

氏名 なかおか ひでゆき  
仲岡 英幸

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 183 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Endothelial microparticles modulate vasculitis during the acute phase of Kawasaki Disease**  
(川崎病急性期血管炎における血管微小粒子の役割)

論文審査委員

(主査) 教授 戸邊 一之  
(副査) 教授 笹原 正清  
(副査) 教授 服部 裕一  
(副査) 教授 芳村 直樹  
(指導教員) 教授 足立 雄一

# 論文内容の要旨

## 【目的】

川崎病は乳幼児期に好発し、原因不明の発熱が持続する疾患である。本疾患の病態は、主に中小動脈を中心とする全身性血管炎症候群であり、特に冠動脈の血管内皮障害をきたし、冠動脈瘤を形成する。現在でもなお、原因は解明されておらず、治療に不応で炎症の程度が強く、冠動脈病変(CAL)を形成する症例が約1割も存在する。CALを形成した場合は、時として瘤内に血栓を形成し、心筋梗塞や冠動脈瘤破裂のため死に至る場合がある。近年、血管内皮細胞障害により血管内皮細胞表面から遊離される血管微小粒子(endothelial microparticles、EMPs)が、冠動脈疾患、糖尿病、慢性腎不全、高血圧などの心血管合併症を有する患者において増加することが報告されている。これらの疾患群において、EMPsは細胞間でのコミュニケーションツールとして、microRNAなどの核酸物質を運搬する重要な役割があることが見直されている。川崎病においても、その病態が全身の血管炎であることからEMPsとの関連性が示唆され、EMPsが情報伝達の役割を担い、血管炎および血管内皮細胞障害に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

我々は、①川崎病急性期において、EMPsが川崎病患者のバイオマーカーとなりうるかどうか、②EMPsの役割を解明するため、川崎病急性期に関与する特定のmicroRNAを明らかにし、③これらのmicroRNAがターゲットとする遺伝子群の発現実験を行い、CAL形成にかかわる機序を明らかにすることを、本研究の目的とした。

## 【方法並びに成績】

**方法:**対象は、川崎病患者50例、年齢や性別を合わせた川崎病以外の有熱患者(ウイルスまたは細菌感染症)25例および健常者25例。さらに、川崎病患者は回復期における冠動脈径により、CAL群( $Z$ -score  $>2.5$ 、4例)および非CAL(NCAL)群( $Z$ -score  $\leq 2.5$ 、46例)の2群に分けた。①IVIG(大量 $\gamma$ グロブリン療法)治療前(Stage-1)、IVIG治療開始2-4日後(Stage-2)およびIVIG治療から2-4週後の回復期(Stage-3)の各3期において、血液検体採取を行った。今回検討するEMPsは微粒子(100nm-1.0 $\mu$ m)であり、通常の血清回収方法に加え12,000gの高速回転を1分間追加し、粗粒子を取り除き、微粒子のみが存在する血清の上清を使用した。血管内皮細胞由来のCD144抗体と血小板由来のCD42b抗体で二重免疫染色し、フローサイトメトリにて微粒子中のCD144抗体陽性EMPsの割合を測定した。②次に、微粒子から抽出したRNAを用い、各期毎にCAL群とNCAL群において、microRNAのmicroarrayを施行した。Stage-2において、CAL群で有意に上昇した複数のmicroRNAと、各々のmicroRNAがターゲットとするmRNAに好中球遊走に関与する5種の炎症性サイトカインmRNA(TNF- $\alpha$ 、IL-1B、IL-6、IL-10、IL-18)を加え、コンピューター解析を行った。③最終的に得られたCAL群に特異的な2種類のmicroRNAを用いて、THP-1単球細胞へのトラスフェクションを行い、サイトカインの遺伝子発現への影響を検討した。

## 成績:

### ① 急性期川崎病における EMPs の推移

微粒子中に含まれる EMPs の割合は、IVIG 治療前の川崎病患者において ( $1.27 \pm 0.16\%$ , mean  $\pm$  SD)、コントロール(有熱者  $0.09 \pm 0.03\%$ 、健常人  $0.08 \pm 0.03\%$ ) に対し優位の増加を認めた ( $p < 0.0001$ ) (図 1)。NCAL 群では Stage-2 で EMPs の割合は急激に減少するのに対して、CAL 群では急上昇を示し、2 群間で EMPs の推移に明らかな相違を認めた ( $p < 0.01$ ) (図 2)。さらに、EMPs 割合の最大値と左右の冠動脈径の Z score との間に強い相関係数を認めた(右冠動脈:  $R = 0.512$ , 左冠動脈:  $R = 0.488$ ) (図 3)。

### ② 特異的な microRNA の同定

次に、CAL 群の EMPs の推移を基に、NCAL 群と比較して有意に Stage-2 で高値を示し Stage-3 で正常化する CAL 群特有の microRNA を抽出した。CAL 群において、Stage-1 から Stage-2 で発現が 2 倍以上に変化し、かつ Stage-3 で正常化した 16 種類の microRNA を特定した (図 4)。また、has-miR-145-5p は CAL 群において Stage-1 で発現量が最高値を示し、Stage-2 まで高値を継続し、Stage-3 で正常化するため、今回の検討に加えた。この CAL 群に特異的な 17 種類の microRNA と、各々がターゲットとする mRNA に対してコンピューター解析を行い、好中球の遊走に重要な炎症性サイトカインと最終的に G-CSF に影響する 2 種類の microRNA (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a) が同定された (図 5)

### ③ microRNA のトランスフェクション実験

THP-1 単球細胞に対して、この 2 種類の microRNA のトランスフェクションを行った。まず予備実験として、positive control (hsa-miR-1) を THP-1 細胞内にトランスフェクションし、3 時間後に target となる protein tyrosine kinase 9 の mRNA の抑制が最大になることを確認した (図 6-1)。続いて、2 種類の microRNA (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a) を THP-1 細胞にトランスフェクションし、hsa-miR-320a は IL-18 の mRNA を 78% 抑制し、hsa-miR-145-5p は IL-6 の mRNA を 54% 抑制かつ IL-18 の mRNA を 47% 抑制することを証明した (図 6-2)。

## 【総括】

血清中に含まれる EMPs は、川崎病患者を予測するだけでなく、血管内皮細胞障害や血管炎の重症度を反映しており、川崎病急性期における CAL 形成を予測する鋭敏なバイオマーカーとなる。さらに、微小粒子内に含まれる特異的な microRNA (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a) は炎症性サイトカインの遺伝子発現を調整し、川崎病の病因や CAL 形成機序に重要な役割を果たしていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

## 【目的】

川崎病は乳幼児期に好発し、原因不明の発熱が持続する疾患である。本疾患の病態は、主に中小動脈を中心とする全身性血管炎症候群であり、特に冠動脈の血管内皮障害をきたし、冠動脈瘤を形成する。現在でもなお、原因は解明されておらず、治療に不応で炎症の程度が強く、冠動脈病変(CAL)を形成する症例が約1割も存在する。CALを形成した場合は、時として瘤内に血栓を形成し、心筋梗塞や冠動脈瘤破裂のため死に至る場合がある。近年、血管内皮細胞障害により血管内皮細胞表面から遊離される血管微小粒子(endothelial microparticles, EMPs)が、冠動脈疾患、糖尿病、慢性腎不全、高血圧などの心血管合併症を有する患者において増加することが報告されている。これらの疾患群において、EMPsは細胞間でのコミュニケーションツールとして、microRNAなどの核酸物質を運搬する重要な役割があることが見直されている。川崎病においても、その病態が全身の血管炎であることからEMPと関連性が示唆され、EMPが情報伝達の役割を担い、血管炎および血管内皮細胞障害に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

仲岡君は、①川崎病急性期において、EMPが川崎病患者のバイオマーカーとなりうるかどうか、②EMPの役割を解明するため、川崎病急性期に関与する特定のmicroRNAを明らかにし、③これらのmicroRNAがターゲットとする遺伝子群の発現実験を行い、CAL形成にかかわる機序を明らかにすることを、本研究の目的とした。

## 【方法ならびに成績】

方法:代諾者からインフォームドコンセントを得た川崎病患者50例を研究対象者とした。年齢や性別を合わせた川崎病以外の有熱患者(ウイルスまたは細菌感染症)25例および健常者25例を対照とした。さらに、川崎病患者は回復期における左右の冠動脈径のZ-scoreにより、CAL群(Z-score >2.5、4例)および非CAL(NCAL)群(Z-score ≤2.5、46例)の2群に分けた。①IVIG(大量γグロブリン療法)治療前(Stage-1)、IVIG治療開始2-4日後(Stage-2)およびIVIG治療から2-4週後の回復期(Stage-3)の各3期において、血液検体採取を行った。今回検討するEMPは微粒子(100 nm-1.0 μm)であり、通常の血清回収方法に加え12,000gの高速回転を1分間追加し、粗粒子を取り除き、微粒子のみが存在する血清の上清を使用した。血管内皮細胞由来のCD144抗体と血小板由来のCD42b抗体で二重免疫染色し、フローサイトメトリにて微粒子中のCD144抗体陽性EMPの割合を測定した。②次に、微粒子から抽出したRNAを用い、各期毎にCAL群とNCAL群において、microRNAのmicroarrayを施行した。Stage-2において、CAL群で有意に上昇した複数のmicroRNAと、各々のmicroRNAがターゲットとするmRNAに好中球遊走に関与する5種の炎症性サイトカインmRNA(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-18)を加え、コンピューター解析を行った。③最終的に得られたCAL群に特異的な2種類のmicroRNAを用いて、THP-1単球細胞へのトラスフェクションを行い、サイトカインの遺伝子発現への影響を検討した。

## 成績:

### ① 急性期川崎病におけるEMPの推移

微粒子中に含まれるEMPの割合は、Stage-1の川崎病患者において(1.27±0.16%, mean±SD)、コントロール(有熱者0.09±0.03%、健常人0.08±0.03%)に対し有意の増加を認めた(p<0.0001)(図1)。NCAL群ではStage-2でEMPの割合は急激に減少するのに対して、CAL群では急上昇を示し、2群間でEMPの推移に明らかな相違を認めた(p<0.01)。さらに、EMP割合の最大値と左右の冠動脈径のZ-scoreとの間に強い相関係数を認めた(右冠動脈:R=0.512, 左冠動脈:R=0.488)。

### ② 特異的なmicroRNAの同定

次に、CAL群のEMPの推移を基に、NCAL群と比較して有意にStage-2で高値を示しStage-3で正常化するCAL群特有のmicroRNAを抽出した。CAL群において、Stage-1からStage-2で発現が2倍以上に変化し、かつStage-3で正常化した16種類のmicroRNAを特定した(図4)。

また、has-miR-145-5p は CAL 群において Stage-1 で発現量が最高値を示し、Stage-2 まで高値を継続し、Stage-3 で正常化するため、今回の検討に加えた。この CAL 群に特異的な 17 種類の microRNA と各々がターゲットとする mRNA に対してコンピューター解析を行い、好中球の遊走に重要な炎症性サイトカインと最終的に G-CSF に影響する 2 種類の microRNA (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a) が同定された。

### ③ microRNA のトランスフェクション実験

THP-1 単球細胞に対して、この 2 種類の microRNA のトランスフェクションを行った。まず予備実験として、positive control (hsa-miR-1) を THP-1 細胞内にトランスフェクションし、3 時間後に target となる protein tyrosine kinase 9 の mRNA の抑制が最大になることを確認した(図 6-1)。続いて、2 種類の microRNA (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a) を THP-1 細胞にトランスフェクションし、hsa-miR-320a は IL-18 の mRNA を 78%抑制し、hsa-miR-145-5p は IL-6 の mRNA を 54%抑制かつ IL-18 の mRNA を 47%抑制することを証明した。

## 【総括】

仲岡君は、川崎病患者と川崎病患者以外の有熱患者の血清中に含まれる EMPs を解析し、川崎病患者の血清中の EMPs が川崎病患者を予測するだけでなく、血管内皮細胞障害や血管炎の重症度を反映しており、川崎病急性期における CAL 形成を予測する鋭敏なバイオマーカーとなることを明らかにした。さらに、微小粒子内に含まれる特異的な microRNA (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-320a) を microarray の解析により見出し、この microRNA が炎症性サイトカインの遺伝子発現を調整し、川崎病の病因や CAL 形成機序に重要な役割を果たしていることを示した。

仲岡君は、これら一連の研究の中で、血清中の EMPs 内には炎症を抑える microRNA が存在することを示し、実際この microRNA が炎症を抑制する作用があることを示した点で医学における学術的重要性が高く、さらに、EMPs が川崎病患者の確定診断にいたらない発熱 7-8 日後の「不全型」患者での川崎病の診断の有力なマーカーとなり、かつ冠動脈病変を予測するマーカーとなりうる可能性を示した点は、今後、臨床的發展が期待できる点である。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。