

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790761

研究課題名（和文）川崎病に於ける冠動脈瘤発症と活性酸素生成酵素 Nox ファミリー

研究課題名（英文） Dynamic analysis of the Nox family NADPH oxidases in the pathogenesis of Kawasaki disease

研究代表者

守屋 美恵 (MORIYA MIE)

国立成育医療センター（研究所）・母児感染研究部・共同研究員

研究者番号：60470001

研究成果の概要（和文）：TNF- $\alpha$ により亢進した好中球 Nox2 由来の活性酸素が、好中球の血管外遊出、更には、冠動脈瘤形成の鍵を握る血管内皮細胞での ICAM-1 発現に関与すると報告されている。しかし、Nox に対する阻害剤や還元剤を用いた間接実験で直接的な証明はない。本研究では、LCWE を投与した川崎病モデルマウス作製して Nox2-KO マウスに適用し、血管内皮細胞での ICAM-1 発現に好中球 Nox2 由来の活性酸素が関与しないことを明らかにした。川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- $\alpha$ が直接血管内皮細胞の ICAM-1 発現を促し、冠動脈瘤形成に関与する可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Potentiated generation of reactive oxygen species (ROS) from neutrophil Nox2 by TNF- $\alpha$  was reported to contribute to ICAM-1 expression in vascular endothelial cells (VEC), which plays a key role in neutrophil extravasation and following aneurysm formation. However, this possibility was only concluded by indirect studies using reducing agents or inhibitors against Nox. In order to get a definite answer, we produced a mouse model of Kawasaki disease using LCWE, and then inspected it with Nox2-KO mice. The inspection studies clearly demonstrated that TNF- $\alpha$  induces ICAM-1 expression, directly affecting VEC without the aid of ROS from neutrophil Nox2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞生物学

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・循環器・Nox・酸化ストレス・TNF- $\alpha$

## 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疾患であり、全身性の難治性血管炎を発症する。患児の約 10%が冠動脈瘤を併発し、小児に於ける後天的心疾患の第一位を占めている。未だ病因は特定されていないが、何らかの感染因子が引き金となり、その発症に患児の遺伝的多型が関与するかも知れないと考えられている。川崎病急性期、冠動脈瘤の形成に先立って炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ の血中濃度が持続的に上昇することが報告されている。冠動脈瘤の発症機序は未だ解明されていないが、血管内膜傷害による冠動脈の弱体化、特に、好中球に多く含まれるエラスターゼによる内弾性板の切断が決定的であると考えられる。

一方、活性酸素が様々な疾患の病態形成に関与することが明らかにされているが、川崎病に於ける血管炎発症との関係は解明されていない。食細胞、特に、好中球に発現している活性酸素生成酵素 (Nox2 型 NADPH oxidase) は、生体組織中最大の酸素ラジカル発生源である。近年、プロトタイプである Nox2 のホモログ遺伝子が様々な組織で発見され、Nox family NADPH oxidases (Nox1~Nox5) を形成することが明らかにされた。Nox (NADPH oxidase) は、血管壁構築細胞 (内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞) にも発現している。川崎病急性期に高値 TNF- $\alpha$ の作用により好中球および血管内皮細胞の活性酸素生成系が亢進し、その酸化ストレスが血管炎発症の引き金となる血管内皮細胞および基底膜の乱れ・破壊に関与する可能性が考えられる。更に、冠動脈瘤の組織学的解析から病変部位に高い活性酸素生成能を持つ好中球の顕著な浸潤が認められている。

## 2. 研究の目的

最近、*L. casei*の細胞壁抽出物 (LCWE) を投与した川崎病モデルマウスを用いて、TNF- $\alpha$ が冠動脈瘤形成の鍵を握ることが報告された。更に、最も信頼され普及している免疫グロブリン補充療法に耐性を示して冠動脈瘤を形成する患児に、TNF- $\alpha$ の中和抗体 (infliximab) を投与すると症状の改善が認められることが報告されている。TNF- $\alpha$ は食細胞や血管内皮細胞の活性酸素生成能を亢進させるが、亢進した好中球 (Nox2) 由来の活性酸素が血管内皮細胞の ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 発現を促し、好中球の血管外遊出を促進すると報告されている。血管外遊出した好中球は、冠動脈瘤形成に至るエラスチン断裂に大きく関

与する。しかし、Nox に対する阻害剤や還元剤を用いた間接実験で直接的な証明はない。本研究では、好中球および血管内皮細胞、どちらの生成する活性酸素が好中球の血管外遊出の鍵である接着分子 ICAM-1 の発現に関与しているか、LCWE を投与した川崎病モデルマウスを作製して Nox2-KO マウスに適用すると共に、マウス血管内皮腫様細胞株 (UV $\varphi$ 2) を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物 (倫理面の配慮)

野生型 (C57BL/6J) および同系の Nox2-knockout (KO) マウスは、国立成育医療センターSPF 動物実験室で繁殖維持した。全ての実験は動物実験委員会の承認 (#05-04) の下に、無用なストレス・苦痛を与えぬよう配慮し、国立成育医療センターの動物実験指針に準拠して行った。更に、Nox2-KO マウスの使用に関しては、遺伝子組み換え安全委員会の承認 (#0010) を得た。

### (2) マウス好中球

野生型および Nox2-KO マウスの好中球は、6%カゼイン (2 ml) を腹腔に注射し、5~7 時間後、腹腔に浸潤した細胞を回収し、比重遠心法 (Ficoll-Paque PLUS) にて分離後、PBS で洗浄した。Trypane-blue dye exclusion test で確認した結果、生存率は 95%以上であった。

### (3) LCWE の精製

LCWE (*Lactobacillus casei* cell wall extract) は、Lehman TJ らの方法 (Arthritis Rheum 1983) に準じて精製した。Group B *L. casei* (ATCC 1158) を MRS ブロス中で培養し、SDS を用いて細胞膜を破壊した後、十分に PBS で遠心洗浄を行い、DNase および RNase による核酸分解、トリプシンによる蛋白質分解を行った。その後、超音波破碎 (2 時間) により細胞壁を破碎し、遠心分画により上清を回収して PBS に懸濁して LCWE 画分とした。LCWE 量はフェノール・硫酸比色定量法により求めた。更に、エンドスペシー法 (生化学工業) を用いてエンドトキシンの混入がないことを確認した。

### (4) 川崎病モデルマウスに於ける TNF- $\alpha$ および ICAM-1 発現解析

川崎病モデルマウスは、Hui-Yuen JS らの方法 (J Immunol 2006) に準じて作製した。Leman TJ らの方法で精製した LCWE (0.84 mg/mouse) を 5~7 週齢の野生型お

よび Nox2-KO マウスの腹腔に投与し、0~24 時間にかけてネプタール (50 mg/kg, ip) 麻酔下にて心臓、脾臓を摘出し、下記に示す TNF- $\alpha$  および ICAM-1 の mRNA 発現解析に供した。一部の実験では TNF- $\alpha$  (PeproTech: 0.1~500 ng/10 g mouse wt) を直接腹腔に投与し、心臓に於ける ICAM-1 mRNA の発現を解析した。

(5) UV $\varphi$ 2 細胞に於ける ICAM-1 発現解析  
マウス血管内皮腫様細胞株 (UV $\varphi$ 2 細胞) は理化学研究所より購入した。5% FCS を含む DMEM 培地中で培養し、0.05 % (w/v) trypsin/0.2 mM EDTA を用いてフラスコから剥離し、週 2 回継代した。実験には 6 穴プレートを用い、ほぼコンフルエントに達した UV $\varphi$ 2 細胞を使用した。FCS を含まない DMEM 培地中で 2 時間培養後、TNF- $\alpha$  (0.1~25 ng/ml) および好中球 ( $1 \times 10^6$  cells/well) を単独あるいは一緒に UV $\varphi$ 2 細胞に添加した。1~24 時間培養後 PBS でプレートを洗浄し、ICAM-1 の発現解析に供した。

(6) mRNA の発現解析  
mRNA の発現は、total RNA 抽出後、逆転写により cDNA を調整し、real-time PCR 法で解析した。マウス心臓および脾臓は摘出後直ちに液体窒素中に回収して凍結破碎し、Trizol reagent (Invitrogen) を用いて、UV $\varphi$ 2 細胞は培養後 RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて、total RNA を抽出した。次に、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) により cDNA に逆転写し、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用いて real-time PCR ( $\Delta\Delta Ct$  法) で解析した。

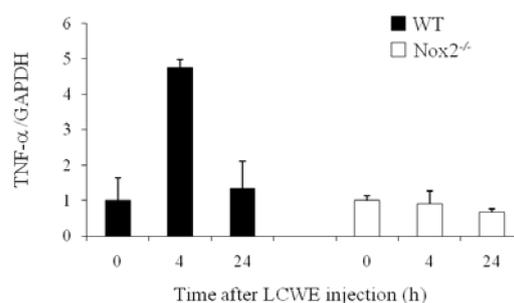
#### 4. 研究成果

(1) LCWE 投与によるマウス脾臓での TNF- $\alpha$  発現

*L. casei* の細胞壁抽出物 (LCWE) を用いて、川崎病に類似した血管炎および冠動脈瘤を発症する川崎病モデルマウスが報告されている。そこで、Lehman TA らの方法に従って精製した LCWE をマウス腹腔に投与して川崎病モデルマウスを作製した。この川崎病モデルマウスを用いて、冠動脈瘤の形成に至る過程で TNF- $\alpha$  が決定的な役割を果たすことが報告されている (Hui-Yuen JS et al, *J Immunol* 2006)。末梢免疫系の TNF- $\alpha$  産生活性を調べるため、先ず、real-time PCR 定量法の確立を試み、脾臓に於ける内在性コントロールとして GAPDH が適切であることを確認し、 $\Delta\Delta Ct$  法を用いて TNF- $\alpha$  mRNA の発現を解析した。LCWE 投与 0、4、24 時間後、マウスから脾臓を摘出して TNF- $\alpha$  mRNA の発現を解析した結果、野生型マウス

(WT) では 4 時間後に一過性の TNF- $\alpha$  の上昇が確認され、24 時間後は初期値に戻った (Fig. 1)。Nox2-KO マウスの脾臓ではこの LCWE に依存する TNF- $\alpha$  産生の上昇は認められなかった。従って、食細胞、特に、マクロファージからの TNF- $\alpha$  産生に Nox2 由来の活性酸素が関与し、川崎病の発症に関連する可能性が示唆された。

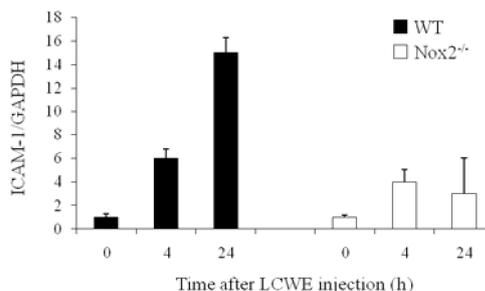
Fig.1 Effect of LCWE on the TNF- $\alpha$  mRNA expression in the mouse spleen



(2) LCWE 投与によるマウス心臓での ICAM-1 発現

好中球は血管内皮細胞上に発現している ICAM-1 と接着しながら血管外へ遊走し、弾性板の崩壊を引き起こすと考えられる。従って血管炎および冠動脈瘤発症に於ける ICAM-1 の意義は大きい。そこで、上記した LCWE 投与 0、4、24 時間後、脾臓を摘出した同じ個体から心臓を摘出し、ICAM-1 mRNA の発現量を real-time PCR 法で解析した。野生型マウス心臓に於ける ICAM-1 mRNA の発現は、LCWE 投与 4 時間後より増加し、24 時間後では顕著であった (Fig. 2)。Nox2-KO マウスでも ICAM-1 の発現上昇が見られたが、野生型マウスほど顕著ではなかった。従って、高値血中 TNF- $\alpha$  存在下、亢進した好中球あるいは血管内皮細胞由来の活性酸素が血管内皮細胞での ICAM-1 産生を促し、川崎病の発症に関与する可能性が考えられる。

Fig. 2 Effect of LCWE on the ICAM-1 mRNA expression in the mouse heart



(3) TNF- $\alpha$ 投与によるマウス心臓での ICAM-1 発現

TNF- $\alpha$  は好中球の活性酸素生成能 (Nox2) を賦活化するが、この亢進した活性酸素が血管内皮細胞の NF- $\kappa$ B を活性化して ICAM-1 産生を促す可能性が報告されている (Fan J et al, J Biol Chem 2002)。しかし、Nox に対する阻害剤や還元剤を用いた間接実験であり、直接的な証明はなされていない。そこで、Nox2-KO マウスに直接 TNF- $\alpha$  を投与して検証実験を行った。TNF- $\alpha$  (0.1~500 ng/10g wt) を腹腔投与し、0、0.5、1、2、4 時間後、心臓を摘出して ICAM-1 mRNA の発現を real-time PCR 法で解析した。野生型マウスでは、0.5 時間後から ICAM-1 mRNA の発現上昇が認められ、1~2 時間でピークに達し、4 時間後には殆ど初期値に戻った (Fig. 3)。そこでピーク値を示した 1、2 時間後に於ける ICAM-1 mRNA の発現を野生型および Nox2-KO マウスの心臓で比較した (Fig. 4)。野生型マウスでは 1、2 時間後、共に TNF- $\alpha$  の用量に依存して ICAM-1 mRNA の発現が上昇した。驚いたことに、Nox2-KO マウスでも野生型に匹敵あるいはそれ以上の ICAM-1 mRNA 発現が認められた。従って、血管内皮細胞に於ける ICAM-1 の発現には好中球由来の活性酸素は関与しないことが証明された。TNF- $\alpha$  が直接血管内皮細胞に作用して ICAM-1 の産生を促すと考えられる。

Fig. 3 Time course of TNF- $\alpha$  induced ICAM-1 mRNA expression in the mouse heart

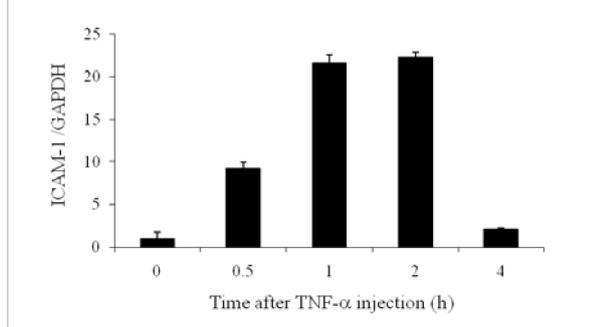
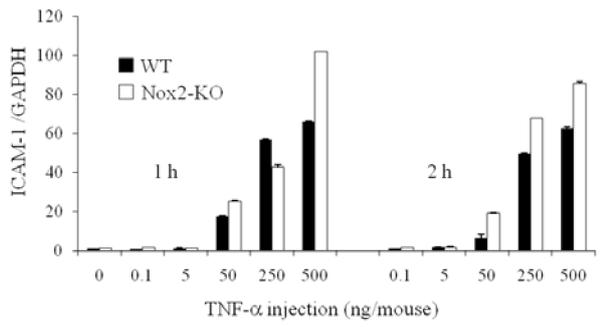


Fig. 4 Effect of TNF- $\alpha$  on the ICAM-1 mRNA expression in the mouse heart

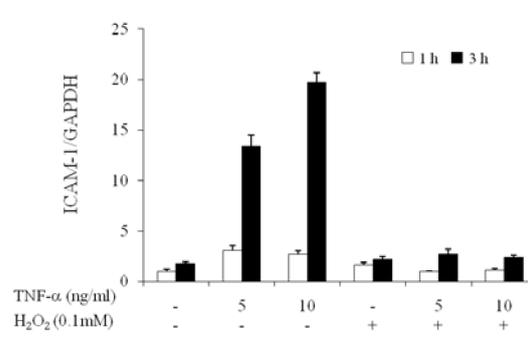


(4) UV $\alpha$ 2 細胞での ICAM-1 発現に対する TNF- $\alpha$  および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響

マウス心臓には血管内皮細胞に加え血管平滑筋や繊維芽細胞が存在する。これらの細胞も各種 Nox を発現し、TNF- $\alpha$  の影響を受けると考えられる。そこで、血管内皮細胞での ICAM-1 発現に焦点を絞って好中球由来活性酸素の影響を調べるため、マウス血管内皮腫様細胞株 (UV $\alpha$ 2) を用いて *in vitro* 解析を行った。UV $\alpha$ 2 細胞での ICAM-1 mRNA の発現は、TNF- $\alpha$  添加 2~3 時間後に最大値を示し、1 時間後の発現は僅かであった (Figs. 5 and 6A)。TNF- $\alpha$  添加 6 時間後、0.1~5 ng/ml 濃度範囲では発現が低下したが、25 ng/ml では低下は認められなかった (Fig. 6A)。培養液中に存在する高濃度の TNF- $\alpha$  が持続的に ICAM-1 mRNA の発現を維持した結果であると考えられる。24 時間後は、すべての TNF- $\alpha$  濃度に於いて ICAM-1 mRNA の発現は低下した (Fig. 6A)。

次に、血管内皮細胞での ICAM-1 発現に活性酸素が関与するか、O<sub>2</sub> の不均化生成物である試薬 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を UV $\alpha$ 2 細胞に添加した。3 時間後、5 および 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  は共に単独で強い ICAM-1 mRNA 発現活性を示した。しかし、0.1 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は全く ICAM-1 mRNA の発現を促さず、更に、TNF- $\alpha$  による発現を阻害した (Fig. 5)。

Fig. 5 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on TNF- $\alpha$  induced ICAM-1 mRNA in UV $\alpha$ 2 cells



(5) UV $\alpha$ 2 細胞での ICAM-1 発現に対する好中球由来活性酸素の影響

野生型および Nox2-KO マウスから分離した好中球を UV $\alpha$ 2 細胞に添加し、ICAM-1 mRNA 発現に対する好中球由来活性酸素の影響を解析した。上記した様に (Fig. 6A)、UV $\alpha$ 2 細胞に TNF- $\alpha$  を添加した場合、TNF- $\alpha$  は用量依存的に ICAM-1 mRNA の発現を促した。予想に反して、野生型マウス由来の好中球は、単独でも 1~25 ng/ml の TNF- $\alpha$  に匹敵する ICAM-1 mRNA 発現活性を示した (Fig. 6B)。この好中球による ICAM-1 mRNA の発現活性も、TNF- $\alpha$  によ

る場合と同じく 2 時間後にピークを示し、6 時間および 24 時間後には低下が認められた。好中球と一緒に TNF- $\alpha$  を添加すると、TNF- $\alpha$  の用量に依存した更なる ICAM-1 mRNA の発現が認められ、この発現は TNF- $\alpha$  単独で得られた値にほぼ匹敵した (Fig. 6B)。TNF- $\alpha$  は好中球の O<sub>2</sub> 生成を刺激することが知られている。従って、TNF- $\alpha$  存在下、野生型マウス由来好中球から生成された O<sub>2</sub> が UV $\eta$ 2 細胞の ICAM-1 mRNA 発現を促進したかも知れない。しかし、活性酸素生成能を欠く Nox2-KO マウス由来好中球も単独で野生型マウス好中球に匹敵する ICAM-1 mRNA 発現活性を示し、TNF- $\alpha$  も用量依存的に発現増強した (Fig. 6C)。これらの結果は、好中球由来の活性酸素が血管内皮細胞の ICAM-1 産生には関与せず、TNF- $\alpha$  が直接血管内皮細胞に作用することを示す。更に、好中球の顆粒成分が ICAM-1 の発現に関与する可能性も示唆している。

## 5. 主な発表論文等

「学会発表」(計 2 件)

- ① 網脇祥子、内田友祐、吉田ルシア幸子、守屋美恵. Dynamic analysis of the Nox family NADPH oxidases in the pathogenesis of Kawasaki disease. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、10 月 21-24 日、2009
- ② 守屋美恵、吉田ルシア幸子、網脇祥子. Is the neutrophil NADPH oxidase (Nox2) involved in the pathogenesis of Kawasaki disease? 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9-12 日、2009

**Fig. 6 PMN-dependent ICAM-1 mRNA expression in UV $\eta$ 2 cells**

