

を得た。

#### C. 研究結果

EC抽出物を膜分画と核分画に分けて採取した場合、PC4のクラスター形成は膜分画の添加に比べて核分画の添加で強く起こった。

MPO-ANCA関連血管炎20症例のうち、寛解した13症例について末梢血における遺伝子発現を検討したところ、Charcot-Leyden crystal protein (CLC)をはじめとする59遺伝子が治療後に有意に発現低下を示し、またADAM28をはじめとする15遺伝子が発現増強を示した。一方、死亡または増悪した5症例については、治療後に有意な発現変化を示す遺伝子は認められなかった。MPO-ANCA関連血管炎の患者と健常者との間で末梢血におけるCLCおよびADAM28の遺伝子発現を検討したところ、CLCには両者に有意差は認めなかったが、ADAM28は治療前の患者群で発現の有意な減少が観察された。

次に、上記検討において有意性の高かった44遺伝子を選定し、Low Density Array (LDA) を作製して、治療予後の判明した新規24症例について解析を行ったところ、LDAはGene chipの結果を良く再現した。さらに、LDAの結果をもとに重回帰分析を行い、治療後の予後を最も正確に予測する組み合わせとして、16個の遺伝子を抽出した。

#### D. 考察

ECの核抽出物をHPLCにより分画し、PC4のクラスター反応を指標として各分画に含まれる蛋白質を同定することにより、PC4の認識抗原、すなわち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。

MPO-ANCA関連血管炎の末梢血トランスクリプトーム解析において、寛解した症例で治療後に発現が低下した遺伝子にはMPO-ANCA関連血管炎の病態増悪に関与する遺伝子が、また治療後に発現が低下した遺伝子には病態抑制に関与す

る遺伝子が含まれている可能性がある。治療前のMPO-ANCA関連血管炎患者では健常者に比べて、末梢血におけるADAM28の発現が低かった。今後、ADAM28の発現低下と病態の関連について、さらに解析を行う必要がある。

治療前と治療開始後早期の末梢血における16個の遺伝子の発現変化を測定することにより、治療後の予後を精度良く推定することができると考えられる。今後は新規症例に対して前向きに予後予測を行い、16個の遺伝子を用いた病態診断法の精度を検証する必要がある。

#### E. 結論

血管炎を発症する env-pX ラットからECに反応するT細胞株を抽出し、その対応抗原が核内成分であることを同定した。

また、MPO-ANCA 関連血管炎患者の末梢血トランスクリプトーム解析を行い、MPO-ANCA 関連血管炎の病態や治療予後に関連する遺伝子群を明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Baba T, Iwasaki S, Maruoka T, Suzuki A, Tomaru U, Ikeda H, Yoshiki T, Kasahara M, Ishizu A. Rat CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> macrophages kill tumor cells through an NKG2D<sup>-</sup> and granzyme/perforin-dependent mechanism. *J Immunol* 180(5): 2999-3006, 2008.

##### 2. 学会発表

- 1) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Nishihira J, Yoshiki T, Ozaki S. Gene expression profiling of peripheral blood before and after treatment of patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: transcriptomics in JMAAV study. *APLAR*, Yokohama, 2008
- 2) Ishizu A, Tomaru U, Iwasaki S, Inuma C, Baba T, Sasaki N,

- Kasahara M, Yoshiki T. The mechanism of vascular injury induced by T-cells autoreactive with endothelial cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都 2008
- 3) Tomaru U, Ishizu A, Miyatake Y, Murata S, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Tanaka K, Kasahara M. Preferential expression of proteasome subunit  $\beta 5t$  in the human thymus. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都 2008
  - 4) Iwasaki S, Baba T, Masuda S, Katsumata K, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. CD8+ monocytes in human peripheral blood. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都 2008
  - 5) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 西平順, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第97回日本病理学会総会, 金沢 2008
  - 6) 石津明洋, 外丸詩野, 岩崎沙理, 飯沼千景, 佐藤亜矢, 佐々木直美, 馬場智久, 笠原正典, 吉木 敬. 自己血管内皮細胞反応性ラットT細胞の解析. 第97回日本病理学会総会, 金沢 2008
  - 7) 外丸詩野, 石津明洋, 宮武由甲子, 高橋里美, 小原次郎, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの発現とT細胞分化に関する検討. 第97回日本病理学会総会, 金沢 2008
  - 8) 外丸詩野, 石津明洋, 宮武由甲子, 鈴木小百合, 風巻 拓, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. ヒト組織におけるプロテアソームサブユニット $\beta 5t$ 発現に関する検討. 第97回日本病理学会総会, 金沢 2008
  - 9) 馬場智久, 岩崎沙理, 外丸詩野, 池田仁, 吉木 敬, 笠原正典, 向田直史, 石津明洋. CD4/CD8 double positive マクロファージの発見と自然免疫系における新しいエフェクター細胞としての展開. 第97回日本病理学会総会, 金沢 2008
  - 10) 岩崎沙理, 馬場智久, 勝俣一晃, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. ヒト末梢血におけるCD8陽性単球の解析. 第97回日本病理学会総会, 金沢 2008
  - 11) 石津明洋, 外丸詩野, 飯沼千景, 岩崎沙理, 佐々木直美, 馬場智久, 笠原正典, 吉木 敬. 自己血管内皮細胞反応性ラットT細胞の解析. 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 札幌 2008
  - 12) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 吉木 敬, 尾崎承一. 顕微鏡的多発血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第54回日本病理学会秋期特別総会, 松山 2008
  - 13) 斎藤永秀, 岩崎沙理, 外丸詩野, 石津明洋. 顕微鏡的多発血管炎の肺病変について. 第13回血管病理研究会, 東京 2008
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願 (2007-253402, 2008-240155)  
発明者: 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 吉木 敬, 尾崎承一  
「自己免疫疾患の被験者に対する治療効果の予測方法」
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

抗内皮細胞抗体の対応抗原に関する研究

加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学 大学院 疾患プロテオーム・分子病態治療学 教授

研究要旨

血管炎症候群で高頻度に認められる抗血管内皮細胞抗体の対応抗原の検出と同定を、プロテオミクスを用いて行った。そのひとつとしてシクロフィリンAを同定した。シクロフィリンAに対する自己抗体は高安動脈炎などの大型血管炎で高頻度に出現することが見出された。診断補助マーカーとしての有用性が期待される。また、血管炎病態形成への関与について詳細に検討することが望まれる。

A. 研究目的

血管炎症候群では、血管内皮細胞に対する自己抗体である抗血管内皮細胞抗体 (anti-endothelial cell antibodies, AECA) が、高頻度に認められる。AECAは疾患活動性と相関し、あるいは病態形成に関与している可能性が報告されている。しかしながら、AECAについて血管内皮細胞のいかなる抗原に対する抗体であるかは未だ確定していない。対応抗原が確定していないために、抗体価測定は抗原特異的に行いえず、cell-ELISAなどによる測定に頼っている。対応抗原により、自己抗体の意義は大きく異なることが予想され、対応抗原が未確定であることが、AECAの研究進展の障害となっている。我々はこれを克服すべく以前よりAECAの対応抗原を、プロテオミクスを用いて網羅的に検出同定を目指してきた。そして、個々の対応抗原を同定した上で、それに対する自己抗体の病態的意義、診断的意義、あるいは治療標的としての意義を明らかにする予定である。今回、AECA対応抗原として、以前に報告したペロキシレドキシ

ン2に加え、シクロフィリンAを同定し、大型血管炎で出現頻度が高いことを見出した。

B. 研究方法

血管内皮細胞としてHUVECを用い、対照細胞としてHela細胞を用いた。それぞれから蛋白質を抽出後、2次元電気泳動法で展開し、膜転写後、血管炎患者血清を用いてウェスタンブロット(WB)を行った。両者の結果を比較し、HUVECでのみ検出される陽性蛋白質スポットをAECA対応抗原の候補をして選別した。次に当該スポットから、ゲル内トリプシン処理した後に、ペプチドを回収し、その質量分析を行った。質量分析結果を蛋白質データベースと照合し、同定を行った。同定された蛋白に関して、順次組換え蛋白質を作成し、ELISA・WBによる個別解析を行った。

なお、本研究は所属大学の生命倫理審査委員会の承認を得て行われている。

C. 研究結果

前年度までの班会議で報告した如く、2次

元電気泳動とディファレンシャル WB によるスクリーニングで、約 150 個の AECA 対応抗原候補蛋白質スポットを検出した。また、現在進めている質量分析による蛋白質同定では 60 個強のスポットを同定している。組換え蛋白質を作成しての 2 次スクリーニングは約 20 個について終えている。その中のひとつシクロフィリン A に対する抗体価を ELISA により測定したところ、陽性症例の割合は血管炎患者全体では 14%であったが、顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者で 27%、高安動脈炎で患者では 86%であった。また、抗シクロフィリン A 自己抗体価は治療により低下あるいは陰性化することが判明した。また、各種内皮細胞を用いた WB では、大動脈血管内皮細胞で高発現していることが判明した。

#### D. 考察

シクロフィリン A は、細胞内に豊富に存在する蛋白であり、これまで酸化ストレスや血管障害などにより内皮細胞、血管平滑筋細胞あるいは単球などから分泌され、細胞内だけでなく、細胞外にも存在することが知られている。炎症性疾患である関節リウマチや全身性エリテマトーデス、また近年血管壁の炎症が関与することが分かってきた動脈硬化症などで、血清中でシクロフィリン A 濃度が上昇するとの報告もある。細胞外シクロフィリン A は、白血球に対する強力なケモアトラクタントであることも報告されている。一方、細胞内シクロフィリン A は免疫抑制剤シクロスポリン A と複合体を形成すると報告されている。それは、T 細胞活性化のシグナル伝達において重要な役割を担うカルシニューリンに結合し、活性化を阻害する。本研究において、シクロフィリン A に対する自己抗体を報告し

たが、抗シクロフィリン A 自己抗体は少なくとも分泌シクロフィリン A に結合することが考えられる。今後、抗シクロフィリン A 自己抗体の各種血管炎、特に高安動脈炎における感度と特異度を、症例数を増やして検討し、診断に寄与するか否かを明らかにする必要がある。また、抗シクロフィリン A 自己抗体が細胞外シクロフィリン A の働きを減弱するのか増強するのかについて検討することで、その病態への関与を明らかにしていく必要がある。

#### E. 結論

AECA の対応抗原の網羅的スクリーニングを行い、候補抗原を同定した。現在までシクロフィリン A に対する自己抗体が大型血管炎で高頻度に出現することを見出している。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Katano M, Okamoto K, Arito M, Kawakami Y, Kurokawa S M, Suematsu N, Shimada S, Nakamura H, Xiang Y, Masuko K, Nishioka K, Yudoh K, Kato T. : Implication of GM-CSF Induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. : Arthritis Res & Ther : in press.
2. Minako M, Yudoh K, Nakamura H, Chiba J, Okamoto K, Suematsu N, Nishioka K, Kato T, Masuko K. : Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4

- in human articular chondrocytes: Role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation. : J Orthop Res. : 27(1):50-57: 2009
3. Duc PA, Yudoh K, Masuko K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H.: Development and characteristics of pannus-like soft tissue in osteoarthritic articular surface in rat osteoarthritis model. : Clin Exp Rheumatol: 26(4): 589-595: 2008
  4. Okunuki Y, Usui Y, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, Nakamura H, Yudoh K, Goto H, Usui M, Nishioka K, Kato T, Takeuchi M.: Proteomic surveillance of retinal autoantigens in endogenous uveitis: implication of esterase D and brain type creatine kinase as novel autoantigens. : Molecular Vision: 14: 1094-1104: 2008
  5. Fujisawa H, Ohtani-Kaneko R, Naiki M, Okada T, Masuko K, Yudoh K, Suematsu N, Okamoto K, Nishioka K, Kato T. : Involvement of Post-Translational Modification of Neuronal Plasticity-Related Proteins in Hyperalgesia Revealed by a Proteomic Analysis. : Proteomics: 8(8): 1706-1719: 2008
2. 学会発表
1. 増子 佳世、村田三奈子、中村洋、遊道和雄、加藤智啓: 関節軟骨細胞におけるプロスタグランジン(PG)E2 の作用: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会: W31-6 (P. 293) : 4/20-23 ; 2008
  2. 川上雄起、松尾光祐(2)、増子佳世、稲葉裕(2)、遊道和雄、齋藤知行(2)、加藤智啓: プロテオミクスを用いた RA 滑膜における新規シトルリン化自己抗原の解析: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会: P2-197 : 4/20-23 ; 2008 : (2 横浜市立大学大学院医学研究科 運動器病態学
  3. 加藤智啓、唐澤里江、遊道和雄、増子佳世、尾崎承一: プロテオミクス・ペプチドミクスを用いた血管炎関連自己抗体および血清ペプチドの探索: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会: S03-4 (P. 157) : 4/20-23 ; 2008
  4. 加藤智啓、増子佳世、中村洋、西岡久壽樹、遊道和雄: プロテオミクスを用いた変形性関節症関連自己抗原およびペプチドの探索: 第52回日本リウマチ学会総会・学術集会: S06-3 (P. 168) : 4/20-23 ; 2008
  5. 岡本一起、増子佳世、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓: ポリアルギニンと融合した核内受容コアクティベーター (MTI-11) の細胞内導入と活性: 第60回日本ビタミン学会: VITAMIN 2008 ; vol.4 ; P39 : 6/13-6/14 : 2008
  6. 藤澤裕樹 2) 金子律子、内木充 2)、岡田智之、増子佳世、遊道和雄、末松直也、岡本一起、西岡久壽樹、加藤智啓: 痛覚過敏モデルラットの脳における蛋白質翻訳後修飾の変化: 日本プロテオーム機構第6回大会 一創薬、バイオマーカー探索に向けて一: 大会要旨集: P15 (S2-6) : 7/29-7/30 : 2008 : 2) : 日本臓器製薬
  7. 飯塚進子、広畑俊成 2)、岡本一起、増子

- 佳世、末松直也、黒川真奈絵、松下礼子  
2)、加藤智啓:プロテオミクスを用いた、  
ループス精神病における抗神経細胞抗  
体の認識エピトープの検出:日本プロテ  
オーム機構第6回大会 一創薬、バイオ  
マーカー探索に向けて一:大会要旨集:  
P21 (S8-3):7/29-7/30:2008:2) 北里  
大学医学部大学院医療系研究科膠原病  
感染内科学
8. 黒川真奈絵、有戸光美、増子佳世、末松  
直也、岡本一起、鈴木登、加藤智啓:ペ  
ーチュット病末梢血単核球における発  
現蛋白の網羅的検討:日本プロテオーム  
機構第6回大会 一創薬、バイオマーカー  
探索に向けて一:大会要旨集:P25  
(P-13):7/29-7/30:2008
  9. 金城永幸、岡本一起、有戸光美、黒川真  
奈絵、増子佳世、末松直也、木村健二郎、  
加藤智啓: IgA 腎症の扁桃を用いた病因  
抗原のプロテオーム探索:日本プロテオ  
ーム機構第6回大会 一創薬、バイオマ  
ーカー探索に向けて一:大会要旨集:P25  
(P-14):7/29-7/30:2008
  10. 片野雅淑、松尾光祐、黒川真奈絵、有戸  
光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、  
加藤智啓:関節リウマチ滑膜細胞のリン  
酸化プロテオーム解析:日本プロテオ  
ーム機構第6回大会 一創薬、バイオマ  
ーカー探索に向けて一:大会要旨集:P27  
(P-24):7/29-7/30:2008
  11. Xiang Yang, Matsui T, Arito M,  
Suematsu N, Yudoh K, Kato T :  
Disease-Specific Serum Peptides In  
Patients With Systemic Sclerosis :  
HUP02008 : 2008
  12. Kurokawa M, Mtsuo K, Nakamura H,  
Masuko K, Okamoto K, Kato T :  
Arthriitis-Inducible Protein,  
Annexin VII: High Phosphorylation In  
Rheumatoid Arthritis : HUP02008 : 2008
  13. 飯塚進子、廣畑俊成、岡本一起、黒川真  
奈絵、増子佳世、末松直也、松下礼子、  
加藤智啓:ループス精神病における抗神  
経細胞抗体の対応抗原のプロテオーム  
解析:第6回北里疾患プロテオーム研究  
会:要旨集 P52 ポスター番号 21 :  
8/31:2008
  14. 金城永幸、岡本一起、黒川真奈絵、有戸  
光美、増子佳世、末松直也、木村健二郎、  
加藤智啓: IgA 腎症の血清と特異的に反  
応する扁桃タンパク質の網羅的解析  
一病因抗原のプロテオーム探索一:第6  
回北里疾患プロテオーム研究会:要旨集  
P53 ポスター番号 22 :8/31:2008
  15. 加藤智啓: Analysis of Brain Proteome  
in SART Rat's, a Model of  
Hyperalgesia : APLAR 2008 :  
Fibromyalgia:Therapeutic  
Strategies : 2008
  16. Kurokawa S M, Arito M, Masuko K,  
Suematsu N, Okamoto K, Suzuki N, Kato  
T : Comprehensive analysis of protein  
expression in peripheral blood  
mononucleocytes from patients with  
Behcet's disease : APLAR 2008 : 2008
  17. 加藤智啓: 膠原病研究におけるプロテオ  
ミクスの有用性:第58回日本アレルギー  
学会秋季学術大会:シンポジウム8「膠  
原病の病態解明と新しい治療戦略」:  
2008
  18. 岡本一起、末松直也、増子佳世、黒川真  
奈絵、有戸光美、遊道和雄、加藤智啓:

細胞内導入配列を付加した核内受容体  
コアクティベーター (MTI-II) の細胞内  
への取り込みと転写促進活性 : 第 31 回  
日本分子生物学会 第 81 回日本生化学  
会大会 合同大会 : 抄録 P209 ポスター  
番号 1P-0390 : 2008

19. 有戸光美、松尾光祐、末松直也、増子佳  
世、黒川真奈絵、岡本一起、加藤智啓 :  
関節リウマチ関連分子アネキシン VII の  
機能解析 : 第 31 回日本分子生物学会 第  
81 回日本生化学会大会 合同大会 : 抄録  
P482 ポスター番号 1P-0390 : 2008
20. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、有戸光美、  
黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、肥塚  
泉、加藤智啓 : 片側内耳破壊後の前庭代  
償におけるラット小脳片葉タンパク質  
のプロテオーム解析 : 第 31 回日本分子  
生物学会 第 81 回日本生化学会大会  
合同大会 : 抄録 P656 ポスター番号  
3P-1124 : 2008

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

1. 高安動脈炎の診断方法およびそれ  
に用いられる診断キット

発明者 : 加藤智啓、唐澤 里江

出願日 : 2008.06.05

出願番号 : 特願 2008-148223

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

本研究は以下の医師・研究者の協力を得て  
行われた。尾崎承一、唐沢里江、黒川真奈絵、  
遊道和雄 (50 音順、敬称略)。

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

血管炎誘発機序の解析

- CAWS および ANCA 誘導の IL-17 産生系および Th<sub>17</sub> 活性化に関する好中  
球とサイトカイン -

分担研究者 鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 教授

研究協力者: 高橋 啓(東邦大学医療センター大橋病院・病理)

協力者: 大野尚仁(東京薬科大学・薬学部)

長尾朋和(千葉大学大学院医学研究院)

星野昭芳(国立国際医療センター)

研究要旨：血管炎発症の初期過程の解析と治療効果を判定する目的で、*C. albicans* 由来の mannose-protein-1,3-β-glucan (CAWS) 誘発の冠状動脈炎モデルを開発してきた。CAWS 投与により、末梢血の好中球の活性化、ANCA 増加や血漿中 complement 3 の減少が認められている。本年度は、本モデルマウスの発症初期に関与する IL-17 系の産生にフォーカスして解析した。本誘導マウスの血漿中に、IL-1β、IL-6、IL-12p70、IL-17、IL-23 の増加が認められた。また、マウス腹腔好中球を *in vitro* で CAWS および MPO 抗体により共刺激することで、IL-6、IL-17 と IL-23 の産生が増加した。しかし、CAWS の代わりに補体によっても、IL-17A と IL-23p19 の発現が上昇した。これらのことから、CAWS 投与により惹起される MPO 抗体(MPO-ANCA)と補体を經由して、好中球からの IL-6、IL-23 と IL-17 の発現・放出が促進されることがわかった。その際、CAWS は、好中球からの IL-6、IL-23 と IL-17 の発現・放出を促進し、自己免疫に関与する Th<sub>17</sub> 系を介して、血管炎発症の初期プロセスに作動すると推定される。

A. 緒言

血管炎の発症の要因には、活性化した好中球が関与していると推定され(Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993, Nephrol., Dial. Transplant. 9:1708-1715, 2004)、好中球抗体 MPO-ANCA の抗原である Myeloperoxidase (MPO)、補体やその他の活性化分子が好中球を活性化することに深く関与している(Exp. Mol. Pathol. 2007)。また、好中球の活性化に伴って好中球表面に表出する MPO に加え CD69 のかわりも重要であることを示し、また、MPO 抗体が直接血管炎誘導初期の血

管内皮細胞傷害度に関わることを示してきた。

本年度は、*C. albicans* 由来 mannose-protein-1,3-β-glucan (CAWS) によって誘導される冠状動脈炎モデル(川崎病様)マウスの IL-1β、IL-6、IL-12p70、IL-17、IL-23 などの炎症性サイトカインを中心に Bio-Plex により網羅的に定量することを目的とした。また、腹腔好中球を *in vitro* で CAWS および MPO 抗体の共刺激によるサイトカイン産生動態をしらべ、炎症惹起機構に Th<sub>17</sub> 系との関連を解析することを目的とした。



## B. 研究方法

### 1. CAWS 投与による冠状動脈炎惹起

*C. albicans* IFO 1385 を完全合成培地の培養上清より水溶性画分 CAWS を精製した。PBS で 20 mg/ml に調整した CAWS をオートクレーブし、マウスに腹腔内投与 (4 mg/マウス) した。27 日後に屠殺し採血し、心臓、腎臓をホルマリン固定し、組織を観察した。

### 2. 活性化好中球のサイトカイン・ケモカイン産生と MPO 分子の細胞表面への発現

8% カゼインを腹腔に投与し、腹腔に侵出した細胞を、CAWS、MPO 抗体にて刺激し活性化させた。培養上清を分離しサイトカイン・ケモカインを測定した。また、細胞表面へ発現する MPO 分子は、QD(655) 標識の MPO 抗体にて検出した。

### 3. サイトカイン・ケモカインの定量

MPO-ANCA による内皮細胞障害に関与するサイトカイン・ケモカインを 15  $\mu$  の血漿を用いて Bio-Plex および ELISA (IL-23) により同時定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症研究所実験動物計画委員会および千葉大学動物委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

## C. 研究結果

### 1. CAWS と MPO-ANCA 投与によるサイトカイン・ケモカインの血中の上昇

CAWS および MPO 抗体投与によるサイトカイン・ケモカインの上昇を検討した。IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-12(p40), IL-17, G-CSF, MIP-1 $\alpha$ , RANTES の上昇が顕著であり、IL-12(p70) は上昇傾向を示した (図 1a)。とりわけ、MPO 抗体投与による IL-6, IL-12(p70), IL-17A, IL-23 の経時的な変動を見ると、IL-6 と IL-23 は、共に 0.5 と 5.25 日に、IL-12(p70) と IL-17 は、共に 3 と 6 日にピークを示した (図 1b)。そして、CAWS 投与による IL-6, IL-17A, IL-23 の経時的な変動では、IL-6 が 0.5 日に、IL-23 が 1 日と 6 日に、IL-17 は 5.5 日の順にピークを示した (図 1c)。

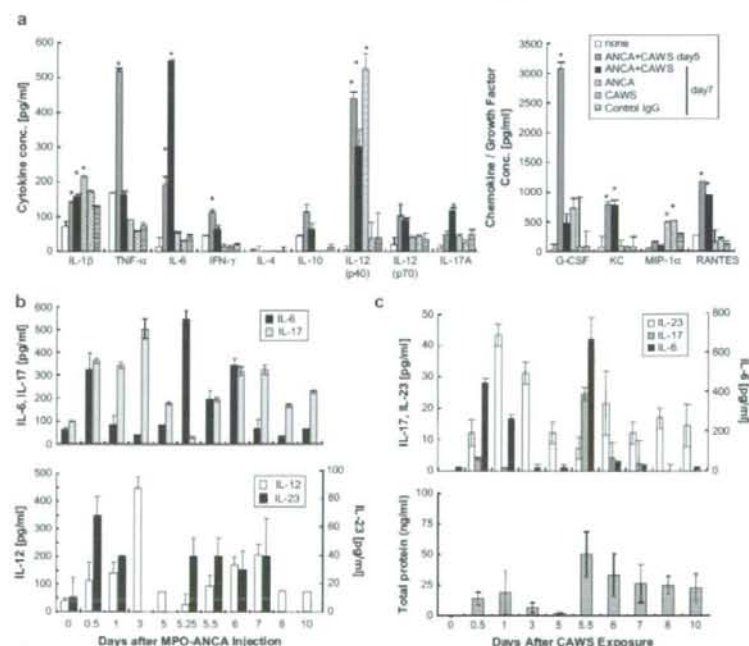


図 1. CAWS と MPO-ANCA 誘導によるサイトカイン・ケモカインの上昇 (a) CAWS と MPO-ANCA 投与による血清中サイトカイン・ケモカインレベル (0, 5, 7 日) (b) IL-6, IL-12p70(p35/p40), (c) IL-17A および IL-23(p19/p40)、mean  $\pm$  SD。

## 2. MPO 抗体投与による脾臓 CD4+細胞のサイトカインの発現

MPO 抗体投与による脾臓 CD4+細胞の IL-6, IL-17A, TGF- $\beta$ 1 の発現を Real time PCR で解析すると、TGF- $\beta$ 1 がすぐに応答し、続いてほぼ同時期に IL-17A の発現が上昇し、3 日後で停止し、その後に IL-6 が発現した (図 2)。

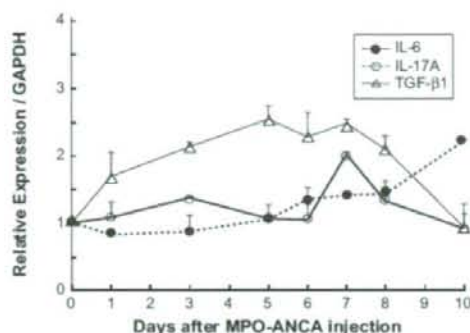
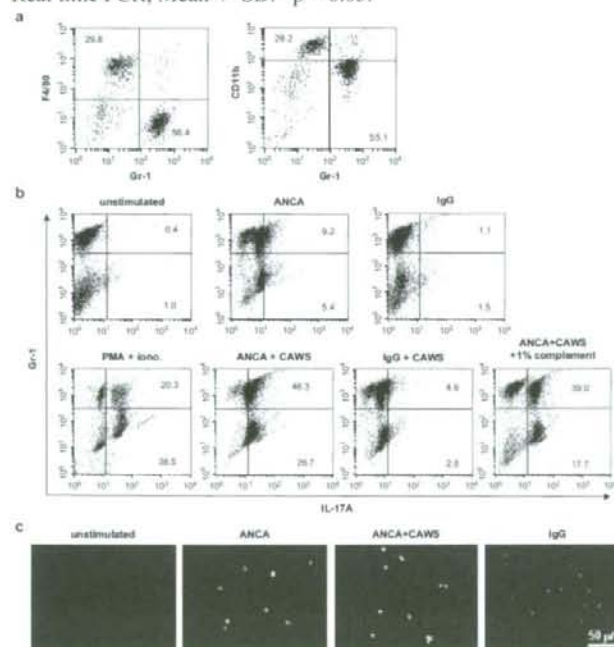


図 2. MPO 抗体(MPO-ANCA)処理マウスの脾臓 CD4+細胞の IL-6, IL-17A, TGF- $\beta$ 1 の発現の経時変化

Real time PCR, Mean $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ .



## 3. *In vitro*での腹腔好中球の MPO 抗体と CAWS による IL-17 の産生

腹腔好中球 (図 3a) を MPO 抗体、CAWS での単独刺激 (1 mg/ml) することで、IL-17 の産生は上昇した。さらに、MPO 抗体、CAWS および補体の共存下では、細胞内 IL-17 の産生はより顕著に上昇した (図 3b)。その細胞の蛍光顕微鏡増からもこれらの発現は確認できた (図 3c)。

図 3. *In vitro* での腹腔好中球の MPO 抗体と CAWS 刺激による IL-17 の産生

(a) 8%カゼインで誘導した腹腔マクロファージ (Gr-1<sup>int</sup>, CD11b<sup>hi</sup>, F4/80<sup>+</sup>) と好中球 (Gr-1<sup>hi</sup>, CD11b<sup>int</sup>, F4/80<sup>-</sup>) の FACS 解析  
 (b) MPO 抗体あるいは control IgG (1 mg/ml) と CAWS (1 mg/ml) で刺激した好中球を、FITC anti-IL-17A と PE anti-Gr-1、PerCP-Cy5.5 anti-F4/80 Abs で染色した。活性化好中球 (F4/80-negative で Gating)  
 (c) 好中球を MPO-ANCA 抗体 (1 mg/ml) で処理し、Brefeldin A と monensin 存在下 6 h での FITC anti-IL-17A mAb と反応させ観察。Bar: 50  $\mu$ m.

#### 4. MPO 抗体(MPO-ANCA)による好中球からのサイトカイン・ケモカイン産生

24時間の培養上清に産生されたサイトカイン・ケモカインを解析した。その結果、1) サイトカインの内、IL-6, IL-17, IL-23の変動を見ると、CAWS投与ではIL-6が、MPO抗体(MPO-ANCA)投与ではIL-17とIL-23が、共刺激ではIL-23に相乗効果があっ

た(図4a)。また、2) ケモカインでは、CAWS投与では、MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, KCが上昇し、MPO抗体投与では、MIP-1 $\alpha$ , RANTES, KC, MCP-1, Eotaxinが上昇した。また、共刺激で相乗効果があったものは、MIP-1 $\alpha$ , KCであり、相乗効果のあったものはMIP-1 $\beta$ であった(図4b)。

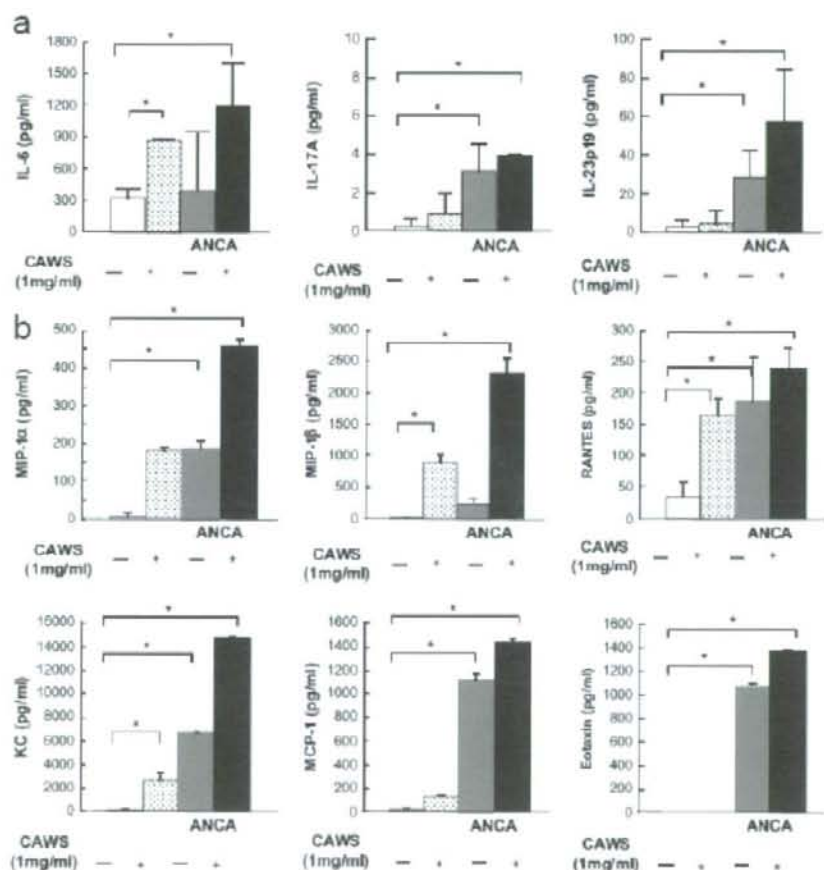


図4. MPO 抗体 (MPO-ANCA) による好中球からのサイトカイン産生  
24時間の培養上清に産生されたサイトカイン・ケモカイン。Means $\pm$ SD. \*:p < 0.01

#### D. 考察

血管炎の発症の要因には、活性化した好中球が関与していると推定され (Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993,

Nephrol., Dial. Transplant. 9:1708-1715, 2004)、好中球抗体 MPO-ANCA の抗原である Myeloperoxidase (MPO)、補体やその他の活性化分子が好中球を活性化すること

に深く関与している(Exp. Mol. Pathol. 2007)。本研究では、CAWS誘導の冠状動脈炎モデル(川崎病様)マウスの炎症性サイトカイン・ケモカインの産生をBio-Plexにより網羅的に定量した。また、腹腔好中球を *in vitro* で CAWS および MPO 抗体での共刺激によるサイトカイン産生動態も解析し、IL-17 産生系の炎症惹起機構の関与について解析した。

#### 1) CAWS と MPO-ANCA 投与によるサイトカイン・ケモカインの血中の上昇

CAWS および MPO 抗体投与によるサイトカイン・ケモカインの上昇を検討し、とりわけ、MPO 抗体投与による IL-6 と IL-23 は、共に 0.5 と 5.25 日に、IL-12(p70) と IL-17 は、共に 3 と 6 日にピークを示した。また、CAWS 投与により、IL-6 が 0.5 日に、IL-23 が 1 日と 6 日に、IL-17 は 5.5 日の順にピークを示した。これらの結果から、IL-6、IL-23 により、IL-17 の産生が誘導されていることが示唆される。

#### 2) MPO 抗体投与による脾臓 CD4+細胞のサイトカインの発現

MPO 抗体投与による脾臓 CD4+細胞は、すぐに応答して TGF- $\beta$ 1 が発現し、続いてほぼ同時期に IL-17A の発現が上昇した。これは、IL-6 の産生とリンクして Th<sub>17</sub> の活性化を誘導しているものと推定される。

#### 3) *In vitro* での腹腔好中球の MPO 抗体と CAWS による IL-17 の産生

腹腔好中球を MPO 抗体、CAWS の単独刺激で、IL-17 の産生が上昇し、MPO 抗体、CAWS および補体の共存下では、両サイトカインのさらに顕著な上昇が見られた。これは、CAWS 誘導の血管炎の初期においては、自己抗体、補体が関与した IL-17 産生系が作動していることを強く示唆している。

#### 4) MPO 抗体(MPO-ANCA)による好中球からのサイトカイン・ケモカイン産生

一方、その培養上清中に産生されたサイトカインは、CAWS 刺激で IL-6 が、MPO 抗体刺激では、IL-17 と IL-23 が上昇し、共刺激では IL-23 に相加効果があり、Th<sub>17</sub> 系への関与が示唆された。また、ケモカインでは、CAWS 刺激で MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、

RANTES、KC が、MPO 抗体刺激で MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、KC、MCP-1、Eotaxin が上昇した。共刺激での相加効果は、MIP-1 $\alpha$ 、KC に、相乗効果 MIP-1 $\beta$  に認められた。これらは、好中球、マクロファージなどに作動するケモカインであった。

以上から、CAWS 投与によって産生される MPO 抗体(MPO-ANCA)が、補体との共同作用により、好中球からの IL-6、IL-23 と IL-17 の発現・放出を促進し、かつ、好中球からの IL-17 産生による自己免疫に関与する Th<sub>17</sub> 系を介して血管炎発症の初期プロセスに作用すると推定された。

### E. 結論

血管炎の発症初期過程の解析と治療効果を判定する目的で、CAWS 誘発の冠状動脈炎モデルを開発してきた。CAWS 投与により、末梢血の好中球の活性化や ANCA 増加や血漿中の complement 3 の減少が分かっている。今回、CAWS 投与初期では、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12p70、IL-17、IL-23 の増加が認められた。一方、腹腔好中球を *in vitro* で CAWS および MPO 抗体により共刺激することで、IL-6、IL-17A と IL-23p19 の発現と産生が増加した。しかし、CAWS の代わりに補体によっても IL-17A と IL-23p19 の発現が上昇した。これらのことから、CAWS 投与により惹起される MPO 抗体(MPO-ANCA)と補体を經由して、好中球からの IL-6、IL-23 と IL-17 の発現・放出が促進されることがわかった。その際、好中球からの IL-6、IL-23 と IL-17 の発現・放出の促進によって、自己免疫に関与する Th<sub>17</sub> 系を介して、血管炎発症の初期プロセスに作用すると推定される。

### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Y. Yasuda, T. Shimoda, K. Uno, N. Tateishi, S. Furuya, K. Yagi, K. Suzuki, S. Fujita. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. *J. Neuroimmunology*. in press.
2. T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D. R.W. Jayne, K. Suzuki, H. Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. *Clin. Exp. Rheumatol.* in press.
3. R. A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Fujimoto, Y. Harabuchi, S. Kobayashi, K. Suzuki, H. Hashimoto. Renal Vasculitis in Japan and UK - are there differences in epidemiology? *Nephrol. Dialysis Transplant.* 23(12):3928-3931, 2008.
4. S. Kobayashi, A. Ito, D. Okuzaki, H. Onda, N. Yabuta, I. Nagamori, K. Suzuki, H. Hashimoto and H. Nojima. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Research* 15(4):253-265, 2008(Aug).
5. A. Mabuchi, T. Nagao, O. Koshio, T. Ishiwata, A. Yano, K. Suzuki, K. Yokomuro, A.M. Wheatley. Role of F4/80+Mac-1<sup>high</sup> adherent non-parenchymal liver cells in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology Res.* 38:1040-1049, 2008(Oct).
6. A. Hoshino, T. Nagao, N. Nagi-Miura, N. Ohno, M. Yasuhara, K. Yamamoto, T. Nakayama, K. Suzuki. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *J. Autoimmunity* 31:79-89, 2008.
7. Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Matsumoto M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, Suzuki K. Preparedness for the spread of influenza: prohibition of traffic, school closure, and vaccination of children in the commuter towns of Tokyo. *J Urban Health* 85(4):619-635, 2008.
8. Nguyen T. L., N. Nakajima, Phuc P., Y.

- Sato, Hoang N. T., Pham V.H., Luong T.S., H. Katano, T. Kumasaka, T. Oka, S. Kawachi, T. Matsushita, T. Sata, K. Kudo, K. Suzuki. H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam. *Jpn. J. of Infectious Dis.* 61: 157-160, 2008.
9. Y. Ogasawara, H. Kaya, G. Hiraoka, F. Yumoto, S. Kimura, Y. Kadota, H. Hishinuma, E. Senzaki, S. Yamagoe, K. Nagata, M. Nara, K. Suzuki, M. Tanokura, K. Kuchitsu. Synergistic Activation of Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283:8885-8891, 2008.
10. Xiao G, Miyazato A, Inden K, Nakamura K, Shiratori K, Nakagawa K, Miyazawa T, Suzuki K, Kaku M, Kawakami K. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides. *Microbiol Immunol.* 52:171-179, 2008.
11. Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, Shiratori K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Suzuki K, Fujita J, Kaku M, Kawakami K. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol.* 15:4067-1074, 2008..

### 書籍

1. 鈴木和男 人工ガンマグロブリン製剤の開発の現状 *ファルマシア* 45: 17-22, 2009年1月
2. 鈴木和男 特集—感染症防御・慢性疾患の初期機構—総論「好中球の機能」「細胞」41: 48-50, 2009年2月
3. 長尾朋和、鈴木和男 特集—感染症防御・慢性疾患の初期機構—「好中球機能異常による血管炎・腎炎」*細胞* 41: 60-63, 2009年2月
4. 鈴木和男 感染症を抑え込め：大規模予測モデル「感染症の脅威：パンデミックへの備えは万全か」*日経サイエンス別冊* 163, pp38-46, 2008年11月
5. 鈴木和男 シミュレーションによる感染症の対策支援「感染症の脅威：パンデミックへの備えは万全か」*日経サイエンス*

別冊 163, pp38-46, 2008年11月

6. 長尾朋和、鈴木和男 ANCA をめぐる基礎的研究の進歩 呼吸器科 14 巻 pp348-354, 2008Oct.

## 2. 学会発表

### 【国内学会】

1. 鈴木和男 感染と血管炎を結ぶ機序 第32回日本腎臓学会東部学術集会 2008年10月11-12日 東京
2. 鄒軍、志賀由佳、鈴木和男、ARDS 病態モデルの肺組織傷害に連動するサイトカインストーム開始時の TNF- $\alpha$  の役割 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
3. 常賀、鈴木和男、In Vitro におけるIVIg治療の作用機序解析 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
4. 宇野賀津子、鈴木和男、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者、健康人の血漿中サイトカイン・ケモカインと IFN- $\alpha$  産生能の比較 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
5. 亀岡洋祐、鈴木和男 MPO リーダーペプチドは活性制御に関与するかII 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
6. 長尾朋和、鈴木和男、MPO-ANCA による糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
7. 富澤一夫、鈴木和男、SCG/Kj マウスにおける MPO-ANCA リスクエピソードと CD24+CD41+ の発現について 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
8. 楠怜奈、鈴木和男、SCG/Kj mice に対する 15-deoxyspergualin 治療による CD3+B220+CD69+ 細胞の減少 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
9. 鈴木和男 好中球 Myeloperoxidase ホモログと川崎病 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
10. 常賀、鈴木和男 QD 標識 TNF- $\alpha$  を使った免疫グロブリン治療の作用解析 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
11. 鈴木和男 わたしたちの体の中を見るバイオイメージングと新技術—からだの中をみるバイオイメージング 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
12. 鈴木和男 バイオイメージングと「化学工学」の融合学理：2002年から未来への橋

渡しめざしてきたもの 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉

13. 常賀、長尾朋和、鄒軍、中山俊憲 鈴木和男 In vitro におけるIVIg治療の作用機序解析と判定法の確立 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
14. Tomizawa Kazuo, Nagao Tmokazu, Ohshima Maamichi, Kobayashi Kazuo, Suzuki Kazuo MPO-ANCA specific IgG2b subclass decrease by treatment with 15-Deoxyspergualin in SCG/Kj mice 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
15. 楠怜奈、長尾朋和、中山俊憲、鈴木和男 Reduction of CD3+B220+CD69+ cell population by treatment with 15-deoxyspergualin SCG/Kj mice 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
16. 長尾朋和、荒谷康昭、中山俊憲、鈴木和男 Secretion of oxidase antibody of neutrophil chemotactic factors from glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都

### 【国際学会】

1. K. Suzuki Xiamen University Medical School Xiamen University Medical School Meeting (アモイ大学会議) 2008/11/19-20 Xiamen, China
2. K. Suzuki Imaging of Vasculitis 2nd International Symposium for Bioimaging in Queenstown (第二回国際バイオイメージング学会) 2008/11/26-28 Queenstown, New Zealand
3. K. Suzuki Steering Meeting on EUVAS/EULAR Steering Meeting on EUVAS/EULAR 2008/12/1-2 Zurich, Switzerland
4. K. Suzuki Immunomodulatory therapy for vasculitis with synthetic IVIG International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
5. Chang He, K. Suzuki et al Modulation of endothelial cell functions by intravenous immunoglobulin in vitro International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009, 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
6. K. Tomizawa, K. Suzuki et al

- Decreased of Risk Epitopies of MPO-ANCA with Remission: Preliminary Analysis International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
7. S. Kawachi, K. Suzuki, et al. Treatment of severe ARDS (including H5N1-FARDS) with IVIg -From the Cases of NHP-Hanoi- International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
8. S. Kobayashi, K. Suzuki, et al. New consensus, definition, classification and system for diagnosis of vasculitis from EULAR and ACR meeting held in Zurich International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
9. M. Furutani, K. Suzuki, et al. Synthetic polyclonal immunoglobulin International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
10. K. Uno, K. Suzuki, et al. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN- $\alpha$ production capacity amongst healthy subjects, MPO-ANCA nephritis patients, and IgA nephritis patients International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
11. Y. Aratani, K. Suzuki Phagocyte NADPH-oxidase deficiency promotes zymosan-induced acute lung inflammation International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
12. J. Hirahashi, K. Suzuki et al. Dietary enrichment with eicosapentanoic acid (EPA) prevents antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatmen and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
6. 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

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究平成20年度報告書

皮膚血管炎アトラス集：血管炎・血管障害診療の手引き作成  
（平成20年度進捗状況）

研究分担者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野

研究要旨 難治性血管炎・血管障害の皮膚症状について一般診療医向け解説書の作成に着手した。書籍の構成は、大きく2章からなり、第I章は、皮膚血管炎・血管障害ガイドライン（日本皮膚科学会、勝岡憲生ら）や国際分類で用いられた病名に準拠して、それらの典型的臨床像・組織像の提示を予定している。第II章は、特異な症例や鑑別すべき疾患の症例提示を行い、一般臨床に役立つ構成を考えた。第I章は、はじめpdf版として、班員のレビューを受ける。第II章は雑誌への連載を行いながら、症例を集積し、研究班最終年度には両章を合本としてアトラス集を発刊する予定である。

共同研究者

勝岡憲生 北里大学医学部皮膚科教授  
古川福実 和歌山県立医科大学皮膚科教授  
片山治子 岡山済生会病院皮膚科  
妹尾明美 三豊総合病院皮膚科

A. 研究目的

Chapel Hill分類は、血管炎症候群の国際的コンセンサスを得た分類である。しかし、実際の診療においては、診療の手引きとなるガイドラインは適当なものが見当たらない。中・小血管炎においては皮膚症状の臨床像とその病理組織所見は診断するうえできわめて重要な手がかりになる。

日本皮膚科学会では、皮膚血管炎・血管障害ガイドラインを作成した。そのガイドラインはChapel Hill分類に沿った記述がされている。このガイドラインの骨子にしたがって、臨床像と病理組織所見を提示することによって、一般診療医が利用するための診療手引書を作成することを研究の目的にした。

B. 研究方法

日本皮膚科学会作成の血管炎・血管障害ガイドライン（日本皮膚科学会のホームページ <http://www.dermatol.or.jp>）または、日皮会誌118;2095-2187, 2008)の血管炎分類に従って、症例と病理組織の収集を行った。

C. 研究結果

第I章の編集のために、皮膚病変を形成しうる血管炎症候群と鑑別すべき血管障害をリストに挙げ（表1）、典型的症例と病理組織所見の収集をした。

第II章作成のために、雑誌への連載ページを確保し、その著作権の移譲を受けることになったため研究班での出版が可能である。

D. 考察

本研究班の最終年度（平成22年度）を目標に血管炎・血管障害のアトラス集を完成すべく作業を進めてい



る。本アトラス集が、一般診療医にとって、血管炎症候群・血管病変の診療手引きとして活用されるように、構成と内容を充実させていく。

#### E. 結論

皮膚血管炎アトラス集作成のコンセプト、構成と進捗状況について報告した。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表（平成20年度）

##### 論文発表

1. Kashino K, Senoo A, Yamasaki O, Iwatsuki K. Gangrenous staphylococcal infections localized on the lesions of acquired reactive perforating collagenosis. *J Dermatol*. 2008; 35:594-7.
2. Yamamoto T, Yamada A, Tsuji K, Iwatsuki K. Tracing of the molecular remnants of herpes virus infections in necrotic skin tissue. *Eur J Dermatol*. 2008;18:499-503.
3. Tsuji K, Hamada T, Uenaka A, Wada H, Sato E, Isobe M, Asagoe K, Yamasaki O, Shiku H, Ritter G, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Nakayama E, Iwatsuki K. Induction of immune response against NY-ESO-1 by CHP-NY-ESO-1 vaccination and immune regulation in a melanoma patient. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 ;57:1429-37.
4. Hamada T, Matsuura H, Oono T, Yamasaki, Asagoe K, Yamamoto T, Tsuji K, Iwatsuki K. Karyotypic analysis of marrow cells in pyodermic lesions associated with myelodysplastic syndrome. *Arch Dermatol* 2008; 144: 643-8.
5. Nakanishi G, Suzuki N, Lin SN, Asagoe K, Iwatsuki K. Re-evaluation of CD34-negative dermatofibrosarcoma

protuberans with a highly sensitive, tyramide-based immunohistochemical analysis. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 719-21.

6. Tokuyama Y, Senoh A, Setsu N, Iwatsuki K. Pustular psoriasis induced by terbinafine: differential diagnosis from acute generalized exanthematous pustulosis. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 725-6

7. Senoh A, Tokuyama Y, Nakayama Y, Fujii K, Iwatsuki K. Erythema multiforme-like contact reaction due to liquid formulated

2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA): Involvement of cytotoxic T-lymphocyte reaction. *Clin Exp Dermatol*, in press.

8. Morizane S, Setsu N, Yamamoto Y, Hamada T, Nakanishi G, Asagoe K, Iwatsuki K. Ichthyosiform eruptions in association with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol*, in press.

##### 学会発表

1. Iwatsuki K. Virus-related lymphomas. Asian Dermatology Congress, Seoul, Oct 2, 2008
2. Iwatsuki K. Staphylococcal virulence factors and atopic dermatitis. 5th International Society for Atopic Dermatitis, Kyoto, May 12, 2008

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 特許取得

特許第4182227号

発明の名称: ウイルス潜伏感染の検査方法および検査用キット

特許権者: 岡山大学法人 岡山大学  
岡山県岡山市津島中一丁目1番1号

発明者: 岩月啓氏 山本剛伸

特許番号: 特願2005-261917

出願年月日: 平成17年9月9日

表1. 皮膚血管炎アトラス掲載予定疾患

血管炎症候群 (ガイドラインに準拠)

I. 大血管  
 大動脈症候群 (高安動脈炎)  
 巨細胞血管炎 (側頭動脈炎)  
 I I. 中血管の血管炎  
 結節性多発動脈炎  
 川崎病  
 I I I. 小血管の血管炎  
 Wegener 肉芽腫症  
 Churg-Strauss 症候群  
 顕微鏡的多発血管炎  
 Henoch-Schoenlein 紫斑病  
 本態性クリオグロブリン血症性血管炎  
 皮膚白血球破砕性血管炎  
 1) じんましん様血管炎, 2) 膿疱性血管炎

閉塞性血管病変

Livedo reticularis (with summer ulceration)  
 抗リン脂質抗体症候群  
 Buerger 病  
 Mondor 病  
 ASO  
 calcifilaxis  
 Blue toe synd./Cholesterin crystal embolism

症候性血管炎: 膠原病などに合併する血管障害

I. 膠原病/免疫疾患関連  
 SLE  
 MCTD  
 SS c  
 Dermatomyositis  
 Sjogren syndrome・高 $\gamma$ グロブリン血症性紫斑  
 Rheumatoid arthritis  
 Behcet disease  
 I I. 異常蛋白血症関連  
 寒冷凝集素/抗自己血球抗体関連  
 混合型クリオグロブリン血症 (C型肝炎など)

いわゆるリンパ球性血管病変

I. 浅在性  
 PLEVA, papulonecrotic tuberculid など  
 I I. 深在性  
 Nodular vasculitis/Erythema induratum Bazin  
 febrile ulceronecrotic Mucha-Habermann  
 Angiocentric lymphoma など

敗血症・その他

敗血症疹 Osler 結節 ・Janeway 結節  
 purpura fulminans など

【大型血管炎分科会】

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

難治性血管炎に関する調査研究班

大型血管炎の臨床研究分科会 研究報告書

慢性閉塞性動脈疾患に対する血管新生療法：

HGF プラスミドの遠隔期成績と

bFGF 蛋白徐放ゼラチンハイドロゲル投与成績

分科会長 重松 宏 東京医科大学外科学第二講座主任教授

#### 研究要旨

慢性閉塞性動脈疾患による重症虚血肢に対する HGF プラスミドや bFGF 蛋白徐放ゼラチンハイドロゲル動脈内投与を用いた血管新生療法により、Buerger 病に対する一般臨床試験成績では、虚血性潰瘍の縮小や安静時疼痛の改善が認められて、一定の有用性が示された。HGF プラスミド投与の遠隔期の安全性についても、特記すべき病的意義のある検査値の上昇や有害事象を認めず、虚血症状の増悪を認めなかった。

#### 研究協力者

宮田哲郎 東京大学大学院医学系研究科  
血管外科学分野 准教授

#### A. 研究目的

1. 重症虚血肢に対する HGF プラスミド(AMG0001, アンジェス MG (株))を用いた Buerger 病に対する一般臨床試験が、本研究班で行われてきた。Buerger 病について追跡 15 ヶ月までの治療成績を検討した。

2. bFGF 蛋白徐放ゼラチンハイドロゲルの動脈内投与成績を検討した。

#### B. 研究方法

1. HGF プラスミドを用いた臨床試験について

Buerger 病については、その診断基準に基づいて確定診断された Buerger 病に

よる動脈病変のため、虚血性潰瘍を有している 20 歳以上 85 歳未満のもので、既存の内科的治療や処置を 4 週間以上（観察期間）行っても投与対象肢の症状の改善が認められないものを対象とした。投与薬剤量や投与方法、有用性の観察および評価方法は既に報告した。

2. bFGF 蛋白徐放ゼラチンハイドロゲル投与について

対象：35～85 歳の安静時疼痛や潰瘍・壊死を有する Buerger 病や閉塞性動脈硬化症による重症虚血肢患者で従来治療により改善が得られないものや手術適応のないもの、あるいは 40～85 歳の閉塞性動脈硬化症による間歇性跛行例で、浅大腿動脈や膝窩動脈に閉塞を有するもの

投与薬剤および方法：bFGF100mg を含ませた酸性ゼラチンハイドロゲル