

プログラム

1. 研究班の活動概要 10 : 00 ~ 10 : 20
主任研究者 尾崎 承一
2. 研究報告
- I. 病理・基礎研究分科会 10 : 20 ~ 11 : 30
座長：能勢真人・鈴木和男
- 1) 分科会報告「血管炎の発症、進展に係わるゲノム・遺伝子・タンパク質」
..... 10 : 20 ~ 10 : 30
愛媛大学医学部病因・病態学講座ゲノム病理学分野
能勢 真人
- 2) 「組換え近交系マウスを用いた血管炎関連自己抗体の検索」 10 : 30 ~ 10 : 40
愛媛大学医学部病因・病態学講座ゲノム病理学分野
能勢 真人
- 3) 「血管炎惹起性ラット T 細胞の樹立と ANCA 関連血管炎末梢血のトランスクリプトーム解析」
..... 10 : 40 ~ 10 : 50
北海道大学医学部保健学科検査技術科学専攻病理形態機能学分野
石津 明洋
- 4) 「プロテオミクス/ペプチドミクスによる血管炎関連蛋白の検索」 10 : 50 ~ 11 : 00
聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
加藤 智啓
- 5) 「マウス虚血下肢への FGF-2 遺伝子治療における VEGF-C/FLT-4 連関ならびに PDGF-BB/PDGFR- β 連関のパラクライン的相互作用の重要性」 ... 11 : 00 ~ 11 : 10
九州大学大学院医学研究院病理病態学
居石 克夫
- 6) 「CAWS 投与実験系における活性化好中球が発現する CD69 の血管炎への関与の解析」
..... 11 : 10 ~ 11 : 20
国立感染症研究所生物活性物質部第三室
鈴木 和男
- 7) 「日本人顕微鏡的多発血管炎における *KIR*, *LILR* 遺伝子多型の関連解析」
..... 11 : 20 ~ 11 : 30
東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類遺伝学
土屋 尚之

昼食 11 : 30 ~ 12 : 45

- 厚生労働省からの基調講演..... 12 : 45～12 : 50
 厚生労働省健康局疾病対策課
 牧野 友彦

II.大型血管炎の臨床研究分科会..... 12 : 50～13 : 40
 座長：重松 宏

- 8) 分科会報告「虚血肢に対する血管新生療法の現状」 12 : 50～13 : 00
 東京医科大学外科学第二講座
 重松 宏
- 9) 「高安動脈炎による広範型胸部大動脈瘤に対するハイブリッド手術」
 「虚血肢の治療を目的としたbFGF タンパクのピンポイントデリバリー法」
 13 : 00～13 : 10
 東京医科大学外科学第二講座
 重松 宏
- 10) 「血管内皮前駆細胞移植療法の臨床応用効果についての検討」 13 : 10～13 : 20
 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学
 浅原 孝之
- 11) 「重症難治性虚血肢に対する血管新生療法—自己骨髄細胞移植及び DDS 徐放化
 蛋白を中心とした総合的治療戦略—」 13 : 20～13 : 30
 日本医科大学第1内科
 高野 照夫
- 12) 「末梢性血管疾患及び難治性潰瘍治療に対する分子治療法の検討」 13 : 30～13 : 40
 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学
 森下 竜一

休憩 15分

III. 中・小型血管炎の臨床研究分科会 13 : 55～16 : 00
 座長：中林公正、吉田雅治

- 13) 分科会報告..... 13 : 55～14 : 30
- 13-1 「MPO-ANCA 関連血管炎に対する標準的治療プロトコールの有用性を明らかに
 する前向き臨床試験」 杏林大学医学部第1内科学
 中林 公正
- 13-2 「ANCA 関連血管炎における BVAS の活用と問題点」 東京女子医科大学第4内科
 湯村 和子
- 13-3 「VDI に関する報告」 順天堂大学附属順天堂越谷病院内科
 小林 茂人
- 13-4 「トランスクリプトーム解析委員会 報告」 北海道大学医学部保健学科検査技術科学専攻病理形態機能学分野
 石津 明洋
- 13-5 「合併症検討委員会 報告」 神戸大学大学院医学系研究科臨床病態・免疫学
 熊谷 俊一

- 14) 「MPO-ANCA 関連血管炎の臨床病型の推移と再燃の時期について」 14 : 30~14 : 40
杏林大学医学部第1内科学
中林 公正
- 15) 「血管炎症候群患者に対する infliximab の有用性～側頭動脈炎と大動脈炎症候群の症例の経験と文献的考察」 14 : 40~14 : 50
埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科
天野 宏一
- 16) 「血管炎症候群に合併する肥厚性硬膜炎について」 14 : 50~15 : 00
順天堂大学附属順天堂越谷病院内科
小林 茂人
- 17) 「シクロホスファミドがマウス皮膚由来血管内皮細胞株 F-2 におよぼす効果」
..... 15 : 00~15 : 10
和歌山県立医科大学皮膚科学
古川 福実
- 18) 「MPO-ANCA 関連血管炎患者における動脈硬化の検討－PWV を用いたパイロット研究－」
..... 15 : 10~15 : 20
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学
楨野 博史
- 19) 「高安動脈炎における抗内皮細胞抗体（AECA）の対応抗原の検討
～イオントラップ型 LC/MS/MSⁿ による解析～」 15 : 20~15 : 30
藤田保健衛生大学医学部リウマチ感染症内科
吉田 俊治
- 20) 「MPO-ANCA 関連血管炎の標準的治療プロトコールの検証と感染症対策」
..... 15 : 30~15 : 40
東京医科大学八王子医療センター腎臓内科
吉田 雅治
- 21) 「MPO-ANCA 関連血管炎の肺病変に関する研究」
「ANCA 関連血管炎に対する Rituximab の有用性を検討する前向きコホート研究」
..... 15 : 40~15 : 50
聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科
山田 秀裕
- 22) 「難治性血管炎の臨床調査個人票分析経過報告」 15 : 50~16 : 00
順天堂大学医学部衛生学
稲葉 裕

3. 事務連絡 16 : 00~16 : 05

4. 懇親会

病理・基礎研究分科会報告

「血管炎の発症、進展に係わるゲノム・遺伝子・タンパク質」

能勢真人 (分科会長、愛媛大・ゲノム病理)、
石津明洋 (北大大学院医学研究科・分子病理、同医学部保健学科・病理形態機能)
加藤智啓 (聖マリアンナ医大・難病治研・生体機能・プロテオーム制御)
居石克夫 (九大大学院医学研究部・病理病態)、
鈴木和男 (国立感染研・生物活性物質)
土屋尚之 (東大大学院医学系研究科・人類遺伝)
高橋□ 啓 (東邦大・大橋病院・病理)
吉木□ 敬 (株ジェネティックラボ)

当分科会は、活動方針であるところの、1) 血管炎モデル動物の解析とヒト血管炎への提言、2) 血管炎におけるゲノミクス、プロテオミクス研究、3) 血管炎原因遺伝子の同定と応用、に沿って、以下の活動計画 (2005-2007) を立案した。

1. モデル動物による血管炎の病理発生の解析
2. 血管炎の発現遺伝子の網羅的解析
3. 血管炎感受性遺伝子の解析
4. 新たな自己抗体、自己抗原の探索
5. 候補遺伝子のタンパク質合成
6. 臨床研究への展開

これらの中で、今年度遂行した成果の概要を以下にまとめる。詳細については、各分担研究者、研究協力者より報告する。

1. モデル動物による血管炎の病理発生の解析：

1) 血管炎惹起性 T 細胞の樹立と解析 (石津、吉木、他)

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (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) に wild-type 血管内皮細胞を免疫することにより血管炎の発症が促進される。この免疫ラットのリンパ節細胞を *in vitro* で wild-type 血管内皮細胞を用いて繰り返し刺激することにより、自律性増殖を示す CD4 陽性 T 細胞集団を得た。コロニー・ピッキング法により T 細胞のクローニングを試み、現在まで TCR V β の使用頻度に偏奇を示す T 細胞亜集団 PC4 を樹立した。この PC4 の wild-type ラットへの静注により肺に肉芽腫性の血管病変を認めた。以上より、この T 細胞は正常血管内皮細胞と接触し、血管炎を惹起したと考えられ、今後その標的分子を解析する。

2) CAWS 投与実験系での活性化好中球が発現する CD69 の血管炎への関与 (鈴木、高橋、居石、他)

MPO-ANCA 関連血管炎においては、MPO-ANCA および CRP、白血球の上昇に加え、活性化好中球が深くかかわっていることが明らかにされている。また、血小板数が増加することが多く、血栓形成を契機に血管傷害が誘導されと考えられはじめている。このため、恒常的に CD69 分子を表面に発現している血小板の関与を検討した。また、CD69 分子は、好中球の活性化とともに細胞表面へ局在移行することから、CD69 ノックアウトマウスを使って、病理所見の違いや *in vivo* および *in vitro* での役割を解析した。さらに、好中球の活性化に関与するサイトカインについて、血栓形成、血管傷害、血管炎発症へと進展する過程での CD69 と連動するサイトカインを特定した。また、本血管炎の発症における VEGF-A/受容体関連の病態学的意義を検討するために、VEGFR-1 の変異体である 7ND 遺伝子導入を用いた病理学的検討を開始した。

3) CD72 多型遺伝子導入による血管炎のレスキュー (能勢、他)

MRL マウス血管炎の位置的候補遺伝子として、以前明らかにした CD72 の領域を含む BAC (bacterial artificial chromosome) contig (B6 型 CD72 と、その一部を相同組換えにて MRL 型 CD72 に改変したもの) をそれぞれ MRL/lpr マウスに導入し、前者では後者に比して血管炎の発症が抑制できるか否かについて組織病理学的に解析した。その結果、B6 型 CD72 は、血管炎ならびに糸球体腎炎の発症・進展を抑制することが明らかとなった。

4) 機能的血管新生機構の破綻と修復の分子モデル (居石、他)

重症下肢虚血マウスモデルを確立し、本モデルを用いて 1) 内因性血管新生関連因子の mRNA ならびに蛋白の時間的、空間的発現を、また 2) FGF-2 遺伝子搭載 SeV ベクターによる機能的、統合的血管新生機構を検討した。特に、虚血組織への FGF-2 遺伝子導入は VEGF-A/-C、PDGF-A/-B、さらに HGF などの血管新生関連因子の発現を促進することが明らかとなった。これら因子の相互反応は血管内皮細胞・非内皮間葉系細胞 (周皮細胞、平滑筋細胞や線維芽細胞) の空間的連携を基盤としており、虚血組織における機能的血管・リンパ管新生に重要であることが示唆された。

2. 血管炎の発現遺伝子の網羅的解析:

ANCA 関連血管炎末梢血のトランスクリプトミクス (石津、吉木、他)

ANCA 関連血管炎 16 症例について、治療前および治療開始後 1 週間での末梢血における遺伝子発現を、DNA チップを用いて網羅的に解析した。これまでの結果では、87 遺伝子が治療前後で優位 (1.5 倍以上) に変動しており、その内 62 遺伝子については、治療により明らかな発現の減少を確認した。今後、これらの遺伝子について Low Density Array 法を用いた定量的解析 (Real-time PCR) により ANCA 関連遺伝子の絞込みを行なう。

3. 血管炎感受性遺伝子の解析：

日本人顕微鏡的多発血管炎と *KIR* 遺伝子多型との関連 (土屋)

日本人の顕微鏡的多発血管炎(MPA)における *KIR* と、そのリガンドである HLA-class I の組み合わせについて検討した結果、遺伝子座の有無による多型の検討(locus typing)により、MPA においては、活性化型の *KIR2DS3* 陽性率の有意な減少($P=0.038$)と、リガンド・受容体の抑制的な組み合わせである HLA-B Bw4(+)-*KIR3DL1*(+)/*3DS1*(-)の有意な増加が観察された($P=0.014$)。さらに、*KIR3DL1*/*3DS1*/HLA-B および *KIR2DL1*/HLA-C の組み合わせを検討したところ、抑制シグナルが強くなるにつれて MPA 発症リスクが上昇する傾向が観察された。また、*KIR3DL1* locus の allele typing においても、同様の傾向が観察された。

4. 新たな自己抗体、自己抗原の探索：

1) 抗内皮細胞抗体対応抗原と血管炎関連血清ペプチドの検索 (加藤)

血管炎における抗内皮細胞抗体対応抗原の検索に関しては、これまで行っていなかった等電点 6-9 の範囲の蛋白質群についても、MPA および大動脈炎症候群などを中心に、HUVEC と HeLa 細胞抽出蛋白を用いた、2次元電気泳動 - ウェスタンブロッティングにより、網羅的ディファレンシャルディスプレイ検索を行い、HUVEC で優位に認識される複数個の抗原を検出した。また、血管炎関連血清ペプチドの質量分析計を用いた網羅的検索においては、他のリウマチ性疾患で疾患特異的と思われるペプチドを検出同定するなど、その方法を確立した。同手法を MPA などの血管炎患者血清に応用し、予備的検討を加えた。

2) 組換え近交系マウスを用いた血管炎関連自己抗体の検索 (能勢、他)

膠原病好発系 MRL/lpr と嫌発系 C3H/lpr マウスの交配による組換え近交系(RI系)MXH/lpr を 11 系統作成し、血管炎病態と既知の自己抗体との関連を経時的に観察したが、現在まで明かな相関は認められなかった。さらに詳細な検討をするため、1) 新たに 4 系統を樹立し、2) これらの RI 系からさらに多様な遺伝的背景を持つマウスを作成する目的で、RI 系間の雑種第一世代 (F1) を作成した。またこれらの RI マウスを用いて、3) プロテオームを基盤とした網羅的な血管炎関連新規自己抗体の検索するため、無細胞蛋白質合成系と AlphaScreen 法を用いた血管炎関連新規自己抗体の検索を開始した。

5. 候補遺伝子のタンパク質合成：

糸球体腎炎の位置的候補遺伝子オステオポンチンの多型タンパク質の機能解析 (能勢、他)

コムギ胚芽リボソームを用いた無細胞系自動タンパク質合成装置 Protomist DT により、既に明らかにした糸球体腎炎感受性遺伝子座 *Agam3* の候補遺伝子 *Opn* について、腎炎好発系の MRL/lpr マウスと腎炎嫌発系の C3H/lpr マウスのそれぞれの *Opn* 多型タンパク質を合成し、これらの *in vitro* における機能的差異を明らかにした。今後、このシステムを利用した血管炎候補遺伝子の多型タンパク質合成とその機能解析が可能になると期待される。

抄録 2

組換え近交系マウスを用いた血管炎関連自己抗体の検索

小森浩章¹、寺田美穂¹、清水友美¹、森土朗²、澤崎達也³、遠藤弥重太³、
能勢真人¹

- 1) 愛媛大学医学部 病因・病態学講座
- 2) 東北大学大学院歯学研究科 顎顔面口腔外科学講座
- 3) 愛媛大学 無細胞生命科学工学研究センター

昨年度までに我々は MRL/lpr と C3H/lpr 交配による膠原病関連組換え近交系(RI系)MXH/lpr マウスを作成し、血管炎病態と自己抗体の関連を経時的に観察した。その結果 MXH/lpr では、現在までヒトで血管炎との関連が言われている自己抗体と血管炎との間に経時的にも関連が認められなかった。一方、QTL 解析によって、suggestive level ながら、血管炎病態と MPO-ANCA 値の感受性遺伝子座をマップした。本年度は血管炎病態と自己抗体との関連をさらに検討するため、以下のような解析を行っている。

1. 新しい MXH/lpr ラインの樹立

これまで MXH/lpr 11 系統を樹立し、これらについて病理学的、免疫学的形質を観察し、系統間分布表(SDP 表)を作成している。本年新たに系統 24,26,37,53 を樹立した。現在形質を解析中である。

2. Recombinant inbred intercross (RIX)の作成

RI 系からさらに多様な遺伝的背景を持つマウスを作成する目的で、RI 系間の雑種第一世代 (F1) を、血管炎好発系(MXH10)、中間群(MXH06)、嫌発系(MXH43)と両親系統群との間で作成した。

3. プロテオームを基盤とした網羅的な血管炎関連新規自己抗体の検索

無細胞蛋白質合成系と AlphaScreen 法を用いた血管炎関連新規自己抗体の検索を開始した。この方法は、cDNA から直接合成された蛋白質と血清中の抗体との反応性を高感度で観察可能なシステムで、自動化が容易なことから、自己抗体を網羅的に、high-throughput に検索可能である。

抄録 3

血管炎惹起性ラット T 細胞の樹立と ANCA 関連血管炎末梢血のトランスクリプトーム解析

石津明洋^{1,2}、西平 順³、佐々木直美¹、外丸詩野¹、笠原正典¹、吉木 敬^{1,3}

¹北海道大学大学院医学研究科病態解析学講座分子病理学分野

²北海道大学医学部保健学科検査技術科学専攻病理形態機能学分野

³株式会社ジェネティックラボ

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (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) は結節性多発動脈炎類似の血管炎を発症する。本ラットでは、骨髄由来の T 前駆細胞が導入遺伝子を発現する胸腺で分化成熟する過程において何らかのセレクション異常が生じ、自己免疫性血管炎が発症すると考えられる。我々は、発症前の env-pX ラットに wild-type 血管内皮細胞を免疫することにより血管炎の発症が促進されることを見出した。次に、免疫ラットのリンパ節細胞を in vitro で wild-type 血管内皮細胞を用いて繰り返し刺激することにより、自律性増殖を示す CD4 陽性 T 細胞集団を得た。コロニー・ピッキング法により T 細胞のクローニングを試みており、現在までのところ、TCR V β の使用頻度に偏奇を示す T 細胞亜集団 PC4 を樹立した。この PC4 を wild-type ラットに静注し 5 日目に解剖したところ、肺に肉芽腫性の血管病変を認めた。以上より、樹立した T 細胞は正常血管内皮細胞と接触し、血管炎を惹起したと考えられた。引き続き血管炎惹起性 T 細胞クローンの単離を行い、その分子解析を行うことにより、血管炎の標的分子を明らかにすることができると考えられる。

ANCA 関連血管炎 16 症例について、治療前および治療開始後 1 週間での末梢血における遺伝子発現を、アフィメトリクス社 DNA チップを用いて網羅的に解析した結果について報告する。これまでの結果から、87 遺伝子が治療前後で有意 (1.5 倍以上) に変動しており、その内 62 遺伝子については、治療により明らかな発現の減少を確認している。今後、これらの遺伝子について Low Density Array 法を用いた定量的解析 (Real-time PCR) から、ANCA 関連遺伝子の絞込みを行う計画である。

抄録 4

プロテオミクス/ペプチドミクスによる血管炎関連蛋白の検索

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 生体機能・プロテオーム制御部門
加藤智啓

本年7月の本研究班班会議において、今後3ヵ年の研究計画を1) プロテオミクスによる血管炎関連自己抗原の検索、既に同定した。2) 抗ペロキシレドキシン II 自己抗体の各種血管炎における感度と特異度を決定し臨床検査としての有用性を探る。3) 質量分析計による血清ペプチドのディファレンシャルディスプレイ (ペプチドミクス) を用いて血管炎の診断・治療の標的として有用な血清中ペプチドの網羅的検索を行う。4) 同定した自己抗体あるいはペプチドの血管内皮細胞に対する影響をプロテーム解析により検討する、の如く設定し、これを進めている。そのうち、血管炎関連自己抗原としてはこれまで行っていなかった、等電点 6-9 の蛋白質群についても HUVEC と Hela 細胞抽出蛋白を用いた網羅的ディファレンシャルディスプレイ検索を行い、HUVEC のみで認識される複数個の抗原候補を検出した。また、血清ペプチドの検索においては、既に他のリウマチ性疾患で疾患特異的と思われるペプチドを検出同定しているが、同様の方法を血管炎患者血清にも応用した。両者とも現在解析中であり、班会議では、その進捗について報告する。

マウス虚血下肢への FGF-2 遺伝子治療における VEGF-C/FLT-4 連関ならびに PDGF-BB/PDGFR-β連関のパラクライン的相互作用の重要性

九州大学大学院医学研究院 病理病態学
鬼丸 満穂、米満 吉和、居石 克夫

【背景・目的】 VEGF-C の受容体である FLT-4 はリンパ管新生のみならず血管新生における血管成熟性への関与が示唆されている。一方、PDGF-BB/PDGFR-β連関も血管の成熟性に必須のシステムとして知られる。我々はこれまでに、マウス虚血下肢に対する FGF-2 遺伝子治療の有効性、特に成熟血管形成促進効果に内因性の両システムが重要な役割を担うことを示唆した。本研究では、FGF-2 遺伝子治療における両システムの関連性の詳細を検討した。【結果】マウス虚血下肢（マウス下肢救済モデル）への FGF-2 遺伝子導入により誘導される血流回復効果は FLT-4 活性中和抗体（AFL-4）の全身投与により完全に抑制された。この時、下肢大腿筋肉内には電顕的にペリサイトの脱落を伴う異常に拡張した毛細血管の出現（PDGF-B ノックアウトマウスの表現型と類似）を認め、FLT-4 による PDGF-B 遺伝子発現制御機構の存在が考えられた。real time RT-PCR 法において、マウス虚血下肢への FGF-2 遺伝子導入により、内因性 VEGF-C、PDGF-B 遺伝子発現は導入七日目に有意な亢進を認めた。この PDGF-B 遺伝子発現亢進は AFL-4 全身投与で、VEGF-C 遺伝子発現亢進は抗 PDGF-BB 活性中和抗体全身投与で有意に抑制された。また AFL-4 や抗 PDGF-BB 活性中和抗体の全身投与はマウス下肢脱落モデルにおける FGF-2 の救済効果をほぼ消失させた。In vitro では、FGF-2 は血管平滑筋細胞（SMCs）における VEGF-C 遺伝子発現を一過性に誘導し、分泌型 VEGF-C（主に FLT-4 のリガンド）蛋白発現を亢進したが、血管内皮細胞（ECs）における PDGF-BB 発現制御には関与しなかった。一方、VEGF-E（Flk-1/KDR のリガンド）、VEGF-C156S（FLT-4 のリガンド）は、それぞれ ECs における PDGF-B 遺伝子発現を亢進し、これら両刺激で相乗効果的に遺伝子発現が亢進された。また、PDGF-BB は SMCs における VEGF-C の遺伝子発現や分泌型 VEGF-C 蛋白発現を亢進し、この発現亢進は、抗 PDGFR-β活性中和抗体や MEK 阻害剤処置で有意に抑制された。【結語】 FGF-2 遺伝子治療の有効性に内因性 VEGF-C/FLT-4 連関ならびに PDGF-BB/PDGFR-β連関が重要な役割を担うが、その機序として血管内皮細胞と間葉系細胞における両システム間のパラクライン的相互作用を介した VEGF-C ならびに PDGF-BB 発現亢進機構の関与が示唆された。

CAWS 投与実験系における活性化好中球が発現する CD69 の
血管炎への関与の解析

鈴木和男（国立感染研・生物活性物質）、
高橋 啓（研究協力者、東邦大・大橋病院・病理）

MPO-ANCA 関連血管炎においては、MPO-ANCA および CRP、白血球の上昇に加え、活性化好中球が深くかかわっていることが明らかにされている。一方、これらの関与に加え、血小板数が増加することが多く、血栓形成を契機に血管傷害が誘導されと考えられはじめている。このため、これらの反応に加え、Constitutive に CD69 分子を表面に発現している血小板の関与を検討する。また、CD69 分子は、好中球の活性化とともに細胞表面へ局在移行することから、CD69 ノックアウトマウスを使って、病理所見の違いや *in vivo* および *in vitro* での役割をしらべる。さらに、好中球の活性化に関与するサイトカインについて、18種類のサイトカインレベルの同時測定と比較から、血栓形成、血管傷害、血管炎発症へと進展する過程での CD69 と連動するサイトカインを特定する。

尚、本研究は、発表者のほか、大野尚仁東京薬大教授、中山俊憲千葉大・院医教授の教室との共同研究によって行う。

日本人顕微鏡的多発血管炎における *KIR*, *LILR* 遺伝子多型の関連解析

土屋尚之¹, 宮下リサ¹, 豆ヶ野剛一¹, 屋部登志雄², 小林茂人³, 橋本博史³, 尾崎承一⁴, 徳永勝士¹

¹ 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学、² 東京都赤十字血液センター、³ 順天堂大学膠原病内科、⁴ 聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科

Killer cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*)はNK細胞や一部のT細胞に発現する活性化型および抑制型受容体で、HLA-class I分子を認識する。*KIR*は19q13.4に位置するleukocyte receptor complex (*LRC*)にクラスターを形成して存在する15遺伝子座にコードされ、遺伝子座の有無および個々の遺伝子座における塩基配列レベルの多型が存在し、自己免疫疾患やウイルス感染症との関連が報告されている。本研究では日本人顕微鏡的多発血管炎(MPA)における*KIR*とHLA-class Iの組み合わせについて検討した。

遺伝子座の有無による多型の検討(locus typing)により、MPAにおいて、活性化型の*KIR2DS3*陽性率の有意な減少($P=0.038$)と、リガンド・受容体の抑制的な組み合わせであるHLA-B Bw4(+)-*KIR3DL1*(+)/*3DS1*(-)の有意な増加が観察された($P=0.014$)。さらに、*KIR3DL1*/*3DS1*/HLA-B および *KIR2DL1*/HLA-C の組み合わせを検討したところ、抑制シグナルが強くなるにつれてMPA発症リスクが上昇する傾向が観察された。

Leukocyte immunoglobulin-like receptor (*LILR*)は、*KIR*に隣接して*LRC*内にクラスターを形成する13遺伝子にコードされ、樹状細胞をはじめとする白血球系の細胞に広汎に発現する活性化型・抑制型・分泌型分子であり、近年、免疫制御上の役割が注目される。われわれはこれまでに、一部の*LILR*ファミリー遺伝子について系統的多型解析を行い、これらが顕著に多型的であることを示すとともに、リウマチ性疾患との関連を報告した。今回、MPAとの関連を検討したので、あわせて報告する。

抄録 8

分科会報告

「虚血肢に対する血管新生療法の現状」

東京医科大学外科学第二講座

重松 宏

(抄録)

大型血管炎の臨床分科会では、1. 側頭動脈炎の視力障害例の治療対象特定疾患への編成、2. HGF 遺伝子治療の治験推進、3. 難治性血管炎に対する再生医療の検討、4. 高安動脈炎に関する厚生省基準及び ACR 分類基準の本邦患者における感度と特異度の検討、などが主な研究計画となっている。側頭動脈炎については、「特定疾患の疫学に関する研究班」による全国疫学調査を平成18年度に行うべく申請中である。血管炎による重症虚血肢に対する血管新生療法の研究は積極的に行われており、血管内皮前駆細胞や自己骨髄細胞移植などについて分担研究者からの報告が行われる。臨床治験として注目されている HGF プラスミドを用いた検討では、Buerger 病に対してこれまで5例が導入されているが、症例数の集積に難渋している。閉塞性動脈硬化症に対する治験では現在までの所、高い有効性が示されており、中間解析により有効性の判定が可能となることが期待されている。虚血肢に対する診断・治療ガイドラインとなっている TASC の改訂が検討されており、その中では血管新生療法として、VEGF や FGF, angiopoietin, 自己骨髄単核球などが紹介されているが、有望な初期有効性を示してはいるものの、第 I 相、II 相段階の成績のため遺伝子治療が適切かどうかの証明は今後の二重盲検試験の結果による、としている。今後の本分科会での検討と症例集積が重要と考えられる。

高安動脈炎による広範型胸部大動脈瘤に対するハイブリッド手術

東京医科大学外科学第2講座

小櫃由樹生, 重松 宏, 川口 聡, 小泉信達, 槇村 進, 小出謙爾

症例は68才, 女性. 高安動脈炎による上行から胸部下行大動脈に至る広範型胸部大動脈瘤にて紹介された. 選択的脳分離体外循環下に elephant trunk 併用全弓部置換術を施行し, 胸部下行瘤に対して3週間後に elephant trunk を中枢側 landing zone とした2期的ステントグラフト内挿術を行った. 術後経過は良好で, 広範型胸部大動脈瘤に対するハイブリッド治療は低侵襲で有効な方法であった.

「虚血肢の治療を目的とした bFGF タンパクのピンポイントデリバリー法」

うらべ ごう

浦部 豪 (1)、保坂晃弘(1)、小山博之(2)、宮田哲郎(1)、重松 宏(3)

(1)東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科学

(2)東京大学医学部附属病院ティッシュエンジニアリング部血管再生医療講座

(3)東京医科大学外科学第二講座

現在東京大学病院において、Buerger 病または閉塞性動脈硬化症の患者で Fontaine III 度または IV 度の症状を呈する重症虚血症例に対して、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) タンパクを含浸させた酸性ゼラチンハイドロゲル・マイクロスフィア (AGHM) を動注し、血管新生による虚血症状の改善を目的とした臨床試験を施行中である。本治療法のコンセプトと臨床試験の途中経過について報告する。

血管内皮前駆細胞を用いた重症虚血下肢に対する血管再生治療

川本篤彦(2)、浅原孝之(1,2)

(1) 東海大学医学部再生医療科学

(2) 神戸先端医療センター血管再生研究グループ／理化学研究所発生再生科学総合
研究センター幹細胞医療応用研究チーム

重症虚血下肢に対する血管再生治療がおこなわれるようになったが、血管再生を反映する客観的指標の改善についてはその評価方法も未確立であるのが現状である。

我々の施設では、2003年11月よりバージャー病を含めた慢性重症虚血下肢に対する自家末梢血血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療を開始している。試験デザインは、単盲検下での用量漸増試験である。対象は、Fontaine分類Ⅲ度以上かつRutherford分類Ⅱ度Ⅳ群以上を示し、血管形成術・バイパス手術の適応がない患者である。フィラグラスチム(10 μ g/kg/day)の5日間投与後、アフエレーシスを実施し末梢血幹細胞(単核球)を採取、CD34陽性細胞を分離し、腰椎麻酔下に下腿40箇所(腓腹筋30箇所、趾間部4箇所、足底部内側筋6箇所)に筋肉内移植する。

現在14例の患者(閉塞性動脈硬化症4例、バージャー病10例)に試験治療を実施した。試験治療期間中、重篤な有害事象の発生はなく安全に実施できている。試験治療により自覚症状や潰瘍の改善は全例において認められている。

我々の施設では主要評価項目としてAnkle Brachial Pressure Index (ABPI) / Toe Brachial Pressure Index (TBPI)、疼痛スコア、最大歩行距離の改善度をスコア化した指標とするほか、皮膚灌流圧(skin perfusion pressure, SPP)測定(レーザードップPV2000)、皮膚組織酸素分圧測定、サーモグラフィ、レーザードプラ血流測定、下肢血管造影を有効性評価指標として実施している。

今回は、現在得られているこれらの有効性評価指標の成績を示し、重症虚血下肢の評価における問題点、血管再生治療の効果のメカニズムについて検討する。

重症難治性虚血肢に対する血管新生療法

—自己骨髄細胞移植及び DDS 徐放化蛋白を中心とした総合的治療戦略—

¹⁾ 日本医科大学第 1 内科, ²⁾ 形成外科, ³⁾ 日本獣医畜産大学獣医外科,

⁴⁾ 京都大学再生医科学研究所

○ 宮本正章¹⁾, 安武正弘¹⁾, 水野博司²⁾, 高野仁司¹⁾, 高木 元¹⁾, 加藤浩司¹⁾, 太良修平¹⁾, 多川政弘³⁾, 工藤圭介³⁾, 田畑泰彦⁴⁾, 高野照夫¹⁾

我々の重症虚血肢例は 91% (29/32 例) が他療法無効な Fontaine IV 度症例で, 59.4% に DM を合併しており, その完治には血流改善のみならず, 潰瘍・壊疽の感染制御, 創傷治癒の 3 要因を総合的に治療することが重要と考えている.

① 自己骨髄細胞移植による血管新生治療: 他療法無効な難治性慢性動脈閉塞症である Buerger 病, 閉塞性動脈硬化症 (ASO), 糖尿病性潰瘍 壊疽及び全身性強皮症 (PSS) に対して現在まで 32 例実施した (高度先進医療承認). ^{99m}Tc-TF perfusion scintigraphy により平均 17% の血流増加を認めた (Cell Transplant 13, 429-437, 2004). 自覚症状・他覚所見の著明な改善を示し, 13 例の壊疽症例中 10 例を救肢し得たが, 3 例が 24 カ月以内に患肢切断を余儀なくされた. ② DDS 徐放化 b-FGF (塩基性繊維芽細胞増殖因子) ハイドロゲル血管新生療法: 低コストで侵襲が極めて少なく, biodegradable な担体により増殖因子を徐放化し, 虚血肢への骨格筋内注入のみで治療可能な次世代型血管新生療法の臨床応用を開始した. まず獣医学臨床分野において 15 歳猫の難治性肩甲部潰瘍が治癒し, 11 ヶ月ボルゾイ犬の胸部難治性潰瘍も治癒し, その他の難治性潰瘍治療でも良好な結果を得た. 現在臨床例も 4 例施行中である. ③ 「医療用ウジによる重症足壊疽治療」: 医療用ウジは 2004 年 1 月 FDA で生体材料として承認されたが, 当院倫理委員会承認のもと, 「医療用ウジによる難治性潰瘍・壊疽治療」を開始した. 前大学病院で患肢切断と診断された 53 歳, 多剤耐性緑膿菌 (MDRP) 合併糖尿病性足壊疽症例に対して医療用ウジにより biological debridement を行い, 植皮も含めて 28 日間で退院した. この医療の産業化のためバイオベンチャー企業を起業した (Biotherapy Labo Inc.) .

末梢性血管疾患及び難治性潰瘍治療に対する分子治療法の検討

大阪大学臨床遺伝子治療学 森下竜一

大阪大学老年腎臓内科学 青木元邦

2001年より実施していた末梢性血管疾患に対する HGF 遺伝子を用いた遺伝子治療臨床研究の長期成績について現在検討を継続している。遺伝子投与後 2 ヶ月の初期成績については既に報告している。疾患 (ASO vs TAO) や動脈硬化の種々の危険因子を考慮したサブ解析は 2 ヶ月の時点では有意なものは得られなかった。さらに容量依存効果も 2 ヶ月では認められず、1 年後・2 年後の長期におけるこれらサブ解析について現在検討中である。

新たな血管新生療法として ets 遺伝子、PGIS 遺伝子に注目しているが、小動物虚血モデルにおいてこれらの遺伝子導入が血流増加作用を誘導することを確認した。また、PGIS 遺伝子は神経伝達速度を改善し、末梢性神経障害の改善にも有用であることが示唆された。

さらに大血管・局所両面からの虚血肢治療法開発を展開すべく、難治性潰瘍の治療についても検討を加えた。被覆剤として CO₂ 産生ゲルに注目しており、ステロイド投与による創傷遅延モデルにおいてその有用性が確認できた。また無針注射器による局所への HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子導入による血流増加を伴う創傷治癒効果についての検討では、皮弁モデルにおいてその生着を促進し、潰瘍の植皮治療に有用であることが示唆された。

抄録 1 3

MPO-ANCA 関連血管炎に対する標準的治療プロトコルの有用性を明らかにする 前向き臨床試験

中・小型血管炎臨床分科会

分科会長 : 中林公正

班員 : 吉田雅治、吉田俊治、槇野博史、古川福実、小林茂人、湯村和子、
山田秀裕、天野宏一

研究協力者 : 臼井 崇、大曾根康夫、兼岡秀俊、熊谷俊一、小池隆夫、
近藤啓文、鈴木康夫、住田孝之、八田和大、原 まさ子、
広畑俊成、武曾恵理

目的 : 昨年の班会議及び三班の合同会議にて、MPO-ANCA 関連血管炎に対する本邦の標準的治療の protocol が、承認された。かつ上記の先生方の施設に於いて、この治療法に対しての倫理委員会の承認が得られた。これにより、本年度から前向き臨床試験が開始され、有用性を明らかにする分科会が発足した。

対象と方法 : 対象は MPO-ANCA 陽性を示す血管炎の症例である。臨床病型を診断し治療法を決定する。同時に、gene chip 用採血を行い、かつ疾患活動性評価、臨床的重症度分類、障害度分類などを記録する。症例を長期的に観察し、夫々の事項を記録して行く。3 年目に最終的解析を施行し、結論を得るように努める。正確な有用性の立証には非常に困難を伴うことが考えられるので、相対的な有用性を明らかにすることを考慮している。

成績 : 初年度であることから、登録された症例は少なかった。次年度より、MPO-ANCA 陽性症例を総て報告してもらう必要があると考えられた。

結語 : MPO-ANCA 陽性の全症例を報告して戴き、漸次解析し、臨床試験上の方向性を改善して行く必要がある、のではないかと考えられた。

附記 : BVAS について湯村和子班員に、VDI について小林茂人班員に、夫々要旨をこの分科会の報告時に発表して戴く。

ANCA 関連血管炎における BVAS の活用と問題点

東京女子医科大学 第4内科

研究分担者：湯村和子

研究協力者：板橋美津世

ANCA 関連血管炎での前向き治療の検討も始まり、治療効果の評価が待たれるところである。まず、治療開始に当たり、本邦における ANCA 関連血管炎ならびに顕微鏡的血管炎の診断に当たり、臨床像に関する評価の詳細な検討が少ない。ヨーロッパで使われている BVAS に関してはすでに本邦においても紹介はされているが、普及には至っていない。今回、本内科で MPO 関連血管炎と診断しえた症例に関して、BVAS を採用し治療効果の評価などをおこなうのに適切かどうかの検討を行った。10 例の MPO 関連血管炎では、全症例腎病変は12点であった。しかし、厳密に新たな発症が1ヶ月以内という期間の限定がつくと当てはまらない場合もあった。急速進行性腎炎という場合、数ヶ月の経過で腎不全にいたら場合と定義されており、この期間の設定に問題が残る。さらに、全身症状を伴う場合が大半であったが、発熱の 38.5℃以上は該当がなかった。さらに、1ヶ月の体重減少が 1-2kg の記載では該当するかどうかの判断が難しかった。続いて、胸部の項目が該当するケースが多く認められたが、本内科の症例では重篤な喀血・出血症例はなかった。他の神経、皮膚、耳鼻咽喉病変、腹部症状、粘膜・皮膚病変も軽微な症状が多く、胸部の項目の胸膜炎・胸水の項目に該当する症例はあったが、心血管系病変は認められなかった。これらの BVAS に取り上げられていない項目もさまざま認められた。また、高齢での発症の場合も多く、糖尿病などの既往症を有する患者が目立った。

一方、治療後の BVAS での評価を用いた改善度をみるには、肺や腎臓の項目でみると難しい場合があった。発症時の腎機能の悪化は、腎病変の程度と関係しており、治療後の腎機能の改善は十分ではない場合も多かったが、まず全身死に至らない治療を目的にすることが先決であると考えられた。

今後、医療経済上も腎死にも至らない治療を確立するためにも、広く難治性血管炎を早期に診断することの重要性の普及と早期の治療が重要である。