

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461626

研究課題名(和文)川崎病における脱分化平滑筋による壁硬化メカニズムの解明及び新規予防法の開発

研究課題名(英文) Development of a new prophylaxis for arteriosclerosis by de-differentiated smooth muscle cells in Kawasaki disease.

研究代表者

丹羽 陽子 (NIWA, Youko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：60623618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は乳幼児期に好発する全身性血管炎であり、血管病変は瘤形成から動脈硬化性変化による閉塞・狭窄性変化に至り、虚血性心疾患の危険因子となる。我々は、この遠隔期の硬化性血管病変の進展には中膜平滑筋の遊走・増殖性変化が関与している可能性を指摘してきた。本研究では、川崎病類似血管炎モデルウサギを作製し、免疫組織学的手法を用いて平滑筋細胞の動態を検討した。遠隔期においても内膜および中膜の肥厚は依然として認められ、その部位は、活性化した平滑筋細胞とプロテオグリカンにより形成されていた。これを足場として、さらなる脂質の取り込みや細胞増殖促進が起こり、動脈硬化へと進展する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is a pediatric systemic vasculitis. Despite the clinically transient nature of active inflammation in childhood albeit rare complications, KD has recently suggested to increased the incidence of ischemic heart disease in young adulthood. However, little is known about the pathogenesis of the post-inflammatory remodeling of the coronary arteries in chronic KD. In the present study, we performed histological analysis of coronary arteries in a KD-like vasculitis of rabbits. We found that post-inflammatory remodeling of coronary arteries is associated with predominant accumulation of proteoglycans in the lesion by proliferation of activated vascular smooth muscle cells, which may lead to progression to coronary arteriosclerosis.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 動脈硬化 平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

川崎病は乳幼児期に好発する全身の中小動脈における汎血管炎である。急性期から回復期にかけて冠動脈瘤を形成し、血栓形成を伴う閉塞性変化や、内膜肥厚・動脈硬化性病変による狭窄性病変など、若年性虚血性心疾患の原因として重要な疾患である。これまでに、川崎病遠隔期例において冠動脈病変の有無にかかわらず、血管内皮機能障害が残存することを報告してきた。また、川崎病類似の血管炎を呈する離乳期家兎血管炎モデルや CAWS (Candida albicans water-soluble fraction) 誘導性血管炎マウスを用いた研究から、中膜平滑筋細胞の内膜への遊走を確認し、遠隔期に高コレステロールを負荷することで容易にアテローム性動脈硬化性病変が進展することも明らかにした。

動脈硬化の発症機序として、何らかの原因で血管内皮が傷害されることにより、凝集してきた血小板や内皮細胞からさまざまな因子が放出され、この因子の刺激を受けた中膜の平滑筋細胞は、増殖型へと形質転換して内膜側へと遊走する。マクロファージコロニー刺激因子(Macrophage-Colony Stimulating Factor: M-CSF)は、単球/マクロファージ系細胞に作用して、分化や成熟を促進する因子であるが、近年では、炎症や免疫応答との関与も明らかにされつつある。内膜に集積した平滑筋細胞には、この M-CSF の受容体(M-CSFR)が発現していることが報告されている。M-CSF により平滑筋細胞はマクロファージ様に分化し、LDL など各種変性脂質を貪食して泡沫化する。さらにはプロテオグリカンといった細胞外マトリックスを合成・分泌することで内膜を肥厚させ、動脈硬化が進展していくと考えられている。川崎病血管炎においても中膜平滑筋細胞が key となり、内膜肥厚や動脈硬化性病変が進展していくと考えられる。

2. 研究の目的

離乳期家兎川崎病モデル動物を用いて、血管炎の発症から遠隔期における中膜平滑筋細胞の動態を調べ、動脈硬化性病変への進展の可能性と血管リモデリングにおける平滑筋細胞の関与について検討した。

3. 研究の方法

川崎病モデル動物として、尾内らが確立した家兎アレルギー性血管炎モデルを用いた。幼若期のウサギに対し、4週齢および6週齢日に馬血清を静脈内投与することにより血管炎を誘発した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。

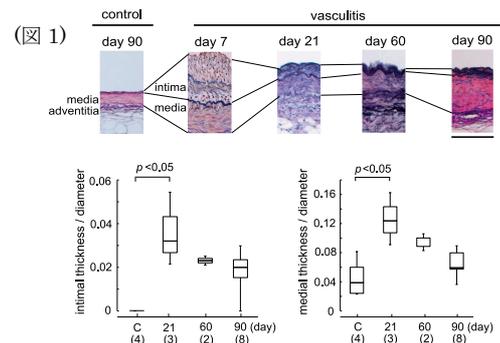
投与後1日、3日、7日、1週間、3週間、2ヶ月、3ヶ月目に心臓を摘出し、固定したのちパラフィンで包埋した。冠動脈について連続切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色およびエラチカワンギーソン(EVG)染色を行った。さらにプロテオグリカ

ンをアルシアンブルー染色により、 α -SMA、VCAM-1、NF- κ B、RAM-11(マクロファージ)、M-CSFR については免疫染色により検出を試みた。

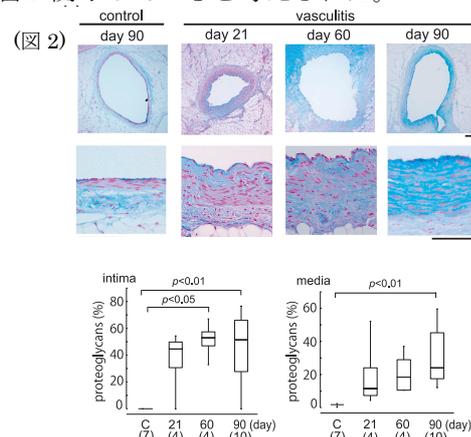
4. 研究成果

本モデルウサギの冠動脈において、馬血清投与後1日で内膜および中膜層の浮腫状変化が見られ、3日後には内膜および外膜への炎症細胞浸潤が認められた。7日後には全層性汎血管炎を発症したが、その後は経時的に衰退し、21日後には炎症細胞はほぼ消退した。RAM-11(+)マクロファージは投与後7日で確認されたが、3ヶ月後には消失していた。マクロファージ化した平滑筋細胞(M-CSFR(+) α -SMA(+))は、投与後3日で出現し、2ヶ月後には減少していたものの依然として炎症部位に分布していた。一方、コントロール群の冠動脈では、いずれの細胞も見られなかった。

また、内弾性板障害を伴う細胞増殖性の内膜および中膜肥厚が投与後7日に認められ、その後減少したが、3ヶ月経過してもなおコントロール群のレベルまでには回復しなかった(図1)。これにより、急性期以降も血管リモデリングが続いていることが示唆された。

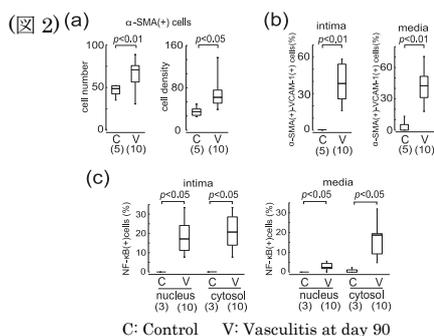


プロテオグリカンを含む細胞外マトリックスの蓄積が、動脈硬化における血管リモデリングに深く関与していることが知られている。本研究において、内膜および中膜のプロテオグリカンは馬血清投与後3週、2ヶ月、3ヶ月と有意に増加し続けていた(図2)。したがって、炎症の消退後も持続する冠動脈の内膜および中膜肥厚は、プロテオグリカンの貯留が関与していると考えられた。



細胞外マトリックスの過剰産生について、活性化した血管平滑筋細胞が関与していることはよく知られている。実際に、急性期(馬血清投与後7日)および遠隔期(3ヶ月)の冠動脈において、 α -SMA陽性細胞がコントロール群に比し有意に増加していた。また、活性化した平滑筋細胞のマーカーであるVCAM-1について、遠隔期における発現を調べた結果、内膜および中膜で α -SMA(+)/VCAM-1(+)細胞が有意に増加していた。さらに、VCAM-1の発現がNF- κ Bの活性化により誘導されることから、急性期におけるNF- κ Bの発現および核移行を調べたところ、ともに有意に増加しており、遠隔期においても依然としてNF- κ B(+)/VCAM-1(+)細胞が確認された。コントロール群では、VCAM-1(+)/ α -SMA(+)or NF- κ B(+)/VCAM-1(+)細胞は検出されなかった(図3)。したがって、遠隔期においても持続する平滑筋細胞の活性化が、炎症後の冠動脈において異常なリモデリングを引き起こしている可能性が示唆された。

以上のことから、川崎病血管炎ではマクロファージ様に活性化した平滑筋細胞がプロ



テオグリカンを分泌し、その貯留が血管内膜および中膜の肥厚に関与していることが考えられた。そこからさらに脂質の取り込みや細胞増殖促進が起こり動脈硬化へと進展する可能性が示された。

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 2 件)

1. Fujii M, Tanaka H, Nakamura A, Suzuki C, Harada Y, Takamatsu T, Hamaoka K. Histopathological Characteristics of Post-inflamed Coronary Arteries in Kawasaki Disease-like Vasculitis of Rabbits. Acta Histochem Cytochem. 2016; 49(1):29-36. 査読あり
2. Hamaoka-Okamoto A, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Nagi-Miura N, Ohno N, Arai Y, Tanaka H, Takamatsu T, Hamaoka K. The involvement of the vasa vasorum in the development of vasculitis in animal model of Kawasaki disease. Pediatr Rheumatol Online J. 2014 Mar 30;12:12.

doi: 10.1186/1546-0096-12-12. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 藤井麻衣子, 中村明宏, 濱岡建城, 高松哲郎, 田中秀央. 血管平滑筋が主役を演じる炎症後血管リモデリングは遠隔期にかけて遷延する. Post-inflamed remodeling of coronary vasculitis of rabbits. 第119回日本小児科学会学術集会. 平成28年5月15日. ロイトン札幌(北海道, 札幌市)
2. 藤井麻衣子, 中村明宏, 濱岡建城, 高松哲郎, 田中秀央. 川崎病遠隔期の内膜肥厚は動脈硬化に進展するかーウサギモデルを用いてー. 第56回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 平成27年10月3日. 関西医科大学 枚方新キャンパス(大阪府, 枚方市)
3. 藤井麻衣子, 中村明宏, 濱岡建城, 高松哲郎, 田中秀央. 川崎病遠隔期の内膜肥厚は動脈硬化に進展するかー離乳期ウサギモデルを用いてー. 第20回日本血管病理研究会. 平成27年10月17日. 国立循環器病センター研究所(大阪府, 吹田市)

[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

丹羽 陽子 (NIWA YOKO)

京都府立医科大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号: 60623618

(2) 研究分担者

濱岡 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

(3)研究分担者

中村 明宏 (NAKAMURA AKIHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・博士研究
員
研究者番号：50313854

(4)研究分担者

岡本 亜希子 (OKAMOTO AKIKO)
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻
医
研究者番号：00405250
(平成 25 年 4 月 1 日～平成 25 年 11 月 30 日)