

合併により下肢虚血の重症化症例も報告されており、肢の保護の観点から、長期にわたる血管外科医による follow-up が必要と考えられる。

本疾患は若年発症のため、住居移転などの社会的な事情により長期間同一の医療機関で治療・経過観察を行われている症例はそれほど多くなく、さまざまな専門科や医療機関において経過が追われている。このため、全国規模の統計を血管外科的な観点から行うことは余り行われていない。現在の本邦における高齢化しつつある Buerger 病患者の肢の長期予後について、血管外科領域の専門施設における現状を検討し、肢の保護に役立てることを目的に全国アンケート調査を行った。

## B 研究方法

日本血管外科学会にご協力いただき、日本血管外科学会評議員の先生方の勤務されている血管外科専門施設を受診されている Buerger 病症例にアンケート調査を依頼した。アンケート内容は発症時における症状・喫煙歴、初診後の治療内容・喫煙歴、アンケート回答時の症状、併存疾患などであった。研究班から各施設に同アンケート用紙を送付し、各施設の先生方から直接症例にアンケートをお願いしていたたくよう依頼した。アンケート回収は各施設の先生方にしていたとき、可及的にアンケートの正確性を期するために、先生方に治療内容などをカルテをもとに確認・訂正していただいた上で、返送していただいた。氏名など個人同定

可能となる項目を除いて、各項目について解析・検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究のアンケート回答に際し、ご本人に個人の資料としては公になることないことをご理解いただいた上でご協力いただいた方に回答していただいた。アンケート回答内容は、個人名を伏せた形で集計し、統計処理した。またアンケート内容には遺伝子解析に関わる項目は含まれていない。

## C 研究結果

アンケートは 50 施設から返送され、547 名のアンケート結果を回収した。内訳は男性 503 例 (92.0%)、女性 (8.0%) であり、外来初診時年齢は 18 歳から 77 歳におよび平均は 42.6 歳であった。初診時からの経過年数は 1 ヶ月から 51 年におよび平均 15.7 年であり、本アンケート回答時年齢は 60.3 歳であった。また発症時までの喫煙歴は 519 例 (94.9%) に認められたか、25 例 (4.6%) には喫煙歴がなかった。

上肢における発症時症状は、冷感 82 例、間歇性跛行 5 例、安静時痛 21 例、潰瘍形成 40 例であり、下肢では冷感 26 例、間歇性跛行 160 例、安静時痛 112 例、潰瘍形成 191 例であり、下肢の症状が強い症例が多かった。上肢下肢合わせての症状では、冷感 55 例、間歇性跛行 142 例、安静時痛 123 例、潰瘍形成 224 例と Fontaine III・IV 度症例が 63% に上った。アンケート回答時の症状は、冷感 101 例、

間歇性跛行 14 例、安静時痛 18 例、潰瘍形成 11 例であり、下肢では冷感 67 例、間歇性跛行 217 例、安静時痛 66 例、潰瘍形成 54 例であった。上肢下肢合わせたの症状では、症状なし 80 例、冷感 108 例、間歇性跛行 212 例、安静時痛 71 例、潰瘍形成 76 例と FontaineⅢ・Ⅳ度症例は 26%であった。多くの症例では、緩解状態にあると考えられた。

現在までの切断術歴では、趾（指）切断 112 例（20.5%）、肢切断 48 例（8.8%）を認めた。また虚血に対する手術として、交感神経切断術が 267 例（48.8%）、血行再建術が 145（26.5%）に行われていた。初診後の喫煙歴に対する回答では、初診後喫煙者 198 例（継続 70 例、途中から禁煙 128 例）、禁煙継続者 303 例（60.5%）であった。趾（指）切断 112 例中初診後喫煙者 66 例、非喫煙者 36 例であり、非趾（指）切断 431 例中初診後喫煙者 131 例、非喫煙者 300 例であり、統計学的に初診後喫煙と趾（指）切断との相関を認めた。また肢切断 48 例中初診後の喫煙に関するアンケート返答があった 42 例中初診後喫煙者 27 例、非喫煙者 15 例であり、非趾（指）切断 494 例中初診後喫煙者 170 例、非喫煙者 324 例であり、統計学的に初診後喫煙と肢切断との相関を認めた。交感神経切断術施行症例で初診後喫煙に対して回答のあった 233 例中、初診後喫煙者 112 例、非喫煙者 121 例であり、非施行 257 例中初診後喫煙者 88 例、非喫煙者 169 例であり、統計学的に

初診後喫煙と交感神経切断術施行との相関を認めた。さらに血行再建術施行症例で初診後喫煙に対して回答のあった 133 例中、初診後喫煙者 64 例、非喫煙者 69 例であり、非施行 364 例中初診後喫煙者 132 例、非喫煙者 232 例であり、統計学的に初診後喫煙と交感神経切断術施行との相関を認めた。

血行再建術ならびに交感神経切断術が行われた 337 症例において、初診時安静時痛 71 例、潰瘍形成 162 例と FontaineⅢ・Ⅳ度症例が 70%を占めたか、アンケート回答時安静時痛 49 例、潰瘍形成 37 例と FontaineⅢ・Ⅳ度症例は 26%に減少した。

交感神経切断術・血行再建術などの外科的治療法が行われず、薬剤による内科的治療法が行われた 215 症例において、初診時安静時痛 52 例、潰瘍形成 71 例と FontaineⅢ・Ⅳ度症例が 57%を占めたか、アンケート回答時安静時痛 27 例、潰瘍形成 26 例と FontaineⅢ・Ⅳ度症例は 25%に減少した。またこれら、保存的治療が行われた症例において初診後の喫煙歴とアンケート回答時の症状については相関を認めなかった。

動脈硬化に関わる合併症は、糖尿病 75 例（13.7%）高脂血症 83 例（15.2%）高血圧 162 例（29.6%）に認められた。また脳梗塞 40 例、脳出血 5 例、虚血性心疾患 35 例、閉塞性動脈硬化症 26 例、動脈瘤 10 例、慢性腎不全 9 例を認めた。また高齢化に従って増加する悪性疾患は、食道癌 3 例、胃癌 16 例、結腸癌 2 例、

直腸癌 2 例、肺癌 7 例、肝臓癌 3 例、水癌 2 例、腎癌 4 例、膀胱癌 2 例、前立腺癌 3 例、その他 4 例に認め、全体としては 48 例 (8.8%) に悪性疾患を認めた。

#### D 考察

Buerger 病は、閉塞性動脈硬化症と異なり若年発症で、背景因子として動脈硬化症や加齢という危険因子が少ないことから、生命予後は良好とされてきた。近年、本邦において生活様式の西欧化、環境衛生の改善などが進み、本疾患の新規発症は大幅に減少してきている。しかしながら、若年発症であることから、現在各医療機関において治療・経過観察されている症例で初診時から同一医療機関を受診している割合は、高くはないと考えられる。このため、肢の予後を長期にわたり追跡することは困難であった。今回、末梢血管疾患を専門として診察されている日本血管外科学会評議員の先生方の勤務機関を受診している Buerger 病症例の方に肢の予後を含めてアンケート調査にご協力いただいた。本調査では、切断部位、時期、血行再建部位、時期など各施設の医師に確認をお願いすることにより可級的に正確に調査することが可能となった。ただ、初診時に通常強く指導されるであろう禁煙に関しては、記載無しか少なからず認められ、患者自身もよくないこととは考えているものの、禁煙できないことをあらわしているものと考えられた。

禁煙を核とする内科的保存治療法によ

って、初診時 57%に認められたいわゆる Fontaine III・IV 度症例か、アンケート時には 25%に減少していた。初診後の喫煙歴に関して症状とは有意な相関か認められなかったか、禁煙者に症状軽快者か多く認められる傾向にあった。Fontaine III・IV 度症例か 25%であるか、切断に至らず内科的治療で対応できていると考え、症状としては比較的軽度な状態で寛解状態に至っているものと考えられる。

交感神経切断術もしくは血行再建術の外科的治療が施行された症例は、当然ながら初診時 Fontaine III・IV 度症例が 70%を占め、前述の保存的治療群に比して重症患者が多く認められた。しかしアンケート時 Fontaine III・IV 度症例は 26%に過ぎず、外科的治療法は有用であった。また趾指切断、肢切断、交感神経切断術、血行再建術のいずれも、初診後喫煙者の優位に多く施行されていた。切断群においては、喫煙継続したために症状の寛解が得られず、切断に陥った症例や切断後には症状がなくなり喫煙をさらに継続した症例の両者が混在しているものと考えられた。また交感神経切断術や血行再建術が施行された症例においては、喫煙継続により症状悪化をもたらされたり、寛解が得られなかったりしたものが多いと考えられた。

保存的治療においても、外科的治療においてもアンケート時には 25%前後か Fontaine III・IV 度の重症虚血趾の群に属する結果となったが、このことから比較

的経症例には禁煙を遵守させ、抗血小板剤を中心とする内科的治療法により治療を開始し、より重篤な症例や内科的治療にて悪化する症例においては外科的治療を選択するのかよいと考えられた。最終的には FontaineⅢ・Ⅳ度症例か 4 分の 1 残存することになるか、これらの症例に対して更なる外科的治療が行われておらず、比較的症状のおちついた寛解に至っているものと考えられた。

加齢に伴い、高血圧・糖尿病・高脂血症など動脈硬化性病変をきたす疾患に罹患するようになり、虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症などを合併する症例も認められた。Buerger 病は主として下腿動脈を侵し、閉塞性動脈硬化症は大腿動脈より中枢側か侵されることが多いため、両疾患の合併は肢の虚血を増悪させる。このため動脈硬化性疾患の背景因子となる疾患を合併している症例では、より嚴重な肢の観察が必要である。

また、加齢に伴いともない増加すると考えられる悪性疾患も合併も、非常に多岐にわたる臓器に認められ、肢の予後の

みならず生命予後を改善するためには、外来受診時に肢の観察のみならず、悪性疾患の合併を念頭において経過観察することか必要であると考えられた。

#### E 結論

Buerger 病症例の肢保護には、初診後の禁煙を徹底し、保存的治療が有効でない症例に対しては、交感神経切除、血行再建術などの外科的治療を考慮することか有用であると考えられた。

#### F 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

なし

##### 2 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

予定なし

厚生労働科学研究費補助金（「難治性血管炎に対する調査研究」事業）

分担研究報告書

重症難治性慢性虚血肢・心に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生治療  
に関する研究

分担研究者 高野 照夫 日本医科大学第一内科 教授

研究要旨 現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない重症難治性虚血肢（ハーシャー病，ASO,糖尿病潰瘍・壊疽，PSS）17例，虚血性心疾患（狭心症，虚血性心筋症）6例に対して自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法を施行し，その有効性及び安全性を示した  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmine(TF) perfusion scintigraphy 等による種々の評価法により，4週後良好な血流増加を証明し（平均 18%），疼痛の消失，緩和，QOL の著明な改善をもたらした 本治療法は，limb salvage のための新しい戦略となりうると考えられた

A 研究目的

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない重症難治性虚血肢（ハーシャー病，ASO,糖尿病潰瘍・壊疽，PSS）に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法の有効性を証明する

B 研究方法

全身麻酔下に腹臥位にて両側腸骨より骨髄細胞液 500 ml を採取した 500  $\mu$ l 及び 200  $\mu$ l の フィルター後，血液分離装置 AS TEC 204 を使用して，骨髄単核球と血小板の細胞層を採取し，最終収量は，60-80 ml に濃縮された 直ちに 24-27G シリンにて虚血下肢及び debridement 後の潰瘍周辺に筋注した

（倫理面への配慮）

日本医科大学付属病院倫理委員会及び日本医科大学倫理委員会の2つの倫理委員会の承認を受け，その適応に関しては

各科（6科7人）よりなる適応評価小委員会において適応を選択した

C 研究結果

Fontaine 分類では，92%がIV度(11/12例)を占め，糖尿病は 33%（4 /12例）か合併していた 視覚的アナログ（visual analog scale VAS）にて定量的に検討したか，術前 66.5  $\pm$  5.0 (mm)に対して術後4週で 12.1  $\pm$  2.2 (mm)と著明に低下していた（ $p < 0.001$ ）ABIは，術前 0.65  $\pm$  0.08 から術後4週で 0.73  $\pm$  0.07（ $p = 0.055$ ）と改善した 足肢及び手指の安静時疼痛は，11/12例 92%で除去された 術前歩行可能で測定可能であった症例での treadmill test における無痛歩行時間は，術前 140  $\pm$  53 秒から術後4週で 451  $\pm$  74 秒と大幅に改善した（ $p = 0.034$ ）

D 考察

全ての症例で患者は満足され，12例中 5

例では、前医で膝下よりの切断術を診断されていたか、本療法の結果、痛みが除去され全例か切断せず、1例を除いて自力歩行で退院した

本治療法の有効性を評価するため、客観的でしかも定量化可能な評価法は難しい Yuyama ら<sup>3</sup>は、angiogenesis の客観的評価法として、ABI, treadmill test における無痛歩行時間及び経皮的酸素分圧(TcO<sub>2</sub>)が有効であったと述べているが、我々の検討では、ABI, treadmill test における無痛歩行時間では有効性が示唆されたものの、TcO<sub>2</sub> は、測定センサーの接触の問題等により有効ではなかった

#### E 結論

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない重症難治性虚血肢（ハーシャー病, ASO, 糖尿病潰瘍・壊疽, PSS）17例, 虚血性心疾患（狭心症, 虚血性心筋症）6例に対して自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法を施行し、その有効性及び安全性を示した <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmine(TF) perfusion scintigraphy 等による種々の評価法により、4週後良好な血流増加を証明し(平均 18%), 疼痛の消失, 緩和, QOL の著明な改善をもたらした 本治療法は、limb salvage のための新しい戦略となりうると考えられた

#### F 健康危険情報

本療法の副作用に関連して、2例で筋注部位の局所的炎症（発赤, 腫脹, 軽度熱感）があったが、7日以内に発赤は消失した

#### G 研究発表

#### 1 論文発表

- ① Miyamoto M, Yasutake M, Takano H et al Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation in refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy Cell Transplant in press
- ② 宮本正章, 安武正弘, 高野仁司, 他 重症難治性糖尿病性壊疽に対する自己骨髄幹細胞浸透人工真皮を用いた血管再生細胞治療 2003, Complication 8, 31-37
- ③ 宮本正章, 安武正弘, 高野仁司, 他 難治性疾患への再生医療 重症難治性心血管疾患に対する自己骨髄細胞を利用した新しい血管再生治療 麻酔 52, S67-S75, 2003
- ④ 宮本正章 糖尿病を合併した ASO に血管再生療法は有効か 循環器診療 2, 17-23, 2003

#### 2 学会発表

- ① 宮本正章 他 第 50 回日本麻酔科学会 招待講演 日本麻酔科学会雑誌 2003
- ② 宮本正章 他 第 65 回日本臨床外科学会総会シンポジウム 日本臨床外科学会雑誌 2003
- ③ 宮本正章 他 第 41 回日本人工臓器学会総会シンポジウム 人工臓器 2003
- ④ 宮本正章 他 第 2 回日本再生医学会総会（優秀演題賞受賞）再生医療 2003
- ⑤ 宮本正章 他 第 39 回日本移植学会総会 要望演題 移植 2003
- ⑥ 宮本正章 他 第 18 回糖尿病足病変研

研究会 内科 2004	(予定を含む。)
⑦宮本正章 他 第2回日本組織移植学会 総会 2003	なし 1 実用新案登録
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)	なし
H 知的財産権の出願・登録状況	2 その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

難治性血管炎に関する調査研究に関する研究

分担研究者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学 教授

研究要旨

難治性血管疾患であるハーシャー病に対して、遺伝子プラスミドによる血管新生療法の安全性・有用性を臨床研究において検討する。現在分担研究者が行っている遺伝子治療臨床研究では中長期においても良好な結果が得られており、本研究班では、さらに詳細な検討を行うため、他施設臨床研究を予定している。本研究は臨床研究にとまらず、最終的には HGF 遺伝子プラスミド製剤の薬剤開発を目指す。

A 研究目的

末梢性血管疾患に対する遺伝子プラスミドを用いた血管新生療法の安全性・有用性を検討する。

B 研究方法

分担研究者は大阪大学で「末梢性血管疾患に対する HGF 遺伝子プラスミドを用いた遺伝子治療臨床研究」(TREAT-HGF, Japan Trial to Treat Peripheral Arterial Disease by Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer) をハーシャー病 8 症例に対して実施した。本臨床研究では、血管新生因子 HGF の naked plasmid の筋注による遺伝子導入を行い、安全性・有効性を観察する。初期成績において良好な結果が得られたか、今回さらに追跡調査し、詳細な長期成績について検討する。

本臨床研究は厚生労働省の遺伝子治療カ

イドラインを遵守しており、また同意取得文書において患者の人権・プライバシーなどの倫理的配慮を行っている。この妥当性は厚生労働省・文部科学省により確認されており、その指導のもとに実施されている。さらに大阪大学内に大阪大学遺伝子治療臨床研究審査委員会を設置しており、第三者機関による管理を受けている。

C 研究結果

TREAT-HGF において 22 症例（閉塞性動脈硬化症 14 例・ハーシャー病 8 例）に対して遺伝子治療が実施された。遺伝子投与に起因する重篤な副作用の発現は現在に至るまで認められず、また遺伝子投与後 2 ヶ月の初期成績で確認された改善度は、遺伝子投与後 1 年においても持続していた。



## D 考察

本遺伝子治療臨床研究において中長期においても、重篤な副作用の発現は見られず、安全性は許容範囲内と考えられた。また初期成績において見られた改善度についても投与後 1 年までその効果は持続していることが確認され、本遺伝子治療が難治性血管疾患に対する有用な治療法になる可能性が強く示唆された。前回報告した初期成績で確認された安全性はその後の追跡にて中長期においても認められる。本臨床研究は 2 年間の追跡調査を予定しており、今後もさらなる追跡調査を行い、遠隔期における副作用の発生・治療効果の持続性についてもさらに検討すべきである。血管新生およびそれに伴う血流量増加を直接検出できる検査手段の確立も今後の課題である。

## E 結論

TREAT-HGF において、遺伝子治療の中長期における安全性・有効性が示唆された。

## F 健康危険情報

現在までに TREAT-HGF において 15 件の重篤有害事象 (SAE) が発生しているか (遺伝子投与後 2 ヶ月の初期判定時には 11 件)、大阪大学遺伝子治療審査委員会において遺伝子プラスミドとの因果関係は否定されており、また厚生労働省・文部科学省に報告され、その妥当性も確認されている。従って現在のところ

遺伝子プラスミドの危険情報はない。研究参加患者にも重篤有害事象について随時報告している。

## G 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Hiromi Koike, Ryuichi Morishita, Sohta Iguchi, Motokuni Aoki, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, Chieko Yokoyama, Tadashi Tanabe, Toshio Ogiwara, Yasufumi Kaneda Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene The FASEB Journal 2003, 17 779-781
- 2 Ryuichi Morishita Cardiovascular Disease and Angiogenesis Intesnal Medicine 2003, 3 301-302
- 3 森下 竜一 末梢性血管障害の遺伝子治療 日本脈管学会 2003 年 第 43 巻第 3 号 75-80
- 4 牧野寛史、森下竜一、荻原俊男 遺伝子を利用した血管再生治療 Genetic Medicine (老年医学) 12月号 2003年 41巻 No 12 1759-1764

2 学会発表

- 1 森下 竜一 「末梢動脈疾患に対する肝細胞増殖因子（HGF）遺伝子による血管新生療法」第10回 日本遺伝子診療学会大会 2003年7月24日 大阪
- 2 森下 竜一 「Long Term Evaluation of Results from 1st Stage in TREAT-HGF」 2003年7月24日 大阪
- 3 森下 竜一 「Clinical results from TREAT-HGF」 The Japan Society Of Gene Therapy 2003年7月18日 京都
- 4 森下 竜一 「」 XIII th Interanational Symposium on Atherosclerosis 2003年9月28日～10月2日 京都
- 5 森下 竜一 「末梢動脈疾患に対する肝細胞増殖因子（HGF）遺伝子による血管新生療法」 第26回日本高血圧学会総会 2003年10月31日 宮崎

H 知的財産権の出願・登録状況

なし。

1 実用新案登録

なし。

2 その他

なし。

## FDG-PET を用いた高安動脈炎活動性の評価に関する研究

分担研究者 小林 靖 東京医科歯科大学医学部循環制御内科助手

**研究要旨** 高安動脈炎は、早期診断の方法、明確な治療指標、再燃診断が遅れ、重篤な合併症が進行してしまうケースが多い。大動脈の炎症を同定する方法として FDG-PET 法を用いその有用性を検討した。その結果、強い炎症が大血管に生じている場合には本法にての早期診断、再燃診断が可能である事が示唆された。

**A 研究目的** 高安動脈炎は現在、1) 全身の炎症所見、2) 画像診断による血管病変の存在、3) 脈無しなどの身体所見、などにより診断が下されているが、診断の遅れ、また、治療の指標も全身的な炎症マーカーに基づいている。しかしながら、その判断に苦慮するケースもある。そこで大動脈における炎症を 18F-FDG-PET を用いて直接評価して、早期診断、治療指標としての可能性を検討した。

**B 研究方法** 研究班の診断基準に基づき行った。急性期患者 10 名、慢性期患者 2 名、再燃例 1 名ならびに正常者 6 名を用いて検討した。半日の絶食後、300-360MBq のフッ素(18F)標識 フロロデオキシグルコース (18F-FDG) を投与後、PET カメラを用い撮像した。全員より書面での同意を得て、また、倫理委員会の承認を得ている。

**C 研究結果** 18F-FDGは急性期患者10名中6名で大動脈やその分枝血管に集積像を認めた。また、再燃例1名において18F-FDGの取り込みを認めた。また、2名の急性期患者について治療中の炎症活動性を検討したところ 炎症マーカーと大動脈炎の炎症の消失が一致しないことが明らかになった。

**D 考察** FDG-PETは高安動脈炎の早期診断、治療指標、再燃診断に有用である可能性がある。一方、動脈に集積するFDGが本当に局所の炎症を反映したものか今後の検討が必要である。

**E 結論** 18F-FDG は高安動脈炎炎症血管部位の同定や活動性の検討に有用である可能性がある。また、症例によっては FDG-PET は治療の有力な指標となる可能性がある。FDG-PET 法は高安動脈炎の早期診断ならびに治療に有用であると考えられる。

**F 健康危険情報** 本方法は非常に安全性が高く、すでに臨床応用されているものである。

**G 研究発表** 1) Kobayashi Y, ら Aortitis inflammation imaged with [Fluorine-18] labeled fluoro-deoxyglucose Positron Emission Tomography (18 FDG-PET) 第 67 回日本循環器学会学術集会、福岡、2003 年 3 月 30 日 2) 小林 靖ら FDG-PET を用いた大動脈炎直接評価と臨床応用 第 100 回日本内科学会、福岡 2003 年 4 月 3 日

**H 知的財産権の出願・登録状況** なし。

## 平成14年度高安動脈炎患者全国調査

分担研究者 小林 靖 東京医科歯科大学医学部循環制御内科助手

**研究要旨** 難治性血管炎研究班大型血管炎の臨床に関する小委員会として平成10年より高安動脈炎患者約900名を登録、現在の本邦における本症の診断、治療、予後などの推移を主治医に対するアンケート調査を通して行っている。今回、平成15年2月に行った調査の概要を報告する。

**研究目的** 高安動脈炎患者臨床病態の推移を全国規模で検討するため、平成10年度に897名の高安動脈炎の患者を登録、第3回目になる今回は、1) 予後、2) 治療状況、3) 外科手術の動向、4) 重症度について検討した。

**研究方法** 大型血管炎の臨床に関する小委員会として調査を行った。平成10年度に登録された897名の高安動脈炎の患者主治医あてに調査表を平成15年1月に送付し、3月末に回収した。

**研究結果** 平成10年度に登録された高安動脈炎患者897名のうち、今回調査では510名(56.9%)の回答を得た。

1) 予後について 510名中、4年間での死亡者は20名、死亡率はおおよそ3.9%、年平均約1%であることがわかった。死亡原因を検討した。不整脈、突然死7名、心不全 6名、肝ガン2名、脳出血、大動脈破裂、炎症性腸炎、腎不全、肺炎 各1名である。2) 治療状況について 薬物療法なく寛解 21.0%、ステロイドのみ 65.3% ステロイド+免疫抑制剤 6.0%、免疫抑制剤のみ 0.0%、その他 3.8%であった。3) 外科手術の動向 外科手術例は510名中90件(17.6%)であった。外科手術が施行された時期は、1960-1970年 4名、1971-1980年 10名、1981-1990年

28名、1991-2000年 44名、2001-2003年 5名であった。手術の内容は、頭頸部、上肢乏血症状に対するバイパス 28名、大動脈弁置換術 25名、大動脈瘤に対する人工血管 14名、腎動脈バイパス、移植、PTA 12名、CABG、PTCA 11名、異型大動脈縮窄症に対する人工血管 4名、下肢乏血症状に対するバイパス 4名、眼底出血、下肢塞栓による切断、大腸切除、頸動脈小体切除 各1名であった。

4) 重症度 各主治医による重症度判定の結果、重症度I 35.7%、II 41.3%、III 3.9%、IV13.7%、V5.4%であった。

**考察** 平成14年度全国調査の結果、高安動脈炎の年間死亡率はおおよそ1%、ステロイドを中心に治療が行われていた。死亡原因として、突然死などの心合併症によるものが多いことがわかった。外科手術は約17%で行われ、頭部上肢乏血症状、大動脈弁閉鎖不全に対する手術が多い。

**結論** 今回の調査から、本邦の高安動脈炎は合併症のなかでも特に心臓合併症による死亡が多いことが明らかになった。本症の3分の1に大動脈弁閉鎖不全が合併する心機能低下例に対する厳重な管理が必要であると考えられる。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める壊死性血管炎の発症機序に関する研究

分担研究者 吉木 敬 北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野 教授

**研究要旨**

ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-I の env-pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット (env-pX ラット) は壊死性血管炎を含む種々の collagen vascular disease を発症する。これまでの研究により、本ラットの壊死性血管炎の発症には胸腺非リンパ球組織における env-pX 導入遺伝子の発現が重要な役割を果たしており、胸腺で分化する CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 免疫制御性 T 細胞に疾患発症前から機能異常があることが明らかとなっている。env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では CTLA-4 や Foxp3、GITR、SOCS ファミリー遺伝子の発現低下があり、細胞機能異常との関連が示唆されるか、同細胞の機能異常は胸腺における分化過程とは無関係に生じていた。すなわち、env-pX ラットの壊死性血管炎の発症に CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常が主要な役割を果たしているとは考えにくい。むしろ、胸腺における自己血管反応性 T 細胞のセレクションに何らかの異常がある可能性が高いと考えられた。

**A 研究目的**

env-pX ラットは壊死性血管炎を含む種々の collagen vascular disease を発症する。これまでの研究により、本ラットの壊死性血管炎の発症には胸腺非リンパ球組織における env-pX 導入遺伝子の発現が重要な役割を果たしており、胸腺で分化する CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 免疫制御性 T 細胞に疾患発症前から機能異常があることが明らかとなっている。env-pX ラットにおける CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の分子異常を明らかにし、胸腺での分化異常の有無ならびに壊死性血管炎発症への関与について検討した。

**B 研究方法**

疾患未発症の env-pX ラットおよび同系正常ラット (WKAH ラット) の脾臓から magnetic cell sorting により CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取し、同細胞の機能発現に関わる各種分子群について、フローサイトメトリーや定量的リアルタイム RT-PCR の手法を用いて比較検討を行った。また、env-pX ラットと WKAH ラットの間であらかじめ骨髄置換を行い、生着後のラットから CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取して、機能障害の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。

**C 研究結果**

env-pX ラットと WKAH ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、T 細胞レセプターの発現量や CD45RC、CD122 (IL-2 レセプター β 鎖)、CD28、CD80/86、膜結合型 TGF-β の発現量に有意差は認めなかった。正常 CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に特徴的とされる CTLA-4 および Foxp3、GITR の遺伝子発現は env-pX ラットでは低かった。また、炎症性サイトカインを抑制することが知られている SOCS ファミリーの遺伝子群の発現も、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では WKAH ラットに比べて有意に低かった。

骨髄を正常に置換した env-pX ラットから採取された CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では免疫反応抑制能が保たれていたか、骨髄を env-pX に置換した WKAH ラットでは同細胞の機能に異常が認められた。

**D 考察**

疾患発症前の env-pX ラットでは、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に量的異常はないものの、同細胞のアナシー状態が破綻しており、免疫反応抑制機能に障害があることが明らかとなっている。今回の検討により、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では CTLA-4 および Foxp3、GITR の遺伝子発現が低いことが明らかとなった。これらの分子は CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の

機能発現に重要な役割をもつことが知られており、これら分子の発現異常と細胞機能異常の関連が示唆された。一方、CD25 をはしめ T 細胞活性化マーカーの発現は env-pX ラットと WKAH ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では差がなく、env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞が、未発見の疾患状態における活性化された T 細胞を含む可能性は低いと考えられる。

env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、炎症性サイトカインのシグナルを抑制する SOCS ファミリー (SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, CIS) の遺伝子発現が極めて低く、WKAH ラットとの差が有意であった。CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞における SOCS ファミリー分子の役割は明らかではないが、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では SOCS ファミリー分子による抑制系が十分に働かないために、活性化シグナルが入りやすい可能性も考えられる。

以上のような env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の分子異常か、胸腺における分化段階での異常によるものかどうかを確認するために、env-pX ラットと WKAH ラットの間であらかじめ骨髄置換を行い、生着後のラットから CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取して、機能障害の有無を検討した。骨髄を正常に置換した env-pX ラットから採取された CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では免疫反応抑制能が保たれていたか、骨髄を env-pX に置換した WKAH ラットでは同細胞の機能に異常か認められた。従って、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>

T 細胞の機能異常は、同細胞に導入遺伝子が発現していることに起因しており、胸腺における分化過程とは無関係に生じていることが判明した。env-pX ラットの壊死性血管炎の発症には胸腺における T 細胞の分化異常が関与していると考えられているので、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常が壊死性血管炎の主要な病因とは考えにくい。むしろ、自己血管反応性 T 細胞のセレクションに何らかの異常がある可能性が高いと考えられる。

## E 結論

env-pX ラットの壊死性血管炎の発症には胸腺非リンパ球組織における env-pX 導入遺伝子の発現が重要な役割を果たしており、胸腺で分化する CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 免疫制御性 T 細胞に疾患発症前から機能異常があることが明らかとなっている。env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では CTLA-4 や Foxp3, SOCS

ファミリー遺伝子の発現低下があり、細胞機能異常との関連が示唆された。しかしながら、同細胞の機能異常は胸腺における分化過程とは無関係に生じており、env-pX ラットの壊死性血管炎の発症に CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常が主要な役割を果たしているとは考えにくい。むしろ、胸腺における自己血管反応性 T 細胞のセレクションに何らかの異常がある可能性が高いと考えられた。

## F 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Yoshiki, T Pathogenesis of HAM/TSP in a rat model Gann Monograph on Cancer Research 50 "Two decades of adult T-cell leukemia and HTLV-I research" Edited by Sugamura, K, Uchiyama, T, Matsuoka, M, Kannagi, M Japan Scientific Societies Press p183-196, 2003
- 2 Higuchi, M, Ishizu, A, Ikeda, H, Hayase, H, Fugo, K, Tsuji, M, Abe, A, Sugaya, T, Suzuki, A, Takahashi, T, Koike, T, Yoshiki, T Functional alteration of peripheral CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases J Autoimmun 20 43-49, 2003
- 3 Ishizu, A, Tsuji, T, Abe, A, Saito, S, Takahashi, T, Ikeda, H, Meruelo, D, Yoshiki, T Transduction of dominant negative ATF-1 suppresses the pX gene expression in joint fibroblastic cells derived from HTLV-I transgenic rats Exp Mol Pathol 74 309-313, 2003
- 4 Tomaru, U, Ikeda, H, Jiang, X, Ohya, O, Yoshiki, T Provirus expansion and deregulation of apoptosis-related genes in the spinal cord of a rat model for human T-lymphocyte virus type I-associated myeloneuropathy J Neurovirol 9 530-538, 2003
- 5 Tanaka, S, Ikeda, H, Otsuka, N, Yamamoto, Y, Sugaya, T, Yoshiki, T Tissue specific high level expression of a full length human endogenous retrovirus genome transgene, HERV-R, under control of its own promoter in rats Transgenic Res

- 12 319-328, 2003
- 6 Kawada, M, Ikeda, H, Takahashi, T, Ishizu, A, Ishikura, H, Katoh, H, Yoshiki, T Vaccination of fusion cells of rat dendritic and carcinoma cells prevents tumor growth in vivo *Int J Cancer* 105 520-526, 2003
  - 7 Nakaya, H, Ishizu, A, Ikeda, H, Tahara, M, Shindo, J, Itoh, R, Takahashi, T, Asaka, M, Ishikura, H, Yoshiki, T In vitro model of suicide gene therapy for alpha-fetoprotein-producing gastric cancer *Anticancer Res* 23 3795-3800, 2003
  - 8 Yano, T, Kishimoto, T, Tomaru, U, Kawarada, Y, Kato, H, Yoshiki, T, Ishikura, H Further evidence of hepatic transdifferentiation in hepatoid adenocarcinomas of the stomach quantitative analysis of mRNA for albumin and hepatocyte nuclear factor-4  $\alpha$  *Pathology* 35 75-78, 2003
  - 9 Yang, L, Ikeda, H, Lai, Y, Yoshiki, T, Takada, K Epstein-Barr virus infection of rat lymphocytes expressing human CD21 results in restricted latent viral gene expression and not in immunoblastic transformation *J Med Virol* 70 126-130, 2003
  - 10 Tsuchikawa, T, Ikeda, H, Kikuchi, K, Tsuji, T, Baba, T, Ishizu, A, Tanaka, Y, Kato, H, Yoshiki, T Hematopoietic progenitor cells as possible origins of epithelial thymoma in a human T lymphocyte virus type I pX gene transgenic rat model *Lab Invest* 84 245-252, 2004
- 2. 学会発表**
- 1 Hayase, H, Ishizu, A, Higuchi, M, Abe, A, Tsuji, M, Ikeda, H, Yoshiki, H Comparative characterization of CD25+CD4+ T cells between HTLV-I transgenic and wild type rats 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S-38-39, 2003
  - 2 Miyatake, Y, Ikeda, H, Yoshiki, T cDNA array analysis of the host gene expression in spinal cords of rats with HTLV-I infection 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S-66, 2003
  - 3 Otsuka, N, Ikeda, H, Tanaka, S, Ishizu, A, Yoshiki, T Tissue specific expression of the env protein in fetus rats carrying a full length HERV-R gene 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S-67, 2003
  - 4 Ikeda, H, Abe, A, Ishizu, A, Hayase, H, Yoshiki, T A transgenic rat model of HTLV-I induced immunological diseases effect of the env-pX transgene to effector cells and target tissues in collagen induced arthritis 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S-68, 2003
  - 5 Ikeda, H, Zhao, X, Miyatake, Y, Yoshiki, T Comparison of host gene expression during HIV-1 infection in human and rat cells 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S-68-69, 2003
  - 6 Tsuji, T, Ikeda, H, Ishizu, A, Takahashi, T, Yoshiki, T Malignant transformation of epithelial thymoma developed in HTLV-I pX transgenic rat by heterotopic transplantation and its molecular analysis 11th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, San Francisco AIDS Res Hum Retroviruses 19 S-71-72, 2003
  - 7 吉木 敬 血管炎症候群の病理と病因—モデル動物からみた考察— シンポジウム 2「新たな血管研究の展開」第92回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 140, 2003
  - 8 石津明洋, 富居一範, 早瀬広子, 樋口正人, 阿部麻美, 辻 宗啓, 辻 隆裕, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬 HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める免疫異常と自己免疫疾患の発症 第92回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 167, 2003
  - 9 石津明洋 Dominant Negative ATF-1 を組み込んだシンビスウイルスヘクターによる関節リウマチの遺伝子治療モデル シンポジウム-11「リウマチの動物モデルと遺伝子治療」第47回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京 リウマチ

- 43 235, 2003
- 10 石津明洋, 富居一範, 早瀬広子, 阿部麻美, 辻宗啓, 宮武由甲子, 池田 仁, 吉木 敬 壊死性血管炎の発症における胸腺の関与について 第 5 回オステオポンチン研究会生体防御機能異常ワークショップ 2003 第 6 回肝臓生物学研究会合同年会, 札幌 プログラム p45
- 11 外丸詩野, 山野嘉久, 吉木 敬 抗原特異的 T リンパ球の新たな検出法 T リンパ球によるペプチド-HLA-GFP 複合体の獲得 第 2 回 HTLV/ATL 研究会 文部科学省特定領域研究「がん」がん疫学総括班 ATL 研究推進委員会, 2003
- 12 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬 HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める関節炎の発症ならびに持続機序に関する検討 第 47 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京 リウマチ 43 411, 2003
- 13 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 辻 隆裕, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬 コラーゲン関節炎誘導による HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットの関節炎発症および持続機序の検討 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 223, 2003
- 14 辻 隆裕, 池田 仁, 石津明洋, 高橋利幸, 吉木 敬 異所性移植による HTLV-I pX トランスジェニックラット胸腺腫の悪性転化とその遺伝子解析 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 244, 2003
- 15 趙 旭東, 池田 仁, 宮武由甲子, 山本友希代, 立野正敏, 吉木 敬 ヒトおよび HIV-1 感染関連遺伝子導入ラット細胞への HIV-1 感染による宿主遺伝子発現の解析 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 248, 2003
- 16 大塚紀幸, 田中 敏, 山本友希代, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬 HERV-R トランスジェニックラットにおける Env 蛋白発現と抗原性の解析 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 256, 2003
- 17 宮武由甲子, 池田 仁, 石津明洋, 高橋利幸, 吉木 敬 検体摂取後の室温放置による cDNA アレイ解析結果への影響 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 285, 2003
- 18 山本友希代, 池田 仁, 石津明洋, 辻 隆裕, 高橋利幸, 吉木 敬 TNF- $\alpha$  およびステロイド投与によるヒト培養血管内皮細胞の遺伝子発現への影響 第 92 回日本病理学会総会, 福岡 日本病理学会会誌 92 291, 2003
- 19 大塚紀幸, 田中 敏, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬 HERV-R 遺伝子導入ラット胎児における env 蛋白の臓器特異的発現 第 36 回北海道病理談話会, 札幌 北海道医学大会プログラム p21
- 20 辻 隆裕, 池田 仁, 外丸詩野, 石津明洋, 吉木 敬 HTLV-I pX トランスジェニックラット胸腺腫の悪性化と p16 遺伝子異常の解析 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋 Jpn J Cancer Res 94 (Suppl) 241, 2003
- 21 外丸詩野, 山野嘉久, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬 HTLV-Ienv 領域における CD8+T 細胞エピトープの同定 抗原特異的 T リンパ球の新たな検出法 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋 Jpn J Cancer Res 94 (Suppl) 242, 2003
- 22 阿部麻美, 石津明洋, 辻 宗啓, 早瀬広子, 菅谷壽晃, 鈴木 昭, 高橋利幸, 池田 仁, 吉木 敬 コラーゲン関節炎誘導による HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットの関節炎発症および持続機序の検討 第 28 回北海道リウマチ研究会, 札幌 北海道医誌 78 468, 2003
- 23 早瀬広子, 石津明洋, 宮武由甲子, 外丸詩野, 池田 仁, 吉木 敬 HTLV-I トランスジェニックラットにおける CD25+4+ regulatory T cell の解析 第 33 回日本免疫学会総会 学術集会, 福岡 日本免疫学会総会・学術集会記録 33 42, 2003
- 24 外丸詩野, 山野嘉久, 吉木 敬 ペプチド/HLA 複合体の抗原特異的 T 細胞による獲得 抗原提示の新しい増幅メカニズム 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡 日本免疫学会総会・学術集会記録 33 270, 2003
- H 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)**
- 1 特許取得**  
該当なし。
- 2 実用新案登録**  
該当なし。



厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「機能的」血管新生過程における血小板由来増殖因子（PDGF-A, -B）  
の役割 内因性血管新生因子群との階層的発現制御に関する研究

分担研究者 居石 克夫 九州大学大学院医学研究院・教授

【研究要旨】

本研究では、血流回復という生理的な血管新生過程（「機能的」血管新生）における間葉系細胞の増殖因子（血小板由来増殖因子 PDGF）の役割について、詳細な解析を行った。PDGF-Aはオートクライン作用により、内因性の血管新生因子群（VEGF HGF）の持続発現に必須であること、そのシグナル経路として p70S6K系が最も重要であることを見出した。一方PDGF-Bはリンパ管新生因子VEGF-Cによる発現制御を受けており、VEGF-C受容体（VEGFR3）のシグナル遮断により新生血管の形態変化（微小血管瘤）と脆弱性が誘導されることが明らかとなった。

A 研究目的

我々はこれまで FGF-2 広い安全域と虚血肢に対する高い効果を示し、血流回復を伴う「機能的血管新生」の重要性を提唱して来た。本理論を基にした重症虚血肢への遺伝子治療臨床研究は 2004 年度より九州大学病院で実施予定である。一方、この FGF-2 の機能として内因性血管新生因子群の階層的発現制御を誘導することを明らかにして来た。本研究では、この「階層的血管新生発現制御機構」における血小板由来増殖因子（PDGF）の機能について検証した。

B 研究方法

雄性 C57BL/6 マウスに重症虚血モデルを作成、SeV-FGF2 あるいは SeV-luciferase を筋注した。血流回復効果はレーザードブラー法、各種血管新生因子の発現の経時的変化を real-time PCR 法、ELISA 法にて定量化した。各種リガンド、受容体に対する中和活性を持つ特異抗体にて活性を遮断し、遺伝子発現量、治療効果をモニターした。

（倫理面への配慮）

本研究は九州大学組み換え DNA 実験委員会の承認のもと、P2 動物実験室で施行した。動物実験は、九州大学動物実験委員会の審議 許可を得た。

C 研究結果

1 PDGF-A について

In vitro、in vivo において、FGF-2 は VEGF、HGF、PDGF-A の発現を誘導し、PDGF-A、p70S6K の活性遮断により VEGF、HGF の発現増強効果は消失

した。

2 PDGF-B について。

FGF-2 の遺伝子導入により、内因性の VEGF-C、それに同期して PDGF-B の発現が増強した。VEGF-C の受容体 VEGFR3/FLT-4 の活性中和抗体投与により、FGF-2 の治療効果が消失、PDGF-B の発現も低下し、多数の微小血管瘤が形成された。

D 考察

FGF-2 遺伝子治療により、階層的 多段階的に内因性血管新生因子群が誘導され、その制御に PDGF が重要であることが明らかとなった。

E 結論

SeV-FGF2 による遺伝子治療は「機能的」血管新生を誘導し、重症虚血肢の救済に有用である。

F 健康危険情報

特に無し。

G 研究発表

1 論文発表（2002 年以降）

- 1 Am J Physiol 2 編（2002 1 編、2003 1 編）
- 2 Gene Therapy 5 編（2003 5 編）
- 3 Crc Res 3 編（2002 2 編、2004、in press 1 編）
- 4 J Immunol 1 編（2002 1 編）、その他。

2 学会発表

アメリカ遺伝子治療学会他、多数。

H 知的財産権の出願 登録状況

特に無し。

# 組換え近交系 MXH/lpr マウスを用いた血管炎病態の経時的観察と

## その遺伝的基盤の解析

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部病理学第二講座

### [研究要旨]

昨年に引き続き、膠原病関連の組換え近交系 MXH/lpr マウスを用いて血管炎を始めとした膠原病病像について解析を進めた。各系統を血清学的・病理学的に経時的に観察した結果、新たに関節炎、涙腺炎等の膠原病病態の好発系をそれぞれ見いだすことができた。血管炎病態に関しては、各系統の腎血管炎の血管炎スコアと MPO-ANCA 値との間に明らかな相関関係は見られなかった。一方で、観察した各系統の腎血管炎の量的形質と、既に明らかにしている各系統の遺伝的形質 - 系統間分布表 ( Strain distribution table, SDP 表 ) - との関連を QTL ( Quantitative trait loci ) 解析することで、5 ヶ月齢雄の腎血管炎について、suggestive loci を第 3 染色体、第 4 染色体にマッピングすることができた。今後 MXH/lpr マウスを用い、さらに詳細な解析を進めることで、血管炎病態を含む膠原病病態の遺伝様式を明らかにするとともに、感受性遺伝子を同定し、その病理発生機構を明らかにできる可能性が示唆された。

### A 研究目的

昨年に引き続き、我々が新たに作成した膠原病関連の組換え近交系 MXH/lpr マウスを用いて、膠原病病態・病理の経時的観察とそのゲノム基盤について解析を行った。

組換え近交系 MXH/lpr マウスは、膠原病好発系 MRL/lpr マウスと、嫌発系 C3H/lpr マウスの 2 つの近交系マウスの雑種第 2 世代のランダムなペアを出発点に、兄妹交配を 20 世代以上繰り返し作出された近交系のセットである<sup>1)</sup>。各系統の染色体は各世代でおこる遺伝子組み換えか重積する結果両親系統の染色体をモザイクとして持ち、しかも全ての座位がホモ接合子となっている。つまり、系統間では遺伝的多様性を有し、なおかつ系統内では遺伝的に均一であるという、相反する性質を兼ね備えたマウス近交系群である。

MXH/lpr の親系統である MRL/lpr マウスは、アポトーシスに関与する Fas の欠損変異

である lpr 遺伝子を有し<sup>2)</sup>、同一個体で血管炎、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎などの様々な膠原病病態や高ガンマグロブリン血症や各種自己抗体価高値などの自己免疫現象を高率に自然発症する。しかし、同じ lpr 遺伝子を有する C3H/lpr マウスはこれら病態を発症しない。これまでに我々は、両者の交配系 ( 戻し交配系 N2、兄妹交配系 F2 ) を作成し、減数分裂に伴う遺伝子組換えの結果、疾患感受性遺伝子を再構成することで、各種膠原病病態が分離して発現することを証明し<sup>3,4)</sup>、さらに各個体の発現形質と遺伝型との相関を遺伝統計学的に解析してそれぞれの病態に関する複数の疾患感受性遺伝子座の同定を行ってきた<sup>5-8)</sup>。

組換え近交系 MXH/lpr マウスは、交配系 ( F2、N2 ) 同様、両親系統のゲノムモザイクで、感受性遺伝子の再構成によって各系統は各種膠原病病態を分離して発現することか予想

される。加えて各系統は 20 世代以上の兄妹交配の結果、近交系として確立されており遺伝的にはほぼ均一で、発現形質は各系統で遺伝的に固定される。この様に「系統間の遺伝的多様性と系統内の遺伝的均一性」を併せ持つことで、(1) 病理学的形質のように観察により生命に影響が及ぶ形質など、これまで経時的観察が困難だった膠原病病態の形質を詳細に評価できる、(2) 外部環境を変動させてその影響を評価できるため、病態の誘因、促進因子の解析や薬剤効果判定が可能である、(3) 各系統の発現形質と遺伝形質の相関を見ることで、感受性遺伝子座の同定が可能である、という、これまでの交配系ではなしえなかった利点を有することになる。それ故、MXH/lpr マウスは、膠原病の病態解明や治療法の開発に重要な役割を果たしうる貴重な動物モデルと言える。

昨年度は、この MXH/lpr マウス 11 系統について、5 ヶ月齢の発現形質の解析により、実際に腎血管炎、糸球体腎炎、各種自己抗体価等の膠原病病態が各々分離して現れること、ならびに遺伝形質について両親系統で多型を有する座位について 10-20cM ごとにゲノムワイドに遺伝子型を決定した SDP 表を作成することで、各系統がそれぞれ異なった両親系統のゲノムモザイクとなっていることを明らかにした。

本年度は、腎血管炎、MPO-ANCA 値を含む各種膠原病形質について 2、3、5 ヶ月齢の各月齢で経時的に観察するとともに、発現形質と既に明らかにした遺伝形質から QTL 解析を行い、感受性遺伝子座をマッピングすることを目的とした。

## B 研究方法

MXH/lpr マウスの 11 系統を対象とし、各系統の 10 匹以上について、2 ヶ月齢、3 ヶ月齢、5 ヶ月齢において病理学的、血清学的解析を行った。血管炎の病理学的解析は、ホルマリ

ン固定した腎臓の組織から **Elastica Masson** 染色を用いて組織標本を作り、腎血管の血管炎の程度を血管ごとにスコア化し(Grade 0 正常または血管周囲の細胞浸潤、Grade 1 微小肉芽組織の形成を伴う外弾性板の破壊、Grade 2 内弾性板の破壊、内膜肥厚)、最も高いスコアをその個体のスコアをした。各系統のスコアは、個体のスコアの平均値を用いた。血清学的解析として、MPO-ANCA 値を含めた自己抗体価を各月齢で測定した(MPO-ANCA 値測定は国立感染症研究所鈴木先生に依頼した)。

血管炎関連病態について、Map Manager QTX<sup>9)</sup> を用いて QTL 解析を行った。

## C 研究結果

### 1 MXH/lpr 各系統の形質の経時的解析 (図 1,2)

腎血管炎、糸球体腎炎、足関節炎、涙腺炎ならびに各種自己抗体について、それぞれ好発系を見いだした。これらの形質は各々分離して発現し、系統内で固定されていた(図1)。

腎血管炎は、MXH/lpr-06、10、36、41 の 4 系統を好発系として見いだしていたか、これらの系統は、3 ヶ月齢の時点で既に他の系統より腎血管炎発症頻度が高値となることが明らかとなった。一方、各系統の腎血管炎のスコアと MPO-ANCA 値の間には、経時的に見ても明らかな相関関係を見いだすことはできなかった(図 2)。

### 2 血管炎関連病態の QTL 解析(図 3)

Map Manager QTX を用い血管炎関連病態の感受性遺伝子座の QTL 解析を行った。

腎血管炎の QTL を 5 ヶ月齢においては第 3 染色体(D3Mit88)、第 4 染色体(D4Mit4)上に suggestive level でマッピングした。また、MPO-ANCA 値については、5 ヶ月齢雄については第 1 染色体上に、3 ヶ月齢雄については第 7 染色体上に、同様に suggestive level で感受性遺伝子座をマッピングした(図 3)。

## D 考察

今回、組換え近交系 **MXH/lpr 11** 系統について、各種膠原病病態を経時的に観察した。昨年度に比し、新たに足関節炎好発系、涙腺炎好発系を見いだすことができた。これらの形質も、他の膠原病形質と分離して発現し、組換え近交系においても我々が既に交配系で明らかにした「背景遺伝子再構成による膠原病病像の分離」という現象を再確認する結果となった。

腎血管炎と **MPO-ANCA** 値の相関関係は経時的観察によっても認められなかった。我々は以前、**MRL/lpr** マウスと **C3H/lpr** マウスの **N2** マウスから兄妹交配世代ごとに組織病理学的な選択を行い、糸球体腎炎を発症せず血管炎のみを発症する **McH5/lpr** マウスを樹立し、このマウスが、血管炎を高率に発症するにもかかわらず **MPO-ANCA** 値は正常マウスレベルにとどまることを明らかにしている<sup>10)</sup>。この結果は、少なくとも **MRL/lpr** マウスと **C3H/lpr** マウスを先祖とした交配系マウス・マウス系統群においては、血管炎病態と **MPO-ANCA** に関連かない可能性を示唆している。しかし、今回我々が観察した腎血管炎は弓状動脈から小葉間動脈にかけての比較的太い血管である。ヒトにおける **MPO-ANCA** は顕微鏡的多発動脈炎に見るように小動脈を主座とした血管炎との関連がいわれている。今回対象とした血管よりもより細かいキャリハリの血管を対象とした解析により血管炎と **MPO-ANCA** の関連が明らかになる可能性がある。

血管炎関連病態の **QTL** 解析によって、いずれも suggestive level で、5 ヶ月齢の腎血管炎の **QTL** を第 3 染色体(D3Mit88)、第 4 染色体(D4Mit4)上に、**MPO-ANCA** について5 ヶ月齢雄は第 1 染色体上、3 ヶ月齢雄は第 7 染色体上にマッピングした。腎血管炎と **MPO-ANCA** の **QTL** の解離は、各々の形質

が異なった遺伝的基盤によって規定されている可能性を示唆するものである。加えて、今回得られた **QTL** を元に、新たに交配系を作成してさらに詳細な感受性遺伝子座の解析や、あるいはコンシェニク系を作成し実際にこの **QTL** の確認を行ってゆく道筋が示された。

## E 結論

- 1 膠原病関連の組換え近交系 **MXH/lpr** マウスの病理学的、血清学的形質について経時的に評価し、各形質の感受性遺伝子座について **QTL** 解析を行った。
- 2 腎血管炎と **MPO-ANCA** 値の間には、経時的にも相関関係を見いだすことはできなかった。これらのうち血管炎関連病態の感受性遺伝子座を **QTL** 解析によりマッピングすることができた。
- 3 新たに関節炎、涙腺炎の好発系を見いだした。
- 4 血管炎病態については、今後さらに血管キャリハリーを考慮した解析を加えていく必要がある。

### [共同研究者]

小森浩章、岩崎美津子、寺田美穂、小野栄夫 (愛媛大学医学部病理学第二講座)、森士朗 (東北大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座顎外科咬合形成学分野)、鈴木和男 (国立感染症研究所生体防御物質室)

### [参考文献]

- 1 Bailey DW Recombinant-inbred strains Transplantation 11, 325-327, 1971
- 2 Watanabe-Fukunaga R et al Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis Nature 356, 314-317, 1992
- 3 Nose M et al Analysis of