

令和 4 年 11 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07878

研究課題名(和文)川崎病冠動脈瘤形成に対する分子標的治療法の開発

研究課題名(英文)Development of molecular targeted therapy for coronary aneurysm formation in Kawasaki disease

研究代表者

吉栖 正生 (Yoshizumi, Masao)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：20282626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腹部大動脈瘤モデルにおいて、TNFスーパーファミリーに属するTRAILが血管の組織破壊を惹起し、TNF受容体スーパーファミリーに属するオステオプロテゲリン(OPG)が、それを抑制する所見に基づき、川崎病血管炎の動物モデルとして用いられるカンジダ菌体抽出物(CAWS)誘導性のマウス血管炎がOPG(-/-)マウスで増悪するか否かを検討した。その結果、増悪所見は認められなかったがCAWS投与後の急性死亡が高率に認められた。TRAILの発現は上昇するが野生型と差を認めず、OPGの直接的な組織保護作用の可能性が示唆され、その機序の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病の患者数は、2000年頃以降増加を続け、2015年には過去最高の罹患率を示し、少子化の中で公衆衛生上深刻な問題となりつつある。川崎病の急性期では、時に冠動脈に重篤な血管炎を惹起し、一部の患児で炎症が持続し冠動脈瘤が形成される。

川崎病冠動脈瘤形成において、TRAILが炎症メディエーターの一つとして重要な役割を担っているのであれば、それに拮抗するOPGを、瘤形成抑制を目的とする分子標的薬として活用する治療法の開発につながると考え、研究を行った。その結果、カンジダ菌体抽出物投与後にOPG欠損マウスが急死するという所見が得られ、新規の病態モデルを得るに至った。

研究成果の概要(英文)：Based on the findings that TRAIL, a member of the TNF superfamily, induces tissue destruction of blood vessels and Osteoprotegerin (OPG), a member of the TNF receptor superfamily, inhibits it in a mouse model of abdominal aortic aneurysm, we investigated whether *Candida albicans* extract (CAWS)-induced murine vasculitis, which is used as an animal model of Kawasaki disease vasculitis, is exacerbated in OPG (-/-) mice. TRAIL expression was up-regulated in OPG (-/-) mice but did not differ from that in the wild-type mice, suggesting that OPG may have a direct tissue-protective effect, and we analyzed the mechanism of it.

研究分野：循環器病学

キーワード：血管炎 TNF受容体スーパーファミリー オステオプロテゲリン 菌体抽出物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

川崎病の患者数は、2000年頃以降増加を続け、2015年には過去最高の罹患率(0~4歳人口10万対330人)を示し、少子化の中で公衆衛生上深刻な問題となりつつある。川崎病の急性期では、時に重篤な血管炎を惹起し、特に冠動脈病変が強いことが知られている。川崎病は、その原因が不明であるだけでなく、一部の患児で炎症が持続し冠動脈瘤が形成される機序も明らかではない。以前我々は、開腹下CaCl₂一回塗布によるマウス腹部大動脈瘤モデルの血管平滑筋細胞においてTNFスーパーファミリーのTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)がオートクライン(自己分泌)的に炎症を増悪させ、大動脈瘤形成を促進することを見出した。TNF受容体スーパーファミリーのOsteoprotegerin (OPG)は、デコイ受容体として、骨ではリガンドRANKLと受容体RANKの結合を阻害し破骨細胞の活性化を抑制している。そのOPGは、血管壁ではリガンドTRAILがその受容体に結合することを阻害して炎症の悪化を防ぎ、腹部大動脈瘤の拡大を抑制すると考えられる。本研究課題の主たる学術的な問いは、川崎病冠動脈瘤形成においても、このTRAILが炎症のメディエータであるか否かである。もしTRAILがメディエータであれば、それに拮抗するOPGを、瘤形成抑制を目的とする分子標的薬として活用する治療法の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

川崎病の冠動脈瘤形成におけるTRAIL-OPG軸の重要性の解明を目的とした。

3. 研究の方法

川崎病に近似する冠動脈炎と冠動脈瘤を発症する系統的血管炎マウスモデルである、Candida Albicans Water-soluble fraction (CAWS)投与による血管炎モデルをOPG欠損マウスに適用してTRAIL/OPGのCAWS血管炎モデルにおける役割を検証した。

4. 研究成果

(A) OPG欠損によるCAWS投与後の死亡率増大

CAWS血管炎モデルの標準的な方法に従って、野生型マウスとOPG欠損マウスそれぞれにCAWS 4 mgを腹腔内に5日連続投与した。野生型マウスではCAWS投与後5日以内の死亡率が12.5%だったのに対して、OPG欠損マウスではCAWS投与後1日での死亡率が87.5%と極めて高率にCAWS投与後の死亡が認められた。

(B) OPG欠損によるCAWS誘導性の血管炎への影響

上記のとおり、OPG欠損により高率にCAWS投与後の死亡が見られたため、CAWSの投与量を1 mgに減らしてモデルを作製した。CAWS投与開始28日後に組織を採取し、冠動脈起始部の血管炎を評価したところ、OPG欠損による明らかな病態の変化は認められなかった(図1)。

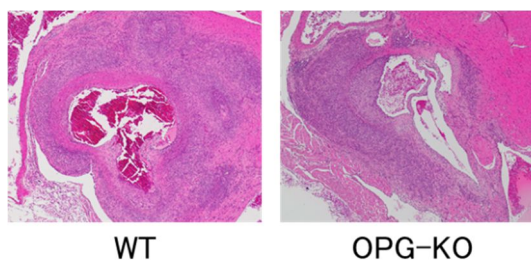


図1. CAWS投与開始28日後の大動脈起始部血管炎

WT、OPG-KOマウス双方に同様の重度の血管炎がみられた

(C) CAWS投与後早期のTRAILとOPGの発現動態(図2)

成果Aで認められたOPG欠損マウスにおけるCAWS投与後早期の死亡の機序を解明することを目的に、CAWS投与後のTRAILやOPGの心臓における発現変化を検討した。リアルタイムPCR法を用いて、TRAILのmRNAの発現を検討したところ、CAWS投与24時間後の心臓で、TRAILは野生型とOPG欠損マウス双方で発現が有意に上昇することが観察された。また、野生型マウスではOPGの発現が著明に増加していた。

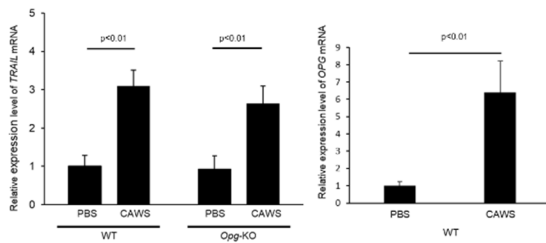


図2. CAWS投与24時間後の心臓におけるTRAIL mRNA、OPG mRNAの発現上昇

(D) OPG 欠損マウスの CAWS 投与後死亡の原因の探索

成果 C で TRAIL-OPG 軸が CAWS 投与により影響を受けていることが推測された。野生型マウスの心臓では CAWS 投与により TRAIL、OPG の双方の発現が上昇していたため、OPG 欠損による CAWS 投与後の死亡が過剰な TRAIL シグナルによるもの、もしくは TRAIL とは無関係の OPG の保護作用の欠落によると推測された。死因を探索するために、まず CAWS 投与 24 時間後の主要臓器の切片を観察した。肺、腎臓、心臓、肝臓の組織を光学顕微鏡下で観察したが、CAWS 投与後の OPG 欠損マウスにおいても致命的な所見は認められなかった。以前、我々は TRAIL がマクロファージの遊走を誘発することを見出しており、CAWS 投与後に心臓で発現が上昇した TRAIL が OPG 欠損下では炎症細胞の遊走を過剰に誘発し心臓における炎症反応を増悪させる可能性を推測した。マクロファージマーカーの F4/80 に対する蛍光免疫染色を用いて、CAWS 投与 24 時間後時点でのマクロファージの心臓への浸潤を検討したところ、野生型と OPG 欠損マウスでマクロファージの浸潤状況に顕著な差は認められなかった (図 3)。

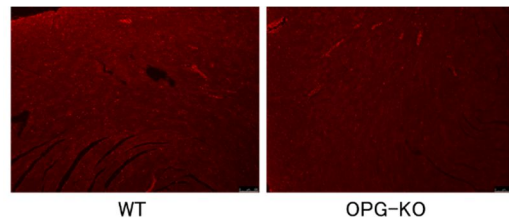


図3. CAWS投与24時間後の心臓におけるF4/80 (Red) 陽性細胞分布
双方の心筋で、F4/80陽性細胞が同様に多数分布している

次に OPG 欠損が CAWS 投与後に血液凝固を誘発する可能性を推測した。詳細な生理学的意義は不明であるが OPG は血液凝固に関連する von Willebrand Factor と結合していることが知られており、OPG の欠損が CAWS 投与後に血栓形成を助長することで臓器損傷を引き起こしていると仮説をたてた。CAWS 投与 24 時間後の心臓組織切片において血小板マーカーの CD41 に対する免疫染色を行い、血栓が存在するかをスクリーニングしたが、野生型と OPG 欠損マウスの双方で明確な血栓形成は認められなかった。

まとめ

上記の通り、CAWS 血管炎モデルにおいて OPG の欠損は致命的イベントを誘発することが示唆され、OPG が CAWS のような病原物質が体内に侵入した場合に生じる急性の致命的現象を抑制する働きを持つことが考えられた。一方で、OPG 欠損による CAWS 投与後の致命的イベントの実態や、その誘発メカニズムについては未だ明らかにすることができていない。OPG は多様な分子と結合し、それらの機能の制御に関連する他、近年では自身も炎症に反応して発現・分泌が上昇し、リガンドとしても作用することが明らかになりつつある。今後は TRAIL 特異的な中和抗体や抗凝固薬を使用して救命実験を行い、OPG 欠損による CAWS 投与後の死亡に関連する病態の解明を図るとともに、他の病原物質曝露モデルを用いて疾病下のホメオスタシス維持における OPG の役割を探索する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bumdelger Batmunkh, Otani Mikage, Karasaki Kohei, Sakai Chiemi, Ishida Mari, Kokubo Hiroki, Yoshizumi Masao	4. 巻 15
2. 論文標題 Disruption of Osteoprotegerin has complex effects on medial destruction and adventitial fibrosis during mouse abdominal aortic aneurysm formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0235553 ~ e02
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0235553	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 唐崎 航平, Batmunkh Bumdelger, 鎌田 諒, 小久保 博樹, 石田 万里, 吉栖 正生
2. 発表標題 CaCl ₂ 誘導性マウス腹部大動脈瘤モデルの発展性：Osteoprotegerin-KOマウスを用いた検討
3. 学会等名 第2回血管炎病因病態研究会
4. 発表年 2019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	小久保 博樹 (Kokubo Hiroki) (10270480)	広島大学・医系科学研究科(医)・講師 (15401)	
研究分担者	高橋 啓 (Takahashi Kei) (80216712)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------