

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591572

研究課題名(和文)リン酸ジエステル加水分解酵素(PDE)阻害剤は川崎病冠動脈瘤形成を抑制するか？

研究課題名(英文) Phosphodiesterase inhibitors inhibit Lactobacillus casei cell-wall-induced inflammations

研究代表者

斉藤 剛克(Saito, Takekatsu)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：30525035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病では原因不明の発熱と全身性に血管炎が発現し、時として重篤な冠動脈瘤が合併する。この冠動脈瘤は突然死の原因にもなり患児のQOLを著しく低下する。乳酸桿菌細胞壁断片(LCWE)は動物に川崎病類似血管炎を惹起する。一方、細胞内セカンドメッセンジャーのcAMPが炎症反応を抑えることが知られている。本研究ではcAMPがLCWE刺激により活性化される炎症シグナルNF- κ B経路と細胞増殖シグナルMAPK経路を抑制すること、そして、LCWE刺激による細胞の増殖も抑制することを明らかにした。また、cAMP下流のpretein kinase A とEpacの両シグナルが関与していることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease patients show the symptoms of a fever and vasculitis, and sometimes severe coronary artery aneurysm. This coronary artery aneurysm might result in lowering the QOL of children. Lactobacillus Lactobacillus casei cell wall fragments (LCWE) make similar Kawasaki disease in animals. Previously we showed that cAMP down-regulates the inflammatory response. In this study, we revealed that cAMP inhibits the LCWE-induced NF- κ B and MAPK pathways, and cell proliferation. In addition, both the signals of pretein kinase A (PKA) and Epac that are downstream of cAMP are involved.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児科 循環器

1. 研究開始当初の背景

川崎病は幼児に好発する疾患で、原因不明の発熱と全身性の血管炎が特徴であり、時として重篤な冠動脈瘤が合併する。この冠動脈瘤は患児の QOL を著しく低下し、突然死の原因にもなり得る。日本では毎年約 1 万人の新規の川崎病患者児が発生し、そのうちの 10% 程度は冠動脈瘤を合併するといわれる。そのため川崎病患者児の冠動脈瘤予防は極めて重要である。

川崎病病因論については、疫学、臨床データから何らかの感染因子がその発症に関与していることが示唆されてきたが、微生物の分離同定や血清学的検索などさまざまな手法を用いても最終確定には未だ至っていない。しかし、動物に乳酸桿菌やカンジダ成分、もしくは異種血清を投与すると川崎病様血管炎が誘発されることが知られている。これまで、これら川崎病疾患モデル動物の解析から、川崎病の成因を明らかにする研究がおこなわれているのが現状である。

2. 研究の目的

私たちは、これまで川崎病患者の血清からサイトカインプロファイル解析を行い、炎症とサイトカインの関与を検討してきた(図 1)。その結果、川崎病の病態に炎症が強く関係していることを見出している。

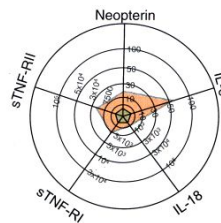


図 1 川崎病のサイトカインプロファイル

一方、私たちは細胞内セカンドメッセンジャーの代表格である cAMP が炎症反応や炎症に起因する細胞増殖を抑えることをすでに報告している。川崎病の主体が炎症であること、そして川崎病に合併する血管炎や動脈瘤は、細胞増殖を伴う“いわゆる血管壁のリモデリング”が惹起されたために生じていることを考えると、cAMP が川崎病の発症もしくは病態の悪化に抑制的に働くのではないかと推論できる。

本研究では、cAMP を分解するリン酸ジエステル加水分解酵素 (PDE) の阻害剤が川崎病の炎症の予防や増悪の抑制に働くか否かを明らかにし、その詳細なメカニズムを解明することにある。

3. 研究の方法

マウスに川崎病類似血管炎を惹起する乳酸桿菌 *Lactobacillus casei* 細胞壁断片 (LCWE) を報告 (Arthritis Rheum 26 (1983), 1259-1265) を基にを作成した。この LCWE を

細胞もしくは動物に投与して、反応を観察した。また、リン酸ジエステル加水分解酵素 (PDE) の阻害剤や cAMP アナログを投与して、LCWE の作用をどのように修飾するかを観察した。

4. 研究成果

Lactobacillus casei 菌はグラム陽性桿菌であることから、LCWE の主成分はペプチドグリカンと考えられるが、作成の過程上精製の行程は含まれていないため、ペプチドグリカン以外にも様々な活性物質が含まれていると思われる。ペプチドグリカンに対する細胞表面の受容体は Toll-like receptor (TLR) 群のなかの TLR-2 である。そこで、TLR-2 受容体を発現するマウス線維芽細胞を LCWE で刺激した。LCWE 刺激は炎症シグナルである NF- κ B 経路と細胞増殖シグナルである MAPK 経路を活性化し、かつ、細胞増殖が誘導された。この NF- κ B 経路と MAPK 経路の活性化や細胞増殖はリン酸ジエステル加水分解酵素 (PDE) の阻害剤により明らかに抑制された。このことはリン酸ジエステル加水分解酵素 (PDE) 阻害剤により増加する細胞内 cAMP の作用と考えられた。実際、cAMP アナログで前処置後に LCWE 刺激を加えても、NF- κ B 経路と MAPK 経路の活性化や細胞増殖は認められなかったことから、cAMP が LCWE の作用を抑制することが示唆された。

cAMP 下流には pretein kinase A (PKA) と Epac へつながるシグナルが存在するが、次に私たちは PKA と Epac の関与を検討した。PKA 阻害薬 (H89) は cAMP による MAPK 抑制作用を解除したが、NF- κ B 抑制作用には影響を与えなかった。次に Epac のみを活性化する 8-(4-chlorophenylthio)-2-Omethyladenosine-3,5-cyclic monophosphate sodium salt (8-CPT-cAMP, Epac activator) は LCWE による NF- κ B の活性化を抑制したが、LCWE による MAPK は活性化できなかった。このこと結果は、PKA シグナルは MAPK 活性の抑制を、Epac シグナルは NF- κ B 活性の抑制を誘導することを示している。また、細胞増殖については PKA シグナルと Epac シグナルの双方が抑制に働くことも明らかにした。

興味あることに、TLR-2 受容体が発現していないグリア細胞でも LCWE 刺激で炎症シグナル NF- κ B 経路が活性化され、COX2 誘導を認めた。同様に TLR-2 受容体が発現していないチャイニーズハムスター卵巣細胞でも LCWE 刺激で炎症シグナル NF- κ B 経路が活性化されることを観察した。これらの結果は、LCWE の受容体として TLR-2 以外の受容体が存在することが示唆される。

実際、TLR-2 を発現しておらず LCWE により細胞内シグナルが惹起される細胞 (グリア細胞やチャイニーズハムスター細胞) では NOD2 受容体の存在をウエスタンブロットで確認した。さらに、NOD2 特異的的刺激剤によりそれら細胞では炎症シグナル NF- κ B が活性化

(COX2 の誘導) されること、つまり NOD2 刺激は LCWE 刺激を模倣することを突き止めた。

通常川崎病患児では5日間以上の高熱が観察されるが、今回使用した LCWE をラットに投与してもごく局所的な発熱が記録されるのみであり、数日および長期間の発熱は観察されなかった。川崎病のその他症状も観察されなかった。Lactobacillus casei 菌はグラム陽性桿菌であることから、LCWE の主成分はペプチドグリカンと考えられるが、作成の過程上精製の行程は含まれていないため、ペプチドグリカン以外にも様々な活性物質が含まれていると思われる。このことは LCWE モデルの限界を暗示するものであり、LCWE モデルが純粹にヒト川崎病のモデルとなるか疑問の余地があることを示している。

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11件)

Ohta K, Hashida Y, Wada T, Saito T, Kasahara Y, Yachie A. Author's reply. J Cardiol. 2015; pii: S0914-5087(15)00016-7. doi: 10.1016/j.jjcc.2015.01.005. <査読有>

Hashida Y, Wada T, Saito T, Ohta K, Kasahara Y, Yachie A. Early diagnosis of Danon disease: Flow cytometric detection of lysosome-associated membrane protein-2-negative leukocytes. J Cardiol. 2014; pii: S0914-5087(14)00287-1. doi: 10.1016/j.jjcc.2014.09.011. <査読有>

Sugimoto N, Toma T, Shimizu M, Kuroda M, Wada T, Yachie A. Shiga toxin-2 enhances heat-shock-induced apoptotic cell death in cultured and primary glial cells. Cell Biol Toxicol. 2014; 30:289-299. doi: 10.1007/s10565-014-9286-1. <査読有>

Mitani Y, Ohta K, Ichida F, Nii M, Arakaki Y, Ushinohama H, Takahashi T, Ohashi H, Yodoya N, Fujii E, Ishikura K, Tateno S, Sato S, Suzuki T, Higaki T, Iwamoto M, Yoshinaga M, Nagashima M, Sumitomo N. Circumstances and outcomes of out-of-hospital cardiac arrest in elementary and middle school students in the era of public-access defibrillation. Circ J. 2014; 78:701-707.

doi.org/10.1253/circj.CJ-13-1162.

<査読有>

Sugimoto N, Ohta K, Saito T, Nakayama Y, Nakamura T, Maeda A, Yachie A.

Lactobacillus casei cell wall extract directly stimulates the expression of COX2 independent of Toll-like receptor 2 in rat glial cells J Microbiol Immunol Infect, 2013;46:389-392. doi: 10.1016/j.jmii.2012.03.004. <査読有>

Mitani Y, Ohta K, Yodoya N, Otsuki S, Ohashi H, Sawada H, Nagashima M, Sumitomo N, Komada Y. Public access defibrillation improved the outcome after out-of-hospital cardiac arrest in school-age children: a nationwide, population-based, Utstein registry study in Japan. Europace. 2013; 15: 1259-1266. doi: 10.1093/europace/eut053. <査読有>

Sugimoto N, Miwa S, Tsuchiya H, Hitomi Y, Nakamura H, Yachie A, Koizumi S. Targeted activation of PKA and Epac promotes glioblastoma regression in vitro. Mol Clin Oncol., 2013; 1: 281-285. DOI: 10.3892/mco.2013.65. <査読有>

中村太地、齋藤剛克、中山祐子、橋田暢子、太田邦雄、心房中隔欠損症における心電図所見の検討：下方誘導の notch は有用か、日本小児循環器学会誌 2013; 29:322-327. <査読有>

Yamamoto R, Kawashiri MA, Tada H, Tsubokawa T, Uchiyama K, Konno T, Hayashi K, Saito T, Ohta K, Yachie A, Yamagishi M. Anomalous origin with myocardial bridging in coronary artery: stealth images in computed tomography. J Am Coll Cardiol, 2012; 60: 2419. doi: 10.1016/j.jacc.2012.03.085. <査読有>

Saito T, Ohta K, Nakayama Y, Hashida Y, Maeda A, Maruhashi K, Yachie A. Natural history of medium-sized atrial septal defect in pediatric cases. J Cardiol, 2012; 60: 248-251. doi: 10.1016/j.jjcc.2012.05.005. <査読有>

Saito T, Sugimoto N, Ohta K, Shimizu T, Ohtani K, Nakayama Y, Nakamura T, Hitomi Y, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A. Phosphodiesterase inhibitors suppress Lactobacillus casei cell-wall-induced NF- κ B and MAPK activations and cell proliferation through protein kinase A--or exchange protein activated by cAMPdependent signal pathway. ScientificWorldJournal. 2012; 2012: 748572. doi: 10.1100/2012/748572. <査読有>

〔学会発表〕(計 7件)

齊藤剛克、太田邦雄、「学校検診管理症例の脱落を防ぐ」、第50回日本小児循環器学会、2014年7月5日、岡山コンベンションセンター(岡山県)

杉本直俊、少作隆子、松崎健太郎、片倉賢紀、紫藤治、「低酸素環境下でのがん細胞の動向」、第9回環境生理学プレコングス、2014年3月15日、国民宿舎レイナー桜島(鹿児島県)

太田邦雄、中山祐子、齊藤剛克、谷内江昭宏、「小学校高学年に対する心肺蘇生法教育の可能性」、第48回日本小児循環器学会、2012年7月5日、国立京都国際会議場(京都府)

中村太地、齊藤剛克ほか、「心房中隔欠損における心電図所見の検討 下方誘導のnotchは有用か」、第48回日本小児循環器学会、2012年7月6日、国立京都国際会議場(京都府)

太田邦雄、齊藤剛克ほか、「胎児診断された先天性完全房室ブロック症例の臨床像」、第48回日本周産期・新生児医学会、2012年7月8日、大宮ソニックシティ(埼玉県)

久保達哉、中村太地、中山裕子、橋田暢子、前田顕子、齊藤剛克、太田邦雄、「Williams症候群および類縁疾患の治療方針～SVASおよびPPSの自然歴からの考察～」、第40回北陸小児循環器研究会、2012年9月10日、金沢大学病院(石川県)

杉本直俊、田中真生、澤木俊興、藤田義正、正木康史、梅原久範、「温熱刺激による唾液腺アクアポリンと転写因子の発現調節」、第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会、2012年09月07日、ウエスティン都ホテル京都(京都府)

〔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：
出願年月日：
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

齊藤 剛克 (SAITO, Takekatsu)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：30525035

(2) 研究分担者

太田 邦雄 (OHTA, Kunio)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：00303280

杉本 直俊 (SUGIMOTO, Naotoshi)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：80272954