

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591590

研究課題名(和文) JNK抑制による川崎病冠動脈瘤に対する退縮治療法の開発

研究課題名(英文) JNK is Critical for Development of Candida albicans-induced Aneurysm in Mouse Model of Kawasaki Disease

研究代表者

吉兼 由佳子 (YOSHIKANE, Yukako)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00449927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダ・アルビカンス標準株の菌体抽出物質4mgを、マウスC57BL/6雄の腹腔内に5日間連続投与を1週目と5週目の2クール行い、川崎病類似汎血管炎モデルマウスを作成した。またカンジダ投与開始前日にJNK阻害薬タブレットをマウス後頸部皮下に留置した。モデルマウス作成1ヶ月後に犠牲死させ、血管病変を解析した。以上をJNK投与群(J群)とし、J群10匹とプラセボ群(ブ群)20匹とで比較検討した。J群では10匹中に1匹(10%)、ブ群では20匹中に13例(65%)で血管病変を認めた(p<0.01)。JNKは川崎病冠動脈瘤形成に関与し、JNK阻害薬が瘤形成予防薬となりうる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We injected Candida albicans cell wall extract (CAWE) into 4-week-old C57BL/6 mice intraperitoneally, and found that CAWE caused the development of aneurysms at coronary artery, carotid artery, celiac artery, iliac artery and abdominal aorta. Histological examination of coronary artery and abdominal aorta in CAWE-treated mice showed marked inflammatory cell infiltration, destruction of elastic lamellae, loss of medial smooth muscle cells and intimal thickening, which are similar to histological features of vascular lesions of patients with KD. To find the role of JNK in aneurysm development, we evaluated the effects of JNK inhibitor, SP600125, on abdominal aortic aneurysms induced by CAWE. Treatment with SP600125 significantly decreased the incidence of aneurysm and also protected against vascular inflammation and tissue destruction histologically, compared with the placebo treatment. JNK potential represents novel therapeutic target for aneurysms in Kawasaki disease.

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 冠動脈瘤 カンジダアルビカンス JNK テネイシンC

1. 研究開始当初の背景

川崎病は持続性の発熱と皮膚粘膜の発赤と腫脹、そして時に冠動脈瘤を伴う全身性の血管炎であるが、その原因は未だに明らかでない。本邦では年間約 12000 人が罹患し、患児数は年々増加し続けている。急性期における高容量の免疫グロブリン静注療法は現在最も有効な治療法であるが、依然として約 10~20% に不応例が存在する上、冠動脈拡大や瘤を形成する例が見られる。実際、代表者らの施設では、川崎病罹患児の約 1% で冠動脈瘤を合併、抗凝固薬を内服している。いったん瘤が形成されると約半数で自然退縮するが、あとの半数の冠動脈瘤は後遺症として残存し、心筋梗塞合併による死亡例を生み出している(全国調査、2009)。したがって、川崎病患児の予後向上のためには、川崎病冠動脈瘤形成の病態を解明し、その進行防止・修復治療を目指した画期的な薬物治療の開発が急務である。

代表者は、川崎病冠動脈瘤と同様に血管炎症が主病態である大動脈瘤の研究に着目した。近年の基礎研究により、血管壁の持続する炎症によってエラスチン等の細胞外基質の破壊が亢進し、壁が脆弱化して大動脈瘤形成に至ると考えられている。ヒト大動脈瘤組織では炎症性サイトカイン TNF- α や細胞外基質分解酵素 MMP-9 が高値であるが(Baxter BT, 2002)川崎病でも TNF- α が誘導した MMP-9 による冠動脈のエラスチン破壊が冠動脈瘤形成に関連すると報告されている(Lau AC, 2004)。

一方、大動脈瘤は長らく進行性で不可逆性の病変と考えられており薬物療法は不可能と考えられていたが、分担者の吉村らが 大動脈瘤組織内において細胞内シグナル伝達分子のひとつである c-Jun N-terminal kinase (JNK)活性が異常に亢進していることを見出し、JNK 阻害療法によりマウス大動脈瘤の退縮と壁構造の修復治療に世界で

初めて成功した(Yoshimura, Nature Med. 2005)。そこで代表者は、川崎病の血管炎病態でも JNK が有力な治療標的候補と考え、川崎病冠動脈瘤の形成予防ならびに退縮治療法を目的とした画期的治療法の開発に着手することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、川崎病冠動脈瘤の発症・病変進展における JNK の果たす役割を解明し、瘤退縮治療法を開発することであり、具体的には申請期間内に以下の 4 点の達成を目標とする。目標 1 ; マウス川崎病モデルを作成し、冠動脈瘤病変の JNK 活性化動態を解明する。目標 2 ; ヒト川崎病冠動脈病変における JNK 活性化とそれを反映するマーカー分子を検討する。目標 3 ; マウス川崎病モデルにおいて、JNK 阻害療法の冠動脈瘤形成予防効果を検証する。目標 4 ; マウス川崎病モデルにおいて、JNK 阻害療法の冠動脈瘤退縮治療効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 川崎病モデルマウスの確立と冠動脈病変における JNK 活性化動態の解明

川崎病冠動脈病変モデルマウスを作成
- 川崎病罹患児糞便中から分離培養したカンジダ・アルビカンスの菌体抽出物質 4mg をマウス腹腔内に連続 5 日間接種を 2 クール行う。冠動脈病変の進行度と関連分子の推移 - 接種終了後 4,8,12 週目に犠牲死させ、組織標本と血液を採取。
- 冠動脈最大径計測、
- 炎症細胞浸潤 (HE 染色)、
エラスチン線維破壊 (EVG 染色) の解析、
- テネイシン C の発現定量 (免疫組織染色)
病変進行度や JNK 活性を反映する血中マーカー候補分子の解析。
- テネイシン C の定量 (ELISA 法)

(2) ヒト川崎病冠動脈病変における JNK 活性化とバイオマーカーの検討

ヒト川崎病冠動脈病変組織の JNK 活性
- 剖検時に組織標本を採取、瘤病変と非瘤
部で以下を比較、- 炎症細胞浸潤 (HE 染
色)、エラスチン線維破壊 (EVG 染色)、-
テネイシン C の発現定量 (免疫組織染色)

川崎病罹患児の末梢血中マーカー候補
分子の解析、- 血中テネイシン C の定量
(ELISA 法)

(3) マウス川崎病における JNK 阻害療法
の冠動脈瘤予防効果の検証

川崎病冠動脈病変モデルマウスを作成
((1) と同じ方法) JNK 阻害薬投与。

- モデル作成前日に JNK 阻害薬
SP600125 (40 mg/pellet, 60-day release, 30
mg/kg/day) を皮下に留置、対照はプラセボ
を投与。冠動脈病変と関連分子の評価。

- モデル作成処置直後 28 日目に犠牲死さ
せ、組織標本と血液を採取、- 冠動脈最大
径計測、- 炎症細胞浸潤 (HE 染色)、エラ
スチン線維破壊 (EVG 染色)、- 組織中テ
ネイシン C の発現定量 (免疫組織染色)、
- 血中テネイシン C の定量 (ELISA 法)

(4) マウス川崎病における JNK 阻害療法
の冠動脈瘤退縮治癒効果の検証

川崎病冠動脈病変モデルマウスを作成
((1) と同じ方法) JNK 阻害薬投与。

- (1) の結果に基づいて汎血管炎とエラ
スチン線維破壊がみられ動脈径が拡大する
冠動脈瘤形成時期 (モデル作成処置後 28
日目と予測) より JNK 阻害薬または対照
としてプラセボを投与、冠動脈病変と関
連分子の評価 - 阻害治療開始後 28 日目に
犠牲死させ、組織標本と血液を採取。- 冠
動脈最大径計測、- 炎症細胞浸潤 (HE 染
色)、エラスチン線維破壊 (EVG 染色)、-
組織中テネイシン C の発現定量 (免疫組織
染色) - 血中テネイシン C の定量 (ELISA
法)

4. 研究成果

大動脈及び冠動脈に汎血管炎を生じた。4
週目; 外膜を中心に単球及びマクロファ
ージが浸潤。外膜及び全層性に TnC が発現。
弾性板が直線化し部分的に断裂。8 週目;
全層性に炎症細胞浸潤、TnC 発現。弾性板
消失。12 週目; 新生内膜で血管内腔がほぼ
閉塞。全層性に炎症細胞浸潤。TnC は新生
内膜のみに残存。今回作成したマウスモデ
ルは川崎病に酷似した血管壁構造破壊の著
しい汎血管炎であり、川崎病冠動脈瘤に匹
敵する組織病変であった。TnC は炎症細胞
浸潤に伴い、外膜 全層 新生内膜に一過
性に発現した。これは川崎病冠動脈瘤形成
過程におけるリモデリングに TnC が関与す
ることを示唆する所見と思われた。

またプラセボ群では 20 匹中に 13 例 (65%)
で肉眼的瘤病変を認めたのに対し、JNK 阻
害薬投与群では 10 匹中に 1 匹 (10%) のみ
で ($p < 0.01$) 有意に直径が小さかった。さ
らに瘤組織所見ではプラセボ群では血管周
囲結合組織から血管壁全層にマクロファ
ージをふくむ強い炎症細胞浸潤弾性線維の断
裂、破壊がみられたが、JNK 阻害薬投与群
では中膜平滑筋層に TnC 発現がみられたが
みられたが、炎症細胞浸潤、弾性線維の破
壊はも軽度であった。JNK 阻害薬は川崎病
汎血管炎を抑制し、瘤形成予防薬となりう
る事が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 10 件)

血管炎モデルマウスを用いた川崎病動
脈瘤の病態診断と治療 吉兼由佳子、山
口耕一、吉田利通、今中恭子_第 103 回
日本病理学会総会 2014.4.24-26 広島

川崎病冠動脈瘤形成予防薬開発; JNK
阻害薬 ~ 汎血管炎モデルマウスを用いた
検討 ~ 吉兼由佳子、橋本淳一、古賀允
久、長 環、吉村耕一、今中恭子、廣瀬伸
一_第 117 回日本小児科学会学術集会

2014.4.11-13 名古屋

c-Jun N-terminal kinase is a novel therapeutic target for controlling the development of Kawasaki disease-related arterial aneurysm / Yukako Yoshikane, Mitsuhsa Koga, Tamaki Cho, Kyoko Imanaka-Yoshida, Junichi Hashimoto, Hiroki Aoki, Koichi Yoshimura, Shinichi Hirose _ American Heart Association Scientific Sessions 2013.11.16-20

JNK 抑制による川崎病冠動脈瘤予防薬の開発～汎血管炎モデルマウスを用いた検討～ / 吉兼由佳子、古賀允久、長環、吉村耕一、今中恭子、橋本淳一、上田誠、山本由美子、青木浩樹、廣瀬伸一__第 33 回日本川崎病学会 2013.9.27-28 富山

Tissue remodeling in vascular wall in Kawasaki disease-related vasculitis model mice. / Yukako Yoshikane, Junichi Hashimoto, Kyoko Imanaka-Yoshida, Mitsuhsa Koga, Tamaki Cho, Koichi Yoshimura, Yumiko Yamamoto, Hiroki Aoki, Shinichi Hirose 7th Takao Symposium 2013.13-15 Tokyo

JNK 阻害薬による動脈瘤形成の抑制 川崎病類似汎血管炎モデルマウスを用いた検討 / 吉兼由佳子、吉村耕一、今中恭子、長環、古賀允久、山本由美子、青木弘樹、橋本淳一、上田誠、廣瀬伸一__第 49 回小児循環器学会総会 2013.7.11-13 東京 (日本小児循環器学会雑誌 29 巻 Suppl. Page168)

川崎病類似汎血管炎モデルマウス病理組織の経時的変化～テネイシンとの関連～ / 吉兼由佳子、橋本淳一、上田誠、長環、古賀允久、吉村耕一、山本由美子、今中恭子、廣瀬伸一__第 116 回日本小児科学会学術集会 2013.4.19-21 広島 (日本小児科学会雑誌 117 巻 2 号 Page333)

The role of tenascin C in an animal model of Kawasaki disease-related coronary artery aneurysm. / Yukako Yoshikane, Junichi Hashimoto, Kyoko Imanaka, Mitsuhsa Koga, Tamaki Cho, Koichi Yoshimura, Yumiko Yamamoto, Hiroki Aoki, Shinichi Hirose_The 19th Asia-Pacific Conference of Cardiology (APCC 2013) 2013.2.21-24 Thai

動脈炎におけるテネイシン C の役割～川崎病類似汎血管炎モデルマウスから～ / 吉兼由佳子、橋本淳一、今中恭子、古

賀允久、長環、吉村耕一、山本由美子、青木浩樹、廣瀬伸一__第 11 回心臓血管発生研究会 2012.10.19-20 福島

川崎病類似汎血管炎マウスモデルの経時的病理組織変化～テネイシン C の発現～ / 吉兼由佳子、今中恭子__第 32 回日本川崎病学会学術集会 2012.10.12-13 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：炎症性動脈瘤の診断方法
発明者：吉田(今中)恭子、三谷義英、吉田利通、清藤努、松下竹次、大熊喜彰、吉兼由佳子、須田憲治、市田蒨子
権利者：吉田(今中)恭子
種類：特許
番号：特開 2014-25863
公開年月日：平成 26 年 2 月 6 日
国内外の別：国外

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉兼由佳子 (YOSHIKANE, Yukako)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：00449927

(2) 研究分担者

吉田(今中) 恭子 (Yoshida-Imanaka, Kyoko)

三重大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00242967

吉村 耕一 (YOSHIMURA, Koichi)
山口県立大学・看護栄養学部・教授
研究者番号：00322248

古賀 允久 (KOGA, Mitsuhsa)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号：60570801

長環 (CHO, Tamaki)

福岡歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：90131870

橋本 淳一(HASHIMOTO, Junichi)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：90580291

(3)連携研究者
なし