

機関番号：32644

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008~2010

課題番号：20790750

研究課題名 (和文)

川崎病の冠動脈病変におけるアンギオテンシンⅡの役割

研究課題名 (英文)

Role of AngiotensinⅡ in coronary artery lesion of Kawasaki disease

研究代表者

菅沼 栄介 (SUGANUMA EISUKE)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60408010

研究成果の概要 (和文)：

川崎病の冠動脈病変の形成には細胞外器質の破壊が大きく関与しており、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMPsなどが知られている。ARBが川崎病の冠動脈瘤形成に対して有効であるというデータはなく、LCWE(乳酸菌抽出液)をマウス腹腔内に注入して川崎病類似の冠動脈病変を惹起するマウスモデルを作製し、ARBが川崎病の冠動脈病変に与える有効性を検討した。LCWEで冠動脈に炎症が惹起され、ARB投与により組織学的に冠動脈周囲の炎症細胞浸潤は抑制された。心臓切片を使用したReal-time PCR法ではLCWE投与群でのmRNA相対発現量はPBS群と比較して、MMP-2(161%)、MMP-9(164%)、IL-6(177%)すべて高値を示した。ARBは川崎病モデルマウスにおける冠動脈病変のMMP-2、MMP-9、IL-6を抑制した結果、冠動脈瘤形成予防に有益である可能性が示唆された。今後治療介入目的で利用しうる合理的な薬剤の一つとなることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Extracellular matrix(ECD) such as INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, MMPs are thought to be involved in coronary artery lesions (CAL) in patients with Kawasaki disease (KD). The mechanisms underlying effects of ARB in CAL are not known. We discussed whether ARB could prevent Lactobacillus casei cell wall extract (LCWE)-induced coronary arteritis in murine model of KD. Inflammations in response to LCWE, are suppressed by ARB treatment. More interestingly, MMP-2, MMP-9, IL-6 mRNA expression at local coronary artery significantly decreased in mice treated with ARB compared with mice post-LCWE injection. Thus, this result suggests that ARB is expected to be a new therapeutic agent for preventing CAL in patient with Kawasaki disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児循環器

## 1. 研究開始当初の背景

川崎病は小児期に好発する急性炎症症候群で全身の血管炎を引き起こす。遷延する発熱、発疹、眼球結膜発赤、非化膿性頸部リンパ節炎、口唇・口腔粘膜紅潮、四肢末端の変化などに特徴づけられる。最も重要かつ重篤な合併症は冠動脈拡張と冠動脈瘤であり、無治療で約 25%、アスピリンと大量 $\gamma$ グロブリン療法を行っても約 5%で合併するといわれており、川崎病の生命予後に大きく関与する。動脈瘤形成には細胞外器質、特に弾性線維の破壊、断裂が大きく関与しており、細胞外器質破壊促進因子には IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、VEGF などの成長因子、MMP (マトリックスメタロプロテナーゼ) やセリンプロテアーゼ等が知られてきた。

アンギオテンシン II は心血管病、腎臓病に大きく関与するといわれている。かつて障害のメカニズムはナトリウムの再吸収、アルドステロン上昇、平滑筋細胞の収縮が原因で起こる高血圧、高脂血症、インスリン抵抗性などが主体であると認識されてきた。しかし近年、アンギオテンシン II は血圧上昇効果のほかに血管内皮細胞機能不全、細胞浸潤や増殖、アポトーシス、細胞外器質の破壊亢進作用なども合わせ持つことが証明された。反対にアンギオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) やアンギオテンシン II 変換酵素阻害薬 (ACEi) は、血圧降下作用だけでなく細胞外器質の破壊や細胞浸潤を抑制する事で動脈硬化病変安定化、ステント後の再狭窄、心筋の繊維化を予防する結果として心不全患者や心筋梗塞後の患者の死亡率を有意に低下した。

近年、申請者等は動脈硬化に起因する動脈瘤モデルマウスにおける ARB の効果を検討した (J Am Soc Nephrol. 2007 18(8):2311-9)。ApoE-/-マウスを ARB 治療群、ヒドララジン治療群、無治療群の 3 群に分け、動脈壁の特徴を各群で比較した。ARB 治療、ヒドララジン治療は共に有意に血圧を低下したが、ARB 治療のみ動脈硬化病変を著明に縮小しさらに組織学的に以下の特徴を示した。

(1) ARB は大動脈の弾性線維(エラスチン)の断裂を有意に抑制した。(図 1)

(2) ARB は動脈硬化病変(血管壁)内のカテプシン S を低下した。

川崎病の合併症には冠動脈病変があり、メカニズムとして細胞外器質、特に弾性線維の破壊、断裂が大きく関与する。

近年、申請者らはマウスモデルにおける動脈硬化病変に対する ARB の効果を検討した。ARB は大動脈壁の弾性線維の断裂を抑制し細胞外器質破壊因子である MMP-9、カテプシン S を有意に抑制することで、動脈硬化に対する病変安定化効果を明らかにした。そこで動脈硬化に起因する動脈瘤と川崎病による動

脈瘤とは発症機序などは異なるが、動脈の血管構造の破綻を来すという面では共通している。そこで“川崎病の冠動脈病変にはアンギオテンシン II によるカテプシン S の活性化とエラスチンの破壊が関与する”という仮説を抱くに至った。図 1 (van Gieson 染色)

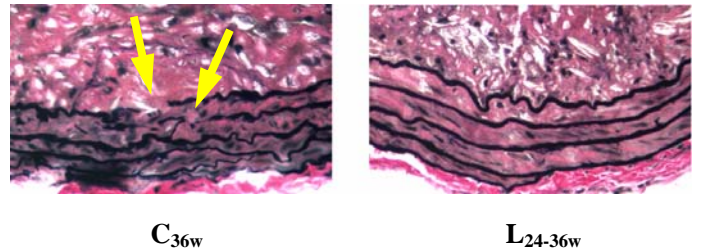
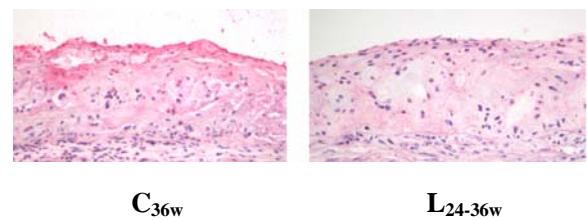


図 2 (カテプシン S 免疫染色)



## 2. 研究の目的

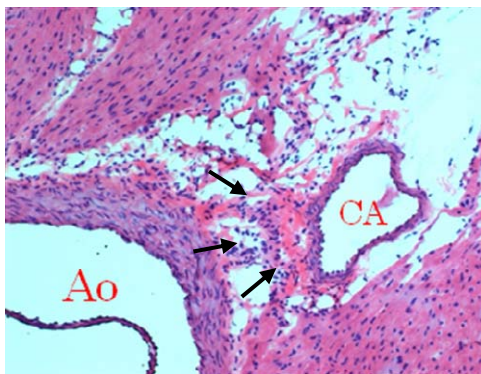
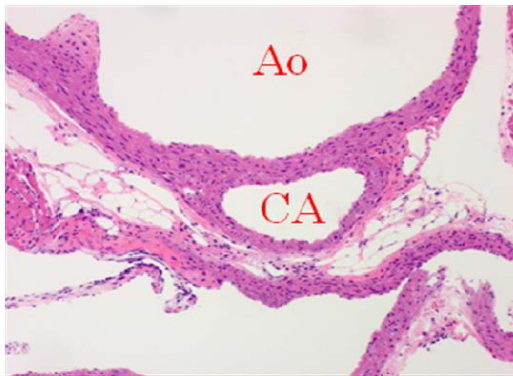
川崎病の治療戦略として重要なのは、いかに冠動脈病変 (CAL) を予防するかである。ARB は細胞外器質の破壊を抑えることで、動脈硬化に起因する動脈瘤患者に対して利益をもたらすことを申請者等は示した。しかし ARB が川崎病に起因する冠動脈瘤形成に対して効果があるというデータはなく、申請者は川崎病モデルにおける ARB の冠動脈に与える有益性を明らかにする事で、今後 ARB が治療的介入目的で利用しうる合理的な薬剤のひとつとなることが期待される。

## 2. 研究の方法

### (1) LCWE

American Type Culture Collection, Manassas, VA (ATCC 11578) で提供している *Lactobacillus casei* bacteria を購入し *Lactobacillus* MRS broth (Dibco, Detroit, MI) で培養し増殖させ 16~18 時間後に遠心 (10,000 $\times$ g、40 分間) し菌を回収する。PBS (pH7.2) で十分に洗浄を行った後、4% SDS (EM Science, Gibbstown, NJ) を加え、細菌を細胞溶解するため、この状況下で一晩室温培養する。さらに細胞壁から粘着物質を除外する為、250  $\mu$ g の RNase, DNase I, trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) との培養をそれぞれ 37 $^{\circ}$ C で 4 時間ずつ行う。終了後 PBS で 4 回洗浄し、得られた pellet はドライアイス/エタノール容器内で 2 時間 5.0 (10-s pulse/5-s pause) の設定で sonicate (超音波処理) を行う (550 Sonic Dismembrator with a one-half-inch tapped

horn and tapered microtip; one-eighth-inch diameter, turned to vibrate at a fixed frequency of 20KHz; Fisher Scientific, Nepean, Canada) 最後に 40,000×g で 1 時間遠心し、上澄みの cell wall extract を回収し、PBS で希釈し最終濃度を 1mg/ml とする。そのうち 0.5mg をマウスの腹腔内に注射する。  
※申請者は川崎病モデルマウスを作成する事に成功し下記に冠動脈炎を示す。  
(上：コントロールマウス (PBS)  
下：LCWE 誘導性冠動脈炎マウス)



冠動脈周囲（外膜）にリンパ球を中心とした炎症細胞浸潤（矢印）を認める（HE染色）。  
LCWE0.5mg を 4 週齢のオスの C57/BL6JJ マウスに腹腔内注射 4 週間後  
Ao；大動脈、CA；冠動脈

#### (2) 実験モデル

4 週齢の雄の C57/BL6 JJ マウスの腹腔内に前述の LCWE0.5 mg または PBS を注入し上記のごとく川崎病モデルマウスを作成する。腹腔内注入後マウスを以下の 3 群に分ける。

①PBS 投与群 (n=10)

②LCWE+無治療 (n=10)

③LCWE+ARB100mg/L (ロサルタン<sup>®</sup>) (n=10)

投与後 4 週の時点で、冠動脈病変の組織学的観察 (HE 染色) を行い血管炎の程度を比較検討した (各群 n=5)。さらに大動脈起始部から RNA を抽出し Real-time PCR 法で MMP-2、MMP-9、IL-6 mRNA の発現量を見た (各群 n=5)。

#### (3) 組織染色、免疫染色

心臓 (冠動脈含む) を摘出し凍結切片を作成する。

凍結切片 (5 μm)

冠動脈；H&E 染色、免疫染色

マクロファージ；Rat Anti-Mouse CD169 染色 (AbD serotec, MCA884EL) で冠動脈周囲のマクロファージの浸潤をみる。

Tリンパ球；Rat Anti-Mouse CD3 染色 (AbD serotec, MCA1477) で染色する。

#### (4) mRNA 定量解析

RNA を抽出し (RNeasy Mini kit・Qiagen, Valencia, CA) ABI prism 7700 sequence detection system (ABI) を使用した RealtimePCR 法 (Taqman) で MMP-2、MMP-9、IL-6 の定量的評価を行う。β-actin をコントロールとする。

#### 4. 研究成果

冠動脈の組織学的観察 (HE 染色) では、リンパ球の冠動脈への浸潤の程度を以下のスコアを用いて半定量的な評価を行った。

スコア 0：リンパ球の浸潤なし

スコア 1：血管外膜のみの浸潤

スコア 2：外膜+中膜の浸潤

スコア 3：外膜+中膜+内膜の浸潤

(汎血管炎)

各群でのスコアの平均値を比較検討した。

PBS と比較して LCWE 投与群で有意にスコアが高かった (PBS：0.75vsLCWE1.86、 $p<0.05$ )

さらに ARB 治療はこのリンパ球浸潤を抑制した (LCWE：1.86vsLCWE+ARB：1.17)。

Real-time PCR 法では LCWE 投与群での mRNA 相対発現量は PBS 群と比較して、MMP-2 (161%)、MMP-9 (164%)、IL-6 (177%) すべて高値を示した。4 週間の ARB 投与により MMP-2 (148%)、MMP-9 (108%)、IL-6 (131%) と発現量の抑制をみた。

ARB は川崎病モデルマウスにおける冠動脈病変の MMP-2、MMP-9、IL-6 を抑制した結果、冠動脈瘤形成予防に有益である可能性が示唆された。今後治療介入目的で利用しうる合理的な薬剤の一つとなることが期待される。

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0件)

[学会発表] (計1件)

- ・ アンギテンシン受容体拮抗薬 (ARB) は川崎病モデルマウスにおいて IL-6、MMP-2、MMP-9 mRNA 発現量を抑制した  
菅沼栄介、松田晋一、中村英明、関根佳織、新村文男、望月博之  
第47回日本小児循環器学会学術集会  
2011年7月7日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅沼 栄介(SUGANUMA EISUKE)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60408010