

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20757

研究課題名（和文）川崎病モデルマウスによる冠動脈炎の病態形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of pathophysiological mechanism of coronary arteritis in Kawasaki disease model mice

研究代表者

藤田 聖実 (Fujita, Masami)

滋賀医科大学・医学部・診療登録医

研究者番号：90834250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：川崎病は日本人小児に多く発症する原因不明の疾患で全身性血管炎を伴い、特に冠動脈に強く炎症が惹起される。川崎病の病因・病態解明のためには浸潤細胞を含む炎症局所の解析が必要であるが、患者の冠動脈組織を得ることは通常困難であるためモデルマウスが広く使われており、その1つとしてFK565マウスが知られている。本研究は、FK565マウスを用いて、川崎病における冠動脈炎の病態形成にNK細胞が寄与するメカニズムを解明することを目的とした。本研究により、FK565マウスの冠動脈周囲にはNK細胞が浸潤すること、および冠動脈周囲に浸潤したNK細胞はケモカイン受容体CX3CR1が強く発現していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病は日本人小児に多く発症する原因不明の急性熱性疾患で、全身の血管炎を起こす。特に冠動脈が障害を受けやすく、後遺症として冠動脈瘤が残存した場合に小児期および成人期の心筋梗塞の原因となるため、早期に血管炎を抑制することが臨床的に重要である。本研究では、FK565マウスにおいて、急性期にCX3CR1陽性NK細胞が冠動脈炎周囲に浸潤することを明らかにした。本研究の成果は、川崎病の急性期治療で最も重要な冠動脈炎抑制のための新たな治療法の開発につながる点で大きな社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Kawasaki disease is a systemic vasculitis that affects infants and young children. KD patients may develop cardiac inflammation, most commonly involving coronary arteries. Understanding of KD pathophysiology is limited by the low availability of human tissues of the disease, so we induced KD-like coronary arteritis in mice using FK565. This study revealed that activated and cytotoxic NK cells infiltrating around the coronary arteritis express the chemokine receptor CX3CR1 and functionally contribute to the development of coronary arteritis in KD.

研究分野：小児循環器

キーワード：川崎病 冠動脈炎 FK565 NK細胞

1. 研究開始当初の背景

川崎病は日本人小児に多く発症する原因不明の急性熱性疾患で、全身の血管炎を起こす。特に冠動脈が障害を受けやすく、後遺症として冠動脈瘤が残存した場合に小児期および成人期の心筋梗塞の原因となるため、早期に血管炎を抑制することが臨床的に重要である。これまでの川崎病死亡例の病理解剖結果の報告から、自然免疫系および獲得免疫系のさまざまな細胞が冠動脈周囲に浸潤することが知られている。病因・病態解明のためには浸潤細胞を含む炎症局所の解析が必要であるが、患者の冠動脈組織を得ることは通常困難であるため、モデルマウスが広く使われている。

川崎病のモデルマウスとして現在知られている代表的なものに、①カンジダ菌体抽出物誘発モデル、②ラクトバチルス細胞壁抽出物誘発モデル、③パターン認識受容体 NOD1 のリガンド FK565 誘発モデル (FK565 マウスと呼ぶ) がある。FK565 マウスは、他の2つに比べて冠動脈により特異的に炎症が起こる点で、川崎病における冠動脈炎発症に最も類似する病態を示す。これらのモデルマウスを用いて、冠動脈周囲にマクロファージ、好中球、リンパ球が浸潤することが報告され、特にマクロファージと病態との関連が調べられてきたが、リンパ球の病態への関与については不明の点が多い。申請者はこれまでに、FK565 マウスの冠動脈を含む大動脈基部のマイクロアレイ解析を行い、対照マウスと比較して発現が亢進する遺伝子群に、ナチュラルキラー (NK) 細胞に発現する遺伝子が多く含まれることを見出した。このことから、川崎病における冠動脈炎発症に NK 細胞が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、FK565 マウスを用いて、川崎病における冠動脈炎の病態形成に NK 細胞が寄与するメカニズムを解明することを目的とする。NK 細胞がどのように冠動脈周囲に浸潤し、どのように病態形成に関与するのかを理解するとともに、その病態に基づいて冠動脈の炎症を制御するための基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) NK 細胞を除去したマウスでの冠動脈炎発症の解析

FK565 マウスは、C57BL/6 マウスに 0 日目に lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内注射し、1 日目、4 日目に FK565 を皮下注射することにより作製する。NK 細胞除去は、LPS を投与する 1 日前に anti-asialo GM1 抗体を腹腔内注射することにより行う。7 日目に安楽死させ、臓器および血液を採取する。冠動脈を含む心臓大動脈基部の HE 染色により冠動脈炎を発症しているかを確認する。また、フローサイトメトリーによりどの免疫細胞が増加しているか、免疫組織染色により冠動脈周囲にどの免疫細胞が浸潤しているかを確認する。

(2) リンパ球を完全に欠損するマウスでの冠動脈炎発症の解析

NK 細胞を含む自然免疫および獲得免疫の全てのリンパ球を欠損するマウスに FK565 を投与し、冠動脈炎を発症するか検討する。

(3) NK 細胞がどのように冠動脈周囲に浸潤するかの検討

NK 細胞が冠動脈周囲に浸潤するメカニズムを明らかにするため、ケモカインレセプターに注目する。FK565 マウスの血中および心臓の定量 PCR およびフローサイトメトリー解析を行い、発現が増強しているケモカインおよびケモカインレセプターを確認する。

4. 研究成果

(1) NK 細胞を除去したマウスでの冠動脈炎発症の解析

LPS を投与する 1 日前に anti-asialo GM1 抗体の腹腔内投与を行うことにより NK 細胞を除去したマウスに FK565、LPS を投与したところ、冠動脈炎の発症が著明に抑制された(図 1)。

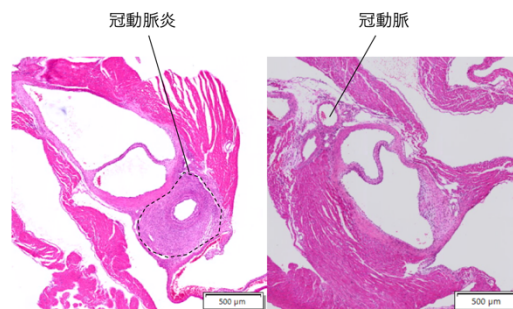


図1 通常のFK565マウス NK細胞を除去したFK565マウス
NK細胞を除去したマウスでは冠動脈炎が著明に軽減されている。

(2) リンパ球を完全に欠損したマウスでの冠動脈炎発症の検討

NK 細胞を含む全てのリンパ球を欠損する NSG マウスに FK565 を投与したところ、冠動脈炎の発症が軽減されることを確認した(図 2)。以上の (1)

(2) より、NK 細胞が冠動脈炎形成に強く関わっていることが示唆された。

(3) NK 細胞がどのように冠動脈周囲に浸潤するかの検討

これまでに行った FK565 マウスのマイクロアレイ解析により、NK 細胞に関わるケモカインレセプターである CX3CR3 と CX3CR1 の発現が増強していた。そこで野生型マウスの心臓と FK565 マウスの心臓の遺伝子比較を定量 PCR 法により行ったところ、CX3CR1 のリガンドである CX3CL1 の発現が増強していた(図 3)。また、FK565 マウスの心臓および血中の NK 細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、FK565 マウス心臓に浸潤した NK 細胞では、血中 NK 細胞に比べて CX3CR1 の発現が増強していた(図 4)。一方、CX3CR3 陽性の NK 細胞は心臓には浸潤していなかった。さらに、心臓内に浸潤した NK 細胞は活性化マーカーである KLRG1 を発現しており、KLRG1 を発現した CX3CR1 陽性 NK 細胞は細胞傷害性物質であるグランザイム B を発現していた(図 5)。以上の結果より、FK565 マウスでは、活性化した NK 細胞が CX3CR1 を発現し、冠動脈周囲に浸潤して冠動脈炎を引き起こすことが示唆された。

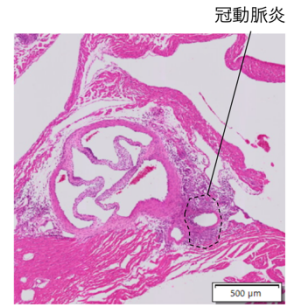


図2 NSGマウス冠動脈炎の発症が軽減している。

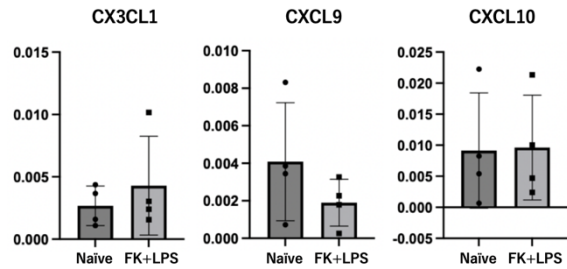


図3 野生型マウスとFK565マウス心臓の遺伝子発現比較

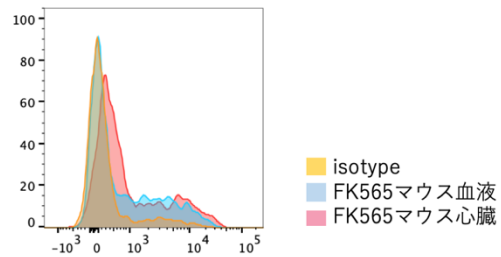


図4 FK565マウスの心臓および血液中のCX3CR1陽性NK細胞

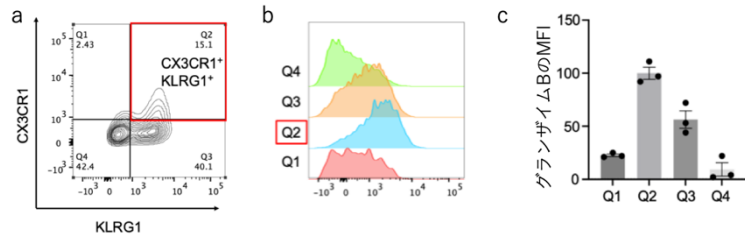


図5 FK565マウス心臓のフローサイトメトリー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masami Fujita, Hiroki Satooka, Takako Hirata
2. 発表標題 The mechanism of coronary arteritis development in a mouse model of Kawasaki disease
3. 学会等名 The 53rd annual meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Masami Fujita, Hiroki Satooka, Takako Hirata, Shinsuke Hoshino
2. 発表標題 The mechanism of coronary arteritis development in a mouse model of Kawasaki disease
3. 学会等名 14th International Kawasaki Disease Symposium (国際学会)
4. 発表年 2024年～2025年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------