

炎症／血管障害におけるミッドカインの関与  
名古屋大学大学院病態内科学講座免疫応答内科学  
湯沢 由紀夫

ヘパリン結合性成長因子であるミッドカイン(MK)は、プライオトロピンとともにMKファミリーを構築する。MKは、神経細胞の生存／分化のみならず、癌発生、血管新生、線溶系亢進、炎症細胞の走化性など様々な生物活性を有する。動脈硬化病変や関節リウマチの関節病変の形成にMKが重要であることを確認した。一方、MKは、胎生期腎に特異的に発現するが、障害された腎尿細管で再び発現が誘導される。腎虚血再灌流障害などの急性障害のみならず、シスプラチン腎症などの慢性間質障害の過程でMKが深く関与していることをMK欠損マウスにて明らかにした。さらに、AS-ODNを用いた治療実験からMKが腎間質障害治療の分子標的となる可能性が考えられる。

**Role of Midkine in inflammatory and vascular diseases**

Yukio Yuzawa

Division of Clinical Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine

The heparin-binding growth factor midkine (MK) and pleiotrophin form a family, which is distinct from ones of other heparin-binding growth factors, such as fibroblast growth factors. MK promotes cell survival, migration of neurons, neutrophils, and macrophages, and neurite outgrowth, and enhances fibrinolytic activity of endothelial cells. It has been shown that MK is a key molecule in the neointima formation of atherosclerotic lesions, and pathogenesis of rheumatoid arthritis. MK is specifically expressed in embryonic kidney, and is also expressed in damaged renal tubules. A study using MK deficient mice revealed that MK is closely involved in not only acute interstitial injury, such as ischemic reperfusion injury, but also in chronic injury such as cisplatin nephropathy. Furthermore, the results of a therapeutic study using AS-ODN suggest the possibility that MK may offer a target molecule in the treatment of tubulointerstitial injury.

### 高齢発症 ANCA 関連血管炎患者に対するシクロfosファミドバルス療法の有効性

○ 山崎康司、佐田憲映、一瀬邦弘、前島洋平、杉山 斉、槇野博史

岡山大学 腎・免疫・内分泌代謝内科学

本邦における ANCA 関連血管炎の特徴は、MPO-ANCA 陽性の顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者の割合が多く、発症年齢が高齢でかつ腎障害の頻度が高いことである。高齢者や腎不全患者では免疫抑制薬の副作用も高頻度であり、使用に際しては注意を要する。今回われわれは経口投与に比較して副作用が少ないとされるシクロfosファミド間歇静注療法 (IVCY) の有用性を後向きに検討した。症例は 29 例 (平均年齢 68 歳、男:女=11:18)。MPO-ANCA(+) 26/28, PR3(+)3/23。治療前の BVAS スコアは平均 17, CRP; 7.5±5.3mg/dl, S-Cr; 2.9±3.6 mg/dl。IVCY の平均投与量は 545±128 mg (369±58.3 mg/m<sup>2</sup>)、投与回数は 1-3 回が 15 例、4-8 回が 12 例であった。併用プレドニン初期量は 42±12mg(0.8±0.2mg/kg)で血漿交換療法 3 例に施行していた。治療の開始に伴い血清 CRP は速やかに低下し、腎機能も 1 M,3M で有意に改善した。治療期間中 5 例が血液透析に導入されたが全例離脱した。最終転帰では死亡 6 例 (生存率 79%) 腎死 1 例 (腎生存率 96%)。経過中に感染症の合併は 14 件であった。IVCY+ステロイド療法は高齢発症 MPA とくに腎障害に対して有効性が認められるが、同時に十分な感染対策が必要であると考えられた。

#### **Favorable response to intravenous cyclophosphamide in elderly patients with ANCA associated vasculitis.**

Yasushi Yamasaki, Ken-ei Sada, Kunihiro Ichinose, Yohei Maeshima, Hitoshi Sugiyama, Hirofumi Makino

Department of Medicine and Clinical Science, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

One of characteristic features of ANCA-associated vasculitis in Japan is high prevalence of MPO-ANCA-positive microscopic polyangiitis (MPA) in elderly population, in which renal involvement is quite often. Older age and severe renal failure are not only risk factors for poor prognosis in vasculitis patients but also dose-limiting factors for cyclophosphamide (CY) administration. As intravenous CY (IVCY) is recognized to be effective and safer than oral continuous administration, we retrospectively analyzed the usefulness of IVCY for the treatment of MPA. Twenty-nine patients (Age; 68 y.o., M/F; 11/18) with MPA were enrolled. BVAS score at diagnosis was 17±7, CRP; 7.5±5.3mg/dl, S-Cr; 2.9±3.6 mg/dl. IVCY was given at 545±128mg (369±58mg/m<sup>2</sup>) and repeated 2-8 times monthly in combination with corticosteroids at dose of 42±12 mg/day (0.8±0.2 mg/kg/day) as an initial dose. Plasma exchange was performed in 3 cases. CRP levels dropped immediately and S-Cr significantly decreased at 1 and 3 month. Five cases required hemodialysis but all cases were withdrawn. In a final outcome, 6 cases died and 1 case reached end-stage renal failure (Survival rate; 79%, renal survival; 96%). Infection was observed in 14 cases. IVCY combined corticosteroids seemed to be effective for elderly-onset MPA patients, but careful observation and prophylaxis for infection should be necessary.

**CAWS 誘発マウス血管炎モデルにおけるヒト免疫グロブリン(h-IG)の血管炎抑制効果**

高橋 啓、大原関利章、直江史郎(東邦大・医・大橋病理)、  
三浦典子、大野尚仁(東京薬大・薬・免疫)、  
村山 研、大川原明子、鈴木和男(国立感染研・生物活性)

*Candida albicans* Water Soluble fractions(CAWS)誘発マウス動脈炎モデルにおける経静脈的 h-IG の有効性について検討した。C57BL/6N マウス(4週齢、雄)の腹腔に CAWS 4mg を連続5日間接種した。CAWS 接種後 h-IG を投与し、実験28日目に安楽死させ大動脈起始部のステップ標本を作製。大動脈や冠状動脈における炎症の有無・その性状について病理組織学的に比較検討した。

未治療群における動脈炎発生率は70%であり、CAWS 接種3日目から5日間連続で h-IG 投与がなされた場合に動脈炎発生は抑制された。MPO-ANCA 含有量の異なる h-IG 投与でも同程度の汎動脈炎発生率の低下をみた。しかし、h-IG の単回大量投与では動脈炎抑制効果は得られなかった。末梢血好中球数は MPO-ANCA が高濃度に含まれる h-IG で低下する傾向を示した。h-IG 投与で血管炎の発生を完全に抑制することは困難であるが、h-IG は汎血管炎への進展を抑制する可能性がある。

**The effect of human immunoglobulin (h-IG) in mice vasculitis model caused by CAWS**

K. Takahashi, T. Oharaseki, S. Naoe, N. Miura<sup>1</sup>, N. Ohno<sup>1</sup>, K. Murayama<sup>2</sup>, A. Okawara<sup>2</sup>, K. Suzuki<sup>2</sup>

Department of Pathology, Ohashi Hospital, Toho University School of Medicine, Tokyo Japan

<sup>1</sup> Laboratory for Immunopharmacology of Microbial Products, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Tokyo, Japan

<sup>2</sup> Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

The effect of h-IG administration in the development of mice vasculitis caused by CAWS was examined. CAWS was injected into peritoneal cavity of the C57BL/6N mice for 5 consecutive days in the 1st week. Mice were killed under anesthesia on 28th experimental day. Tissue specimens were fixed, embedded in paraffin and H&E-stained sections were prepared using routine histological techniques. The incidence of panarteritis in control group was 70%. Incidence of panarteritis was reduced by h-IG administration for 5 consecutive days from 3rd experimental day, concerning high dose MPO-ANCA, low dose MPO-ANCA and conventional dose groups. The development of panarteritis was not inhibited by the single, large dose h-IG administration. There was no obvious difference in histology between these groups. The number of peripheral neutrophils decreased when administering h-IG containing high dose MPO-ANCA. Though h-IG administration cannot prevent the development of vasculitis in this model, it is suggested that h-IG show a inhibitory effect in progressing to panvasculitis.

## マウス血管炎モデル-2:

## CAWS 誘発血管炎の系統差と免疫学的パラメータの解析

東京薬科大学薬学部 免疫学教室 大野尚仁 ([ohnonao@ps.toyaku.ac.jp](mailto:ohnonao@ps.toyaku.ac.jp))

難治性血管炎に関し、分子レベルで病態を解明し、治療法を開発することは急務である。高橋らは *Candida* 細胞壁 mannan を主成分とする抽出物 (CADS) をマウスに頻回腹腔内投与するプロトコールを用いて解析し、血管炎発症は著しい系統差を示し、C57Bl/6, C3H/HeN は高発症系統、DBA/2, BALB/c, CBA/J は低発症系統であることを明らかにした。

我々は *Candida* 培養外液から mannoprotein- $\beta$ -glucan を主成分とする多糖 CAWS を調製し本モデルに適用してきた。系統差を比較したところ、AKR/N, A/J, C3H/HeJ, CBA/N, DBA/1, DBA/2, BALB/c のいずれの系統においても血管炎が発症した。一方、CBA/J は抵抗性であった。さらに、DBA/2 の感受性は CADS と異なり重篤であり、投与後 6 週前後で死亡した。

DBA/2 マウスを用いて種々のパラメータを検討したところ、血管炎は通常投与量の 1/10 以下 (250 $\mu$ g/mouse) でも惹起されるが、致死率は低投与量では低下すること、局所の増殖性変化は最終投与から 1 週間程度で始まること、3 週間程度からは心重量が増加することがわかった。

DBA/2 マウスの脾臓細胞を *in vitro* で培養し、CAWS で刺激すると、容量依存的に GM-CSF ならびに IFN $\gamma$  を産生した。この作用は C3H/HeN では認められなかった。また、脾細胞を GM-CSF 添加条件下に CAWS で刺激すると、IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$  などのサイトカインを産生は増強された。これらのことから、DBA/2 マウスは CAWS に応答して GM-CSF を産生しやすく、この性質が重篤な血管炎を惹起することに関連している可能性がある。

**Model Mice for Coronary Arteritis-2**

## Strain specificity of CAWS-induced coronary arteritis

Naohito Ohno, Tokyo Univ. Pharm. Life Sci. [ohnonao@ps.toyaku.ac.jp](mailto:ohnonao@ps.toyaku.ac.jp)

Intraperitoneal administration of CAWS (water-soluble extracellular polysaccharide fraction obtained from the culture supernatant of *Candida albicans*) to mice induces coronary arteritis. We analyzed strain specificity of the arteritis and AKR/N, A/J, C3H/HeJ, CBA/N, DBA/1, DBA/2, BALB/c were found to be sensitive. In contrast, CBA/J was resistant. The coronary arteritis of DBA/2 mice was the most serious, with majority of mice expiring about 6 weeks from CAWS administration. Within the observation period, hyperplasia started around 1 week and heart weight increased from 3 weeks from CAWS administration.

Stimulation of spleen cells of CAWS-administered DBA/2 mice by CAWS *in vitro* released significant concentration of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Stimulation of spleen cells of naive DBA/2 mice by CAWS *in vitro* released GM-CSF, but other strains were not. In the presence of GM-CSF, spleen cells of DBA/2 mice released significantly higher concentration of IFN- $\gamma$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ . These facts strongly suggested that CAWS induced GM-CSF productivity in DBA/2 mice would be a key property of severe coronary arteritis. The CAWS induced coronary arteritis is a good tool for analyzing molecular mechanism and development of new therapeutic strategy.

**ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスにおける好中球活性化と凝固系活性化を介した半月体形成機序**

猪原登志子 1,2、大川原明子 2、劉寧 3、日浅俊介 3、雑賀寛 4、根本久一 4、北徹 1、武曾恵理 5、鈴木和男 2、小野孝彦 3

1 京都大・循内、2 国立感染研・生物活性、3 静岡県立大・病態薬学、4 日本化薬、5 北野病院・腎内

【目的】 SCG/Kj マウスは血清 MPO-ANCA 陽性で半月体形成性糸球体腎炎を発症し、血管炎症候群の動物モデルとして病態の解明に有用である<sup>1)</sup>。これまで我々は、メサンギウム増殖性腎炎モデルにおいて凝固過程が半月体形成を進行させる役割につき報告してきた<sup>2)</sup>。今回は SCG/Kj マウスを用いて血管炎における半月体形成機序について検討した。【方法】 SCG/Kj マウスの腎組織において糸球体内好中球浸潤、壊死・半月体病変、MPO 抗原、Tissue factor、フィブリン沈着とともに、尿所見、血清 MPO-ANCA、好中球 MPO 放出能との関連について検討した。【結果】 SCG/Kj マウスの腎組織では、腎炎早期では糸球体毛細血管の内皮に Tissue factor の発現とフィブリン沈着を認め、腎炎の進行とともに壊死部にこれらが広く染色された。さらに好中球浸潤・半月体形成を認め、末梢好中球からの MPO 放出能の高値が認められた。【考察】 好中球活性化により糸球体毛細血管で炎症がおこり、Tissue factor の産生に引き続いて凝固が進行し、糸球体基底膜が断裂するとともに、ポーマン腔内フィブリン沈着を経て、半月体形成へと進展することが示唆された。

1) Ishida-Okawara et al.: Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol Dial Transplant* 19: 1708-1715, 2004

2) Ono et al.: Role of mesangial Factor V expression in the crescent formation in rat experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Pathol* 204: 229-238, 2004

**SCG/kj mice, a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis, develop crescent formation through neutrophil activation, tissue factor expression and fibrin precipitation**

Toshiko Ito-Ihara<sup>1,2</sup>, Akiko Ishida-Okawara<sup>2</sup>, Ning Liu<sup>3</sup>, Shunsuke Hiasa<sup>3</sup>, Kan Saiga<sup>4</sup>, Kyuich Nemoto<sup>4</sup>, Toru Kita<sup>1</sup>, Eri Muso<sup>5</sup>, Kazuo Suzuki<sup>2</sup>, and Takahiko Ono<sup>3</sup>

1 Department of Nephrology and Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto. [itoshi@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:itoshi@kuhp.kyoto-u.ac.jp). 2 Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo. 3 Department of Clinical Pharmacology & Therapeutics, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences, Shizuoka. 4 Nippon Kayaku CO. Ltd., Tokyo. 5 Division of Nephrology, Kitano

**Background.** SCG/Kj is a recombinant inbred mouse strain which spontaneously develops crescentic glomerulonephritis (GN) with serum myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA) and therefore have been proposed as an animal model for ANCA-associated crescentic GN. Here we investigate mechanisms to develop crescent formation in SCG/Kj mice. **Methods.** Urinalysis, neutrophil number in peripheral blood, plasma tumor necrosis factor- $\alpha$ , and MPO-ANCA of SCG/Kj mice (n=45) were compared to those of the C57BL/6 mice (control, n=9). Immunohistological examination was performed with rabbit antibody against rmMPO, goat anti-mouse fibrinogen antibody, and goat anti-mouse tissue factor antibody. In SCG/Kj mice, spontaneous release of MPO and superoxide generation from peripheral neutrophils were examined and compared with the following scores of renal histopathological findings: 1) number of infiltrated neutrophils in glomeruli; 2) grading of glomerular necrosis; 3) grading of fibrin-related antigen; and 4) grading of crescent formation. **Results.** SCG/Kj mice had significantly heavier proteinuria with hematuria. SCG/Kj mice developed necrotic lesions in 100%, and crescent formation in 69% of mice examined, while C57BL/6 mice showed neither. Tissue factor and fibrin were observed along glomerular capillary loops in the initial phase of the disease. Then, MPO antigen, tissue factor, and fibrin were stained in the necrotizing lesions of glomeruli. Finally, fibrin precipitation was observed in the Bowman's cavity together with cellular crescent formation. MPO release was positively correlated with the necrotizing score ( $p<0.01$ ). Superoxide generation, however, was negatively correlated with the necrotizing score ( $p<0.05$ ), suggesting that superoxide had already decreased when renal damage histopathologically established. **Conclusion.** Inflammation and disruption of glomerular capillary vessels triggered by activated neutrophils lead to expression of tissue factor, and activation of coagulation pathway. Crescents may be formed through fibrin precipitation, which was produced through activated coagulation pathway after the leakage of fibrinogen into the Bowman's cavity from ruptured capillary.

### ANCA 関連腎炎の新しい動物モデルの検討

板橋美津世、湯村和子、大川原明子、山下淳二、金城義昭、鈴木和男、二瓶宏  
東京女子医大第四内科、国立感染症研究所生物活性物質部、日本製薬、

【目的】 ANCA 上昇を示す半月体形成性腎炎の動物モデルとして MRL lpr/lpr, SCG/Kj マウスが知られている。動物モデルは血管炎の発症メカニズムの解明や治療薬の発展には必要不可欠である。今回我々は bovine serum albumin(BSA)を用いた ANCA 関連腎炎モデルについて検討した。【方法】 C57BL/6N マウスに BSA(0.2mg)を2週毎に4回腹腔内投与し、その後 BSA(50mg/kg)を6週間連日投与した。好中球、血小板、MPO-ANCA、腎組織を経時的に観察した。【結果】 BSA 投与後、血液検査にて血小板、好中球が上昇し、尿検査にて血尿、蛋白尿が出現した。MPO-ANCA は9週目より顕著に上昇した。腎組織では、好中球浸潤や半月体形成がみられた。腎臓における好中球浸潤の程度は、MPO-ANCA 値や尿蛋白と有意に相関があった。【結論】 BSA 投与後、MPO-ANCA の上昇と共に尿蛋白、尿潜血、腎臓における好中球浸潤や半月体形成を認めた。BSA 腎炎マウスは ANCA 関連腎炎のモデルになり得ると考えられた。

#### A Novel Model Mouse of MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis with Increased Neutrophil Contribution.

Wako Yumura<sup>1</sup>, Mitsuyo Itabashi<sup>1</sup>, Akiko Ishida-Okawara<sup>2</sup>, Junji Yamashita<sup>3</sup>, Yoshiaki Kaneshiro<sup>3</sup>, Hiroshi Nihei<sup>1</sup>, Kazuo Suzuki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Biodefense Laboratory, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Nihon Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan

**Background.** It has not been reported that mouse models for anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis showing correlation between myeloperoxidase (MPO)-ANCA in serum and involvement of neutrophils in the development of vasculitis, though some reports of induction models. We developed mice showing glomerulonephritis (GN) by induction with bovine serum albumin (BSA) administration accompanied increase of neutrophils and platelets in the peripheral blood prior to elevation of MPO-ANCA titer. **Methods.** Crescentic GN (CrGN) was induced by injection of BSA in B57BL/6 mice. Counts of peripheral blood, the plasma levels of MPO-ANCA and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and urinary analysis, as well as histologic evaluation of the kidneys such as glomerular neutrophil infiltration and crescentic formation by standard light microscopic examination, immunofluorescence at regular intervals during the course the disease were performed. **Results.** Neutrophils infiltration into the renal glomeruli 11 weeks after the first BSA injection and crescentic formation began at 10 weeks. Platelets and neutrophils counts significantly increased. Proteinuria was observed at 5 weeks. At 9 weeks MPO-ANCA promptly increased, and TNF- $\alpha$  also increased at 11 weeks. The infiltration of neutrophils confirmed with anti-MPO antibody into glomeruli was observed from 8 weeks. The infiltration showed correlation MPO-ANCA titer and proteinuria. Proteinuria also significantly correlated with MPO-ANCA titer. Finally, the renal lesion with crescentic formation was associated with increase of MPO-ANCA titer prior to its progression. **Conclusions.** MPO-ANCA was detected in the mice after the secondary daily injection of BSA at 9 weeks after the initial injection causing increase of platelets and neutrophils. The profile of immune deposits in glomeruli differed from that of the pauci-immune found in human ANCA associated vasculitis, marking not completely representative for human ANCA-associated CrGN. These findings indicate that BSA induces activation of peripheral blood by platelets-neutrophils interaction followed by the elevation of MPO-ANCA, resulting in the development of CrGN in mice.

## 人工グロブリンのストラテジー

### Strategy of recombinant polyclonal immunoglobulin

○古谷昌弘(FURUTANI, Masahiro), 東儀彰子(TOGI, Akiko)

積水化学工業(SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.)

(E-mail: [furutani002@sekisui.jp](mailto:furutani002@sekisui.jp))

免疫グロブリン大量静注療法(IVIG; intravenous immunoglobulin)は ANCA(anti-neutrophil cytoplasmic antibody)が関与する川崎病、血管炎、腎炎の治療に有効である。しかしながら、その安全性、副作用や安定供給面での問題を抱えており、人工グロブリンの開発は極めて重要である。

MPO(myeloperoxidase)で免疫した MPO ノックアウトマウス脾臓 RNA より RT-PCR によって VL 及び VH 遺伝子を増幅し、overlap-PCR によって scFv (single chain Fv)遺伝子を調製した。T7 プロモーターのコントロール下でポリクローナル scFv を大腸菌細胞質に合成したところ、封入体として合成された。現在、scFv の効率的な可溶化精製を検討している。一方、重鎖定常領域(CH1-CH2-CH3)は分子シャペロン的一种である PPIase (peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase)との融合蛋白質として大腸菌細胞質可溶性画分へ合成可能であった。ProteinA を用いるアフィニティクロマト、限定分解型プロテアーゼによる PPIase からの遊離、及びアニオン交換クロマトによって均一に精製できた。現在、これら 2 つの抗体ドメインによる血管炎モデルマウスの治療を検討している。

### Synthetic IgG

Masahiro Furutani and Akiko Tohgi, Sekisui Co. Ltd., Kyoto

While IVIG (intravenous immunoglobulin) treatment is effective for ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody)-associated Kawasaki disease, vasculitis, and glomerulonephritis, immunoglobulin from plasma has the problems in safety, side effects, and stable supply. The development of recombinant polyclonal immunoglobulin is pressing need

The VL and VH genes were amplified by RT-PCR from the spleen RNA of the MPO (myeloperoxidase)-knockout mouse immunized with MPO. Single chain Fv (scFv) genes were synthesized by the second overlap PCR. The polyclonal scFv antibodies were synthesized by T7 promoter system in *E. coli* cytoplasm. The product was obtained as an inclusion body. Efficient purification of soluble polyclonal scFv is under investigation. On the other hand, the heavy chain constant region (CH1-CH2-CH3) was synthesized as the fusion form with one of molecular chaperones, peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) in the soluble fraction of *E. coli* cytoplasm. The CH1-CH2-CH3 was purified to homogeneity by Protein A-affinity chromatography, liberation from PPIase by digestion with PreScission protease, and an anion exchange chromatography. Now we try treatment of a mouse disease model of human vasculitis with these two antibody domains.



## Development of a blood RNA diagnosis system for autoimmune diseases

**Hiroshi Nojima**

Department of Molecular Genetics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1  
Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. ([snj-0212@biken.osaka-u.ac.jp](mailto:snj-0212@biken.osaka-u.ac.jp))

To develop a novel blood RNA diagnosis system, we have established a novel cDNA subtraction technique named “stepwise subtraction” that allows comprehensive isolation of almost all of the upregulated mRNA species in the target cells (EMBO Rep. 3:367-372, 2002). Using this technique, we have isolated 305 mRNA (cDNA) species whose expressions are dramatically enhanced in blood cells as compared to fibroblast cells, and named them PREB genes (cDNAs) comprehensively after predominantly expressed in blood cells. We found that about a half of the PREB genes are uncharacterized novel genes. Oligonucleotides (60 mer) corresponding to these PREB genes were designed to prepare the cDNA microarray that were used to perform focused transcriptome analysis on the gene expressions of the blood cells obtained from the patients afflicted with autoimmune diseases. Total RNAs isolated from 30 angitis patients, 80 rheumatoid arthritis (RA) patients, 130 systemic lupus erythematoses (SLE) patients, 50 idiopathic thrombocytopenia purpura (ITP) patients, and 100 normal volunteers will enable us to identify the genes that show not only the disease specific transcriptome patterns, but also the common expression patterns among these autoimmune diseases.

Moreover, we have comprehensively isolated the disease specific mRNA (cDNA) species whose expressions are extraordinarily augmented in blood (or bone marrow) cells of the patients as compared to those of normal volunteers. Especially, we have isolated more than 100 genes that are specifically expressed in the blood cells of MPA (microscopic Polyangiitis) patients. Interestingly, some of the genes are repeatedly isolated in all of these autoimmune diseases. Using the real-time PCR method, we have conducted quantitative analysis on the expression levels of some of these genes in each patient and examined their relationships with the malignancy of the disease. By combination of these analyses, we aim to establish a blood RNA diagnosis system for the autoimmune diseases.

**Malignancy in MPO-ANCA associated vasculitis**

Miho Karube, Yoshihiro Arimura, Kimimasa Nakabayashi , Akira Yamada

First Department of Internal Medicine

Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan,

arimuray@kyorin-u.ac.jp

**OBJECTIVE:**

The relationship between malignancy and myeloperoxidase(MPO)- antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis was investigated.

**METHODS:** A retrospective review of 89 consecutive patients with MPO-ANCA associated vasculitis admitted to Kyorin University Hospital and affiliated hospitals was performed. The average age was 64.6 years old and male to female ratio was 1 to 1.4. The incidence of malignancy was compared with a normal population in Japan. Also, the previous reported cases of ANCA associated vasculitis complicated with malignancy in Japan were reviewed.

**RESULTS:** Six patients in 89 MPO-ANCA associated vasculitis (6.7%) had a diagnosis of malignancy, 3 had lung cancer, 1 had prostate cancer, 1 had colon cancer and 1 had acute myeloid leukemia. The average age of the patients with malignancy was 68.3 years old, male to female ratio was 2 to 1. The rate of malignancy compared with an age-matched control group was increased in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. From 60 to 79 years old, standerized incident rate ratio of malignancy for males was 8.7 and for females was 3.8. Twenty one ANCA associated vasculitis patients with malignancy were reported in Japan. Nineteen had MPO-ANCA or P-ANCA, 3 had PR3-ANCA or C-ANCA and 1 had both P-ANCA and C-ANCA. The average age was 65.3 years old, male to female ratio was 6 to 1. Seven patients (33%) had lung cancer, 6 (29%) had malignancy of the digestive tract, and 5 (24%) had hematologic malignancy (2 had acute myeloid leukemia, 3 had malignant lymphoma). **CONCLUSION:** Patients with MPO-ANCA-associated vasculitis have an increased risk of malignancy. Malignancy in MPO-ANCA-associated vasculitis was dominantly male. Main malignancy was lung cancer.

**Study for the evidence of beneficial effect of IVIg therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan**

Eri Muso<sup>1</sup>, Toshiko Ito-Ihara<sup>1,2</sup>, Kazuo Suzuki<sup>3</sup>, Hiroshi Hashimoto<sup>4</sup> and the Study Group for the Prospective Randomized Control Trial of IVIg in MPO-ANCA related RPGN

<sup>1</sup>Division of Nephrology, Kitano Hospital The Tazuke Kofukai Medical Research Institute, Osaka, <sup>2</sup>Department of Nephrology, Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, <sup>3</sup>Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases, <sup>4</sup>Department of Clinical Immunology, Medical School of Juntendo University, Tokyo

MPO-ANCA 関連血管炎に伴う急速進行型糸球体腎炎の治療には、ステロイドパルス療法を含む大量療法、免疫抑制剤の併用などが施行されることが多く、その腎生存予後の改善には寄与するものの、感染症などの合併症が加わることで生命予後および QOL の悪化をきたすことも事実である。近年これらの免疫抑制治療に IVIg 療法を併用することにより、低用量のステロイド療法で治療可能となり、さらに腎および生命予後の良好な症例を経験することが、欧米で報告され、わが国でも全国で症例の報告がされてきた。わが国の 32 症例の報告のまとめでは、良好な腎予後に加え、治療後の 6 ヶ月時点で、感染による生命死は報告されていない。

本治療法の MPO-ANCA 関連急速進行型糸球体腎炎に対する良好な効果を裏づけるべく、わが国において多施設共同での RCT が計画され、実行されつつある。本試験では、対象をわが国の ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎の分類での I, II 群に絞って、IVIg 療法とわが国の進行性腎障害に関する調査研究班の急速進行性糸球体症候群分科会の制定したガイドラインに沿った治療を平行して行い、IVIg 使用、非使用群間で、腎機能の改善度、ステロイド、免疫抑制剤の使用量、感染症の発症頻度などをエンドポイントとして比較検討を行う。早急な IVIg の有効性のエビデンスの確立が望まれる。

MPO-ANCA related rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) often necessitated aggressive immunosuppressive treatment using high dose corticosteroid and cyclophosphamide (CYC) which sometimes brings about severe side-effects such as systemic infection before its completion. IVIg has been utilized for this disease not only to avoid such infection but to provide the immunomodulatory effect to suppress the disease activity. Recent Japanese survey of 32 IVIg cases has revealed the favorable results both in renal and life survival rate at 6 months after the therapy.

To establish the evidence of the effectiveness of this therapy for RPGN due to MPO-ANCA related polyangiitis, prospective controlled study was planned with several endpoints such as amelioration of serum creatinine, lower dose of immunosuppressants, and incidence of infection. Highly qualified evidence of beneficial effect of IVIg in this critical disease is expected.

**The Basic and Clinical Research Interface: Recent advance in autoimmunity**

David Jayne

Vasculitis and lupus Clinic

Addenbrooke's Hospital

Cambridge, UK

The identification of molecular targets and monospecific therapeutic antibodies using recombinant technology had provided new treatments and a new mechanism for exploring pathogenesis. Tumor necrosis factor (TNF) is now known to be a critical cytokine in rheumatoid arthritis and anti-TNF agents have confirmed its importance in vasculitis. Furthermore endothelial dysfunction, an important risk factor for cardiovascular disease, caused by vascular inflammation can be normalised by TNF blockade thus opening new opportunities for the prevention of vascular disease. Other specific interventions in autoimmunity, including B cell depletion and blockade of CTLA4 have pointed to the roles of B cells and co-stimulatory blockade in disease progression.

Despite the heterogeneous nature of autoimmune disease and the potential difficulties inherent in studying the pattern of gene expression, recent clinical studies have demonstrated consistent messenger RNA (mRNA) patterns, or signatures, that correspond with classical diagnoses. For example, in systemic lupus erythematosus, activation of the gamma-interferon pathway and granulopoiesis patterns correlate with active disease. Improved methodology, based on leukocyte fractionation prior to mRNA extraction is likely to improve the sensitivity of this technology. Areas of exploitation include revision of disease classification, prediction of therapeutic response and dissection of the therapeutic action of newer immune suppressive and immunomodulatory drugs.



厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と  
安全性向上に関する研究班  
(H16-医薬-070)

平成16年度第一回班会議

日時： 2004年7月2日(金)、3日(土)

場所： 安芸グランドホテル

現地世話人： 岡崎富男(広島市民病院)

主任研究者： 鈴木和男(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性向上に関する研究班  
\*事業名が変わりました

7月1日 19時～21時

総括班会議：ホテルグランビア広島

7月2日 11時～11:30

事務局準備会議：安芸グランドホテル

———— 班会議プログラム ————

7月2日（金） 11:30 一般受付開始

13:00～13:25

平成16年度計画と達成目標

鈴木和男（主任研究者：国立感染研）

13:25～13:30

1. 基礎分科会

1) 平成16年度計画と達成目標

大野尚仁（東京薬大）

2) 分担者・協力研究者のプロジェクト発表・・・各演題10分の発表＋若干の質疑

13:30～14:30

<モデルマウス> 座長：高橋 啓

(1) CAWS 惹起血管炎モデルの発症に関する因子の多角的解析

大野尚仁（東京薬科大学）

(2) 血管炎を誘発する CAWS 投与初期におけるマウス好中球の活性化

大川原明子（国立感染症研究所）

(3) ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスにおける好中球活性化とフィブリン沈着を介した半月体形成機序

小野孝彦（静岡県立大・病態薬学）、猪原登志子、劉 寧、北 徹（京都大・循内）

雑賀寛、根本久一（日本化薬） 武曾恵理（北野病院・腎内）

大川原明子、鈴木和男（国立感染研・生物活性）

(4) ANCA 上昇を認める BSA 腎炎マウス作製の試み

湯村和子、板橋美津世、二瓶宏（東京女子医科大学 第4内科）

石田一大川原明子、鈴木和男（国立感染症研究所 生物活性物質部）

山下潤二、金城義明（日本製薬株式会社）

14:30～15:20

<人工IVIG開発> 座長：大野尚仁

- (5) マウス系統的血管炎誘発モデルを用いたヒト免疫グロブリン治療効果の検討  
高橋 啓 (東邦大学医学部附属大橋病院)
- (6) 人工ポリクローナルグロブリンの合成  
古谷昌弘 (積水化学・開発研究所)

<休憩>

16:00-17:00

3) 分担者・協力研究者の個別発表・・・各演題10分の発表+若干の質疑  
座長：新井孝夫

- (7) 好中球機能異常による炎症性腸疾患の解析  
荒谷康昭 (横浜市立大学・木原生研)
- (8) MPO-ANCA による糸球体内皮細胞の粘着分子  
長尾朋和<sup>1\*</sup>, 松村実美子<sup>1,2</sup>, 馬淵綾子<sup>3</sup>, 越尾修<sup>4</sup>, 南谷晴之<sup>2</sup>, 鈴木和男<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>国立感染研・生物活性物質, <sup>2</sup>慶應大・院理工, <sup>3</sup>オタゴ大 (ニュージーランド), <sup>4</sup>帝京大・医,\*現コーネル大・医 (ニューヨーク)
- (9) 血管炎における活性化好中球の CD69 分子  
村山研<sup>1,2</sup>、長尾朋和<sup>1</sup>、鞍馬秀輝<sup>3</sup>、長谷川明洋<sup>4</sup>、船津高志<sup>3,5</sup>、南谷晴之<sup>6</sup>、新井孝夫<sup>2</sup>、中山俊憲<sup>4</sup>、鈴木和男<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>国立感染研・生物活性、<sup>2</sup>東京理科大・理工、<sup>3</sup>早稲田大・理工、<sup>4</sup>千葉大・院医、<sup>5</sup>東大・薬、<sup>6</sup>慶応大・理工
- (10) Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b(high)CD8alpha(-) dendritic cell development  
鈴木章一 (長崎大学熱帯医学研究所)

17:00-18:00

座長：荒谷康昭

- (11) 薬物を結合させた量子ドットの生体、組織、細胞内動態と機能評価  
山本健二 (国立国際医療センター研究所)
- (12) 細胞骨格の機能研究におけるモノクローナル抗体の応用  
新井孝夫 (東京理科大学)
- (13) 川崎病の心および血管病変と古典的な結節性動脈周囲炎との組織学的異同に関する検討  
直江史郎 (桐蔭横浜大学先端医用工学センター、横浜総合病院病理部)  
高橋 啓、大原関利章 (東邦大学医学部大橋病院病理学講座)  
日本の臨床試験データセンターの現状と展望
- (14) 山崎 力 (東京大学大学院医学系研究科リニカルバイオインフォマティクス研究ユニット)

18:00-

夕食

7月3日(土)

2. 臨床分科会

9:00-9:05

2-1)平成16年度計画と達成目標

武曾恵理 (田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科)

2-2) 分担研究者・協力研究者のプロジェクト会議 (臨床試験も含む)

9:05-10:35 (各15分)

座長:岡崎富男

2) -1 各種疾患に対するγグロブリン療法の取り組み

a.(15)劇症型心筋炎に対するγグロブリン療法

和泉大輔、小玉 誠、相澤 義房 (新潟大学医歯学総合病院第1内科)

b.(16)わが国に於けるMPO-ANCA関連急速進行性糸球体腎炎への免疫グロブリン大量療法(IVIg)施行例の解析

武曾恵理、古宮俊幸 (田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科)

猪原登志子(京都大学循環病態学)、今井圓裕 (大阪大学大学院病態情報内科学)

山縣邦弘(筑波大学)、赤松明(愛媛県立病院)

鈴木和男(国立感染症研究所生物活性物質部)

c.(17)大量ガンマグロブリン療法を行ったANCA関連腎炎3症例の検討

長澤康行、倭成史、三上聡司、岩谷博次、伊藤孝仁、今井圓裕 (大阪大学大学院病態情報内科学)

座長:橋本博史

d.(18)難治性血管炎におけるIVIg療法と血中サイトカインの検討

猪原登志子 (京都大学大学院医学研究科循環器)

武曾恵理 (田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科)

鈴木和男 (国立感染症研究所生体防御物質室)

e.(19)MPO-ANCA関連腎炎におけるIVIg治療前後での種々の免疫パラメーターの変化

宇野賀津子 (ルイ・パストゥール医学研)

鈴木和男 (国立感染症研究所・生物活性物質部)

武曾恵理 ((財) 田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科)

10:35-10:50 休憩

10:50-11:20 座長:武曾恵理

2) -2 各種血管炎の話題

a.(20)多臓器障害・意識障害を呈した川崎病再発例

木口久子、鎌田政博、中川直美、岡崎富男 (広島市立広島市民病院小児循環器科・小児科)

b.(21)顕微鏡的多発血管炎の予後と治療における臨床的研究

金英俊、小林茂人、津田裕士、橋本博史 (順天堂大学膠原病リウマチ内科)

11:20-12:00

3.「まとめ」 岡崎富男、直江史郎

4. 事務連絡 事務局



## 平成16年度計画と達成目標

鈴木和男(主任研究者:国立感染研)

血管炎である川崎病では、その治療をステロイドパルスからガンマグロブリン製剤に変えてから重篤な病態は激減し、その有効性が実証されている。一方、自己免疫性の血管炎であるMPO-ANCA(myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody)関連血管炎は、欧米よりも、わが国に多く、特に高齢者に発症し、近年その頻度が増している。本症は重篤な急速進行性糸球体腎炎をきたし、その治療は、ステロイドパルスをはじめ、各種免疫抑制療法や対応抗原の感作療法によっているが、しばしば腎死に至り高齢者透析の原因となっており、また感染症の頻発も医療経済を圧迫している。このステロイド療法のリスク軽減のため有効な免疫補助療法が切望されており、ヨーロッパでは、血管炎への大量ガンマグロブリン製剤治療(IVIg)が好成績を得ている。わが国でも、本研究のグループで、予備的なIVIg療法を継続し昨年度までの解析で、早期の疾患活動性の抑制、腎死や感染症発症頻度の低下など有効な成績を報告した(Kid & Blood Press. Res. 26: 297,2003)。また、IVIgによるQOLの改善を経験した患者からの本治療への要望も強く、保険適用にむけた臨床試験も申請の段階にさしかかっている。このように、わが国の高齢化社会の到来により、IVIg療法の適応疾患が増加することが予想される。そこで、われわれは、血管炎の治療へのIVIg療法による透析離脱をふくめ医療経済をめざしつつ、安全性確保のために人工グロブリン化をすすめている。その臨床応用にむけたモデルマウスの開発(Inflammation, 2001)によりFvのライブラリーを作製している。人工グロブリンによる血管炎のIVIg治療を施行しNative-IVIg法の有効性同様の結果がでつつある。また、IVIgの安全性の観点から、開発している人工グロブリンの安全性についても、感染性因子、内因性・外因性毒素、炎症惹起分子の特定など、感染研の安全研究ガイドラインを基に安全性の確保を検討する。

### 16年度の目標

#### 1. 基礎分科会

1) 人工ポリクローナルグロブリン作製  
リコンビナントの候補分子精製

2) 治療評価と安全確保

モデル動物(冠状動脈炎と腎炎)による人工ポリクローナルグロブリンの治療  
治療の予備的結果を得る

#### 2. 臨床分科会

臨床例の検討と基礎班への協力



厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と  
安全性向上に関する研究班

(H16-医薬-070)

平成16年度第二回班会議

会期： 2005年1月8日(土) 10-17時  
会場： 感染研、共用第一会議室

主任研究者：鈴木和男(国立感染症研究所)

## 血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性向上に関する研究班

期日： 1月8日（土）10～17時

場所： 感染研、共用第一会議室

終了後、懇親会

※発表は、班員、協力者個別発表：パワーポイントにて10分+2分をお願いします。

### プログラム

10:00-11:00 総括班会議

開会：鈴木和男（国立感染研）、赤川清子（国立感染研）、中山俊憲（千葉大・院医）

1. 赤川清子：マクロライド誘導体のマクロファージにおける HIV-1 増殖抑制作用  
（国立感染研、免疫部）
2. 砂塚 敏明：HIV 増殖抑制作用を有するマクロライドの開発  
（北里大学北里生命科学研究所・薬品学）
3. 鈴木和男：HIV-Nef と MPO  
（国立感染研、生物活性物質部）
4. 澤田 誠：HIV-nef によるミクログリアの毒性転換（名古屋大学環境医学研究所）（藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・難病治療共同研究部門、大学院医学研究科・分子医学）
5. 川上和義、○仲村 究、宮城一也、澤田 誠：エイズ日和見真菌感染に伴う脳症の発症機序の解析  
（琉球大学大学院医学研究科感染症制御学講座分子病態感染症学分野（第一内科））
6. 亀岡洋祐：ジュネーブ病院におけるアルツハイマー患者群の MPO 遺伝子多型について  
（国立感染症研究所・遺伝子資源室）
7. 荒谷康昭：MPO 欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能（横浜市立大学木原生物学研究所）
8. 大富美智子：LECT2 KO マウスのニューロンおよびアストログリアの形態学的解析  
（東邦大・理学部 生物分子科学科 分子生物学部門）

12-13:00 昼食

- 13:00・13:19 1. 中山俊憲（千葉大・院医・免疫発生）  
研究班の概要 及び  
「CD69 分子に焦点を当てた関節炎治療薬の開発」
- 13:19・13:32 2. 山田道之（横浜市大・理）  
「peptidylarginine deiminase (PAD)の白血球活性化の解析」
- 13:32・13:45 3. 加藤智啓（聖マリアンナ・医）  
「ヒト関節炎における抗 CD69 抗体の意義」

休息

14:00-14:15

1. 「血液製剤の人工化に向けて (案)」 疾病対策課課長 (課長補佐)

2. 基礎班

14:15-14:08 基礎班の概要: 大野尚仁 (東京薬大)

2) 血管炎機構解析

14:38-14:50・CAWS 誘発血管炎の系統差と高応答性系統 DBA/2 における免疫学的パラメータの解析:  
大野尚人 (東京薬大)

14:50-15:02

・ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスにおけるマンナン結合タンパク質の沈着意義: 上村和秀 (静岡県立大・病態薬学) 他

15:02-15:14

・MPO-ANCA を支配する遺伝子座のマッピング: 鈴木和男 (国立感染研) 他

15:14-15:26

・MPO 遺伝子の生体の意義: クリプトコッカス感染に対する生体防御における MPO の関与:  
荒谷康昭 (横浜市大・木原生物研)

15:26-15:38

・マウス MPO リスクエピトープペプチドに対するモノクローナル抗体の作製:  
新井孝夫 (東京理科大・理工)

15:38-15:50

・QD の新しい利用法: 山本健二 (国立国際医療センター)

1) 血管炎モデル動物開発

15:50-16:02 ・病理、遺伝子マッピング: 高橋啓 (東邦大・医・大橋病院・病理) 他

16:02-16:14 ・初期応答: 大川原明子 (感染研)

16:14-16:26 ・腎炎: 湯村和子 (東京女子医大)

16:26-16:38 ・RPGN一病態解析: 太刀川仁 (国立感染研、

16:38-16:50 ・SCG/Kj マウスにおける好中球活性化、組織因子発現、  
フィブリン沈着を介した半月体形成機序小野孝彦 (静岡県立大・病態薬学) 他

3. 治療実験と臨床

1) IVIG による動物モデルの治療:

17:00-17:12 A) 冠状動脈炎: 高橋啓 (東邦大・医・大橋病院・病理) 他

17:12-17:24 B) ラット自己免疫性心筋炎における免疫グロブリン融合タンパク治療の検討:  
塙晴雄、相澤義房 (新潟大院医) 他

17:24-17:36 2) 合成グロブリン(SyIVIG)のストラテジー: 古谷昌弘 (セキスイ化学)

17:36-17:48 3) SyIVIG による動物モデルの治療—中間報告: 鈴木和男 (国立感染研)

17:48-18:00 A) MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に対する IVIG 単独療法の免疫病態への影響  
武曾恵理 (北野病院)

B) IVIG 治療の実際: 古宮俊幸 (北野病院)

C) 大量ガンマグロブリン療法を行った ANCA 関連腎炎 3 症例の検討:

長澤康行、岩谷博次、伊藤孝仁、今井圓裕 (大阪大学大学院病態情報内科学腎臓研究室)

D) IVIG 治療の新しい評価法—1

MPO-ANCA 関連腎炎患者の好中球の QDot 標識抗 MPO 抗体による好中球 MPO の検出  
猪原登志子 (京都大・院医)

E) IVIG 治療の新しい評価法—2 IVIG 治療前後の患者血漿中のサイトカイン動態:

特に IL-12p70 の変動に関する知見について: