

## 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 6月10日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591184

研究課題名（和文） 単球・血管内皮・脂肪細胞による3次元培養モデルを用いた川崎病血管炎の病態の解析

研究課題名（英文） Investigation of inflammatory mechanism in Kawasaki disease using co-culture in vitro vascular model

研究代表者：

田代 克弥（TASHIRO KATSUYA）

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：70295046

研究成果の概要（和文）：本研究では、小児における全身性血管炎である川崎病の血管炎の機序を *in vitro* で再現し、治療方針の確立を含めた詳細な検討を行うことを目的とした。その手法として、過去に川崎病について行われてきた *in vitro* の研究は、白血球・血管内皮細胞・平滑筋細胞等を各々独立した培養で検討されてきたのに対して、複数の細胞を共培養し相互作用による反応を見ることに重点を置いた。その結果、3T3,U-937,臍帯血管内皮を用いた共培養では、細胞同士の接触自体で炎症に関わる細胞の機能が強く惹起されることが明らかになった。これは、生体内の炎症反応進行において細胞同士の相互作用が極めて重要であることをしめした。

研究成果の概要（英文）：Kawasaki disease (KD) is a systemic vasculitis in children. In this project, we tried to established one of *in vitro* culture models which clarified inflammatory processes of KD. Furthermore, we intended to find adequate therapeutic plan for vasculitis in KD. We examined co-culture experiments using cells which are basic components in coronary arteries.

Our co-culture experiments used lipoblastid 3T3 cells, U937 monocytic cells and umbilical vein endothelial cells. Any type of combination co-cultures showed that cell-to-cell contact strongly activated various cell functions closely related with inflammatory process. Our results indicate progression of inflammatory reaction in our body would be accelerated by cell-to-cell cross talk.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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，川崎病，血管病変，単球活性化

## 1. 研究開始当初の背景

成人の血管病変、特に動脈硬化・腹部大動脈瘤では単球・マクロファージの重要性は既に確立されている。一方、小児特有の血管炎である川崎病における単球・マクロファージの役割についてはまだ不明な点が多く、特に急性期における役割については議論されている。単球・マクロファージはリンパ球や好中球より生体内では多彩な機能を発揮することは知られており、血管壁の破壊には単球・マクロファージが産生する蛋白分解酵素である Matrix Metalloproteinases が重要であるとされている。我々はこれまでも単球・マクロファージに着目して、1) 近年単球・マクロファージから産生される炎症マーカーの一つとして成人冠動脈病変・動脈硬化との関連が注目されている Resistin が細菌感染に比較して川崎病急性期に有意に増加していること 2) 川崎病急性期末梢血単球では MMP-9 と Resistin 蛋白が共に発現が増強していること 3) 川崎病患者では急性期末梢血単核球における Resistin の mRNA 発現が増加していること 4) 川崎病心後遺症合併例では心後遺症非合併例に較べて血清 CRP が低値でも Resistin は高値を示し、血清 Resistin と MMP-9 は比較的良い相関を示していること 5) 川崎病における肝臓由来の炎症・抗動脈硬化マーカーの一つである Fetuin-A の変化についての検討では、細菌感染同様病勢の沈静化と共に血清 CRP と逆相関を示し川崎病の CRP は単球・マクロファージの活性化を反映していない 以上のようなことを明らかにしてきた。これらの結果は、川崎病急性期に単球・マクロファージは細菌感染と働きが大きく異なることを示唆しており、川崎病における単球・マクロファージは感染症と異なる動脈硬化や腹部大動脈瘤に類似した働きをしている可能性を示唆している。従って、川崎病の血管病変形成の機序解明には単球・マクロファージの働きを詳細に検討することは意義深く重要であると考えている。

これまでの研究結果を踏まえて川崎病冠動脈病変における活性化単球・マクロファージは動脈硬化血管病変同様極めて重要な役割を果たしていると考えている。更に、動脈瘤の好発部位は、何れも外膜周囲には豊富な脂肪細胞が分布しており、最近着目されている炎症関連内分泌細胞としての脂肪細胞が単球・マクロファージの活性化に何らかの役割を果たしている可能性が推測される。しかし、それについての明確な検討

はこれまで殆どなされておらず、個々の細胞の働きのみならず異種細胞の相互作用を明らかにすることは生体内での実際の病態を理解する上で重要と考えるそこで我々は、1) 川崎病急性期の炎症下での単球・マクロファージの活性化は細菌感染と異なっており、血管壁の破壊に Resistin の産生亢進及び弾性繊維を分解する Matrix metalloproteinases (MMPs) の産生・分泌がリンクして動脈血管壁で作用している。2) 両者の産生亢進が単球・マクロファージ細胞内を同時に生じさせる刺激やシグナル亢進が川崎病に特徴的かつ重要な病態である。3) 動脈血管病変の形成部位は何れも外膜周囲の脂肪組織の豊富な部位に局限しており、これは単球・マクロファージが血管壁への侵入の過程で、が外膜周囲脂肪細胞から、強力かつ作用限局性の活性化誘導刺激を受け取り、これが川崎病における血管病変発生部位を規定している という仮説を考えた。

## 2. 研究の目的

炎症に関わる細胞の相互作用に着目し、川崎病急性期血管病変の進行において血管壁に浸潤する活性化単球・マクロファージと血管周囲の脂肪細胞の果す役割を明らかにして、それに基づき最終的には**川崎病の心血管病変進展阻害に有効かつ特異的な治療法を提示すること**を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 二次元共培養による単球の活性化効果についての検討

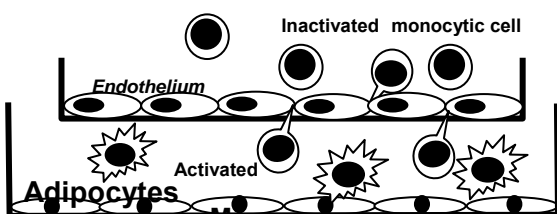
生体内では細胞同士が接触して、お互いに情報交換を行い活性化することが想定されている。初年度には血管内皮細胞及び 3T3 脂肪細胞との共培養を行い、単球の活性化について MCP-1, MMPs, iNOS, CRP, Ferritin 等の炎症関連蛋白の発現の変化を調べる。3T3 細胞を用いた予備実験では U937 は未分化の 3T3 細胞との接触により、U937 細胞の MCP-1・MMP-9 の発現が増加を既に観察している。そこで今年度は、引き続き市販されているヒト冠動脈内皮細胞・脂肪細胞と健常者から得られた末梢血単球を用いてより、ヒト生体内に近い状況における、単球機能変化について比較検討した。

### 2. 3次元共培養実験：

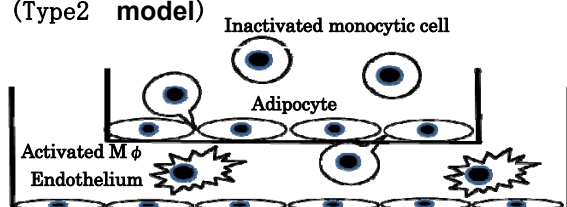
平成 22 年度におこなう単球と血管内皮細胞（臍帯静脈内皮・冠状動脈内皮）及びヒト脂

脂肪細胞二次元システムでの実験を踏まえて下図のような、3次元共培養システムで単球の活性化・機能変化についての検討を行う。この実験系2種類を作成し、**Type I**では**最上層が血管外膜側、脂肪細胞層を外膜、中間室を血管壁内と仮想して作成し、最上層に末梢血単球あるいは単球様株化細胞を入れて血管内皮細胞に接触した後中間室に侵入させ、更に脂肪細胞とへの接触を行わせる。**血管内皮細胞はヒト臍帯静脈内皮もしくはヒト冠動脈内皮細胞を使用して、**血管内腔から血管壁内への単球の浸潤を再現することを目的とした。**一方 **Type II**では**血管内皮細胞と脂肪細胞の位置を逆転させることにより血管外膜側からマクロファージが血管壁内へ浸潤していく状況を再現することを目的とした。**

(Type 1 model)



(Type2 model)



#### 4. 研究成果

川崎病における血管炎症メカニズムについてin vitro研究としては、単球細胞株U937-脂肪細胞(3T3)の共培養及び臍帯内皮細胞-単球の共培養をおこなった。それにより何れの共培養においても単球の活性化が惹起されることが観察された。この結果はこれまでの報告にもあるように、細胞同士の接触が、単球の活性化委に重要であることを示している。他方、通常の単独培養では各種刺激物質(LPS・IFN- $\gamma$ 等)で容易に単球細胞の活性化が得られたに対して、共培養系ではその時点で既に活性化状態になっているため各種刺激による大きな変化を検出できなかった。

仮想外膜として当初3T3細胞株を使用していたが、マウス由来であり本来の脂肪細胞

とは性質を異にすることが考えられたため、ヒト脂肪前駆細胞を導入し、それについては脂肪細胞への分化誘導を確認した。この結果、3T3よりもよりin vivoに近い状況を再現できるようになった。しかし、この細胞においてU-937および末梢血単球の共培養で、単球の活性化が共培養の時点で強く促進される状態であった。

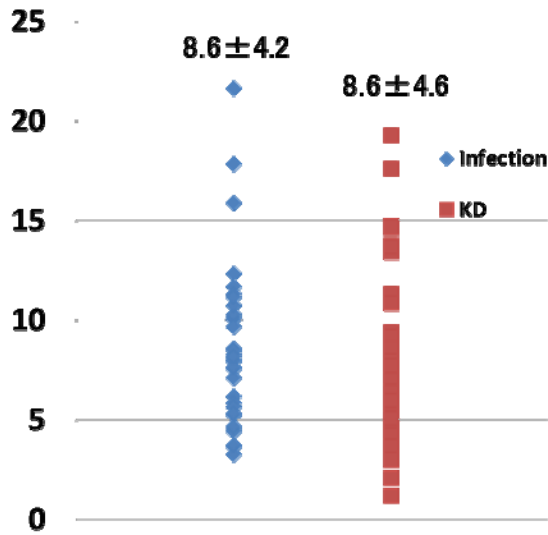
以上の結果から、当初想定していた共培養系はそれ自体で細胞活性化を来してしまい、更なる細胞の機能変化を評価しにくいことが明らかになった。今後この系での実験を発展させるためには、血管内皮細胞・脂肪細胞との共培養でも単球を刺激しない条件の確立が必要である。これが確立できれば、細胞同士の接触・情報交換に伴う変化についての詳細は検討が可能になると考えている。

また、この間に小児の冠動脈周囲脂肪織で起こっている細胞集簇やアディポカインの発言について当院剖検例での免疫組織学的検討を開始して現在遂行中である。成人での冠動脈周囲脂肪織・冠動脈壁についての病理学的検討の報告は散見されるが、小児における報告はなく小児特有な冠動脈病変が生じる背景を明らかにできるものと考えている。

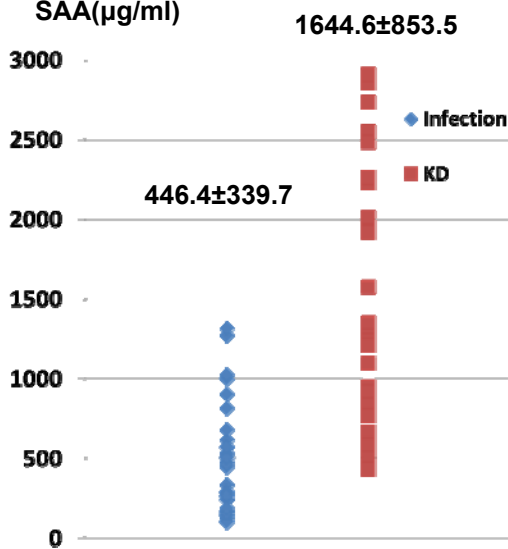
更に、川崎病における炎症の機序解明のために、臨床研究として患者急性期の血清における血清アミロイドA(SAA)の測定検討を開始した。具体的には、CRPと同様肝臓から産生される急性反応蛋白であるSAAの変化について他の炎症マーカー(WBC数・好中球数・CRP)について細菌感染症と比較検討した。これでは細菌感染症と川崎病においてCRPは同値であってSAAは有意( $P < 0.001$ )に高値を示し、両者での炎症発症機序が異なることが推定された。また、川崎病におけるSAAの推移はCRPと同様もしくはそれ以上に変化を示し、従来の炎症マーカーよりも病勢をより鋭敏に反映して変化することを明らかにした。今後川崎病症例についてのデータ集積を行い更なる解析を行う予定である。

#### 川崎病と細菌感染症における CRP・SAAの違い

CRP (mg/dl)



SAA(μg/ml)



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)

熊本崇、前田寿幸、市丸智浩、田代克弥、濱崎雄平 *Yersinia pseudotuberculosis*5a 抗体価上昇が認められた腸間膜リンパ節膿瘍の 1 例. 日本小児科学会雑誌. 査読有. 116. 2012 年. 1549-1553

[学会発表] (計 2 件)

(1) 田代克弥、濱崎雄平 川崎病急性期における血清アミロイド A の有用性. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20~22 日 福岡市

(2) 田代克弥、濱崎雄平 川崎病急性期治療にお

ける抗 TNF-α 阻害剤の作用機序の解明 川崎病治療懇話会 2010 年 7 月 9 日 千葉県浦安市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

田代 克弥 (TASHIRO KATSUYA)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号: 70295046

(2) 研究分担者:

濱崎 雄平 (HAMASAKI YUHEI)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号: 10172967

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: