

16) 森下竜一、遺伝子治療のトランスレーショナルリサーチ、第30回肝臓研究会、2004年1月17日(土)

17) 森下竜一、血管再生医学の進展開：末梢疾患から中枢疾患へ、第11回 宮崎心臓疾患研究会、2004年1月26日(月)

18) 森下竜一、Development of HGF(Hepatocyte Growth Factor) Gene Therapy Drug to Stimulate Angiogenesis、4th Annual Workshop in Japan for Progress In Clinical Trials、2004年2月14日(土)

19) 森下竜一、血管をターゲットとした動脈硬化の新しい治療戦略—薬物療法から血管再生療法まで—、第20回東邦循環器研究会、2004年2月28日(土)

20) 森下竜一、循環器疾患の遺伝子治療—現状と未来—、第40回 秋田循環器疾患治療研究会、2004年4月9日(金)

21) 森下竜一、血管をターゲットとした生活習慣病の治療戦略、第3回 臨床動脈硬化診断フォーラム、2004年4月28日(水)

22) 森下竜一、血管再生療法の基礎と臨床、第31回 細胞情報伝達系北海道研究会、2004年5月21日(金)

23) 森下竜一、遺伝子治療と再生医療、バイオ部会定例セミナー 再生医療の現状と必要な研究と技術、2004年6月23日(水)

24) 森下竜一、血管再生療法の基礎と臨床、第3回埼玉循環器フロンティア、2004年6月25日(金)

25) 森下竜一、Therapeutic angiogenesis using HGF(hepatocyte growth factor) gene to treat ischemic disease、Japan Society for the Promotion of Science Research for the

Future Program

Biology of neo-angiogenesis、2004年8月26日(木)

26) 森下竜一、糖尿病合併に対する血管新生治療の最前線～基礎研究から実用化まで～、第5回 Osaka Bay Diabetes Forum、2004年9月11日(土)

27) 森下竜一、透析患者の下肢閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療、第17回日本透析医会シンポジウム透析医療における Consensus Conference2004、2004年11月14日(日)

(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。)

1. 特許取得

①HGF 遺伝子からなる医薬 特願平7-245475

②血管新生療法用医薬組成物 特願2000-192480

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

高安動脈炎に対する外科治療成績に関する研究

分担研究者 安田慶秀 北海道大学循環器外科教授

研究要旨

過去 20 年間に 23 例の高安動脈炎に対し 30 回の外科治療を経験した。閉塞病変は弓部分枝が 6 例 8 手術、冠動脈、異型大動脈縮窄症、腎動脈が各 2 例。拡張病変は全弓部、遠位弓部、胸腹部が各 2 例、下行、腹部が各 3 例。大動脈弁閉鎖不全の 6 例に弁置換施行（基部 2 例）。末梢動脈瘤は 2 例（4 例重複）。在院死は早期の 1 例、遠隔死 2 例で 10 年累積生存率は 70.5%、5 年心血管事故回避率は 72.7%と満足すべき成績が得られた。

A. 研究目的

高安動脈炎（Takayasu's arteritis: TA）は病態が複雑で、また外科的侵襲による炎症反応の再燃もしばしば経験される。本症に対する外科治療に当たっては生命予後に直結する病態を的確に見極めるとともに遠隔期合併症を回避し quality of life を維持する治療計画を立てること、また手術合併症を回避するため周術期炎症コントロールが肝要である。本稿では過去 20 年間に当施設で経験した TA の遠隔期手術成績および周術期ステロイド療法について報告する。

B. 研究方法

1985 年より 2004 年 3 月までに北海道大学病院で手術を施行した TA 23 例を対象とした。症例の内訳は、男性 14

人、女性 9 人、手術時年齢は 20 歳から 69 歳、平均 44 ± 13 歳であった。

病態別手術数は、閉塞性病変 14（弓部分枝および上肢動脈 8、冠状動脈 2、異型大動脈縮窄 2、腎血管性高血圧 2）、大動脈弁および基部の拡張性病変 6（annuloaortic ectasia 2、大動脈弁逆流（AR）4、同時手術として上行 1、近位弓部 2、弓部大動脈 1、冠状動脈 1、僧帽弁 1）、基部以下の拡張性病変 14（弓部大動脈 2、遠位弓部 2、下行大動脈 3、胸腹部大動脈 2、腹部大動脈 3、末梢動脈瘤 2）であった。このうち 4 手術の重複があり、計 30 手術を経験した。グラフト不全に対する Redo 手術が 2 例あり、6 例（23%）で多発性病変に対する複数回の手術が行われた（1 例は 3 回の手術を受けた）。

手術術式：

1) 頸部動脈再建手術：頸部動脈の

再建は6例8手術経験したが、初回手術は全て1998年以前の症例であった。その内訳は上行大動脈-頸部動脈のバイパス術が3例、下行大動脈-頸部動脈のバイパス術が3例、左総頸動脈-左鎖骨下動脈バイパス術が2例であった。

- 2) AR症例に対する手術：ARに対する手術は6例で、単純大動脈弁置換術(AVR)1, 他の3例はAVRに加えそれぞれ僧帽弁形成術 hemiarch repair、冠動脈形成術を行った。Bentall手術の2例は同時に弓部大動脈全置換術、hemiarch repairを行った。
- 3) 大動脈瘤に対するグラフト置換術：前項AR症例を除外した大動脈置換手術は、全弓部大動脈置換術2 (elephant trunk法1、stented elephant trunk法1)、遠位弓部置換術2、下行大動脈置換術3、胸腹部大動脈再建術2 (Crawford II型胸腹部大動脈瘤に対する腹部4動脈再建を伴う再建手術1, 巨大な仮性動脈瘤に対するHardy手術1)、腎動脈下腹部大動脈置換術3であった。
- 4) 異型大動脈縮窄：2例中1例は腹部大動脈の血栓内膜摘除術、1例は下行大動脈-左鎖骨下動脈、腹腔動脈、上腸間膜動脈、腸骨動脈バイパス術を施行した。
- 5) 腎血管性高血圧症(RVH)：RVH 2例では、泌尿器科医師チームの協力下にbench surgeryで腎動脈狭窄を修復し、これを骨盤腔内に移植した。

1例は異型大動脈縮窄と左鎖骨下動脈狭窄を有し、RVH改善により鎖骨下動脈盗血症状が出現し、二期的に頸動脈-鎖骨下動脈バイパス術を施行した。

- 6) 冠動脈狭窄病変：2例で冠動脈入口部狭窄に対するパッチ形成術を施行した。左冠動脈入口部病変例では自己心膜パッチで形成し、他の1例は上行大動脈置換とともに両側冠動脈入口部を自己心膜パッチで形成した。
- 7) 末梢動脈瘤：ステロイド投与中に菌血症、左鎖骨下動脈瘤切迫破裂をきたした1例に瘤空置術を施行した。この症例は両側総頸動脈瘤も有していたが、一年後の現在拡大をみていない。弓部大動脈瘤に合併した腕頭動脈瘤は、全弓部置換時に同時置換した。

ステロイド療法の検討：われわれは、周術期の炎症コントロールと炎症の再燃による組織の脆弱化を防ぎ、間接的に吻合部離開を予防するためC反応性蛋白(C-reactive protein: CRP) \leq 5mg/dL を目標として術前ステロイドを投与し、またステロイド投与による手術リスク軽減するためステロイド投与量を可能な限り10mg/日以下まで減量して手術に望むことを基本方針としている。23例中、手術時の診療記録が参照可能な16例中における周術期ステロイド療法について検討した。

C. 研究結果

手術成績：早期成績は、初期の1985年にCrawford III型胸腹部大動脈瘤の切迫破裂をきたした32歳、男性に対するHardy手術症例で、術後2ヶ月目に空置した瘤が破裂して死亡したが、この1例を除く全例が生存退院した。早期グラフト閉塞は弓部置換後左の総頸動脈グラフト閉塞の1例のみであった。この症例と、他の1例の計2例に術後脳梗塞を認めたが、いずれも脳神経学的後遺症を残すことなく退院可能であった。他の合併症は術後出血再開胸を2例、輸血後肝炎を1例認めた。

遠隔期予後調査の追跡率は100%で、術後観察期間は3ヶ月から140ヶ月の平均54ヶ月であった。遠隔期に10例で心血管事故が発生した。遠隔死は2例で、1例は術後6年に瘤の増大により破裂死し他の1例は術後6年に脳梗塞で死亡した。非致死的心血管事故として脳梗塞1例(5ヶ月後)、バイパスグラフト閉塞・再バイパス3例(7ヶ月後、7年後、7年後)、腹部大動脈瘤の増大による手術3例(8ヶ月後、2年後、3年後)、下肢急性動脈閉塞1例(2年後)を認めた。5年・10年累積生存率はそれぞれ $95.4 \pm 4.6\%$ 、 $70.5 \pm 15.7\%$ であった。5年累積心血管事故回避率は $72.7 \pm 11.0\%$ であった。

周術期ステロイド療法：16例中11例(69%)が周術期にステロイドを内服していた。そのうち8例が入院時より

内服していたが、うち6例(75%)はPrednisolone (PSL) 10mg/日以下を内服しており、平均 11.9 ± 8.9 mg/日であった。手術直前にはPSL 10mg/日以下を内服していたのは5例であったが、平均投与量は 10.9 ± 5.7 mg/日と減少した。術中・術後早期の経口摂取不能な時期は外科的ストレスに対応し、多めの量を経静脈的に投与し、漸減して経口PSLへ移行させた。退院時に内服していたのは10例で、5例はPSL 10mg/日以下を内服しており、平均 14.1 ± 8.5 mg/日と術前より増加していたが統計学的有意差はなかった。最終フォローアップ時の内服量は 14.8 ± 11.3 mg/日と、退院時と著変なかった。術前CRP陽性例は11例で、その値は0.24から3.24mg/dLの平均 1.45 ± 0.97 mg/dLであった。退院時CRP陽性例は12例で、その値は0.25から3.99mg/dLの平均 1.98 ± 1.77 mg/dLと若干上昇していたが統計学的有意差はなかった。

D. 考察

今回われわれが外科的治療を施したTA患者は沈静期にあるものがほとんどであり、その平均年齢 44 ± 13 歳は妥当であるといえる。男女比に関しては、われわれの症例では男女比で14:9と逆に男性に多かった。このことは大動脈弁および基部を含めた大血管の拡張病変に対して手術を受けた14例中男性が10例と高率に含まれていることが影響している。その原因は不明だが、男性では本来のTAによる

病変に、新たに動脈硬化性病変による修飾も加わり、病変の進行が女性より早いのかかもしれない。

TA の外科治療においては手術侵襲によって炎症反応が再燃し大量のステロイド投与が必要となることがあり、それに伴う吻合部離開や仮性動脈瘤の発生、バイパスグラフトの閉塞、あるいはAVR例における人工弁逸脱による perivalvular leakage などの問題がある。われわれが吻合部離開や仮性動脈瘤対策として行っているのは、縫い代を十分取り、必要に応じてフェルトにより補強を行うことであり、少しでも縫合糸の緩みがあれば必ず後から増し締めを追加するようにしている。使用しているグラフトは最近では他の大血管手術と同様ほとんどがゼラチンコーティングしたニット編みダクロンであるが、現在までにグラフトそのものに起因する問題は経験していない。

脳や上肢の虚血症状に対する血行再建術は 1960 年代には積極的に行われていたが、これらの術式は年々減少傾向にある。われわれが施行した頸部動脈再建 6 例 8 手術例では、初回手術は全て 1998 年以前の症例であった。TA における脳虚血の自然予後についての理解が進むとともに、positron emission tomography の導入による脳血流の正確な評価が行われるようになり、近年、本症における脳血行再建術が減少したと考えられる。

なお、HLA-B52 陽性例で有意に AR の合併が多く、重症例が多いという報

告があり、われわれの AR 合併の 1 例や、三度にわたる手術を受けた症例でも HLA-B52 陽性であり、多数例についての検討が望まれる。

TA に伴う大動脈瘤の治療においては、最近では大動脈弓部から胸部下行大動脈に連なる広範な病変に対しては elephant trunk 法を用いた計画的二次的手術や stented elephant trunk 法による一期的根治手術により低侵襲な外科的治療が可能となっており、その遠隔成績の向上に寄与している。しかし遠隔期においては炎症の再燃による吻合部合併症や残存病変の進行の危険が常にあることを念頭に置き、術後長期にわたる慎重なフォローアップが必要であることはいうまでもない。

RVH に対する腎動脈の血行再建法には内膜摘除術、大動脈腎動脈バイパス術、ステント留置術、異所性自家腎移植などの選択肢があるが、われわれの経験した 2 例中 1 例では右腎動脈は long segment に閉塞しており、内膜摘除術やステント留置術は困難と判断した。また、異型大動脈縮窄症を合併しており腎動脈周囲の大動脈は全周性に石灰化した、いわゆる porcelain aorta であり、バイパスグラフトの中枢側吻合部としては不相当と考え、異所性自家腎移植を選択した。もう 1 例は 24 歳女性の左腎動脈の 99% 狭窄例であったが、狭窄の主座が末梢にあり、

一次分枝を別々に再建しなければならなかったため、長期予後も考慮し、異所性自家腎移植を選択した。

TAにおける冠動脈疾患の外科治療においては、比較的若年者が多いために、長期予後を見据えた術式選択、グラフト選択がその遠隔成績において重要な鍵を握るとおもわれる。われわれの経験した2例は両者とも冠動脈入口部の75%狭窄を有する症例であったため、自己心膜パッチを用いて冠動脈入口部のパッチ形成術を施行した。1例は大動脈弁置換、上行大動脈置換同時施行例であったため、本術式は同一術野内で施行でき、妥当な術式選択と考えている。

E. 結論

過去約20年間に23例のTAに対する外科治療を報告した。1985年に早期死亡を1例認めたのみで、以後全例生存退院しており、満足すべき手術成績といえる。しかし遠隔期に致死的心血管事故が2例あり、術後長期にわたる慎重なフォローアップが必要である。本疾患の生命予後を向上させるうえでは遠隔期に進展してくる大動脈弁不全や大動脈瘤、あるいは冠動脈病変やRVHに対する外科的治療が重要な役割を占めるものとおもわれる。しかし一方で、炎症の再燃に起因する吻合部離開や仮性動脈瘤、もしくはグラフト狭窄や閉塞の発生、ならびに人工弁逸

脱による perivalvular leakage、パンプス形成による人工弁機能不全などの問題点をいかに回避するかが、その外科的治療成績を左右する重要な鍵を握っているとおもわれる。従ってTAの外科治療においては炎症の程度を見極めた手術時期の選定、ステロイドを中心とした周術期・術後長期にわたる炎症のコントロール、再建方法の工夫、病態を考慮した補助手段、再建範囲、再建術式の選定が肝要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 國原 孝、若狭 哲、松崎賢司、椎谷紀彦、窪田武浩、村下十志文、安田慶秀：高安動脈炎に対する外科治療成績。脈管学 2004;44:363-374.
- 2) Toshifumu Murashita, Kimihiro Yoshimoto, Hiroshi Sugiki, Keishu Yasuda : Bilateral coronary ostial patch angioplasty with autologous pericardium in Takayasu arteritis: a case requiring replacement of the aortic valve and ascending aorta. European Journal of Cardio-thoracic Surgery . 2004;26:866-868.

2. 学会発表

- 1) 杉木 宏司、村下 十志文、吉本 公洋、国原 孝、椎谷 紀彦、窪田 武浩、安田 慶秀：大動脈炎症候群の冠動脈入口部狭窄に対する Superior approach による自己心膜パッチ拡大の経験。第 9 回日本冠動脈外科学会学術大会 2004.7.8-9 札幌
- 2) 村下 十志文、杉木 宏司、吉本 公洋、安田 慶秀：両側冠動脈入口部パッチ形成、大動脈弁および上行大動脈置換術を施行した大動脈炎症候群。第 57 回日本胸部外科学会定期学術集会 2004.10.20-22 札幌
- 3) 若狭 哲、國原 孝、椎谷 紀彦、安田慶秀：高安動脈炎治療における周術期ステロイド投与の検討。第 24 回日本血管外科学会北海道地方会 2004.4.3 札幌
- 4) 杉木 宏司、村下 十志文、吉本 公洋、椎谷 紀彦、窪田 武浩、安田 慶秀、田中 進一郎、鈴木 ひとみ、鈴木 隆司：両冠動脈起始部拡大術を施行した高安動脈炎の 1 例。第 91 回日本循環器学会北海道地方会 2004.5.15 札幌
- 5) 村下 十志文、杉木 宏司、吉本 公洋、安田 慶秀：両側冠動脈入口部パッチ形成、大動脈弁置換、上行大動脈置換を行った大動脈炎症候群の 1 例。第 7 回北海道心臓外科フォーラム 2004.5.22 札幌
- 6) 村下 十志文 他 5 名：大動脈炎症候群による冠動脈入口部狭窄に対する自己心膜パッチ拡大術。第 4 回血管外科アカデミー 2004.8.21 岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

18F-FDG PET を用いた高安動脈炎炎症評価に関する研究

分担研究者 小林 靖 東京医科歯科大学大学内科系診療科助手

研究要旨

18F-FDG PET と造影 CT の合成画像により大血管の炎症を感度、特異度の高い画像として可視化する方法を開発した。この方法により高安動脈炎の早期診断、治療評価の判定がより確実に行えることが明らかになった。

A. 研究目的

高安動脈炎の診断は全身の非特異的な炎症症状と血管病変の画像診断による同定により行われるが、早期診断が難しい。そこで 18F-FDG PET を用いて大型血管炎症を直接評価する方法を検討した。

B. 研究方法

高安動脈炎急性期患者、慢性期患者、ならびに健常対照群を用いて検討を行った。18F-FDG PET ならびに造影 CT を行い画像処理により大動脈血管壁への FDG の取り込みを検討した。

C. 研究結果

18F-FDG PET による検討に結果、FDG の取り込みは急性期患者に有意に観察された。次に急性期患者 PET 像を検討したところ強い炎症の場合血管走行にそった FDG 取り込み増を認めたが、PET のみでは FDG 蓄積が血管壁に局在しているのかはっきりしなかった。そこで造影 CT との合成像をコンピューターによる作成したところ、解剖学的に FDG 取り込み同定出来るのみならず、大動脈炎診断の感度を飛躍的に向上させることが明らかになった。また、FDG 取り込み像の観察から従来から言われていた炎症のスキッ

プ像が示され、さらに肺動脈の炎症の観察にも有用であることが明らかになった。

D. 考察

18F-FDG PET による高安動脈炎の早期診断、治療評価の判定、さらには再燃例の評価がより正確に行える可能性が示された。しかし動脈硬化などでも FDG の取り込みが認められることがあり、他の所見と合わせての総合的な評価が必要と考えられる。

E. 結論

18F-FDG PET と造影 CT による大動脈炎評価が高安動脈炎診断に有用であることが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表 Kobayashi Y., et al. Aortic wall inflammation due to Takayasu arteritis imaged with ¹⁸F-FDG positron emission tomography co-registered with enhanced computed tomography. The Journal of Nuclear Medicine. in press

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
病理分科会報告書

分科会長 吉木 敬 株式会社ジェネティックラボ 技術顧問
居石克夫 九州大学大学院医学研究院病理病態学 教授
能勢真人 愛媛大学大学院医学系研究科病因・病態学ゲノム病理学 教授
由谷親夫 岡山理科大学理学部臨床生命科学科 教授
研究協力者 西平 順、尾川直樹（株式会社ジェネティックラボ）
石津明洋（北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野）

研究要旨

本分科会では、①血管炎症例の網羅的遺伝子発現解析、②血管炎アトラスの作製、③血管炎モデル動物の確立と解析をはじめとする各個別研究、を行った。①については、ANCA 関連血管炎において、治療応答性に関与する可能性がある 6 遺伝子を抽出した。②については今年度中に完成予定である。③については、膠原病組換え近交系マウスを用いた環境要因と膠原病病態の関連解析、HTLV-I 遺伝子導入ラットにおける壊死性血管炎発症機序の解析、マウス下肢虚血モデルにおける分子病態解析、バージャー病に対する新しい血管再生治療と微小血管造影法によるその評価が行われた。

A. 研究目的

本分科会では、

- ①血管炎症例の網羅的遺伝子発現解析
- ②血管炎アトラスの作製
- ③血管炎モデル動物の確立と解析をはじめとする各個別研究を行った。

①血管炎症例の網羅的遺伝子発現解析

B. 研究方法

血管炎発症および治療応答性に関与する遺伝子を探索するため DNA アレイを用いた遺伝子発現解析を実施した。血管炎症例の治療前、治療後における末梢血サンプルを用いて、Genechip アレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。

（倫理面への配慮）

文部科学省・厚生労働省・経済産業省の掲げる遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、各々の研究実施機関の倫理委員会の承認を受け、全例インフォームド

コンセントを得たうえで検体を採取した。

C. 研究結果

死亡群と軽快群を対比して解析可能であった ANCA 関連血管炎では、それぞれの群において治療前後の発現変化が逆の挙動を示す 6 遺伝子がピックアップされた。

D. 考察

これらの遺伝子は血管炎の治療応答性に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

症例を蓄積しクラスター解析を導入することによって、血管炎発症および治療応答性などに関与する遺伝子が明らかになると予想される。

②血管炎アトラスの作製

原発性血管炎症候群 10 疾患、血管炎類縁疾患 8 疾患、続発性血管炎症候群 8 疾患

について、臨床項目、病理項目に分けて分担執筆した。病理項目の執筆については、班員のみならず血管病理研究会に所属する専門家にも執筆を依頼した。

③血管炎モデル動物の確立と解析をはじめとする各個別研究

B. 研究方法

膠原病好発系 MRL/lpr マウスと嫌発系 C3H/lpr マウスの組換え近交系を用いた遺伝子リコンビネーションとフェノタイプの解析、HTLV-I 遺伝子導入ラットやマウス虚血下肢モデルを用いた分子病態解析、バージャー病に対する新しい血管再生治療と微小血管描出法の検討を行った。
(倫理面への配慮)

動物実験については各研究実施機関の動物実験指針に基づき研究を行った。臨床研究については各研究実施機関の倫理委員会の承認を受け、全例インフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

膠原病関連組換え近交系マウス (MXH/lpr マウス) に polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C) を投与することにより、加齢によって発症する自己免疫形質の発現が促進されることを明らかにした。また、HTLV-I 遺伝子導入ラット (env-pX ラット) に正常ラット由来の血管内皮細胞を免疫することにより、壊死性血管炎の発症が促進されることを明らかにした。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける下肢虚血耐性低下に血小板由来増殖因子 (PDGF-B) の発現低下が関与していることを示した。アドレノメデュリン併用末梢血単核球移植によりバージャー病の皮膚潰瘍が改善し、微小血管造影法により効果的な血管再生が認められた。

D. 考察

Poly I:C 投与はある種のウイルス感染を模倣していると考えられる。組換え近交系 MXH/lpr マウスは、膠原病が感染症等を契機に発症・増悪する現象の良いモデルとなり得る。env-pX ラットでは、自己血管反応性 T 細胞が存在し、それが免疫操作により活性化されて血管炎の発症が促進されたと考えられた。PDGF-B は毛細血管周皮細胞のリクルートに重要であることから、糖尿病における下肢虚血耐性の低下は、血管新生反応の障害というより、むしろ血管の成熟過程の障害であると考えられた。バージャー病に対する新しい血管再生治療として、アドレノメデュリン併用末梢血単核球移植の有効性と安全性をさらに確認する必要がある。

E. 結論

今後、膠原病組換え近交系 MXH/lpr マウスを用いて、血管炎を含む膠原病の発症・病態に関わる遺伝的背景を明らかにすることが可能である。また、HTLV-I 遺伝子導入ラットから自己血管反応性 T 細胞クローンを樹立することにより、新しい血管炎誘導モデルの確立や血管炎標的分子の解明が期待される。マウス虚血下肢モデルを用いた分子病態解析により、血管の成熟過程に PDGF-B が重要な役割を果たしていることが示唆された。バージャー病に対する低侵襲の新しい血管再生治療として、アドレノメデュリン併用末梢血単核球移植の有効性が示唆された。

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

「機能的」血管・リンパ管新生過程における各種血管新生因子発現誘導および
その血小板由来増殖因子（PDGF）を介した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、血流回復を伴う機能的血管・リンパ管新生過程における、各種血管新生因子の発現動態の解析、ならびにその制御における血小板由来増殖因子（PDGF-A, -B）の意義について検討した。血管内皮増殖因子群（VEGF, HGF）は間葉系細胞における PDGF-A によりオートクライン制御により血管新生を促進し、また内皮由来 PDGF-B が間葉系細胞の VEGF-C を誘導、さらにこの VEGF-C は内皮由来の PDGF-B を誘導し、このパラクライン制御系により毛細血管の成熟性+リンパ管の形成が効率よく導かれることが明らかになった。

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。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、昨年の研究をさらに発展させた。

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ップラー法、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。この PDGF-A/p70S6K 系は悪性腫瘍においても VEGF 発現を支配する、ユビキタスな系であることが明らかとなった。

2. PDGF-B について：

FGF-2 の遺伝子導入により、内因性の VEGF-C, PDGF-B の発現が増強した。VEGF-C の受容体 VEGFR3/FLT-4 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ると共に、リンパ管の数が減少した。一方、PDGF-B の発現を特異的活性中和抗体で遮断しても、VEGF-C の発現は低下した。

D. 考察、E. 結論

FGF-2 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。このシステムの破綻が、血管数と血流の乖離に至ることも示された。

G. 研究発表

1. 論文発表（2004年度）

Circ Res 94:385-393, 2004.
Circ Res 94:1186-1194, 2004.
Circulation. 110:2444-2452, 2004.
Pathol Res Pract 200: 517-529, 2004.
Eur Surg Res. 36:323-330, 2004.
Human Pathol, 2005 (in press)
Rheumatology (Oxford). 2005 (in press)
Arterioscler Thromb Vasc Biol (in revision)
Cancer Res (in revision)

2. 学会発表

日本病理学会、日本動脈硬化学会など約 50 件。

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特になし。

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

環境要因による膠原病病態誘導・促進効果の解析に関する研究

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部 病因・病態学講座 ゲノム病理学分野 教授

共同研究者 小森浩章、岩崎美津子 同分野助手、森士朗 東北大学大学院歯学研究科 講師

研究要旨：組換え近交系(Recombinant inbred, RI 系)マウスは親系統マウスのゲノムをモザイクとしてかつホモ接合子として持つマウス近交系群であり、ポリジーン型疾患である膠原病病態の経時的観察ならびに環境要因による病態の修飾作用を解析するのに適した動物実験系である。今年度我々は、昨年までに樹立し基礎的な形質解析を行った膠原病関連 RI 系 MXH/lpr マウスを用いて、ある種の感染症が膠原病病態に与える作用について解析しうるマウス実験系の確立を試みた。同時に RI 系間の交配系(recombinant inbred intercross, RIX)を作成し膠原病病態感受性遺伝子座を絞り込む研究にも着手した。

A. 研究目的

我々はこれまでに膠原病関連 RI 系 MXH/lpr マウスを用いて膠原病の免疫学的、病理学的形質を経時的に観察し、系統間分布表を作成した。その結果、MPO-ANCA を含むいくつかの形質について感受性遺伝子座をマップすることができた。

組換え近交系の利点として各系統が近交系として確立されており遺伝的に均一と見なせる点がある。今年度はこの利点に着目し、1. RIX の作成による病態感受性遺伝子座のさらなる絞り込み、2. 環境要因の膠原病病態への影響をゲノムレベルで解析する実験系の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 組換え近交系間の交配系 RIX の作成

これまでの解析で MPO-ANCA 高値の系統を数系統見出し、QTL 解析により D1Mit291 (101.5cM)、D7Mit340 (1.2cM)に

suggestive linkage レベルで MPO-ANCA の感受性遺伝子座をマップした。これらの結果をふまえて、新たに MXH/lpr 各系統間の交配系 RIX を作成し MPO-ANCA 感受性遺伝子座の領域を狭めることとした。現在交配に着手している。

2. 環境要因の膠原病病態への影響をゲノムレベルで解析する実験系の確立

膠原病病態が環境要因、たとえば感染等を契機に発症・増悪することはよく知られている。以前我々は2本鎖RNAアナログである polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)投与により、加齢に伴い発症する自己免疫病形質の発現を促進し得ることを明らかにしている。この結果をふまえて、MXH/lpr マウス8系統に poly I:C 5mg/kg を6週齢から18週齢まで12週間、3日毎に腹腔投与した。対照群には DPBS を同様に投与した。18週齢で解剖し病理学的に解析した。

(倫理面に対する配慮)

愛媛大学動物実験指針に基づき実験を行った。

C. 研究結果

poly I:C 投与により MXH/lpr 全系統で膵炎の発症が誘導された。糸球体腎炎は系統 07, 10, 54 で重症度が増し、特に系統 10 においては糸球体腎炎の増悪により早期に死亡する個体が多く見られた。血管炎は poly I:C では促進されなかった。

すでに作成した系統間分布表を用いて腎血管炎ならびに膵炎の病態誘導・促進効果の感受性遺伝子座を QTL 解析にて検討した。その結果、糸球体腎炎は Chr.3 (D3Mit203)、Chr.8 (D8Mit112)、Chr.9 (D9Mit90, D9Mit128)、膵炎は Chr.3 (D3Mit45) に感受性遺伝子座をマップした。現在、これらの膠原病病態誘導・発症効果の経時的観察ならびに作用の遺伝的機構の解明に着手している。

D. 考察

2 本鎖 RNA はウイルス感染時産生される病原体由来分子で生体では toll-like receptor 3 (TLR3) により認識され自然免疫系を活性化するといわれている。2 本鎖 RNA アナログである poly I:C も TLR3 のリガンドとなることが知られており、poly I:C 投与によってウイルス感染状況をシミュレートすることが可能である。今回の研究では実際に poly I:C 投与によって糸球体腎炎、膵炎といった自己免疫病態を促進・誘導したが、これら病態の誘導・促進効果は各系統間で異なって現れ、しかも感受性遺伝子座もそれぞれ異なった locus にマップされた。糸球体腎炎誘導効果に関

する 4 つの感受性遺伝子座間では epistatic な効果は認められなかった。これらの結果は我々が提唱している「膠原病病像の発症にはカスケード反応に関わる遺伝子群の遺伝子多型が大きな役割を果たす」という仮説を支持するものと考えている。

また QTL 解析とは異なったアプローチとして、poly I:C-TLR3 axis のシグナル伝達系機能分子の遺伝子解析にも着手している。現時点では TLR3 の cDNA 多型の解析を行ったが MXH/lpr の親系統である MRL/lpr、C3H/lpr 間には遺伝子多型は認められていない。現在シグナル伝達下流の分子についての解析を進めている。

E. 結論

・2 本鎖 RNA アナログ poly I:C を MXH/lpr 各系統に投与することで、いくつかの膠原病病態が誘導・促進されることが明らかとなった。また QTL 解析によってこれらの病態誘導・促進効果の感受性遺伝子座をマッピングした。

[研究協力者]

寺田美穂(愛媛大学医学部病因・病態学講座ゲノム病理学分野)、鈴木和男(国立感染症研究所生体防御物質室)

G. 研究発表

論文発表

1. Okamoto M, Takagi M, Kutsuna M, Hara Y, Nishihara M, Zhang MC, Matsuda T, Sakanaka M, Okamoto S, Nose M, Ohashi Y.: High expression of interleukin-1 β in the corneal epithelium of MRL/lpr mice is under the control of their genetic background. Clin Exp Immunol 136:239-244, 2004

2. Nakatani K, Fujii H, Hasegawa H, Terada M, Arita N, Ito MR, Ono M, Takahashi S, Saiga K, Yoshimoto S, Iwano M, Shiiki H, Saito Y, Nose M.: Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Kidney Int.* 65:1290-300, 2004.

3. Morito N, Yoh K, Hirayama A, Itoh K, Nose M, Koyama A, Yamamoto M, Takahashi S.: Nrf2 deficiency improves autoimmune nephritis caused by the fas mutation lpr. *Kidney Int.* 65:1703-13, 2004.

4. Takasawa N, Munakata Y, Ishii KK, Takahashi Y, Takahashi M, Fu Y, Ishii T, Fujii H, Saito T, Takano H, Noda T, Suzuki M, Nose M, Zolla-Patzner S, Sasaki T.: Human parvovirus B19 transgenic mice become susceptible to polyarthritis. *J Immunol* 173:4675-83, 2004.

5. Oishi H, Miyazaki T, Mizuki S, Kamogawa J, Lu L-M, Tsubaki T, Arita N, Ono M, Yamamoto H, Nose M.: Accelerating effect of an MRL gene locus on the severity and onset of arthropathy in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum*, in press.

6. 能勢真人.: 動物モデルをどのようにヒトの疾患に応用するか. *Molecular medicine* 41; 157-162, 2004

7. 能勢真人, 鴨川淳二.: lpr マウスに見られる関節炎のその遺伝子. *分子リウマチ* 1: 293-301, 2004

学会発表

1. 小森浩章、岩崎美津子、森士朗、能勢真人.: 新規組換え近交系 MXH/lpr マウスによる膠原病病態、病理の時間動態と遺伝的基盤の解析. *日本病理学会会誌* 93(1): 217, 2004

2. Komori H, Terada M, Tsuji Y, Iwazaki M, Mori S, Nose M.: Attempt on genetic analysis of the susceptibility to an environmental chemical using a new set of recombinant inbred strain of mice MXH/lpr. 1st International Symposium on Environmental Behavior and Ecological Impacts of Persistent Toxic Substances, 18-19 March 2004, Matsuyama, Japan

3. 小森浩章、寺田美穂、岩崎美津子、小野栄夫、森士朗、能勢真人.: 新規組換え近交系マウスを用いた膠原病の環境要因感受性のゲノム解析. 第 21 回日本疾患モデル学会総会、京都、2004.11.11-12

4. Komori H, Terada M, Ito MR, Hata K, Nozaki Y, Mori S and Nose M.: Genetic dissection of autoimmune disease phenotypes in a new recombinant inbred strain of mice MXH/lpr. 1st International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics, Oct. 3-7, 2004, Budapest, Hungary

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Buerger 病に対する低侵襲血管再生治療に関する研究

分担研究者 由谷親夫 岡山理科大学 理学部臨床生命科学科 教授

研究要旨

低侵襲の血管再生治療として、血管再生能、移植細胞アポトーシス抑制作用を有する生体内ペプチドであるアドレノメデュリンと末梢血単核球移植の複合的血管再生治療の有効性について検討した。基礎研究で末梢血単核球移植単独治療に比し、より効果的な血管再生が認められた。倫理委員会の承認の元、臨床応用し、バージャー病による皮膚潰瘍の改善が認められた。

A. 研究目的

難治性の重症 Buerger 病に対する自己骨髄細胞移植治療が開始され、当施設でも、臨床症状の著明な改善が得られた。しかしながら、骨髄細胞移植治療は、腹臥位の全身麻酔下で、大量の骨髄液を採取するため、侵襲が大きい。一方、末梢血単核球移植は低侵襲ではあるが、効果が不十分とされている。アドレノメデュリンは、単核球のアポトーシスを抑制し、血管拡張作用と血管再生能力を有する。基礎実験において、単核球とアドレノメデュリンの併用療法は効果的な血管再生治療であることが示された。本年度は、末梢血単核球移植とアドレノメデュリン併用療法の臨床応用を検討し、低侵襲の血管再生治療の開発を試みた。

B. 研究方法

血行再建術が困難な重症 Buerger 病患者に対し、末梢血単核球移植とアドレノメデュリンの併用による複合的血管再生治療を施行し、有効性と安全性を検討した。患者選択においては、担癌および網膜症を除外した。末梢血幹細胞（内皮前駆細胞）を含む末梢血単核球の分離は遠心分離装置を用いて行い、アドレノメデュリンは GMP 基準に準じて製造されたものを使用した。

（倫理面への配慮）

臨床応用の際には、本検査の合併症・効能・不利益・利益を説明し、本人及び家族の同意の元に施行した。

C. 研究結果

難治性の皮膚潰瘍を有する 50 代の女性に対し、末梢血単核球移植とアドレノメデュリンの併用による複合的血管再生治療を施行した。Ankle Brachial

Pressure Index は右が 0.65 と左が 0.57 であった。

透析室でクイントンカテーテル挿入後、末梢血単核球のアフェレーシスを施行した。10L/約 4 時間のアフェレーシスで 50ml の単核球液が採取できた。単核球数は 6.4×10^8 個、CD34(+)は 1.5×10^6 個であった。静脈麻酔下に、27G 針を用い、皮膚潰瘍を有する左下腿に筋注した。アドレノメデュリンは $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ を持続皮下注した。皮膚潰瘍は 2 ヶ月の経過で軽快し、退院できた。

E. 結論

難治性の重症 Buerger 病に対する末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合治療は低侵襲で有効な血管再治療と思われる。今後、臨床症例を増やし、その有効性と安全性を確認する必要がある。

G. 研究発表

循環器病研究委託費 16 公-6

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

共同研究者

西上和宏	国立循環器病センター	心臓血管内科
知久正明	国立循環器病センター	心臓血管内科
盛 英三	国立循環器病センター	心臓生理部
永谷憲歳	国立循環器病センター	再生医療部

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 北海道大学名誉教授

研究協力者 石津明洋 北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野講師

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-I の env-pX 遺伝子を導入したラット (env-pX ラット) は、ヒト結節性多発動脈炎類似の壊死性血管炎を発症する。その発症には、導入遺伝子を発現する胸腺フレームワークが重要な役割を果たしていると考えられている。疾患未発症の env-pX ラットに正常ラット由来の血管内皮細胞を免疫することにより壊死性血管炎の発症が促進されたことから、本ラットには自己血管内皮細胞反応性 T 細胞が存在する可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

env-pX ラットは、ヒト結節性多発動脈炎類似の壊死性血管炎を発症する。その発症には、導入遺伝子を発現する胸腺フレームワークが重要な役割を果たしていると考えられている。env-pX ラットに認める壊死性血管炎の発症機序の解明を目的とし、研究を行った。

B. 研究方法

env-pX ラットの壊死性血管炎の発症に自己血管反応性 T 細胞が関与していることを確認するため、疾患未発症の env-pX ラットを培養血管内皮細胞で免疫し、血管炎の発症が促進されるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

本学の動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

正常ラット由来の血管内皮細胞を免疫した env-pX ラットでは、7 頭中 6 頭に、オリジナルの env-pX ラットと同様の壊死性血管炎の発症が認められた。操作に用いたアジュバントのみ免疫した 8 頭では、壊死性血管炎の発症は確認されな

った。

D. 考察

これまでの検討から、env-pX ラットでは骨髄由来の T 前駆細胞が env-pX 遺伝子を発現する胸腺フレームワークと相互作用する際に、positive または negative selection の異常が生じ、自己血管反応性 T 細胞が末梢に出現すると考えられていた。今回の検討では、env-pX ラットに存在する自己血管内皮細胞反応性 T 細胞が免疫操作により活性化され、壊死性血管炎の発症が促進されたと考えられた。

E. 結論

env-pX ラットより、自己血管反応性 T 細胞クローンを抽出することが可能であると考えられた。予備実験において採取された血管細胞反応性クローンは CD4 陽性 T 細胞のフェノタイプを示していた。今後、血管炎惹起性 T 細胞クローンの樹立と、その characterization、クローンの移入による血管炎誘導モデルの開発、クローンの認識する血管分子の同定を行うことにより、壊死性血管炎の発症機序を明らかにすることができると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Abe A, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Tsuji T, Miyatake Y, Tsuji M, Fugo K, Sugaya T, Higuchi M, Matsuno T, Yoshiki T. Bone marrow cells carrying the env-pX transgene play a role in the severity but not prolongation of arthritis in human T-cell leukemia virus type-I transgenic rats: a possible role of articular tissues carrying the transgene in the prolongation of arthritis. *Int J Exp Pathol* 85: 191-200, 2004.
- 3) Miyatake Y, Ikeda H, Michimata R, Koizumi S, Ishizu A, Nishimura N, Yoshiki T. Differential modulation of gene expression among rat tissues with warm ischemia. *Exp Mol Pathol* 77: 222-230, 2004.
- 4) Yamamoto Y, Ishizu A, Ikeda H, Otsuka N, Yoshiki T. Dexamethasone increased plasminogen activator inhibitor-1 expression on human umbilical vein endothelial cells: an additive effect to tumor necrosis factor- α . *Pathobiology* 71: 295-301, 2004.
- 5) Takada M, Tada M, Tamoto E, Kawakami A, Murakawa K, Shindoh G, Teramoto K, Matsunaga A, Komuro K, Kanai M, Fujiwara Y, Shirata K, Nishimura N, Miyamoto M, Okushiba S, Kondo S, Hamada J, Katoh H, Yoshiki T, Moriuchi T. Prediction of lymph node metastasis by analysis of gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *J Surg Res* 122: 61-69, 2004.
- 6) Murakawa K, Tada M, Takada M, Tamoto E, Shindoh G, Teramoto K, Matsunaga A, Komuro K, Kanai M, Kawakami A, Fujiwara Y, Kobayashi N, Shirata K, Nishimura N, Okushiba S, Kondo S, Hamada J, Katoh H, Yoshiki T, Moriuchi T. Prediction of lymph node metastasis and perineural invasion of biliary tract cancer by selected features from cDNA array data. *J Surg Res* 122: 184-194, 2004.
- 7) Tamoto E, Tada M, Murakawa K, Takada M, Shindo G, Teramoto K, Matsunaga A, Komuro K, Kanai M, Kawakami A, Fujiwara Y, Kobayashi N, Shirata K, Nishimura N, Okushiba S, Kondo S, Hamada J, Yoshiki T, Moriuchi T, Katoh H. Gene- expression profile changes correlated with tumor progression and lymph node metastasis in esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 10: 3629-3638, 2004.
- 8) 石津明洋：自己免疫疾患の病態形成に関する新たな細胞・分子・遺伝子「HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける CD25⁺CD4⁺T 細胞機能異常と自己免疫疾患の発症」*臨床免疫* 42: 415-420, 2004.

2. 学会発表

- 1) 石津明洋、早瀬広子、宮武由甲子、富居一範、樋口正人、阿部麻美、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬：自己免疫疾患モデルとしての HTLV-1 env-pX 遺伝子導入ラット。第 93 回日本病理学会総会，札幌。日本病理学会誌 93: 163, 2004.
- 2) 外丸詩野、山野嘉久、石津明洋、池

- 田 仁、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 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 239, 2004.
- 3) 馬場智久、石津明洋、宮武由甲子、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬: HTLV-1 pX トランスジェニックラットと正常 Wistar ラットの交配種における全身性炎症性疾患の発症. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 240, 2004.
- 4) 辻 宗啓、吉木 敬、池田 仁、石津明洋：ストレス環境下における培養骨細胞の apoptosis 関連遺伝子の発現に関する検討. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 241, 2004.
- 5) 宮武由甲子、外丸詩野、石津明洋、池田 仁、吉木 敬：HTLV-1 感染による HAM 感受性ラットおよび抵抗性ラットの脊髄における遺伝子発現の解析. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 249, 2004.
- 6) 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 CD4+CD25+regulatory T cell の解析. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 294, 2004.
- 7) 伊藤僚子、吉木 敬、池田 仁、石津明洋、外丸詩野：ヒト大腸癌培養株 DLD-1 細胞とその 5-FU 耐性株の比較. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌. 日本病理学会誌 93: 304, 2004.
- 8) 宮武由甲子、池田 仁、鈴木 昭、馬場智久、道又理恵、外丸詩野、石津明洋、吉木 敬：HTLV-1 感染による HAM ラット病感受性および抵抗性は脊髄における宿主の対ウイルス反応性に依存する. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 95, 2004.
- 9) 外丸詩野、山野嘉久、石津明洋、吉木 敬：T 細胞による抗原提示と免疫抑制機構. 第 34 回日本免疫学会・学術集会, 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 100, 2004.
- 10) 馬場智久、石津明洋、宮武由甲子、鈴木 昭、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬：HTLV-1pX 遺伝子導入ラットと正常 Wistar ラットの交配種における胸腺異常と chronic GVHD 様疾患の発症. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 札幌. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34: 278, 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録
該当なし。
 3. その他
該当なし。

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

基礎研究分科会研究報告

分担研究者 鈴木和男（分科会会長） 国立感染症研究所・生物活性物質部 室長

研究要旨

基礎研究分科会では、本年度、分科会員3名と協力者1名（鈴木和男、土屋尚之、加藤智啓、高橋啓）により施行し、血管炎発症に関する要因の解析を行い過去2年間の実績を基礎に最終年度としての成果を得た。血管炎発症に関する要因に好中球 CD69 の関与を示した。また、顕微鏡的多発血管炎における HLA および KIR 遺伝子群の関与が示された。さらに、血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原として抗ペロキシレドキシニン2を新たに候補として提示することができた。

A. 研究目的

基礎研究分科会では、分科会員3名と協力者1名によって行った。

1. 鈴木和男（分科会会長、国立感染症研究所・生物活性物質部）、高橋 啓（協力研究者、東邦大学医学部大橋病院病理）
2. 土屋尚之（東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学）
3. 加藤智啓（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター）

以下に、これまでの2年間の実績に加え、平成16年度の具体的な成果を報告する。

1. 血管炎発症に関する好中球 CD69 の解析

血管炎の発症の要因と病態に、活性化した好中球の影響が考えられている。関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデ

ス(SLE)等の血管炎を認める疾患の患者の血中に抗 CD69 自己抗体が検出されており、特に RA 患者においては、滑膜中、末梢血中の好中球の CD69 分子が細胞膜上に表出していることが最近報告された。一方、抗タイプ II コラーゲン抗体の静脈注射により誘導される関節炎が、CD69-KO マウスでは発症せず、滑膜に好中球が浸潤しないが、Wild-type マウス由来の好中球を静脈注射すると滑膜での炎症が発生することから、CD69 分子は好中球の炎症反応に関与している可能性が示唆されている。

これらの研究から、CD69⁺活性化好中球が血管炎発症との関連が示唆されている。本分子は、タイプ₂膜貫通型 C 型レクチン糖タンパク質であり、好中球をはじめ、活性化した T 細胞、B 細胞、NK 細胞、好酸球の細胞膜表面に移行・局在

することが知られており、血小板表面には恒常的に存在している。

そこで、本研究では、活性化好中球に CD69 が血管炎発症に関与しているかについて CD69-KO マウスにより解析した。また、血管炎発症にかかわる血栓形成における CD69 の関与についても CD69-KO マウスを用いて検討した。

2. 顕微鏡的多発血管炎における HLA および KIR 遺伝子群の関連の解析

日本人顕微鏡的多発血管炎(MPA)における HLA-DRB1*0901-DQB1*0303 ハプロタイプの関連を報告してきた。本年度は、HLA 領域における疾患感受性領域をさらに解析するために、HLA-B, C および DPB1 の検討を行うとともに、あわせて、HLA-class I をリガンドとし、NK 細胞や T 細胞に活性化あるいは抑制性シグナルを伝達する killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)遺伝子群の関連を検討した。

3. 血管炎における抗内皮細胞抗体の対応抗原に関する検討

血管炎における抗内皮細胞抗体(AECA)の病因論的役割を明らかにする目的で、その対応抗原同定を行い、個別抗原に対する自己抗体の臨床的意義を明らかにする。

B. 研究方法

各分担者の項目を参照

(倫理面への配慮)

患者とはインフォームドコンセントをかわし、個人情報の授受はなく、コードにより解析した。動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづき行った。

C. 研究結果

1. 血管炎発症に関する好中球 CD69 の解析

CD69-KO マウスにおいて、CAWS(*Candida albicans* water soluble fraction)誘導血管炎の発症頻度が野生型が 100%発症するのに比し、63%に低下した。また、CD69-KO マウスでの血栓形成についても検討し、血管内への活性酸素誘導の血栓形成による血流遮断の有意な遅延が生じた。

さらに、CAWS 誘導の血管炎発症初期のサイトカイン変動を解析したところ、好中球数の増加と活性化に伴い、特に、IL-12p70, IL-1_β および IL-10 が著明に増加した。

これらの結果は、活性化好中球表面に出る CD69 分子が、炎症性サイトカインレベルの上昇と連動しておこったと推定される。

2. 顕微鏡的多発血管炎における HLA および KIR 遺伝子群の関連の解析

HLA 領域では、DRB1*0901-DBB1*0303 ハプロタイプが HLA 領域における主要