

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591555

研究課題名(和文)川崎病冠動脈病変の機序と治療法の開発：単離血球によるMMPとTIMPの動態の解明

研究課題名(英文) Mechanism and therapeutic strategy of coronary involvement of Kawasaki disease: dynamics of MMP and TIMP1 in isolated cells.

研究代表者

是松 聖悟 (SEIGO, KOREMATSU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60264347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病の冠動脈瘤形成へ関与が示唆されているMMP9とTIMP1について、我々は、前者が顆粒球に、後者が血小板に高濃度に含有されていることが見出した。今回、各種薬剤に対する顆粒球MMP9と血小板TIMP1の反応性を検討した。

川崎病と健康成人の末梢血より、顆粒球、血小板を単離精製後、ガンマグロブリン(G)、メチルプレドニゾロン(M)、ウリナスタチン(U)と共培養し、ELISA法を用いて培養上清中のMMP9、TIMP1蛋白量を検討した。顆粒球MMP9は、G共培養下で低下したが、P、Uに差はみられなかった。血小板TIMP1はこの3薬剤による影響を受けなかった。顆粒球MMP9の抑制にGが有効であった。

研究成果の概要(英文)：MMP9 and TIMP1, which have been reported to be associate with coronary involvement of Kawasaki disease, are distributed in the granulocytes and platelets, respectively. In this study we evaluated drug responsiveness of granulocyte-derived MMP9 and platelet-derived TIMP1. Whole blood by patients with Kawasaki disease and healthy adult were collected, and then, their granulocytes and platelets were co-cultured with gamma-globulin, methylprednisolone and ulinastatin. Only granulocyte-derived MMP9 decreased during co-cultured with gamma-globulin. Other medicines could not affect granulocyte-derived MMP9 and platelet-derived TIMP1. Gamma-globulin is effective in suppression of granulocyte-derived MMP9.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 MMP9 TIMP1 顆粒球 血小板

1. 研究開始当初の背景

川崎病は乳幼児期に全身性血管炎に起因する遷延性高熱を呈し、一部に冠動脈瘤を発症する。動脈壁内弾性板融解酵素 matrix metalloproteinase (MMP) 9 による内弾性板融解が、その一時的原因と指摘されている[1-5]。

一方、川崎病の急性期には顆粒球と血小板の増加が指摘されており、我々は MMP9 が顆粒球に、その抑制因子 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) 1 が血小板に、高濃度分布することを報告した[6]。

2. 研究の目的

川崎病の基礎病態の解明と治療法の改善を目的として、今回は、顆粒球含有 MMP9 と血小板含有 TIMP1 の熱および薬剤反応性の基礎データを検討した。

3. 研究の方法

(1) 熱反応性

健常成人 2 名を対象とした。末梢血を informed consent のもと 80ml 採取。Ficoll 遠心密度勾配法、アルブミン、デキストラン処理にて、血漿、顆粒球、リンパ球、血小板を分離精製し(各分画の精製度 99% 以上)、顆粒球は RPMI 培地+10%FCS、血小板は 5%Alb 添加 Tyrode-HEPES 培地に懸濁し、triplicate として、37、39、41 下、0.5、1、2、4、12 時間共培養した。

Bio-rad protein assay kit (Bio-rad) にて蛋白量測定し、ELISA kit (第一ファインケミカル) を用いて、培養上清中の MMP9、TIMP1 含有量を測定した。

また、還元 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、メンブレンに転写、blocking 処理後、1 次抗体-anti-human rabbit MMP9 (Cell Signaling Tec)、2 次抗体-anti-rabbit IgG-HRP (Cell Signaling Tec) にて、培養液上清中の MMP9 蛋白を検出した。さらに、0.8%gelatin 添加ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、酵素還元溶液にて over night で培養し、Coomassie brilliant blue 染色にて、MMP9 活性を検出した。

さらに、MMP9 Fluometric Drug Discovery kit (Enzo Life Science) を用いて、血小板培養液上清との共培養による recombinant MMP9 活性の阻害を測定した。

統計処理は unpaired t 検定、Mann-Whitney U 検定を用いた。

(2) 薬剤反応性

川崎病患児 1 名 (1 歳 1 か月男児) と健常成人 8 名の末梢血を informed consent のもと 10 ml 採取した。顆粒球を単離精製後、顆粒球を 10%FCS 添加 RPMI に、血小板を 5% アルブミン添加 Tyrode-HEPES に懸濁し、37、5%CO₂ 下で、ガンマグロブリン (50 mg/ml)、メチルプレドニゾロン (80 µg/ml) ウリナスタチン (100 U/ml) と共培養した。Luna-FL (Logos system) を用いて顆粒球の培養中の生存能を、また、ELISA kit (第一ファインケミカル) を用いて培養上清中の MMP9、TIMP1 の蛋白量を検討した。

統計処理は Wilcoxon signed rank 検定を用いた。

尚、本研究は大分大学医学部倫理委員会 (587 号) の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 結果

熱反応性

ELISA 法にて、培養時間に応じ、まずは 4 時間後には MMP9 蛋白が、次いで 12 時間後には TIMP1 蛋白が増加することが明らかとなった。

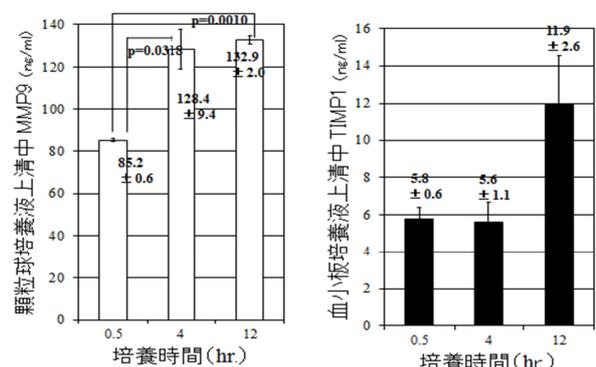


図 1 : 培養液上清中 MMP9、TIMP1 蛋白量 (37、0.5、4、12 時間培養後) -ELISA 法

また、顆粒球培養上清中 MMP9 蛋白は軽度減少、TIMP1 は温度が高いほど蛋白量の増加がみられ、その比は有意に低下した。

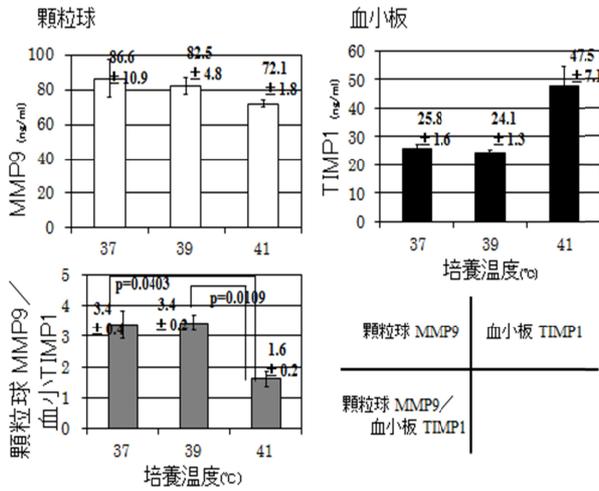


図 2: 培養液上清中 MMP9、TIMP1 蛋白量(37、39、41) -ELISA 法

Western blot では、95kDa の MMP9 蛋白がみられたが、MMP9 の活性をみる gelatin zymography では、95kDa よりも、72kDa の成熟型 MMP9 蛋白の活性がみられ、さらに 41 培養下では 130kDa の未熟型酵素蛋白の活性比の増大がみられた。

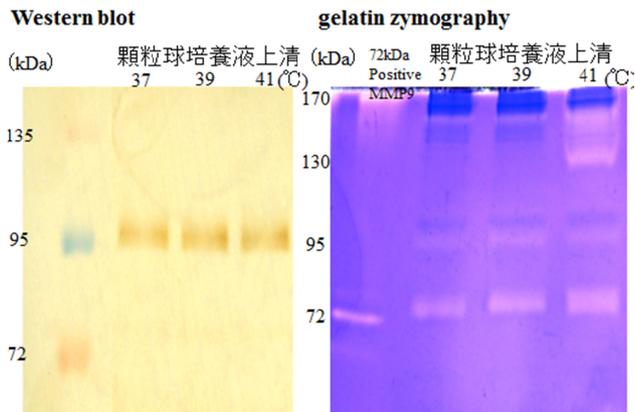


図 3: MMP9 蛋白-Western blot、MMP9 酵素活性 gelatin zymography

TIMP1 を高濃度含有する血小板培養液上清による MMP9 活性阻害実験では、有意な MMP9 の活性阻害がみられ、37 より、41 血小板培養液上清のほうが、阻害している傾向があった。

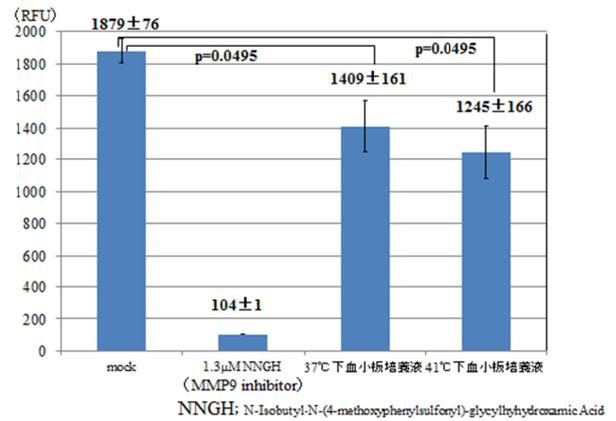
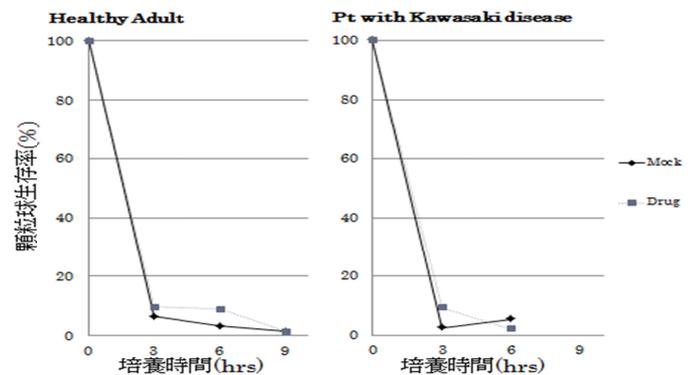


図 4: recombinant MMP9 と血小板培養液上清との共培養による MMP9 活性阻害実験
薬剤反応性

Luna-FL (Logos system) にて、培養中において生存する顆粒球はおおよそ培養 3 時間後まで確認された。

図 5: 培養細胞 (顆粒球) の生存率 (0、3、6、9 時



間培養後)

この結果から、健常成人の培養 3 時間後における薬剤共培養下と非共培養下の培養上清の顆粒球 MMP9 蛋白量を比較したところ、ガンマグロブリン共培養下で有意な低下がみられたが、メチルプレドニゾン、ウリナスタチンでは差がみられなかった。川崎病患児においても同様の結果が得られた。

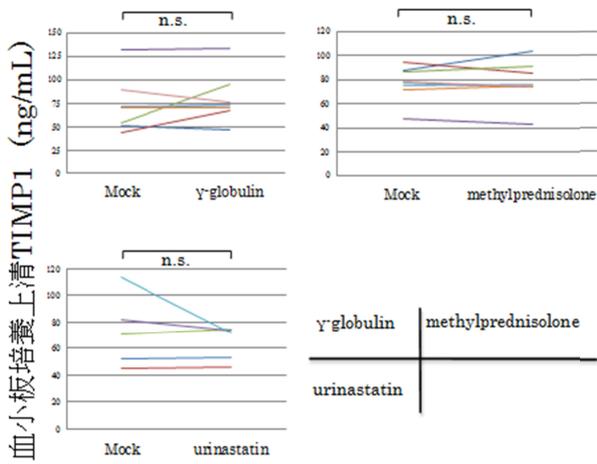


図6：培養液上清中MMP9蛋白量（培養3時間後：健康成人）-ELISA法

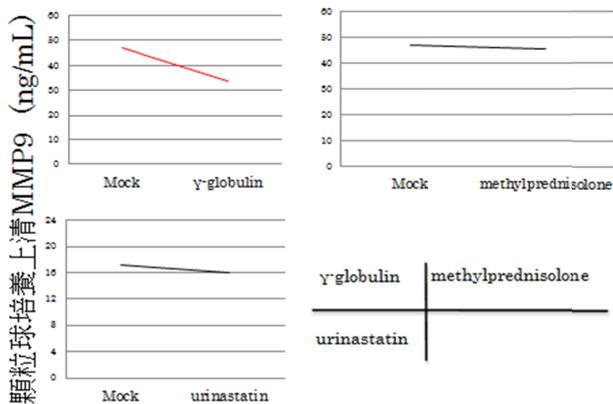


図7：培養液上清中MMP9蛋白量（培養3時間後：川崎病患児）-ELISA法

血小板TIMP1の薬剤反応性を健康成人で検討したが、3薬剤による影響を受けなかった。

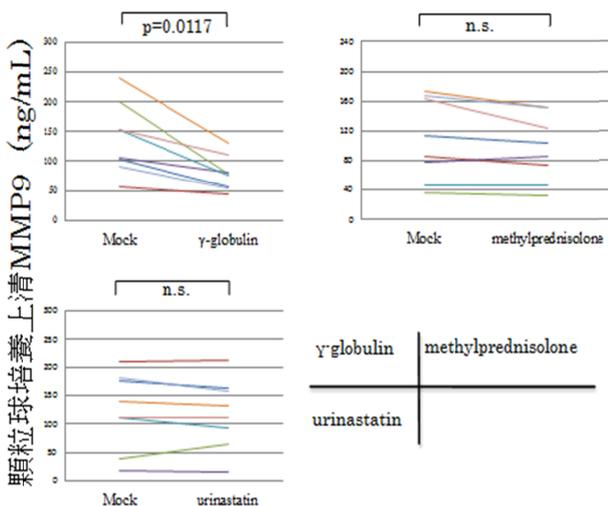


図4：培養液上清中TIMP1蛋白量（培養3時間後：健康成人）-ELISA法

考察

(2) 考察

本稿では、顆粒球、血小板を分離精製し、MMP9とTIMP1の薬剤反応性を検討した。高温処理により、顆粒球MMP9酵素蛋白は低下、血小板TIMP1は増加、その比は有意に低下した。高温処理は、血小板TIMP1のMMP9活性阻害能を増加した。また、顆粒球MMP9は、ガンマグロブリン共培養下で有意に低下を示したが、メチルプレドニゾロン、ウリナスタチンでは差がみられなかった。血小板TIMP1は、この3薬剤による影響を受けなかった。

川崎病患児における血管病変の初期は、顆粒球による血管壁への浸潤から始まり、単球やリンパ球の浸潤はその後から生じるとされている[1]。Sunagawaら[2]により川崎病患児の破裂した巨大冠動脈瘤に好中球が凝集しているとの報告もある。

一方でSangら[3]はMMP9が内弾性板融解による血管炎を惹起し、TIMP1はその阻害酵素となることを示した。また冠動脈瘤を伴う川崎病患児の血清MMP9は高値を示すこと[4]、動物実験で、MMP9の阻害により冠動脈の予後が改善したこと[5]が報告され、MMP9とTIMP1の相互活性が、川崎病における冠動脈瘤発生に関与していることが示唆されている。

我々はMMP9が顆粒球に、TIMP1が血小板に高濃度含有されることを報告し[6]、川崎病急性期の顆粒球、血小板増多が病態に合致することを指摘した。これまで、各血球由来のMMP9、TIMP1の熱反応性や薬剤反応性を比較検討した報告はない。

今回、顆粒球由来のMMP9量がガンマグロブリンにより低下をきたすということが示された。川崎病のMMP9に対するガンマグロブリンの作用機序については心臓の血管内皮細胞の実験系において、NF- κ Bを介したMMP9の抑制という報告がなされた[7]。しかし、我々の実験では3時間という短い時間で、ガンマグロブリンにより顆粒球培養上清中のMMP9量の低下がみられた。これは細胞内の合成抑制というより、細胞外に放出されたMMP9のガンマグロブリンによる中和作用の可能性を示唆した。

ただし、熱反応性の検討にて、高熱の持続は顆粒球MMP9を抑制し、血小板TIMP1を増加させることも同時にわかった。

そもそも川崎病における顆粒球は発熱早期から増加するが、血小板は病日が進行するにつれ、徐々に増加する傾向がある。発熱早期にガンマグロブリンを投与した場合、効果が不十分となることも臨床経験上みられている。それは血小板由来 TIMP1 の生合成が不十分な状態での治療となるからかもしれない。

今回の結果は、川崎病における冠動脈瘤の発生機序と、高熱に対する治療法の検討に寄与する、基礎データとなった。

<引用文献>

- Nelson Textbook of Pediatrics 19th edition, 2011.
- Sunagawa K et al. *Pediatr Cardiol* 2008;29:1115-1119.
- Sang OX et al. *Biol Reprod* 1990;43:956-964.
- Takeshita S et al. *Clin Exp Immunol* 2001;125:340-344.
- Lau AC et al. *Arthritis Rheum* 2008;58:854-863.
- Korematsu S et al. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:973-974.
- Shangguan W et al. *Exp Clin Cardiol* 2014;20:4136-54

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Korematsu S, Ohta Y, Tamai N, Takeguchi M, Goto C, Miyahara H, Kawano T, Izumi T, Cell distribution differences of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in patients with Kawasaki disease, *Pediatr Infect Dis J*, 査読有, Vol. 31, No. 9, 2012, pp.973-974.

[学会発表] (計 4 件)

是松聖悟 他、川崎病冠動脈瘤形成における MMP9 と TIMP1 の活性動態特性、第 115 回日本小児科学会、2012.4.22、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

是松聖悟 他、MMP9 と TIMP1 の熱反応性：川崎病の遷延性高熱と冠動脈瘤発生との関連性

の検討、第 116 回日本小児科学会、2013.4.19、広島国際会議場（広島県広島市）

是松聖悟 他、川崎病遷延性高熱時の顆粒球 MMP9 と血小板 TIMP1 の活性変化、第 117 回日本小児科学会、2014.4.12、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

是松聖悟 他、川崎病冠動脈瘤形成の基礎病態：顆粒球 MMP9 と血小板 TIMP1 の細胞成分分画の検討、第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2014.5.9、京都国際会議場（京都府京都市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

是松聖悟 (KOREMATSU, Seigo)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：60264347