

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）

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

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 今中 恭子(吉田 恭子)

平成26(2014)年 3月

目 次

| | |
|--|----|
| 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 | |
| 分担研究報告 | |
| 1. 川崎病等小児有熱疾患患者の前向き研究 | 6 |
| 阿部淳・松下竹次・廣江道昭・白石公・佐地勉・武田充人・ 市田蓠子・須田憲治・吉兼由佳子 | |
| 2. ヒト冠動脈瘤組織の病理学的研究 | 11 |
| 佐地勉・高橋啓 | |
| 3. 炎症性動脈瘤形成症候群動物モデルに関する研究 | 14 |
| 吉村耕一・吉兼由佳子 | |
| 4. 動脈瘤形成におけるテネイシン C の分子機能の解 | 析 |
| 18 | |
| 青木浩樹 | |
| 研究成果の刊行に関する一覧表 | 21 |
| 付録 | |
| (資料)班会議プログラム | 25 |
| 研究成果の別刷 | 27 |

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

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。

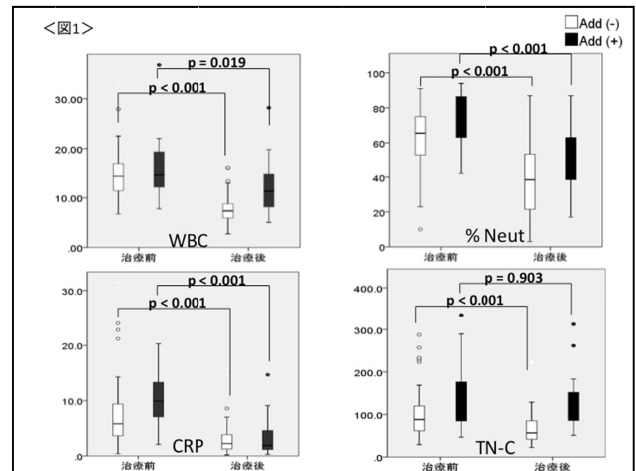
治療検査前検査データの比較を表 2 に示す。

< 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(-)群と比較して、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。

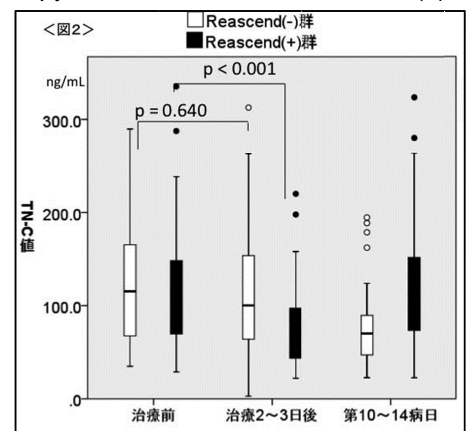
リモデリングマーカーとしての TN-C

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)

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
—ヒト冠動脈瘤組織の病理学的研究—

研究分担者：佐地 勉（東邦大学医療センター大森病院小児科学 教授）

研究協力者：高橋 啓（東邦大学医療センター大橋病院病理診断科 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。本研究で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、テネシン C に注目し、ヒト冠動脈瘤病変でのテネシン C の発現を確認し、病変の進行に伴う発現経時的变化について検討した。

A. 研究目的

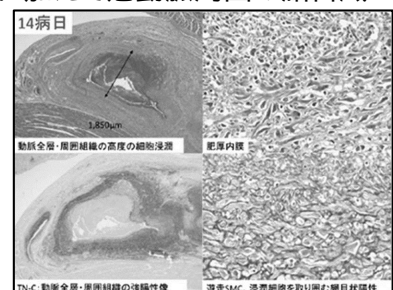
炎症性動脈瘤形成症候群にみられる冠動脈瘤は、心筋梗塞の原因となって生命予後を左右する最も重篤な病変である。多くは、川崎病に合併するが、現在、冠動脈瘤形成を予知する有効なマーカーはない。我々は、組織傷害と炎症に伴って発現が著しく増加する細胞外マトリックス分子の一つテネシン C(TN-C)が新しいマーカーとして有用であると予想した。一般に、TN-C は、病変局所に沈着するとともに、一部は血中に放出されるため、血中濃度を測定することが可能である。血中バイオマーカー TN-C の有用性を検証するために、実際のヒト冠動脈瘤病変での TN-C の発現を確認し、病変の進行に伴う発現経時的变化を解析することは必須である。平成23年度研究班で解析したヒト剖検症例の瘤壁は、組織学的にはすでに癒着化しており、炎症期から瘤形成の進行する急性期における所見が得られなかった。従って、本年度は、急性期病変の進行における TN-C の発現様式を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

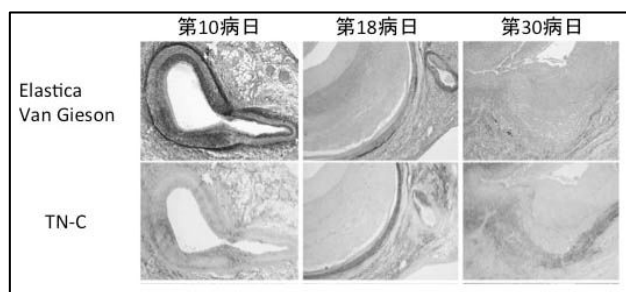
東邦大学医療センター大橋病院に保存されている川崎病急性期剖検症例13検例（年齢：3か月～5歳2ヶ月、性別：男9例、女4例、病日：6日～6年）の冠動脈、および心筋組織について HE, Elastica Van Gieson(EV), Sirius Red(SR)染色および、TN-C、CD68、 α 平滑筋アクチン(SMA)を免疫組織染色し、炎症細胞浸潤、エラスチン線維破壊などの組織像と対比した。

【結果】

血管炎の存在する冠動脈では全例で TN-C の発現が認められ、発現強度は炎症の程度と関連した。経時的な検討では、18-20 病日を境に TN-C 発現の局在に左が認められた。すなわち 10-18 病日例では、血管壁に加えて冠動脈周囲の結合織に強い浮腫性変化と強い炎症細胞浸潤がみられ、この領域に一致した TN-C の発現をみた。

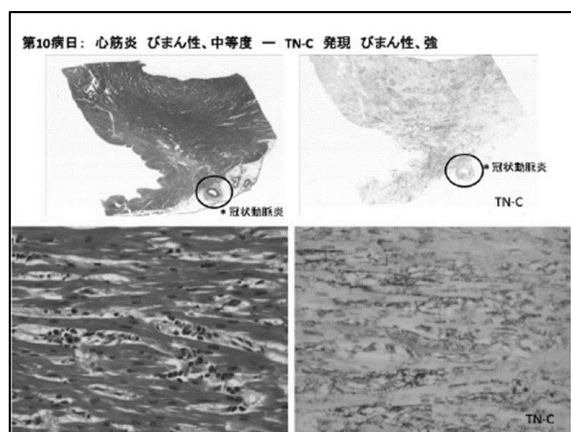


炎症が消退し始める 27 日以降では TN-C の発現は中膜および新生内膜に局限し、外膜結合織での TN-C 発現はほとんどみられなくなった。



8ヶ月以降例では多くの血管炎癒痕部では発現がなかったが、肥厚内膜深部の新生血管や再疎通血管周囲に発現をみた。血管炎を伴わない動脈では TN-C の発現はほとんどみられなかった。

2 心筋炎が高度な症例は 4 例で、7 例は軽度であった。残りは心筋梗塞合併例であった。心筋炎の程度が高度な症例では TN-C の発現は高く、かつ広範囲に認められる傾向にあった。これに対し、心筋炎の程度が軽度あるいは限局性の場合、後続部位に TN-C の強い発現を認めた。CD68 養成マクロファージ浸潤が有意な領域に TN-C が強く発現する傾向が見られたが、CD66 陽性好中球優位の症例においても TN-C の発現は強く認められた。



心筋炎は 33 病日例まで観察されたが、それ以降の症例では心筋炎や心筋炎後線維化は認められなかった。一方、30 病日以降症例の多くで新旧の心筋梗塞を伴っていた。TN-C は炎症細胞浸潤や梗塞が存在する領域に一致して発現し、その強度は炎症細胞浸潤の程度と相関した管周囲に発現をみた。

D . 考察

川崎病急性期に、TN-C は冠動脈病変部の炎症に伴って発現するが、壁構造が破壊され瘤形成が進行する時期には、炎症細胞浸潤部よりむしろ血管中膜に局在し、病期により異なる細胞によって産生され、また、病態修飾機能を示す可能性が示唆された。また、冠動脈瘤形成患者で、心筋組織にも炎症を伴い、その病変にも TN-C 発現を認めることが明らかになった。従って、血中 TNC 濃度は、冠動脈病変の程度のみならず、より広く病態の強さを反映するマーカーになることが示唆された。

E . 結論

ヒト川崎病冠動脈瘤形成の急性期に、病変局所に病勢を反映して TNC が発現することが確認できた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Harada M, Akimoto K, Otaka M, Sato K, Oda H, Otsuki M, Takahashi K, Kishiro M and Shimizu T. *Thrombolytic therapy in Kawasaki disease: a report of four cases. Pediatr Int.* 55: e111-5, 2013
- 2) 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
- 3) Takahashi K, Oharaseki T and Yokouchi Y. *Update on etio and immunopathogenesis of Kawasaki disease. Curr Opin Rheumatol.* 26: 31-6, 2014
- 4) Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Naoe S and Saji T. *Kawasaki disease: basic and pathological findings. Clin Exp Nephrol.* 17: 690-3, 2013

- 5) Tobayama H, Takahashi K, Fukunaga H, Matsui K, Tanaka N, Harada M, Furukawa T, Oda H, Akimoto K, Kishiro M and Shimizu T. *Analysis of arterial function in adults with a history of Kawasaki disease.* J **Cardiol.** 61: 330-5, 2013

2. 学会発表

- 1) 横内幸、大原関利章、勝崎譲児、原田真菜、今中恭子、高橋啓. 急性期川崎病心筋炎におけるテネイシンCの発現. 第33回日本川崎病学会・学術集会、富山、2013年9月27日
- 2) 高橋啓、横内幸、大原関利章、勝崎譲児、原田真菜、今中恭子. 急性期川崎病冠状動脈炎におけるテネイシンCの発現. 第33回日本川崎病学会・学術集会、富山、2013年9月27日

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

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、臨床に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

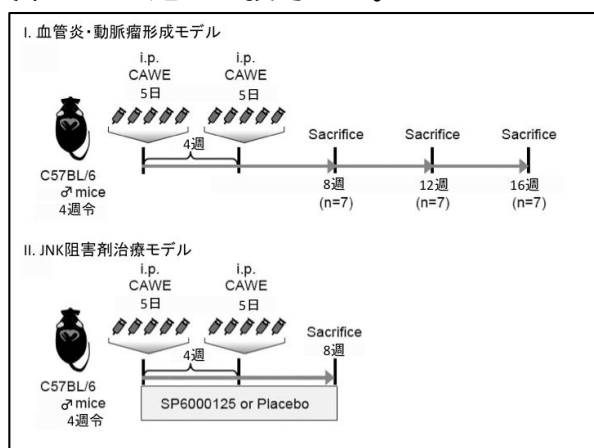
カンジダ抽出液の精製:Takahashi ら方法 (Takahashi K. et al. Inflamm.Res 2004: 53:72-77) に従い、カンジダ・アルビカンス標準株保存菌液をサブロー寒天培地にて 48 時間培養し、集菌、洗菌後、0.5N KOH 溶液で煮沸し抽出液を得、1N HCL 溶液でアルカリ抽出液 (*Candida albicans* cell wall extract: CAWE)とし、3 日間透析後 PBS にて 100mg/ml に調整した。

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)

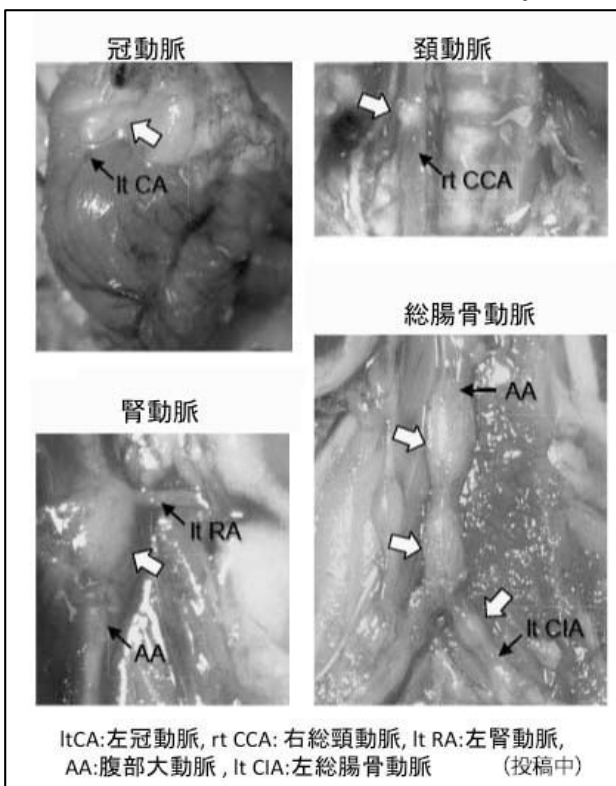
本実験計画は、山口大学、福岡大学の動物実験委員会で審査され承認された。

B . 結果

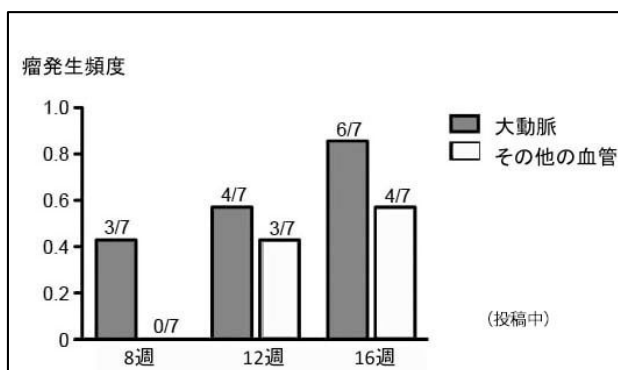
1 動脈瘤の形成

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。

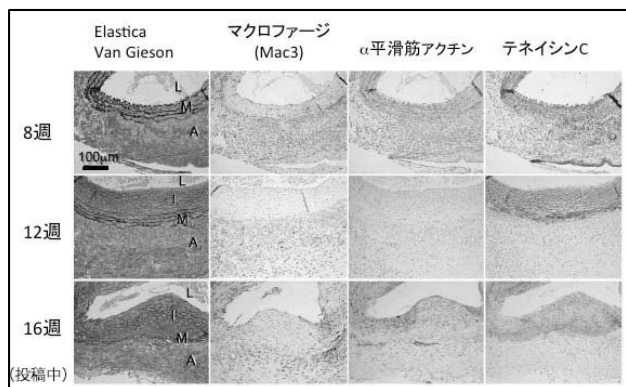


大動脈には、CAWE 初回投与後、8、12、16 週ではそれぞれ 42.9%(3/7)、57.1%(4/7)、85.7%(6/7)のマウスに大瘤形成をみとめたが、中型血管の病変発生頻度は低かった。冠動脈瘤形成は CAWE 初回投与後 12 週後の 7 例中 1 例で、16 週後の 7 例中 1 例で肉眼的に左冠動脈起始部から主幹部に認めた。



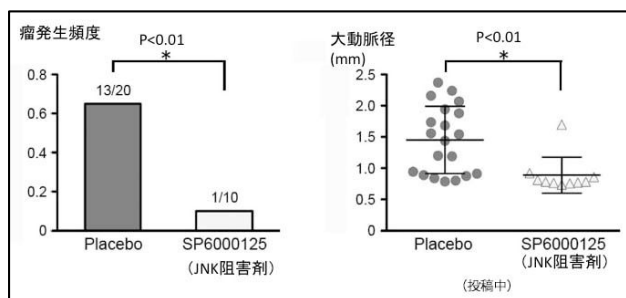
組織学的には CAWE 初回投与後 8 週後には、血管全層、特に外膜結合織にマクロファージを主体とする強い炎症細胞浸潤がみられ、中膜弾性線維の断裂と TN-C の全層性の沈着を認めた。12 週後には、炎症細胞浸潤はやや消退したが、中膜弾性線維は直線化、破壊され、平滑筋細胞

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。



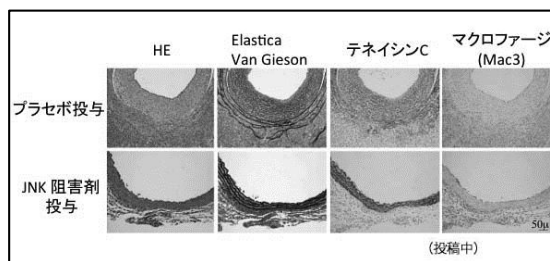
2 JNK 阻害剤による炎症性動脈瘤モデルマウスの治療

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組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る。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

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
- 動脈瘤形成におけるテネイシン C の分子機能の解析 -

研究分担者：青木浩樹（久留米大学循環器病研究所分子生物学 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。画期的な診断・治療法の開発には、動物実験モデルを用いた病態の正確な把握と分子機序の解明が必須である。本研究では、動脈の炎症・瘤形成の病態制御の鍵分子であり、診断マーカー候補分子の一つ、細胞外マトリックス、テネイシン C の血管壁における分子機能の解析を行った。

A . 研究目的

炎症性動脈瘤形成症候群は多くは小児に発症し、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不可逆的な著しい拡張をおこし、本態は、血管壁の組織破壊であると考えられる。最近、高齢者の大動脈拡張性病変、すなわち、大動脈瘤 / 大動脈解離の分子病態メカニズムの解析が精力的にすすめられている。急性炎症に続発する本症候群の病態とは一見異なるが、血管壁の不適切なストレス応答、組織破壊から血管の不可逆的拡張にいたる分子機構は共通すると思われる。我々は、最近、慢性炎症に起因し、より緩徐に破壊が進行する大動脈疾患である大動脈瘤のヒト組織を解析し、組織破壊活性が高い部位でテネイシン C (TN-C) の発現が高いこと、マウス腹部大動脈モデルでも炎症に伴って TN-C が発現が誘導することを見いだした。TN-C は細胞外マトリックスのうち、多彩な分子機能を持つ matricellular タンパクの一つに分類され、組織リモデリングを制御する鍵分子の一つと考えられている。本研究では、TN-C ノックアウトマウスを用いて大動脈瘤・大動脈瘤解離モデルを作成し血管壁における TN-C の炎症制御および組織保護作用に

ついて検討した。

B . 研究方法

本研究は、吉村耕一(山口大学)、今中恭子(三重大学)と共同で行った。

1 動物

C57BL6 をバックグラウンドとする TN-C レポーターマウス、および TNC 遺伝子欠損マウスを用いた。

2 大動脈瘤・解離モデル

腹部大動脈周囲に塩化カルシウム塗布すると、大動脈周囲に炎症が惹起され、血管壁組織が破壊されて血管が拡張、すなわち腹部大動脈瘤が形成される。また、AngiotensinII を負荷すると血圧が上昇する。この二つを組み合わせると、腹部大動脈瘤形成部の上流、胸部大動脈に非常に強い血行動態負荷をかけることができる。本研究ではこのモデルを使用した。

3 細胞培養および精製 TN-C

大動脈平滑筋細胞は、内因性 TN-C の影響を除外するため、TN-C ノックアウトマウスの胸部大動脈から elastase/collagenase を用いて分離した。培養系に添加する TNC はヒトグリオーマ U251 cell line の培養上清から精製した。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウス実験を用いた実験は山口大学、三重大学の指定された管理区域内で行い、生命倫理・安全対策に対する取り組みが確保された。本実験計画は、指針に基づき各大学の動物実験委員会および組換え DNA 実験安全委員会で承認され、遺伝子改変実験動物についても指定された管理区域内で行なった。

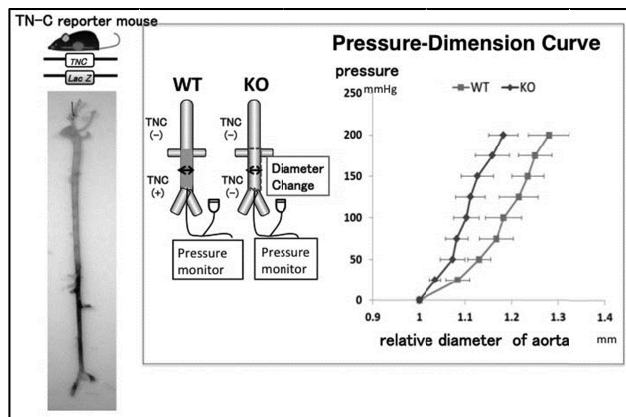
C. 結果

1 血管壁における TN-C の発現

マウス胎児の大動脈で、胎児循環がほぼ確立する胎生 14.5 日以降、大動脈全長の中膜平滑筋層で強い TN-C の発現がみられ、出生後、発現はさらに増強したが、成体マウスでは、腹部大動脈中膜にのみ弱い発現がみられた。

2 TN-C ノックアウトマウスの血管壁の物理特性

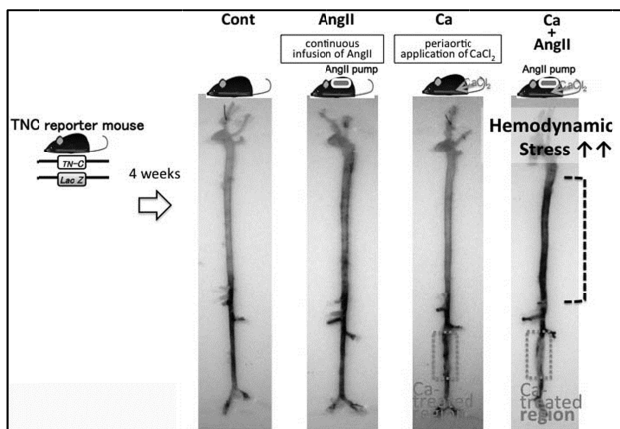
TN-C ノックアウトマウスには目立った表現型がみられないが、本来なら TN-C 発現のみられる腹部大動脈の受動的拡張能を野生型と対比すると、ノックアウトマウスでは血管壁の柔軟性が低下していた。



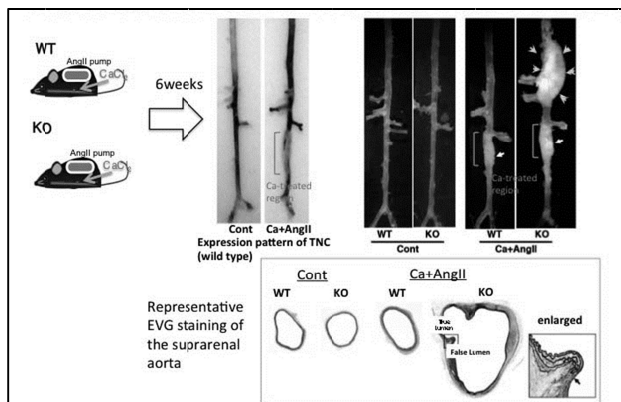
3 大動脈瘤・解離モデル

TN-C レポーターマウスに AngiotensinII 投与すると血圧は上昇し、胸部大動脈に TN-C の発現が誘導された。腎動脈下大動脈に塩化カルシウム塗布するとその部位に TN-C 発現を伴う炎症、組織破壊がおこり、瘤が形成された。またその周囲の線維化に伴い組織硬化がおこり、上流の胸部大動脈に負荷がかかり TN-C 発現が誘導された。さらに、塩化カルシウム塗布と AngiotensinII

投与を組み合わせると、上流の胸部大動脈に強い圧負荷を生じ、TN-C の極めて強い発現誘導がみられた。

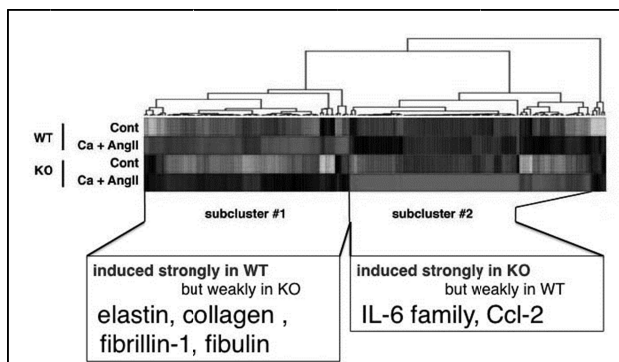


TN-C ノックアウトマウスにこの強い血行動態負荷をかけると、上部大動脈の拡張と血管壁の解離を発症した。



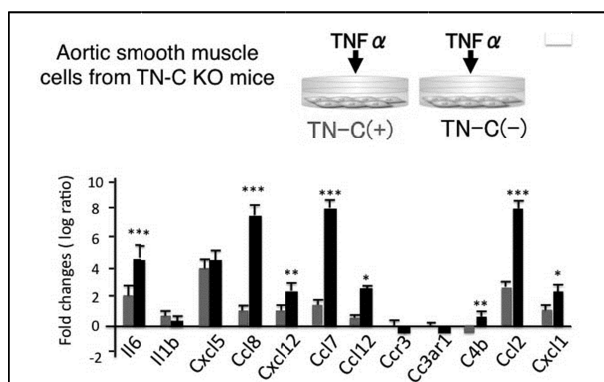
4 トランスクリプトーム解析

刺激後解離発症前に上部大動脈のトランスクリプトーム解析を行なったところ、野生型ではコラーゲンおよびエラスチンの発現が亢進していたが、ノックアウトマウスではその応答が弱い一方で、種々のマトリックス・メタロプロテアーゼおよびケモカインの発現が亢進していた。



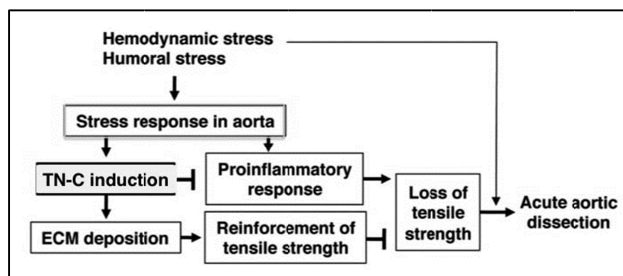
5 培養平滑筋に対する TN-C の作用

マウスから得られた大動脈平滑筋細胞を TN-C 存在下または非存在下で培養した後に TNF による炎症刺激を加えたところ、TN-C 非存在下ではより高いケモカイン発現応答を認めた。



D. 考察

種々のストレスに応答して発現する TN-C は、大動脈壁の柔軟性と強度を維持すると同時に破壊性炎症応答を減弱する分子的ショックアブソーバーであり、その機能不全は大動脈解離を引き起こすと考えられた (下図)。



本研究班の川崎病患者臨床前向き研究では、第2病日より第10-14病日に血中 TN-C の再上昇した群の方が動脈瘤形成の頻度が低かった。これは、急性期に炎症に伴って発現した TN-C は治療後、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く可能性を示唆する。我々のノックアウトマウスを用いた結果は TN-C が炎症反応を抑制し、マトリックスの産生をあげて組織修復、補強を促進することにより血管保護的な作用を有するとの仮説を支持するものと思われる。

E. 結論

TN-C は炎症反応を抑制し、マトリックスの産生をあげて組織修復、補強を促進することにより血管保護

的な作用を有すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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) 青木浩樹. 大動脈壁のストレス応答: 適応と不全適応. 第 91 回に本生学会大会、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、2014 年 3 月 16-18 日
- 2) 青木浩樹. *Inflammation and tissue remodeling in aortic diseases.* 第 78 回日本循環器学会学術集会、東京、2014 年 3 月 21-23 日

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

| 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 | Imanaka-Yoshida K, Yoshida T and Miyagawa-Tomita S | Tenascin-C in development and disease of blood vessels. | Anat Rec | | | in press |
| | Shiba M, Fujimoto M, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Taki W and Suzuki H. Tenascin-C Causes Neuronal Apoptosis After Subarachnoid Hemorrhage in Rats | Tenascin-C causes neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats. | Transl Stroke Res | | | in press |
| | 今中恭子 | 心血管疾患におけるテネascin C の機能—診断と治療への応用 | 医学のあゆみ | 248 | 529-534 | 2014 |
| | 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 |
| | Suzuki H, Shiba M, Fujimoto M, Kawamura K, Nanpei M, Tekeuchi E, Matsushima S, Kanamaru K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T and Taki W. | Matricellular protein: a new player in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. | Acta Neurochir Suppl | 115 | 213-8 | 2013 |
| | Shiba M, Suzuki H, Fujimoto M, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Kanamaru K, Matsushima S and Taki W. | Role of platelet-derived growth factor in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. | Acta Neurochir Suppl | 115 | 219-23 | 2013 |

| | | | | | | |
|------|---|---|------------------|-----|---------------------|------|
| | 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 |
| 阿部淳 | Fukuda S, Ito S, Oana S, Sakai H, Kato H, Abe J, Ito R, Saitoh A, Takayama I. | Late development of coronary artery abnormalities could be associated with persistence of non-fever symptoms in Kawasaki disease | Pediatr Rheum. | 11 | 28 | 2013 |
| | Miyazono A, Abe J, Ogura M, Sato M, Fujimaru T, Kamei K, Ito S. | Successful remission induced by plasma exchange combined with leukocytapheresis against refractory systemic juvenile idiopathic arthritis | Eur J Pediatr. | | Epub ahead of print | 2013 |
| 廣江道昭 | 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 |
| 白石 公 | Hoashi T, Kagisaki K, Miyazaki A, Kurosaki K, Shiraishi I, Yagihara T and Ichikawa H | Anatomic repair for corrected transposition with left ventricular outflow tract obstruction. | Ann Thorac Surg | 96 | 611--20 | 2013 |
| 佐地勉 | 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 |
| | Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, | Kawasaki disease: basic and pathological findings. | Clin Exp Nephrol | 17 | 690-3 | 2013 |

| | | | | | | |
|------|--|--|---------------|-----|--------|------|
| | Naoe S and Saji T. | | | | | |
| | 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 |
| | Harada M, Akimoto K, Ogawa S, Kato H, Nakamura Y, Hamaoka K, Saji T, Shimizu T and Kato T. | National Japanese survey of thrombolytic therapy selection for coronary aneurysm: intracoronary thrombolysis or intravenous coronary thrombolysis in patients with Kawasaki disease. | Pediatr Int | 55 | 690-5 | 2013 |
| 武田充人 | Murakami T, Takeda A, Yamazawa H, Tateno S, Kawasoe Y and Niwa K. | Aortic pressure wave reflection in patients after successful aortic arch repair in early infancy. | Hypertens Res | 36 | 603-7 | 2013 |
| | Yamazawa H, Takeda A, Takei K and Furukawa T. | Primary prevention of sudden cardiac death in a low-risk child with familial hypertrophic cardiomyopathy: the role of cardiac magnetic resonance imaging. | Clin Res | 103 | 75-7 | 2014 |

| | | | | | | |
|-------|---|---|-----------------------------|-----|---------|----------|
| 市田 露子 | Hirono K, Sekine M, Shiba N, Hayashi S, Nakaoka H, Ibuki K, Saito K, Watanabe K, Ozawa S, Higuma T, Yoshimura N, Kitajima I and Ichida F. | N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a predictor of reoperation in children with surgically corrected tetralogy of fallot. | Circ J | 78 | 693-700 | 2014 |
| | Mitani Y, Ohta K, Ichida F, Nii M, Arakaki Y, Ushinohama H, Takahashi T, Ohashi H, Yodoya N, Fujii E, Ishikura K, Tateno S, Sato S, Suzuki T, Higaki T, Iwamoto M, Yoshinaga M, Nagashima M and Sumitomo N. | Circumstances and outcomes of out-of-hospital cardiac arrest in elementary and middle school students in the era of public-access defibrillation. | Circ J | 78 | 701-7 | 2014 |
| 須田 憲治 | 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 |
| | Teramachi Y, Suda K, Ogawa S, Kamiyama H, Hamaoka K. | Flying with giant coronary aneurysms caused by kawasaki disease. | nt J Cardiol. | 168 | 4964-5 | 2013 |
| 吉村 耕一 | 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 |

| | | | | | | |
|------|--|---|---------|---|------|------|
| 青木浩樹 | 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 |
|------|--|---|---------|---|------|------|