドライン)は、2003年7月に初めて提唱されたが、すでに8年が経過した。この間に新しいエビデンスが蓄積され、また新しい薬物療法も追加報告されてきた。さらに3年毎に、国際川崎病シンポジウムも開かれ、ガイドラインの改訂が必要と考えられたため委員を再編成して取り組んできた。

2. 目的と方法

IVIG承認後に市販後調査の結果が集積され、IVIG単回療法の有効性と安全性が示され、年々冠状動脈病変(CAL)の合併頻度が低下してきている。しかし依然として巨大冠状動脈瘤はおおむね同頻度で推移しており、最終的にIVIG不応例への迅速な対応が鍵となる。

今回は最新の文献調査、エビデンスレベルとグレード評価、治療法(治療薬選択手順)の再考、特にoff-labelの扱いを重要視した。例えば、旧ガイドラインに記載されていないインフリキシマブ(IFX)、シクロスポリンA(CsA)などの新規治療法に関しては、十分にrisk/benefitを考慮して、日本内外のエビデンスを集積した。毎年世界から200近い論文が発表されるが、いまだに最良の治療薬に関しては定説がない。しかし、自己免疫性疾患やリウマチ性疾患など多くの疾患で長きにわたって特効薬はなく、症例毎の観察によることが多い。

3. 診断と不全型への対応

第21回川崎病全国調査の結果が自治医科大学から報告された。2年間の合計患者数(2009～2010年)は23,730人である。KDの診断は診断の手引き第5版に基づいて行う。以下に示す6つの主要症状のうち5つ以上の症状を伴うものをKDとする。

- 1) 5日以上続く発熱(ただし、治療により5日未満で解熱した場合も含む)
 - 2) 両側眼球結膜の充血
 - 3) 口唇、口腔所見: 口唇の紅潮、いちご舌、口腔咽頭粘膜のびまん性発赤
 - 4) 不定形発疹
 - 5) 四肢末端の変化:
 - (急性期) 手足の硬性浮腫、掌蹠ないしは指趾先端の紅斑
 - (回復期) 指先からの膜様脱落
 - 6) 急性期における非化膿性頸部リンパ節腫脹
- ただし、上記6主要症状のうち、4つの症状しか認められなくても、経過中に断層心エコー法もしくは、

Tenascin-C in Development and Disease of Blood Vessels

KYOKO IMANAKA-YOSHIDA,^{1,2*} TOSHIMICHI YOSHIDA,^{1,2} AND SACHIKO MIYAGAWA-TOMITA^{3,4}

¹Department of Pathology and Matrix Biology, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie 514-8507, Japan

²Mie University Research Center for Matrix Biology, Tsu, Mie 514-8507, Japan

³Department of Pediatric Cardiology, Medical Research Institute, Tokyo Women's Medical University, Tokyo 162-8666, Japan

⁴Division of Cardiovascular Development and Differentiation, Medical Research Institute, Tokyo Women's Medical University, Tokyo 162-8666, Japan

ABSTRACT

Tenascin-C (TNC) is an extracellular glycoprotein categorized as a matricellular protein. It is highly expressed during embryonic development, wound healing, inflammation, and cancer invasion, and has a wide range of effects on cell response in tissue morphogenesis and remodeling including the cardiovascular system. In the heart, TNC is sparsely detected in normal adults but transiently expressed at restricted sites during embryonic development and in response to injury, playing an important role in myocardial remodeling. Although TNC in the vascular system appears more complex than in the heart, the expression of TNC in normal adult blood vessels is generally low. During embryonic development, vascular smooth muscle cells highly express TNC on maturation of the vascular wall, which is controlled in a way that depends on the embryonic site of cell origin. Strong expression of TNC is also linked with several pathological conditions such as cerebral vasospasm, intimal hyperplasia, pulmonary artery hypertension, and aortic aneurysm/ dissection. TNC synthesized by smooth muscle cells in response to developmental and environmental cues regulates cell responses such as proliferation, migration, differentiation, and survival in an autocrine/paracrine fashion and in a context-dependent manner. Thus, TNC can be a key molecule in controlling cellular activity in adaptation during normal vascular development as well as tissue remodeling in pathological conditions. *Anat Rec*, 297:1747–1757, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: muscle; tenascin-C; blood vessel

Abbreviations used: ECM = extracellular matrix; TNC = tenascin-C; VSMC = vascular smooth muscle cell; α SMA = α -smooth muscle actin; SAH = subarachnoid hemorrhage.

Grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; Grant sponsor: Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan; Grant sponsor: Grant-in-Aid for Scientific Research.

*Correspondence to: Kyoko Imanaka-Yoshida M.D., Ph.D., Department of Pathology and Matrix Biology, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie 514-8507, Japan. Fax: 81592315009. E-mail: imanaka@doc.medic.mie-u.ac.jp

Received 10 November 2013; Accepted 25 January 2014.

DOI 10.1002/ar.22985

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

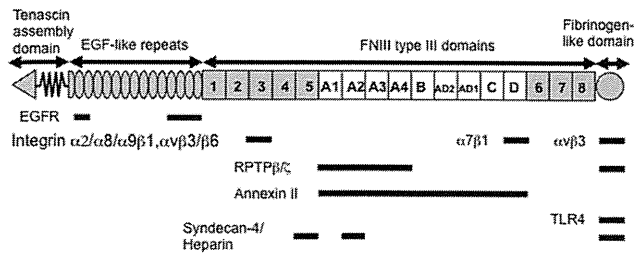


Fig. 1. The modular structure of TNC and known binding receptors. Each TNC monomer comprises four distinct domains: an assembly domain, EGF-L, constant (gray), and alternatively spliced (black) FNIII repeats, and the C-terminal FBG. (Modified from Midwood et al., *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68, 3175–3199).

Living tissue is composed of multiple heterogeneous cells and extracellular matrix (ECM) synthesized by these cells. ECM provides the structural framework to mechanically support cell shape and position and to integrate mechanical forces generated inside individual cells and transmit them to the whole tissue. Furthermore, ECM biologically regulates cell function. Increasing attention has been directed to a unique functional category of ECM, matricellular protein, which does not contribute directly to structures such as fibrils or basement membranes, but rather modulates cell function by interacting with cell-surface receptors, proteases, growth factors, and other matrix molecules (Bornstein and Sage, 2002; Bornstein, 2009).

Tenascin-C (TNC) is a prototype member of matricellular proteins along with thrombospondin-1 and SPARC (Sage and Bornstein, 1991; Bornstein, 1995). TNC is highly expressed during embryonic development, wound healing, inflammation and cancer invasion, and has a wide range of effects on cell adhesion, motility, differentiation, growth control, and extracellular matrix production and deposition. As in the case of target disruption of several other matricellular protein genes, TNC knockout mice do not display distinct phenotypes (Saga et al., 1992; Forsberg et al., 1996). However, accumulating data based on detailed studies of disease models using a TNC knockout have demonstrated that TNC could play an important role in the development and remodeling of various tissues [reviewed in (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011)]. Several other excellent reviews have been directed toward understanding the role of TNC in cancer invasion and inflammation (Midwood and Orend, 2009; Midwood et al., 2011; Udalova et al., 2011; Van Obberghen-Schilling et al., 2011; Brellier and Chiquet-Ehrismann, 2012). In this review, we will focus on the role of TNC in cardiovascular development and disease, highlighting its biological significance for vascular smooth muscle cells (VSMCs).

TENASCIN-C

Tenascins are a family of four multimeric extracellular matrix glycoproteins: tenascin-C, X, R, and W (Tucker et al., 2006; Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011). The best described member of the family is TNC, which is a huge molecule of about 220–400 kDa as an intact monomer and assembled with a hexamer. The molecule consists of an N-terminal assembly domain, followed by EGF-like repeats, constant and alternatively spliced

fibronectin Type III repeats, and a C-terminal fibrinogen-like globular domain (Fig. 1). Each domain of TNC interacts with other matrix molecules and cell surface receptors including integrins $\alpha9\beta1$, $\alpha v\beta3$, and $\alpha v\beta6$, toll-like receptor 4 (TLR-4) and syndecan-4, and transmits multiple signals [also see (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2006; Midwood and Orend, 2009)].

Regulatory Mechanism of TNC Expression

Strong expression of TNC is found in the embryo near migrating cells, at sites of epithelial–mesenchymal interactions, and in adult tissue, for example, in the cancer stroma or at sites of tissue repair and regeneration associated with inflammation. Gene expression of TNC is tightly regulated dependent on the tissue microenvironment; in particular, various growth factors and many signaling pathways are involved in the regulation of TNC expression [reviewed in (Tucker and Chiquet-Ehrismann, 2009)]. The promoter region of TNC has several binding sites for transcription factors, including Prx1 (activated by FAK signaling; McKean et al., 2003), Ets (Watanabe et al., 2003), AP1 elements (activated via ERK/MAPK; Chiquet-Ehrismann et al., 1994, 1995), and Smad 2/3 (Jinnin et al., 2004).

Furthermore, it is well recognized that mechanical stress is an important modulator of the expression of TNC. Indeed, TNC is often expressed at sites subjected to mechanical stress, such as myotendinous and osteotendinous junctions (Jarvinen et al., 2000), and its expression is down-regulated by immobilizing tendons while load-induced bone remodeling and muscle overload up-regulates TNC expression (Webb et al., 1997; Fluck et al., 2000; Mikic et al., 2000; Mackey et al., 2011). *In vitro*, mechanical strain induces TNC expression in fibroblasts (Asparuhova et al., 2009, 2011) and VSMCs (Feng et al., 1999).

The molecular pathway of the mechano-induction of TNC has been extensively studied in fibroblasts. Chiquet et al. (2009) have elegantly demonstrated a RhoA-mediated signaling axis of TNC induction (Fig. 2). In culture, cyclic tensile strain activates RhoA in fibroblasts, depending on integrin $\beta1$ (Chiquet et al., 2007) and integrin-linked kinase (ILK; Maier et al., 2008), which causes the reduction of monomeric G-actin by inducing actin assembly and stress fiber formation (Ridley and Hall, 1992). Depletion of the G-actin pool frees MAL/myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A)/megakaryoblastic leukemia-1 (MKL1) to enter the nucleus (Asparuhova et al., 2009), which induces TNC expression partly depending on serum response factor (SRF) (Asparuhova et al., 2009, 2011). This RhoA-mediated actin signaling activated by mechanical stimulation requires pericellular fibronectin (Lutz et al., 2010). Meanwhile, exogenous TNC interferes with fibronectin-mediated RhoA activation (Wenk et al., 2000), destabilizes actin stress fibers through down-regulation of tropomyosin-1 (Ruiz et al., 2004), and finally suppresses TNC transcription (Lutz et al., 2010), creating a negative feedback loop controlling TNC expression.

Moreover, it is noteworthy that TNC itself is an elastic molecule that can be stretched to several times its resting length *in vitro* (Oberhauser et al., 1998; Marin et al.,

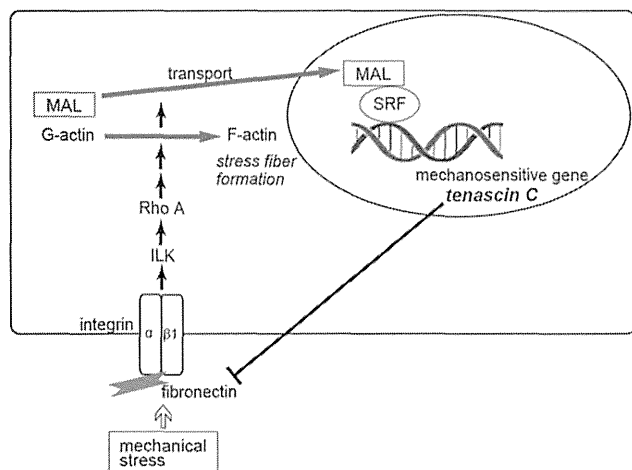


Fig. 2. Schematic presentation of the molecular pathway of the mechano-induction of TNC. Mechanical strain activates RhoA in fibroblasts, depending on fibronectin, integrin $\beta 1$ and ILK, which causes the reduction of monomeric G-actin by inducing actin assembly and stress fiber formation. Depletion of the G-actin pool frees MAL/MRTF-A/MKL1 to enter the nucleus, which induces TNC expression partly depending on SRF. Meanwhile, TNC interferes with fibronectin-mediated RhoA activation, and finally suppresses TNC transcription. (Adapted from Asparuhova et al., Scand J Med Sci Sports, 2009, 19, 490–499).

2003), and may contribute to tissue elasticity and protect against mechanical stress as a shock absorber.

TNC in Cardiovascular System

The characteristic of spatiotemporally restricted expression during embryonic development and tissue remodeling in response to injury is clearly observed in the heart. During the development of the heart, TNC is transiently expressed at restricted sites during several important stages such as differentiation of cardiomyocytes (Imanaka-Yoshida et al., 2003). It is sparsely detected in the normal adult myocardium, but reappears under pathological conditions associated with inflammation. In various heart diseases such as myocardial infarction, myocarditis and hypertension, TNC synthesized by interstitial non-cardiomyocytes plays an important role in tissue remodeling by weakening the adhesion of cardiomyocytes to connective tissue, promoting the recruitment of myofibroblasts, and modulating inflammatory responses [reviewed in (Imanaka-Yoshida, 2012; Imanaka-Yoshida et al., 2004; Midwood et al., 2011; Okamoto and Imanaka-Yoshida, 2012)]. Consequently, by taking advantage of its specific expression, TNC can be applicable as a biomarker and a molecular imaging target for diagnosis of disease activity (Imanaka-Yoshida, 2012; Okamoto and Imanaka-Yoshida, 2012). In contrast, TNC in the vascular system is more complex. In general, the expression of TNC in the normal vascular wall is low and upregulated in pathological conditions; however, positive immunostaining of TNC is sometimes seen at branching sites of normal muscular vessel walls (Mackie et al., 1992). Constitutive expression of TNC is also detected in the medial layer of the abdominal aorta of normal adult mice but not in the tho-

racic aorta (Kimura et al., in press). TNC-producing cells in the vascular wall are predominantly smooth muscle cells in media.

Vascular Development and TNC

Smooth muscle is an involuntary nonstriated muscle found in various organs/tissues, such as the bladder, uterus, gastrointestinal tract, bronchus, and medial layer of blood vessels. VSMCs contribute to the contraction and relaxation of the vessels, controlling blood pressure, and blood flow. VSMCs are derived from multiple progenitor cell types and the diversity of precursor cells may contribute to various cellular function of the vascular wall (Majesky, 2007, 2013; Majesky et al., 2011; Xie et al., 2011, 2013). VSMC populations with different embryonic origins are observed not only in different vessels but also within segments of the same vessel, located in discrete groups within the vessel (Majesky, 2013; Xie et al., 2013).

Development of aorta and TNC. The origin of VSMCs of the aorta is heterogeneous (Fig. 3). The second heart field gives rise to VSMCs of the root of the aorta as well as the pulmonary trunk (Waldo et al., 2005). The cardiac neural crest contributes ascending and arch portions of the aorta and its branches, the innominate and right subclavian arteries, right and left common carotid arteries, and ductus arteriosus, but not left and right pulmonary arteries. The origin of VSMCs of the descending aorta is more complex. Initially, smooth muscle cell differentiation is induced in lateral plate mesoderm-derived cells; however, this population is replaced by paraxial mesoderm (somites) derivatives (Esner et al., 2006; Pouget et al., 2006; Wasteson et al., 2008; Wiegrefe et al., 2009). Individual somites build up locally restricted spatial domains of the “segmental” aortic wall (Majesky, 2007).

Despite the mosaic origin of the component cells, no evident segmental expression pattern of TNC is observed during development of the aorta. In E12–13 mouse embryos, very weak expression of TNC is observed in the ascending aorta and pulmonary truncus, in contrast to the strong expression in outflow and pulmonary arteries (Fig. 4A). Expression of TNC in medial smooth muscle cells of the aorta is upregulated after ED14–15 (Fig. 4B) when the systemic circulatory system is established, and becomes stronger after birth. This upregulated expression may reflect the increased hemodynamic stress on the aortic wall. Similarly, increased mechanical stress produced by ligation of pulmonary arteries increased TNC expression (Jones et al., 2002).

Development of coronary artery and TNC. Most cells of coronary vessels originate from extracardiac tissue known as the proepicardial organ. Mesenchymal cells from this region attach to and migrate along the surface of the heart to form a nascent epicardium. Subsequently, the epithelial epicardium undergoes epithelial-mesenchymal transition and seeds pluripotent mesenchymal cells into the subepicardial space, which differentiate into coronary smooth muscle cells, perivascular fibroblasts, myocardial interstitial cells, and possibly part of the endothelial cells (Mikawa and Gourdie, 1996; Dettman et al., 1998; Perez-Pomares et al., 1998)

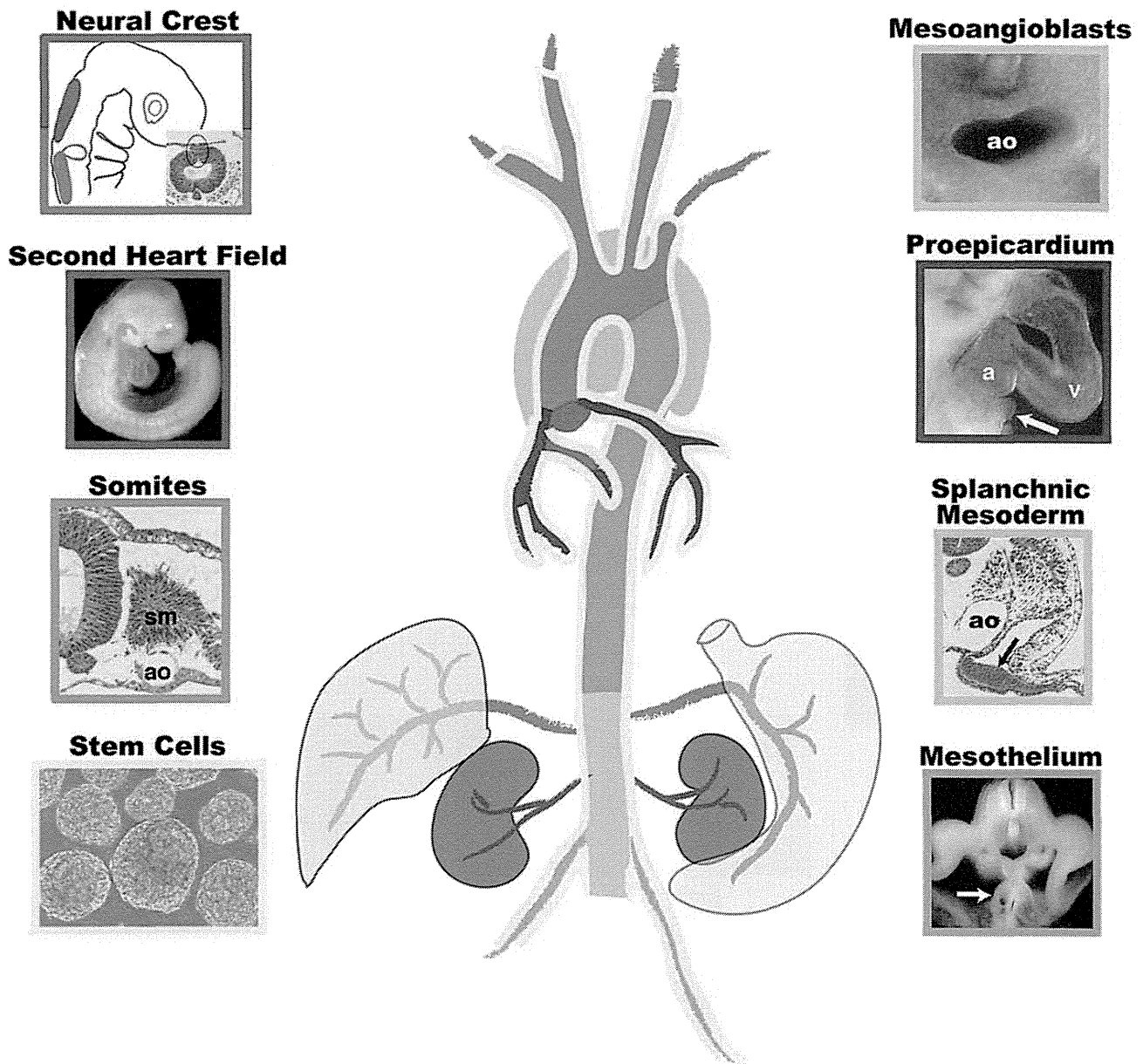


Fig. 3. The heterogeneous origin of vascular smooth muscle cells of the aorta and coronary arteries. Different colors explain different embryonic origins for vascular smooth muscle cells as indicated in the boxed images to the left and right columns. Cardiac neural crest cells form the ascending and aortic arch and branch walls, and preotic neural crest cells contribute to the septal branch coronary artery. The proepicardium, splanchnic mesoderm, and mesothelium are marked by

arrows in each boxed image. The mesothelium forms vascular smooth muscle cells of the developing intestine and lung. The yellow line shows that various sources of stem cells contribute to both local and systemic vascular wall. a: Atrium; ao: dorsal aorta; sm: somite; v: ventricle (Adapted from Majesky, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27, 1248–1258).

[also see (Nakajima and Imanaka-Yoshida, 2013) for review]. TNC is upregulated at the epithelial-mesenchymal transition of epicardial cells. Epicardium-derived endothelial precursors form the vascular plexus. Once the primitive coronary endothelial tubes connect with the aortic sinuses of the ascending aorta, VSMCs are recruited. While VSMCs of the coronary arteries are mainly derived from the proepicardial organ, the preotic neural crest contributes to the septal coronary artery

(Arima et al., 2012). Strong expression of TNC is detected, closely associated with the formation of the thick α -smooth muscle actin (α SMA) positive vascular wall (Ando et al., 2011; Fig. 5), which suggests that TNC may be involved in maturation of the coronary artery.

Maturation of the vascular wall includes the differentiation of mural cells from the undifferentiated mesenchyme, mural cell proliferation, and recruitment. Addition of TNC to epicardial cells in culture changes