

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10149

研究課題名(和文) P-selectin中和抗体を用いた川崎病分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Experimental study of P-selectin as a potential therapeutic target for Kawasaki disease

研究代表者

中村 明宏 (Nakamura, Akihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50313854

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)：川崎病は小児に見られる原因不明の血管炎で、罹患者の一部は冠動脈後遺症を伴う。本研究で私たちは、川崎病マウスモデルを用いて、好中球の血管内皮へのローリングなどの働くタンパク質、P-selectinが血管炎部位において従来より報告のあった血管内皮や血小板に加えて、内膜肥厚部位や外膜側の細胞にも発現していることを見出した、さらに、腫瘍組織の新生血管に発現する分子として知られるTEM8が後炎症性血管モデリング部位の内膜肥厚部位や血管周囲の小血管に発現していることを見出した。中和抗体による炎症抑制効果はまだ実証できていないが、これらの分子は川崎病血管炎の治療標的候補として検討する意義があると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病の病因は未だ明らかでなく、その病態の分子機序も不明な点が多く残されている。特に本疾患の標準的治療法である免疫グロブリン静注療法(IVIG)に対する不応症例でしばしば見られる冠動脈後遺症は、臨床上的主要な問題となっており、IVIGに代わる新規治療法の開発が急がれる。本研究は血管病態や病的な血管新生に関連するとの報告がある2つの分子が、川崎病の炎症及び血管リモデリングに関わることを動物モデルを用いた実験で示した。本研究の成果は、今後の川崎病の新規治療法開発のための有用な基礎的知見を提供すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease is a idiopathic pediatric vasculitis. On the basis of experimental study with animal model for the disease, we found that P-selectin is expressed in neointima and cells in the adventitia as well as endothelial cell and CD41-positive cells(platelets). Beside the protein, during this study, we unexpectedly recognized that tumor endothelial marker 8 (TEM8) was expressed in the post-inflammatory vessels in the animal model. Although we haven't demonstrated that the vasculitis is effectively suppressed with neutralizing antibodies to these proteins in mouse model, it may be worthwhile targeting for the proteins in therapeutics of KD-associated cardiovascular complication.

研究分野：小児循環器病学

キーワード：川崎病 血管炎 免疫グロブリン静注療法抵抗性 P-selectin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

川崎病血管炎は主に離乳期前後の小児に見られる原因不明の全身性血管炎で、しばしば冠動脈傷害(coronary artery lesions : CALs)を伴う。標準的治療法として免疫グロブリン静注療法 (IVIG) が確立されて以降、急性期死亡率は著しく減少したが、症例全体の約 15% 前後は IVIG に対して治療抵抗性を示し、結果として、これらの症例では CALs の合併や心血管後遺症のリスクを増加させる。川崎病血管炎についてはその病因はもちろん、病態の分子機序についても不明な点が多い。しかし近年、いくつかの川崎病動物モデルが確立されたことで、川崎病血管炎に関する実験分子病理学的アプローチや治療法開発に関する研究が可能になりつつある。

P-selectin は血小板の分泌顆粒や血管内皮細胞の(Weibel Parade body: W-P body)に局在し、これらの細胞の活性化に伴い細胞膜上に移行する。細胞膜上に移行した P-selectin は、好中球などの発現する P-selectin glycoprotein ligand 1(PSGL1)と相互作用し、これらの細胞の接着や血管内皮上のローリングを促進する。川崎病においては、急性期にその血中濃度の増加がすでに報告されており、また血小板活性化は同疾患を特徴付ける臨床的所見の一つとしてよく知られていることなどから、P-selectin が本疾患の発症、進展に重要な役割を果たす可能性は高いと考えられる。本研究では、川崎病分子病態川崎病病態における P-selectin の役割の解明を目標として、川崎病動物モデルを用いた実験病理学的研究を実施した。

2. 研究の目的

川崎病血管炎の発症および進展における P-selectin の関与について解析し、同分子の治療標的としての可能性について動物モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

Candida albicans 水溶性抽出物(*Candida albicans* water soluble fraction : CAWS)を DBA/2 マウス (~5 週齢)の腹腔内に 5 日間連続投与した。対照群には PBS を同様に投与した。CAWS 投与マウス全てで 6~7 日の時点で明らかな血管炎を発症した。別の川崎病マウスモデルとして乳酸菌細胞壁抽出物 (LCWE) を C57BL/6J マウス (~5 週齢)および DBA/2 マウスの腹腔内に単回投与した。C57BL/6 マウスでは 20 日目で投与したマウスの約 70%に血管炎を発症したが、DBA/2 マウスでは明らかな血管炎の発症は認められなかった。

(2) 免疫組織化学

マウスより心臓を摘出し、大動脈基部・冠動脈起始部を中心に未固定凍結切片を作成した。切片は 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、常法に従い、蛍光標識した抗 P-selectin 抗体、抗体 CD41 抗体にて染色した。抗 TEM8 抗体による免疫染色は PFA 固定ではなくアセトン固定し酵素抗体法で染色した。

(3) 中和抗体を用いたマウス血管炎の抑制効果の検討

川崎病マウスモデルに、CAWS 投与終了後 1 日目に抗 P-selectin 抗体(IgG)または正常ヒツジ IgG を単回、腹腔内に投与した。7 日後に解剖して、大動脈基部・冠動脈起始部の切片を作成し、ヘマトキシリンエオシン染色を実施した。

4. 研究成果

(1) 血管炎部位における P-selectin の分布

冠動脈起始部を含む大動脈基部の動脈壁から外膜側にかけて p-selectin を検出した。血小板マーカーである CD41 に対する抗体との二重染色により、その大部分は血小板以外の細胞に由来することが示唆された(図 1)。P-selectin については、内皮細胞の他、低酸素ストレスなどにおいて血管平滑筋細胞での発現亢進と、その血管リモデリングへの関与が最近報告されており(Sundd P et al 2019, Zeiffr et al 2004)、川崎病マウスモデルの炎症部位の pselectin も同細胞に由来する可能性が考えられる。

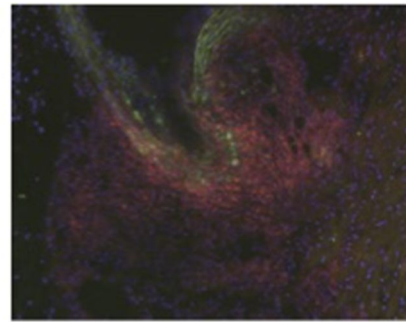


図1.川崎病マウスモデルの冠動脈起始部における P-selectin (赤) と CD41 陽性細胞(緑)の分布。* 大動脈の弾性線維の自家蛍光もみられる。

(2) P-selectin 中和抗体による血管炎抑制の検討

P-selectin は好中球の血管内皮への集積やローリングなど血管炎発症に直接働くほか、血管リモデリングへの関与も予想され、治療上の分子標的としても重要と考えられる。よって、中和抗体で P-selectin の機能を抑制することで血管炎病態の改善が測れるかどうか検討したが、少なくとも本実験条件下では明らかな抑制効果は見られなかった。投与プロトコルの検討が必要と思われるが、必要な抗体量を考慮すると詳細な条件検討は困難だった。

(3) 血管炎後期の血管リモデリング部位における TEM8 の発現

血管病態における P-selectin の機能として、前述の炎症反応とは別に、近年、腫瘍など病的な状態における血管新生や血管リモデリングへの関与が示唆されている(Gunningham SP et al. 2007)。私たちはこれまでに川崎病マウスモデルの血管炎部位に著明な新生血管の増生が見られることを報告しており(Suzuki C et al 2017)この面に P-selectin 等の分子が関与する可能性もある。病態における血管新生に働く分子としては Tumor endothelial marker 8 (TEM8)が知られている。TEM8 は腫瘍組織の新生血管などで発現することが知られているが、腫瘍以外の病態におけるその関与は明らかでない。川崎病マウスモデルの血管炎部位における TEM8 の発現を免疫染色にて調べた。その結果、TEM8 は特に血管の著明なりモデリングがみられる炎症後期において内膜肥厚部位及び外膜側の小血管の一部で発現が見られた(図 2)。各種マーカーとの多重染色から、発現細胞は血管内皮でなく、平滑筋細胞あるいは周皮細胞であることが示唆された。TEM8 は当初内皮細胞で見出されたが、その後培養血管平滑筋細胞でも高発現していることが報告されている。これらのことから、血管炎部位における TEM-8 陽性血管については vasa vasorum を考えている。

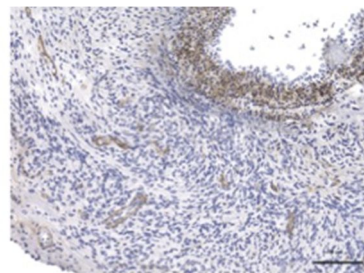


図2 川崎病マウスモデルの血管炎部位の小血管における TEM8 の発現。

(4)まとめ

研究期間内に P-selectin が治療標的となりうるかどうかを明らかにするには至らなかったが、本血管炎モデルでは同分子が、当初予想していた内皮細胞や血小板よりもむしろそれ以外の血管平滑筋細胞や外膜側に分布する未同定の細胞で強く発現していることがわかった。今後、これらの細胞の同定と試みるとともに、マウスを用いた中和抗体に

よる治療実験についても投与プロトコールについて再検討を行う。TEM-8 についてはまだ予備的な結果ではあるが、本マウスモデルでは病変部位、特に血管リモデリングを呈する部位で特異的に検出されることから、同分子が冠動脈後遺症の予防、治療のための分子標的となりうることを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kami D, Kitani T, Nakamura A, Wakui N, Mizutani R, Ohue M, Kametani F, Akimitsu N, Gojo S.	4. 巻 13
2. 論文標題 The DEAD-box RNA-binding protein DDX6 regulates parental RNA decay for cellular reprogramming to pluripotency.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0203708.	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 Nakamura A, Ikeda K, Hamaoka K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Etiological significance of Infectious Stimuli in Kawasaki Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Pediatrics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2019.00244.	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 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	4. 巻 179
2. 論文標題 Non-receptor Type, Proline-Rich Protein Tyrosine Kinase 2 (Pyk2) Is a Possible Therapeutic Target for Kawasaki Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Immunology.	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.clim.2017.01.013	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中村明宏、亀谷富由樹、三浦典子、鈴木千夏、田中秀央、大野尚仁、濱岡建城
2. 発表標題 川崎病様マウス血管炎におけるIgM型自然抗体の関与
3. 学会等名 第14回日本病理学会カンファレンス（犬山）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura A, Kametani F, Miura N, Suzuki C, Ohno N, Hamaoka K
2. 発表標題 Involvement of self-reactive IgM in the pathogenesis of Candida albicans extract-induced Kawasaki disease-like murine vasculitis
3. 学会等名 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Awaji-shima, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura A et al.
2. 発表標題 Possible involvement of Immunoglobulin A-producing cells in post-inflammatory vascular remodeling in mouse model for Kawasaki disease.
3. 学会等名 12th International Kawasaki Disease Synposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki C et al.
2. 発表標題 Potential of Proline-rich Tyrosine Kinase 2 (Pyk2) as a Therapeutic Target for Kawasaki Disease.
3. 学会等名 12th International Kawasaki Disease Synposium (国際学会)
4. 発表年 2018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	池田 和幸 (Ikeda Kazuyuki) (30507786)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	