

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860814

研究課題名(和文)川崎病血管炎における冠動脈後遺症発症の機序の解明

研究課題名(英文) In vitro analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin and prednisolone for the prevention of coronary artery abnormalities in Kawasaki disease.

研究代表者

上野 健太郎 (Ueno, Kentaro)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20644892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病における内皮細胞の生存傷害と免疫グロブリン(IG)、ステロイド(PSL)の役割、冠動脈後遺症(CAA)の関連性を検討した。HUVEC培養細胞を患者血清で刺激し、薬剤非投与群、PSL群、IG群(IG)、PSL+IG群の4群に分類し各種実験を行った。川崎病群では細菌感染群と比較し、細胞死に関わる細胞毒性、caspase3/7活性、HMGB-1値が有意に上昇し(P<0.001)、細胞生存シグナルであるAktのリン酸化が抑制されていた(P=0.023)。IG投与で細胞死に関わる因子は低下し、リン酸化Aktの上昇がみられた。細胞毒性の増加とリン酸化Aktの減少はCAA発症に有意な関連性を示した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to evaluate the pathogenic role of cell survival and death in in vitro model of Kawasaki disease (KD) vasculitis. KD patients (42) and febrile patients (10 as controls) were analyzed. HUVECs were stimulated with sera from patients with KD were left untreated or treated with immunoglobulin (IG) and/or prednisolone (PSL). Loss of viability in patients with KD were observed compared to controls (P<0.001). Relative levels of cytotoxicity, caspase-3/7 activity and HMGB-1 were significantly higher in KD compared to controls (P<0.001, respectively), while significant decrease in phosphorylated Akt/Akt ratio was observed (P=0.023). The increased cytotoxic effects and decreased phosphorylated p-Akt/Akt ratio were closely associated with CAA (P = 0.002 and P = 0.032, respectively). Furthermore treatment with IG significantly reduced the relative levels of cytotoxicity, caspase 3/7 activity and increased levels of p-Akt/Akt ratio on cultured HUVECS in KD (P < 0.001, respectively).

研究分野：小児循環器学

キーワード：川崎病 血管炎 細胞傷害 細胞生存 アポトーシス 免疫グロブリン ステロイド

### 1. 研究開始当初の背景

川崎病は小児に発症する全身性の血管炎で、冠動脈後遺症をきたすことが重大な問題である。免疫グロブリン大量療法 (IVIG) 等の治療でその頻度は減少しているが、まだ数%に後遺症がみられる。そこで難治例に初期治療としてのIVIG + プレドニゾロン (PSL) は冠動脈後遺症の発症を抑え、追加治療が必要な患児を減らすという結果が得られ、その有用性が示された。血管炎炎症部位では炎症に伴う内皮細胞の変化 (血管透過性の調節、細胞増殖、血液凝固・溶解作用、細胞外マトリックス産生、脂質代謝作用) とともに、機械的刺激に伴う変化 (ずり応力や伸展作用) も作用していると考えられる。同時に強い炎症の下では、細胞は傷害を起こし細胞死が誘導され、細胞傷害に伴う組織因子や接着因子が放出され、血栓形成が助長される。川崎病血管炎ではこれらの炎症に伴う作用が、細胞の生存と死の均衡を保つことで冠動脈後遺症の発症を抑えられ、この均衡が崩れると冠動脈後遺症が発症に関与しているものと考えられる。

### 2. 研究の目的

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞培養細胞 (HUVEC) を用いて、川崎病患児の血清 (IVIG 前) を添加し、内皮細胞の生細胞率、細胞死 (apoptosis、necrosis) の評価、細胞生存シグナルの評価 (Akt、リン酸化 Akt)、非ヒストン核タンパク質である HMGB-1 (high mobility group box protein1)、加えて川崎病患児の臨床経過、検査結果、冠動脈後遺症との関連性を後方視的に検討する。また免疫グロブリン製剤、ステロイド製剤がどのように冠動脈後遺症発症の抑制に寄与しているかを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 鹿児島大学病院、鹿児島市立病院で入院加療された川崎病患児、有熱性細菌感染患児で、その両親へ本研究に関する説明を行い、家族の同意が得られた川崎病患児42例 (IVIG

反応群: 32例、IVIG不応群: 10例)、有熱性細菌感染患児10例を対象とした。臨床検査値による重症度評価はGunmaスコア

(Kobayashi et al. Circulation 2006; 113: 2606-) で行った。川崎病患児は心エコー検査を治療開始時に施行し、その後も週2-3回繰り返して施行し、左右冠動脈径の測定を行った。冠動脈の正常径を、それを基に患児の各冠動脈のzスコアによる評価も行った。Fuseらの方法で計算し(Ogata S. et al. Int J Cardiol. 2013;168:3825-8)、発症1か月時点での冠動脈zスコアの最大値が2.5を超えるものをCAAと定義した。

(2) 川崎病患児 (IVIG前) (KD群)、抗菌薬投与前の有熱性細菌感染患児 (コントロール群) の血清を用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) への反応を行った。HUVEC (第3-4継代) に7.5%患者血清を用いて24時間刺激をした。次に刺激された細胞を薬剤非投与群、プレドニン投与群 ( $10^{-6}$ M) (PSL)、免疫グロブリン投与群 (20mg/dl) (IG)、プレドニン + 免疫グロブリン投与群 ( $10^{-6}$ M+20mg/dl) (PSL+IG) の4群に分類し、さらに24時間培養した。2群間の平均値の差はMann Whitney U検定で比較し、頻度の差の検定はFisherの直接確率検定法を用いて検討した。

(1) 生細胞率 (Proliferation): MTT assay (Dojindo, Kumamoto, Japan)

(2) 細胞傷害の評価 (Cytotoxicity): MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (dead cell protease) (Promega, USA) & High Mobility Group Box1 (HMGB1) (ELISA; (Shino-Test Corporation, Tokyo, Japan))

(3) 細胞のアポトーシス評価 (Apoptosis assay): Caspase-Glo 3/7 assay

(relative fluorescence intensity) (Promega, USA) & fluorescent microscopy (CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent assay; Invitrogen, Carlsbad, CA)

- (4) 細胞外基質への影響 ( matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ) : ELISA
- (5) 細胞生存へのシグナル ( Survival signaling ) : Akt phosphorylation in Western blotting

#### 4 . 研究成果

結果 1 :

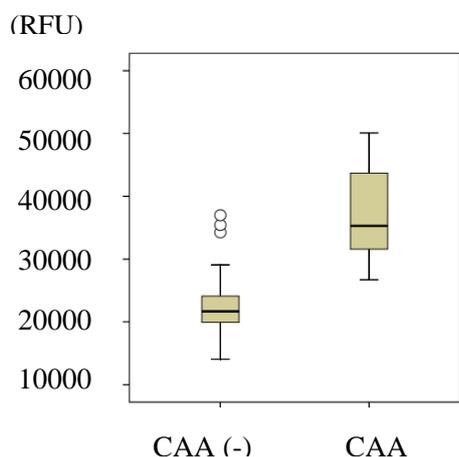
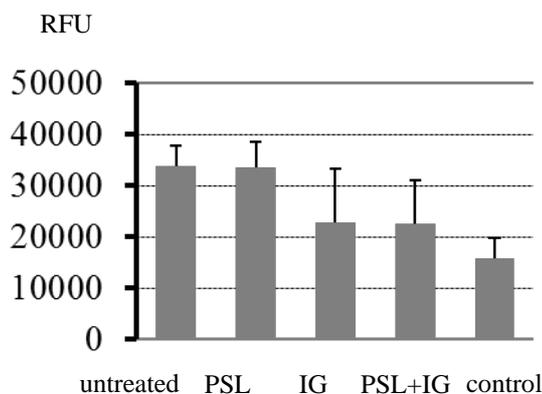
Group	Kawasaki disease (n = 42)	Bacterial infection (n = 10)
Male, N (%)	20 (47.6)	5 (50.0)
Age (years)	1.7 (0.8-2.9)	1.4 (0.9-2.1)
Body weight (kg)	10.2 (8.4-14.3)	9.6 (8.2-11.7)
Days of fever	4.0 (3.0-6.0)	4.0 (3.0-4.8)
WBC (x10 <sup>3</sup> /μl)	13.5 (11.0-16.0)	14.4 (11.2-16.5)
Neutrophil count(x10 <sup>3</sup> /μl)	9.0 (6.8-1.1)	10.1 (9.0-1.3)
Ht (%)	33.4 (31.9-35.4)	35.2 (31.7-37.9)
Platelet count (×10 <sup>4</sup> /μl)	35.2 (29.0-43.3)	36.5 (33.9-43.3)
AST (IU/L)	39 (26-108)	35 (28-55)
ALT (IU/L)	23 (15-122)	20 (13-48)
LD (IU/L)	309 (268-357)	293 (237-425)
T.P (g/dl)	6.6 (6.2-6.9)	6.7 (5.6-7.7)
Alb (g/dl)	3.7 (3.4-4.0)	3.9 (3.7-3.9)
Na (mEq/L)	134 (133-136)	137 (135-140)
CRP (mg/dl)	6.1 (4.3-9.3)	6.8 (5.6-8.8)

川崎病患児と有熱性細菌性疾患患児との比較

では男女比、年齢に差はなかった。WBC数、好中球数、CRP値にも有意差はなく、血清Na値にのみ有意差がみられた。

結果 2 : HUVEC ( 第3-4継代 ) に7.5%濃度のIVIG前川崎病患児血清と抗菌薬投与前の有熱性細菌感染患児の血清を用いて24時間刺激をした。MTT assayを用いて比較したところ、川崎病患児血清で刺激した群で有意に生細胞が減少していた ( P < 0.001 ) 。

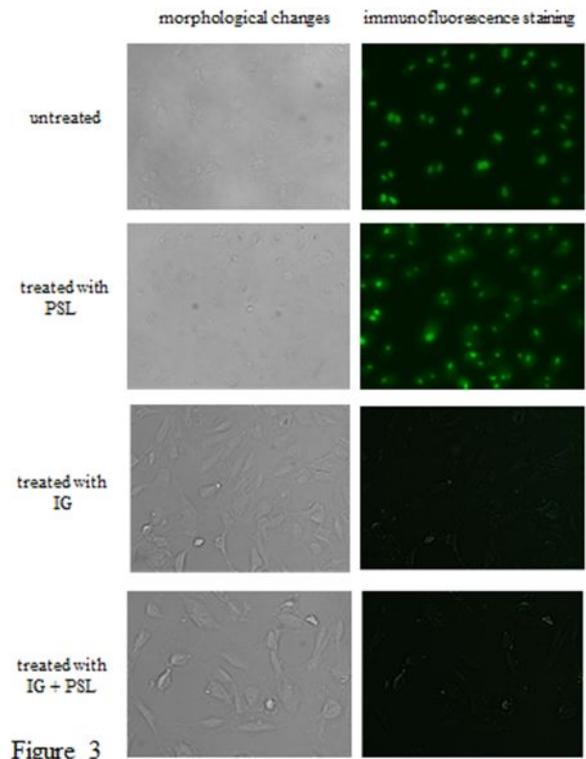
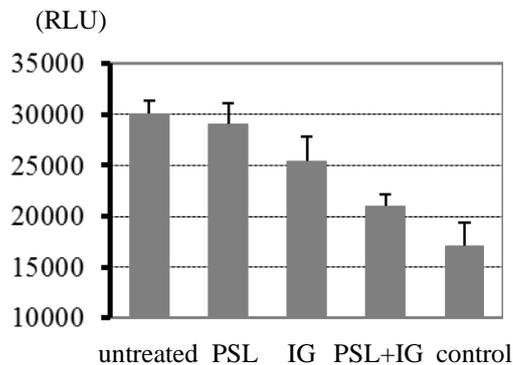
結果 3 : Cytotoxicity assay ( dead protease assay; necrosis)を施行した。KD群ではコントロール群と比較して相対的RFUの上昇を認めた ( median 28,607 vs. 12,744、P<0.001)。KD群における cytotoxicity活性は。薬剤費投与群、PSL群で差はなかったものの、IG群、IG+PSL群で有意に抑制された。KD n=27, control n=6。



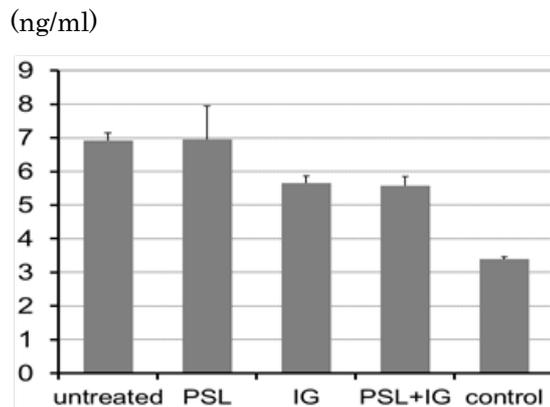
また相対的cytotoxicity値は、冠動脈後遺症 ( CAA )群で有意に高値であった ( P=0.002)。

結果 4 - 1 : 吸光度計を用いてcaspase-3/7の相対発光量を測定したところ、KD群ではコントロール群と比較して相対的RLUの上昇を認めた (median 28,688 vs. 16,745、 $P<0.001$ )。KD群における caspase-3/7活性は、薬剤費投与群、PSL群で差はなかったものの、IG群、IG+PSL群で有意に抑制された。PSL単独では薬剤非投与群と比較して Caspase活性に差はなかった。IG投与群では Caspase活性が有意に抑制され、さらにIG+PSL併用群で抑制効果は増大した (KD  $n=27$ , control  $n=6$ ,  $P<0.001$ )。

結果 4 - 2 : 蛍光顕微鏡での Caspase3/7活性では、PSL単独では薬剤非投与群と比較して Caspase活性の抑制はみられなかった。IG投与群では Caspase活性が有意に抑制された



結果 5 : HMGB-1値は、KD群でコントロール群と比較して有意に高値であった (median 5.8 vs. 3.3 ng/ml,  $P<0.001$ )。HMGB-1値はPSL単独では薬剤非投与群と比較して差はなく、IG投与群および併用群で有意に減少した ( $P=0.038$  and  $P=0.007$ )。



結果 6 : 細胞生存シグナルである Aktのリン酸化について評価した。

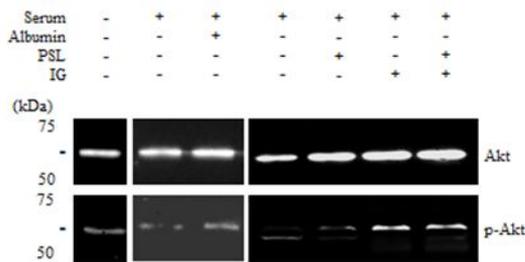


Figure 6A

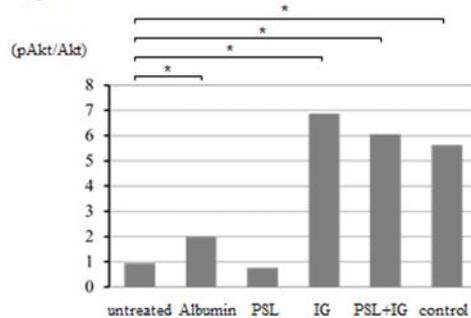


Figure 6B

p-Akt/Akt値はKD群でコントロール群に比較して有意に高値であった ( $P=0.0025$ )。

p-Akt/Akt値はPSL単独では薬剤非投与群と比較して差はなく、IG投与群および併用群で有意に減少した ( $P=0.019$  and  $P=0.024$ )。

#### 考案

川崎病血管炎 (KD) のin vitroモデルでは内皮細胞の生細胞率は有熱性細菌感染群 (コントロール群) と比較し、KD群が有意に減少しており、その原因として細胞毒性に伴う内皮細胞障害 (ネクローシス) やアポトーシスが関与していると考えられた。川崎病患者血清中には様々なサイトカイン、ケモカインが含まれており、それらが直接的な細胞傷害に関与している可能性が示唆された。

またHMGB-1は川崎病で有意に上昇していた。HMGB1は、炎症刺激に伴う様々な細胞死から、循環血液中に受動的に分泌され、NF $\kappa$ Bの活性化、炎症性サイトカイン産生をきたす。全身性のHMGB1の上昇は、更なる炎症の悪化をきたし、悪循環が形成される。HMGB-1は、川崎病血管炎における炎症の遷延化の一因として関連している可能性が示唆された。細胞生存シグナルに関しては、KD群ではコン

トロール群と比較して有意にAktのリン酸化が抑制されるが、免疫グロブリン投与でAktのリン酸化は誘導されることが分かった。細胞保護効果があると共に抗細胞死に寄与していると考えられた。

川崎病冠動脈後遺症 (CAA) は、cytotoxicity (ネクローシス) の増加やリン酸化Aktの減少と強い相関を示した。川崎病では急性期に内皮細胞の細胞傷害を起こし、また細胞生存シグナルが抑制されたことを考えると、細胞の生存と障害の適応的な動的均衡が破綻することにより、長期に及びリモデリングが起こり構造的、機能的な障害が発生すると考えられた。

一方、ステロイドに関しては、アポトーシス促進作用、抗アポトーシス作用ともに報告されており、いまだ議論の余地があると考えられている。今回の内皮細胞の生存・傷害の検討では、プレドニンの効能や免疫グロブリンとの相乗効果に関しては、新たな知見を得ることはできなかった。

#### 結語

川崎病では、急性期に血管炎に伴う内皮細胞障害/細胞死が誘導され、細胞生存シグナルであるAktのリン酸化が抑制される結果、細胞の生存と障害の動的均衡が破綻すると考えられ、冠動脈後遺症発症に深く関与していると考えられた。

川崎病における免疫グロブリンの作用機序の一つとして、急性期の細胞障害、アポトーシスを抑制し、リン酸化Aktを誘導する働きがあり、血管内皮細胞の恒常性の維持、細胞保護効果に関与していると考えられた。

#### 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 15 件)

1. Kentaro Ueno, Yuichi Nomura, Yasuko Morita, Taisuke Eguchi,

Kiminori Masuda , Yoshifumi Kawano., Circulating Platelet-Neutrophil Aggregates Play a Significant Role in Kawasaki Disease., Circ J. Vol.79, pp.1349-1356 (2015)( 査読あり )

2. Nakae K, Ueno Kentaro, Kawamura J, Yanagimoto K, Eguchi T, Nomura Y, Kakihana Y, Kawano Y. Mechanical circulatory support as a potentially useful strategy in patients with severe cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. Med J Kagoshima Univ 11: 41-50 (2015) ( 査読あり )
3. 中崎奈穂、上野健太郎、江口太助、野村裕一、河野嘉文、奥章三、学校心臓検診でスクリーニングされた肺高血圧症を伴う先天性右肺動脈欠損の1例、小児科診療, Vol.68, No.3, pp.451-455 (2015). ( 査読あり )
4. Yanagimoto K, Nomura Y, Masuda K, Hirabayashi M, Morita Y, Yoshishige M, Ueno K, Eguchi T, Kawano Y. Immunoglobulin G values before treatment are correlated with the responsiveness to initial intravenous immunoglobulin therapy for Kawasaki disease. International Archives of Allergy and Immunology 2014; 164: 83-88 ( 査読あり )

[学会発表](計16件)

1. Ueno K, Nomura Y, Morita Y, Eguchi T, Masuda K, Kawano Y. Circulating platelet-neutrophil aggregates play a significant role in Kawasaki disease. Eleventh International Kawasaki Disease Symposium, Honolulu, United States, 2015.02.03-02.06.
2. 上野健太郎, 二宮由美子, 柳元孝介, 江口太助, 野村裕一, 河野嘉文, 中江広治,

森田康子, 益田君教. 川崎病血管炎における血小板好中球複合体の関与の検討. 第50回日本小児循環器学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市) 2014.07.03-07.05

3. 上野健太郎, 二宮由美子, 江口太助, 野村裕一, 河野嘉文, 松葉智之, 重久喜哉, 井本 浩. Valsalva 洞に起始する体肺側副動脈を有した肺動脈閉鎖、心室中隔欠損、主要体肺側副動脈の22q11.2欠失症候群の1例. 第50回日本小児循環器学会総会・学術集会 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市) 2014.07.03-07.05
4. Ueno K, Kawaminami K, Miyahara E, Morita Y, Ninomiya Y, Yanagimoto K, Eguchi T, Masuda K, Nomura Y, Kawano Y. In vitro analysis of the mechanisms of intravenous immunoglobulin and prednisolone for the prevention of coronary artery abnormalities in Kawasaki disease. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology, Helsinki, Finland, 2014.05.21-05.24

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

上野 健太郎 (KENTARO UENO)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属  
病院助教

研究者番号：20644892