

川崎病既往児の冠動脈瘤における早期動脈硬化・血管老化所見の検討

深澤 隆治¹⁾, 渡辺 美紀¹⁾, 池上 英¹⁾, 内木場庸子¹⁾
 初鹿野見春¹⁾, 上砂 光祐¹⁾, 勝部 康弘¹⁾, 小川 俊一¹⁾
 山内 仁紫²⁾, 落 雅美²⁾

日本医科大学小児科¹⁾, 日本医科大学第二外科²⁾

Key words :

川崎病, 冠動脈瘤, 加齢変化, 動脈硬化,
eNOS, ICAM-1, RAGE

Coronary Aneurysm of Kawasaki Vasculitis Showing Typical Features of Senescence

Ryuji Fukazawa,¹⁾ Miki Watanabe,¹⁾ Ei Ikegami,¹⁾ Yohko Uchikoba,¹⁾ Miharu Hajikano,¹⁾
 Mitsuhiro Kamisago,¹⁾ Yasuhiro Katsube,¹⁾ Shunichi Ogawa,¹⁾ Hitoshi Yamauchi,²⁾ and Masami Ochi²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, ²⁾Second Department of Surgery, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

Background: The functional changes associated with cellular senescence are involved in human aging and age-related vascular disorders. Findings of senescence such as adhesion molecule expression, receptor for advanced glycation end product (RAGE) expression, and strong β -galactosidase (β -gal) staining of endothelial cells have been reported in adult atherosclerotic lesions of coronary arteries. We evaluated whether senescence-associated phenotypes were present in coronary artery aneurysms in Kawasaki disease (KD).

Methods: Three KD patients aged 5, 5, and 11 years underwent coronary artery bypass grafting (CABG), along with giant coronary artery aneurysm size-reducing operation. The excised coronary artery aneurysm tissues were used for β -gal staining and other immunohistochemical stainings including von Willebrand (vW) factor, endothelial nitric oxide synthetase (eNOS), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and RAGE. The controls were internal thoracic arteries (IMA), which were obtained from the adult patients by the trimming procedure used for CABG.

Results: Strong β -gal staining was observed at the endothelial cells in coronary aneurysms of KD, whereas little staining was observed in the controls. Immunohistochemical study showed decreased vW factor and eNOS expression in endothelial cells in KD. In addition, RAGE was stained in proliferated intima, and ICAM-1 was strongly stained especially at endothelial cells in the adventitia in KD.

Conclusions: Increased β -gal activity, ICAM-1 and RAGE expression, and decreased eNOS expression are all characteristic phenotypes of senescence. Together with their histological similarity to the early atherosclerotic region, KD aneurysms have already developed atherosclerotic progression even in young patients with KD.

要 旨

背 景：成人の早期動脈硬化所見として血管内皮細胞の障害および血管老化所見が注目されている。代表的な所見として endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) の低下，炎症性サイトカインの増加，接着因子の増加が挙げられる。今回川崎病冠動脈瘤においてもこのような早期動脈硬化所見が認められるのかを検討した。

対象・方法：川崎病巨大動脈瘤，および心筋虚血を有する症例 3 例 (5 歳 2 例，11 歳 1 例) で，冠動脈バイパス術，巨大冠動脈瘤縫縮術を施行した際に供出された冠動脈瘤壁について，加齢関連 β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 活性染色ならびに免疫組織染色を行った。

結 果：冠動脈瘤では，強い β -gal 染色，von Willebrand (vW) 因子，eNOS の低下，intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の亢進，receptor for advanced glycation end products (RAGE) の発現などが確認され，これまで成人の動脈硬化所見として報告されている老化に特徴的組織像と極めて類似した組織像を呈していた。

結 語：少なくとも川崎病冠動脈瘤では，若年といえども組織学的には動脈硬化が確実に進行していると考えられた。

平成16年11月18日受付

別刷請求先：〒206-8512 東京都多摩市永山 1-7-1

平成17年 5 月24日受理

日本医科大学多摩永山病院小児科 深澤 隆治

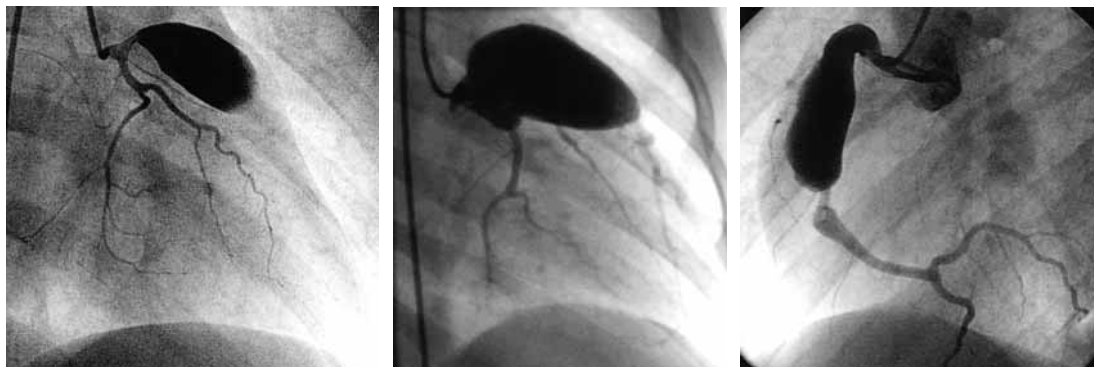


Fig. 1 Coronary artery angiography of the patients in this study.

- A Left coronary artery angiography of a 5-year-old girl. The left anterior descending branch was described in a considerably late phase of the angiogram. Coronary artery dilatation was not controlled even after immunoglobulin therapy, and it developed into giant coronary aneurysms on both sides. Thrombus formation was frequent in aneurysms despite warfarine therapy, and repeated thrombolysis by urokinase was required. One and a half years after onset, CABG and giant aneurysm size-reducing procedure were carried out.
- B Left coronary angiography of a 5-year-old boy. Three administrations of immunoglobulin therapy and steroid pulse therapy could not minimize giant coronary artery aneurysm formation on both sides. One year after the onset, CABG and giant aneurysm size-reducing procedure were carried out.
- C Right coronary angiography of an 11-year-old boy. Giant coronary aneurysms were produced in spite of immunoglobulin and urokinase therapy. CABG and giant coronary aneurysm size-reduction operation were done three and a half years after the onset.

緒言

近年成人領域での動脈硬化病変の研究の進歩が著しい。動脈硬化は慢性的な血管炎に基づく炎症性疾患であり、血管壁への低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein: LDL) の沈着、マクロファージの浸潤とLDL取り込みによる肥満細胞化、プラーク形成、プラーク破綻による血栓形成から狭心症、心筋梗塞に至る一連の流れが解明されてきている。組織学的、分子生物学的解析も進んでおり、動脈硬化病変部の細胞接着因子の増加や、各種炎症性サイトカイン増加が確認されている¹⁾。細胞接着因子の増加や炎症性サイトカインの増加はいわゆる「血管の老化所見」として知られているものであり、血管の老化と動脈硬化とは深く関係していることが判明してきている²⁾。

一方、川崎病は原因こそいまだ解明されていないが、全身の血管炎を主体とする疾患であり、特に冠動脈炎による冠動脈後遺症は川崎病の予後をほぼ決定付けるものである。アスピリン、免疫グロブリンをはじめとする治療が広く一般化してきており、急性期に冠動脈拡張を含む冠動脈障害を来す症例は約10%となっている^{3,4)}。急性期冠動脈障害を生じなかった症例においても、近年動脈硬化が炎症性疾患であると理解されてくるに至り炎症性疾患としての共通性から、川崎病の既往が将来において動脈硬化の危険因子の一つになる可能性が論議されるようになってきている^{5,6)}。

今回われわれは、川崎病児の巨大冠動脈瘤の組織を解析する機会を得た。川崎病巨大冠動脈瘤において動脈硬化の早期所見である「血管老化の所見」が小児でも認められるかどうかを検討し、動脈硬化所見との相違を組織学的に明らかにしようと試みた。

対象および方法

当科において川崎病による巨大冠動脈瘤、冠動脈狭窄により冠動脈バイパス手術 (coronary artery bypass grafting: CABG) および巨大冠動脈縫縮手術を施行した3例 (男児2例, 女児1例)。年齢は5歳2例, 11歳1例で、それぞれ川崎病罹患から手術までの期間は、1年6カ月, 1年0カ月, 3年6カ月であった。全例に免疫グロブリン療法, 2例にウロキナーゼ療法, 1例にステロイドパルス療法が施行されていたが、巨大冠動脈瘤を形成した症例である。CABG施行時は全例アスピリン、ワーファリンの投与を受けていた。おのおのの症例の冠動脈造影をFig. 1に示す。これらの症例に対し、CABGおよび巨大冠動脈内の血流改善を目指して、巨大冠動脈縫縮術を施行した。縫縮術の際に摘出される冠動脈組織を一般病理検査、および今回の研究に使用した。また、58, 67, 71歳症例で狭心症のためにCABGを施行した際にトリミングされた内胸動脈を対照として用いた。

本研究は日本医科大学付属病院倫理委員会の承認を受け、各症例の保護者からインフォームドコンセント



Fig. 2 Senescence-associated β -galactosidase staining.

- A Photograph of luminal surface of giant coronary artery aneurysm of the KD patient. Strong senescence associated with β -galactosidase activity (blue staining) was observed on the luminal surface of the aneurysm.
- B Control IMA: little blue staining was seen on the luminal surface of control IMA.
- C Frozen cross-section of β -gal-stained KD aneurysm: β -gal blue color staining was predominant inside the aneurysm, suggesting β -gal activity was mainly induced by endothelial cells (arrows).

×100

A | B | C

を画面にて得た。

1. 加齢関連 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)活性染色

加齢に伴い血管組織内 β -gal活性は上昇するため、本染色は血管老化所見を検出する染色として報告されている⁷⁾。摘出された血管を4% paraformaldehyde (PFA)にて室温で30分固定後、 β -gal染色液[1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal), 5mmol/l potassium ferrocyanide, 5mmol/l potassium fericyanide, 50mmol/l NaCl, 2mmol/l MgCl₂, 0.01% sodium deoxycholate, and 0.02% Nonidet-40]にて24時間37°Cにてincubateした。組織を撮影した後、OCT compound (Miles Inc.)に包埋し凍結、7 μ mの凍結切片とした。

2. 免疫組織染色

手術中に供出された組織は2分し、一方は4% PFAにて速やかに固定し、パラフィン包埋のうえ4 μ mに薄切した。パラフィン包埋切片は、脱パラフィン、proteinase Kによる抗原賦活化処理1% H₂O₂にて内因性ペルオキシダーゼ阻害を行い、一次抗体として抗von Willebrand (vW)抗体(DAKO, EPOS HRP conjugate)、抗endothelial nitric oxide synthetase (eNOS)抗体(clone 3, BD Transduction Laboratories, 1:75)にて反応させた。また、2分した組織の一方は、OCT compoundに包埋し凍結後、7 μ mに薄切、アセトン固定、1% H₂O₂にて内因性ペルオキシダーゼ阻害後、抗intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)抗体(clone P24A, CHEMICON International, Inc. 1:50)、抗receptor for advanced glycation end-product (RAGE)抗体(H-300, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1:100)にて1時間反応させた。おのおの1次抗体反応後TBST (pH 7.4)にて4回洗浄、vW抗体についてはそのまま3,3'-

diaminobenzidine (DAB)発色、そのほかの抗体についてはHRP conjugated 二次抗体(Bio-Rad Laboratories, 1:3,000)に処理、DAB発色させた。

結 果

1. 加齢関連 β -gal活性染色 (Fig. 2)

川崎病冠動脈腫組織では、3例とも血管内腔側に強い β -gal染色(青色)を認めた(Fig. 2A)。一方、controlの内胸動脈にはほとんど β -gal染色は確認できなかった(Fig. 2B)。川崎病冠動脈腫組織凍結切片においては血管の内膜・内皮に一致する部位に沿って β -gal染色が確認された(Fig. 2C矢印)。

2. 免疫組織染色

1) vW染色 (Fig. 3)

Control内胸動脈では、血管内皮に沿ってvW因子が染色された(Fig. 3A矢印)。川崎病巨大冠動脈でも発色はcontrolに比べ弱いものの、血管内皮に沿ったvW因子の染色が観察された(Fig. 3B矢印)。

2) eNOS染色 (Fig. 4)

Control内胸動脈では、血管内皮に沿ったeNOSの染色が確認された(Fig. 4A矢印)。川崎病巨大冠動脈腫では血管内皮に沿ったeNOSの染色は確認されなかったが、外膜における微小血管内皮にはeNOSの染色を認めた(Fig. 4B矢印)。免疫組織染色はeNOSの活性を観察しているものではないが、少なくともeNOSの存在が極めて低下していることを示唆するものであり、NOの定常的な産生もかなり低下していることを示唆する所見と考えられた。

3) ICAM-1染色 (Fig. 5)

Control内胸動脈では外膜の微小血管でわずかにICAM-

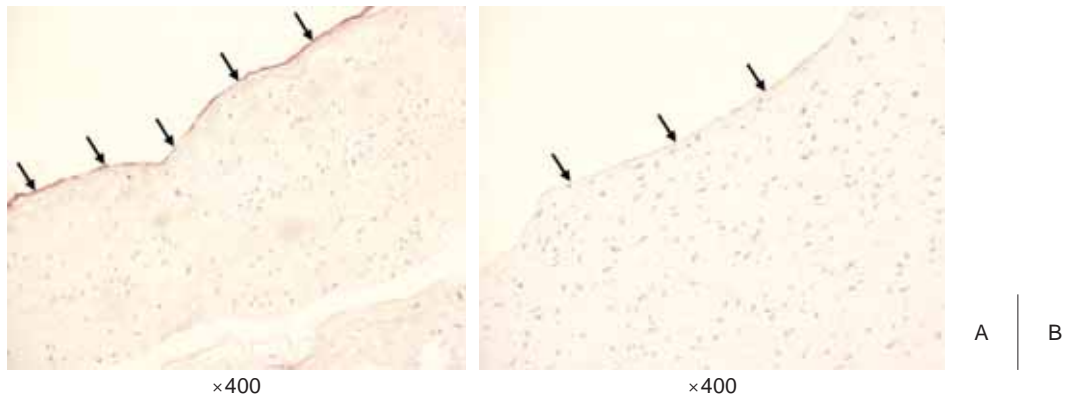


Fig. 3 Immunohistochemical staining for von Willebrand factor.

- A Control IMA: vW factor staining was observed along with the endothelium (arrows).
 B KD aneurysm: weak (compared to control IMA) staining of vW factor was detected on the surface of the lumen (arrows).

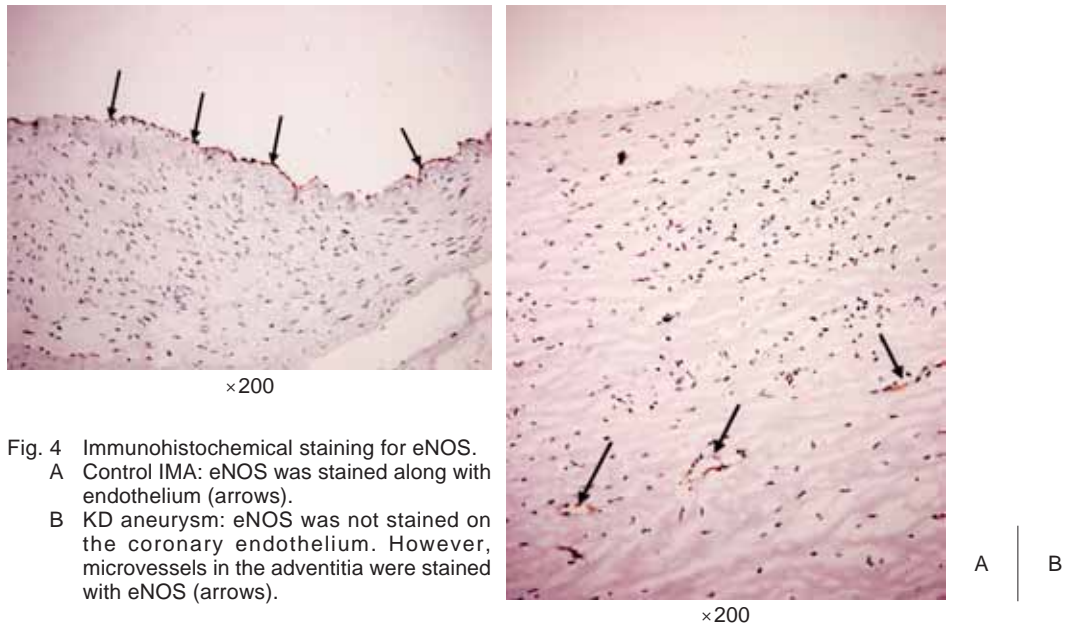


Fig. 4 Immunohistochemical staining for eNOS.

- A Control IMA: eNOS was stained along with endothelium (arrows).
 B KD aneurysm: eNOS was not stained on the coronary endothelium. However, microvessels in the adventitia were stained with eNOS (arrows).

1の発現が認められたのに対して(Fig. 5A矢印),川崎病冠動脈瘤では増殖した内膜内,外膜での微小血管内皮でICAM-1の発現が観察された(Fig. 5B矢印)。

4) RAGE染色(Fig. 6)

Control内胸動脈では,RAGEの染色は認められないが(Fig. 6A),川崎病冠動脈瘤では増殖した内膜内にRAGEの発現が確認された(Fig. 6B矢印)。

考 察

これまでの報告では,川崎病冠動脈病変として組織学的に特徴的なものは,著しい炎症による血管構造の破壊と内膜の著しい肥厚であるとされていた⁸⁾。近年,動脈硬化病変が炎症性疾患であるとの概念が確立さ

れ,冠動脈血管炎である川崎病の長期予後として,川崎病既往症例の早期動脈硬化の進展の可能性が注目されている^{5,6)}。しかし,動脈硬化と川崎病との直接の因果関係は証明されるに至っていない。動脈硬化病変には血管の老化と呼ばれる組織・細胞学的特徴があり,動脈硬化の炎症性変化のもととなっている。これまでの川崎病と動脈硬化との関係を論じたものの中には,動脈硬化の加齢変化に注目した川崎病冠動脈病変の研究は報告されていないことから,今回のわれわれの研究は大変意義深いものと考えられる。

今回,若年の症例といえども巨大冠動脈瘤組織で加齢関連 β -gal活性が亢進していることが確認され,巨大冠動脈瘤では組織的には加齢変化が進行していること

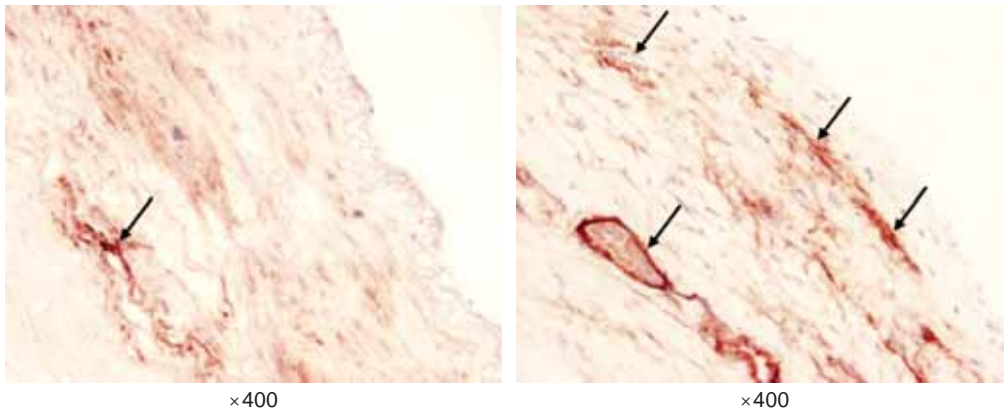


Fig. 5 Immunohistochemical staining for ICAM-1.

A Control IMA: small vessels in adventitia expressed ICAM-1 (arrow).

B KD aneurysm: ICAM-1 was expressed in small vessels in hyperplastic intima and in adventitia (arrows).

A | B

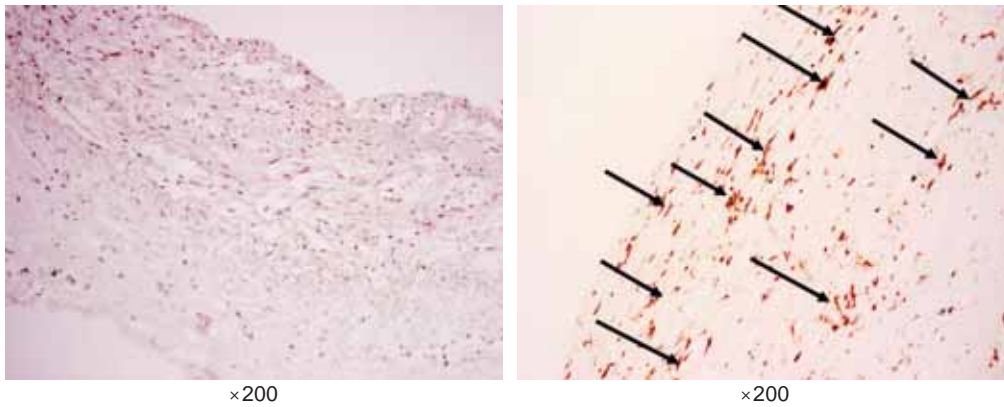


Fig. 6 Immunohistochemical staining for RAGE.

A Control IMA: no RAGE staining.

B KD aneurysm: RAGE is expressed in hyperplastic intima (arrows).

A | B

が認められた。血管の老化所見は血管内皮細胞の機能障害とも共通し、正常血管内皮機能の減弱、血管弛緩性の減弱、炎症性サイトカインの増加、細胞接着因子の増加などが挙げられ、それぞれ組織学的にはeNOSの低下、ICAM-1の増加などが代表的所見とされる⁹⁾。このような血管の老化所見は特に動脈硬化巢の細胞に常に観察されることであり、血管老化所見と動脈硬化との密接なつながりが示唆されている。今回のわれわれの研究では、川崎病巨大冠動脈瘤でも組織学的血管老化として矛盾のない免疫組織学的所見が得られている。

一方、最近成人の血管内皮障害から動脈硬化病変に至る過程において注目されているものとしてAGE(advanced glycation endproducts)RAGE相互作用がある。AGE/RAGE相互作用は内皮細胞の増殖・管腔形成促進、周皮細胞の消失といった作用を示すことから、糖尿病性

網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経症という糖尿病の三大合併症に深く関わっていることが示唆されている^{10, 11)}。グルコースをはじめとする還元糖は、蛋白質・アミノ酸のアミノ基と非酵素的に反応して、Schiff baseやAmadori productなどの糖化産物を可逆的に形成する(Fig. 7)。その後、縮合、開裂、架橋形成を経て不可逆的にAGEを形成する。この一連の反応がglycationと呼ばれる。例えば、糖尿病治療コントロールに用いられるHbA1cはAmadori productの一つである。AGEには、bis(lysyl)imidazolium cross-link, hydroimidazolones, monolysyl adductsなどのsubgroupがあり、AGE形成反応は循環血液中、細胞外マトリックス、細胞内と生体内ではいずれでも起こり得る。糖尿病、腎不全、加齢変化に際してはAGEの亢進が認められている。AGEの受容体がRAGEであり、血管上皮細胞ではAGE/RAGE相互作用から細胞接着因子、tissue factor、炎症性サイトカイ

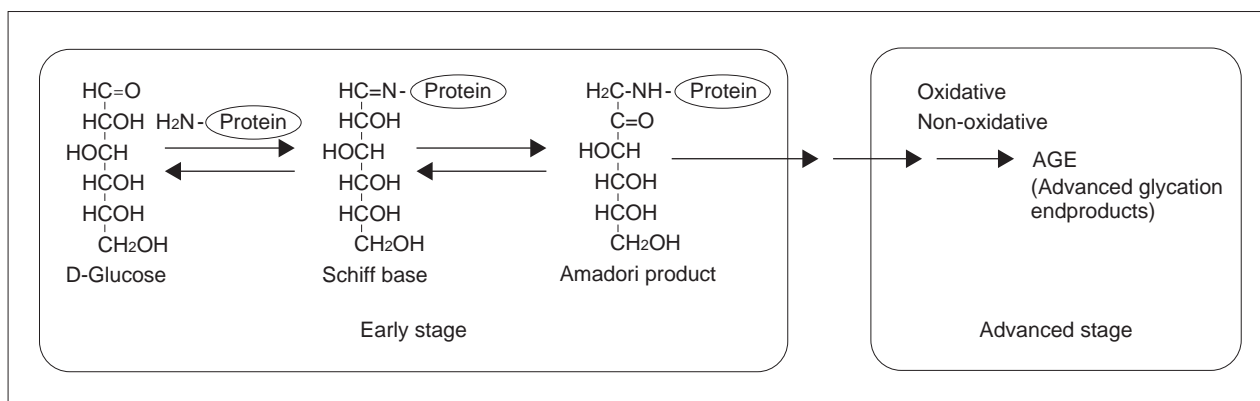


Fig. 7 AGE formation.

ン、ケモカインが誘導され、活性酸素もNADPHオキシターゼを介して産生されることが報告されている¹²⁾。これら一連の反応は、糖尿病患者以外でも動脈硬化を来す要因として注目され、動脈硬化病巣ではRAGEの発現が確認されている¹³⁾。

さらに付け加えるならば、RAGEのリガンドの一つであるS100A12(EN-RAGE)が川崎病急性期に高値を示すことが報告されており¹⁴⁾、AGE/RAGEの相互作用が急性期も含めて川崎病と深く関わっていることが示唆されている。

今回冠動脈瘤で観察されたeNOS発現の低下、ICAM-1の亢進、RAGEの発現は、これまで動脈硬化薬にて報告されてきた組織所見と極めて類似するものであり、少なくとも川崎病冠動脈瘤では若年であっても動脈硬化が確実に進行していると考えられた。

【参考文献】

- 1) Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC: Genetic basis of atherosclerosis: Part I: New genes and pathways. *Circulation* 2004; 110: 1868–1873
- 2) Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al: Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 105: 1541–1544
- 3) Yanagawa H, Nakamura Y, Yashiro M, et al: Results of the nationwide epidemiologic survey of Kawasaki disease in 1995 and 1996 in Japan. *Pediatrics* 1998; 102: E65
- 4) Yanagawa H, Nakamura Y, Yashiro M, et al: Incidence survey of Kawasaki disease in 1997 and 1998 in Japan. *Pediatrics* 2001; 107: E33
- 5) Noto N, Okada T, Yamasuge M, et al: Noninvasive assessment of the early progression of atherosclerosis in adolescents with Kawasaki disease and coronary artery lesions. *Pediatrics* 2001; 107: 1095–1099
- 6) Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S: Pathological study of post-coronary arteritis in adolescents and young adults: with reference to the relationship between sequelae of Kawasaki disease and atherosclerosis. *Pediatr Cardiol* 2001; 22: 138–142
- 7) Dimri GP, Lee X, Basile G, et al: A Biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9363–9367
- 8) Amano S, Hazama F, Hamashima Y: Pathology of Kawasaki disease: I. Pathology and morphogenesis of the vascular changes. *Jpn Circ J* 1979; 43: 633–643
- 9) Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al: The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: Antisenescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2: 141–148
- 10) Vautier JL, Schmidt AM: Protein glycation: A firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 2004; 95: 233–238
- 11) 山本靖彦, 桜井 繁, 米倉秀人, ほか: AGE-RAGE系を標的とした糖尿病血管障害の抑制の可能性. *日薬理誌* 2003; 121: 49–56
- 12) Vautier MP, Chappey O, Corda S, et al: Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E685–694
- 13) Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, et al: The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: Role of glycemic control. *Circulation* 2003; 108: 1070–1077
- 14) Foell D, Ichida F, Vogl T, et al: S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet* 2003; 361: 1270–1272