

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591226
 研究課題名（和文）川崎病血管炎におけるリンパ系システムの分子制御機構に関する研究

研究課題名（英文）Lymphangiogenesis in acute Kawasaki disease

研究代表者

寺井 勝（TERAI MASARU）
 東京女子医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80207472

研究成果の概要：川崎病において、修復に関与するリンパ系の再構築過程を明らかにし、川崎病重症例の治療に役立てることを目的とした。リンパ管新生因子 VEGF-D は、血液中、浸潤細胞や心臓の組織、血管において産生が増加し、この蛋白の受容体はリンパ管に発現し、組織学的にもリンパ管が新たに新生する所見が得られた。TNF で処理すると、VEGF-D の産生が抑制されることが実験的に証明された。VEGF-D が川崎病血管炎の修復機転に大きな役割をしていることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：川崎病、リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

川崎病は原因不明の血管炎である。免疫グロブリン無効の重症例では冠動脈瘤の発生率が高く、重症例に対する新たな治療法の確立は社会や患者団体の求めるところである。そのためには、多角的な研究が必要となる。

重症例の病態研究の結果、血管透過性の亢進とこれに続く血漿タンパクの漏出 (plasma leakage) による浮腫が重症川崎病のひとつの特徴であること (Circulation

2003) 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) が血管透過性の亢進やマクロファージの遊走・活性化に関わっていること (Circulation 2002)、VEGF-A 受容体下流のシグナル伝達分子である p38 MAPK の阻害薬剤によりインビトロで血管透過性の改善がみられることを明らかにしてきた。

諸氏の研究成果により、重症例では、VEGF を含む種々の炎症性サイトカインの関与により、血管内皮障害、plasma leakage、そして血管周囲の浮腫が進展し、局所に生じ

た循環不全と虚血が冠動脈構造の破綻 瘤形成に拍車をかけていると考えられる。

リンパ系は、血管外に移動した白血球や血漿タンパク、老廃物の回収に重要な働きをしている。特に、組織に漏れた血漿タンパクの再回収には重要な働きをしており、その回収が遅れると、血漿浸透圧や組織代謝が障害され、組織の炎症が長引くことが知られている。リンパ系研究が血管系ほど着目されてこなかった最大の理由は、特異的な分子マーカーが不明であったことが大きい。1997年にリンパ管新生分子、VEGF-C、VEGF-Dが発見されたことを契機に、癌のリンパ節転移の研究が盛んにおこなわれるようになった。一方、炎症疾患においても、VEGF-CやVEGF-Dの受容体(VEGFR-3)下流のシグナルを人為的に阻害すると、炎症局所のリンパ管新生が阻害し、浮腫が遷延、予後不良となることが報告された(J Clin Invest 2005;115;247)。炎症性疾患におけるリンパ系システムの研究はまだ始まったばかりであるが、plasma leakageと血管外硬性浮腫の遷延を特徴とする川崎病血管炎においてはリンパ系システムの重要な役割が予想される。

川崎病において、plasma leakageや炎症の沈静化にはリンパ管新生によるリンパ系システムの再構築が必要と考えられる。しかしながら、これまでリンパ系から解析した研究はみあたらない。

2. 研究の目的

川崎病血管炎におけるリンパ系システムの再構築の分子基盤を明らかにし、重症例の新たな治療に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

リンパ管新生分子であるVEGF-CやVEGF-Dの関与が川崎病に認められるかをインビトロで検証する。

1)ELISA法により、血中のVEGF-C、VEGF-Dの濃度を解析する。

2)DNAマイクロアレイを用いて、末梢血球中のこれら分子のmRNAを解析する。

リアルタイムPCR法を用いて、DNAマイクロアレイの解析結果の信憑性を検証する。

3)組織におけるVEGF-C、VEGF-Dの蛋白発現、さらにはVEGF-C、VEGF-Dの主たる機能的受容体(VEGFR-3)の発現を免疫組織化学的に解析する。

4)さらに、リンパ管内腔面積をコンピューター計測し急性期川崎病患者におけるリン

パ管新生の形態学的に定量解析する。

5)川崎病の血清刺激によるヒトリンパ管内皮細胞を3次元培養して、増殖、遊走、リンパ管新生の機能に関して解析する。

6)炎症時におけるリンパ管新生分子の発現調節機構を解析する。

7)炎症修復におけるリンパ系システムの再構築を検証する。

4. 研究成果

リンパ管新生分子であるVEGF-Dの関与が認められるかをインビトロで証明した。

血中VEGF-D濃度が川崎病の急性期や対照健康小児に比較して、川崎病回復期に有意に増加する($p<0.01$)ことが判明し、VEGF-Dが川崎病の治癒機転に何らかの役割をしていることが示唆された。

一方、VEGF-C濃度に関しては、対照、急性期、回復期のいずれにも差異が認められなかった。

DNAマイクロアレイを用いて、川崎病患者末梢血球中のVEGF-DのmRNAを熱性対照患者との比較で解析した。その結果、単核球、好中球のいずれの末梢血球からもVEGF-Dの産生はまったくみられず、組織からのVEGF-D蛋白の産生が示唆された。

このことを検証するために、リアルタイムPCR法を用いて、免疫グロブリン治療前後の末梢血単核球および各種培養細胞(肺繊維芽細胞、冠動脈血管内皮細胞、皮膚リンパ管内皮細胞、冠動脈血管平滑筋細胞)におけるVEGF-D mRNAの発現量をGAPDH mRNAの補正で比較した。その結果、患者単核球におけるVEGF-D mRNAは発現していないことが確認された。一方、培養細胞では、繊維芽細胞由来のmRNAが最も多く、次いで、冠動脈血管内皮細胞、皮膚リンパ管内皮細胞の順にみられた。これらの結果より、川崎病においても末梢血よりも血管炎組織における発現がおきている可能性が示唆された。

そこで、川崎病剖検組織において、VEGF-D及びその主たる機能的受容体(VEGFR-3)の発現を免疫組織化学的に解析した。

その結果、遠隔期川崎病や対照組織と比較して、VEGF-Dは川崎病組織に浸潤している単核球や心筋組織、心筋の血管内皮に発現していた。

また川崎病急性期心臓組織においては、対照および川崎病遠隔期の心臓組織に比べて、リンパ管の管腔面積の拡大(図1)が統計学的に有意に認められ、リンパ管新生がおきてい

る可能性が示唆された。

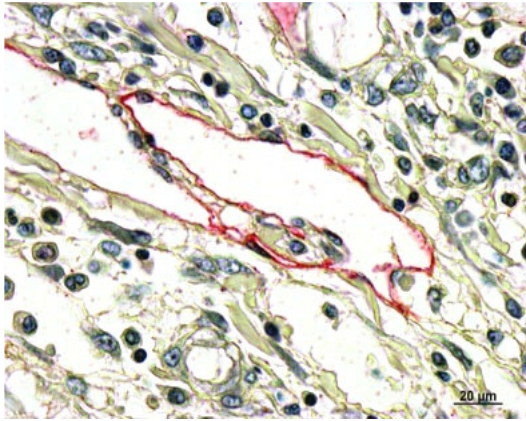


図1 急性期川崎病組織におけるリンパ管の拡大とその内皮細胞が内皮細胞に対する抗体で染色されている。

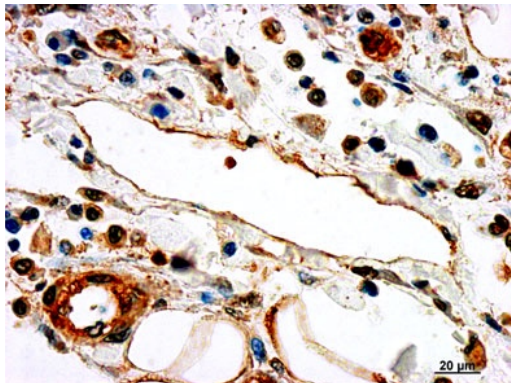


図2 拡張したリンパ管組織の内皮細胞にはVEGF-D蛋白の発現が見られた。同時に、浸潤細胞もVEGF-D蛋白を発現している。

VEGF-Dの受容体はリンパ管内皮に発現し(図2)、これらの所見は、リンパ管新生がおこっていることを示唆する所見であった。

さらに、血液中のVEGF-D値は、冠動脈瘤患者の回復期では冠動脈異常を来たさなかった患者に比して有意に低値であることが判明した。

川崎病血管炎においては、TNF- α などの炎症性サイトカインやケモカインが過剰に産生され、これらサイトカイン産生過剰と冠動脈瘤との関連が指摘されている。そこで、VEGF-D産生に対するTNF- α の影響を検討した。線維芽細胞をTNF- α で刺激すると細胞内でのVEGF-D mRNA発現がコントロールに比べて約1/10に低下することが判明した。

以上より、川崎病血管炎において、VEGF-Dが血管炎の修復機転に大きな役割をしていることが示唆された。冠動脈瘤患者ではリンパ

系システムの治癒機転が遅れていること、そのために冠動脈壁の浮腫の遷延が冠動脈組織における虚血をもたらし、冠動脈壁の破綻から瘤形成にいたることが示唆された。

今後の更なる解析を通して、新たな治療法の開発に繋げていく考えである。

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)

Abe J, Ebata R, Jibiki T, Yasukawa K, Saito H, Terai M: Elevated granulocyte colony-stimulating factor levels predict treatment failure in patients with Kawasaki disease.

J Allergy Clin Immunol 122; 1008-1013, 2008. 査読あり

Hamada H, Terai M:

Treatment of Kawasaki disease - perspective.

Nippon Rinsho. 2008 Feb;66(2):360-4.

Review. Japanese.

寺井 勝: 川崎病. 「小児科とサイトカイン」 小児科診療 診断と治療社, 71; 2191-2196, 2008. 査読なし

寺井 勝: 小児内科増刊号 川崎病 40 巻 1445-1449, 2008. 査読なし

Higashi K, Terai M, Hamada H, Honda T, Kanazawa M, Kohno Y.:

Impairment of angiogenic activity in the serum from patients with coronary aneurysms due to Kawasaki disease

Circ J. 2007 Jul;71(7):1052-9. 査読あり

[学会発表](計 2件)

安川久美, 東 浩二, 寺井 勝, 上原里程, 屋代真弓, 中村好一, 柳川 洋: 川崎病巨大冠動脈瘤の検討-第19回川崎病全国調査から- 第27回日本川崎病研究会 2008年10月 札幌

Ebata R, Yasukawa K, Hamada H, Higashi K, Abe J, Terai M.: Increased production of vascular endothelial growth factor-D and lymphangiogenesis in acute Kawasaki disease. 9th International Kawasaki

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺井 勝 (TERAI MASARU)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：80207472

(2) 研究分担者

安川 久美 (YASUKAWA KUMI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10375769

(3) 研究協力者

江畑 亮太 (EBATA RYOTA)

千葉大学大学院生