

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591183

研究課題名（和文） 川崎病類似NLRリガンド誘発冠動脈炎モデルの病態の検討

研究課題名（英文） The pathophysiology of NLR ligand-induced coronary arteritis like Kawasaki disease

研究代表者

西尾 壽乗（NISHIO HISANORI）

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：00507783

研究成果の概要（和文）：

川崎病類似NLRリガンド誘発冠動脈炎モデルの病変部における遺伝子発現を調べたところ、様々なサイトカイン・ケモカイン遺伝子が高発現していたことから、冠動脈炎はその血管がもつ内因的因子が重要であることがわかった。さらにこの冠動脈炎は様々な細菌構成物質の先行刺激により、頻度・重症度ともに増悪した。以上から、川崎病の部位特異性・多様性について本モデルで説明することができた。

研究成果の概要（英文）：

In NLR ligand-induced coronary arteritis model like Kawasaki disease, the lesion of coronary artery showed higher expression of various cytokine's and chemokine's genes than those of other blood vessels, suggesting that intrinsic factors of each vascular tissue were important on this site-specific vascular inflammation. Furthermore, the frequency and severity of this coronary arteritis were enhanced by priming of various bacterial component. This model could explain the site-specific vascular inflammation and diversity of etiology in Kawasaki disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：小児循環器学、川崎病、冠動脈炎

1. 研究開始当初の背景

川崎病は主に乳幼児にかかる急性熱性疾患であり、全身の血管炎を特徴とする。川崎病の原因は様々な指摘があるものの、川崎病すべての症例に共通する原因は見つかっていない。

そんな中、我々は様々な細菌から放出される物質NLRリガンドをマウスに皮下あるいは口腔内投与することにより、川崎病類似の冠動脈炎が発症することを見いだした。このモデルは人工的物質を口腔内投与することで冠動脈炎を発症するという世界初のモデル

ルであり、川崎病の部位特異的炎症や原因の多様性について説明できるモデルと考えられた。

2. 研究の目的

(1) この NLR リガンド誘発冠動脈炎モデルの病態に関して、サイトカイン測定、免疫不全マウスなどのノックアウトマウスでの病理評価により、川崎病との類似性について検討を行う。

(2) プライミングとしてリポポリサッカライド (LPS) の先行投与を行った場合に、発症頻度および重症度が高くなることが分かっており、プライミングとして様々な自然免疫受容体リガンドを投与することにより、発症頻度および重症度が高くなるかどうかについて調べ、本モデルの多様性について検討する。

(3) 動脈硬化病変を来す ApoE KO マウスでの冠動脈炎発症後の経過を追うことにより、冠動脈炎発症後の動脈硬化の早期進展について評価を行う。

3. 研究の方法

(1) NLR リガンド誘発冠動脈炎モデルの病態に関する研究

①炎症性サイトカイン測定による NLR リガンド誘発冠動脈炎モデルの病態検討

LPS による priming を行った 24 時間後に NLR リガンドを皮下投与する。皮下投与後 24 時間、2 日、3 日、7 日目に屠殺し、下大静脈から血清を回収し、サイトカインを測定する。

②各種ノックアウトマウスを用いた NLR リガンド冠動脈炎モデルの病態検討

免疫不全マウス (SCID mouse) に、LPS による priming 後 NLR リガンドを皮下投与し、それを週 1 回 4 週間行い、4 週目に屠殺し、病理学的評価を行う。

(2) 川崎病類似 NLR リガンド誘発冠動脈炎モデルの多様性に関する検討

priming として様々な自然免疫受容体リガンドを投与することにより、発症頻度および重症度が高くなるかどうかについて検討する。priming 物質は川崎病の原因として報告のある細菌、スーパー抗原、Toll-like receptor を中心に物質の投与を行う。

(3) NLR リガンド誘発冠動脈炎モデルを用いた動脈硬化の進展の検討

動脈硬化病変を来す ApoE KO を使い、5 週齢の ApoE KO マウスに対して、LPS 投与後 NLR ligand6 日連日内服を行い 1 週間で冠動脈炎を発症させる。その後 3 週放置し、9 週齢で屠殺し、病理学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) NLR リガンド誘発冠動脈炎モデルの病態に関する研究

①炎症性サイトカイン測定による NLR リガンド誘発冠動脈炎モデルの病態検討

NLR リガンド投与後 24 時間後では、川崎病で認めるような高サイトカイン血症を認めなかった。そこで、各組織の遺伝子発現を調べたところ、様々なサイトカイン・ケモカイン遺伝子が大動脈起始部にて他の血管組織と比べて高い発現を示していた (図 1)。

Category	Symbol	Rank	Aortic root			Pulmonary artery			Aorta			Spleen		
			FK565			FK565			FK565			FK565		
			day2	day4	day7	day2	day4	day7	day2	day4	day7	day2	day4	day7
All	Ccl5	1	86.2	123.9	66.1	3.5	6.4	3.0	42.7	85.6	44.9	0.9	3.3	2.8
	Arg1	2	64.4	9.3	4.6	2.7	0.7	0.5	16.1	8.0	3.7	7.9	1.8	0.6
	Ccl2	3	34.4	36.7	15.2	10.1	11.6	8.2	20.3	26.2	12.7	2.6	3.1	1.3
	Cxcl13	4	32.1	8.2	17.0	0.7	2.8	0.3	4.7	8.0	6.2	1.8	1.2	3.4
	Ccl8	5	8.1	27.1	48.0	7.9	16.5	21.4	2.5	12.7	21.0	0.9	3.8	0.8
	Il6	6	2.8	12.9	15.3	0.8	0.9	0.5	1.3	7.7	4.2	0.5	0.6	0.4
	Serpina3n	7	25.4	17.6	14.5	42.1	6.7	9.9	4.3	3.3	4.0	3.6	5.9	2.1
	Saa3	9	35.8	25.5	20.6	24.0	11.4	16.1	28.9	25.1	42.2	21.3	16.7	9.8
	Cfb	10	22.4	24.2	21.8	7.4	7.8	8.5	1.9	2.4	2.3	1.5	0.9	2.2
	Lcn2	11	16.1	9.5	8.2	22.3	14.6	12.7	0.9	0.8	0.6	0.9	1.2	0.8
	Chemokine/cytokine	Ccl5	1	86.2	123.9	66.1	3.5	6.4	3.0	42.7	85.6	44.9	0.9	3.3
Ccl2		3	34.4	36.7	15.2	10.1	11.6	8.2	20.3	26.2	12.7	2.6	3.1	1.3
Cxcl13		4	32.1	8.2	17.0	0.7	2.8	0.3	4.7	8.0	6.2	1.8	1.2	3.4
Ccl8		5	8.1	27.1	48.0	7.9	16.5	21.4	2.5	12.7	21.0	0.9	3.8	0.8
Il6		6	2.8	12.9	15.3	0.8	0.9	0.5	1.3	7.7	4.2	0.5	0.6	0.4
Ccl7		16	12.0	12.7	13.8	6.7	4.8	1.9	2.1	12.1	4.6	1.7	2.4	1.8
Cxcl9		21	10.4	25.2	17.4	1.1	1.4	0.6	19.7	13.3	8.5	1.8	1.7	2.4
Cxcl10		22	17.2	18.8	11.4	7.6	6.5	2.6	45.1	42.7	17.5	3.0	1.6	2.6
Cxcl2		23	6.3	8.4	9.4	1.8	1.7	2.9	2.5	3.3	3.0	0.7	1.0	1.2
Ccl19		30	14.6	15.7	6.2	0.8	2.3	0.4	3.7	7.9	2.3	0.8	1.1	1.0
Mmp	Mmp3	29	4.6	14.2	10.4	2.3	1.4	0.7	4.1	4.5	3.4	3.0	5.3	2.8
	Mmp12	39	9.6	15.6	5.9	1.0	1.8	1.8	2.0	4.6	3.2	1.7	0.7	2.0

図 1 各組織での遺伝子発現

さらに、各組織を清潔に回収し、NLR リガンドで培養刺激したところ、大動脈起始部において有意にサイトカイン産生を認めた (図 2)。

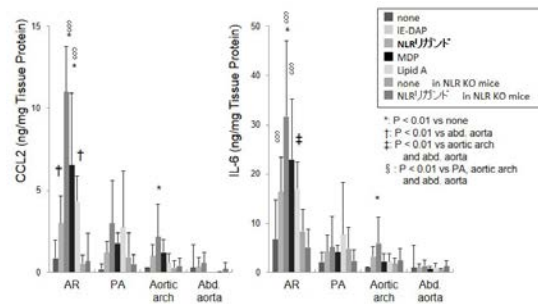


図 2 各組織の組織培養によるサイトカイン産生

以上より、NLR リガンドにより大動脈起始部に有意にサイトカインが放出され、冠動脈炎を引き起こし、それは遺伝子発現を含めた、元来各組織が持つ内因的な因子によることがわかった。また、マウスにおいては全身の高サイトカイン血症を引き起こさないが、逆に冠動脈炎を発症するには局所の炎症のみでも起こりうる事が判明した。

②各種ノックアウトマウスを用いたNLRリガンド冠動脈炎モデルの病態検討

SCIDマウスに対してNLRリガンドを投与したところ、wild typeのマウスと比較するとやや軽度ではあるが、冠動脈炎の発症を認めた(図3)。以上から、獲得免疫は冠動脈炎の増悪に関わっており、冠動脈炎発症には必要ではないことがわかった。

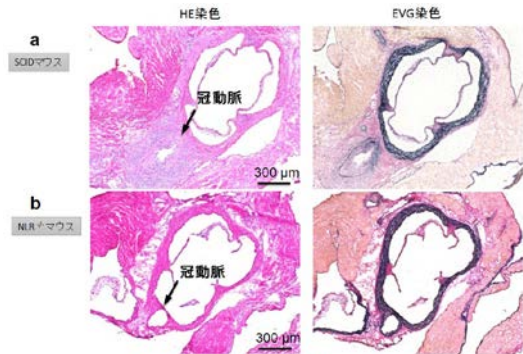


図3 各ノックアウトマウスでの冠動脈炎発症の有無

(2) 川崎病類似NLRリガンド誘発冠動脈炎モデルの多様性に関する検討

LPSの他、OK432、ペプチドグリカン、zymosan、Poly(I:C)、E.coli DNA、α toxin、Streptolysin O、Streptococcal pyrogenic exotoxin A、TSST-1によるプライミングを行った上で、NLRリガンド内服を行ったところ、LPS、OK432、zymosan、α toxin、E.coli DNAのプライミングにより、冠動脈炎発症頻度および重症度が悪化した(図4)。

Reagents	Dose (Mice)	Administration route	Priming	Duration of Administration	Severity of CA	Incidence of CA-His / total
-	-	-	Any priming ip	once	-	0/30
FK565	100ug x 6 times/w	po	-	1w	4, 4, 4, 4	3/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	LPS 20ug ip	1w	2+, 2+, 4, 4+	5/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	OK432 50ug ip	1w	2+, 2+, 4, 4+	5/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	PGN K12 500ug ip	1w	4, 4, 4, 4	3/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	Zymosan 500ug ip	1w	2+, 2+, 4, 4+	5/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	Alpha toxin 1ug ip	1w	2+, 2+, 4, 4+	5/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	SLO 5ug ip	1w	2+, 4, 4, 4+	4/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	Poly(I:C) 500ug ip	1w	4, 4, 4, 4	3/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	E.coli DNA 500ug ip	1w	2+, 4, 4, 4+	5/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	SPLA 10ug ip	1w	4, 4, 4, 4	3/5
FK565	100ug x 6 times/w	po	TSST-1 10ug ip	1w	4, 4, 4, 4	3/5

図4 様々な細菌構成物質のプライミングによる冠動脈炎の発症頻度・重症度

以上より、様々な細菌構成物質との組み合わせにより、冠動脈炎の発症頻度や重症度が悪化することがわかった。これは、川崎病の多様性を説明しうる結果であった。

(3) NLRリガンド誘発冠動脈炎モデルを用いた動脈硬化の進展の検討

ApoEノックアウトマウスでもNLRリガンド1週間投与で冠動脈炎を発症することを確認した上で、5週齢のマウスに1週間NLRリガンドを投与し、その後は無投与で動脈硬化の進展について検討を行った。

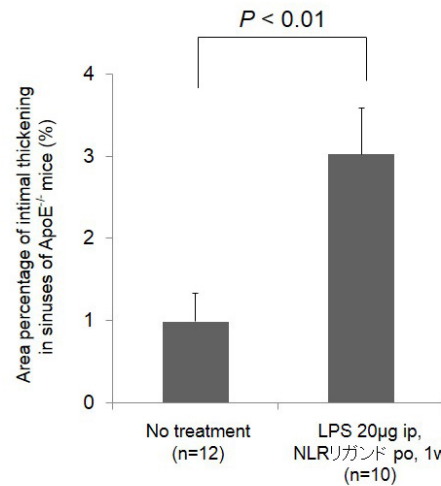


図5 冠動脈炎発症後の動脈硬化の進展(9週齢)

9週齢の大動脈弁周囲の動脈硬化病変について評価を行ったところ、冠動脈炎を発症させた群において、有意に動脈硬化病変の進行を認めた(図5)。9週時点では冠動脈炎は完全に解消しており、冠動脈炎を発症させたことが動脈硬化の進展につながったと考えられる。

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1件)

Nishio H, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; 31(5): 1093-9 査読あり

[学会発表] (計6件)

① Nishio H et al. NLR ligands induce site-specific vascular inflammation. 2011 Pediatric Academic Societies. April 30-May 3, 2011, Denver, America

② Hara T, Nishio H et al. Establishment of a coronary arteritis murine model by oral administration of pure innate immune ligands. 10th world congress on inflammation. June 25-29, 2011, Paris, France.

③ Hara T, Nishio H et al. Nod1 ligands induce coronary arteritis. 6th European meeting for vascular biology & medicine. September 21-24, 2011, Krakow, Poland.

④ Nishio H et al. Novel coronary arteritis murine model induced by pure innate immune ligands. 22nd Fukuoka international symposium on pediatric/maternal-child health research.

September 3, 2011, Fukuoka, Japan.

⑤ Nishio H et al. Nod1 ligand-induced coronary arteritis is enhanced by various bacterial components. 2012. Pediatric Academic Societies. April 28- May 1, 2012, Boston, America.

⑥ Hara T, Nishio H. A novel role of Nod1 in the vascular inflammation. World Immune Regulation Meeting. March 13 -16, 2012, Davos, Switzerland.

[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

西尾 壽乗 (NISHIO HISANORI)
九州大学・大学病院・学術研究員
研究者番号：00507783

(2) 研究分担者

山村 健一郎 (YAMAMURA KENICHIRO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：30532858

永田 弾 (NAGATA HAZUMU)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20570790

(3) 連携研究者

なし