

令和元年5月15日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05351

研究課題名(和文)川崎病の病態を制御する細胞外マトリックス分子の機能解明

研究課題名(英文) A study of unction of an extracellular matrix molecule which could modulate pathophysiology of Kawasaki Disease.

研究代表者

吉田 恭子(今中恭子)(Imanaka-Yoshida, Kyoko)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00242967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病は日本をはじめ東アジアの乳幼児を中心に発症する全身性血管炎で、冠動脈瘤は生命予後に直結する重篤な合併症であるが、病態は解明されておらず、その形成を予知する診断法も確立されていない。本研究では、動物モデル実験、ヒト剖検組織、患者血清と臨床経過を組み合わせ、炎症局所に特異的に発現して炎症および組織修復を制御する細胞外マトリックス分子の一つtenascin-C(TN-C)の分子動態・機能を解析し、TN-Cが川崎病急性期に炎症性サイトカインにより発現誘導され、ポシティブループを形成して炎症を増強することにより病態を増悪し、また血中TN-Cが病勢を反映するバイオマーカーになることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病に合併する冠動脈瘤は、免疫グロブリン治療の普及により発症頻度こそ減少したが、今なお、根本的な治療法はもとより、その形成を予知する診断法も確立されていない重篤な病態である。従って、分子病態解明を基盤とした新しいバイオマーカーおよび分子治療標的治療法の開発が急務である。本研究では、細胞外マトリックス分子の一つtenascin-C(TN-C)が治療抵抗性、及び冠動脈瘤形成を予知し治療法を選択するための有用なマーカーとなることが明らかになった。さらに、TN-Cが炎症を増強する病態増悪因子として働きうること及びその作用機構の一端が明らかになったため、それを利用した新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is an acute febrile illness of childhood characterized by systemic vasculitis and hyperendemic in Japan. The most critical complication is coronary aneurysm, however the pathophysiology remains unsolved. We studied the molecular function of a matricellular protein, tenascin-C(TN-C), in pathophysiology of KD and evaluated its potential for a diagnostic marker. In combined analysis with two kinds of experimental KD models using genetically engineered mice, human autopsy specimens and laboratory test on blood sample from the patients, we have found vascular smooth muscle cells and mesenchymal cells in adventitia in the vascular lesion synthesize TN-C stimulated by proinflammatory cytokines, which in turn, aggravates inflammation by activating macrophages. Furthermore, the elevated serum TN-C reflects disease activity and can be a predictive marker for high risk of coronary aneurysm formation and used to evaluate the effectiveness of the therapy.

研究分野：実験病理

キーワード：炎症 動物モデル バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 川崎病は、乳幼児を中心に発症する発熱性疾患で、日本をはじめ東アジアに多い。冠動脈を含む中小動脈の全層性炎症を本態とし、冠動脈壁が破壊されて瘤が形成されると、心筋梗塞の原因となるなど生命予後に直結する重篤な疾患である。冠動脈瘤は免疫グロブリン治療の普及により発症頻度こそ減少したが、今なお、病態解明に基づく根本的な治療法はもとより、その形成を予知する診断法も確立されていない。

(2) 細胞外マトリックス分子の一つテネイシン C (TN-C) は炎症局所に特異的に発現して炎症および組織修復を制御する。我々の研究により、血中 TN-C が心筋梗塞、心不全、脳動脈瘤など種々の病態で疾患活動性や予後予測マーカーになることが明らかになってきたため、川崎病の病態マーカーになりうるかと考え、2011-2014 年に厚生労働省難治性疾患「炎症性動脈瘤形成症候群」研究班を組織し、後ろ向き研究により血中 TN-C が川崎病の冠動脈瘤形成の予知に有用であるという予備的結果を得た。

#### 2. 研究の目的

遺伝子改変動物を用いたモデル実験、ヒト剖検検体、通常の診療で得られる患者血清と臨床経過を組み合わせる総合解析し、川崎病の病態における TN-C の分子動態及び機能を解明すると同時にバイオマーカーとしての有用性を検証し、新たな治療標的としての可能性を検討するために

- (1) 川崎病冠動脈瘤形成過程における (TN-C の発現マップの作製と産生細胞の同定
- (2) 冠動脈瘤病態マーカーとしての有用性の検証
- (3) マウスモデル及び培養細胞を用いた TN-C 分子機能解析と治療標的になる可能性の検証することを目的とした。

#### 3. 研究の方法

(1) A. C57BL/6 バックグラウンドの 4 週令のテネイシン C (TN-C) の遺伝子座に LacZ 遺伝子をノックインしたレポーターマウスに *Candida albicans* water-soluble fraction (CAWS) を投与したモデル、BALB/c バックグラウンドの TN-C レポーターマウスに Nod-1 リガンド FK565 を投与したモデルの 2 種類のマウス川崎病モデルを作成して、免疫組織化学により、川崎病冠動脈瘤形成過程における TN-C の発現・局在マップを作成し、産生細胞を同定した。

B. 東邦大学大橋病院の剖検標本リポジトリを用いてヒト冠動脈瘤形成過程での TN-C 分子の発現の経時的変化を解析した。

(2) 川崎病学会「新規バイオマーカーの確立に関する小委員会」及び 2017 年からは AMED 「バイオマーカーを用いた川崎病急性期治療法選択に関する研究」班と連携し、川崎病新規発症者の症例レジストリーを構築して血中 TN-C の測定を行い、前向き観察研究による、冠動脈瘤形成予知マーカー呼び治療効果判定マーカーとしての有用性について評価を行なった。

(3) A. TN-C ノックアウトを用いて(1)同様、2 種類の川崎病マウスモデルを作成し、動脈瘤形成、炎症の強さ、組織破壊の程度、サイトカイン発現を野生型と対比した。

B. マウス骨髄細胞由来マクロファージに精製 TNC を作用させてマクロファージに対する制御機能を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) A. (CAWS) 1mg /day を腹腔内に 5 日間連続投与すると、投与後 17-21 日で、ヒト川崎病急性期と病変に類似した冠動脈壁全層の強い炎症細胞浸潤、平滑筋細胞の壊死、中膜弾性線維の破壊と、病変部に TN-C の発現・沈着がみられた。ベータガラクトシダーゼ染色と免疫染色を組み合わせ、炎症急性期、平滑筋アクチン陽性の血管中膜平滑筋細胞及び、外膜周囲間質に存在するマクロファージ、T リンパ球、血管内皮細胞、リンパ管内皮のいずれでもない間葉系の細胞が TN-C を産生することが明らかになった。急性期の TN-C の発現・沈着は急性期第 10 病日のヒト剖検組織でも確認できたが、しかしながら、CAWS

モデルマウスでは投与 60 日後にも激しい炎症が持続し、動脈壁の著しい破壊が進行し、慢性期の病変はヒト川崎病の病態とは異なると考えられた。強い炎症が冠動脈が完全に破壊されるまで 60 日以上、長期間持続し、ヒトの病態とは異なると考えられた。そこで、BALBc バックグラウンドの 4 週令の TN-C レポーターマウスに Nod-1 リガンド FK565 (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を 1 日目及び 5 日目に皮下投与する別のモデル作成を試みた。FK565 投与後 7-14 日をピークに冠動脈起始部にマクロファージ浸潤を主体とする炎症が見られたが、CAWS モデルと異なり、炎症は徐々に消退し 45 日には完全に沈静化し、ヒト川崎病により良近いモデルと考えられた。しかしながら、冠動脈に外膜周囲のコラーゲン線維が増加し蛇行が見られたが、血管壁弾性線維の破壊や瘤形成は確認できなかった。CAWS モデル同様、急性期の病変部に TN-C の発現・沈着がみられ、その産生細胞は、血管中膜平滑筋細胞及び外膜周囲結合織の FSP あるいは DDR2 陽性間葉系細胞であることが確認できた。また FK565 モデルマウスの血中 TNC 値は急性期に上昇して治癒期に低下することも確認でき、バイオマーカーシミュレーション系になることが確認された。

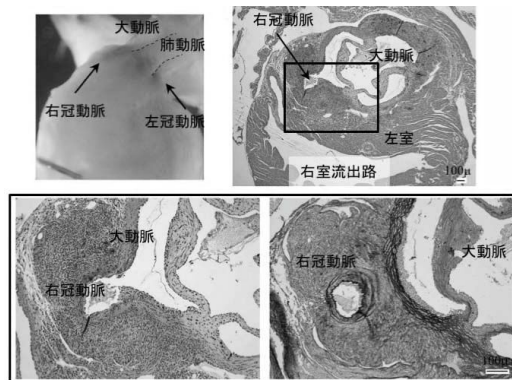


図 1. CAWS による川崎病マウスモデルの病変

B. ヒト川崎病冠動脈の剖検組織でも急性期第 10 病日に病変部に TN-C の沈着が認められたが、第 30 病日に炎症が消退すると消失し、血中 TN-C 値が病変局所での発現を反映することが確認できた。

(2) 川崎病患者に対するバイオマーカー TN-C の有用性を検証するために 380 例の症例が登録された。現在多くの症例が、小林スコアによる低リスク群 (score 4) では初回治療は免疫グロブリンとアスピリン、高リスク群 (score 5) ではそれにステロイドを追加した RAISE プロトコールに沿った治療を受けるという現状に即して解析した。低リスク群では初回治療有効例も無効例も治療前の血中 TNC 値に差はなかったが、高リスク群では初回治療有効例の治療前 TN-C 値は、低リスク群より有意に高く、高リスク群では治療不応性を予知できることが明らかになった。また、いずれの群でも治療有効例では、治療後の TNC が有意に低下し、治療効果判定指標になることも明らかになった。

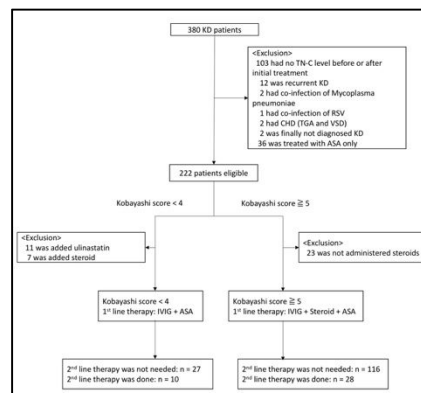


図 2.川崎病前向き研究登録症例

(3) A. 様々な組織の炎症病変に発言する TN-C は、病変局所で細胞に autocrine/paracrine 的に作用し、接着、遊走、分化、増殖、アポトーシスの制御に関わり、炎症、線維化を増強するなど多彩な機能を持つ病態を修飾する。我々が以前報告したように、マウス腹部大動脈周囲に  $\text{CaCl}_2$  を塗布により炎症を惹起しさらに

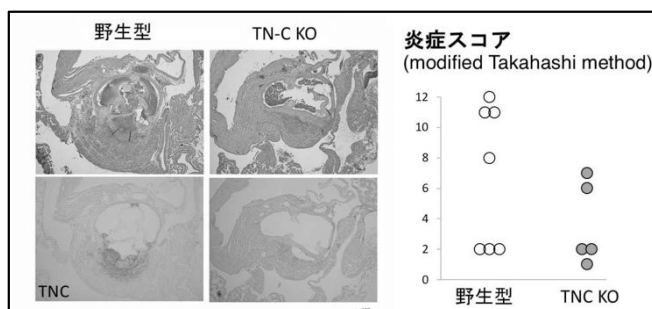


図 3. CAWS モデルマウスの炎症評価

angiotensinII 投与を行い非常に強い圧負荷からを負荷するモデルでは、胸部大動脈壁の平滑筋細胞を破壊的圧ストレスから保護し炎症反応を抑制することにより解離性大動脈瘤の発生を抑制する。しかし、TN-C は状況依存的にしばしば相反する作用を示し、遺伝子欠損マウスを用いた研究ではモデルの作り方により逆の結果が報告されることも少なくない。今回、CAWS モデルでは急性期 (投与 22 日目) で Takahashi らの方法に準じて大動脈基部を右冠尖、左冠尖、無冠尖、右冠動脈、左冠動脈の 5 つのセグメントに分けて評価すると、有意差は得られなかったが、TN-C KO で

は野生型と比較して炎症や組織破壊の程度が軽い傾向が見られ、RT-PCR で炎症性サイトカインの発現上昇も抑制された。FK565 によるモデルでも同様の傾向が見られた。

B. 培養系で TN-C はマクロファージの炎症性サイトカイン産生、M1 への polarization を促進、M2 へ polarization を抑制した。さらに炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ は、培養系で、病変部の TNC 産生細胞である血管平滑筋細胞の TNC 発現を誘導し、川崎病急性期に TNC はポジティブループを作って炎症を増強すると考えられた。従って、急性期に TN-C の分子機能を抑制することにより病変の進展を抑制できると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Kimura T., Tajiri K., Sato A., Sakai S., Wang Z., Yoshida T., Uede T., Hiroe M., Aonuma K., Ieda M., Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C accelerates adverse ventricular remodelling after myocardial infarction by modulating macrophage polarization. *Cardiovasc Res.* 115: 614-624. (査読あり)  
doi:10.1093/cvr/cvy1244., 2019.

Ageyama N., Kurosawa H., Fujimoto O., Uehara T., Hiroe M., Arano Y., Yoshida T., Yasutomi Y., Imanaka-Yoshida K. Successful Inflammation Imaging of Non-Human Primate Hearts Using an Antibody Specific for Tenascin-C. *Int Heart J* 60: 151-158, 2019. (査読あり)  
doi: 10.1536/ihj.17-734

Yokouchi Y., Oharaseki T., Enomoto Y., Sato W., Imanaka-Yoshida K., Takahashi K. Expression of tenascin C in cardiovascular lesions of Kawasaki disease. *Cardiovasc Pathol* 38: 25-30, 2018. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.carpath.2018.10.005

Imanaka-Yoshida K., Matsumoto K. I. Multiple Roles of Tenascins in Homeostasis and Pathophysiology of Aorta. *Ann Vasc Dis* 11: 169-180, 2018. (査読あり)  
doi: 10.3400/avd.ra.17-00118

Okuma Y., Suda K., Nakaoka H., Katsube Y., Mitani Y., Yoshikane Y., Ichida F., Matsushita T., Shichino H., Shiraishi I., Abe J., Hiroe M., Yoshida T., Imanaka-Yoshida K. Serum Tenascin-C as a Novel Predictor for Risk of Coronary Artery Lesion and Resistance to Intravenous Immunoglobulin in Kawasaki Disease- A Multicenter Retrospective Study. *Circ J* 80: 2376-2381, 2016. (査読あり)  
doi: 10.1253/circj.CJ-16-0563

[学会発表] (計 6 件)

Yamamoto D., Toyofuku Y., Katoh D., Sakamoto Z., Nishio H., Imanaka-Yoshida K. Analysis of molecular dynamics of Kawasaki Disease using a murine model induced by FK565. The 2<sup>nd</sup> JCS council Forum on Basic Cardio Vascular Research. 2018

Toyofuku Y., Katoh D., Miura N., Ohno N., Yoshida T. , Imanaka-Yoshida K. A possible role of tenascin-C in arterial lesion of Kawasaki Disease model mouse. The 12<sup>th</sup> International Kawasaki Disease Symposium. 2018

Yamamoto D., Toyofuku Y., Katoh D., Sakamoto Z., Nishio H., Imanaka-Yoshida K. Possible role of tenascin-C in Kawasaki vasculitis. 2018 Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference. 2018

Yamamoto D., Toyofuku Y., Katoh D., Nishio H., Imanaka-Yoshida K. Expression analysis of tenascin-C in a murine model of Kawasaki Disease induced by Nod-1 ligand. The 1st JCS council Forum on Basic Cardio Vascular Research. 2018

山本大貴、豊福優衣、加藤大佑、三浦典子、大野尚仁、吉田利通、今中恭子、*Candida albicans* 細胞壁水溶性画分を用いた川崎病モデルマウスによるテネンシン C の解析、第 36 回日本川崎病学会学術集会、2017

山本大貴、豊福優衣、加藤大佑、三浦典子、大野尚仁、吉田利通、今中恭子、川崎病モデルマウスの冠動脈瘤形成とテネイシンCの発現、第49回日本結合組織学会学術集会、2017

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：大熊 喜彰

ローマ字氏名：(Okuma, Yoshiaki)

所属研究機関名：国立研究開発法人国立国際医療研究センター

部局名：その他部局等

職名：小児科医師

研究者番号（8桁）：10609168

研究分担者氏名：勝部 康弘

ローマ字氏名：(Katsube, Yasuhiro)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20246523

研究分担者氏名：三谷 義英

ローマ字氏名：(Mitani, Yoshihide)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60273380

研究分担者氏名：高橋 啓

ローマ字氏名：(Takahashi, Kei)

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：80216712

研究分担者氏名：俵 功

ローマ字氏名：(Tawara, Isao)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：80378380

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。