

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19657

研究課題名(和文)川崎病血管炎におけるスタチン製剤の役割と新たな治療薬としての可能性の検討

研究課題名(英文)The role of statin on endothelial cells in acute phase of Kawasaki disease.

研究代表者

上野 健太郎 (Ueno, Kentaro)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：20644892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病 in vitroモデルで、急性期内皮細胞は necrosis優位の細胞障害を起こし、さらにDAMPsの中心的役割を担う HMGB-1が過剰に放出されることで、細胞の恒常性が失われ、冠動脈病変に寄与している可能性を示した。また治療として用いられる免疫グロブリンは、強力な細胞保護効果を示した。ステロイドは、細胞保護効果に乏しく、HMGB-1活性の低下、ERKリン酸化抑制、NF- κ B値抑制と二次的な炎症カスケードをブロックし、炎症の遷延を抑制している働きを有してると考えられた。スタチンは濃度依存性に necrosisを抑制することが分かったが、現在シグナル解析中である。

研究成果の概要(英文)：Prednisolone (PSL) is considered as preemptive primary treatment in combination with intravenous immunoglobulin (IVIG), especially for predicted IVIG non-responders. We focused on the pathogenesis of early KD vasculitis by examining the balance between endothelial cell survival and death, using serum activity from KD patients before IVIG to stimulate in vitro human coronary artery endothelial cells (HCAECs). We revealed that IG and a combination of IG and PSL treatments inhibited KD serum activated HCAECs proliferation and cytotoxicity mediated necrosis, decreased levels of HMGB-1, NF- κ B p65 and IL-6, increased levels of soluble RAGE, and decreased Akt and ERK1/2 phosphorylation. Furthermore, we revealed that PSL treatment have potentiate inhibitory effect on HMGB-1 induced inflammatory response via a suppression of NF- κ B p65 and ERK 1/2 activation. PSL treatment may be an effective to suppress HMGB-1-mediated inflammatory responses in acute phase of KD vasculitis.

研究分野：小児科 川崎病

キーワード：川崎病 冠動脈瘤 血管炎 小児科 細胞恒常性

1. 研究開始当初の背景

川崎病は小児に発症する全身性の血管炎で、冠動脈病変をきたすことが重大な問題である。免疫グロブリン大量療法 (IVIG) 等の治療でその頻度は減少しているが、まだ数%に冠動脈病変がみられる。そこで IVIG 不応が予測される難治例に初期治療としての IVIG + プレドニゾン (PSL) 療法を検討したランダム化比較試験が行われた。IVIG+PSL 初期併用療法は IVIG 単独での治療と比較して、冠動脈病変の発症を抑え、追加治療が必要な患児を減らすという結果が得られ、その有用性が示された。

また私たちは、川崎病モデルにおける検討で、急性期内皮細胞は necrosis 優位の細胞障害を起こし、さらに damage-associated molecular pattern (DAMPs) の中心的役割を担う High mobility group box protein1 (HMGB-1) が過剰に放出されることで、細胞の恒常性が失われ、冠動脈病変に寄与している可能性を示してきた。

そこで私たちは、成人領域で動脈硬化性心血管疾患の治療として推奨されているスタチン製剤に着目した。スタチン製剤は血管内皮機能保護作用、抗炎症作用、抗酸化作用、血栓抑制や交感神経活性抑制作用など多面的効果を有し、小児後天性心疾患で冠動脈病変をきたすことが最大の問題となる川崎病においても、その臨床応用は長期予後の改善に期待できると考えた。

2. 研究の目的

ヒト冠動脈血管内皮細胞培養細胞 (HCAEC) を用いて、治療前川崎病患児の血清を用いて刺激し、冠動脈内皮細胞の細胞増殖率、necrosis の評価、主要な DAMPs の一つである HMGB-1 の評価、apoptosis にかかわる Caspase-3/7 活性の評価、炎症シグナルである NF- κ B、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の産生、細胞生存/増殖シグナルの評価 (Akt, ERK) を評価、解析する。

次に免疫グロブリン製剤、ステロイド製剤、スタチン製剤が、どのように働き冠動脈病変発症の抑制に寄与しているかを解明する。

3. 研究の方法

鹿児島大学病院、鹿児島市立病院で入院加療された川崎病患児、その両親へ本研究に関する説明を行い、家族の同意が得られた川崎病患児の血液検体を使用した。川崎病の IVIG 不応を示唆する臨床検査値による重症度評価は小林スコア (Kobayashi et al. Circulation 2006; 113: 2606-) で行った。

川崎病患児血清 (7.5%) 用いて HCAEC を 24 時間刺激した。次に血清刺激された HCAEC を生理食塩水投与群 (Control)、免疫グロブリン投与群 (20mg/dl) (IG)、プレドニン投与群 (10^{-6} M) (PSL)、プレドニン+免疫グロブリン+プレドニン投与群 (IG+PSL) の 4 群に分類し、さらに 24 時間培養した。川崎病の血清を投与しなかった群を Vehicle (VH) とした。群間の解析に関しては、one-way ANOVA、Kruskal-Wallis test or Wilcoxon rank test を用い、両側検定で $p < 0.05$ を有意と評価した。

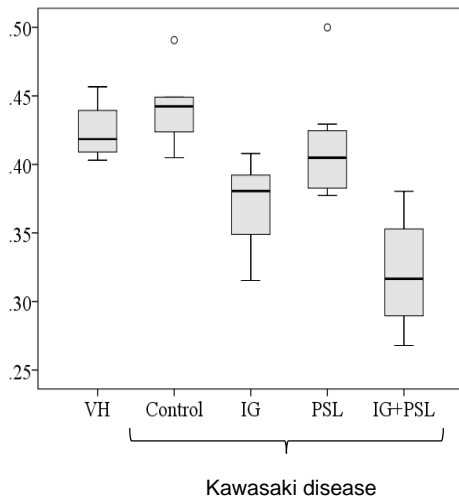
各研究

- 細胞増殖率 (Proliferation): MTT assay (Dojindo, Kumamoto, Japan)
- 細胞傷害の評価 (Cytotoxicity): MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (dead cell protease) (Promega, USA) & High Mobility Group Box1 (HMGB1) (ELISA; (Shino-Test Corporation, Tokyo, Japan))
- 細胞のアポトーシス評価 (Apoptosis assay): Caspase-Glo 3/7 assay (relative fluorescence intensity) (Promega, USA) & fluorescent microscopy (CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent assay; Invitrogen, Carlsbad, CA)

- NF- κ B、TNF- α 、IL-6の産生
- 細胞生存シグナル：Akt/Akt phosphorylation in Western blotting
- 細胞増殖シグナル：ERK/ERK phosphorylation in Western blotting

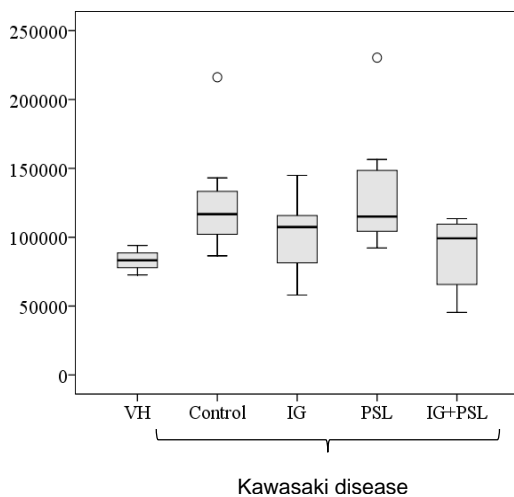
4. 研究成果

結果1：細胞増殖率



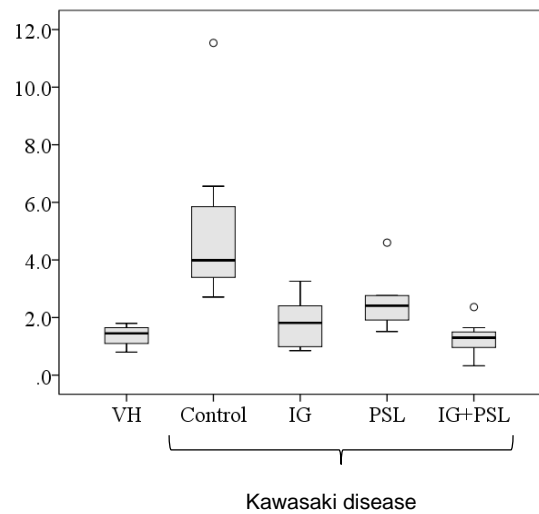
Control 群で細胞増殖が確認された。IG 群、IG+PSL 群で優位に細胞増殖は抑制された (共に $P = 0.012$)

結果2：Cytotoxicity



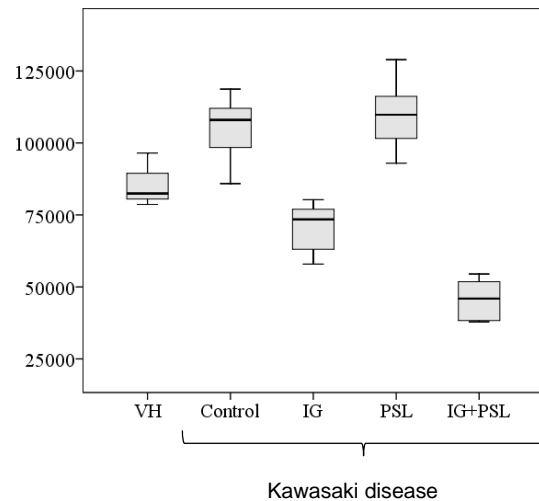
Control 群で Cytotoxicity 値 (Necrosis) が増加した。IG 群、IG+PSL 群で優位に Cytotoxicity 値は抑制された (共に $P = 0.018$)

結果3：HMGB-1



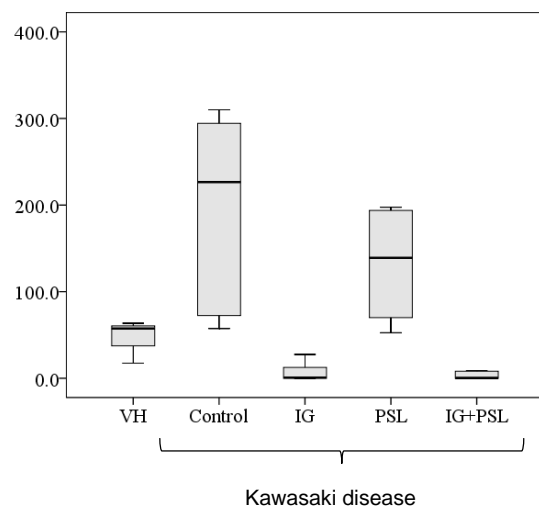
Control 群で HMGB-1 値が上昇した。IG 群、PSL 群、IG+PSL 群で優位に Cytotoxicity 値は抑制された ($P = 0.013$, $P = 0.022$, $P = 0.007$)

結果4：Caspase-3/7 活性



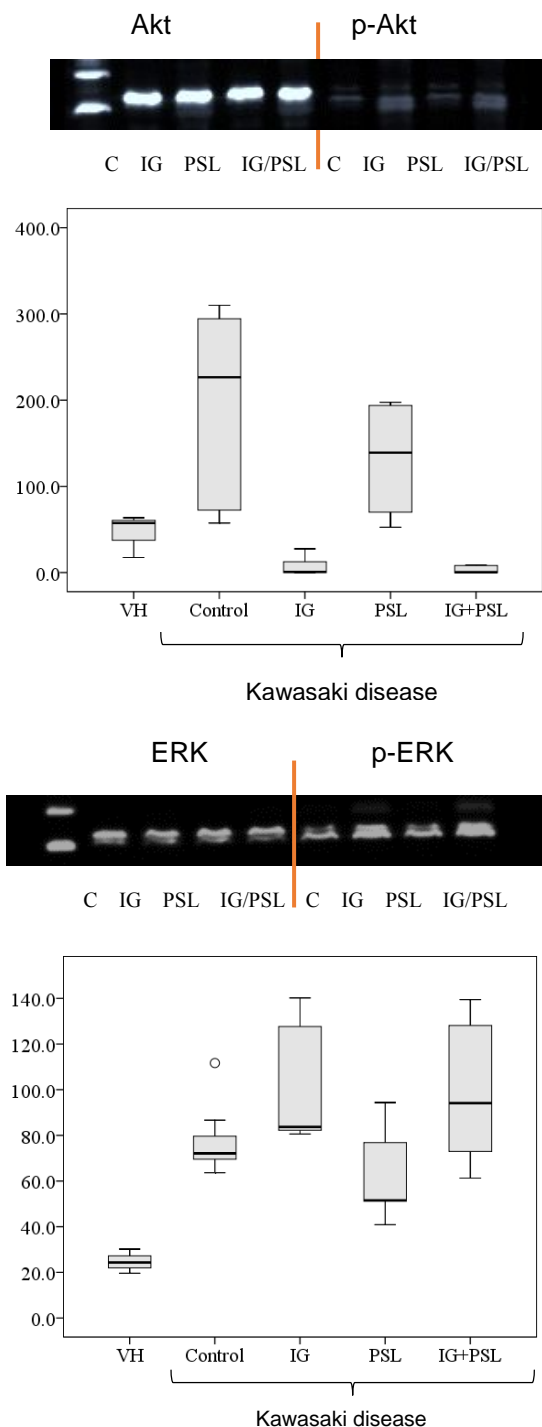
Control 群で Caspase-3/7 活性が上昇した。IG 群、IG+PSL 群で優位に Cytotoxicity 値は抑制された (共に $P < 0.001$)

結果5：NF- κ B 活性



Control 群で NF-kB 活性が増加した。IG 群、PSL 群、IG+PSL 群で優位に NF-kB 値は抑制された ($P = 0.027, P = 0.044, P = 0.007$)

結果 6 : 細胞生存/増殖シグナル



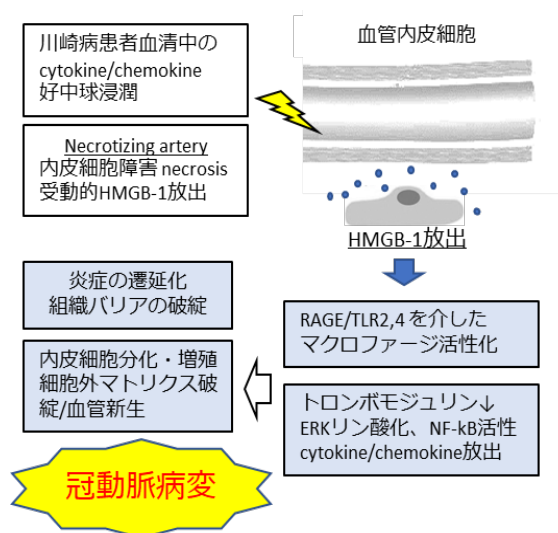
リン酸化 Akt/Akt、リン酸化 ERK/ERK で評価 Control 群でリン酸化 Akt/Akt、リン酸化 ERK/ERK が上昇した。IG 群、IG+PSL 群でリン酸化 Akt/Akt は有意に抑制され (共に $P =$

0.018), リン酸化 ERK/ERK は有意に増加した ($P = 0.018, P = 0.032$)。PSL に関しては、リン酸化 ERK/ERK が有意に抑制された ($P = 0.028$)

考案

川崎病急性期には血清中のサイトカイン、ケモカインによる強い細胞障害 (細胞死) が起こっており、細胞生存/増殖シグナルの増加、炎症の増幅、更には全身循環性の HMGB-1 が多量に放出されることが確認された。免疫グロブリンはこれらの作用を強力に抑制することが分かった。

興味深いことにステロイドは、単独の作用としての細胞保護効果に乏しく、HMGB-1 活性の低下、ERK リン酸化抑制、NF-kB 値抑制と二次的な炎症カスケードをブロックし、炎症の遷延を抑制している働きを有していると考えられた。



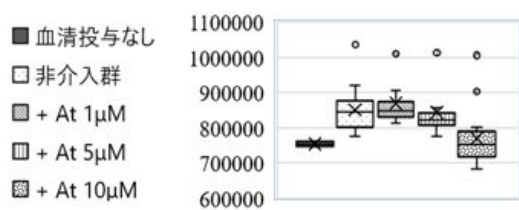
ステロイドの HMGB-1 活性の低下機構について、現在膜蛋白発現量 (sRAGE、トロンボモジュリン、TLR2/4) の解析中である。

【スタチンの働きについて】

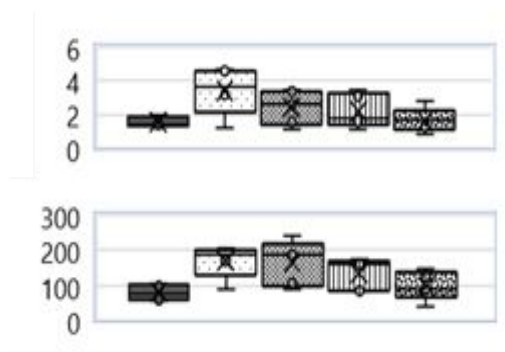
HCAECに7.5%患者血清を用いて24時間刺激を行い、スタチン製剤であるアトルバスタチン (At) を薬剤非投与群、At 1 μ M、At 5 μ M、

At 10 μ M 投与群の4群に分類した。
Necrosis/apoptosisの評価、Akt/ERK定量評価し、
蛍光免疫染色での細胞形態評価を行った

スタチンは濃度依存性に necrosisを抑制、
Akt/ERKのリン酸化を抑制した。
た。



上段 pAkt/Akt 下段 pERK/ERK



川崎病にいけるスタチンの作用機序は、ステロイドと異なり、直接的な細胞保護効果を有している可能性があった。また Akt や ERK についても作用機序が異なるため、今後追加実験を行っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Kentaro Ueno, Yuichi Nomura, Yoshifumi Kawano, et al. Disruption of Endothelial Cell Homeostasis Plays a Key Role in the Early Pathogenesis of Coronary Artery

Abnormalities in Kawasaki Disease. Scientific Reports 2017; 7:srep43719 (査読あり)

2. Shunji Seki, Kentaro Ueno, Yoshifumi Kawano, et al. Atrioventricular reciprocating tachycardia in a girl with atrial fibrillation. *Pediatr Int* 2017; 7:ped.13346 (査読あり)
3. Kentaro Ueno, et al. Dexmedetomidine is associated with an increased incidence of bradycardia in patients with trisomy 21 after surgery for congenital heart disease. *Pediatric Cardiology* 2016 DOI: 10.1007/s00246-016-1421-8 (査読あり)
4. Takahashi Y, Kentaro Ueno, et al. Potential risk factors for dexmedetomidine withdrawal seizures in infants after surgery for congenital heart disease. *Brain Dev.* 2016; pii: S0387-7604(16)00029-2. doi:10.1016/j.braindev (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. 上野健太郎, 塩川直宏, 高橋宜宏, 関 俊二, 中江広治, 二宮由美子, 櫛木大祐, 松葉智之, 井本 浩. 人工心肺下乳児心臓手術後の急性腎障害 (AKI) の危険因子、短期予後と術後循環作動薬・血管拡張薬の AKI 発症予防効果に関する検討. 第 53 回日本小児循環器学会総会学術集会 浜松 2017.07.07-07.09
2. 上野健太郎, 塩川直宏, 高橋宜宏, 中江広治, 森田康子, 櫛木大祐, 河野嘉文, 益田君教, 野村裕一, 廣瀬淳子. 川崎病冠動脈内皮細胞におけるステロイドの役割. 第 37 回日本川崎病学会・学術集会 東京 2017.10.27-10.28
3. 上野健太郎. 日本川崎病学会川崎賞受賞特別講演 Disruption of Endothelial Cell Homeostasis Plays a Key Role in the Early Pathogenesis of Coronary Artery Abnormalities in Kawasaki Disease. 第

37 回日本川崎病学会・学術集会 東京
2017.10.27-10.28

4. Nomura Y, Yoshinaga M, Ueno K, Eguchi T, Masuda K, Tanaka Y, Nishibatake M. Computerized interpretation of electrocardiograms poses a risk of false-negative diagnosis of long QT syndrome or WPW syndrome. the 50th Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology, Rome, 2016.06.01-06.04

6 . 研究組織

(1)研究代表者 (UENO, Kentaro)

上野 健太郎

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号 : 20644892