

200936135A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の
genomic DNA 収集に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

平成 22 (2010) 年 5 月

研究代表者 針 谷 正 祥

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者のgenomic DNA収集に関する研究	3
東京医科歯科大学大学院薬害監視学講座 教授	針谷正祥
III. 分担研究報告	
1. 臨床研究と連動した抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者のgenomic DNA収集体制確立に関する研究	7
東京医科歯科大学大学院薬害監視学講座 教授	針谷正祥
岡山大学大学院腎・免疫・内分泌代謝内科学 教授	槇野博史
聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科学 教授	尾崎承一
聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科学 准教授	山田秀裕
(資料1) 「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」 遺伝子解析 研究実施計画書	
2. 抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者のgenomic DNA収集に際しての倫理的整備に関する研究	25
東京医科歯科大学大学院薬害監視学講座 教授	針谷正祥
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 教授	土屋尚之
東京医科歯科大学大学院膠原病・リウマチ内科学 教授	宮坂信之
東京医科歯科大学医学部附属病院臨床試験管理センター 特任准教授	富田 誠
(資料2) 「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」 同意説明文書	
(資料3) 「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」 同意書	
(資料4) 「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」 同意撤回書	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
V. 研究成果の刊行物・別刷	41

I 構成員名簿

平成21年度 難治性疾患克服研究事業 抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の
genomic DNA収集に関する研究 構成員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	針谷 正祥	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科薬害監視学講座	教 授
研究分担者	榎野 博史	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	教 授
	尾崎 承一	聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科学	教 授
	山田 秀裕	聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科学	准教授
	土屋 尚之	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	教 授
	宮坂 信之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病リウマチ内科学	教 授
	富田 誠	東京医科歯科大学医学部附属病院臨床試験管理センター	特 任 准教授

Ⅱ 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服 研究事業）
総括研究報告書

抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集に関する研究

研究代表者 針谷正祥 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科薬害監視学 教授

研究要旨

抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎には顕微鏡的多発血管炎（MPA）、Wegener 肉芽腫症（WG）、アレルギー性肉芽腫性血管炎（AGA）の3疾患が含まれる。我が国ではMPAの発症頻度が最も高く、欧米とは臨床病型の分布に大きな差異があり、厚生労働省難治性血管炎調査研究班による2つの前向き臨床研究でその特徴が解析されている。本研究では、これらの臨床研究と関連させて genomic DNA 検体を収集・解析するための「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」を立案・実施した。比較的短期間の研究実施期間であったにもかかわらず、研究年度中に39検体を収集し得た。引き続き検体を収集し、本研究の目的の一つである難病資源バンクへ寄託すると共に、収集した genomic DNA を用いた遺伝子解析を実施する予定である。

氏名	所属研究機関名	職名
針谷正祥	東京医科歯科大学 大学院	教授
槇野 博史	岡山大学大学院	教授
尾崎 承一	聖マリアンナ医科 大学	教授
山田 秀裕	聖マリアンナ医科 大学	准教授
土屋 尚之	筑波大学大学院	教授
宮坂 信之	東京医科歯科大学 大学院	教授
富田 誠	東京医科歯科大学 医学部附属病院	特任准教授

おけるANCA関連血管炎の臨床的特徴については、厚生労働省難治性血管炎調査研究班による2つの前向き臨床研究から詳細な情報が得られると期待されているが、遺伝子解析研究は欧米に大きく立ち後れている。2つの前向き臨床研究とは、平成16年度から厚生労働省難治性血管炎調査研究班（主任研究者・尾崎承一）において実施されたMPO-ANCA関連血管炎に対する重症度別治療プロトコルの有用性を明らかにする前向き臨床研究（Prospective study of the severity-based treatment protocol for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis; JMA AV）（試験は終了し現在解析中で、約50例が登録）および、平成21年度から厚生労働省難治性血管炎調査研究班（主任研究者・槇野博史）で実施中の抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究（Observational Cohort Study of Remission Induction Therapy in Japanese Patients with ANCA-associ

A. 研究目的

抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎には顕微鏡的多発血管炎（MPA）、Wegener肉芽腫症（WG）、アレルギー性肉芽腫性血管炎（AGA）の3疾患が含まれる。我が国ではMPAの発症頻度が最も高い（推定年間1400名）が、いずれの疾患も推定患者数は非常に少ない（WG 600～800名、AGA 400～500名）。日本人に

ated Vasculitis; RemIT-JAV) (目標登録症例数240例)である。そこで、これらの臨床研究に参加した、あるいは参加予定のANCA関連血管炎患者genomic DNAを収集し、資源バンクに寄託することを主目的とする遺伝子解析研究を立案・実施することを、本研究の目的とした。本研究計画の最大の特徴および利点は、詳細な臨床データと関連づけが可能な患者genomic DNAを収集出来る点であり、多彩な臨床経過・治療反応性を示す本疾患の遺伝子研究上、そのメリットは非常に大きいと考えられる。

B. 研究方法

「臨床研究と連動した抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集体制確立に関する研究」および「抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集に際しての倫理的整備に関する研究」の2つの分担研究を立ち上げた。

1. 臨床研究と連動した抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集体制確立に関する研究

JMAAVに登録済みのMPO-ANCA関連血管炎患者44例(死亡例除く)、RemIT-JAV登録予定のANCA関連血管炎患者(240例予定)を基本的な対象患者とし、選択基準・除外基準を設定した。患者同意取得、試料収集、genomic DNA抽出・保管、遺伝子解析研究実施、難病資源バンクへの寄託までの手順を検討し、平成21年度中に試料収集が終了しない可能性を考慮し、平成22年度以降の収集・保管体制も検討した。さらに本遺伝子解析研究の特徴である各臨床研究との連携方法についても詳細に検討した。これらの結果を踏まえて、「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」遺伝子解析研究実施計画書を作成し、研究を実施した。

2. 抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集に際しての倫理的整備に関する研究

本研究班で実施する「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」の研究手順上、遵守すべき指針等を検討し、併せて倫理的問題点を抽出した。その検討結果を踏まえて、「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」遺伝子解析研究実施計画書に関する同意説明文書、同意書、同意撤回書を作成した。

C. 研究結果

1. 臨床研究と連動した抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集体制確立に関する研究

- (1) 「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」の遺伝子解析研究計画書を作成し、研究協力機関に配布した。研究協力施設における倫理審査委員会等審査承認状況は、平成22年3月現在、10施設で倫理審査委員会承認済み、残りの参加予定施設で同委員会等申請中である。
- (2) 検体収集のための委託業務準備として、ゲノムDNA抽出を依頼する委託先と、個人情報と連結可能匿名化して検体収集するための打ち合わせを9月から実施し、伝票および検体収集用資材を確定し、1月から収集用キットを各施設に配布した。
- (3) 検体収集状況は、平成21年5月現在、39検体が収集された。RemIT-JAV参加患者の検体が28、JMAAV参加患者の検体が11であった。全ての検体からは適切にゲノムDNAが抽出され、研究計画書に沿って保管されている。

2. 抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集に際しての倫理的整備に関する研究

資料収集・保管・解析における倫理的問題点の抽出と対策を検討し、その結果を踏まえて同意説明文書、同意書、同意撤回書を作成した。一般

の方には難解な遺伝子・遺伝子と病気について冒頭で概説し、本研究の概要、目的・意義、方法、試料の保管・二次利用、予想される利益・不利益、研究協力の任意性と撤回の自由、個人情報保護、研究成果の公表、解析結果を知る権利、費用、問い合わせ先について順次記載した。

D. 考察

ANCA 関連血管炎は腎病変・肺病変を呈する全身性炎症性疾患であり、副腎皮質ステロイド薬、免疫抑制薬による治療が行われるが、重症感染症を始めとして治療上の合併症も多く、その治療戦略には未だ改善すべき問題点が数多く残されている。また、我が国と欧米では ANCA 関連血管炎の病態が異なっており、日本独自の症例に基づいた臨床研究が非常に重要である。

本研究によって日本人 ANCA 関連血管炎患者ゲノム DNA を臨床データと共に集積することができれば、今後の ANCA 関連血管炎の病因・病態の解明のみならず、薬理遺伝学的解析によるより有効かつ安全な治療方針の検討が可能となるため、その学術的意義は非常に高い。また、欧米のデータとの国際比較も可能となることから、国際的にも意義のあるデータが得られる。

一方、本研究課題により難病研究資源バンクへの寄託が実現すると、今後の我が国における ANCA 関連血管炎の遺伝子研究を加速させ、その結果として難治性疾患である ANCA 関連血管炎の治療成績・予後改善をもたらす、行政および国民医療に貢献できる研究となる。しかし、現在実施されている連結不可能匿名化での検体提供システムには、臨床情報の提供と臨床研究に携わる研究者のインセンティブ保護のバランスの面から問題も残されており、今後検討されるべき点と考えられる。

今後、本研究課題で収集されるゲノム DNA を使用して、ゲノムワイド関連研究および候補遺伝子を用いた関連研究の両面から、収集した DNA の解析を進める予定である。これらの遺伝子解析研究により、ANCA 関

連血管炎の日本人における関連遺伝子が同定され、病因・病態解析が進展することが期待される。

E. 結論

厚生労働省難治性血管炎調査研究班による 2 つの前向き臨床研究と関連させて genomic DNA 検体を収集・解析するための「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」を立案・実施した。

比較的短期間の研究実施期間であったにも関わらず、研究年度中に 39 検体を収集し得た。引き続き検体を収集し、本研究の目的の一つである難病資源バンクへ寄託すると共に、収集した genomic DNA を用いた遺伝子解析を実施する予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

- (1) Takakuwa Y., Kurokawa S. M., Ooka S., Nagai K., Arito M., Masuko K., Suematsu N., Okamoto K., Ozaki S. and Kato T.: Comprehensive analyses of serum peptides in microscopic polyangitis. The 73th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2009. 10. Philadelphia, U.S.A.
- (2) Shen N, Fu Q, Deng Y, Zhao J, Qian XX, Tang YJ, Kaufman K, Chen JY, Kawasaki A, Tsuchiya N, Kawaguchi Y, Yang WL, Yu CY, Howe HS, Mok MY, Harley J, Guthridge J, Grossman JM, Cantor RM, Song YW, Bae SC, Chen SL, Hahn B, Lau YL, Tsao B. Gender Specific Association of X-linked TLR7 with Male SLE. 2009 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 17-22, 2009, Philadelphia.
- (3) 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.
- (4) Hikami K, Kawasaki A, Ito I, Koga M, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Arinami T, Sumida T, Tsuchiya N. Association of SPI1 3'-untranslated region polymorphism with systemic lupus erythematosus. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting, Oct 20-24, Honolulu.
- (5) 佐田憲映, 榎野博史: 血管炎 顕微鏡的多発血管炎患者の厚生労働省臨床個人調査票データを用いた血管炎分類アルゴリズムの検討第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 2009 年 4 月 23 日～26 日
- (6) 山村昌弘, 佐田憲映, 針谷正祥, 藤井隆夫, 尾崎承一, 榎野博史: リウマチ性疾患の長期アウトカム ANCA 関連血管炎のアウトカム研究 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 2009 年 4 月 23 日～26 日
- (7) 山村昌弘, 佐田憲映, 針谷正祥, 藤井隆夫, 有村義宏, 榎野博史: 難治性血管炎調査研究班「わが国の難治性血管炎研究の現況—過去から未来へ—」4) RemIT-JAV 研究: わが国の ANCA 関連血管炎の診療実態の把握を目指して 第 50 回日本脈管学会総会 東京 2009 年 10 月 29 日～30 日
- (8) 尾崎承一: 血管炎症候群の病態と治療。第 106 回日本内科学会総会。2009 年 4 月 10-12 日。東京。
- (9) 尾崎承一: 血管炎症候群に対するリツキシマブ療法。第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 23-26 日。新高輪。
- (10) 石津明洋、外丸詩野、岩崎沙理、吉木敬、尾崎承一: MPO-ANCA 関連血管炎患者抹消血のトランスクリプトーム解析。第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会。2009 年 4 月 23-26 日。新高輪。
- (11) Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. Association of TNFAIP3 polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. 第 39 回日本免疫学会総会 平成 21 年 12 月 2 日～4 日、大阪。
- (12) 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。
- (13) 氷上光輝、川崎 綾、伊東郁恵、古賀農人、伊藤 聡、林 太智、後藤 大輔、松本 功、堤 明人、高崎芳成、橋本博史、有波忠雄、住田孝之、土屋 尚之: SPI1 遺伝子 3' 非翻訳領域多型と全身性エリテマトーデスとの関連。第 54 回日本人類遺伝学会。2009 年 9 月 24 日～ 26 日、東京。
- (14) 冨田 誠、栗原 考次: 遺伝統計解析における DNA マーカーの LD 集積性, 第 1 回大規模データ科学に関する研究会, 北海道大学情報基盤センター, 2009 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録
特記事項なし

Ⅲ 分担研究報告

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

臨床研究と連動した抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集体制確立に関する研究

研究代表者 針谷正祥 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科薬害監視学 教授

研究分担者 槇野 博史 岡山大学大学院腎・免疫・内分泌代謝内科学 教授

研究分担者 尾崎 承一 聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科 教授

研究分担者 山田 秀裕 聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科 准教授

研究要旨

日本人における ANCA 関連血管炎の臨床的特徴については、厚生労働省難治性血管炎調査研究班による 2 つの前向き臨床研究 (JMAAV および RemIT-JAV) によって詳細な情報が得られると期待されている。そこで、JMAAV に登録済みの MPO-ANCA 関連血管炎患者 44 例 (死亡例除く)、RemIT-JAV 登録予定の ANCA 関連血管炎患者 240 例 (登録予定患者数) から可能な限り多くの検体を収集し、最終的に資源バンクに寄託することを主目的とする「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」を立案・実施した。JMAAV および RemIT-JAV 研究本部との打ち合わせ、検体収集のための委託業務準備を経て、遺伝子解析実施計画書を策定した。平成 22 年 4 月現在、10 施設で倫理審査委員会承認済み、残りの参加予定施設で同委員会等申請中であり、平成 21 年 5 月現在、39 検体 (RemIT-JAV 参加患者検体 28、JMAAV 参加患者検体 11) が収集され、東京医科歯科大学薬害監視学講座に保管された。残りの検体に関しては平成 23 年度以降に引き続き厚生労働省難治性血管炎調査研究班を通じて収集・保管する予定である。

A. 研究目的

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎には顕微鏡的多発血管炎 (MPA)、Wegener 肉芽腫症 (WG)、アレルギー性肉芽腫性血管炎 (AGA) の 3 疾患が含まれる。我が国では MPA の発症頻度が最も高い (推定年間 1400 名) が、いずれの疾患も推定患者数は非常に少ない (WG 600~800 名、AGA 400~500 名)。日本人における ANCA 関連血管炎の臨床的特徴については、厚生労働省難治性血管炎調査研究班による 2 つの前向き臨床研究 (JMAAV および RemIT-JAV) によって詳細な情報が得られると期待されているが、遺伝子解析研究は欧米に大きく立ち後れている。本分担研究では、これらの臨床研究に参加したあるいは参加予定の ANCA 関連血管炎患者 DNA を収集し、

資源バンクに寄託することを主目的とする遺伝子解析研究計画を立案・実施することを目的とした。

B. 研究方法

1. 目標試料数

JMAAV に登録済みの MPO-ANCA 関連血管炎患者 44 例 (死亡例除く)、RemIT-JAV 登録予定の ANCA 関連血管炎患者 240 例 (登録予定患者数) から可能な限り多くの検体を収集する。

2. 対象患者

- (1) 選択基準: JMAAV または RemIT-JAV に登録され、本研究への参加に関する文書同意が得られる成人患者。
- (2) 除外基準・研究参加中止基準: 患者が選択基準に該当しないと判明した場合、患者が同意を撤回した場合

3. 研究手順の概要

- (1) 倫理審査委員会による研究計画の審査・承認
 - (2) 研究参加施設における対象患者の選択および文書同意取得
 - (3) 研究参加施設における対象患者からの採血および連結可能匿名化、DNA抽出委託機関への送付、研究本部（東京医科歯科大学）への当該患者の臨床試験（JMAAVまたはRemIT-JAV）登録ID報告
 - (4) 委託機関でのDNA抽出および研究本部への送付
 - (5) 研究本部でのDNA検体の受け取り、照合、保管
 - (6) 難病資源バンクへの寄託（本研究期間終了後）
 - (7) 遺伝子解析研究実施（本研究期間終了後）
 - (8) 難病資源バンクへの寄託：本研究で収集する各DNA検体の一部をJMAAVおよびRemIT-JAVの解析終了後には連結不可能匿名化の上、難病研究資源バンクに寄託する。
- ### 4. 平成22年度以降の検体収集

JMAAV登録患者に関しては、可能な限り平成21年度中に試料収集を完了し、収集出来ない症例については平成22年度以降に収集・保管する。RemIT-JAVの患者登録期間は平成22年12月31日までであるため、本研究の研究期間終了後も本研究課題の期間内と同様に検体を収集・保管する。

5. 各臨床研究との連携方法の検討

本研究では、各臨床試験・臨床研究（JMAAVまたはRemIT-JAV）で収集したデータと遺伝子解析結果を関連づける必要がある一方で、試料収集時の各施設における匿名化を維持する仕組みが必要である。そのため、以下の方法を立案した：JMAAVまたはRemIT-JAVの研究本部は、JMAAVまたはRemIT-JAVで収集したデータを整理したのちに研究参加施設に送付し、各研究参加施設は試

料を提供した患者データのみを選択し、試料と同じ連結可能匿名化済みのIDを付与して本研究の研究本部（東京医科歯科大学薬害監視学講座）に提供する。東京医科歯科大学の個人識別情報管理者・同補助者が同一患者のgenomic DNA検体と同一のID（第2回連結可能匿名化でgenomic DNAに付与したID）を臨床情報に付与したのちに、遺伝子解析に使用する。

C. 研究結果

1. 遺伝子解析研究計画書の作成および研究協力施設における倫理審査委員会等審査承認状況
「抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究」の遺伝子解析研究計画書を作成し、研究協力機関に配布した。平成22年4月現在、10施設で倫理審査委員会承認済み、残りの参加予定施設で同委員会等申請中である。

2. 検体収集のための委託業務準備

genomic DNA抽出を依頼する委託先と、個人情報連結可能匿名化して検体収集するための打ち合わせを9月から実施し、伝票および検体収集用資材を確定し、1月から収集用キットを各施設に配布した。

3. 検体収集状況

平成21年5月現在、39検体が収集された。RemIT-JAV参加患者の検体が28、JMAAV参加患者の検体が11であった。全ての検体からは適切にgenomic DNAが抽出され、研究計画書に沿って保管されている。

D. 考察

我が国と欧米ではANCA関連血管炎の臨床病型の分布が大きく異なっており、日本独自の症例に基づいた臨床研究が非常に重要である。

本研究によって日本人ANCA関連血管炎患者genomic DNAを臨床データと共に集積することができれば、今後のANCA関連血管炎の病因・病態の解明のみならず、薬理遺伝学的解析によるより有効かつ

安全な治療方針の検討が可能となるため、その学術的意義は非常に高い。また、欧米のデータとの国際比較も可能となることから、国際的にも意義のあるデータが得られると予想される。

本研究課題への交付決定から6か月間で、難病研究資源バンクとの調整、遺伝子解析研究計画の作成、研究協力施設への依頼、一部の施設での承認、ゲノムDNA委託業者との折衝および具体的な収集体制確立し、39検体を収集した経緯を考慮すると、本研究課題は比較的効率よく実施できたと考えられる。

E. 結論

ANCA関連血管炎患者の genomic DNA を収集するための研究計画を立案し、各参加施設での倫理審査を経て、検体を収集した。限られた研究期間ではあったが、厚生労働省難治性血管炎調査研究班による2つの前向き臨床研究に参加し、臨床経過が詳細に記録されている患者39名の genomic DNA を収集することができた。残りの検体に関しては平成23年度以降に引き続き厚生労働省難治性血管炎調査研究班を通じて収集・保管し、遺伝子解析研究を進める予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ooka S, Maeda A, Ito H, Omata M, Yamada H, Ozaki S: Treatment of refractory retrobulbar granuloma with rituximab in a patient with ANCA-negative egener's granulomatosis: a case report. *Mod Rheumatol*. 19(1):80-3. 2009.
- (2) Nakamura T, Kanazawa N, Ikeda T, Yamamoto Y, Nakabayashi K, Ozaki S, Furukawa F.: Cutaneous polyarteritis nodosa: revisiting its definition and diagnostic

criteria. *Arch Dermatol Res*.

301(1):117-121. 2009.

- (3) Maeda A., Okazaki T., Inoue M., Kitazono T., Yamasaki M., François A. Lemonnier, Ozaki S: Immunosuppressive effect of angiotensin receptor blocker on stimulation of mice CTLs by angiotensin II. *International Immunopharmacology* 9: 1183-1188, 2009. 6

2. 学会発表

- (1) Takakuwa Y., Kurokawa S. M., Ooka S., Nagai K., Arito M., Masuko K., Suematsu N., Okamoto K., Ozaki S. and Kato T.: Comprehensive analyses of serum peptides in microscopic polyangiitis. The 73th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. 2009.10. Philadelphia, U.S.A.
- (2) 佐田憲映, 榎野博史: 血管炎 顕微鏡的多発血管炎患者の厚生労働省臨床個人調査票データを用いた血管炎分類アルゴリズムの検討第53回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 2009年4月23日～26日
- (3) 山村昌弘, 佐田憲映, 針谷正祥, 藤井隆夫, 尾崎承一, 榎野博史: リウマチ性疾患の長期アウトカム ANCA関連血管炎のアウトカム研究 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京 2009年4月23日～26日
- (4) 山村昌弘, 佐田憲映, 針谷正祥, 藤井隆夫, 有村義宏, 榎野博史: 難治性血管炎調査研究班「わが国の難治性血管炎研究の現況—過去から未来へ—」4) RemIT-JAV研究: わが国のANCA関連血管炎の診療実態の把握を目指して 第50回日本脈管学会総会 東京 2009年10月29日～30日
- (5) 尾崎承一: 血管炎症候群の病態と治療。第

106回日本内科学会総会。2009年4月10-12日。東京。

- (6) 尾崎承一: 血管炎症候群に対するリツキシマブ療法。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009年4月23-26日。新高輪。
- (7) 石津明洋、外丸詩野、岩崎沙理、吉木敬、尾崎承一: MPO-ANCA 関連血管炎患者抹消

血のトランスクリプトーム解析。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会。2009年4月23-26日。新高輪。

H. 知的財産権の出願・登録
特記事項なし

資料 1

遺伝子解析研究実施計画書

受付番号

107

研究責任者氏名	針谷正祥	研究責任者所属・職	東京医科歯科大学大学院医歯学総合 研究科薬害監視学・教授	
研究題目	抗好中球細胞質抗体関連血管炎関連遺伝子に関する研究			
研究遂行者（遺伝子解析研究責任者及び遺伝子解析実施者）				
氏名	所属	職	責任者・実施者の別	役割分担
針谷 正祥	東京医科歯科大学大 学院薬害監視学	教授	責任者	遺伝子解析研究責任者、研究全 体の統括、研究計画策定
槇野 博史	岡山大学大学院、 腎・免疫・内分泌代 謝内科学	教授	実施者	臨床研究(RemIT-JAV)との連携
尾崎 承一	聖マリアンナ医科大 学リウマチ・膠原 病・アレルギー内科 学	教授	実施者	臨床研究(JMAAV)との連携
山田 秀裕	聖マリアンナ医科大 学リウマチ・膠原 病・アレルギー内科 学	准教授	実施者	臨床研究(JMAAV)との連携
土屋 尚之	筑波大学大学院分子 遺伝疫学研究室	教授	実施者	遺伝子解析実施者
宮坂 信之	東京医科歯科大学大 学院膠原病・リウマ チ内科学	教授	実施者	臨床データの解析
富田 誠	東京医科歯科大学医 学部附属病院臨床試 験管理センター	特任准教授	実施者	遺伝子解析実施者 遺伝子解析結果の生物統計学的 検討
研究期間	東京医科歯科大学医学部遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会承認後から 平成26年3月31日まで (遺伝子解析研究の進捗により、必要であれば延長申請する場合もある。東京医科歯科 大学以外の施設においては、各施設での遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会承認後 から平成26年3月31日までとする。)			

研究目的（研究期間中に何をどこまで明らかにしようとするのかを記入）

抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎は、小血管に病変の主座を有する血管炎症候群の中の一群の疾患であり、顕微鏡的多発血管炎（MPA）、Wegener 肉芽腫症（WG）、アレルギー性肉芽腫性血管炎（AGA）の3疾患が含まれる。いずれも病因が不明で、いわゆる難治性疾患と言われている。我が国ではMPAの発症頻度が最も高い（推定年間1400名）が、いずれの疾患も推定患者数は非常に少ない（WG 600～800名、AGA 400～500名）。日本人におけるANCA関連血管炎の臨床的特徴については、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」による2つの前向き臨床研究によって詳細な情報が得られると期待されているが、欧米におけるANCA関連血管炎との間には、疫学的にも臨床像においても顕著な違いが見られ、疾患関連遺伝子においても、日本人におけるエビデンスの集積が必須である。本研究では、2つの前向き臨床研究に参加した患者を対象としてANCA関連血管炎のゲノムの解析のためのgenomic DNA収集を行い、臨床情報と関連付けた遺伝子解析を進めることにより、我が国における本疾患の病因・病態研究を促進することを第一の目的とする。さらに、得られたゲノムは提供者の同意のもと、保存したDNAを品質管理が厳格で、公共性が高い資源バンクに寄託し、我が国における本疾患の研究を一層促進させることを第二の目的とする。

ゲノム解析は、候補遺伝子を用いた関連研究およびゲノムワイド関連研究の両面から実施する。ゲノムワイド関連研究は、全身性エリテマトーデスを始めとする自己免疫疾患において、その有効性が既に示されており、従来の病因・病態論からは予測できないような関連遺伝子を見出せる可能性があるため、ANCA関連血管炎のような病因が不明な疾患の研究に極めて有用である。現在、ゲノムワイド関連研究に広く使用されている解析方法は、集団中にある程度高い頻度で存在する数十万個所の一塩基多型（SNP）を用いて患者集団と対照集団での頻度の差を解析する方法であり、日本人のように遺伝的に比較的同質な集団においては、寄与率が必ずしも高くない遺伝子をかなり狭い責任領域に特定出来る可能性がある。ANCA関連血管炎のゲノムワイド関連研究の報告は、国内外を通じて、これまでに見られない。

一方、ゲノムワイド関連研究のみでは、コピー数多型や、集団中には稀であるが、発症における寄与が大きい疾患関連変異の検出が不可能である。これらは、候補遺伝子解析によって検討する必要がある。

このように、前向きに収集した豊富な臨床情報と関連付けられる遺伝子解析は本疾患あるいは類縁疾患において他に類がなく、極めて特色のある遺伝子研究であり、大きな研究成果が期待される。

研究方法（研究対象とする遺伝子の内容、試料提供者を選ぶ方針、基準を含む）

4. 研究対象とする遺伝子の内容と解析範囲

連結可能匿名化されたヒト末梢血（以下、検体と記載）よりゲノムDNAを抽出し、候補遺伝子を用いた関連研究およびゲノム全体に分布する一塩基多型（SNP）を対象とするゲノムワイド関連研究を施行する。候補遺伝子解析では、血管炎や他の自己免疫疾患におけるこれまでの研究成果から選定された免疫系遺伝子（HLA領域、I型インターフェロン経路関連遺伝子群、T細胞・B細胞・抗原提示細胞において機能する遺伝子群など）を解析対象とする。「MPO-ANCA関連血管炎に対する重症度別治療プロトコルの有用性を明らかにする前向きコホート調査研究」（Japan MPO-ANCA associated vasculitis study; JMAAV）および「抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究」（Observational Cohort of Remission Induction Therapy in Japanese Patients with ANCA-associated Vasculitis; RemIT-JAV）で得られた臨床情報（病型、治療効果、副作用など）と遺伝学的解

析結果とから疾患関連遺伝子を探索する。

5. 試料提供者を選ぶ方針、考え方、または基準

本研究は、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」による2つの臨床試験「MPO-ANCA 関連血管炎に対する重症度別治療プロトコルの有用性を明らかにする前向きコホート調査研究」(JMAAV)および「抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究」(RemIT-JAV) と連携して実施する遺伝子解析研究である。JMAAV または RemIT-JAV に参加し、かつ本研究について十分に説明を受け、本人からインフォームド・コンセントを取得することが可能な患者のみを対象とする。ANCA 関連血管炎の診断は共同研究機関において確定されており、患者もその診断名を告知されている。なお、未成年者は研究対象から除外する。ANCA 関連血管炎の診断を受けている患者に加え、対照者として、連結不可能匿名化された健常人ゲノムDNAをヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSRRB) から入手、使用する。

なお、検体を取り扱うものの感染の危険性については、感染性が高いために検体の提供に不適さいと判断された場合には、提供されないこととする。ANCA関連血管炎の診断を受けている検体提供者の場合には、临床上、必要な感染性病原体の検査は実施され、臨床記録として残されている。

6. 目標試料数

JMAAVに登録済みのMPO-ANCA関連血管炎患者約50例、RemIT-JAV登録予定のANCA関連血管炎患者240例(登録目標例数)から可能な限り多くの検体を収集する。対照群としては、年齢、性別を適合させた健常人ゲノムDNA約300例をHSRRBより購入する。

患者・健常者をそれぞれ300検体、集団中のリスクアリアル頻度を0.3と仮定し、有意水準を0.05とした場合、遺伝子型相対危険度1.4の感受性遺伝子を約80%の検出力で検出する。ゲノムワイド関連研究における多重検定を考慮し、有意水準を 1×10^{-5} とした場合、遺伝子型相対危険度1.9の遺伝子に関して、約80%の検出力が確保される。多因子疾患のゲノムワイド関連研究における検体数としては、必ずしも十分とは言えないものの、加齢黄斑変性症におけるゲノムワイド関連研究(Klein et al., Science 2005)では、患者96、対照者50という小さなサンプルサイズであるにもかかわらず、Complement factor Hの関連が検出されている。ANCA関連血管炎は、満足すべき治療がなく、生命予後不良の稀少疾患であることを考慮し、今回のサンプルサイズで、寄与の大きな疾患感受性遺伝子を検出するとともに、寄与が中程度である遺伝子の候補を多数見出し、今後の検証の対象とすることは、本疾患の研究上、意義深いものであると考える。

7. 研究方法 (図1)

a 東京医科歯科大学医学部遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会による研究計画の審査・承認

b 共同研究機関(本研究の研究遂行者が所属する機関)および研究参加施設(JMAAVまたはRemIT-JAVに参加し、本研究に用いるヒト末梢血を採取する施設、以下研究参加施設と記載)(表1)の遺伝子解析研究倫理審査委員会による研究計画の審査・承認

- c 研究参加施設における対象患者の選択および文書同意取得。同意時には、上記臨床研究で収集した各患者のデータを遺伝子解析研究に用いることも併せて同意文書に記載
- d 研究参加施設における対象患者からの採血、連結可能匿名化、DNA抽出外部委託機関（株式会社エスアールエル）への送付
- e 外部委託機関（株式会社エスアールエル）でDNAを抽出し、研究本部（東京医科歯科大学薬害監視学）へ送付
- f 研究本部でのDNA検体の受け取り、連結可能匿名化（2回目）を実施。東京医科歯科大学の個人識別情報管理者・同補助者はアルファベットおよび数字で構成される4桁の新たなIDを各検体に付与し、対応表を「個人識別情報を含む情報の保護方法」に記載した方法によって厳重に保護し、保管する。DNA検体の保管、研究参加施設への報告。研究参加施設には収集検体数に応じた研究協力費（5000円）を研究本部から支払う。
- g 研究本部から資源バンクへの寄託：寄託時期、公開時期、公開方法などは試料の収集状況および遺伝子解析研究の進捗状況によるため、資源バンクと調整予定である。平成21年7月現在の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針14(2)」に基づいて資源バンクへ試料を寄託する場合には、連結不可能匿名化を行うと共に、バンクに提供することの同意を含む提供者の同意事項を遵守する。新たな遺伝子解析倫理指針等が将来示された場合には、その指針を順守して行う。
- h 遺伝子解析研究実施：遺伝子解析（生物統計学的検討を含む）は東京医科歯科大学薬害監視学（針谷正祥、遺伝子解析研究責任者）、筑波大学大学院分子遺伝疫学研究室（土屋尚之、遺伝子解析実施者）、東京医科歯科大学臨床試験管理センター（富田 誠、遺伝子解析実施者）で実施する。ゲノムワイド関連研究に関しては、外部委託をする予定であるが、現時点では具体的な委託機関の決定が困難であり、今後調整を進める。委託を実施する際には、事前に東京医科歯科大学医学部遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会に委託先に関する変更申請を研究本部が行い、承認後に委託を実施する。「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針7(10)、(11)」の記載に基づき、受託者に「倫理審査委員会の承認を受け、研究を行う機関の長の許可を受けた」旨を文書で提示するとともに、連結可能匿名化した試料（ゲノムDNA）に、改めて別のIDを付し（第3回連結可能匿名化）、受託者に提供する。受託業務終了後は、全試料を受託者より回収し、再度、研究本部にて保管する。第3回連結可能匿名化の際には、第2回連結可能匿名化と同様に、東京医科歯科大学の個人識別情報管理者・同補助者がアルファベットおよび数字で構成される4桁の新たなIDを各検体に付与し、対応表を「個人識別情報を含む情報の保護方法」に記載した方法によって厳重に保護し、保管する。
- i 臨床研究との連携：本研究では、各臨床試験・臨床研究（JMAAVまたはRemIT-JAV）で収集したデータと遺伝子解析結果を関連づける。そのため、JMAAVまたはRemIT-JAVの研究本部は、JMAAVまたはRemIT-JAVで収集したデータ（データ収集用の用紙を表2、表3に示す）を整理したのちに研究参加施設に送付し、各研究参加施設は試料を提供した患者データのみを選択し、試料と同じ連結可能匿名化済

みのIDを付与して本研究の研究本部に提供する。東京医科歯科大学の個人識別情報管理者・同補助者が同一患者のゲノムDNA検体と同一のID（第2回連結可能匿名化でゲノムDNAに付与したID）を臨床情報に付与したのちに、遺伝子解析に使用する。

この研究に関連した経験・実績とその対応

平成16年度から厚生労働省難治性血管炎調査研究班（主任研究者・尾崎承一）においてMPO-ANCA関連血管炎に関する前向き臨床試験（JMAAV）が実施された（約50名が登録、試験は終了）。平成20年度に厚生労働省難治性血管炎調査研究班（主任研究者・楨野博史）で抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究（RemIT-JAV）が立案され、平成21年度から試験が開始されている（登録予定患者数240名。現在患者登録が進行中）。

遺伝子解析研究責任者の針谷正祥は、リウマチ性疾患における遺伝子解析研究に共同研究者として参加し、以下の成果を報告した。

- ① 日本人健常者約800名から末梢血由来 genomic DNA（以下、DNA）を収集すると共に、末梢血B細胞由来EBウイルスB細胞株を樹立し、これらのB細胞株をヒューマンサイエンス研究資源バンクに寄託した。収集した健常者DNAを用いて、199の薬剤関連遺伝子の single nucleotide polymorphism (SNP) および haplotype を決定し報告した (Am. J. Hum. Genet 2004)。
- ② 日本人強皮症患者における IL-1A 遺伝子、成人スチル病における IL-18 遺伝子の SNP を解析し、疾患との有意な関連性を報告した (Arthritis Rheum 2003, Genes Immun 2002)。

遺伝子解析実施者の土屋尚之は、全身性エリテマトーデス (SLE)、強皮症を中心に、日本人集団における疾患感受性遺伝子解析を十数年にわたり継続しており、その成果を80編以上の英文論文に報告してきた。代表的成果としては、SLEと *FCGR2B* との関連の発見 (Arthritis Rheum 2002)、日本人集団における *IRF5* (Arthritis Rheum 2008)、*STAT4* (Arthritis Res Ther 2008)、*BLK* (Arthritis Rheum 2009) と SLE との関連、*IRF5* (Arthritis Rheum 2009)、*STAT4* (Ann Rheum Dis 2009) と強皮症との関連の報告などがあげられる。また、これまでも「難治性血管炎に関する調査研究班」の分担研究者として日本人 ANCA 関連血管炎の遺伝子解析を施行し、*HLA-DRB1*0901-DQB1*0303* haplotype (Genes Immun 2007)、*KIR* (Arthritis Rheum 2006)、*LILRA2* (Genes Immun 2008) との関連を報告してきた。

遺伝子解析実施者の富田 誠は、主に1,000座位程度毎に絞り込まれた領域に対し、haplotype block 同定や Tag SNPs 選択の方法を提案し (Comput. Stat. Data Anal. 2008)、遺伝子解析についても、これらを応用した関連解析の有意な結果を報告した (Schizophr. Res. 2009a, 2009b)。

研究に要する費用種別（運営費、科学研究費等）

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集に関する研究」研究費
研究費補助金難治性疾患克服研究事業「難治性血管炎調査研究班」研究費
などの研究費を用いる

予想される成果

代表的リウマチ性疾患である SLE、関節リウマチでは疾患関連遺伝子解析によって、日本人患者の発症・予後に関わる重要な遺伝子が次々と見いだされ、新たな病態・治療標的の解明に結びつく可能性が示されている。一方、ANCA 関連血管炎では副腎皮質ステロイド薬、免疫抑制薬による治療が行われているが、重症感染症を始めとして治療上の合併症も多く、その治療戦略には未だ改善すべき問題点が数多く残されている。

本研究の第一の成果として、MPO-ANCA 関連血管炎に関する前向き臨床試験 (JMAAV) に登録済みの MPO-ANCA 関連血管炎患者約 50 例、抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究 (RemIT-JAV) 登録予定の ANCA 関連血管炎患者 240 例から可能な限り多くの検体を収集することが期待される。血管炎のような複雑な病態を呈する疾患においては、個々の臨床所見や治療応答性と関連する遺伝子多型を検出することが重要であり、そのためには、正確な臨床情報の存在が不可欠である。これまで我が国において、このような規模で、臨床情報を伴ったゲノム DNA の解析が行われたことはなく、今回の研究はきわめて重要な意義を有する。

本研究の第二の成果として、疾患関連遺伝子の同定が期待される。疾患関連遺伝子としては免疫系に關与する遺伝子が予想され、病因・病態の解明のみならず、新規治療標的および治療法の発見につながる可能性が高く、本疾患ならびに類縁疾患の研究に新たな展望を開くものと期待される。第三の成果として、ANCA 関連血管炎患者ゲノム DNA の資源バンクへの寄託を通じた我が国における本領域の研究の加速が期待される。これは、本疾患の稀少性を考慮すると、きわめて重要な貢献であると考えられる。

予想される被験者への危険や不利益

本研究においてヒト末梢血の採取は通常の臨床静脈採血と同様の方法で行われるので、それに伴う身体的・精神的不利益は小さいと考えられるが、採血時の身体的損傷・反応 (まれにみられる迷走神経反射など) に対しては臨床上に適切とみなされる処置を遅滞なく行い対応する。

遺伝子解析結果自体による倫理的・法的・社会的不利益は匿名化・情報管理の体制 (以下に説明する) により防止する。また遺伝子解析を行うことに伴う心理的不利益に対しては、研究参加施設における主治医が相談・情報提供の機会を提供する。

本研究はヘルシンキ宣言 (2008 年 10 月、第 59 回 WMA ソウル総会) およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 (平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正) 文部科学省、厚生労働省及び経済産業省) を遵守して実施する。

※被験者への説明文書及び同意文書を添付すること

個人識別情報を含む情報の保護方法

<管理方法> (図 2)

個人情報は、個人情報管理者により研究参加施設 (末梢血採取機関) にて管理され、本研究の遺伝子解析研究責任者及び遺伝子解析実施者には原則として個人情報の伝達は行われぬ。研究参加施設 (ヒト末梢血採取機関) の個人情報管理者は、患者に対して独自の ID (参加施設用 ID) を付与し、病院での患者 ID、患者氏名、住所、電話番号、生年月日を削除する連結可能匿名化を行う。これらの対応表は、各研究参加施設 (末梢血採取機関) における倫理審査委員会の承認を受けた方法により、厳重に保管される (第 1 回連結可能匿名化)。研究本部 (東京医科歯科大学薬害監視学) は、研究参加施設 (末梢血採取機関) の個人識別情報管理者により付与された ID とともに匿名化された試料 (ゲノム DNA) および匿名化された臨床情報を受けとる。

東京医科歯科大学においては、試料および臨床情報の情報管理は、研究実施者が所属する研究班とは独立に、東京医科歯科大学学長より個人識別情報管理者 (医学部附属病院長) を指定し、これを行う。個人識別情報管理補助者は、個人識別情報管理者より指名、監督の下、個人情報が含まれる情報の匿名化を行う。

個人識別情報管理者 (管理補助者) が管理を行う具体的手順は以下の通りである。試料及びそれに付随する臨床情報には、研究本部の独自 ID が新たに付与される (研究本部用 ID)。これは研究参加施設 (末梢血採取