

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461617

研究課題名(和文)冠動脈プロテオミクス解析による川崎病バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Proteomic exploration of biomarkers for kawasaki disease-associated coronary artery lesions

研究代表者

河井 容子 (Kawai, Yoko)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：60405248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は小児の原因不明の血管炎として知られ、とくに冠動脈は同血管炎の好発部位であり、しばしば冠動脈瘤などの後遺症を伴う。冠動脈病変をより初期段階で検出することは本疾患の冠動脈後遺症を予防する上で極めて重要であり、そのための有用なバイオマーカーの発見が強く望まれている。私たちは、iTRAQ法によるヒト冠動脈と大動脈由来の初代培養内皮細胞の比較プロテオミクス解析を行い、いくつかの小胞体関連蛋白質の発現が冠動脈内皮で低いことを見いだした。この結果は、冠動脈内皮細胞の小胞体ストレス感受性や細胞膜糖蛋白質や分泌蛋白質のグリコーム/プロテオームに同細胞を特徴づける差異がある可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease is a pediatric vasculitis. As coronary arteries are preferential targets for the disease, KD frequently involves coronary artery sequela including aneurysms. Thus it is urgent issue to establish reliable and sensitive biomarker for KD-associated coronary artery. In this study, we conducted comparative proteomics of human endothelial cells derived from the coronary arteries and aorta. As a result, reduced expression was detected in endoplasmic reticulum-associated proteins of the coronary arterial endothelial cells, implying that coronary artery endothelium might be different from that of other vessel in ER-stress sensitivity, glycome of membrane glycoproteins and proteome/glycome of secreted proteins.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 プロテオーム 血管内皮細胞 小胞体ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

川崎病は小児にみられる原因不明の全身性血管炎で、とくに冠動脈は同血管炎の好発部位となり、しばしば冠動脈瘤に代表される後遺症につながる。川崎病冠動脈後遺症については、成年後の心血管イベントのリスクを増加させる可能性が懸念されており、川崎病の原因はもちろんであるが、とりわけ冠動脈炎発症の分子機序解明は臨床上喫緊の課題である。川崎病血管炎にみられる部位特異性を規定する機序については、血行力学的特性や内皮細胞の生物学的差異等が考えられるが、冠動脈内皮の特性に関する体系的な研究はほとんどなされていないため、未だ明らかではない。

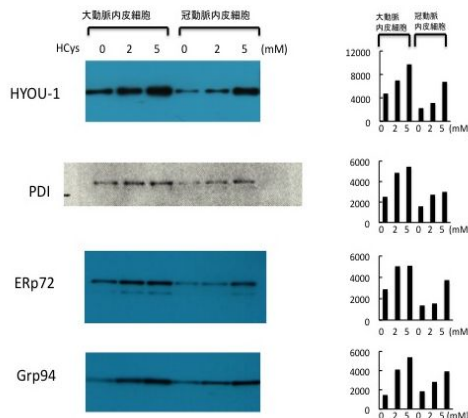
### 2. 研究の目的

冠動脈内皮細胞プロテオーム解析により川崎病における冠動脈内皮傷害の有用なマーカーとなりうる蛋白質を明らかにする。

### 3. 研究の方法

ヒト冠動脈および大動脈内皮細胞初代培養細胞より蛋白質を抽出し、還元アルキル化後、トリプシン処理により断片化した。さらにそれぞれの細胞由来の蛋白質について異なる化学標識を行ったのち LC-MS/MS にて分析した(iTRAQ 法)。得られたデータについてはバイオインフォマティクス的手法により解析した。両細胞間で差異がみられた蛋白質についてはウェスタンブロットングでさらに検証するとともに、ヒト組織標本を用いて免疫組織化学的染色を行った。

Fig1. Homocysteine による小胞体ストレス負荷に対する応答能の比較



### 4. 研究成果

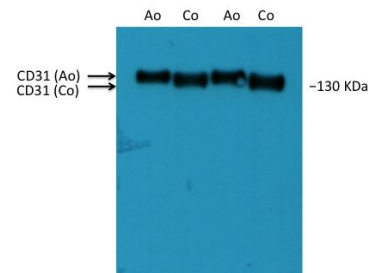
由来部位の異なる初代血管内皮細胞のプロテオミクス解析から以下の知見を得た。

1) 大動脈内皮細胞と比べて冠動脈内皮細胞においていくつかの小胞体関連蛋白質の蛋白質発現量が低値を示した。ホモシステインによる小胞体ストレス負荷によって誘導される主要な小胞体ストレス関連蛋白質蛋白質レベルも冠動脈内皮細胞では大動脈のその約50~70%であった。ヒト組織切片を用いて、小胞体関連蛋白質の

免疫組織化学的検討を行ったが、冠動脈と大動脈の間の発現の差異を検出するのは困難であった。

2) 本研究の過程で血管内皮細胞のマーカー蛋白質として知られる CD31 (PECAM1) の SDS-PAGE 上での移動度に冠動脈由来内皮細胞と大動脈由来内皮細胞の間で差異があることを見いだした。PNGase 処理および 0-glycosidase 処理によってもその差異に変化がないことから、糖鎖修飾の違いに起因するものではないと考えられる。また phos-tag を用いた分析から、リン酸化の違いによる可能性は低いと考えられる。

Fig2. 大動脈内皮細胞(Ao)と冠動脈内皮細胞(Co)間のCD31の比較



3) 私たちは、得られた定量的プロテオミクスデータを、委託したバイオインフォマティクス解析とは別の方法で独自に解析した。その結果、まだ予備的データではあるがあらたに CD93 の発現量に量細胞間で差異が認められた。CD93 については今後さらに研究を進めて行く予定である。

### (まとめ)

冠動脈内皮に特異的な蛋白質を見いだすには至らなかったが、小胞体関連蛋白質群の発現が小胞体ストレス誘導の有無によらず大動脈と比較して低いことは、冠動脈内皮細胞の小胞体ストレスに対する脆弱性を示唆する。同時に今回の結果から分泌蛋白質や細胞膜の糖蛋白質に冠動脈内皮細胞を特徴づける知見が見いだされる可能性もあると考えている。今後、各種血管由来の内皮細胞のセクレトームあるいは細胞膜画分のグライコム/プロテオームの分析を行い、冠動脈内皮を特徴づけるマーカーの探索を計画している。また由来血管の違いによる内皮 CD31 の生化学的差異については、川崎病を含む血管病態に関連する各種疾患患者由来のマイクロパーティクルのプロテオーム解析によりその臨床的意義が見いだされる可能性が期待出来ると考える。

### 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 5 件)

久保慎吾, 糸井利幸, 西川幸佑, 森下祐馬, 浅田大, 河井容子, 池田和幸, 中川由美,

西田眞佐志, 濱岡建城  
Hemoscope(R)による 3DCT 画像の CFD (computational fluid dynamics) 解析  
PROGRESS IN MEDICINE 35: 1182-1186, 2015. (査読なし)

池田和幸, 鈴木千夏, 八幡倫代, 朽津有紀, 岡本亜希子, 小澤誠一郎, 松尾憲典, 足立晋介, 内藤岳史, 濱岡建城  
京都地区におけるステロイド初期併用療法の効果検証 PROGRESS IN MEDICINE 36(7): 863-869, 2016. (査読なし)

Suzuki C, Nakamura A, Miura N, Fukai K, Ohno N, Yahata T, Okamoto-Hamaoka A, Fujii M, Yoshioka A, Kuchitsu Y, Ikeda K, Hamaoka K.  
Non-receptor type, proline-rich protein tyrosine kinase 2 (Pyk2) is a possible therapeutic target for Kawasaki disease.  
Clin Immunol. 2017 ;179:17-24.  
(査読あり)

Ito F, Ito T, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Hamaoka K. The Application of a Modified d-ROMs Test for Measurement of Oxidative Stress and Oxidized High-Density Lipoprotein. Int J Mol Sci. 2017 Feb 21;18(2). pii: E454. doi: 10.3390/ijms18020454.  
(査読あり)

Ikeda K, Mizoro Y, Ameku T, Nomiya Y, Mae SI, Matsui S, Kuchitsu Y, Suzuki C, Hamaoka-Okamoto A, Yahata T, Sone M, Okita K, Watanabe A, Osafune K, Hamaoka K. Transcriptional Analysis of Intravenous Immunoglobulin Resistance in Kawasaki Disease Using an Induced Pluripotent Stem Cell Disease Model.  
Circ J. 2016 ;81:110-118.  
(査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

鈴木千夏, 中村明宏, 沖垣光彦, 三浦典子, 大野尚仁, 八幡倫代, 岡本亜希子, 吉岡綾子, 朽津有紀, 池田和幸, 濱岡建城  
血管新生抑制をターゲットとした川崎病治療の可能性～川崎病モデル動物を用いた検討 第 36 回日本川崎病学会学術集会. 2016.9.30-10.1. ワークピア横浜. 横浜.

渡辺幸典, 西田眞佐志, 西川幸佑, 森下祐馬, 久保慎吾, 梶山葉, 河井容子, 中川由美, 池田和幸, 奥村謙一, 糸井利幸, 浜岡建城 成人期に達した先天性心疾患患者における腎障害の検討.  
第 51 回日本小児腎臓病学会学術集会 2016.7.7-7.9. ウィンクあいち. 名古屋市

西田眞佐志, 川勝秀一, 西川幸佑, 森下祐

馬, 久保慎吾, 渡辺幸典, 梶山葉, 河井容子, 中川由美, 池田和幸, 奥村謙一, 糸井利幸, 浜岡建城  
小児腎疾患および先天性心疾患患者における尿中 L-FABP の意義  
第 51 回日本小児腎臓病学会学術集会 2016.7.7-7.9. ウィンクあいち. 名古屋市

西川 幸佑, 森下 祐馬, 久保 慎吾, 浅田大, 河井 容子, 池田 和幸, 中川 由美, 糸井 利幸, 浜岡 建城  
アントラサイクリン系薬剤を使用した小児がん患者の Tissue Mitral Annular Displacement(TMAD)による心機能評価.  
第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2015.7.15-17 ホテル日航東京 東京都港区

Suzuki C, Nakamura A, Okigaki M, Miura N, Ohno N, Yahata T, Okamoto A, Yoshioka A, Kuchitsu Y, Ikeda K, Hamaoka K. Involvement of Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) in Kawasaki disease-like murine vasculitis.  
49<sup>th</sup> Annual meeting of European Paediatric and Congenital Cardiology. May 20-23 2015, Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic.

鈴木千夏, 八幡倫代, 岡本亜希子, 吉岡綾子, 朽津有紀, 中村明宏, 池田和幸, 濱岡建城  
川崎病におけるずり応力惹起血小板凝集能測定の臨床的意義  
第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2015.7.15-17 ホテル日航東京 東京都港区

池田和幸, 鈴木千夏, 八幡倫代, 朽津有紀, 岡本亜希子, 濱岡建城  
血小板凝集能測定による川崎病冠動脈後遺症例に対する dual antiplatelet therapy (DAPT) の有用性の検討  
第 51 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2015.7.15-17 ホテル日航東京 東京都港区

〔図書〕(計 0 件)

なし  
〔産業財産権〕  
なし  
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 河井 容子  
(KAWAI Yoko)  
京都府立医科大学医学部附属病院・専攻医  
研究者番号：60405248

(2)研究分担者 池田 和幸  
(IKEDA Kazuyuki)  
京都府立医科大学大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30507786

研究分担者 中村 明宏  
(NAKAMURA Akihiro)  
京都府立医科大学大学院医学研究科・博士  
研究員  
研究者番号 50313854

研究分担者 濱岡 建城  
(HAMAOKA Kenji)  
京都府立医科大学大学院医学研究科・教授  
研究者番号 60189602  
(削除：平成 28 年 3 月 22 日)