

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：82412

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08594

研究課題名(和文)川崎病冠動脈瘤における狭窄機序の解明と治療開発への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of Kawasaki disease-related coronary stenosis and its application to the development of therapeutic agents

研究代表者

菅沼 栄介 (Suganuma, Eisuke)

埼玉県立小児医療センター (臨床研究部)・感染免疫科・副部長

研究者番号：60408010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの腹腔内に乳酸菌抽出物(LCWE)を注射することで冠動脈狭窄をきたす新たなマウスモデルを開発した。狭窄は、血管平滑筋細胞の増殖・遊走により起こることが分かった。次に候補薬剤の投与による狭窄抑制作用についての検証を行った。全トランス型レチノイン酸(atRA)は炎症抑制作用に加え、平滑筋細胞増殖抑制作用を有するとされる。LCWE投与2週間後よりatRAを開始し、週5回、14週間の投与を行ったところ、atRA投与群では非投与群と比較して冠動脈炎スコアと冠動脈狭窄率の有意な改善をみた。atRAは冠動脈瘤を伴う川崎病患者の冠動脈狭窄を抑制できる候補薬剤の1つとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は川崎病に合併する冠動脈瘤の生命予後を左右する冠動脈狭窄にターゲットとした動物実験である。まず以前から知られていた冠動脈炎マウスの経過を見ていく中で冠動脈の内腔が次第に狭窄してくるという新たな発見があった。冠動脈の狭窄は心筋梗塞や狭心症にもつながることが知られている。ビタミンA誘導体であるレチノイン酸は、古くから白血病の治療薬として知られ、安価で副作用も少ない薬剤である。本研究を通じてレチノイン酸の冠動脈への保護的な有益性が証明されたことで、冠動脈瘤を合併した川崎病患者に対する新たな治療選択肢の一つとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new mouse that causes coronary stenosis by intraperitoneal injection of LCWE. Coronary stenosis was characterized by proliferation and migration of vascular smooth muscle cell. Next, we focused on the therapeutical approaching against coronary stenosis. All-trans-retinoic acid (atRA) is known to inhibit proliferation of the vascular smooth muscle cells. atRA was started 2 weeks after LCWE injection and continued 5 times a week for the next 14 week. Mice treated with atRA had significantly lower scores for coronary arteritis and stenosis than untreated mice. Therefore, it is expected to have clinical applications preventing coronary stenosis in Kawasaki disease patients with coronary artery aneurysm.

研究分野：感染症学、免疫学、川崎病

キーワード：川崎病 マウス冠動脈炎 LCWE 全トランス型レチノイン酸 冠動脈狭窄 血管平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

川崎病は乳幼児期に好発する原因不明の全身性血管炎であり、国内での罹患患者数は増加しており年間約 16000 人が発症する。無治療で約 20%、急性期に適正な治療を行っても約 2.3%の患者に冠動脈瘤を合併し、狭窄や閉塞などによる急性心筋梗塞や突然死の原因となる。近年多くの研究成果により急性期川崎病に対する大量ガンマグロブリン、ステロイド、インフリキシマブ (Masuda H, Suganuma E : Journal of Pediatrics 2018)、シクロスポリン A など急性期の抗炎症療法の有効性が報告され冠動脈瘤の合併する頻度は減少傾向にある。

一方で冠動脈瘤を合併した場合の予後は不良で、近年の国内の巨大冠動脈瘤の全国調査によると、死亡を 6%、心筋梗塞を 16%に認め、多くは 2 年以内に発症していた。また申請者らの報告した冠動脈瘤患者 1006 名における追跡調査において、瘤内径のサイズが大きく (巨大冠動脈瘤) 特に男児や免疫グロブリン治療抵抗例において冠動脈イベントがより起こりやすいことが明らかとなった (Miura M, Suganuma E : JAMA pediatrics 2018、表 1)。さらに病理学的には、内腔の筋線維芽細胞の増殖 (LMP : luminal myofibroblastic proliferation) と壁に血栓が生じ (Orenstein JM : PLoS One 2012) 血行動態のずり応力の減少と血流パターンの障害と相まって (Ohkubo T : Pediatric International 2007) 巨大瘤の狭窄・閉塞を起こすものと推察されている。

これらの研究成果により冠動脈瘤の実態が明らかになりつつあるが、内膜増殖の制御機構に関して予後を改善するための新規治療薬の開発へ向けた研究は進んでおらず多くの課題を残している。

2. 研究の目的

申請者らは、乳酸菌抽出物 (*Lactobacillus casei* cell wall extract、以下 LCWE) を腹腔内に単回投与することで 2 週間後には高率にマウス冠動脈炎を誘導することに成功しており (図 1、H&E、EVG 染色) 冠動脈の全層にわたる汎血管炎と弾性線維の断裂を伴う壁構造の破壊性変化により冠動脈内腔の拡大 (冠動脈瘤) を来していた。さらに 4 週間後には α -SMA 陽性の血管平滑筋細胞 (以下 SMC) が遊走したと思われる冠動脈内膜の肥厚 (新生内膜) により内腔は明らかに狭窄していた。

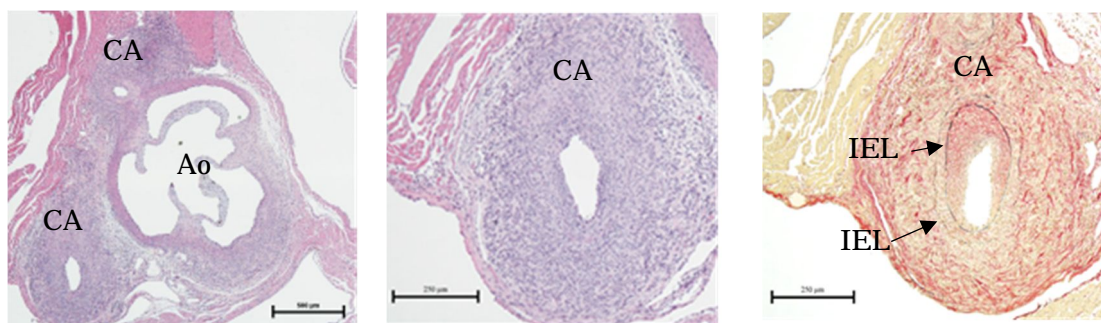


図 1、冠動脈炎、冠動脈瘤

H&E 染色 (左中) で冠動脈全層にわたるリンパ球やマクロファージを主体とした激しい炎症細胞浸潤を認める。EVG 染色 (右) では内弾性版 (IEL) と外弾性板 (EEL) の脆弱化と断裂を認める (矢印)。Ao : 大動脈、CA : 冠動脈

本研究の目的は、冠動脈瘤における内膜増殖機構を明らかにし、冠動脈狭窄の抑制をターゲットとした候補薬剤を同定することである。冠動脈瘤を合併した川崎病に対する冠動脈イベントの予測因子や新規治療ターゲットを開発することを最終目標とする。

3. 研究の方法

検証 : 本モデルマウスにおける冠動脈内膜増殖・狭窄の定量的評価法の確立

6 週齢の C57BL/6J マウスに LCWE (1000 μ g) を腹腔内投与し、2 週、4 週、8 週、16 週後にそれぞれ解剖を行う (n=5-7)。コントロールは、LCWE の代わりに PBS を腹腔内投与する (各 n=3)。両側冠動脈分岐部を含む大動脈弁レベルの心臓組織をパラフィン包埋・薄切した後各種組織染色を行う。Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色、Elastic van Gieson's (EVG) 染色、 α -smooth muscle actin (α -SMA) 染色を行う。

・内膜増殖・血管狭窄の定量的評価

(1) 内膜の面積 (μm^2)、(2) 内腔の厚さ (μm)

検証 : 平滑筋細胞の増殖抑制・分化誘導するレチノイン酸の有効性

<実験プロトコル>

5 週齢、オス、C57Bl/6J マウス

LCWE / PBC 投与 2 週後より開始し内膜増殖・肥厚がピークとなる 16 週後まで継続する。

- ・無治療群 (n=6): LCWE (ip) + コーン油 (5 回/週、胃管)
- ・レチノイン酸治療群 (n=7): LCWE (ip) + RA (50mg/kg、5 回/週、胃管)
- ・コントロール群 (n=5): PBS + 通常飲料水

H&E 染色、EVG 染色、免疫染色 (α SMA 染色、抗 PCNA、抗 MMP-9)

冠動脈炎スコア、冠動脈狭窄、弾性線維断裂、内膜の SMA・PCNA 陽性細胞数、MMP-9 陽性面積 (μm^2)

4. 研究成果

1、LCWE 投与から 16 週後に内膜の増殖と冠動脈内腔の狭窄が最大となる (図 1)。

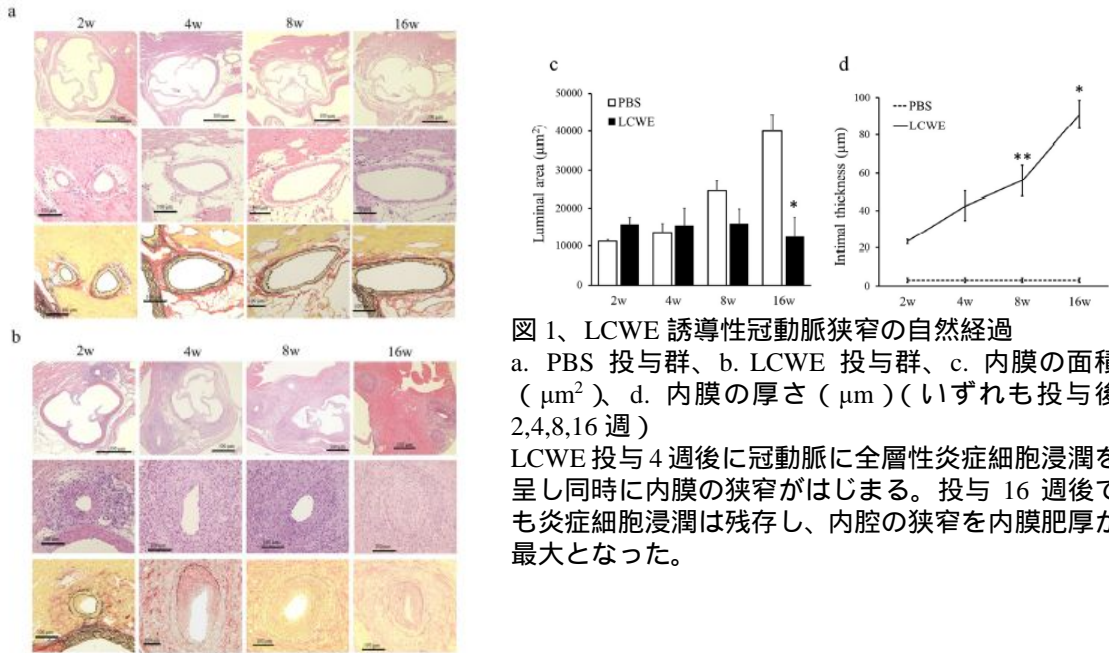


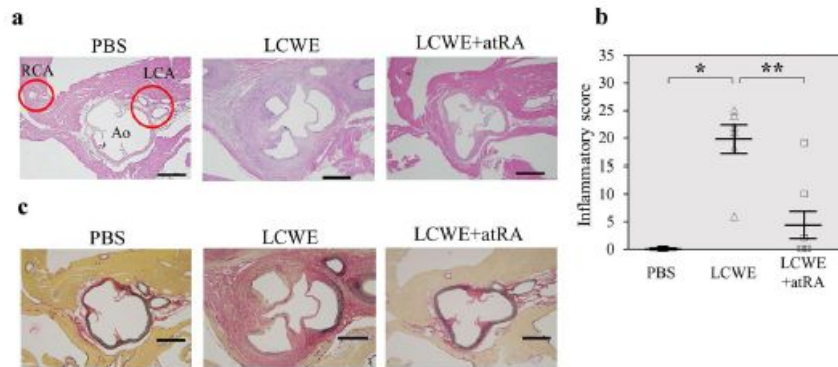
図 1、LCWE 誘導性冠動脈狭窄の自然経過

a. PBS 投与群、b. LCWE 投与群、c. 内膜の面積 (μm^2)、d. 内膜の厚さ (μm) (いずれも投与後 2,4,8,16 週)

LCWE 投与 4 週後に冠動脈に全層性炎症細胞浸潤を呈し同時に内膜の狭窄がはじまる。投与 16 週後も炎症細胞浸潤は残存し、内腔の狭窄を内膜肥厚が最大となった。

2、全トランス型レチノイン酸 (atRA) は LCWE 誘導性冠動脈炎、冠動脈狭窄を軽減する (図 2)

atRA 投与群 (20mg/kg) は、非投与群と比較して冠動脈炎スコアが有意に抑制されていた (19.3 ± 2.8 vs 4.4 ± 2.8 ,



$p < 0.0001$)

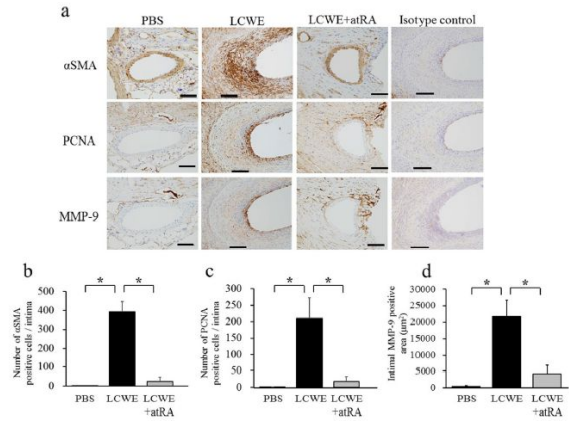
(図 2)

冠動脈狭窄に関しては、3つの指標での評価を行った。まず新生内膜の発生頻度は、LCWE群では100%であったが、LCWE+atRA群では18.5%と有意に抑制された ($p < 0.05$)。さらに内膜の厚さ (100.5 ± 18 vs $11.5 \pm 9.3 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) や狭窄率 (67.5 vs 18.5% , $p < 0.01$) に関しても atRA 投与群は無治療群と比較して有意に低下した

(図3)

3、免疫染色による検討 (αSMA 、PCNA、MMP-9) (図4)

LCWE 投与により誘導された肥厚した内膜の詳細な組織像の検討を行った。LCWE 投与により増強した内膜の αSMA 陽性細胞数、PCNA 陽性細胞数、MMP-9 陽性エリアは、atRA の投与によりきわめて強く抑制された。Isotype control はいずれも陰性であった。

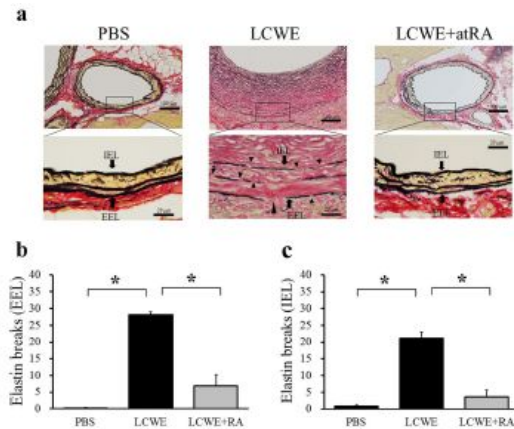


4、atRA は LCWE によって誘導された弾性線維の断裂・破壊を有意に抑制する (図4)

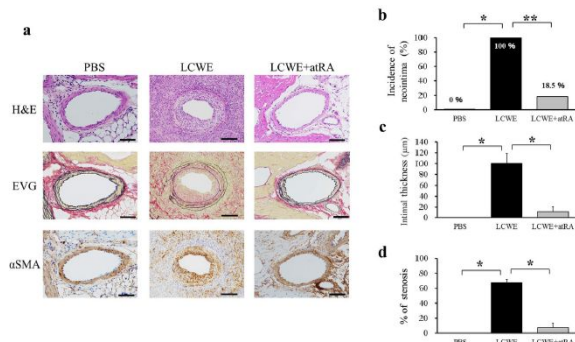
(図5)

血管壁構造の維持に重要な断線線維について

の検討も行った。中膜の断線線維の断裂数をスコア化し半定量的な評価を行った。LCWE 投与群では、PBS 投与群と比較して弾性線維の断裂と脆弱化を認めた一方で atRA 治療群では弾性線維の断裂はほぼ完全に抑制されていた (図 5a) 外弾性板 (EEL) 内弾性板 (IEL) 共に同様の傾向であった (図 5b)。



本研究は川崎病に合併する冠動脈瘤の生命予後を左右する冠動脈狭窄をターゲットとした基礎研究である。まず大きな発見として以前から知られていた LCWE により誘導した冠動脈炎マウスの経過を見ていく中で、血管平滑筋細胞の増殖・遊走により冠動脈内腔が徐々に狭窄していくという新たな病理学的な特徴を見出すことができた。川崎病における冠動脈の狭窄は心筋梗塞や狭心症にもつながることが知られている。実際の冠動脈瘤を有する川崎病患者の冠動脈瘤の病理像をすべて反映しているわけではないが、冠動脈狭窄に類似した新たなモデル動物としての今後の活用が期待される。元来、前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬として知られるビタミン A 誘導体であるレチノイン酸が、マウス冠動脈狭窄を軽減するだけでなく血管炎や血管保護作用を有することを示した。今後、レチノイン酸が、冠動脈瘤を合併した川崎患者の予後を改善するための新たな治療選択肢の一つとなることが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eisuke Suganuma, Satoshi Sato, Satoko Honda, Atsuko Nakazawa	4. 巻 69
2. 論文標題 A novel mouse model of coronary stenosis mimicking Kawasaki disease induced by Lactobacillus casei cell wall extract	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 233-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0124.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Eisuke Suganuma, Satoshi Sato, Satoko Honda, Atsuko Nakazawa	4. 巻 11
2. 論文標題 All trans retinoic acid alleviates coronary stenosis by regulating smooth muscle cell function in a mouse model of Kawasaki disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93459-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菅沼栄介
2. 発表標題 All-trans-retinoic acidはマウス冠動脈狭窄を軽減する
3. 学会等名 第40回日本川崎病学会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅沼栄介
2. 発表標題 LCWEによるマウス冠動脈狭窄の病理学的特徴
3. 学会等名 第39回日本川崎病学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eisuke Suganuma
2. 発表標題 All-trans-retinoic acid Reduces Coronary Artery Stenosis via regulating smooth muscle cell function in a mouse model of Kawasaki disease
3. 学会等名 The 13th International Kawasaki Disease Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅沼栄介
2. 発表標題 LCWE誘導性マウス冠動脈炎の長期観察
3. 学会等名 第3回 血管炎病因病態研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 菅沼栄介	4. 発行年 2020年
2. 出版社 カレントセラピー 株式会社ライフメディコム	5. 総ページ数 87
3. 書名 特集 川崎病 -診断と治療の新展開- マウスモデルの現状と課題	

1. 著者名 菅沼栄介	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 239
3. 書名 川崎病学 改訂第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐藤 智 (Sato Satoshi) (60385028)	埼玉県立小児医療センター(臨床研究部)・感染免疫科・医 長 (82412)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関