

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591588

研究課題名(和文) 血管炎の急性期における血管平滑筋細胞の形質転換に伴う細胞機能・応答機構の解明

研究課題名(英文) Evaluation of vascular smooth muscle cell function and response mechanism according to transformation from constitution type to secretion type in acute phase of vasculitis

研究代表者

小川 俊一 (Ogawa, Shunichi)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：50194436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病類似の血管炎動物モデルを作成し、血管炎に伴い内弾性板の破壊により中膜から内皮下に血管平滑筋細胞が迷入することを組織学的に解明した。さらに、血管平滑筋細胞が形質転換を促すとされる転写因子((Kruppel-like zinc-finger transcription factor 5:KLF5、Early growth response factor-1:Egr-1)などの発現から内皮下に迷入した血管平滑筋細胞が構成型から分泌型に形質転換している可能性が示唆された。ただし、形質転換した血管平滑筋細胞の機能や応答機構については十分な解明がなされなかった。

研究成果の概要(英文)：I made a vasculitis animal model of the Kawasaki disease resemblance, and elucidated migration of a vascular smooth muscle cell from a media by the destruction of the inner elasticity band with a vasculitis histologically in the subendothelial site. Furthermore, the possibility that the vascular smooth muscle cell which migrated in the subendothelial site was transformed in a secretion type from a constitution type by the expression of transcriptional factors such as KLF5 and Egr-1 was suggested. But enough estimation was not accomplished about the function and response mechanism of a transformed vascular smooth muscle cell.

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

1. 研究開始当初の背景

- (1) 我々は以前から川崎病に合併した冠動脈障害について組織学的、形態学的、生理機能的、生化学的に瘤形成の機序やその血行動態について検討してきた。その中で、血管炎に伴い血管再構築が起こっていく経過で、血管平滑筋細胞が key を担っているのではないかと考えるようになった。
- (2) 特に、内弾性板の破壊により中膜から内皮下に迷入した血管平滑筋細胞が、構成型から分泌型に形質転換し、さらに組織破壊をもたらす瘤形成に大きく関与し、その後の血管再構築の際も形質転換した血管平滑筋細胞が多大な影響を及ぼすのではないかとこの仮説を強く抱いた。

2. 研究の目的

- (1) *Candida albicans* 培養液中の可溶性多糖体分画(CAWS)を用いて川崎病類似の血管炎動物モデルの作成を行う。
- (2) 作成した血管炎組織を用いて、血管平滑筋細胞の構成型から分泌型への形質転換する機序、および形質転換した平滑筋細胞の細胞機能、応答機構の解明を免疫組織学、分子生化学、分子生物学、微小電気生理学などの方法を用いて行う。

3. 研究の方法

- (1) CAWS を用いた血管炎の作成：4-5 週齢の DBA/2 系マウス(日本 SLC 株式会社)を用い、*Candida albicans* 培養液中の可溶性多糖体分画(CAWS)1mg/mouse をマウスの腹腔内に 5 日間投与し血管炎を作成。同様のマウスを用いて生食を腹腔内に 5 日間投与し、対照とする。2 週間後に屠殺し、Hematoxylin and Eosin(HE)染色および Elastica Masson Goldner(EMG)染色を行い、血管炎が惹起されているかどうか組織学的に検討する。
- (2) マウスの血漿サイトカイン、ケカインの検討：Bio-Plex system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて、23 のサイトカインとケカイン(IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17), eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, keratocyte-derived cytokine(KC), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF- $\alpha$  を測定。
- (3) 血管炎が惹起された動脈組織の免疫組織染色：血管炎の存在が確認された後、分化型血管平滑筋細胞から脱分化型血管平滑筋細胞に形質転換する際に、その過程に参与することが予想される転写因子(Kruppel-like zinc-finger transcription factor 5:KLF5、Early growth response factor-1:Egr-1)と M-CSF の受容体であ

る M-CSFR に対する抗体を作成し、免疫組織染色を行う。

- (4) 血管平滑筋細胞の単離、および各培養細胞の作成：血管炎が惹起されている事を確認後に、大動脈パルシバ洞左冠尖から左冠動脈主幹部を切除。さらに、切除した組織を培養液中(Dullbecco's modified Eagle's 液)に 10% fetal bovine serum、1% penicillin/streptomycin、1% L-glutamine を添加で細切り、37 $^{\circ}$ C で 5-8 分間インキュベートする。その後組織を collagenase (0.25mg/ml Yakult 社)を含む液で 37 $^{\circ}$ C 5-7 分間インキュベート。その後酵素を含まない液に保存。組織片を液中で振ることにより単離血管平滑筋細胞を得ることが出来る。単離した血管内皮細胞を培養液に満たしたデベッキ内に細胞数が  $1 \times 10^5$  個/ml になるように調整し培養液と共に 37 $^{\circ}$ C、95%O $_2$ 、5%CO $_2$  下にて培養する。血管平滑筋細胞は培養 2 日目には細胞が互いに confluent となると予想している。
- (5) 血管平滑筋細胞微小電気生理学的検討：血管炎および対照の動脈組織より得られた単離血管平滑筋細胞に対してパッチクランプ法を用いて whole cell 膜電位依存性 Ca $^{2+}$  チャンネルおよび K $^{+}$  チャンネル電流の測定を行う。さらにそのデータを解析ソフト(pCLAMP ver 8, Axon Instruments, USA)を用いて解析、検討する。
  - (ア) 膜電位依存性 Ca $^{2+}$  チャンネル電流の検討：細胞灌流液(mM)：NaCl 143, KCl 5.4, NaH $_2$ PO $_4$  0.33, MgCl $_2$  0.5, Glucose 5.5, HEPES 5, BaCl $_2$  2 (pH 7.4) パッチ電極内組成(mM)：CsCl 110, TEA-Cl 20, MgCl $_2$  5, Na $_2$ -ATP 5, EGTA 4, HEPES 10 (pH 7.2)すべての電気生理学的実験は室温(約 22 $^{\circ}$ C)にて施行する。
  - (イ) 膜電位依存性 K $^{+}$  チャンネル電流の検討：細胞灌流液(mM)：NaCl 143, KCl 5.4, NaH $_2$ PO $_4$  0.33, MgCl $_2$  0.5, CaCl $_2$  1.8, glucose 5.5, HEPES 5, CdCl $_2$  0.2mM (Ca $^{2+}$  current の阻害のため) (pH 7.4)。パッチ電極内組成(mM)：KOH 120, KCl 20, MgCl $_2$  2, HEPES 5, EGTA 10, ATP-Mg 1, Aspartic Acid 60 (pH 7.2)すべての電気生理学的実験は室温(約 22 $^{\circ}$ C)にて施行する。
- (6) 各培養細胞よりの mRNA の抽出：血管炎が惹起された血管平滑筋細胞および対照の血管平滑筋細胞をそれぞれ培養し、培養細胞より mRNA を抽出する。
- (7) DNA チップによる網羅的遺伝子発現の評価：DNA チップ(CodeLink Bioarray, Amersham Biosciences 社製)および

DNA プロファイリング解析装置(Amersham Biosciences 社製)を用いて各種培養平滑筋細胞に発現するシグナルを検討する。

- (8) 定量 PCR による遺伝子発現量の検討: 遺伝子プロファイリング解析の結果、発現の変動が確認された遺伝子についてはプローブ (アプライドバイシステム社製)を用いて TaqMan PCR により定量 PCR を行い、遺伝子発現を定量する。
- (9) 血管平滑筋細胞におけるサイトカイン、ケカイン、増殖因子、抗血栓因子、接着因子、活性酸素種のスカベンジャー酵素、細胞外マトリックス分解プロテアーゼの変動: 血管平滑筋細胞の形質転換に関係すると予想される因子が遺伝子プロファイリングにて検出できなかった場合には、以下の変動予想因子に対して定量 PCR または、免疫組織染色を行う。サイトカイン(IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ )、ケカイン(IL-8, MCP-1)、増殖因子(TGF- $\beta$ , VEGF)、向血栓因子(TF, PAI-1)、接着因子である ICAM-1, VCAM-1)、活性酸素種のスカベンジャー酵素(SOD)、細胞外マトリックス分解プロテアーゼ(MMP-1, MMP-3, MMP-9)の発現を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験動物の身体的評価:

CAWS群およびcontrol群において、マウスの体重(CAWS群:20.9 $\pm$ 0.9g、Control群:21.5 $\pm$ 0.8g)、心臓重量(CAWS群:0.13 $\pm$ 0.03g、Control群:0.14 $\pm$ 0.03g)および心臓重量・体重比(CAWS群:0.60 $\pm$ 0.05、Control群:0.62 $\pm$ 0.08)について検討したが、各項目ともに有意な変動はなく、CAWSが実験動物の発育に与えた影響はこれらの指標で見られる限りないと考える。

##### (2) 組織学的所見:

CAWSを5日間腹腔内投与した2週間後の血管の組織は全例において大動脈バルブから左右の冠動脈分岐部にかけて汎血管炎の組織所見が認められた。好中球やリンパ球、組織球の浸潤が認められ(図-1)、一部において内・外弾性板は破壊され、冠動脈瘤の形成が認められ(図-2)、川崎病に伴う冠動脈瘤形態と類似の形態を呈していた。さらに内膜下にフィブリンの析出および膠原線維の増殖に混在して血管平滑筋細胞の中膜から内皮下への迷入が確認された。一方、Control群では全例において血管炎を示唆する所見は認められなかった(図-3、図-4)。

図-1 CAWS群 HE 染色



図-2 CAWS群 EMG 染色

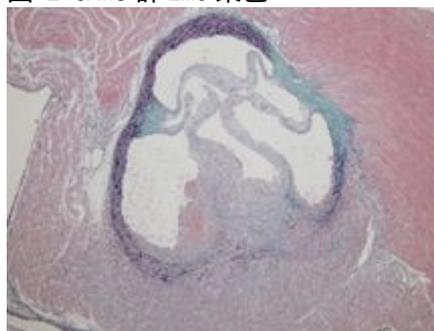


図-3 Control 群 HE 染色

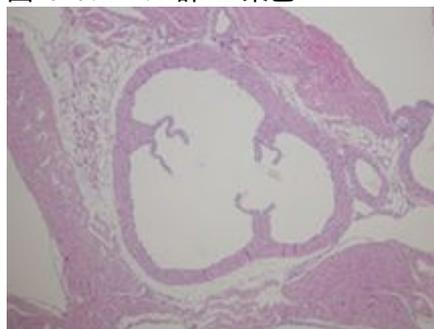
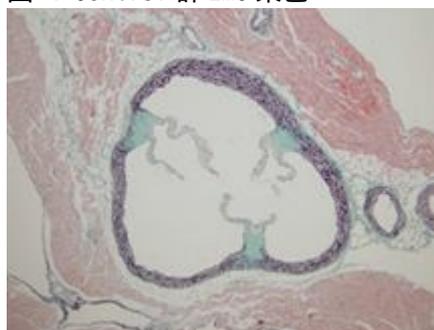


図-4 Control 群 EMG 染色



- (3) マウスの血漿サイトカイン・ケカイン濃度の検討  
検討した23個のサイトカイン・ケカインのうち CAWS群においてIL-13, IL-17, KC, TNF $\alpha$  がControl群に比し有意に高値を呈した (Table1)。以上より血管炎にはこれらのサイトカイン・ケカインの関与が大である事が示唆された。

#p<0.001 versus Control群 (n=4)

	CAWS 群	Control 群
IL-13	277+98.8#	142+69.2
IL-17	44+17.7#	7.71+3.78
KC	113+61.5#	24.4+31.4
TNF	276+75.1#	152+54.9

(4) KLF5, Egr-1 の免疫組織染色:

KLF および Egr-1 による免疫組織染色では 40 倍の顕微鏡視野における 150 x 150 μ m<sup>2</sup> の KLF5 陽性細胞および Egr-1 陽性細胞を測定し、Control 群との比較検討を行った。

Control 群では KLF5 陽性細胞および Egr-1 陽性細胞は全く認められなかったが、CAWS 群では有意に KLF5 陽性細胞(n=4, 24±6.8cells)および Egr-1 陽性細胞(n=3, 13±4.6cells)が認められた。

(5) 血管平滑筋細胞の単離および各培養細胞の作成:

血管炎の内膜側および中膜側、さらに control の組織を採取し、血管平滑筋細胞を単離し、それぞれの細胞を培養する予定であった。しかし、中膜組織からの血管平滑筋細胞(構成型と考える)と、内皮下に迷入した血管平滑筋細胞(分泌型と考える)の形態上の区別が出来ず、正確にそれぞれの細胞を単離することが不確かであった。従って、それらを用いた培養細胞も作成することが出来なかった。

当然、単離細胞を用いた whole cell Patch clamp 法による膜電位依存性 Ca<sup>2+</sup> および K<sup>+</sup> チャンネル検査は施行できなかった。さらに、各種培養細胞を用いておく合う予定であった、形質転換したと考えられる血管平滑筋細胞の DNA チップによる網羅的遺伝子発現の評価、ならびに、定量 PCR による遺伝子発現量の検討も施行することが出来なかった。

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 15 件)

- (ア) 小川 俊一、冠動脈疾患(下) - 診断と治療の進歩 - XV. 川崎病の診断・治療の現状、日本臨床、査読無、69 巻、2011、529-535
- (イ) 小川 俊一、落 雅美、冠動脈障害を有する川崎病既往者の冠循環動態および侵襲的治療前後の冠循環動態を考察する、J Jpn Coron Assoc、査読有、17巻、2011、66-74
- (ウ) 小川 俊一、小児における冠攣縮性狭心症に対する侵襲的検査補綴野重要性と問題点、日本小児循環器学会雑誌、査読有、

28巻、2012、65-66

- (エ) 小川 俊一、冠循環生理の基本と川崎病後遺症の各病径における冠循環動態、日本小児循環器学会雑誌、査読有、28巻、2012、117-125
- (オ) 勝部 康弘、小川 俊一、循環器疾患診療のツールとしての「イマ-カ」小児循環器疾患」、Heart View、査読無、16巻、2012、96-102
- (カ) 小川 俊一、川崎病のup to date冠動脈病変治療の進歩、小児科、査読有、2012、1795-1801
- (キ) Kobayashi T、Saji T、Ogawa S、他、Efficacy of immunoglobulin plus predonisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease (RAISE study): a randomized, open-label, blinded-endpoints trial、Lancet、査読有、379巻、2012、1613-1620、DOI:10.1016/S0140-636(11)61930-2
- (ク) Onouchi Y、Ozaki K、Burns JC、Ogawa S、他、A genome-wide association study identifies three new risk loci for Kawasaki disease、Nature Genetics、査読有、44巻、2012、517-522、DOI: 10.1038/ng.2220
- (ケ) 小川 俊一、血管炎—基礎と臨床のクロストーク— III 川崎病の原因・病理・診断・治療 「川崎病の診断」、日本臨床、査読無、71巻、2013、125-131
- (コ) 小川 俊一、冠動脈病変の「カバ」イロツ - を考える、血管医学、査読無、14巻、2013、86-93
- (サ) Harada M、Akimoto K、Ogawa S、他、National Japanese survey of thrombolytic therapy selection for coronary aneurysm: intracoronary thrombolysis or intravenous coronary thrombolysis in patients with Kawasaki disease、Pediatrics International、査読有、55巻、2013、690-695、DOI: 10.1111/ped.12187
- (シ) Ohashi R、Fukazawa R、Ogawa S、他、Etanercept suppress arteritis in a murine model of Kawasaki disease: a comparative study involving different biological agents、Int J Vasc Med、査読有、2013、DOI:10.1155/2013/543141
- (ス) Hosokawa Y、Yamamoto T、Kato K、Ogawa S、他、Reversible stenosis of the saphenous vein graft compressed by giant coronary aneurysm in Kawasaki disease、J Am Coll Cardiol、査読有、62巻、2013、e3、DOI:10.1016/j.jacc.2013.01.097
- (セ) 小川 俊一、川崎病 小児期から成人期

への管理、心臓、査読有、45巻、2013、1461-1464

- (ノ) Teramachi Y, Suda K, Ogawa S, 他、Flying with giant aneurysms caused by Kawasaki disease、International Journal of Cardiology、査読有、168巻、2013、4964-4965、DOI:10.1016/j.ijcard.2013.07.141

[学会発表](計 16 件)

Katsube Y, Fukazawa R, Ogawa S, 他、PTX3, a New Biomaker for vasculitis, Predicts Intravenous Immunoglobulin unresponsiveness in Patients with Kawasaki disease、2011.4.3、New Orleans (USA)  
深澤 隆治, 小川 俊一, 他、Data Mining 方を用いた川崎病遺伝子多型解析、第 47 回日本小児循環器学会、2011.7.7、福岡

Kobayashi T, Ogawa S, 他、Significance of primary therapy with intravenous immunoglobulin plus predonisolone for severe Kawasaki disease: Result from Japanese randomized clinical trial、American Heart Association Scientific Sessions 2011、2011.11.14、Orland (USA)  
Mitani Y, Ogawa S, 他、Acute coronary syndrome in adults with a history of Kawasaki disease: A Japanese nationwide survey、American Heart Association Scientific Sessions 2011、2011.11.16、Orland (USA)

Ogawa S, Current advances in Kawasaki disease: Sequelae of Kawasaki disease in young adults、World congress of Cardiology 2012、2012.4.19、Dubai (UAE)

小川 俊一、川崎病冠動脈病変の変遷：その機序と対応、第 60 回日本心臓病学会、2012.9.15、金澤

渡邊 誠, 深澤 隆治, 勝部 康弘, 小川 俊一, 他、Biomechanical factors に「よる冠循環動態の評価、第 48 回日本小児循環器学会、2012.7.6、京都

深澤 隆治, 小川 俊一, 他、川崎病 E<sup>+</sup> マイク遺伝子解析による川崎病発症機構の解明、第 48 回日本小児循環器学会、2012.7.7、京都

深澤 隆治, 小川 俊一, 他、最近 10 年間における川崎病巨大冠動脈瘤の実態調査、第 32 回日本川崎病学会、2012.10.13、東京

深澤 隆治, 勝部 康弘, 小川 俊一, 他、1999~2010 年川崎病全国調査に基づく巨大冠動脈瘤の全国調査、第 49 回

日本小児循環器学会、2013.7.12、東京  
渡邊 誠, 深澤 隆治, 勝部 康弘, 小川 俊一, 他、成人期に達した川崎病後の巨大冠動脈瘤を有する症例の長期予後、第 49 回日本小児循環器学会、2013.7.12、東京

大橋 隆治, 深澤 隆治, 小川 俊一, 他、川崎病 E<sup>+</sup> マイクにおける Etanercept の「血管炎抑制効果について、第 49 回日本小児循環器学会、2013.7.13、東京  
池上 英, 深澤 隆治, 小川 俊一, 他、最近 10 年間の巨大冠動脈瘤の全国調査における心筋梗塞例の検討、第 33 回日本川崎病学会、2013.9.27、富山  
深澤 隆治, 小川 俊一, 他、1999~2010 年川崎病巨大冠動脈瘤全国調査における冠動脈閉塞に関わる因子の解析、第 33 回日本川崎病学会、2013.9.27、富山

Fukazawa R, Ogawa S, 他、National survey of Kawasaki disease patients with giant aneurysm in recent 10 years: analysis of myocardial infarction and cardiac death、American Heart Association Scientific Session 2013、2013.11.18、Dallas (USA)

Fukazawa R, Ogawa S, 他、Steroid significantly reduces immunoglobulin therapy resistance in high risk Kawasaki disease patients with elevated BNP; A sub-analysis of Raise study、第 78 回日本循環器学会、2014.3.22、東京

[図書](計 1 件)

小川 俊一、総合医学社、小児科学レビュー- 自己免疫疾患、炎症性疾患の臨床検査「川崎病」、2013、346-351

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 俊一 (OGAWA Shunichi)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50194436

(2) 研究分担者

勝部 康弘 (KATSUBE Yasuhiro)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20246523

深澤 隆治 (FUKAZAWA Ryuji)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80277566