

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10079

研究課題名(和文)川崎病におけるエクソソームmicroRNAの研究：新たな診断法、治療に向けて

研究課題名(英文)A role of exosomal micro RNA in Kawasaki disease

研究代表者

大橋 隆治(Ohashi, Ryuji)

日本医科大学・医学部・大学院教授

研究者番号：00328783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病における血管炎と慢性期血管病変の機序解明のため、血管炎マウスモデルの心臓血管組織、ヒト川崎病の冠動脈組織を用いて、エクソソーム由来miRNAの出現、浸潤マクロファージの形質(M1/M2 macrophage)について検討した。エクソソーム由来miRNAの役割に関しては、手技的問題、限られたヒトのサンプル数により、結論を導くには至らなかった。一方、川崎病と成人動脈硬化の血管病変の比較では、川崎病ではM1マクロファージが優位となる一方、成人の動脈硬化ではM2が優位であるなど異なる形質を認めた。川崎病慢性期では、成人動脈硬化とは異なる発症機序により血管硬化病変が起こっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病は、乳幼児に見られる原因不明の全身性血管炎である。合併症として急性期の冠動脈炎が知られているが、成人後も動脈瘤、動脈硬化などの後遺症を残す。今回、川崎病慢性期の冠動脈血管壁内に浸潤した炎症細胞に含まれるマクロファージの形質(M1/M2 macrophage)を成人の動脈硬化病変と比較したところ、成人の動脈硬化ではM2が優位であったのに対し、川崎病ではM1が優位であった。この結果は、川崎病慢性期の血管病変の進展機序が、成人動脈硬化とは異なることを示唆している。今後、川崎病血管病変の発症機序解明への道が拓けると思われる。

研究成果の概要(英文)：To explore mechanisms in development of vascular lesions in Kawasaki Disease (KD), a role of exosomal micro RNA (miRNA) and phenotypes of macrophages into vascular walls were investigated. Although exosome levels appeared to be increased in serum of mouse models with arteritis, we were unable to achieve the conclusive results on roles of exosomal miRNA in human KD due to the limited number of samples and technical difficulties. In assessment of macrophage phenotypes in histological sections of the coronary arteries from human KD, the proportion of M1 phenotype, detected by CD86 or SOCS3, was higher in KD than in adult patients with atherosclerosis. In contrast, the proportion of M2, detected by CD163 or MRC1, was higher in atherosclerosis. We conclude that despite histological similarities between KD and atherosclerosis, these two diseases have a different immunological etiology for progression of the chronic vascular lesions.

研究分野：病理学

キーワード：川崎病 血管炎 マクロファージ 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

川崎病は、原因不明の心血管炎で、乳幼児を中心に毎年約1万人の新規発症がある。主な合併症として、冠動脈炎が知られている。薬物治療により、これらの急性期炎症反応は一時的に抑制できるが、約5%の患者は成人後も動脈瘤、動脈硬化、虚血性心疾患などの心後遺症を残す。今日まで、川崎病についての研究は多いが、急性期後の慢性期血管病変発症の機序についての研究は限られている。その為、川崎病罹患後の心血管系の後遺症を抑制する決定的な治療法もまだ見つかっていない。Micro(mi)RNAは、細胞内で標的 mRNA に結合することにより作用し、様々な疾患制御に関与している。細胞は、自ら産生するエクソソームに miRNA を内包し、細胞外に放出することにより、細胞間のコミュニケーションを行っている。心血管系においては、エクソソームは心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞から分泌され、細胞間の情報伝達手段として機能しており、miRNA を内包するエクソソームは心血管系疾患の新しい治療標的、及び創薬ターゲットとして注目されている。例えば、ヒト臍帯動脈内皮細胞にずり応力刺激を加えると、miRNA (miR-143/145)が増加し、共培養した平滑筋細胞に取り込まれて、アテローム形成に関与する遺伝子の発現を抑制する。さらに、この miRNA (miR-143/145) を含んだエクソソームを動脈硬化モデルマウスに投与すると、動脈硬化病変の形成が抑制されたという。これらの結果は、エクソソームが心血管関連疾患の病態に深く関与していることを示唆している。

研究代表者の大橋は、培養血管平滑筋、血管内皮細胞を用いて、動脈硬化、冠動脈病変の進展のメカニズムについて報告してきた(大橋隆治 Cardiovasc Res 70(1):146-157, 2006, J Surg Res 133(2):89-94, 2006)。また、研究分担者の深澤は、川崎病に罹患した患者の冠動脈では、成人後に動脈硬化のリスクが高まることや、急性期冠動脈炎に対し免疫グロブリン製剤とステロイド剤投与の効果を検討してきた(深澤隆治 Lancet 2012; Apr28;379:1613-20, Curr Opin Pediatr 2010; 22(5):587-92)。我々は最近、Candida Albicans Water Soluble Fraction(CAWS)を投与してヒト川崎病との類似性が極めて高いと考えられる冠動脈炎モデルマウス(CAWS モデル)を作製し、TNF- α の阻害剤である、etanercept を投与することにより、血管炎が軽減できることを報告した(大橋隆治、Int J Vasc Med, p.1-10, 2013)。本研究では、ヒト川崎病検体、冠動脈炎モデルマウスを使用して、慢性期の動脈硬化病変発展の機序を明らかにする。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では川崎病の新しい診断法や治療薬開発などの臨床応用に展開するための基盤研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

1) CAWS マウスモデルの心血管組織、および、ヒト川崎病患者由来の冠動脈組織を用いて、エクソソーム由来 miRNA の網羅的スクリーニングを施行し、血管炎、心血管病変に関与している候補 miRNA を選出、ヒト検体での発現を評価する。

2) 慢性期で硬化性変化を呈するヒト川崎病患者由来の冠動脈組織を用いて、動脈硬化病変進展の機序を明らかにする。特にマクロファージ(M1/M2 macrophage)を中心とする炎症細胞がどのように関与しているかを検証する。

3. 研究の方法

マウス血管炎モデルの作製

4-5 週齢の DBA/2 系マウス(日本 SLC 株式会社)を用い、*Candida albicans* 培養液中の可溶性多糖体分画(CAWS)1mg/mouse を腹腔内に 5 日間投与し血管炎を作成する(大橋隆治、Int J Vasc Med, p.1-10, 2013)。血管炎惹起後(4 週間後)、マウスを sacrifice して心、冠動脈組織を採取、凍結化する。

ヒト川崎病患者からの血清、冠動脈組織の準備

当院小児科で川崎病と診断され、その後のフォローアップ中に、巨大な冠動脈溜を形成して、coronary bypass 術を施行した患者の冠動脈組織を使用する。川崎病患者の血清は、当院小児科で外来受診した川崎病患者から提供して頂く。

血管炎モデルマウス、および川崎病患者から採取した組織検体、血清、尿より、抽出キット(Qiagen)を用いてエクソソーム抽出する。エクソソームから、microRNA 抽出キット(ambion)を用いて、miRNA を抽出する。分泌型 miRNA とエクソソーム由来 miRNA の比較を行う。

当院小児科で川崎病と診断され、その後、巨大な冠動脈溜を形成したため、coronary bypass 術を施行した患者の冠動脈組織を使用して以下の実験を行った。

冠動脈組織検体を使用して、エクソソームマーカー(CD63) や組織球マーカー(Mac-2)を使用し、エクソソームの主たる由来細胞の確認を行う。同時に、マクロファージの phenotype(M1/M2) が川崎病の動脈硬化病変発症にどのように関与しているか、成人の大動脈硬化病変組織と比較する。

4. 研究成果

1) Preliminary study として、マウス血管炎モデル 3 匹の血清、心臓組織からエクソソーム抽出を試みた。正常マウスの血清と比較して、エクソソームの増加傾向が見られた(図 1)。この後、匹数を増やして行ったが、2,3 回目以降の実験では結果がばらつくなど、再現性のある有意な結果が得られなかった。心臓組織からもエクソソーム抽出したが、degradation が強く、再現性ある結果とはならなかった。当院小児科で外来受診した川崎病患者数名から得た血清に対しても同様に再現性ある結果が得られなかった。その後、患者数を増やして行うことも検討したが、家族から同意を得ることができず、断念した。

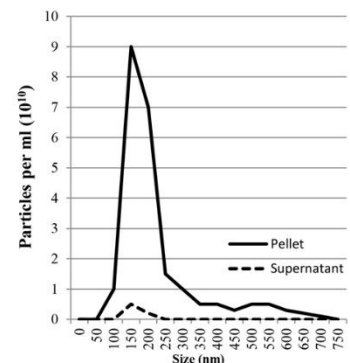


図1 血管炎マウス血清におけるエクソソーム出現

2) 慢性期川崎病患者の冠動脈組織(n=5)と、成人の大動脈硬化病変組織(n=8)を使用し、マクロファージの形質(M1/M2)を検証することにより、動脈硬化病変の進展機序を比較した(文献参照)。組織学的に、慢性期川崎病患者の冠動脈組織のほとんどには、成人の大動脈硬化病変に類似した膠原線維の増生による内膜肥厚、中膜の菲薄化、弾性板の断裂が見られることに加えて、種々の

程度の炎症細胞浸潤が血管壁に認められた(図2、EMG染色)。免疫染色による検討では、CD68陽性汎マクロファージは、川崎病、成人動脈硬化群ともに認められたが、細胞数は成人動脈硬化群で有意に多かった。マクロファージの形質(M1/M2)を

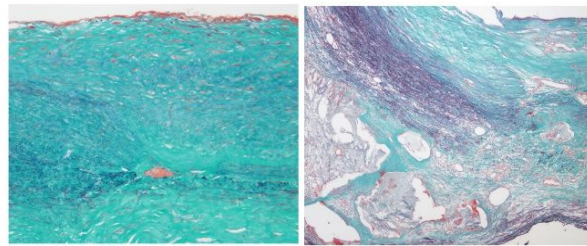


図2 川崎病冠動脈 成人動脈硬化

血管の内膜、中膜、外膜の3層にて、CD86、SOCS3 (M1 marker)とCD163、MRC1(M2 marker)陽性細胞数で評価した。川崎病群では、M1の比率が高かったが、成人動脈硬化群ではM2マクロファージが優位であった(図3,4,5)。

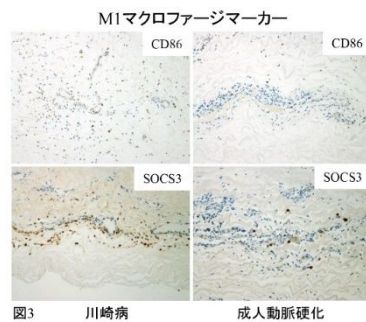


図3 川崎病 成人動脈硬化

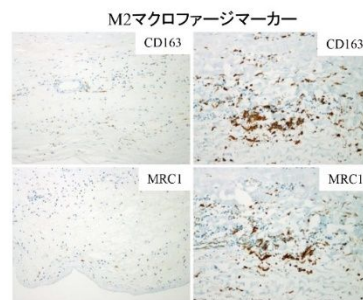


図4 川崎病 成人動脈硬化

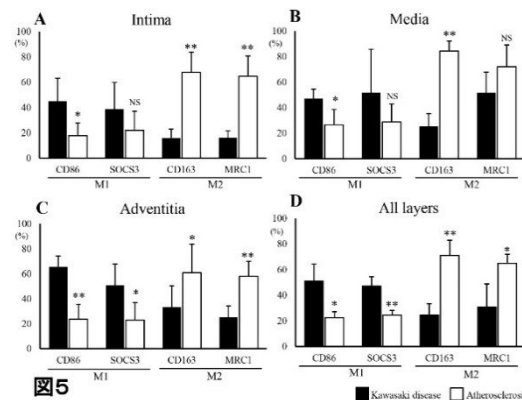


図5

■ Kawasaki disease □ Atherosclerosis

まとめ

当初の目的として掲げた川崎病血管炎におけるエクソソームの役割に関しては、手技的問題、患者から十分な数のサンプルを得ることができないなどの理由から、期待通りの結果を得ることができなかった。

慢性期川崎病患者のうち巨大動脈瘤を来した症例と、川崎病の既往のない成人動脈硬化例の血管壁におけるM1/M2マクロファージ比率を、免疫組織化学染色的手法にて比較した。川崎病群と非川崎病群の血管病変には、組織学的に類似点があるものの、異なるM1/M2マクロファージ比率を認めた。これらの結果は、川崎病慢性期の血管病変の発症機序が、通常の動脈硬化とは異なる可能性を示している。今後、動物モデルや人標本を用いた検討が必要であると思われる。

文献) [Ohashi R, Fukazawa R, Shimizu A, Ogawa S, Ochi M, Nitta T, Itoh Y. M1 macrophage is the predominant phenotype in coronary artery lesions following Kawasaki disease. \(2019\) Vascular Medicine Oct 17:1358863X19878495. doi: 10.1177/1358863X19878495. \[Epub ahead of print\].](#)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohashi R, Fukazawa R, Shimizu A, Ogawa S, Ochi M, Nitta T, Itoh Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 M1 macrophage is the predominant phenotype in coronary artery lesions following Kawasaki disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vascular Medicine	6. 最初と最後の頁 484-492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1358863X19878495.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchimura R, Ueda T, Fukazawa R, Hayakawa J, Ohashi R, Nagi-Miura N, Ohno N, Migita M, Itoh Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 Adipose tissue-derived stem cells suppress coronary arteritis of Kawasaki disease in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 14-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14062.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki K, Sasaki T, Kunugi S, Shima Y, Fukazawa R, Shimizu A, Nitta T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Resection of Kommerell's diverticulum in an infant with prenatal diagnosis of right aortic arch.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40792-019-0726-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe M, Fukazawa R, Ogawa S, Ohkubo T, Abe M, Hashimoto K, Hashimoto Y, Itoh Y.	4. 巻 75
2. 論文標題 Virtual histology intravascular ultrasound evaluation of coronary artery lesions within 1 year and more than 10 years after the onset of Kawasaki disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cardiol	6. 最初と最後の頁 171-176.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2019.06.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Y, Fukazawa R, Nagi-Miura N, Ohno N, Suzuki N, Katsube Y, Kamisago M, Akao M, Watanabe M, Hashimoto K, Tsuno K, Matsui R, Itoh Y.	4. 巻 86
2. 論文標題 Interleukin-1beta Inhibition Attenuates Vasculitis in a Mouse Model of Kawasaki Disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch	6. 最初と最後の頁 108-116.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2019_86-206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 深澤隆治、小川俊一	4. 巻 76
2. 論文標題 中型血管炎 川崎病 川崎病の診断	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 183-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura M, Kobayashi T, Fukaza R et al	4. 巻 5
2. 論文標題 Association of Severity of Coronary Artery Aneurysms in Patients With Kawasaki Disease and Risk of Later Coronary Events.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JAMA Pediatr	6. 最初と最後の頁 180030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1001/jamapediatrics.2018.0030. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukazawa R, Kobayashi T et al.	4. 巻 82
2. 論文標題 Infliximab for the Treatment of Refractory Kawasaki Disease: A Nationwide Survey in Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 239-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1253/circj.CJ-17-0433. Epub 2017 Aug 30.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Grande Gutierrez N, Fukazawa R et al	4. 巻 120
2. 論文標題 Assessment of Coronary Artery Aneurysms Caused by Kawasaki Disease Using Transluminal Attenuation Gradient Analysis of Computerized Tomography Angiograms.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Cardiol	6. 最初と最後の頁 556-562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.amjcard.2017.05.025. Epub 2017 May 30.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi R, Fukazawa R, Watanabe M, Hashimoto K, Suzuki N, Nagi-Miura N, Ohno N, Shimizu A, Itoh	4. 巻 Feb2
2. 論文標題 Characterization of a murine model with arteritis induced by Nod1 ligand, FK565: a comparative study with a CAWS-induced model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1287150. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe M, Fukazawa R, Ogawa S, Watanabe M, Fukushima Y, Kiriya T, Hayashi H, Itoh Y.	4. 巻 83(2)
2. 論文標題 Usefulness of Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography Fusion-Hybrid Imaging to Evaluate Coronary Artery Disorders in Patients with a History of Kawasaki Disease.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 71-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.83.71.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onouchi Y, Fukazawa R, Yamamura K et al	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Variations in ORAI1 Gene Associated with Kawasaki Disease.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plos ONE	6. 最初と最後の頁 e0145486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0145486. eCollection 2016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 阿部 正徳, 深澤 隆治	4. 巻 48
2. 論文標題 【慢性疾患児の一生を診る】 循環器疾患 川崎病に合併した冠動脈後遺症(解説/特集)	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 1484-1487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 深澤 隆治 小川 俊一	4. 巻 80
2. 論文標題 【小児循環器のファーストタッチから専門診療へ】 主要症候に対するファーストタッチ 心音の異常・心雑音(解説/特集)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 19-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 原口 尚子, 松井 亮介, 築野 香苗, 渡邊 誠, 深澤 隆治, 伊藤 保彦
2. 発表標題 学校心臓検診で発見された左冠動脈肺動脈起始症の1例
3. 学会等名 第87回 日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎病発症から1年以内と10年以上の冠動脈病変の組織評価の検討
2. 発表標題 渡邊 誠, 深澤 隆治, 松井 亮介, 築野 香苗, 橋本 佳亮, 橋本 康司, 阿部 正徳, 赤尾 見春, 上砂 光裕, 勝部 康弘
3. 学会等名 第87回 日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uchimura R, Ueda T, Fukazawa R, Ohashi R et al
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of adipose tissue-derived stem cell in a Kawasaki disease mouse model
3. 学会等名 14th Congress of Asian society for pediatric research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内村僚一、植田高広、深澤隆治、大橋隆治
2. 発表標題 川崎病血管炎モデルマウスに対する脂肪由来間葉系幹細胞投与の効果検証
3. 学会等名 第121回 日本小児科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋隆治、深澤隆治、伊藤保彦ほか
2. 発表標題 NOD 1 ligand, FK565 動脈炎モデルの組織像：CAWS モデルとの比較研究
3. 学会等名 第37回 日本川崎病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦大、深澤隆治ほか
2. 発表標題 多施設共同による川崎病冠動脈瘤の予後と管理 後方視的研究からレジストリ研究へ(
3. 学会等名 第65回 日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2017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
研究 分担 者	深澤 隆治 (Fukazawa Ryuji) (80277566)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	