

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791195

研究課題名(和文)川崎病の冠動脈病変と酸化ストレス

研究課題名(英文)Oxidative stress and coronary artery lesion in Kawasaki disease

研究代表者

菅沼 栄介(SUGANUMA, EISUKE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60408010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病の冠動脈病変と酸化ストレスの関連性については不明な点が多い。今回酸化ストレスに感受性を示すNrf2遺伝子欠損(KO)マウスに対してLCWEを腹腔内投与し冠動脈炎を誘発しワイルドタイプ(WT)と比較した。予想に反してNrf2KOマウスの冠動脈炎と血清の炎症性サイトカインはともに有意な抑制をみた。Nrf2KOマウスの末梢血中マクロファージは超急性期に強く誘導される一方で亜急性期は脾臓におけるアポトーシスが著明に亢進していた。つまりNrf2遺伝子は抗酸化ストレス作用による抗炎症作用と脾臓におけるアポトーシスの抑制による炎症の遷延化という2つの側面を持つという新たな発見があった。

研究成果の概要(英文)：Nrf2 is essential to the expression of antioxidant genes. Involvement of oxidative stress in the development of coronary arteritis(CA) in Kawasaki disease(KD) remains unknown. We have tested whether the disruption of Nrf2 in mice causes exacerbated CA in a murine model of KD induced by Lactobacillus casei cell wall extract(LCWE). Six week-old male Nrf2 knockout(KO) and wild type (WT) mice were injected with either PBS or 300ug of LCWE. Two and 4 weeks after LCWE administration, severity of CA was assessed. KO mice had decreased mRNA expression of antioxidant genes, including Ho-1 and NQO1. In contrast to our hypothesis, KO mice showed less severe CA. Serum cytokine levels such as TNFalpha, IL1beta, IL6 and MCP1 were lower in KO than WT mice. Spleen from KO mice exhibited increased number of apoptotic cells. These results suggest that, although Nrf2 induces antioxidant genes (benefit), it suppresses apoptosis of inflammatory cells, leading to exacerbation of CA (risk) in KD.

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：川崎病冠動脈炎 LCWE 酸化ストレス Nrf2遺伝子 Keap1遺伝子

### 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。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%、大量 グロブリン療法 (IVIG) とアスピリン治療を行っても約 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。動脈瘤形成には炎症細胞 (リンパ球、単球/マクロファージ等) 浸潤や細胞外物質 (弾性線維、コラーゲン) の破壊が大きく関与しており、これらを促進する因子として IL-6、IL-1、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、VEGF、MMP、VCAM-1、ICAM-1 など数多くのサイトカイン、ケモカイン、接着因子等が知られてきた。

一方、活性酸素種 (以下 reactive oxygen species=ROS) はタンパク質の変性、脂質の酸化、DNA の切断、塩基修飾などを引き起こし、種々の疾病の発症や進展、また老化にも関与している。この活性酸素の過剰状態である酸化ストレスは、生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化に傾いた状態であると定義づけられる。数多くの臨床研究・基礎研究により循環器領域では、高血圧、脂質異常症、糖尿病などの危険因子がいずれも生体の酸化ストレスを増大させ、またこの酸化ストレスを制御することは動脈硬化や心筋梗塞・心不全をはじめとする心血管系の予防や治療において重要であることが認識されてきた。

川崎病は動脈硬化と共通する側面があり、血管 (動脈) 壁を首座としてマクロファージ等の炎症細胞浸潤が中心的な役割を担う。申請者は以前動脈硬化モデルマウス (ApoE ノックアウトマウス) におけるアンジオテンシン (A) 受容体拮抗薬 (ARB) の病変安定化効果について研究を行った。

その結果 ARB は動脈硬化病変を縮小するだけでなく組織学的に以下の効果を示す事がわかった。

1. ARB は動脈硬化病変のコラーゲンの比率を有意に増加した。

2. ARB は弾性線維の断裂を有意に抑制した。

3. ARB は動脈硬化病変内のマクロファージの浸潤を抑えた。

これらの機序として interferon (IFN- $\gamma$ )、macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) など種々の炎症性サイトカインの発現が関与していることが考えられ、さらにその基盤には A による NADPH オキシダーゼを介する ROS 産生増加の可能性がある。

近年、川崎病患者と酸化ストレスに関する文献が少数散見されている。高槻らは、酸化ストレスのマーカーである尿中 8-iso-prostaglandinF2 (8-iso-PG) は川崎病患者で他の熱性疾患患者と比較し有意に高値を示し、大量 IVIG 療法により 8-iso-PG は有意に低下させた事を報告した。また Yiu-fai Cheung らは aneurysm のある川崎病患者で酸化ストレスのバイオマーカーであ

る malonaldehyde と hydroperoxides を測定し高値であった。しかし、酸化ストレスと急性期の川崎病の冠動脈病変の形成に関する因果関係は明らかではない。

生体における抗酸化システムとして、**Keap1-Nrf2 系** が中心的な役割を果たしている (7)。転写因子 Nrf2 は多くの抗酸化遺伝子の制御配列上に存在する ARE 配列に結合しそれらの転写を誘導する。また keap1 は通常は Nrf2 を細胞質にトラップし分解を促進されるが酸化ストレス下では Nrf2 は keap1 による分解から逃れ、核に移行し活性化する (8)。

### 2. 研究の目的

川崎病の治療戦略の一番のポイントはいかに冠動脈病変を予防するかである。本研究は川崎病の冠動脈病変における酸化ストレスの役割を Nrf2/keap1 の mutant マウスを用いて明確にする新規、独創的なものである。この研究を通じて酸化ストレス軽減が冠動脈炎の発症、進展に対する治療戦略の一つとなることが期待される。

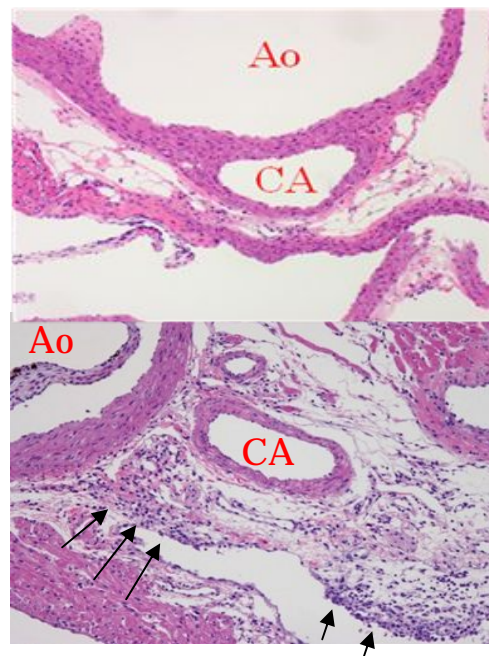
### 3. 研究の方法

#### (1) 川崎病モデル病変の作製

American Type Culture Collection, Manassas, VA (ATCC 11578) で提供している *Lactobacillus casei* bacteria を購入し培養し、RNase, DNase, trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で脂質や核酸などの除去を行った後、得られた pellet を超音波処理にてさらなる細胞破壊を行い超高速遠心 (40,000  $\times$  g) で上澄みの cell wall extract を回収し、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) 実験マウス

すでに供与を受けている Nrf ノックアウトマウス、keap-1 ノックダウンマウスはともにヘテロの同士を交配させ、マウスのコロニーを増やす。同胞から得られたワイルドタイプ（WT）マウスはコントロールマウスとして使用する。

4 週齢の雄のマウスを以下の 4 群に分ける。

Nrf2 ノックアウトマウス+LCWE 腹腔内注射 <n=10>

Nrf2 ノックアウトマウス+PBS 腹腔内注射 <n=10>

ワイルドタイプマウス+ LCWE 腹腔内注射 <n=10>

ワイルドタイプマウス+ PBS 腹腔内注射 <n=10>

LCWE はいずれも 300 μg/匹使用

LCWE 投与 2 週と 4 週後にマウスを sacrifice し各群間での冠動脈炎の程度をスコアリングし比較検討を行う。

#### (3) 血清サイトカイン測定

Cytometric bead array 法を用いて LCWE 投与後、超急性期（2, 6, 24 時間後）と亜急性期（14 日、28 日後）に眼窩静脈叢より約 100 μL の採血を行い TNF-、Interleukin-6、Interferon-、Macrophage chemoattractant protein-1 といった炎症性サイトカインの経時的な変化を見た。

#### (3) リアルタイム PCR（上部心臓組織）

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 IL-6、TNF-、Hmox-1、GSTM1、NQO1mRNA の定量的評価を行い actin を内因性コントロールとした。

#### (4) フローサイトメトリー（FACS 解析）

末梢血及び骨髄・胸腺、リンパ節等の組織から比重分離液を用いて得た単核球に対し各種蛍光標識抗体を用いて染色し FACS にて解析を行う。CD3、CD4、CD8、CD25（Foxp3）、CD19、CD20、Mac-1、class-、CD80、CD11c、CD14、CD16、CD56 などの T 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹上細胞などの解析をする蛍光抗体を用いる。

#### (5) 免疫染色

心臓（冠動脈含む）、脾臓を摘出し凍結切片を作製する。（心臓切片は 5 μm）

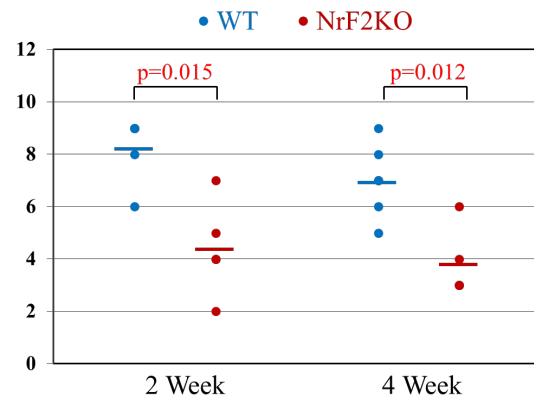
マクロファージ：F4/80 染色（Anti-F4/80 antibody, abcam®）

アポトーシス：TUNEL 染色（TUNEL dilution buffer, Biotin-16-dUTP, TUNEL Enzyme Roche Applied Science®）

#### 4. 研究成果

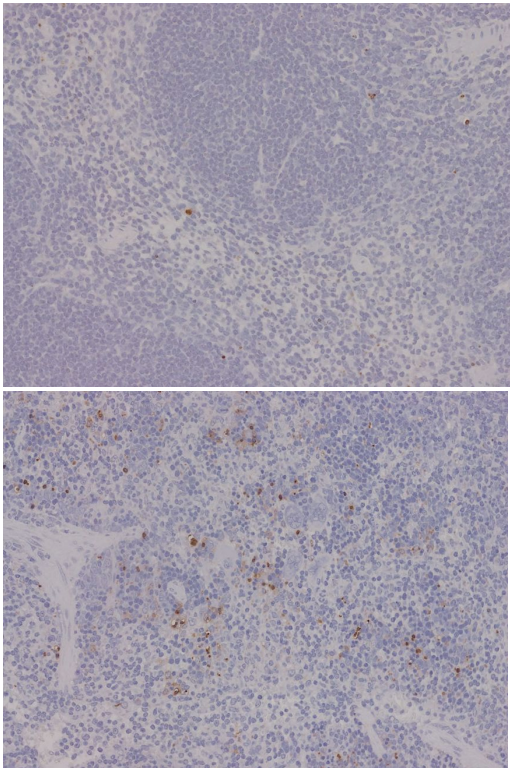
Nrf2 の標的遺伝子である Ho-1、NQO-1mRNA 値は、上部心臓組織において Nrf2KO マウスで有意に抑制されていた。しかしながら予想に反して、LCWE の投与により Nrf2KO マウスの冠動脈炎は WT マウスと比較して 2 週後（WT：7.0±0.8vs Nrf2：4.0±1.0 p=0.015）、4 週後（WT：7.0±1.1 vs Nrf2：3.7±0.7、p=0.012）共に有意に抑制されており（図 1）血清 TNF-、IL-1、IL-6、MCP-1 も Nrf2KO マウスで抑制されていた。FACS 解析では Nrf2KO マウスの末梢血で LCWE 投与 6 時間後に CD11b の強い誘導を認めた反面で、投与 28 日目で Nrf2KO マウスの脾臓細胞数の有意な増加と TUNEL 染色でアポトーシスの強い誘導を見た（図 3）。結論として Nrf2 遺伝子欠損マウスは局所での抗酸化因子は有意に抑制されていたが冠動脈炎はむしろ抑制された。Nrf2 欠損の持つ脾臓におけるアポトーシス誘導促進作用が炎症抑制の一因である事が推察された。

図 1：冠動脈炎の重症度スコア



LCWE 投与後 2 週後（左）、4 週後（右）ともに Nrf2 遺伝子欠損マウスで冠動脈炎の有意な抑制をみた。

図 2 : TUNEL 染色 ( Apotosis )



脾臓での TUNEL 染色を示す。  
Nrf2 遺伝子欠損マウス ( 下段 ) で WT マウス ( 上段 ) と比較してアポトーシスの有意な促進を見た ( 茶色 : TUNEL 染色陽性細胞 ) 。

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 )

Nrf 遺伝子欠損マウスは LCWE 誘導性冠動脈炎を抑制する  
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 50 回日本小児循環器学会学術集会で口演発表予定 ( 2014 年 7 月 3 日・岡山 )

〔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 )

研究者番号 : 60408010

東海大学・医学部・講師