

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791069

研究課題名(和文)川崎病類似冠動脈炎マウスモデルの遺伝子発現に基づいた新たな川崎病治療戦略の検討

研究課題名(英文)The new strategy of treatment of Kawasaki disease on the basis of gene expression in Kawasaki disease-like vasculitis mouse model

研究代表者

永田 弾(Nagata, Hazumu)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20570790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：冠動脈炎モデルマウスにおいてマイクロアレイ解析からサイトカイン、ケモカイン関連遺伝子が高発現していることがわかり、抗IL-6受容体抗体と抗CCL2抗体を投与した。結果としてこの物質だけでは炎症を抑制できないことがわかり、いろいろな物質の関与があることが示唆された。また、モデルマウスにおいて心機能は炎症によって低下する傾向がみられたがエコー輝度と冠動脈炎の程度との相関を見出すことはできなかった。検討数を増やすとともに手法も含め更なる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our previous research demonstrated that the gene associated with cytokine or chemokine was overexpressed in mouse model of Kawasaki disease-like vasculitis. In the present research, the administration of anti IL-6 antibody and anti CCL2 antibody could not suppress the inflammation. These results suggested that several cytokine and chemokine were related to the occurrence of vasculitis. The cardiac function of mouse model decreased gradually. There was no relation between the degree of inflammation of vasculitis and the level of echogenicity of coronary artery. We should increase the number of case and modify the methods.

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：川崎病マウスモデル サイトカイン ケモカイン 心エコー

1. 研究開始当初の背景

1. 川崎病治療の現状

高サイトカイン血症を特徴とする川崎病に対して、現在では免疫グロブリン大量投与 (IVIG)、アスピリン内服を基本治療とし、不応例に対してはステロイドパルス療法や抗 TNF 抗体投与、血漿交換などが行われる。しかし、その治療選択、タイミングについては議論の余地を残す。

2. 川崎病患者の末梢血単核球における遺伝子発現

川崎病患者の末梢血単核球を分離し、マイクロアレイ解析を行ったところ、今まで川崎病との関連が報告されている 16 遺伝子のうち、川崎病急性期において正常対象と比べて 2 倍以上のものは HGF や S100A9、S100A12 であり、サイトカインやケモカイン遺伝子の上昇を認めなかった。(Ikeda et al. *Clin. Exp. Immunol.* 2010) 川崎病患者では高サイトカイン血症を起こすが、それですべてが説明できず、実際にそれらのサイトカインがどの細胞から放出されているかについても解明されていない。

Gene name	Synonyms	Fold difference
		KD/ctrls
interleukin 1, beta	IL1B	0.33 ± 0.38
interleukin 2	IL2	0.68 ± 0.07
interleukin 4	IL4	0.42 ± 0.22
interleukin 6	IL6	0.54 ± 0.31
interleukin 8	IL8	0.17 ± 0.22
interleukin 10	IL10	0.77 ± 0.25
tumor necrosis factor	TNF	0.86 ± 0.09
interferon, gamma	IFNG	0.86 ± 0.04
chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2 (MCP1)	1.12 ± 0.16
chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4 (MIP1B)	0.56 ± 0.29
chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5 (RANTES)	0.40 ± 0.46
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	CSF3	0.95 ± 0.17
vascular endothelial growth factor A	VEGFA	0.36 ± 0.23
hepatocyte growth factor	HGF	2.75 ± 4.13
S100 calcium binding protein A9	S100A9	3.94 ± 1.65
S100 calcium binding protein A12	S100A12	3.50 ± 1.68

川崎病急性期末梢血単核球におけるサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子の発現について

3. 川崎病類似冠動脈炎マウスモデルの各血管における遺伝子発現

当教室において、自然免疫リガンドの一つ Nod1 リガンドを用いた新たな冠動脈炎マウ

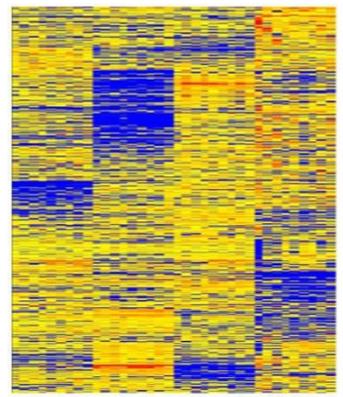
スモデルを完成させた (Nishio et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011) (右図)。この冠動脈炎は好中球、マクロファージを主体とした炎症細胞浸潤を特徴とし、川崎病急性期の冠動脈炎病理像と類似している。

この自然免疫リガンドにより、様々な川崎病病因説を一つに集約して説明でき、さらに生理的な投与方法である内服投与でも冠動脈炎を起りうることから、川崎病の病因解明につながるモデルである。

このモデルを利用して、ヒトでは検索できない、血管組織の遺伝子発現をマイクロアレイにて解析した。すると、Nod1 リガンドによる刺激に対して組織特異的な反応性を認めた (図)。特にサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子が起始部大動脈において高発現している一方、末梢血の高サイトカイン血

症は認めなかった。以上より、本モデルにおける冠動脈炎発症はその組織特有の反応性に関連し、末梢血はその増悪に関連性があると考えられた。

本研究は、この川崎病類似マウスモデルの冠動脈起始部の遺伝子発現結果を基に、新たな川崎病治療戦略の検討を行うことを目的とする。



1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
 起始部大動脈 肺動脈 大動脈 脾臓
 1: LPS 2: Nod1リガンド
 3: LPS+Nod1リガンド
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 改変

4. 川崎病評価法としての輝度に関する研究

川崎病患者において、backscatter 法を用いて心臓の各部位 (冠動脈、僧帽弁、左室乳頭筋) のエコー輝度 (単位: db) を測定したところ、川崎病群では正常対照群と比較して有意に輝度が上昇しており、IVIG 不応例では反応例よりも有意に輝度が亢進していた。また、IVIG (1g/kg or 2g/kg) によって解熱が得られた後、エコー輝度は徐々に低下してく

ることが示された。

そこで、この評価法を用いて、マウスの病勢を輝度により評価し、実際の病理像とその輝度を比較することにより、川崎病患者の冠動脈病変の状況について推察することができ、冠動脈病変の間接的な病勢としての血液データより鋭敏な指標となりうると考える。

2. 研究の目的

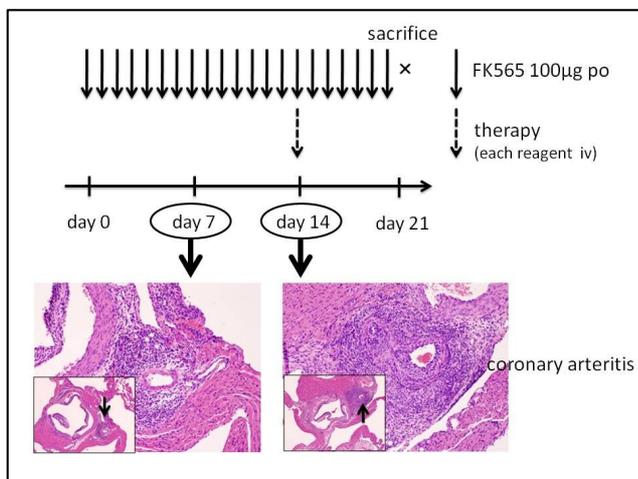
川崎病の治療にはいくつかの選択肢があるが、どの治療をどのタイミングで行うかについてはまだ定まった見解はない。当教室で作成した川崎病類似冠動脈炎モデルマウスのサイトカイン・ケモカイン(IL-6、CCL2など)を抑制することで、モデルマウスのエコー輝度や病理学的な炎症病変がどのように変化するかを評価し、その治療が炎症に対してどのような影響を与えているのかを検討する。それにより川崎病の病理病態という観点からより適切な治療法を見いだすことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

A. マウス (C56BL/6、5 週齢、雌) に対して Nod1 リガンド(FK565)を 3 週間連日口腔内投与し、2 週目に以下の物質を投与し、3 週目に屠殺し、病理学的評価を行う。(右図)

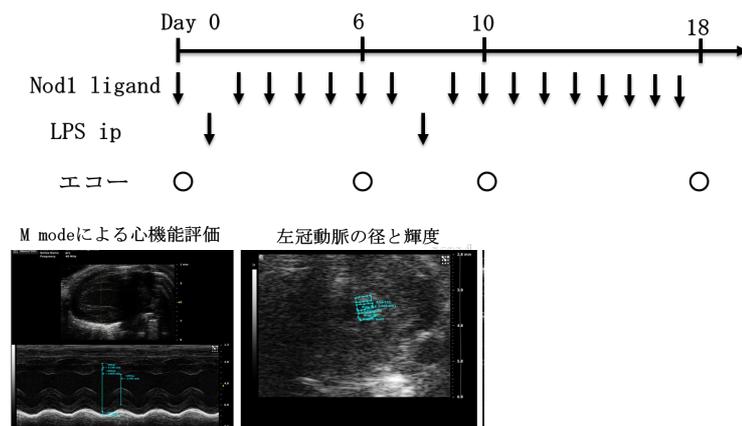
・ **MR16-1** (抗 IL-6R 抗体、中外製薬): 2mg/head (*Reumatol Int.* 2010)

・ **C1142** (抗 CCL2 抗体、Centocor 社): 2mg/kg (*Neoplasia* 2007)



B.

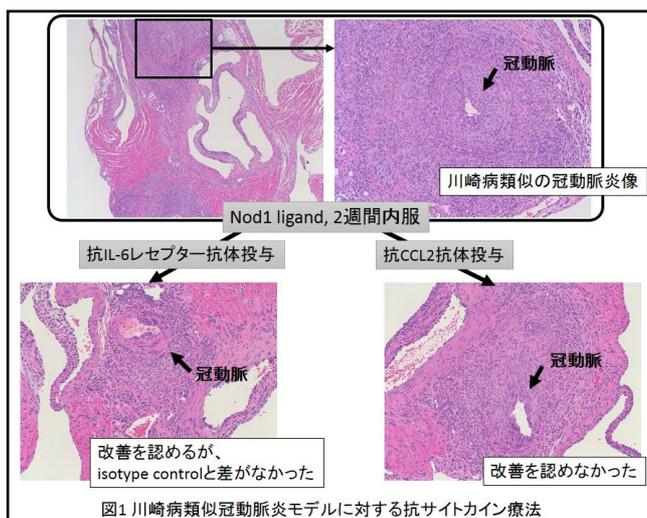
- ・ 使用したエコー
プライムテック社 Vevo 2000
probe 40MHz
- ・ 麻酔
セボフルレンを使用
心拍数 350-450bpm になるように調節
- ・ マウス (5 週 雌)
Mouse1 LPS+FK565
Mouse2 FK565
Mouse3 control



近接する心腔内との差を輝度とした

4. 研究成果

A

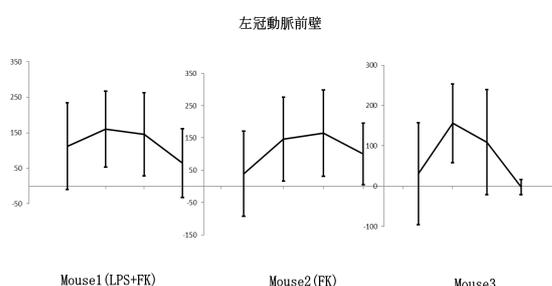


抗 IL-6 レセプター抗体および抗 CCL2 抗体にて IL-6 および CCL2 の作用を抑制をかけたところ、明らかな抑制効果は認めなかった。

B.

Mouse1 (LPS+FK)				
	pre	day6	day10	day18
EF (%)	42.5	40.5	42	35.4
LVDd (mm)	4.197	4.131	4.093	4.199
LCA φ (mm)	0.176	0.196	0.247	0.274
Mouse2 (FK)				
	pre	Day6	Day10	Day18
EF (%)	48.9	37	33.7	25.9
LVDd (mm)	3.990	3.783	3.576	4.817
LCA φ (mm)	0.175	0.184	0.274	0.299
mouse3				
	Pre	Day6	Day10	Day18
EF (%)	51.0	52.2	46	45
LVDd (mm)	3.659	4.279	4.292	5.623
LCA φ (mm)	0.177	0.176	0.157	0.159

LPS, FKを投与したmouseでは心機能が低下傾向にあることがわかった。



輝度については時系列で輝度が亢進する傾向にはなかった。

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 11 件)

Yamamura K¹, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T. Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. *Rheumatology* 2014 (Epub ahead of print)

Testicular sex cord-stromal tumor in a boy with 2q37 deletion syndrome. Sakai Y, Souzaki R, Yamamoto H, Matsushita Y, Nagata H, Ishizaki Y, Torisu H, Oda Y, Taguchi T, Shaw CA, Hara T. *BMC Med Genomics* 2014 (Epub ahead of print)

Hoshina T, Nakashima Y, Sato D, Nanishi E, Nishio H, Nagata H, Yamamura K, Doi T, Shiokawa Y, Koga Y, Kang D, Ohga S, Hara T Staphylococcal endocarditis as the first manifestation of heritable protein S deficiency in childhood. *J Infect Chemother* 2014 (Epub ahead of print)

Uike K, Matsushita Y, Sakai Y, Togao O, Nagao M, Ishizaki Y, Nagata H, Yamamura K, Torisu H, Hara T. Systemic vascular phenotypes of Loey's-Dietz syndrome in a child carrying a de novo R381P mutation in TGFBR2: a case report. *BMC Res Notes* 2013 6:456

Ninomiya T, Takada H, Nagatomo Y, Nanishi E, Nagata H, Yamamura K, Doi T, Ikeda K, Hara T. Development of Kawasaki disease in a patient with PFAPA. *Pediatr Int* 2013 55(6):801-2

Nagata H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Yamamura K, Hara T Diagnostic imaging of a child with congenital internal jugular vein phlebectasia. *J Pediatr* 163(4):1229-1229.e1 2013

Nagata H, Ihara K, Yamamura K, Tanoue Y, Shiokawa Y, Tominaga R, Hara T Left ventricular efficiency after ligation of patent ductus arteriosus for premature infants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 146(6):1353-8

Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T Thrombocytosis in asplenia syndrome with

congenital heart disease: A previously unrecognized risk factor for thromboembolism. Int J Cardiol. 167(5):2259-63. 2013

Nagata H, Yamamura K, Ikeda K, Ihara K, Hara T Balloon-occluded retrograde transvenous obliteration for congenital portosystemic venous shunt: report of two cases. Pediatr Int. 54(3):419-21.2012

Yamamura K, **Nagata H**, Ikeda K, Ihara K, Hara T Efficacy of bosentan therapy for segmental pulmonary artery hypertension due to major aortopulmonary collateral arteries in children. Int J Cardiol. 161(1):e1-3. 2012

Baba H, Sugimori H, Nanishi E, **Nagata H**, Lee S, Kuwashiro T, Hashizume M Stroke in a child safely treated with intravenous tissue plasminogen activator and edaravone, a free radical scavenger. J Stroke Cerebrovasc Dis. 21(8):903.e5-8. 2012

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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
永田弾(Nagata Hazumu)
九州大学医学研究院

研究者番号：20570790

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：