

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

. 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	
. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	7
. 付録	
班会議プログラム -----	10
研究成果の別刷 -----	14

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）

市田蒔子（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

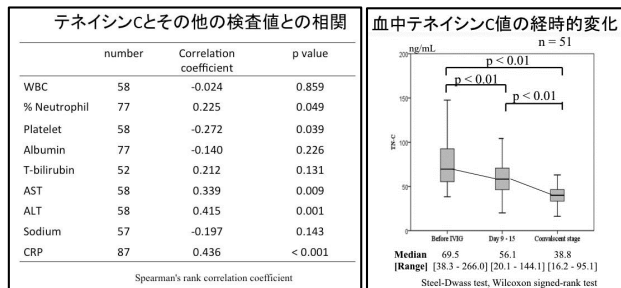
大学、国立国際医療研究センター、福岡大学、久留米大学、富山大学、北海道大学は厚生省倫理規定に基づき所属施設内に倫理委員会がすでに設置されており、かつ、本研究は事前に各施設での倫理委員会での倫理面からの審査を受けた。血液検体のセキュリティに関しては、識別コード記載した連絡表と採血管により連結可能な匿名化するシステムを構築した。

C. 研究結果

1. 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。



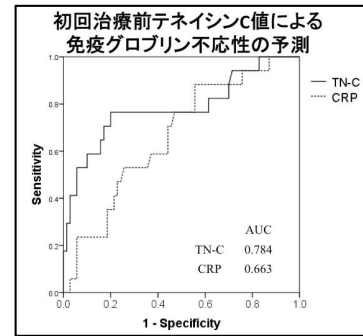
(投稿準備中)

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。

免疫グロブリン反応群(R群)と不応群(NR群)の血液検査データ			
	R 群	NR 群	p value
数	86	20	
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 ⁴ /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

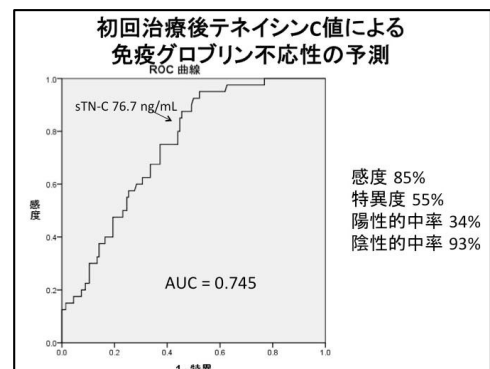
(投稿準備中)

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, sensitivity 70%, specificity 77%, AUC 0.784 に対し, CRP ではカットオフ値 6.9mg/dl で sensitivity 79%, specificity 52%, AUC 0.663 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シン 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シン 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、血中テネイシン 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シン 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シン 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、血中テネイシン 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 テネイシン 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^{1 2})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。テネイシン 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シン 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, Matsushita 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、勝碓譲児、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シニン 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、市田落子、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. テネシニン 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、市田路子、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 <i>Candida albicans</i> -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,	Gellan sulfate core platinum coil with tenascin-C promotes intra-aneurysmal organization in rats.	Transl Stroke Res	5	595-603	2014

	Yoshida T, Taki W, Suzuki H					
	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- 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 childhoodpulmonary 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
--	--	--	------------------	----	-------	------