

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とモデル動物の開発 - CD69、MPO および LAMP-2 の役割 -

千葉大学大学院医学研究院免疫発生・炎症制御 鈴木和男

研究協力者：高橋 啓（東邦大学医療センター大橋病院・病理）

長尾朋和（千葉大学大学院医学研究院）

協力者：大野尚仁（東京薬科大学・薬学部）

中山俊憲（千葉大学大学院医学研究院）

荒谷康昭（横浜市立大学大学院）

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 mannoprotein-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。昨年度までに、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 IL-6、IL-17 と IL-23 産生の増加を報告した。一方、これまで、Myeloperoxidase (MPO) や CD69 分子が血管炎に関与していることを MPO-KO および CD69-KO マウスで実証してきた。本年度は、MPO および CD69 両遺伝子欠損の相加効果を調べる目的で、(MPO-CD69-DKO) マウスにて解析した。DKO マウスでは、IL-10 の上昇が顕著で、G-CSF および TNF- α も上昇傾向があり、IL-9 および Eotaxin は減少した。また IL-13 は、減少傾向を示した。これらの因子の変動はあったものの、病理学的影響はむしろ悪化を示した。このことは、CAWS 誘導冠状動脈炎モデルにおいて、MPO および CD69 遺伝子の相加的な作用をそれぞれが打ち消している可能性が示唆された。一方、腎臓にフォーカスしたモデルマウスの作製を試みた。anti-mouse MPO ポリクローナル抗体もしくは anti-LAMP2 モノクローナル抗体を lipopolysaccharide と同時に C57BL/6 マウスへ投与し、腎組織を観察した。その結果、anti-LAMP2 投与群においては、急激な血尿、蛋白尿が観察され、anti-MPO 投与群では、血尿、蛋白尿が観察された。さらに、それぞれの抗体投与群において、半月体形成、白血球浸潤が観察された。これらのモデルマウスが誘導型の糸球体腎炎モデルとして有用であることが示された。

A. 研究目的

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することで深く関与し

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。我々は、昨年度まで、*C. albicans* 由来 mannoprotein-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-1・、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・解析してきた。

本年度は、これらの因子について、MPO および CD69 の両遺伝子欠損マウスにおいて、両遺伝子の相加効果を解析することを目的とした。一方、これまで、われわれが使用してきた MPO-ANCA 関連血管炎のモデルマウスの SCG/Kj マウスは、自然発症型である。しかし、発症機序の解析や薬理効果を検討する上で、より有用な「誘導型」のモデルマウスが望まれてきている。そこで我々は、近年報告されている anti-MPO 抗体や anti-LAMP2 抗体の投与によって発症するモデルマウスの作製を試みた。

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。

Wild(C57BL/6) 、 MPO-KO(C57BL/6) 、 CD69-KO(C57BL/6) 、 両遺伝子欠損 (MPO-CD69-DKO(C57BL/6))、4 週齢オスマウスに CAWS を投与した。

2. 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・L の血漿を用いて Bio-Plex により同時定量した。

3. 血管炎モデル動物の検討: Anti-MPO 抗体と anti-LAMP2 抗体による誘導型糸球体腎炎モデルマウス

MPO-KO マウスに、マウス MPO で免疫することによって得た anti-mouse MPO ポリクローナル抗体もしくは anti-LAMP2 モノクローナル抗体を lipopolysaccharide と同時に C57BL/6 マウスへ投与し、その後経時的に尿検査を行い、さらに屠殺後に HE 染色、蛍光免疫染色にて腎組織を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、千葉大学動物委員会および国立感染症研究所実験動物計画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. MPO-CD69-DKO への CAWS 投与によるサイトカイン・ケモカインの血中濃度の変化
CAWS および MPO 抗体投与によるサイトカイン・ケモカインの変動

- 1) Wild に比し、DKO で上昇:
IL-10 の上昇が顕著であり、G-CSF および TNF- α も上昇傾向が認められた。
- 2) Wild に比し、DKO で減少:
IL-9 および Eotaxin は、減少した。また IL-13 は、減少傾向を示した。

それ以外の IL-1 β 、IL-1 α 、IL-2 \sim 6、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-17、GM-CSF、IFN- γ 、KC、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES では、両者に差が認められなかった。

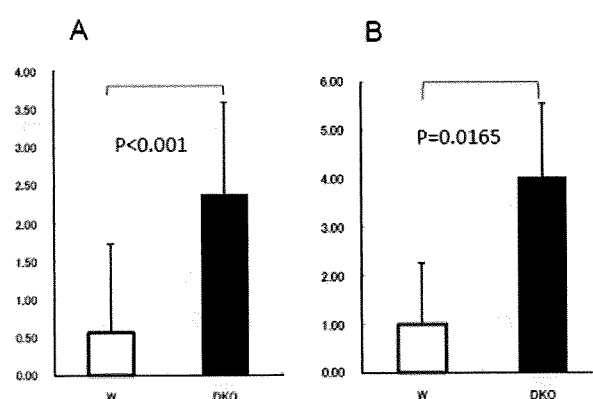
2. CAWS 投与による冠状動脈炎の誘導

冠状動脈炎の病理学的評価において、冠状動脈炎の病理学的評価において、Wild に比して DKO において Score/segment および侵襲セグメント数/mouse が増加した (図 1)。

図 1. CAWS 投与による冠状動脈炎の誘導

A. Score/segment, B. 侵襲セグメント数/mouse

3. Anti-MPO 抗体と anti-LAMP2 抗体による誘



導型糸球体腎炎モデルマウス

MPO-KO マウスに、マウス MPO で免疫することによって得た anti-MPO 抗体もしくは anti-LAMP2 モノクローナル抗体を lipopolysaccharide と同時に C57BL/6 マウスへ投与することで、anti-LAMP2 投与群においては、投与 2 時間をピークとして急激な血尿、蛋白尿が観察された。Anti-MPO 投与群におい

ては、投与2日後をピークとして血尿、蛋白尿が観察された。また、それぞれの抗体投与群において、半月体形成、白血球浸潤が観察された。

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 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で深く関与している(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、MPO および CD69 の両遺伝子の相加効果をしらべる目的で、MPO および CD69 の両遺伝子欠損マウスを用いて両遺伝子の相加効果を解析した。サイトカイン・ケモカインの解析から、MPO および CD69 の両遺伝子欠損マウスでは、IL-10 の上昇が顕著で、G-CSF および TNF- α も上昇傾向が認められ、IL-9 および Eotaxin が減少し、IL-13 は、減少傾向を示した。これらの因子の変動はあったものの、両遺伝子欠損による病理学的影響はむしろ悪化を示した。このことは、CAWS 誘導冠状動脈炎モデルにおいては、MPO および CD69 遺伝子の相加的な作用をそれぞれが打ち消している可能性が示唆された。

一方、血管炎モデル動物作製では、anti-MPO 抗体と anti-LAMP2 抗体による誘導型糸球体腎炎モデルマウスの作製を試み、anti-MPO 抗体もしくは anti-LAMP2 抗体の投与により、急激な血尿、蛋白尿が、anti-MPO 投与群においては、血尿、蛋白尿が観察され、

両抗体投与群において、半月体形成、白血球浸潤が観察された。これらのモデルマウスが誘導型の糸球体腎炎モデルとして有用であることが示された。

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。

これまで、CAWS 投与初期では、IL-1 α 、IL-6、IL-12p70、IL-17、IL-23 の増加が認められた。

しかし、両遺伝子欠損マウスのサイトカイン・ケモカインの解析から、Wild に比し、IL-10 の上昇が顕著で、G-CSF および TNF- α も上昇傾向が認められた。また、IL-9 および Eotaxin は、減少した。また IL-13 は、減少傾向を示した。これらの因子の変動はあったものの、両遺伝子欠損による病理学的影響はむしろ悪化を示した。このことは、CAWS 誘導冠状動脈炎モデルにおいては、MPO および CD69 遺伝子の相加的な作用をそれぞれが打ち消している可能性が示唆された。一方、腎臓にフォーカスしたモデルマウスの作製を試みた。anti-MPO 抗体もしくは anti-LAMP2 の投与により、急激な血尿、蛋白尿が観察され。また両抗体投与群において、半月体形成、白血球浸潤が観察され、これらのモデルマウスが誘導型の糸球体腎炎モデルとして有用であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Akiko Ishida-Okawara, Hitomi Yamada, Yoshiaki Kaneshiro, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Administration of human immunoglobulin inhibited development of vasculitis in a murine model of vasculitis induced with CAWS, *Candida albicans* water soluble fraction. Modern Rheumatol. in press
2. Masumitsu Hatta, Natsuo Yamamoto, Akiko Miyazato, Kiwamu Nakamura, Ken Inden, Tetsuji Aoyagi, Kazuo Suzuki, Mitsuo Kaku, Kazuyoshi Kawakami. Early production of tumor necrosis factor- α by Gr-1+CD11b+ mononuclear cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs. FEMS Immunol Med

- Microbiol 2009; in press .
3. Akihiro Hasegawa, Katsuhiro Hayashi, Hiroyuki Kishimoto, Meng Yang, Soichi Tofukuji, Kazuo Suzuki, Hiroshi Nakajima, Robert Hoffman, Mutsunori Shirai, Toshinori Nakayama. Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009; in press .
 4. Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N. IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice. *J Immunol*. 183(5):3417-24 (2009).
 5. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, Stavrakis G, Shimosawa T, Xiao L, Nagahama Y, Suzuki K, Fujita T, Mayadas TN. *Circulation*. 120(13):1255-65 (2009).
 6. Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi. Analysis of cytokines in broncho-alveolar lavage fluids of patients with ARDS: Increase of IL-6, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β . *JJSICM(Journal of Japanese Society of Intensive Care*. in press 2009.
 7. Shoji Kawachi, San Thi Luong, Mika Shigematsu, Hiroyuki Furuya, Thuy Thi Bich Phung, Phuc Huu Phan, Hiroyuki Nunoi, Liem Thanh Nguyen, Kazuo Suzuki. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. *J. Infectious Dis*. 2009; 200: 510-515.
 8. Chiaki Kaga, Shigeyuki Nomura, Mina Okochi, Tomoko Nozu, Tomokazu Nagao, Atsushi Nagai, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki, Hiroyuki Honda. Screening of epithelial cell-adhesive peptides from fibronectin loop region and its cell specificity. *J Chem. Engineering Japan* 2009; 4:298-302.
 9. Tomoko Nozu, Mitsuko Kondo, Kazuo Suzuki, Jun Tamaoki, Atsushi Nagai. A Comparison of the Clinical Features of ANCA-Positive and ANCA-Negative Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. *Respiration* 2009;77:407-415.
- 書籍**
1. 長尾朋和、鈴木和男 ANCA 関連血管炎と Neutrophil Extracellular Traps(NETs、好中球細胞外補足構造) リウマチ科 (科学評論社) in press
 2. 長尾朋和、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎と血管内皮細胞 「腎臓と透析」東京医学社 in press
 3. 鈴木和男 ANCA 関連血管炎モデルマウスの新知見 「脈管学」メディカルトリビューン社 in press
 4. 鈴木和男 ナノ粒子の知恵の塊-ドラッグデリバリーシステムのイメージング 技術評論社刊「光る生き物—ここまで進んだバイオイメージング技術」pp140-153、2009年11月1日刊行
 5. 長尾朋和、鈴木和男「好中球機能異常による血管炎・腎炎」、細胞(ニューサイエンス社)、41(2)、pp.60-63、2009.
 6. 長尾朋和、鈴木和男「ANCA 関連血管炎」ANCA 関連血管炎—発症機構解析・モデルマウス・新たな治療法—炎症と免疫(先端医学社)、2009年17巻(6)11月 707-713
- 2. 学会発表**
- 【国内学会】
1. 平橋淳一、鈴木和男、藤田敏郎 ANCA 関連血管炎と Neutrophil シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第 52 回日本腎臓学会学術総会 横浜 平成 21 年 6 月 3-5 日
 2. 長尾朋和、鈴木和男 MPO-ANCA が直接誘導する糸球体血管内皮細胞活性化の分子機構 シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第 52 回日本腎臓学会学術総会横浜 平成 21 年 6 月 3-5 日
 3. 鈴木和男 総合討論: ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合 シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第 52 回日本腎臓学会学術総会 横浜 平成 21 年 6 月 3-5 日

4. 常賀、長尾朋和、中山俊憲、鈴木和男 IVIg 治療による活性化血管内皮細胞からのサイトカイン産生調節機序の解析第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009 年 6 月 26-27 日
5. 三浦典子、高野雄介、安達禎之、塙 晴雄、相澤義房、鈴木和男、大野尚仁 CAWS 血管炎に対する IL-10 遺伝子治療の効果 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009 年 6 月 26-27 日
6. 鈴木和男 「プライマリーケア医が血管炎を見つける」血管炎の国際情報普及フォーラム、栃木、2009 年 9 月 20 日
7. 第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
8. Yoshitomo Hamano, Wako Yumura, Eiji Kusano, Tomokazu Nagao and Kazuo Suzuki. Genetic dissection of dendrocytosis related to the pathogenesis of ANCA related systemic vasculitis: lessons from SCG/Kj mouse model. 第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
9. 藤元昭一、小林茂人、鈴木和男、布井博幸. 宮崎県における ANCA 関連血管炎の疫学調査— 発症率と欧米との差異を明らかにするために —第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
10. 小林茂人、藤元昭一、鈴木和男. 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎など疫学調査の種類と考え方 —欧米と日本の差異: 発症率と罹病率: population-based study と hospital-based study—第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
11. 武曾恵理, 宇野賀津子、岩崎由加子、立石悠、古宮俊幸、猪原登志子、鈴木和男. MPO-ANCA 陽性 MPA への IVIg 療法の急性期の血中サイトカインケモカインに対する抑制効果. 第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
12. 村上央, 三浦典子, 安達禎之, 石橋健一, 塙晴雄, 相澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁. GM-CSF 遺伝子導入マウスの CAWS 反応性. 第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
13. 鈴木和男 好中球研究の新たな展開. 第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
14. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男. MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステムの特性: 健常人、IgA 腎症との比較から. 第 15 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
15. 鈴木和男 ANCA 陽性の間質性肺炎: 最近の話題 ANCA 陽性の間質性肺炎 第 27 回 呼吸器・免疫シンポジウム 2009 年 11 月 21 日、東京
16. Miyuki Omori-Miyake, Kazuyoshi Ando, Hidehiro Ueshiba, Yutaka Arimura, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki and Junji Yagi. A role of LECT2, leukocyte cell-derived chemotaxin 2, in experimental sepsis. 39 回日本免疫学会, 12 月 2-4 日、大阪
17. Reina Kusunoki Tomokazu Nagao, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Involvement of Interleukin-6 in RPGN of SCG/Kj mice. 39 回日本免疫学会, 12 月 2-4 日、大阪
18. 志賀由佳, 富澤一夫, 長尾朋和, シュゲン, 前原康宏, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男. マウスモデルにおける VILI と TNFa, IL6, KC の先行投与によるびまん性肺障害 (DAD) の初期段階の誘導/Early phase of diffuse alveolar damage induced by VILI plus TNFa, IL6, KC in mice. 39 回日本免疫学会, 12 月 2-4 日、大阪
19. Tomokazu Nagao, Koya Suzuki, Toshinori Nakayama, and Kazuo Suzuki. A mouse model of pauci-immune glomerulonephritis induced by monoclonal anti-LAMP-2 antibody.. 39 回日本免疫学会, 12 月 2-4 日、大阪

【国際学会】

1. Kazuo Suzuki Discussion Leader 'Myeloperoxidase and the heart' 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
2. Kazuo Suzuki, Yoshitomo Hamano. Role of the 'Man-1' cluster gene region on chromosome-1 in response in MPO-ANCA vasculitis genetic dissection of vasculitis, MPO-ANCA production, and related traits in scg/kj mice. 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
3. Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Kan Saiga, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Toshinori Nakayama, Masaru Tanokura, Kazuo Suzuki. Association of risk epitopes of MPO-ANCA with renal failure in SCG/Kj mice showing crescentic glomerulonephritis. 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North

- Carolina, USA.
4. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Nobuyo Maeda, Hideki Koyama, and Kazuo Suzuki. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungi. ISHAM-, Tokyo, May 29.
 5. Kazuo Suzuki. Lecture on Epitope of MPO-ANCA in Workshop-I: Epitope specificity. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 6. Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Kazuko Uno, Naoto Tamura, Yuji Yamanishi, Atsushi Fukatsu, Richard A. Watts, David G. I. Scott, David R. W. Jayne, Kazuo Suzuki, Hiroshi Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 7. Eri Muso, Kensuke Joh, Toshiko Ihara, Yukako Iwasaki, Toshiyuki Komiya, Kazuo Suzuki. Specific cytokines and chemokines as the predictor of clinical and pathological activity and chronicity in patients with ANCA-ANCA-positive MPA. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 8. Toshiaki Oharaseki, Yuki Yokouchi, Megumi Wakayama, Fumie Ihara, Hitomi Yamada, Kazuo Suzuki, Shiro Naoe, Kei Takahashi. Histopathology of late-stage arteritis in murine systemic vasculitis induced by polysaccharide of *Candida albicans*, as animal model of Kawasaki disease. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark.
 9. Kazuo Suzuki, Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Shigeto Kobayashi, Eri Muso, Wako Yumura, Takeshi Sasaki, Osamu Hotta, Yasuaki Harabuchi, Sakae Homma, Yuji Yamanishi, Manabu Nishii, David Jayne, Niels Rasmussen, Toshinori Nakayama, Hashimoto Hashimoto, Japan-UK-EU Project Members. Risk Epitopes of MPO-ANCA in Patients with MPA in Japan. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 10. Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Yuki Yokouchi, Hitomi Yamada, Hiroshi Mamada, Shiro Naoe, Tsutomu Saji, Naohito Ohno, Kazuo Suzuki. Effect of anti-TNF-alpha medicaments in mice vasculitis model caused by *Candida albicans* water soluble fraction. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 11. Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Kan Saiga, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Toshinori Nakayama, Masaru Tanokura and Kazuo Suzuki. Risk Epitopes of MPO-ANCA in SCG/Kj mice. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 12. Kazuko Uno, Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Katsumi Yagi, Setusya Fujita, Kazuo Suzuki. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN-alpha production capacity amongst healthy subjects, patients with MPO-ANCA positive MPA, and IgA nephritis. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 13. Shouichi Fujimoto, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki. Incidence and clinical phenotype of ANCA-associated renal vasculitis: comparison between Japan and the UK. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 14. Junichi Hirahashi, Kimito Kwahara, Makoto Arita, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Keiichi Hishikawa, Toshiro Fujita. Dietary enrichment with eicosapentanoic acid (EPA) prevents anti-neutrophils cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
 15. Yoshitomo Hamano, Wako Yumura, Eiji Kusano, Kazuo Suzuki. Genetic dissection of leukocytosis related to spontaneously occurring crescentic glomerulonephritis in a model of SCG/Kj mice. The American Society of Nephrology The 42nd Annual Meeting and Scientific Exposition October 27 to November 1, 2009. San Diego, USA
 16. Kazuo Suzuki. Contribution of

- neutrophils to host-defense and chronic diseases. Lecture in Peking University 1st Hospital. 2009年10月6日, Beijing, China
17. Kazuo Suzuki. Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Severe Lung Injury in Mice with influenza infection, Seminar in NIAID-NIH, Oct 15, 2009, Bethesda, USA
 18. Hamano et al. Genetic Dissection of Leukocytosis Related to Spontaneously Occurring Crescentic Glomerulonephritis in a Model of SCG/Kj Mice. ASN Meeting, Oct. October 29, 2009, USA.
 19. Eri Muso, Kazuko Uno, Yukako Iwasaki, Yu Tateishi, Toshiyuki Komiya, Toshiko Ihara, Kazuo Suzuki. IVIg therapy for acute phase MPO-ANCA positive systemic vasculitis—New horizon of therapy with evidence of Suppressive effect on acute cytokine and chemokine storm—Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
 20. K. Takahashi, T. Oharaseki, Y. Yokouchi, H. Yamada, H. Mamada, N. N. Miura, N. Ohno, H. Murata, S. Naoe and K. Suzuki CAWS-induced murine vasculitis and Kawasaki disease. Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
 21. Tomokazu Nagao, Yasuaki Aratani, Toshinori Nakayama, and Kazuo Suzuki. Development of murine crescentic glomerulonephritis model using anti-MPO and anti-LAMP-2 antibodies. Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
 22. Yoshitomo Hamano, Wako Yumura, Eiji Kusano, Tomokazu Nagao and Kazuo Suzuki Genetic dissection of aberrant T cell activation related to the pathogenesis of ANCA related systemic vasculitis in a model of SCG/Kj mice. Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
- G. 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

血管炎好発系 McH5/1pr マウスの血管炎に対する CXCL16 アンタゴニストの抑制効果

愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学 長谷川均

研究協力者 松本卓也、金磊（愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学）

宮崎龍彦、高平尚子（愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学）

研究要旨

【目的】血管炎の発症・進展にケモカインの関与が指摘されている。我々は、McH5/1pr マウス腎に好発する肉芽腫性多発動脈炎における CXCL16 の発現を解析するとともに、CXCL16 アンタゴニスト（CXCL16-AT）の治療効果について検討した。【方法】N 末端を削除し、さらに分泌型にし、遊走能を持たない CXCL16-AT を発現ベクターに組み込み後導入した非転移性繊維芽細胞株を、マウスの皮下に接種し、経過を観察した。【結果】N 末端から 4 アミノ酸以上を削除した分泌型 CXCL16 は遊走能がなくなることが明らかになった。McH5/1pr マウス腎では、8-10 週齢から、主に、血管内皮細胞、上皮細胞や血管周囲の浸潤マクロファージに CXCL16 の発現が認められた。CXCL16-AT 投与群では、血管壁の破壊や肉芽形成は有意に抑制された。【結語】CXCL16-AT は血管炎の新しい治療薬になる可能性がある。

A. 研究目的

血管炎の発症・進展にケモカインの関与が指摘されている。我々は、McH5/1pr マウス腎に好発する肉芽腫性多発動脈炎における CXCL16 の発現を解析するとともに、遺伝子治療可能な分泌型 CXCL16 アンタゴニスト（CXCL16-AT）を作成し、血管炎の発症、進展への影響について検討した

B. 研究方法

1. CXCL16 アンタゴニストの作成

マウス CXCL16 の N 末端から 1 アミノ酸を除去できるようプライマーを設定し、シグナル配列としてヒト IFN- β のシグナル配列を用いて、RT-PCR で増幅し、pCXN2 ベクターに挿入し、分泌型の CXCL16 アンタゴ

ニスト（CXCL16-AT）プラスミドを作成した。このプラスミドを MRL/1pr マウス由来の非転移性線維芽細胞株 MRL/N-1 に導入し、発現細胞を作成した。

2. McH5/1pr マウス

8 週齢頃から、全身の中・小動脈を中心に、特に腎血管では著明で、肉芽腫性多発動脈炎を好発するマウス。

3. CXCL16 の組織での発現

6、8、10、12、16 週齢の McH5/1pr マウスの腎から total RNA を抽出し、real time PCR により CXCL16mRNA の発現を検討した。組織での局在はパラフィン切片を脱パラ化後、ビオチン標識抗マウス CXCL16

ヒツジ血清を用いた免疫染色にて検討した。

4. CXCL16 アンタゴニストによる McH5/lpr マウスの臓器病変の検討

8 週齢（血管炎発症初期）の McH5/lpr マウスの皮下に CXCL16-AT 導入非転移性線維芽細胞株 5×10^6 を接種し、8 週間後にそれぞれの臓器病変の程度を検討した。

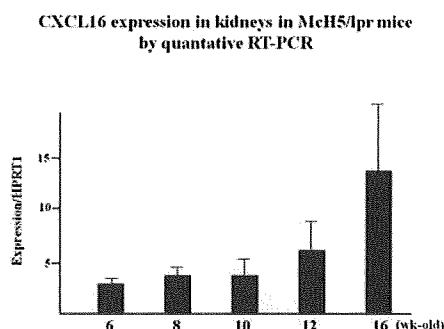
（倫理面への配慮）

C. 動物実験は愛媛大学動物実験指針に基づき倫理面に配慮して行った。研究結果

N 末端から 4 アミノ酸以上を削除した分泌型 CXCL16 は遊走能がなくなることが明らかになった。これらのうち、マウス CXCL16 を CXC から 3 アミノ酸前まで N 末端を除去した分泌型ミュータント (MAGSCSCDR---HLPQ; 85 アミノ酸残基) を、本研究に用いた。

McH5/lpr マウスにおける腎血管での CXCL16 の発現は、real time PCR (図 1) や免疫組織染色による解析から、8-10 週齢から、主に血管内皮細胞、浸潤マクロファージおよび間質細胞に認められるようになり、12 週以降にさらに増強することが明らかになった。

図 1 McH5/lpr マウス腎での CXCL16 の発現



8 週齢（血管炎発症初期）の McH5/lpr マウスの皮下に CXCL16-AT 導入非転移性線維芽細胞株を移植した。その 2 週間頃より、マウス血中に遊走阻止効果が認められるようになり、8 週後に腎での血管炎の程度を検討した。図 2, 3 に示しているように、弓状動脈レベルの血管において、コントロール群では、外内弾性板の破壊を伴う壊死性肉芽腫性血管炎と周囲の強いリンパ球およびマクロファージの浸潤がみられる。一方、CXCL16-AT 投与群では、血管周囲に軽度のリンパ球浸潤を認めるものの、浸潤細胞は血管外膜に接しておらず、血管壁の組織傷害もほとんど認められなかった。以上より、CXCL16-AT 投与により、McH5/lpr マウスの腎血管炎の発症・進展が有意に抑制された。

図2 CXCL16 アンタゴニスト投与による腎血管炎の抑制効果

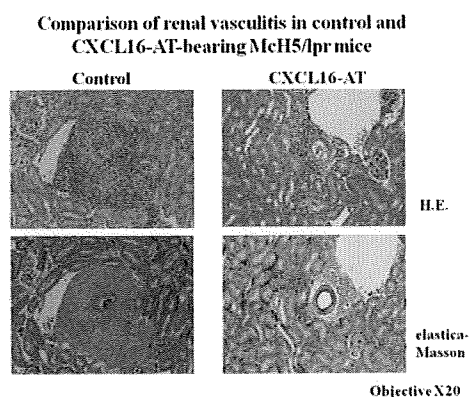
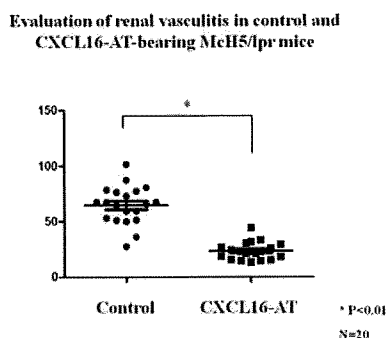
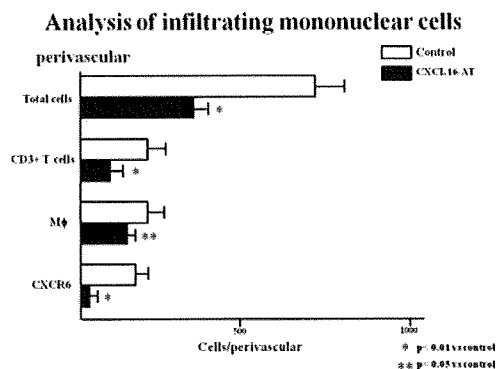


図3 CXCL16 アンタゴニスト投与群とコントロール群での腎血管炎の比較



さらに、腎血管周囲の浸潤細胞を CXCL16-AT 投与群とコントロール群で比較検討した。図4に示しているように、CXCL16-AT 投与群は、コントロール群に比し、CXCR6 陽性細胞、特に活性型 T 細胞やマクロファージの浸潤が有意に抑制された。一方、CXCL16-AT 投与によって、McH5/lpr マウスの抗 DNA 抗体の産生には影響を及ぼさなかった。

図4 腎血管周囲の浸潤細胞の解析



D. 考察

マウス CXCL16 は、CXC 構造をとり、225 残基の成熟タンパク質からなる膜結合型ケモカインで、プロテアーゼで切断されて分泌型となる。膜結合型 CXCL16 は細胞接着分子として、分泌型 CXCL16 は細胞遊走因子として機能するが、いずれの場合も CXCR6 をレセプターとして用いる。CXCR6 は、活性型 CD4⁺T 細胞 (Th1 細胞優位)、CD8⁺T リンパ球、NKT 細胞、形質細胞、単球・マクロファージなど多くの免疫細胞や炎症細胞に発現されている。一方、CXCL16 は、単球・マクロファージ、樹状細胞、間質上皮細胞、血管内皮細胞、腎 podocyte、大動脈平滑筋細胞などに発現し、TNF- α 、IFN- γ などの炎症刺激により発現が誘導される。したがって、現在、ヒトの血管炎疾患にて、CXCL16 の発現を検討した報告はないものの、CXCL16-CXCR6 系が血管炎の病態に関与することが容易に想像できる。

McH5/lpr マウスは、MRL/lpr マウスと C3H/lpr マウスを交配して作製したコンジェニックマウスで、全身の中・小動脈を中心に、肉芽腫性血管炎を好発するマウス

で、多発性動脈炎のモデルとして用いられる。本研究において、McH5/lpr マウスの血管炎の発症・進展に、CXCL16 の発現が関与していることを明らかにした。さらに、CXCL16 アンタゴニスト投与によって、McH5/lpr マウスの抗 DNA 抗体産生の産生には影響を及ぼさなかったが、腎血管炎の発症・進展が有意に抑えられた。その機序としては、CXCL16 アンタゴニストによって、腎血管周囲に CXCR6 陽性細胞、特に活性型 T 細胞やマクロファージが浸潤するのを抑制することによると考えられた。

E. 結論

多発性動脈炎の動物モデルで、CXCL16 アンタゴニストが、動脈炎を抑制することを明らかにした。今後、CXCL16 アンタゴニストが、ヒト血管炎疾患の新しい治療薬になる可能性が期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, Goda H, Hasegawa H, Hamakawa H. CD151 regulates HGF-stimulated morphogenesis of human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379(4):1097-100, 2009.
2. Tanimoto K, Yakusijin Y, Fujiwara H, Otsuka M, Sugita A, Sakai A, Hato T, Hasegawa H, Yasukawa M. Clinical significance of co-expression of CD21 and LFA-1 in B-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 89(4):497-507, 2009.

学会発表

1. Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Matsumoto T, Yasukawa M. Amelioration of lupus nephritis with dendritic cells using a NF-kappaB decoy and histone H3 peptide in NZB/W F1 mice. 73rd Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology Oct 19, 2009, Philadelphia, USA.
 2. 長谷川均、松本卓也、金磊、宮崎龍彦、安川正貴、能勢真人。血管炎好発系 McH5/lpr マウスの血管炎に対する CXCL16 アンタゴニストの抑制効果。第 54 回日本リウマチ学会総会（発表予定）。神戸。2010年4月。
 3. 金磊、長谷川均、松本卓也、河野政志、安川正貴。PPAR α および γ アゴニストによるヒト制御性T細胞への分化誘導機序。第54回日本リウマチ学会総会（発表予定）。神戸。2010年4月。
 4. 長谷川均、金磊、河野政志、松本卓也、安川正貴。PPAR α および PPAR γ アゴニストはヒト制御性 T 細胞への誘導や機能を増強する。第39回日本免疫学会総会。大阪。2009年12月3日。
 5. 金磊、長谷川均、河野政志、井上淳、安川正貴。ヒト制御性T細胞への分化誘導を促進する生理活性物質の解析。第53回日本リウマチ学会総会。東京。2009年4月25日。
- #### G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

抗好中球細胞質抗体対応抗原の翻訳後修飾に関する研究

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 加藤智啓

研究要旨

顕微鏡的多発血管炎等で出現する MPO-ANCA、ウェゲナー肉芽腫症等で出現する PR3-ANCA の産生機序解明のため、対応抗原である MPO と PR3 の翻訳後修飾を、方法論を含め検討した。好中球顆粒画分のタンパク質を二次元電気泳動展開後、抗体により MPO および PR3 のスポットを特定した。両者ともに、分子量と等電点の異なる 10 個以上の蛋白質スポット群として検出され、一部は質量分析により MPO あるいは PR3 であると同定され、患者/健常人間での差異を検出する方法として有用であると考えられた。実際、本法を用いて予備的に MPO-ANCA 陽性患者と健常人の好中球 MPO を比較したところ、患者において分子量 28kDa の 5 つのスポットの pI 値がアルカリ側に移動しており、症例を増やした検討が必要であるが、疾患特異的な翻訳後修飾の可能性が示唆された。

A. 研究目的

血管炎症候群において、顕微鏡的多発血管炎 (MPA)・アレルギー性肉芽腫性血管炎 (AGA)・ウェゲナー肉芽腫症 (WG) では、好中球細胞質に対する自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasm antibodies, ANCA) が効率的に認められ、ANCA 関連血管炎と総称される。特に、MPA ではミエロペルオキシダーゼ (MPO) に対する抗体 (MPO-ANCA) が、WG ではプロテイナーゼ 3 (PR3) に対する抗体 (PR3-ANCA) が特徴的に認められる。両 ANCA は疾患標識抗体としての意義を有するとともに、その産生機序はそれぞれの疾患の病因病態と深く結びついていると考えられるため、ANCA 産生機序解明は両疾患解明の重要な糸口である。一般に自己抗体産生機序としては、対応抗原の修飾、交差反応、あるいは免疫担当分子の異常などいくつかの仮説がある。しかしながら、ヒト疾患において産生機序の確定した自己抗体はほとんどなく、ANCA についても例外でない。上記産生機序のうち、対応抗原の修飾は古くから提唱され、また、近年関節リウマチにおいてタンパク質のシトルリン化が亢進していることなどが判明し、注目されている。しかしながら、タンパク質修飾の一般的なスクリーニング法が確立していないために、解析が

進んでいない。今回、ANCA 対応抗原の MPO と PR3 を対象に、2 次元電気泳動法と質量分析法を用いてそれぞれの ANCA 陽性患者における翻訳後修飾を、方法論を含め検討した。

B. 研究方法

MPO-ANCA、もしくは PR3-ANCA 陽性患者、および健常人の好中球より顆粒画分を調整し、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を二次元電気泳動で展開した後、PVDF 膜に転写し、抗 MPO 抗体もしくは抗 PR3 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。検出された蛋白質スポットをトリプシン処理し、生成したペプチドを MALDI-TOF/TOF 型質量分析計で解析することで、MPO もしくは PR3 であることを確認した。以上の方法で検出された MPO および PR3 のスポットの等電点もしくは分子量を患者と健常人で比較し、疾患特異的な翻訳後修飾の有無を検討した。

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

二次元ウェスタンブロット法により、好中球顆粒画分の二次元電気泳動ゲル中の MPO および PR3 のスポットを特定することができた。両

者とともに、分子量と pI の異なる複数のスポット群として検出された。MPO では、長鎖が分子量 28kDa-55kDa, pI 5.5-9.0 の範囲に 20 個以上のスポットとして、短鎖が分子量 13kDa、pI 0-6.0 の範囲に 3 個のスポットとして検出された。PR3 は、15-28kDa、pI 6.3-7.8 の範囲に 15 個以上のスポットとして検出された。質量分析により、これらのスポットのうち、MPO で 3 スポット、PR3 で 6 スポットが、それぞれ MPO 長鎖および PR3 であることが確認された。検出されたトリプシン消化断片の全アミノ酸配列に対する割合（配列カバー率）は、MPO 長鎖で 10-24%、PR3 で 14-24%に達した。

さらに予備的検討として、2 次元ウエスタンブロット法を用いて MPO-ANCA 陽性患者（68 歳男性）と健常者（66 歳男性）の好中球顆粒画分中の MPO のスポット群を検出し、それらの等電点と分子量を比較した。その結果、分子量 28kDa の 5 つのスポットの pI 値が 0.5 程度アルカリ側に移動しており、等電点をアルカリ側に変化させるような疾患特異的な翻訳後修飾の可能性が示唆された。

D. 考察

2 次元ウエスタンブロット法により、ANCA 陽性患者および健常人の好中球顆粒画分から MPO および PR3 を検出し、その等電点と分子量を測定する方法を確立した。両者ともに等電点と分子量の異なる 10 個以上のスポット群として検出され、分解やアミノ酸側鎖の化学修飾など生体内で複雑な翻訳後修飾を受けていることが示唆された。

これら翻訳後修飾について、患者群と健常者群で差異が存在するか否か、今後検討していく予定である。予備的検討で行った MPO-ANCA 陽性患者・健常人 1 検体ずつの比較では、分子量 28kDa 付近の MPO のスポットがアルカリ側に移動しているという結果が得られている。この等電点の移動が疾患に由来するものかどうかを、今後、検体数を増やして検討していく。

同時に、質量分析によって、等電点の変化を引き起こしている翻訳後修飾の同定も進めている。今回、質量分析計で検出された MPO および PR3 のトリプシン消化物の配列カバー率は、それぞれ、10-24%、および 14-24%であった。翻訳後修飾の網羅的な同定を行うには、更なる配列カバー率の向上が不可欠である。タンパク質消化法や、生成ペプチドの抽出法などの効率化も今後の研究課題の一つである。

E. 結論

好中球から単離した MPO および PR3 を、2 次元ウエスタンブロット法により、その等電点および分子量を測定する方法を確立した。本法により、MPO-ANCA 陽性患者において疾患特異的な翻訳後修飾が存在する可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuko K, Murata M, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Shimizu H, Beppu M, Nakamura H, Kato T: A suppressive effect of prostaglandin (PG) E2 on the expression of SERPINE1/plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in human articular chondrocytes - an in vitro pilot study. : Open Access Rheumatol Res Rev: 1: 9-15: 2009.
2. Xiang Y, Kurokawa MS, Kanke M, Takakuwa Y, Kato T: Peptidomics: identification of pathogenic and marker peptides. Peptidomics Protocol (in press)
3. Masuko K, Murata M, Yudoh K, Kato T, Nakamura H: Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy: Not just for viscosity. Int J General Med 2: 77-81: 2009.
4. Yudoh K, Karasawa R, Masuko K, Kato T: Water-soluble fullerene (C60) inhibits the receptor activator of NFkB (RANK)-induced osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. Int J Nanomed 4: 1-7: 2009.
5. Hatsugai M, Kurokawa M, Kouro T, Nagai K, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Ito F, Kato T: Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells are useful for differential diagnosis of ulcerative colitis from Crohn's disease. J Gastroenterol (in press)
6. Iizuka N, Okamoto K, Matsushita R, Kimura M, Nagai K, Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Suematsu N, Hirohata S, Kato T: Identification of autoantigens specific for systemic lupus erythematosus with central nerve system involvement. Lupus

(in press)

7. Knaeshiro N, Xiang Y, Nagai K, Kurokawa MS, Okamoto K, Arito M, Masuko K, Yudoh K, Yasuda T, Suematsu N, Kimura K, Kato T: Comprehensive analysis of short peptides in sera from patients with IgA nephropathy. : Rapid Commun Mass Spect: 23: 3720-3728: 2009
2. 学会発表
1. 岡本一起、永井宏平、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓 ビタミン B6 酵素の転写を促進する核内受容体コアクティベーター (MTI-II) のホモログタンパク質 (prothymisin) の活性。日本ビタミン学会第 61 回大会 : 2009
 2. 唐澤里江、遊道和雄、村田美奈子、尾崎承一、西岡久寿樹、加藤智啓 : 高安動脈炎の疾患特異的マーカー。第 53 回リウマチ学会 : 2009
 3. 増子佳世、村田美奈子、遊道和雄、中村洋、別府諸兄、加藤智啓 : 変形性関節症における軟骨変性と血管新生 : 第 53 回リウマチ学会総会・学術集会 第 18 回国際リウマチシンポジウム。2009
 4. 村田三奈子、遊道和雄、唐澤里江、加藤智啓、千葉純司、別府諸兄、西岡久寿樹、井上和彦、増子佳世 : 関節軟骨におけるヒアルロン酸レセプター Layilin についての検討。第 53 回リウマチ学会 : 2009
 5. 川上雄起、増子佳世、遊道和雄、齋藤知行 1)、加藤智啓 : 関節軟骨細胞におけるアンギオテンシン II レセプターの発現。第 53 回リウマチ学会 : 2009
 6. 中村浩士、松崎益徳 1)、加藤智啓 : 拡張型心筋症の発症と進展機序に関する抗心筋抗体の検討 : 第 53 回リウマチ学会。2009 :
 7. 有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、岡本一起、永井宏平、末松直也、加藤智啓 : 「アセチル化」プロテオミクスによる関節リウマチ (RA) 関連分子の探索。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
 8. 初谷守朗、黒川真奈絵、紅露剛史、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、伊東文生、加藤智啓 : 末梢血単核球のプロテオーム解析による潰瘍性大腸炎クローン病の鑑別診断。 : 日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
 9. 飯塚進子、岡本一起、有戸光美、永井宏平、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、廣畑俊成、加藤智啓 : 中枢神経ループスにおける抗神経細胞抗体の対応抗原の検出。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
 10. 高桑由希子、黒川真奈絵、大岡正道、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、尾崎承一、加藤智啓 : 顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
 11. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、永井宏平、有戸光美、黒川真奈絵、増子佳世、末松直也、肥塚泉、加藤智啓 : めまいモデルラット前庭代償期における小脳片葉プロテオーム解析。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
 12. 金城永幸、小坂橋賢一郎、Yang Xiang、永井宏平、黒川真奈絵、岡本一起、有戸光美、増子佳世、遊道和雄、安田隆、末松直也、木村健二郎、加藤智啓 : 血清ペプチドミクス解析による IgA 腎症の診断マーカーの探索。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
 13. 加藤智啓 : リウマチ性疾患におけるプロテオミクス解析。日本プロテオーム機構第 7 回大会 : 2009
 14. 安藤敬永、永井宏平、近田正英、岡本一起、黒川真奈絵、増子佳世、有戸光美、末松直也、小林俊也、加藤智啓、幕内晴朗 : プロテオミクスによる腹部大動脈瘤形成機序の解明。第 50 回日本脈管学会総会 : 2009
 15. 長田賢一、増子佳世、竹鼻健司、田中孝幸、安東利彦、松本美富士、加藤智啓、西岡久寿樹 : 血清アミノ酸成分解析による線維筋痛症とうつ病の判別の検討。第 1 回日本線維筋痛症学会 : 2009
 16. Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Okamoto K, Nagai K, Suematsu N, Kato T : Acetyl-Proteomics for the Investigation of Pathological Molecules in Rheumatoid Arthritis. WHUPO: 2009
 17. Nagai K, Kaneshiro N, Xiang Y, Kurokawa M, Okamoto K, Arito M, Masuko K, Yudoh K, Yasuda T, Suematsu N, Kimura K, Kato T: Comprehensive analysis of short peptides in sera from patients with IgA nephropathy. WHUPO: 2009
 18. Fukasawa M, Okamoto K, Nakamura M, Nagai K, Arito M, Kurokawa M, Masuko K, Suematsu N, Koizuka I, Kato T: Proteomics of Cerebellar Floccules during Vestibular Compensation of A Rat Vertigo Model. WHUPO 2009
 19. Hatsugai M, Kurokawa M, Kouro T, Nagai

K, Arito M, Masuko K, Suematsu N, Okamoto K, Ito F, Kato T: Protein Profiles of Peripheral Blood Mononucleocytes are Useful for Discrimination of Ulcerative Colitis from Crohn's Disease. WHUPO 2009

20. 有戸光美、松尾光祐、黒川真奈絵、永井宏平、岡本一起、増子佳世、末松直也、加藤智啓：関節リウマチ関連分子アネキシンA7の機能解析。第82回日本生化学会大会：2009

21. 初谷守朗、黒川真奈絵、紅露剛史、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、伊東文生、加藤智啓：末梢血単核球のプロテオーム解析による潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別診断。第82回日本生化学会大会：2009

22. 高桑由希子、黒川真奈絵、大岡正道、永井宏平、有戸光美、増子佳世、末松直也、岡本一起、尾崎承一、加藤智啓：顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索。第82回日本生化学会大会：2009

23. 岡本一起、末松直也、増子佳世、黒川真奈絵、有戸光美、永井宏平、遊道和雄、加藤智啓：新規の核内レセプター・コアクティベーター(MTI-II)の立体構造と転写促進活性。第82回日本生化学会大会：2009

24. 深澤雅彦、岡本一起、中村学、永井宏平、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82回日本生化学会大会：2009

25. 永井宏平、金城永幸、Yang Xiang、黒川真奈絵、岡本一起、有戸光美、増子佳世、遊道和雄、安田隆、末松直也、木村健二郎、加藤智啓：多変量解析 OPLS-DA を用いた IgA 腎症の血清ペプチドマーカーの検索。第82回日本生化学会大会：2009

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。

I. 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。永井宏平*、佐藤利行*、黒川真奈絵*、有戸光美*、岡本一起*、末松直也*、尾崎承一**、大岡正道**、高桑由希子**、遊道

和雄***。（*聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム・分子病態治療学、**同大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科学、***同大学 難治性疾患制御学）

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

ANCA 関連血管炎関連遺伝子に関する研究

筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 土屋尚之
協力者 筑波大学大学院人間総合科学研究科 伊東郁恵

研究要旨

近年の大規模な疾患関連遺伝子解析研究により、自己免疫性リウマチ性疾患に共通の遺伝因子が予想以上に多数存在することが明らかになった。われわれは、2008年にヨーロッパ系集団において見出された新たな全身性エリテマトーデス(SLE)関連遺伝子領域である*FAM167A-BLK*領域が、日本人においてもSLEに関連するのみならず、関節リウマチ、全身性強皮症とも関連することを見出した。今回、当該領域に位置する一塩基多型rs13277113とANCA関連血管炎との関連を検討したところ、顕微鏡的多発血管炎(MPA)において、上記疾患群とも関連するrs13277113 Aアレルの有意な関連が検出された（アレル頻度の比較において $P=0.034$ 、オッズ比1.68、95%信頼区間1.04-2.72）、劣性モデルにて $P=0.029$ 、オッズ比1.91、95%信頼区間1.05-3.41）。以上の結果から、*FAM167A-BLK*領域は、MPA発症の遺伝因子ともなる可能性が新たに示唆された。

A. 研究目的

近年、*PTPN22*、*IRF5*、*STAT4* など、複数のリウマチ性疾患、自己免疫疾患に共通する疾患感受性遺伝子が予想以上に多いことが明らかになってきた。

2008年に、ヨーロッパ系集団における2つのゲノムワイド関連研究により、*FAM167A* (*C8orf13*) - *B lymphoid tyrosine kinase* (*BLK*) 領域に位置する一塩基多型(SNP) rs13277113 と全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)との関連が報告された。われわれは日本人集団においてSLEとこの領域の関連を確認するとともに、日本人集団においては、リスク遺伝子型頻度、オッズ比ともに、ヨーロッパ系集団よりも高いことを報告した(Ito et al., *Arthritis Rheum* 2009)。

また、北米のゲノムワイド関連研究において、この領域が関節リウマチ(RA)感受性遺伝子領域として報告されたのに相前後して、われわれも日本人集団においけるRAとの関連を報告した(Ito et al., *Ann Rheum Dis* 2009)。

われわれはさらに、rs13277113が、全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)とも関連することを見出した(Ito et al., *Arthritis Rheum* in press)。平行して、北米集団における強皮症とこの一塩基多型

(SNP)との関連が報告された(Gourh et al., *J Autoimmun* 2009)。

FAM167A-BLK 領域と血管炎との関連の報告はこれまでにない。われわれは、本研究において、rs13277113 と ANCA 関連血管炎の関連を検討した。

B. 研究方法

日本人ANCA関連血管炎78例（顕微鏡的多発血管炎[microscopic polyangiitis, MPA] 50例、Wegener 肉芽腫症[Wegener's granulomatosis, WG] 8例、Churg-Strauss 症候群[Churg-Strauss syndrome, CSS] 9例、その他9例）について、TaqMan genotyping assayにより遺伝子型を決定し、日本人健常対照群 768例と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、平成11～13年度の難治性血管炎に関する調査研究班において多施設共同研究により収集され、連結不可能匿名化された形で保管されていた試料を、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に則り、「遺伝子研究の同意を得た既収集匿名検体（A群試料）」として使用する研究計画を筑波大学大学院人間総合科学研究科医の倫理委員会に

諮り、承認を受けた上で施行した。

C. 研究結果

MPA 50例において、rs13277113アリルA ($P=0.034$, オッズ比[OR] 1.68, 95%信頼区間[CI] 1.04-2.72)および遺伝子型A/A ($P=0.029$, OR 1.91, 95%CI 1.05-3.41)が、健常対照群と比較して、有意に増加していた(表1)。

サンプルサイズが小さいため、統計学的解析には耐えないものの、CSS 9例においても、同様にA/A遺伝子型の増加傾向が観察された。一方、WG 8例においては、そのような傾向は認められなかった。

ANCA関連血管炎全例を、自己抗体の種類および臨床症状別に解析したところ、MPO-ANCA陽性群において、有意な関連が認められた(表1)。

D. 考察

SLE、SSc との関連が確立している SNP rs13277113 は *FAM167* と *BLK* の遺伝子間領域に位置しており、リスク遺伝子型では mRNA レベルでの *BLK* の発現低下、*FAM167A* の発現上昇と関連することが報告されている。*FAM167A* はユビキタスに発現する機能未知の遺伝子で、*BLK* は *LYN*、*HCK*、*LCK* と相同性を有する、Src family tyrosine kinase をコードする遺伝子であるが、いずれも、機能は十分解明されていない。

今回の研究により、rs13277113 は、MPA と関連することが示唆された。BLK 領域と ANCA 関連血管炎の報告は、国内外を通じてこれまでに見られない、新規知見である。

MPA のサンプルサイズが小さいため、統計学的有意性はぎりぎりであるものの、患者群におけるリスクアリル頻度(0.78)およびオッズ比(1.68)は、SLE(それぞれ0.78, 1.66)(Ito et al., *Arthritis Rheum* 2009)に匹敵し、SSc(それぞれ0.75, 1.44)(Ito et al., *Arthritis Rheum* in press)を上回るものである。今後、この関連を、症例数を増やして確認する必要がある。

E. 結論

FAM167A-*BLK* 領域に位置する SNP と MPA

との関連が新たに見いだされた。本領域は、SLE, RA, SSc のみならず、血管炎とも関連することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Hom G, Graham RR, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Behrens TW, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of the association between *C8orf13*-*BLK* region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009; 60:553-558.
2. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Kondo Y, Sugihara M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Matsuta K, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of association between *FAM167A* (*C8orf13*)-*BLK* region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* Published Online First: 9 September 2009. doi:10.1136/ard.2009.118760.
3. Ito I, Kawaguchi K, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N. Association of *FAM167A* (*C8orf13*) - *BLK* region with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* in press.
4. 土屋尚之: 日本人集団における顕微鏡的多発血管炎の疾患感受性遺伝子解析。 *脈管学* 2009;49:31-37.

2. 学会発表

1. 土屋尚之: リウマチ性疾患の遺伝的背景-共通性と異質性. 第53回日本リウマチ学会総会シンポジウム、2009年4月24日、東京。(リウマチ学会2009プログラム抄録集 p120)。
2. 伊東郁恵、川崎綾、伊藤聡、近藤裕也、杉原誠人、堀越正信、林太智、後藤大

輔、松本功、堤明人、松多邦雄、住田孝之、土屋尚之：*C8orf13-BLK* 領域遺伝子多型と関節リウマチとの関連。第53回日本リウマチ学会総会ワークショップ、2009年4月25日、東京。（リウマチ学会 2009 プログラム抄録集 p288）。

3. 土屋尚之：膠原病の疾患関連遺伝子解析（特別講演）。第5回生物学的製剤治療研究会。2009年7月2日、横浜。
4. 伊東郁恵、川口鎮司、川崎綾、長谷川稔、大橋順、川本学、藤本学、竹原和彦、原まさ子、佐藤伸一、土屋尚之：*C8orf13-BLK* 領域遺伝子多型と全身性強皮症との関連。第54回日本人類遺伝学会。2009年9月24日～26日、東京。
5. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N. Association of *FAM167A (C8orf13) -BLK* region with systemic sclerosis. 2009 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 17-22, 2009, Philadelphia.
6. 土屋尚之：日本人における全身性エリテマトーデス感受性遺伝子（シンポジウム指定演者）。第37回日本臨床免疫学会、平成21年11月13日～15日、東京。
7. 伊東郁恵、川崎綾、大橋順、伊藤聡、近藤裕也、杉原誠人、堀越正信、林太智、後藤大輔、松本功、堤明人、川口鎮司、川本学、長谷川稔、竹原和彦、松多邦雄、原まさ子、佐藤伸一、住田孝之、土屋尚之：関節リウマチ、全身性強皮症と *FAM167A (C8orf13)-BLK* 領域遺伝子多型の関連。第37回日本臨床免疫学会、平成21年11月13日～15日、東京。

2. 実用新案登録なし。

3. その他なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得なし。

表 1 日本人 ANCA 関連血管炎と *FAM167A-BLK* 領域 SNP rs13277113 の関連

	遺伝子型頻度 n (%)			アリル頻度の関連*1		劣性モデル*2	
	A/A	A/G	G/G	P	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)
MPA	31 (62.0)	16 (32.0)	3 (6.0)	0.034	1.68 (1.04-2.72)	0.029	1.91 (1.05-3.41)
CSS	6 (66.7)	3 (33.3)	0 (0)				
WG	3 (37.5)	2 (25.0)	3 (37.5)				
MPO-ANCA+	39 (60.9)	20 (31.3)	5 (7.8)	0.041	1.55 (1.01-2.36)	0.022	1.82 (1.09-3.06)
PR3-ANCA+	5 (45.5)	3 (27.3)	3 (27.3)				
腎障害+	31 (58.5)	17 (32.1)	5 (9.4)	0.15	1.39 (0.89-2.17)	0.08	1.65 (0.94-2.89)
呼吸器症状+	27 (64.3)	11 (26.2)	4 (9.5)	0.067	1.62 (0.97-2.72)	0.021	2.11 (1.12-3.97)
健常対照群	354 (46.1)	334 (43.5)	80 (10.4)		reference		reference

*1 G アリルに対する A アリルの関連

*2 (G/G+A/G)遺伝子型に対する A/A 遺伝子型の関連

OR: オッズ比、CI: 信頼区間

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

皮膚血管炎・血管障害のスペクトラムと臨床・病理所見
診療の手引き「皮膚血管炎アトラス集」（平成21年度研究報告）

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学 岩月啓氏
北里大学医学部 皮膚科学 勝岡憲生

研究要旨 血管炎の診断において皮膚病変は重要な診断の糸口になり、その病理組織所見は決定的な診断情報を提供する。われわれは、皮膚血管炎の皮膚所見を収集して、血管炎分類に準拠して分類したアトラス集を編集することを本研究班3年間の研究課題とした。一般臨床医を対象にした診断の手引きとするために、いわゆる血管炎症候群と類似の臨床所見を示す血管障害を鑑別診断として組み入れ、また、典型例とともに鑑別に苦慮した症例も収集して編集する予定である。

共同研究者

川上民浩 聖マリアンナ医大皮膚科
古川福実 和歌山県立医科大学皮膚科
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

血管炎症候群の分類には幾多の変遷があるが、Chapel-Hill分類は国際的コンセンサスを得た分類である[1-3]。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[4]。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。しかし、一般臨床医にとっては、血管炎分類や診療ガイドラインとともに、診断の手引が必要とされている。血管炎の診断においては、皮膚病変の臨床像とその病理組織所見は重要な情報を提供する。国際的新分類および厚労省研究班に準拠して、一般診療において役立つ「皮膚血管炎アトラス集」を作成することを本研究班の到達目標に設定した。

B. 研究方法

血管炎症例の臨床像と病理組織の収集を行い、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（<http://www.dermatol.or.jp>）[4]）の血管炎分類に従って、再分類を行って、ア

トラス集を編纂する。

C. 研究結果

1. アトラス集構成

第I章は国際分類に準拠した典型例の臨床と病理組織所見を中心とした診療の手引き（表1）、第II章は、鑑別に苦慮した症例集の2章で構成する。

2. 進捗状況

第II章は、商業誌に連載を始めており、すでに15症例が入稿済みである。すべての著作権は編集者に帰属するため、約30症例を再編集して第II章症例集にする予定である。第I章の執筆に際しては、項目立てを行い、執筆者の依頼を行った。

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。