

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09686

研究課題名(和文)川崎病血管炎の解明 - 血管微小粒子(EMPs)に焦点を当てて -

研究課題名(英文)Clarification of vasculitis in Kawasaki disease; focusing on the endothelial microparticles

研究代表者

廣野 恵一(Hirono, Keiichi)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：80456384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血清中に含まれるEMPsは、川崎病患者を予測するだけでなく、血管内皮細胞障害や血管炎の重症度を反映しており、川崎病急性期におけるCAL形成を予測する鋭敏なバイオマーカーとなる。さらに、微小粒子内に含まれる特異的なmicroRNA(hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a)は炎症性サイトカインの遺伝子発現を調整し、川崎病の病因やCAL形成機序に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：EMPs could serve as a sensitive marker for characterizing the severity of endothelial damage and vasculitis in acute KD. Moreover, these specific miRs, hsa-miR-145-5p and hsa-miR-320a, may participate in modulation of inflammatory cytokine expression levels, and may contribute to pathogenesis of vasculitis in acute KD. Our novel findings might offer a new clinical approach for the treatment of KD. Further efforts are needed to develop the highly efficient molecular targeting therapies for KD.

研究分野：川崎病

キーワード：川崎病 血管内皮微小粒子 血管炎

1. 研究開始当初の背景

川崎病は乳幼児に好発する原因不明の急性熱性疾患であり、主たる病態は全身の自己免疫性血管炎であり、特に冠動脈の血管内皮障害を引き起こす。初期治療として行われる免疫グロブリン大量(IVIG)療法に不応の患者も未だに 20-30%存在し、後遺症として約 3%に冠動脈病変の合併が認められる。小林らは、未治療の川崎病患者を層別化し、スコアの高いハイリスクな患者だけを対象として IVIG 単独療法と IVIG + ステロイドの併用療法を比べる大規模なランダム化比較試験(RAISE Study)を行い、ステロイド併用療法の優位性を証明した。これらの論文により免疫グロブリン不応例の予測が臨床研究にも有用であることが示された。しかし、冠動脈瘤発症を予測するバイオマーカーは未だに確立されていない。

一方、微量粒子(microparticles(MPs))は、各種サイトカインによる細胞の活性化、シェアストレスや低酸素などの生理学的刺激やアポトーシスにより血管内皮細胞、血小板や白血球などの血球細胞などから血中に放出される。MPs は長い間不活発な破片として扱われてきたが、現在は生物学の重要な細胞間のシグナル伝達物質として評価されつつある。EMPs のうち血管内皮細胞より放出されるものを endothelial microparticles(EMPs)と呼ばれる。

血中に存在する EMPs が高血圧、冠動脈疾患、糖尿病、慢性腎不全などの心血管合併症を有する患者において上昇することが報告されており、EMPs が血管内皮機能や血管リモデリング、アポトーシスの指標となる可能性が示唆される。EMPs 存在下ではラット大動脈における血管内皮依存性血管拡張作用が減弱し、NO 産生も減少すると報告され、EMPs 自体が血管内皮機構を障害する可能性も示唆される。このように、EMPs は炎症性病態で血中に増加するとされるが、どの部位の血管から産生されるか、どのようなメカニズムによって血管内皮細胞から出芽し放出されるか、それ自身がどのような生物活性を有するか未解明な部分が多い。そこで、我々は、血管に対する EMPs の作用を明らかにするために以下の実験を行い新たな知見を得ている。

A) 培養血管内皮細胞に TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、LPS にて刺激することで、EMPs の効率的な産生系が確立し、刺激直後から EMPs 産生が確認されたことより、

non-genomic な反応であることが強く推察された(未発表)。

- B) TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、LPS による炎症惹起によって、EMPs に含まれる miRNA 組成が大きく変化することが明らかになった(未発表)。
- C) EMPs を加えることにより、周皮細胞が Vimentin 陽性となり、合成型(未分化型)に変化する可能性が示唆された(未発表)。
- D) 川崎病患者において、初期治療前の血清中の EMPs は増加が見られた。また冠動脈病変を伴っている症例においてその傾向は顕著であった(未発表)。
- E) 川崎病急性期における流血中の末梢血単核球細胞において miR の動態を解析し、5 種の miR(miR-93、miR-877、miR-92b、miR-182、miR-296-5p)が同定された。このうち miR-93 は VEGFA の発現を調節し、川崎病冠動脈病変における重要なシグナル伝達系を担っている可能性が考えられた(未発表)。

これまでの川崎病の我々の研究成果から EMPs の未発表の知見から、川崎病急性期における血管炎において、EMPs が情報伝達の役割を担い、血管炎及び血管障害に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。つまり、EMPs に焦点を当て、川崎病血管炎を明らかにすることを本研究の目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、川崎病血管炎を明らかにするために EMPs の役割を明らかにすることである。そのために、(1)フローサイトメトリーを用い EMPs を測定し、川崎病における EMPs の動態を明らかにする、(2) EMPs のマイクロアレイを行うことで EMPs の同定を行う、(2)川崎病患者の剖検例の冠動脈を同定した EMPs にて病理組織学的に検討し EMPs の局在を明らかにする、(3)川崎病患者由来 iPSC 内皮細胞を作製の上、(3)刺激実験とノックダウン実験を行い機能解析することで、EMPs と内皮細胞の関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

川崎病急性期患者のサンプルの採取と EMPs 濃度の測定

対象は、免疫グロブリン大量療法(IVIG)が行われた川崎病患者とする。IVIGの反応性から2群に分類し、IVIG反応群は投与後48時間以内に解熱するものとする。発症から1ヶ月後において、心エコー上、Zscoreを用い冠動脈が+2SD以上拡張をきたす群を冠動脈病変群とする。患者の末梢血は、IVIG投与前、投与直後、発症2週間後、4週間後に採取する。採取した血液を血漿と血液細胞に分離し、血液細胞はiPS細胞作製のために、血清はEMP測定、刺激実験およびサイトカインの測定に用いる。

川崎病急性期におけるEMP濃度の測定を行い、炎症の程度と冠動脈病変の有無により相関があるか検討する。IVIG投与前、投与直後、発症2週間後、4週間後のEMP濃度をCD31+/CD41-, CD31+/annexin+, CD144+/CD42-, CD105+, CD106+で染色しフローサイトメトリー法を用いて測定し、1冠動脈病変群と非冠動脈病変群の比較検討を行い、血管炎の重症度とEMPの相関を明らかにする。

マイクロアレイによるEMPの同定
まず、採取した血漿を遠心し、そこからRNA isolation kitを使用しtotal RNAを抽出する。続いて、単離したtotal RNAからmiRNAの遺伝子発現の解析を施行する。解析にはGeneChip system with the Human Genome U133 Plus 2.0 ArrayおよびGene Chip miRNA Array (Affymetrix, Santa Clara, CA)を使用し、EMPに含まれるmiRNAを同定する。

川崎病患者の剖検例における冠動脈の病理組織学的解析
冠動脈病変を有している川崎病患者の剖検例において、免疫染色を行う。内膜、中膜、外膜と平滑筋層に分けて、炎症細胞の局在とEMPの局在を明らかにし、EMPの川崎病患者における局在を明らかにする。

4. 研究成果

急性期川崎病におけるEMPの推移
微粒子中に含まれるEMPの割合は、IVIG治療前の川崎病患者において(1.27 ± 0.16%, mean ± SD)、コントロール

(有熱者 0.09 ± 0.03%、健常人 0.08 ± 0.03%)に対し優位の増加を認めた(p<0.0001)(図1)。NCAL群ではStage-2でEMPの割合は急激に減少するのに対して、CAL群では急上昇を示し、2群間でEMPの推移に明らかな相違を認めた(p<0.01)(図2)。さらに、EMP割合の最大値と左右の冠動脈径のZ scoreとの間に強い相関係数を認めた(右冠動脈:R=0.512,左冠動脈:R=0.488)。

特異的なmicroRNAの同定

次に、CAL群のEMPの推移を基に、NCAL群と比較して有意にStage-2で高値を示しStage-3で正常化するCAL群特有のmicroRNAを抽出した。CAL群において、Stage-1からStage-2で発現が2倍以上に変化し、かつStage-3で正常化した16種類のmicroRNAを特定した(図4)。また、has-miR-145-5pはCAL群においてStage-1で発現量が最高値を示し、Stage-2まで高値を継続し、Stage-3で正常化するため、今回の検討に加えた。このCAL群に特異的な17種類のmicroRNAと、各々がターゲットとするmRNAに対してコンピューター解析を行い、好中球の遊走に重要な炎症性サイトカインと最終的にG-CSFに影響する2種類のmicroRNA(hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a)が同定された。

microRNAのトランスフェクション実験

THP-1単球細胞に対して、この2種類のmicroRNAのトランスフェクションを行った。まず予備実験として、positive control(hsa-miR-1)をTHP-1細胞内にトランスフェクションし、3時間後にtargetとなるprotein tyrosine kinase 9のmRNAの抑制が最大になることを確認した(図6-1)。

続いて、2種類の

microRNA(hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a)をTHP-1細胞にトランスフェクションし、hsa-miR-320aはIL-18のmRNAを78%抑制し、hsa-miR-145-5pはIL-6のmRNAを54%抑制かつIL-18のmRNAを47%抑制することを証明した(図6-2)。

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)

Miura M, Kobayashi T, Kaneko T, Ayusawa M, Fukazawa R, Fukushima N, Fuse S, Hamaoka K, Hirono K Association of Severity of Coronary Artery Aneurysms in Patients With Kawasaki Disease and Risk of Later Coronary Events.

JAMA Pediatr. 2018 7;172:e180030.

(査読あり)

Nakaoka H, Hirono K, Yamamoto S, Takasaki I, Takahashi K, Kinoshita K, Takasaki A, Nishida N, Okabe M, Ce W, Miyao N, Saito K, Ibuki K, Ozawa S, Adachi Y, Ichida F.

MicroRNA-145-5p and microRNA-320a encapsulated in endothelial microparticles contribute to the progression of vasculitis in acute Kawasaki Disease.

Sci Rep. 2018;8:1016. (査読あり)

Masuda H, Kobayashi T, Hachiya A, Nakashima Y, Shimizu H, Nozawa T, Ogiwara Y, Ito S, Takatsuki S, Katsumata N, Suzuki Y, Takenaka S, Hirono K, Kobayashi T, Suzuki H, Suganuma E, Takahashi K, Saji T; Committee of Survey on Infliximab use for Kawasaki disease. Infliximab for the Treatment of Refractory Kawasaki Disease: A Nationwide Survey in Japan.

J Pediatr. 2018;195:115-120. (査読あり)

Hachiya A, Motoki N, Akazawa Y, Matsuzaki S, Hirono K, Hata Y, Nishida N, Ichida F, Koike K.

Left ventricular non-compaction revealed by aortic regurgitation due to Kawasaki disease in a boy with LDB3 mutation.

Pediatr Int. 2016;58:797-800. (査読あり)

Saito K, Nakaoka H, Takasaki I, Hirono K, Yamamoto S, Kinoshita K, Miyao N, Ibuki K, Ozawa S, Watanabe K, Bowles NE, Ichida F.

MicroRNA-93 may control vascular endothelial growth factor A in circulating peripheral blood mononuclear cells in acute Kawasaki disease.

Pediatr Res. 2016;80:425-32. (査読あり)

[学会発表] (計 22 件)

廣野恵一

冠動脈エコーハンズオンセミナー

第 10 回北陸川崎病研究会、2017 年 12 月 2 日、金沢

勝部康弘、今中恭子、武田充人、阿部淳、小林徹、益田博司、大熊喜彰、深澤隆治、高月晋一、加藤太一、三谷義英、廣野恵一、池田和幸、吉兼由佳子、須田憲治、永田弾、山村健一郎、佐地勉、日本川崎病学会 川崎病バイオマーカー小委員会

川崎病バイオマーカーのエビデンス分類
第 37 回 日本川崎病学会・学術集会、
2017 年 10 月 27 日

勝部康弘、今中恭子、武田充人、阿部淳、小林徹、益田博司、大熊喜彰、深澤隆治、高月晋一、加藤太一、三谷義英、廣野恵一、池田和幸、吉兼由佳子、須田憲治、永田弾、山村健一郎、佐地勉、日本川崎病学会 川崎病バイオマーカー小委員会

テネイシン C、ペントラキシン 3、腫瘍壊死因子による免疫グロブリン大量療法への不応例予測の可否 - 多施設共同研究
第 37 回 日本川崎病学会・学術集会、
2017 年 10 月 27 日

三浦大、鮎澤衛、池田和幸、加藤太一、小林徹、塩野 淳子、須田憲治、津田悦子、沼野藤人、廣野恵一、深澤 隆治、前田潤、三谷 義英、研白

冠動脈瘤をとまなう川崎病患者のレジストリ研究計画

第 37 回 日本川崎病学会・学術集会、
2017 年 10 月 27 日

金井貴志、竹下誠一郎、川村陽一、木下恵司、中谷圭吾、岩島覚、滝澤裕司、廣野恵一、森一越、吉田裕輔、野々山恵章
好中球/リンパ球比、血小板/リンパ球比による IVIG 不応の予測に関する多施設共同研究

第 37 回 日本川崎病学会・学術集会、
2017 年 10 月 27 日

岡部真子、廣野恵一、宮尾成明、仲岡英幸、齋藤和由、小澤綾佳、市田路子、木下耕史、高崎一朗

川崎病急性期における long noncoding RNA の発現解析

第 37 回 日本川崎病学会・学術集会、
2017 年 10 月 27 日

岡部真子、宮尾成明、仲岡英幸、齋藤和由、
小澤綾佳、廣野恵一、市田路子、池野友基、
青木正哉、芳村直樹

川崎病罹患後にペースメーカー心室閾値
の上昇を認めた洞不全症候群の1例

2017年度日本小児循環器学会、2017年7
月8日、浜松

宮尾成明、岡部真子、齋藤和由、小澤綾
佳、廣野恵一

多発性の巨大冠動脈瘤と末梢動脈瘤で
遠隔期に発見された不全型川崎病につ
いて

第 26 回小児循環器病カンファレンス
2017 年 7 月 1 日、京都

三浦大、鮎澤衛、池田和幸、加藤太一、小
林徹、塩野淳子、須田憲治、津田悦子、沼
野藤人、廣野恵一、深澤隆治、前田潤、三
谷義英、脇研自

冠動脈瘤をともなう川崎病患者のレジストリ
研究

2017年度日本小児科学会、2017年4月14
日、東京

岡部真子、宮尾成明、仲岡英幸、齋藤
和由、小澤綾佳、廣野恵一、市田路子、
池野友基、青木正哉、芳村直樹

川崎病罹患後にペースメーカー心室域
値の上昇を認めた洞不全症候群の1例

第 16 回富山小児循環研究会、2016 年
11 月 25 日、富山

Hideyuki Nakaoka, Keiichi Hirono, Mako
Okabe, Nariaki Miyao, Kazuyoshi Saito,
Keiichi Ibuki, Sayaka Ozawa, Kei
Takahashi and Fukiko Ichida.

Endothelial microparticles modulate
vasculitis during the acute phase of
Kawasaki Disease.

The 89th Scientific sessions of AHA 2016,
2016 年 11 月 15 日、New Orleans,
Louisiana

仲岡英幸、廣野恵一、岡部真子、宮尾成
明、伊吹圭二郎、齋藤和由、小澤綾佳、
市田路子

川崎病急性期における血管内皮細胞由
来の血管微小粒子(EMPs)の役割

第 36 回日本川崎病学会、2016 年 10 月
1 日、横浜

三浦大、廣野恵一

内径の Z スコアによる川崎病冠動脈瘤
の重症度の評価

第 36 回日本川崎病学会、2016 年 10 月
1 日、横浜

仲岡英幸、岡部真子、宮尾成明、伊吹
圭二郎、齋藤和由、小澤綾佳、廣野恵
一、市田路子

川崎病急性期における血管内皮細胞由
来の血管微小粒子(EMPs)の役割

第 52 回日本小児循環器学会総会・学術
集会、2016 年 7 月 7 日(木)、東京

Masaru Miura, Naoya Fukushima, Tetsuji
Kaneko, Ryuji Fukazawa, Shigeto Fuse,
Kenji Hamaoka, Keiichi Hirono, Hitoshi
Kato, Taichi Kato, Toru Kobayashi,
Tsutomu Saji, Shinya Shimoyama, Kenji
Suda, Hiroyuki Yamagishi, Kenji Waki.

Tokyo Metropolitan Children's Medical
Center, and the ZSP2 Study Group,
Japanese Society of Kawasaki Disease.

Severity Assessment of Coronary Artery
Aneurysm by Z-score of the Internal
Diameter in Kawasaki Disease.

The 88th Scientific sessions of AHA 2015,
Chicago, 2015.11

Hideyuki Nakaoka, Keiichi Hirono, Ichiro
Takasaki, Seiji Yamamoto, Koshi

Kinoshita, Asami Takasaki, Nariaki Miyao,
Kazuyoshi Saito, Keiichi Ibuki, Sayaka
Ozawa, and Fukiko Ichida.

Increased circulating endothelial
microparticles in the acute phase of
Kawasaki Disease.

The 88th Scientific sessions of AHA 2015,
Orlando, Florida, 2015.11

宮尾成明、仲岡英幸、伊吹圭二郎、小澤
綾佳、廣野恵一、市田路子。

遠隔期に多発性の巨大末梢動脈瘤およ
び巨大冠動脈瘤が認められた不全型川
崎病の一例。

第 35 回日本川崎病学会、2015 年 10 月
9 日、鹿児島

仲岡英幸、廣野恵一、高崎一朗、山本
誠士、高崎麻美、宮尾成明、伊吹圭二郎、
齋藤和由、小澤綾佳、市田路子。

川崎病急性期における血管内皮細胞由来の血管微小粒子 (EMPs) の役割.

第35回日本川崎病学会、2015年10月9日、鹿児島

岡部真子、橋本郁夫、佐久間友子、渡辺一洋、上勢敬一郎、仲岡英幸、廣野恵二、市田路子.

川崎病急性期における IVIG 前後の血清 IgG の変化と治療反応性の検討.

第35回日本川崎病学会、2015年10月9日、鹿児島

清水宗明、宮尾成明、仲岡英幸、伊吹圭二郎、小澤綾佳、廣野恵一、市田路子.

腋窩動脈瘤を契機に診断された川崎病による冠動脈瘤の一例.

富山小児感染免疫研究会、2015年9月26日、富山

- ⑳ 仲岡英幸、伊吹圭二郎、小澤綾佳、廣野恵一、足立雄一、市田路子

川崎病急性期における血管内皮細胞由来の血管微小粒子(EMPs)の役割.

第51回日本小児循環器学会総会・学術集会、2015年7月17日、東京

- ㉑ Hideyuki Nakaoka, Keiichi Hirono, Keijiro Ibuki, Sayaka Ozawa, Fukiko Ichida.

Increased circulating endothelial microparticles in the acute phase of Kawasaki Disease.

The 11th International Kawasaki Disease Symposium, Feb 3, 2015, Honolulu, Hawaii

(図書) (計1件)

- 1) Keiichi Hirono, Fukiko Ichida 『Kawasaki Disease: Current Understanding of Mechanism and Evidence-based Treatment』Evidences of endothelial damage in acute stage. Saji, B.T., Newburger, J.W., Burns, J.C., Takahashi, M. (Eds.), 2016: 335-340. Springer, Japan

(産業財産権)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣野 恵一 (HIRONO, Keiichi)
富山大学・附属病院・助教
研究者番号:80456384

(2)研究分担者

高崎 一郎 (TAKASAKI, Ichiro)
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・准教授
研究者番号:00397176

山本 誠士 (YAMAMOTO, Seiji)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教
研究者番号:10456361

市田 路子 (ICHIDA, Fukiko)
富山大学・事務局・学長補佐
研究者番号:30223100

小澤 綾佳 (OZAWA, Sayaka)
富山大学・附属病院・診療助手
研究者番号:40596540