

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591188

研究課題名（和文） 川崎病血管炎から動脈硬化性変化への進展に関する増悪メカニズムを探る

研究課題名（英文） Research on mechanism of progression from vasculitis of Kawasaki disease to sclerotic lesion

研究代表者

河井 容子 (KAWAI YOKO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：60405248

研究成果の概要（和文）：血管障害や動脈硬化の発症に、炎症や酸化ストレス、血管内皮機能障害の重大な関与が知られている。これらはサイトカイン産生や血小板活性化を惹起し、さらに病態が進展する。本研究では、川崎病における炎症、酸化ストレス及び血小板活性化について検討した。急性期において、奏功例ではIVIGにより酸化ストレスおよび炎症性マーカーは速やかに低下したが、IVIG不応例では治療前の抗酸化マーカーが低値であり、治療後も酸化ストレス及び炎症性マーカーの高値が続いた。血小板の活性化は半年以上も持続していた。酸化ストレス及び血小板活性化の評価は、川崎病の病態把握に非常に有用であり、臨床的意義が示された。

研究成果の概要（英文）：Inflammation, oxidative stress and vascular endothelial disorder related deeply the onset of vascular disorder and arteriosclerosis. They initiate production of various cytokines and platelet activation, thereby progress disease condition. We examined platelet activation and oxidative stress in acute Kawasaki disease. Oxidative stress and inflammatory markers in IVIG-responder group immediately decreased by IVIG treatment. On the other hand, antioxidant marker of IVIG-nonresponder group in pre-treatment was significantly lower than that of healthy control and IVIG-responder group, and oxidative stress and inflammatory markers maintained high value. Platelet was activated for more six months from the onset of Kawasaki disease. This study showed the evaluation of oxidative stress and activated platelets are useful and have clinical significance.

t.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：小児循環器学、川崎病、酸化ストレス、血小板、動脈硬化、血管障害

1. 研究開始当初の背景

乳幼児期に発症する全身性血管炎である川崎病は年々増加傾向をたどっており、今年年間発症は1万人を超す。急性期治療を行ったにも関わらず合併症として特に急性期から回復期にかけて冠動脈瘤を形成することがあり、将来的に血栓形成を伴う閉塞性変化や狭窄性病変へと進展する例も散見され、若年性虚血性心疾患の原因として益々重要な疾患となっている。

近年川崎病既往が早発動脈硬化発症のリスクファクターとなる可能性が指摘されるようになった。動脈硬化の発症と進展に血管内皮障害と慢性炎症が関与していることは周知の事実であるが、さらに酸化ストレスの関与が大きく注目され始めている。川崎病遠隔期症例における動脈硬化発症と進展においてもこれらの関与が十分に考えられることから、我々は血管内皮障害と慢性炎症、酸化ストレスの3者の悪循環がいずれ動脈硬化発症につながるという仮説を提唱した。

2. 研究の目的

川崎病急性期では、血小板凝集能の亢進および著名な血小板数増加が見られることが知られている。この血小板凝集能の亢進は、冠動脈瘤の形成に関与しているほか、血管病変の血栓性閉塞や動脈硬化性病変への進展においても重要な危険因子である。

血小板が活性化され凝集に至る経路やそれに関わる因子は数多く存在するが、活性化血小板からは、マイクロパーティクルと呼ばれる微小な膜小胞体が放出されることが知られている。この血小板由来マイクロパーティ

クル (Platelet-derived microparticle: PDMP) は、プロコアグulant活性を有し、その活性は血小板表面よりも50~100倍高く、凝固促進機能は活性型血小板以上に重要である可能性が示唆されている。また血管炎症に関わる機能粒子であり、血小板活性化マーカーとして、さらには血管炎症のマーカーとして有用であることが報告されている。このため、PDMPは血小板活性化動態のみならず、血管炎病態をも評価できる可能性が考えられる。さらに、白血球と血管内皮細胞の接着分子の発現を増強させ、動脈硬化発症メカニズムとの関与も報告されている。動脈硬化は、密接に関わり合う炎症と酸化ストレスに血管内皮障害が加わり三者が互いに増悪因子として働くことで動脈硬化性病変へと進展していくと考えられている。血管炎を主体とし、病変部での炎症性細胞の存在や種々のサイトカイン産生が見られる病態からみて、川崎病においても、急性期および慢性期の血管障害の病態に酸化ストレスが関与する可能性が示唆されている。

酸化ストレスの定義は、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS)の生成系と消去系のバランスが崩れであることから、酸化ストレスを検討するにあたり両者を調べる必要がある。

本研究では、川崎病急性期における血小板活性化、酸化ストレスおよび炎症の臨床学的意義について検討した。

3. 研究の方法

(1) 川崎病急性期における血小板活性化動態

対象は、当院と研究協力機関にて川崎病と診断された20例。うち、IVIg施行例は16

例、非施行例は4例であった。

通常の採血時に、併せて本研究用血液を採取した。治療開始直前、治療開始2日後、2週間後、発病1か月後、2か月後、3か月後、6か月後にそれぞれ採血を行い、以下の測定を行った。

・血小板数：本学臨床検査部に委託。

・PDMP：採取した血液は、EDTA-ACD採血管を用いて血漿を遠心分離した。得られた血漿のPDMPをELISA法で測定した。なお、川崎病急性期では血小板数が大きく変動することから、血小板1万あたりのPDMP値で評価した。

(2) 川崎病急性期における酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン動態

対象は、川崎病急性期19例。うち6例は、初回IVIG治療終了48時間後も37.5℃以下に改善せず、IVIGあるいはステロイドによる追加治療を要した。これらIVIG不良例も初回IVIG投与2週間後には解熱していた。

採血による検体採取は、IVIG治療直前、IVIG治療終了直後、IVIG治療終了2週間後に行い、それぞれ酸化ストレス指標として reactive oxygen metabolites (ROM)、抗酸化力指標として biological antioxidant potential (BAP)、炎症性マーカーとして高感度CRP、IL-1, 2, 6、およびTNF- α を測定した。結果は、IVIG治療直前におけるそれぞれの測定値を100とし、変化率を求めて検討した。

・ROM、BAP：ウイスマー社製フリーラジカル解析装置を用いて測定。

・高感度CRP、IL-1, 2, 6、TNF- α ：BioPlex suspension array systemを用いて測定。

また、本研究は本学倫理委員会の承認のもとに行った。すべての研究対象者に、研究内容を十分に説明し、検体提供について自由意思で承諾を得るよう努め、書面による同意を

得た。研究対象者が若年でインフォームド・コンセントを得ることが困難な場合は、保護者等からのインフォームド・コンセントを得た。また、人権保護や個人情報保護に関して十分に配慮した。

4. 研究成果

(1) 川崎病急性期における血小板活性化動態

一般的な急性有熱性疾患と比較し、治療開始前の川崎病例のPDMPは有意に高値であった。

IVIG施行例において、PDMPは施行後に有意に低下したが、IVIG非施行例ではむしろ上昇傾向を示した。

川崎病では、一般的な有熱性疾患と比較して、血小板が非常に活性化しており、急性期治療における抗血小板療法の必要性を裏付ける結果であった。

また、IVIGを施行し心血管後遺症がなかった症例の中で、急性期治療プロトコルに基づき発症から2~3か月後に抗血小板療法を中止したところ、PDMPが再上昇する症例が散見された。さらに発症後6か月が経過しても、やや高値を示す症例も見られた。そのため、川崎病血管炎で見られる血小板活性化は長期に渡り、抗血小板薬の中止時期には注意が必要である。このことから、川崎病発症から少なくとも抗血小板療法中止時期までのPDMP動態を評価することは、臨床的意義があると考えられる。また、冠動脈障害を合併した1例では、IVIG施行後も高値を維持しており、PDMPが血管炎の病態評価においても有用である可能性が示唆された。

(2) 川崎病急性期における酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン動態

IVIG奏功群のROMは、IVIG直前は明らかな高値を示し(623.5 \pm 85.2 U.CARR、P<0.0001 vs. control) だが、IVIG治療直後

には 567.0 ± 96.1 U.CARR ($P < 0.05$ vs. IVIG 直前) に、また IVIG 治療 2 週後には 448.6 ± 75.2 U.CARR ($P < 0.01$ vs. IVIG 治療直後) へと経過とともに速やかに低下していた。

一方、IVIG 不応群の ROM は、IVIG 直前は IVIG 奏功群と同様に明らかに高値 (566.5 ± 43.3 U.CARR、 $P < 0.01$ vs. control) を示したが、IVIG 初回治療直後には有意の低下を示さなかった (544.8 ± 71.2 U.CARR, n.p vs. IVIG 治療直前)。しかし、IVIG 初回治療 2 週後 (追加治療後) には有意に低下していた (368.7 ± 57.2 U.CARR、 $p < 0.01$ vs. pre-IVIG and post-IVIG)。なお、IVIG 奏功群と IVIG 不応群の間で、IVIG 治療直前の値には有意な差は見られなかった。

IVIG 奏功群の BAP において、IVIG 治療前 (2689.8 ± 225.1 mol/L) と治療直後 (2695.4 ± 280.0 mol/L) で明らかな変動は見られなかったが、IVIG 治療 2 週後は明らかな増加傾向を示し、IVIG 治療前および IVIG 治療直後と比較して有意に高値 (2870.0 ± 189.3 mol/L、 $p < 0.01$ vs. pre-IVIG、 $p < 0.05$ vs. post-IVIG) を示した。

一方、IVIG 不応群の BAP は、IVIG 治療前 (2476.3 ± 76.8 mol/L)、IVIG 初回治療直後 (2483.5 ± 204.7 mol/L)、IVIG 治療 2 週後 (2564.6 ± 162.9 mol/L) で、経過中で有意な変化を認めなかった。また、IVIG 不応群の BAP は対照群 ($p < 0.01$) および IVIG 奏功群 ($p < 0.05$) に比較して有意に低値を示していた。

IVIG 奏功群では ROM の変動とすべての炎症性マーカーは病勢に合わせて低下していた。一方、IVIG 不応群では hs-CRP、IL-6 が低下しているのに反して、ROM や TNF- α 、IL-1, 2 は低下していなかった。

川崎病急性期において、ROS 生成系の指標である ROM は、健常小児と比較して有意に

高値を示し、IVIG 治療により奏功群では、速やかに低下した。しかしながら、不応群においては IVIG 初回投与による有意な変化は見られなかった。

また、奏功群における IVIG 治療前の ROS 消去系指標である BAP は、健常小児と有意な差はなく、IVIG 治療 2 週間後に上昇した。一方で、不応群における IVIG 治療前の BAP は有意に低値を示し、IVIG による変化も認められず、奏功群とは明らかに異なる反応を示した。このことから、BAP が IVIG に対する反応性を予測するマーカーになり得る可能性が示唆された。また、IVIG 不応群では、ROM の低下および BAP の上昇が見られないことから、酸化ストレス状態が持続した状態にあることが予測される。酸化ストレスは炎症と相互に増悪因子として働き、今回の検討においても、奏功群において各炎症性マーカーは IVIG 治療により速やかに低下していったが、不応群においては hs-CRP よび IL-6 は低下したものの、IL-1, 2, TNF- α はほとんど変化しなかった。

本研究により、炎症性マーカー、酸化ストレス、PDMP 測定の臨床的意義が示された。今後はさらに、とくに IVIG 不応例に対する急性期治療において、血管障害発症・進展を阻止すべく、主要な役割を果たす炎症、酸化ストレスおよび血小板活性化の三者の悪循環を早急に断ち切り、改善するような治療が必要であると考えられる。

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 1 件)

Yoko Kawai, Kenji Hamaoka. Spontaneous Thrombotic Obstruction of Aneurysmal Coronary Arteriovenous Fistula. *Pediatr*

Cardiol, 2012. PMID:23341051 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河井 容子 (KAWAI YOKO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻
医

研究者番号：60405248

(2) 研究分担者

浜岡 建城 (HAMAOKA KENJI)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60189602

問山 健太郎 (TOIYAMA KENTARO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00433285

(3) 連携研究者

なし