

重症・最重症群(n=23)と軽症群(n=21)の治療前後のVDIとVDIの変化率

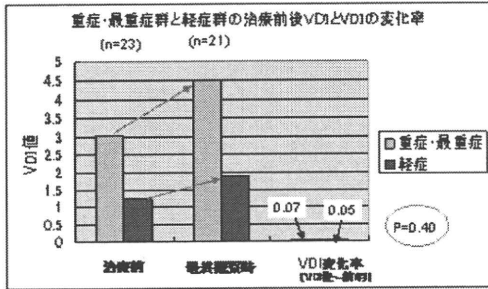


図 3. 重症・最重症群と軽症群の VDI の変化

重症・最重症群は、治療開始時および最終観察時で、軽症群と比べ、高い VDI を示したが、VDI の増加に関しては両群での差異は認めなかった(図 3)。非寛解群は治療開始時および最終観察時で、寛解群と比べ、高い VDI を示したが、VDI の増加には差異を認めなかった(data not shown)。

以上より、最終観察時の VDI は、治療開始時の VDI に規定されることが推定された。つまり、標準的治療により、重症・最重症群であっても軽症群に比べ VDI の増加には統計学的な差異はなかった。また、同様に、非寛解群であっても、標準的な治療により、寛解群と比べて VDI の増加には統計学的な差異はなかった。

また、最終観察時の VDI を BVAS と比較検討した結果、治療開始時の BVAS persistent が 4 以上の場合と 4 未満の場合で、最終観察時の VDI が、それぞれ 4.32 ± 3.70 , 2.29 ± 1.61 と、前者で有意に最終観察時 VDI が高いことが明らかになった ($p=0.024$)。このため、治療開始時から BVAS persistent を下げる積極的な治療努力が必要であることが考えられた。

治療前 BVAS persistent 値 4未満群 vs 4以上群の比較

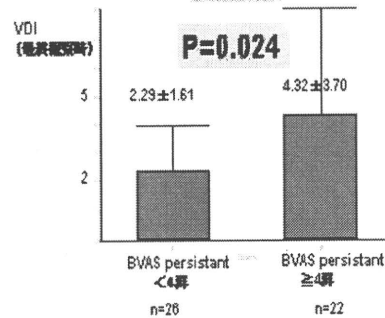


図 4. 治療前 BVAS persistent を 2 群に分け最終観察時の VDI を比較

また、BVAS persistent と VDI の関係を相関係数で比較すると解析方法が異なるが、BVAS persistent が VDI と相関することが明らかになった。

	BVAS2003				VDI-18M
	NW-0	PS-0	PS-3M	PS-18M	
NW-0	1				
PS-0	-0.47146	1			
PS-3M	0.297172	0.189508	1		
PS18M	0.293026	0.121398	0.747012 ($P<0.01$)	1	
VDI-18M	-0.06953	0.190471	0.306048 ($P<0.05$)	0.621257 ($P<0.01$)	1

表 2. BVAS new/worse, BVAS persistent と VDI の相関

4. 臨床指標と BVAS, VDI

6 週間以内に寛解した群と 6 週間以後に寛解した群について比較したが、BVAS は寛解に至るまでの期間を予測できなかった。寛解に至るまでの期間は VDI に影響しなかった(図 5)。

寛解までの期間と各指標

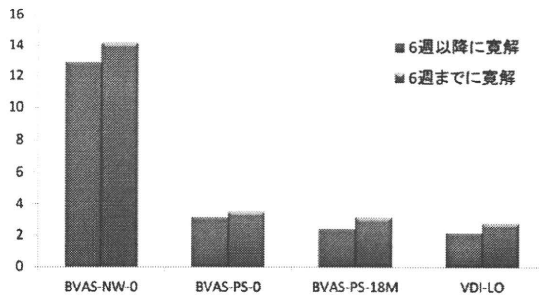


図5. 寛解までの期間と BVSA,VDI

BVAS, VDI を再燃あり群、再燃なし群で比較した。図6に示すように、BVAS new/worse, persistent とともに再燃を予測できなかった。ただし、再燃時には、BVAS new/worse は増加をしめした(前述)。

再燃と各指標

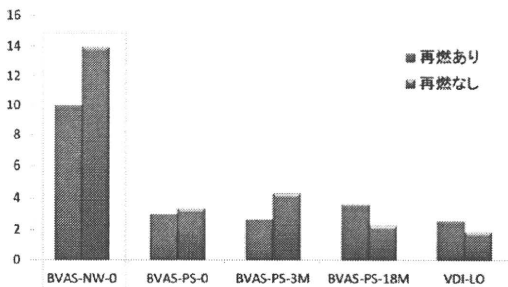


図6. 再燃の有無と BVAS,VDI

生存の有無を BVAS, VDI の治療開始時で比較した。図7に示すように、BVAS, VDI はともに、生命予後を予測できなかった。ただし、死亡原因は原疾患でないものが多い。死亡症例では治療開始時 VDI が高い傾向があった。

生存の有無と各指標

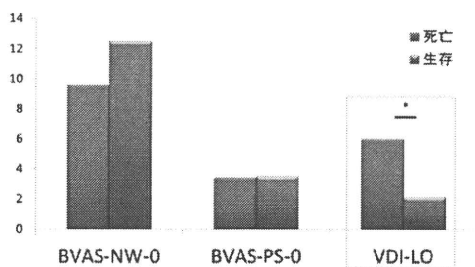


図7. 生存の有無と BVAS, VDI

感染症の合併を BVAS, VDI で検討した。図7に示すように、3, 18ヶ月の感染症は、BVAS persistent 高値例に多いことが明らかになった (* P < 0.05 Mann-Whitney's U test)。

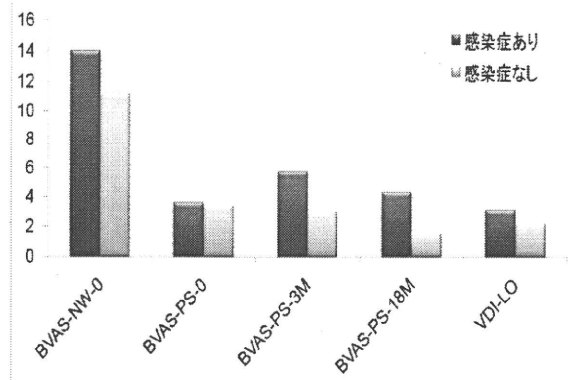


図7. 細菌・真菌感染症と BVAS,VDI

D. 考察

JMAAV の報告は、MPO-AAV に対する疾患評価指標の Validation としては初めてのまとまった報告である。JMAAV 登録症例で、以下のことが確認された。

1. 早期に寛解導入ができている (BVAS-N/W)。
2. 再燃は 6~9 か月が多い (BVAS-N/W)。
3. くすぶり病態が障害 (VDI) の増加につながる (BVAS-PS)。
4. 障害の増加は血管炎または治療に起因する合併症を中心としたものである (VDI)。
5. 機能障害がある程度残存する (SF-36)。

BVAS の特徴と問題点は、

1. 臨床症状を網羅的に把握でき、有症率として捉えることができる。病態の並列的把握、加算式評価である。
2. 寛解・再燃を客観的に評価できる。「悪化」がなければ、「軽快」や「不変」でも BVAS-N/W は低下する。悪化がなく残存する所見は BVAS-N/W から BVAS-PS に移行する。
3. 現実的な利用は、「初診時活動性評価」と「寛解率評価」にとどまる。

4. BVAS-PSはValidationが不足、各臓器における感度の違いがある。JMAAVでは、値の変動は腎要素に大きく依存していた。各臓器に対する項目数や項目の質に違いが存在し、検証すべきことと考えられた。

VDIの問題点は、VDIは3ヶ月以上継続する非可逆的病変を記載するが、

1. 正しく運用されていない。若干の例外はあるが、原則的にVDIは減らない。
2. 肺・腎・神経など重要な指標ほど改善している。合併症と混同されている場合がある。
3. 以前からあったのか、血管炎やその治療で起こったか不明な場合がある。
4. このため、既往歴の聴取が重要である。

このため、今回の解析は最終観察時のデータ以外は用い難いと委員会での検討で判断し、最終結果とした。

今後の課題は、VDI, BVASの適正使用のためのEducationが重要である。

- 1) 日本語ガイドンスを作製する。
- 2) Webにおける最新版の提供とトレーニングを行う。
- 3) MPO-AAV 特異的指標 (BVAS/MPA) の開発と検証を行う。項目削減のみで、点数再配分にとどめれば、既存の評価と平行してValidationでき、汎用性が高く、現実的であるとの意見も出された。
- 4) 「寛解」、「再燃」、「障害」の予見性の要因を検討する。
- 5) 実用性(簡易性)をあげるような評価票にする

また、専門家の意見の集約と十分な検討・検証を行わなければ、海外でのバージョン・アップの評価法に対応できないことが推定された。今回の委員会での検討は、この点が、実際に経験され、反省すべき点と結論づけられた(図8)。

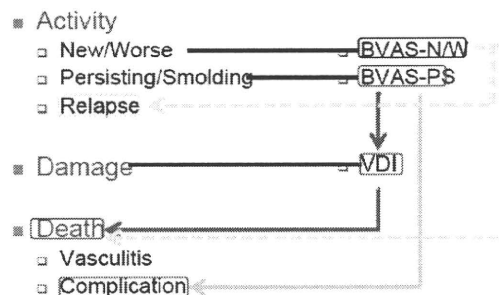


図7. 疾患活動性、臓器障害、死亡とBVAS, VDIの関係(林太智による)

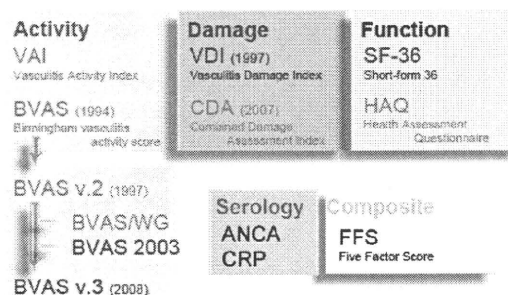


図8. 全身性血管炎の疾患評価指標(林太智による)

E. 結論

JMAAV 試験に関して、BVAS2003、VDI, SF-36を使用して、疾患活動性、臓器障害、生活の質を検討し、評価法を各種臨床徴候との関連性を検討・検証した。

日本のMPO-ANCA関連血管炎の特徴・病態、標準的治療法の妥当性が明らかになった。また、評価法の問題点を検討し、今後検討すべき問題点について論議した。

今後の研究に活かすべき事項を詳細に記載した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 橋本博史, 小林茂人, 藤元昭一, 湯村和子, 高橋 啓, 猪原登志子, 平橋淳一, 鈴木和男. 血管炎の新分類基準、新治療や発症機構研究の世界的動向. 日本医事新報 (4472) : 46-52, 2010
2. 湯村和子. 血管炎症候群の活動性と障害の評価-BVAS, VDI. リウマチ科

- 43 (6) : 593-604, 2010
3. Suzuki Y, Takeda Y, Sato D, Kanaguchi Y, Tanaka Y, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H, Ozaki S, Horikoshi S, Tomino Y. Clinicoepidemiological manifestations of RPGN and ANCA-associated vasculitides: an 11-year retrospective hospital-based study in Japan. *Mod Rheumatol.* 20:54-62, 2010.
 4. Basu N, Watts R, Bajema I, Baslund B, Bley T, Boers M, Brogan P, Calabrese L, Cid MC, Cohen-Tervaert JW, Flores-Suarez LF, Fujimoto S, de Groot K, Guillevin L, Hatemi G, Hauser T, Jayne D, Jennette C, Kallenberg CG, Kobayashi S, Little MA, Mahr A, McLaren J, Merkel PA, Ozen S, Puechal X, Rasmussen N, Salama A, Salvarani C, Savage C, Scott DG, Segelmark M, Specks U, Sunderkötter C, Suzuki K, Tesar V, Wiik A, Yazici H, Luqmani R. EULAR points to consider in the development of classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Oct;69(10):1744-50.
 5. Kida I, Kobayashi S, Takeuchi K, Tsuda H, Hashimoto H, Takasaki Y. Antineutrophil cytoplasmic antibodies against myeloperoxidase, proteinase 3, elastase, cathepsin G and lactoferrin in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2010 Sep 28. [Epub ahead of print] (In press).
 6. Okuzaki D, Fukushima T, Tougan T, Ishi T, Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, Nojima H. Genopa^{1TM}A novel hollow fiber array for focused microarray analysis. *DNA Research* 2010;17:369-79.
 7. Kobayashi S, Fujimoto S, Takahashi K, Suzuki K. Anti-neutrophil cytoplasmic associated vasculitis, large vessel vasculitis and Kawasaki disease in Japan. *Kidney Blood Press Res.* 2010 ;33(6)442-55.
2. 学会発表
 1. 湯村和子. ループス腎炎治療の基本. 第 20 回九州・山口ループス腎炎治療研究会 2010. 8. 21, 福岡
 2. 湯村和子. ANCA 関連血管炎の多彩な病態. 第 2 回血管炎の国際情報普及フォーラム 2010. 10. 7, 広島
 3. 湯村和子. 好腎好日 (こうじんこうじつ) ~腎臓をいたわり、長生きする~. 第 111 回老年学公開講座 2010. 10. 12, 東京 好腎好日:25, 2010
 4. 小林茂人 血管炎の診断—診断の難しさ—, 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会、栃木県総合文化センター、平成 22 年 9 月 24-25 日
 5. 小林茂人. EULAR/ACR による新しい血管炎の分類基準・診断基準作成について、ワークショップ 16. 血管病理の明日への展望、第 99 回日本病理学会総会. 京王プラザホテル、平成 22 年 4 月 28 日
 6. 小林茂人、藤元昭一、鈴木和男、EULAR/ACR による新しい血管炎の分類基準・診断基準作成について、ワークショップ 4、血管病理の明日への展望、第 99 回日本病理学会総会、京王プラザ、4 月 28 日、2010.
 7. 土屋尚之、伊藤郁恵、小林茂人、橋本博史、顕微鏡的血管炎と *BLK* 領域多型の関連、ワークショップ、第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、546, 4 月 22-25 日、神戸ポートピアホテル、2010.
- 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）

ANCA 関連血管炎のわが国における治療法の確立のための多施設共同前向き臨床研究

平成 22 年度臓器病変検討委員会 腎臓病理分担研究報告書

分担研究者

山縣邦弘	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 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 准教授
栗原泰之	聖マリアンナ医科大学放射線科 准教授

研究協力者

長田道夫	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 分子病理学分野 教授
上杉憲子	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 准教授
小川弥生	GLab 病理解析センター病理診断部 副部長
金網友木子	東京慈恵会医科大学付属柏病院病理部 講師
北村博司	国立病院機構千葉東病院臨床研究センター腎病理研究部 専任室長
臼井丈一	筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 腎臓病態医学 講師

研究要旨

ANCA 関連腎炎の前向き腎生検組織診断を病理スコアシートを用い 5 人の病理医で行い、診断者間の病変診断の一致率と、腎予後に関与する病理所見の抽出し、諸外国の報告と比較検討した。病理診断は、事前に目合わせをし、病変の定義を明確にして行い、一致性が高くなった。診断者間の一致率は、細胞性、繊維細胞性半月体や係蹄壊死など急性糸球体病変では良好だが、慢性糸球体病変や間質病変、血管炎では中程度であった。病理所見のいずれも、治療後 6 ヶ月後の eGFR と有意な関係はなかったが、比較的組織重篤度の高くない症例が含まれ、また集積症例数が少ないこともその原因と考えられた。解析した症例は、過去の報告に比べ病理所見が軽く腎機能が良好だった。診断一致率は他の報告にくらべ差はないか良好であった。ANCA 関連腎炎での診断の一致性の詳細な検討は少なく、本検討は貴重な検討である。本研究班で行った病理検討は急性糸球体病変の抽出に有用だが、慢性病変では検討が必要である。また、腎予後と病理所見の関連は、症例数をさらに集積して検討する必要がある。

A. 研究目的

本研究班で集積した症例に対し、研究班で作成した病理スコアシートにより行った病理診断の妥当性と腎機能予後の推定における有用性について検討し、本疾患における病理学的解析の位置付けを明らかにする。

B. 研究方法

(1) 前年度に行った JMAAV 登録症例 20 例の腎生検病理評価における 5 人の病理医の診断一致率を、統計解析し、級内相関係数と κ 値を算出する。研究前に行った予備評価の結果と比較する。

(2) 腎予後の推定が可能な病理組織の

抽出をロジスティックモデルを用い行う。

(3) 本研究班での病理所見の特異性、診断の一致率を文献的に比較検討する。

(倫理面への配慮)

症例は完全に匿名化しており、症例の特定は不可能である。

C. 研究結果

(1) 予備評価では、糸球体半月体の診断に病理医間の不一致がめだったが、目合わせをし、病理所見の定義を明確化した後の検討では、不一致の改善をみた。

(2) 病理医間の病理診断の一致率は、糸球体急性病変（血栓、係蹄壊死、細胞性/線維細胞性半月体）では、良好または

非常に良好な級内相関（級内相関係数 0.77-0.86）を得たが、慢性糸球体病変（線維性半月体、分節性硬化）は低いか中程度の相関（級内相関係数 0.17-0.61）であった。急性間質病変（細胞浸潤や尿管炎）一致率（κ値）は中程度で、慢性間質病変（尿管萎縮、間質線維化）の級内相関は、0.57-0.58 で中程度であった。血管炎一致率の級内相関は、0.52-0.59 と中程度であった。

（3）各病理所見と eGFR6 ヶ月後変化（治療前より低下）をオッズ比を用い、検討したが、有意な関係は認められなかった。

（4）本研究班での検討症例は、以前の報告例と比べて腎病理重症度や腎機能低下は、明らかに軽かった。診断の一致率は報告例と差はないか良好であった。症例数は少なかった。

D. 考察

病理所見の目合わせが、診断一致性の向上に有用であった。糸球体急性病変の一致率は高かったが、慢性病変診断はばらつきが多く、さらに検討する必要がある。予後予測病理因子の抽出ができなかったのは症例数が少ないことが大きな原因と考えられた。

E. 結論

ANCA 関連腎炎の病理診断は、診断者間の目合わせが重要である。本病理所見シートは急性病変の抽出に有用だが、慢性病変の診断方法について検討する必要がある。腎予後に関与する病変抽出は症例を増やし検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Usui J, Ebihara I, Kaneko S, Kobayashi M, Yamagata K. Peritubular capillary lesions in post-streptococcal acute glomerulonephritis. NDT Plus 3:91-92, 2010
2. Hirayama K, Ishizu T, Shimohata H, Miyamoto Y, Kakita T, Nagai M, Ogawa

Y, Fujita S, Hirayama A, Yamagata K, Kobayashi M, Koyama A. Analysis of T-cell receptor usage in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated renal vasculitis. Clin Exp Nephrol Feb;14(1) 36-42, 2010

3. Kaneko S, Usui J, Narimatsu Y, Ito H, Narimatsu H, Hagiwara M, Tsuruoka S, Nagata M, Yamagata K. Renal involvement of monoclonal immunoglobulin deposition disease associated with unusual monoclonal immunoglobulin A glycan profile. Clin Exp Nephrol 14:389-395, 2010
4. Hoshino J, Fujimoto Y, Naruse Y, Hasegawa E, Suwabe T, Sasa N, Takemoto F, Ishiwata S, Ohno M, Ubara Y, Yamagata K, Takaichi K. Characteristics of Revascularization Treatment for Arteriosclerosis Obliterans in Patients With and Without Hemodialysis. Japanese Circulation Journal 74:2426-2433, 2010
5. 甲斐平康, 野口和之, 臼井丈一, 山縣邦弘【糸球体疾患 腎炎からネフローゼまで、最高の診療を目指して】糸球体疾患の診断と病態生理 糸球体疾患の診断の極意 内科 106(1) : 30-35, 2010
6. 臼井丈一, 山縣邦弘【内科疾患の診断基準 病型分類・重症度】腎臓 急速進行性糸球体腎炎 内科 105(6) : 1096-1099, 2010
7. 永井恵, 山縣邦弘 糸球体濾過値と尿中アルブミンによる末期腎不全の予測検査と技術 38(5) : 380-381, 2010
8. 中井滋, 鈴木一之, 政金生人, 和田篤志, 伊丹儀友, 尾形聡, 木全直樹, 重松隆, 篠田俊雄, 庄司哲雄, 谷口正智, 土田健司, 中元秀友, 西慎一, 西裕志, 橋本整司, 長谷川毅, 花房規男, 濱野高行, 藤井直彦, 丸林誠二, 守田治, 山縣邦弘, 若井建志, 渡邊有三, 井関邦敏, 椿原美治, 日本透析医学会統計

調査委員会統計解析小委員会 わが国の慢性透析療法の現況(2008年12月31日現在) 日本透析医学会雑誌 43(1): 1-35, 2010

9. 金子修三, 山縣邦弘 【抗血小板薬・抗凝固薬のリスクとベネフィット-知らなければならぬ最新のエビデンス】 わが国における抗血小板・抗凝固療法の現状と問題点 腎臓内科の立場から 診断と治療 98(2): 203-208, 2010
10. 山田秀裕, 顕微鏡的多発血管炎の長期治療成績と生命予後, リウマチ科 43(4), 373-377, 2010
11. 山田秀裕, 血管炎治療体系の新展開, 炎症と免疫 18(5), 66-70, 2010
12. 山田秀裕, ANCA 関連血管炎, 間質性肺炎診療マニュアル, 242-244, 2010
13. 山縣邦弘. 急速進行性腎炎症候群 (RPGN) 今井 圓裕 編 腎臓内科レジデントマニュアル、改訂第5版: 101-106 2010

2. 学会発表

1. 須賀万智, 永淵裕子, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 石津明洋, 黒川真奈絵, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎における疾患活動性と QOL への影響. 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム 54 回・19 回 2010 年 3 月
2. 血管炎・APS JMAAV トランスクリプトーム解析. 石津明洋, 外丸詩野, 吉木敬, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 黒川真奈絵, 須賀万智, 尾崎承一, Japanese study group for MPO-ANCA-associated vasculitis(JMAAV). 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム 54 回・19 回 2010 年 3 月
3. 白井丈一、斎藤知栄、平山浩一、山縣邦弘 ANCA 関連腎炎、結果年 1) ミゾリビン療法を中心に. 第 53 回日本腎臓学会学術総会 2010 年 6 月
4. 加瀬田幸司、荒川洋、飯塚正、川村哲也、白井丈一、楊景堯、小林正貴、山

縣邦弘. 肺泡出血に対して血漿交換療法が奏功した Goodpasture 症候群の 1 例 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会 2010 年 9 月

5. 野口和之、斎藤知栄、永井恵、鈴木創、白井丈一、鶴岡秀一、上杉憲子、長田道夫、山縣邦弘. IgA 腎症と抗 GBM 抗体型腎炎を合併し、治療前後で興味ある腎病理経過を示した 1 例 第 40 回日本腎臓学会東部学術大会 2010 年 9 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

予定も含み、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）

ANCA 関連血管炎のわが国における治療法の確立のための多施設共同前向き臨床研究

平成 22 年度臓器病変検討委員会 肺病変分担研究報告書

分担研究者

山田秀裕

栗原泰之

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

聖マリアンナ医科大学放射線科 准教授

研究要旨

MPO-ANCA 関連血管炎における肺病変の頻度、臨床像、予後を明らかにすることを目的として、多施設共同前向き臨床試験 JMAAV に登録され、解析対象となった 48 症例を検討した。肺病変は 22 例(46%)に認められ、このうち 1 例は治療の経過中に肺胞出血を併発した。IVCY で改善する例が多かった。肺病変の画像解析では、UIP パターン 10 例(48%)、気腔内充填像／結節影ならびに淡いすりガラス陰影が各 5 例(24%)、線状陰影のみが 3 例(14%)にみられた。散在性限局性肺病変には肉芽腫性病変を示唆するものがあり、Wegener 肉芽腫症と考えられた。10 例(48%)に肺気腫の合併がみられ、CPFE 症候群に合致していた。

A. 研究目的

MPO-ANCA 関連血管炎における肺病変の頻度、臨床像、予後を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

厚労省難治性血管炎に関する調査研究班を中心として行われた多施設共同前向き臨床試験 JMAAV に登録された 50 症例のうち、解析対象 48 例の肺病変に関するデータを抽出し、解析した。

本臨床試験は、各施設における生命倫理委員会の承認の上、登録患者からの文書同意を得て、行われた。

C. D. 研究結果ならびに考察

肺病変は 22 例(46%)に認められ、このうち 1 例は治療の経過中に肺胞出血を併発した。肺病変以外の臓器障害を伴わない肺限局型が 4 例(8%)にみられた。シクロホスファミド間欠静注療法が施行された 12 例中 7 例で改善がみられたのに対し、IVCY 非投与例では 7 例中 2 例のみであった。また、50%の症例で肺活量が 10%以上改善した。治療開始前の CT 画像が得られた 21 例の画像所見は、UIP パターン 10 例(48%)、気腔内充填像／結節影ならびに淡いすりガラス陰影が各 5 例(24%)、線状陰影のみが 3 例(14%)にみられた。気腔

内充填像の散在性肺病変には、治療後に既存の肺構造の破壊を伴う嚢胞性病変として治癒する症例がみられ、肉芽腫性病変が示唆された。かかる症例は、MPO-ANCA 陽性 Wegener 肉芽腫症と考えられた。興味深いことに、10 例(48%)に間質性肺炎とともに肺気腫の合併がみられ、最近提唱された Combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) 症候群(Cottin V, Nunes H, Brillet P, Delaval P, Devouassoux G, Tillie-Leblond I, et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. Eur Respir J. 2005;26:586-93)に合致していた。

E. 結論

MPO-ANCA 関連血管炎には高頻度に肺病変が合併するが、その臨床像は多彩であった。UIP パターン以外に肉芽腫性病変や CPFE 症候群を呈する症例がみられ、その臨床像、長期予後、喫煙との関連は、今後、多数例での検討課題と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 山田秀裕, 顕微鏡的多発血管炎の長期治療成績と生命予後, リウマチ科 43(4), 373-377, 2010
2. 山田秀裕, 血管炎治療体系の新展開,

炎症と免疫 18(5), 66-70, 2010

3. 山田秀裕, ANCA 関連血管炎, 間質性肺炎診療マニュアル, 242-244, 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況

予定も含み、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）

ANCA 関連血管炎のわが国における治療法の確立のための多施設共同前向き臨床研究
合併症検討委員会 研究報告書

熊谷俊一 神戸大学大学院医学研究科内科系講座臨床検査・免疫学分野 客員教授
渥美達也 北海道大学大学院医学研究科内科学講座・第二内科 准教授
吉田雅治 東京医科大学八王子医療センター腎臓内科 教授
中澤 隆 倉敷中央病院内分泌代謝・リウマチ内科 医長

研究要旨

JMAAV 解析対象 48 症例についての合併症に関する個別の二次アンケートを行い、解析した結果、感染症 19 例・29 件（Grade4 2 件、Grade5 2 例を含む）、心血管系イベント 1 例、脳血管イベント 3 例、糖尿病 9 例、脊椎圧迫骨折を含む骨折 3 例を認めた。感染症の内訳は、細菌感染症（11 件）、真菌感染症（6 件）、ニューモシスチス肺炎（3 件）、ウイルス感染症（7 件）、未分類（2 件）であった。この結果をふまえて、「感染症予防のガイドライン」を作成した。

A. 研究目的

ANCA 関連血管炎のわが国における治療法の確立のために、合併症の実態とその危険因子を明らかにすることにより、「感染症予防のガイドライン」を作成する事を目的とする。合併症は、感染症、血管イベント、糖尿病、骨折や骨訴訟症など多岐にわたり、生命や QOL を損なう重篤なものも含まれていた。これらのうち感染症に焦点をあて、その種類や頻度、発現時期や程度を調査し、その危険因子を明らかとしてきた。この解析をもとに、感染症を減少させるための治療法や予防法についてのガイドラインの作成を目指す。

B. 研究方法

対象は、「ANCA 関連血管炎のわが国における治療法の確立のための多施設共同前向き臨床研究」に登録し、除外症例を除いた 48 例。これらについての「有害事象報告書」「VDI 報告書」および二次アンケートにより合併症に関する情報を抽出し、これらを解析した。

B-1 感染症合併のリスク因子の解析

候補リスクとして年齢・性別・臨床病型（治療開始前に登録する重症度分類）・ANCA

値・eGFR・糖尿病の有無・ステロイド初期投与量・ステロイドパルス療法の有無・シクロホスファミド(CY)投与の有無を挙げ、感染症合併群対非合併群との比較について、ロジスティック回帰分析を行った。更にステップワイズ変数選択法を用いて解析した。また、全例のステロイド総投与量を計算し、感染・非感染群間で比較した。

B-2 感染種別のリスク因子

B-1 と同様の手法を用いて解析した。また、感染種ごとの特徴を抽出し、予防投薬のなされたニューモシスチス肺炎(PCP)と真菌感染症については、その効果について検討した。

B-3 感染予防のガイドライン（案）作成

本研究結果から得られた感染リスクを基に、既存の報告や汎用される他分野でのガイドラインも参考にして作成した。

（倫理面への配慮）

本研究全体として、各施設倫理委員会の承認および ID 番号による匿名化を行った

C. 研究結果

1) 感染症のリスク因子解析

JMAAV 解析対象 48 症例についての「有害事象報告書」「VDI 報告書」および合併症

に関する個別の二次アンケートにより情報抽出し解析した結果、感染症 19 例・29 件（軽微なものを除く）を認め、うち重症感染症 Grade 4 が 2 件、死亡例(Grade 5) が 2 例あった。感染症の発症時期は平均約 200 日であり、その内訳は、細菌感染症 (11 件)、真菌感染症 (6 件)、ニューモシスチス肺炎 (pneumocystis pneumonia;PCP) (3 件)、ウイルス感染症 (7 件)、未分類 (2 件) であった(表 1)。

2) 感染症合併のリスク因子 (総論)

まず、感染症合併リスク因子を抽出する目的で、感染症合併群と非合併群を比較した多変量解析を行った。JMAAV 症例全データの中から、候補リスクとして年齢・性別・臨床病型(治療開始前に登録する重症度分類)・ANCA 値・eGFR・糖尿病の有無・ステロイド初期投与量・ステロイドパルス療法の有無・シクロホスファミド(CY)投与の有無を挙げ、ロジスティック回帰分析、さらにステップワイズ変数選択法を用いて解析した。結果、「CY 投与かつステロイドパルス療法」が統計学的に有意なリスク因子であり、「年齢」もその傾向を認めた。

本検討においては「ステロイド初期投与量」が統計学的には有意なリスク因子とならなかったが、ステロイド薬「総投与量」がリスクとなるか否かについて、全例のステロイド薬総投与量を計算し、感染・非感染群間で比較した。これらを比較する上で、既存の適切な比較方法がないため、今回同委員会はある時点におけるステロイド投与量および総投与量(積算量)を比較した。感染群において、感染症発症日(病日)は中間値 137 日、平均値 200 日であったため、この 2 時点について解析した。この 2 時点において、ステロイド総投与量は感染群において統計学的に有意に多いことが示された(図 1)。このことは、ステロイド総

投与量が感染合併リスクの一つである可能性を示したのみならず、感染群におけるステロイド量の遅れや困難さを示しているとも考えられた。

3) 感染症合併リスク因子 (各論)

① 感染症発症時期についての解析

感染症合併症の時期(病日)について検討した。前述のように、感染症発症日(病日)は中間値 137 日、平均値 200 日であった。また、感染発症全 plot 図(図 1)からは、寛解導入時期にのみ感染症が多いとは言えず、全経過に渡り感染症が発症していた。ただし、特筆すべきことは、200 病日以降に発症した感染症のほとんどは CY 併用群であった。

② 複数回感染

本臨床試験中の感染症 29 件(19 例)のうち 6 例が複数回感染した。複数回感染した症例のリスクについて検討したが有意な因子は抽出できず、これらの 6 例中 4 例は CY 非投与群であった。現時点では、一度感染した症例は二度目以降の感染に注意が必要であることの注意喚起にとどまる。

③ 感染種別のリスク因子

細菌感染症(11 件)、真菌感染症(6 件)、PCP(3 件)、ウイルス感染症(7 件)、未分類(2 件)の 5 群各々において、前述と同様の説明因子を用いて多変量解析を行った。ウイルス感染症において「CY 投与かつステロイドパルス療法」がリスクになる傾向がみられたが[オッズ比 20.18(0.91-1319.04)]、他においては有意な因子はあげられなかった(症例数不足による解析不能も含む)。

統計学的には証明できなかったが、留意すべき重要事項を以下に述べる。まず、細菌感染症は全体としてみると全期間に渡って発症していたが、4 例あった Grade 4 以上の重篤な感染症のうち 3 例は大腸菌による尿路感染症で、いずれも治療開始後

長期経過してから(200病日以降)発症し、しかもCY併用群であった。また、ウイルス感染症の大半を占めた帯状疱疹4件はいずれもCY投与群だったが、全例とも適切な治療により重篤化せず軽快した(Grade 3)。

D. 考察

本研究の最も重要な点は、JMAAVという「専門家の考えた標準治療」を行った場合の感染症合併率について、本邦においては初めて研究であるということである。本研究の対象解析患者48例は18ヶ月間に29件の感染症を生じた(29events/72pt-yrs = 40.3件/100pt-yrs)。これを、同様の海外の試験CYCAZARAM (David Jayneら)¹⁾における144例中33件(33events/216pt-yrs = 15.3件/100pt-yrs)の感染症と比較すると、本研究において感染症合併率が高かったが、本研究とCYCAZARAMの間には背景の差があるため単純比較はできない。すなわち、本研究における感染リスク因子の解析が、既にある欧米のRCTの際の感染合併率よりも重要であると言える。

臨床医が最も危惧していることは、強力な治療が感染のリスクになり得ることで、AAVにおいてはCYおよびステロイド大量の是非に注目が集まる。本研究では、CY使用者での感染症合併率は59.1%(23例中13例)と非使用者の23.1%(26例中6例)に比べ多かったが有意ではなく、多変量解析においてもCY単独ではリスクとならなかった。また、CY使用によるGrade3以上の血球減少の症例はなく、CY使用で危惧される白血球減少症が、感染リスクになるという事実はなかった。これらの事実は、AAV治療における最も信頼された薬剤であるCYの使用を躊躇させるものでないと言える。しかし、CYにステロイドパルス併用した場合、オッズ比6.39

(1.12-46.23)で有意のリスク因子として抽出されたことは、強力な治療の併用を要した場合の感染リスクを再確認させるものと解釈できる。

本邦のステロイド漸減法は、欧州のAAV治療ガイドライン³⁾と比較して緩やかであることが多い。そこで、ステロイド漸減の遅れが感染症リスクになっている可能性を検討した。感染群で感染症発症時のステロイドの使用量とそれまでの総使用量が非感染症群に比べて有意に多く、ステロイド減量の遅れが感染症併発のリスクとなる可能性が示唆された。

また、今回の調査の特色として治療開始後200日以降に、重症感染症Grade4が2件、死亡例(Grade5)が1例の発症が報告された。これらの症例はいずれも大腸菌による尿路感染症で、CYの併用例であった。ステロイド投与量の少ない寛解維持期においても感染症を発症し得ることと、CY使用例における寛解維持期での重症尿路系細菌感染症に注意すべきであることは、重要な情報として挙げられる。病型(重症度)や腎機能などは細菌感染症のリスク因子としては同定されず、本研究結果から重症感染症の防止に重要なことは、ステロイドの可及的速やかな減量と、寛解維持期のCY長期投与の回避(他の維持療法への変更など)の2点であると強調したい。

E. 結論

以上の結果を踏まえて以下の「感染症予防ガイドライン」を作成した。

● 基本指針

臨床病型・CYの使用・ステロイド薬初期投与量やパルス療法自体は統計学的に有意な感染リスクではなく、標準治療に沿った治療をためらうべきではない。AAVの寛解が最重要課題であることが前提である。

● ステートメント

- (1) わが国の標準治療を行う際の重症感染症の合併率は高いことに注意すべきである【推奨度D】。
- (2) CY+ステロイドパルス併用療法を要した場合は、特に感染症発症に留意することが推奨される【推奨度C】。
- (3) 治療により寛解に至ったら、ステロイド薬の減量速度や維持量に留意することを推奨する【推奨度C】。
- (4) 核のリスクを考慮し、必要に応じて結核に対する予防投与を行うべきである【推奨度C】。
- (5) PCP 発症の予防のため、全例、とりわけCY 使用例においては、ST 合剤の予防投与が推奨される【推奨度B】。
- (6) 既存の肺障害があるなど重篤な肺真菌症のリスクがある症例には、経口アゾール系抗真菌薬の予防投与が推奨される【推奨度C】。
- (7) 一度感染症を合併した症例は、反復する可能性が高いことに留意すべきである【推奨度D】。
- (8) 免疫抑制療法を受けている患者は、肺炎球菌ワクチン、毎年インフルエンザワクチンの接種を受けることが推奨される。生ワクチンの使用は、免疫抑制療法終了から少なくとも3カ月間は避けるべきである【推奨度C】。
- (9) 治療前にB型肝炎、C型肝炎の適切な血清学的検査を行うべきである【推奨度B】

文献：

- 1) Jayne D, et al: N Engl J Med, 349: 36-44, 2003.
- 2) Mukhtyar C, et al: EULAR recommendation for the management of primary small and medium vessel vasculitis. Ann Rheum Dis. 68(3):310-7, 2009. Epub 2008 Apr 15.
- 3) Lapraik C, et al: BSR and BHPR guidelines for the management of adults with ANCA associated vasculitis. Rheumatology, 2007.
- 4) Takeda, K, et al: Arthritis Rheum. 50:2202-10, 2005.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 吉田雅治：ANCA 関連血管炎－総論、Wegener 肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、Churg Strauss 症候群、リウマチ病学テキストテキスト 診断と治療社 東京 274-289, 2010
2. 吉田雅治：ウェゲナー肉芽腫症、リウマチ・膠原病内科・クリニカルスタンダード、文光堂、東京 143-153, 2010
3. 吉田雅治：抗好中球細胞質抗体と病態の関係はあるか、分子リウマチ治療3(1):16-20, 2010
4. Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, Okumura F, Hatakeyama S, Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between $\beta 2$ glycoprotein I and $\alpha 5 \beta 1$ integrin. J Cell Mol Med(in press)
5. Suzuki E, Amengual O, Atsumi T, Oku K, Hashimoto T, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Ieko M, Fukushima K, Koike T. Increased expression of Phospholipid Scramblase 1 in Monocytes from patients with systemic Lupus erythematosus. J Rheumatol 37, 2639-45, 2010
6. Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S. Anti-Programmed Cell Death 1 Antibody Reduces CD4+PD-1+ T Cells and Relieves the Lupus-Like Nephritis

- of NZB/W F1 Mice. *J Immunol.* 184, 2337-2347 2010
7. Kyogoku C, Yanagi M, Nishimura K, Sugiyama D, Morinobu A, Fukutake M, Maeda K, Shirakawa O, Kuno T, Kumagai S. Association of calcineurin A gamma subunit (PPP3C) and early growth response 3 (EGR3) gene polymorphisms with susceptibility to schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry Res.* Epub ahead of print 2010
 8. Yamamoto T, Onishi T, Kaneko A, Matsumoto K, Hayashi N, Kinoshita S, Kawano S, Kawai H, Hirata K, Kumagai S. Medical therapy alone produces regression of combined aortic and mitral valve involvement in hypereosinophilic syndrome. *Circulation* 122(16) E488-90 2010
 9. Mamehara A, Sugimoto T, Sugiyama D, Morinobu S, Tsuji G, Kawano S, Morinobu A, Kumagai S. Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J Med Sci.* 30;56(3) E98-107 2010
 10. Ardianto G, Sugimoto T, Kawano S, Kasagi S, Jauharoh SN, Kurimoto C, Tatsumi E, Morikawa K, Kumagai S, Hayashi Y. The HPB-AML-I cell line possesses the properties of mesenchymal stem cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 13;29(1):163 Epub ahead of print 2010
 11. Morinobu A, Tsuji G, Kasagi S, Saegusa J, Hayashi H, Nakazawa T, Kogata Y, Masaki K, Nishimura K, Sendo S, Miura N, Kawano S, Kumagai S. Role of imaging studies in the diagnosis and evaluation of giant cell arteritis in Japanese: Report of eight cases. *Modern Rheumatology.* In press 2010
 12. Oyabu C, Morinobu A, Sugiyama D, Saegusa J, Tanaka S, Morinobu S, Tsuji G, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S. Plasma platelet-derived microparticles in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol.* In press 2010
2. 学会発表
1. 佐々木まり子、吉田雅治、中林巖：PR-3 ANCA 関連血管炎の疾患活動性に有用な PR-3 ANCA ELISA の再検討 第 54 回日本リウマチ学会総会、2010 年 4 月 22 日
 2. 吉田雅治：MPO-ANCA 関連血管炎、腎炎の病勢、免疫抑制療法の指標に MPO-ANCA 親和性は有用である。第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 16 日
 3. 渥美達也、大友耕太郎、小池隆夫：シンポジウム 1「腎炎・ネフローゼ症候群の免疫抑制療法 2010」「全身性血管炎症候群に対する IVCY による寛解導入療法」第 53 回日本腎臓学会学術総会 神戸 2010 年 6 月
 4. 熊谷俊一：EMB とリウマチ臨床 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010. 4
 5. 辻剛、千藤荘、三浦菜津子、笠木伸平、林宏樹、三枝淳、杉本健、河野誠司、森信暁雄、熊谷俊一：CNS ループス 2009 年当施設で経験した SLE に合併する無菌性髄膜炎の 6 例 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010. 4
 6. 森信暁雄、杉山大典、辻剛、笠木伸平、森信早穂子、三枝淳、河野誠司、熊谷俊一：検査 膠原病患者における血小板由来マイクロパーティクル 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010. 4
 7. 綾野雅宏、中澤隆、西村啓祐、西川あゆみ、杉山大典、熊谷俊一、横田敏彦：タクロリムス関節リウマチ患者におけるメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の検討 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010. 4
 8. 森信暁雄、藤田昌昭、三崎健太、三枝淳、熊谷俊一：RA の病因・病態 TSA により誘導される IEX1 は滑膜細胞のアポトーシスを誘導する 第 54 回日本リウマチ

学会総会・学術集会 2010.4

なし

9. 石津明洋、外丸詩野、吉木敬、湯村和子、山縣邦弘、山田秀裕、熊谷俊一、黒川真奈絵、須賀万智、尾崎承一：血管炎・APS JMAAV トランスクリプトーム解析 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010.4
10. 三枝淳、藤田昌昭、森信暁雄、三崎健太、河野誠司、熊谷俊一：生物製剤 TCZ・新治療インテグリン非結合 FGF1 は Bcl-2 関連蛋白を制御して滑膜細胞のアポトーシスを誘導する 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010.4
11. J Saegusa, A Morinobu, S Kawano, Y Takada, S Kumagai: The proinflammatory action of phospholipase A2 Group IIA is mediated through interaction with integrins (ALPHA)V(BETA)3 and (ALPHA)4(BETA)1, EULAR 2010.6
12. K Misaki, A Morinobu, J Saegusa, Y Miyamoto, S Kasagi, S Kumagai: Histone deacetylase inhibitor(HDAi) Ameliorates chronic arthritis in SKG Mice by altering conventional dendritic cells(cDCs) phenotype into Tolerogenic DCs.・EULAR 2010.6
 - ・第14回国際免疫学会 2010.8
 - ・国際樹状細胞シンポジウム 2010.9
 - ・第74回ACR 2010.11(研究発表の為、タイトルは同じであるが、毎回新しいプログレス結果を発表した)
13. S Kasagi, S Kawano, S Kenichiro, Y Tanaka, N Minato, T Okazaki, T Honjo, S Kumagai: Anti-PD-1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus like nephritis of NZB/W F1 mice. 第14回国際免疫学会 2010.8

G. 知的財産権の出願・登録状況

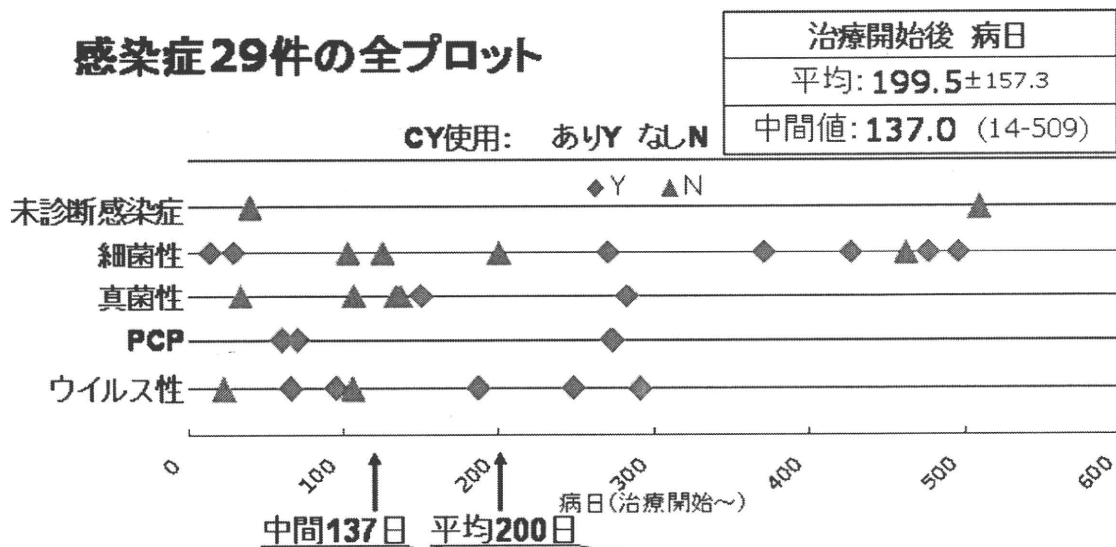
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他

感染病原体	件数	Grade		
		3	4	5
細菌感染症	11	8件	2件	1件
真菌感染症	6	5		1
PCP	3	2		1
ウイルス感染症	7	6		1
不明	2	2		
計	29	23	2	4
感染合併症例 (人)	19	15	2	2

表 1. JMAAV 解析対象 48 例中、19 人、29 件の感染症合併をみとめた（軽症感染症は除外）。ただし、Grade は有害事象の重症度 grade；有害事象共通用語規準 v3.0（CTCAE v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版 2004 年 10 月 27 日）より。

感染症29件の全プロット



	感染群	非感染群	P値		感染群	非感染群	P値
PSL dose	16.4 ±5.3	13.4 ±4.5	0.13	PSL dose	13.4 ±5.8	10.2 ±3.4	0.05
PSL積算量	3548.4 ±806.1	3048.7 ±612.5	0.03	PSL積算量	4477.5 ±1075.4	3791.3 ±796.4	0.03

	PSL20mg は何日	積算 4072 は何日	積算 3170 は何日	200 日の PSL 量	137 日の PSL 量	200 日の 積算量	137 日の 積算量
感染 vs.非感染 p 値	0.50	0.07	0.10	0.05	0.13	0.03	0.03

図 1. 感染症発症時期（病日）とステロイド積算量

- 29 件の感染症発症病日一覧（グラフ）に、感染種別の感染症発症時期が plot した。CY 投与の有無を赤◆と青▲で示した。
- 29 件の感染発症病日の中間値（137 日）と平均値（200 日）の時点において、そのときのステロイド投与量（PSL 換算 mg/日）と総投与量（PSL 換算積算量 mg）を表に示した。感染種別に発症時期の傾向を述べることはできないが、29 件の平均 200 病日以後の感染発症のほとんどが CY 併用群である。
- 感染群・非感染群において PSL20mg に至った時期（病日）、PSL 積算量 4072mg および 3170mg に至った時期（病日）を比較した。さらに、第 200 病日および第 137 病日における PSL 投与量および積算量を比較した。二群間の比較は分布の形に応じて t 検定もしくは wilcoxon 順位和検定で解析をし、P 値を表に示した。ただし、感染症発症時の平均 PSL 投与量 20mg、積算 PSL の平均が 4072mg、中間値が 3170mg であった。また、感染発症時期は平均 200 病日、中間値 137 病日であった。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
ANCA 関連血管炎のわが国における治療法の確立のための多施設共同前向き臨床研究
病態関連因子解析委員会 研究報告書

石津明洋 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 教授
黒川真奈絵 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 准教授

研究要旨

MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前および治療開始 1 週間後の末梢血を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。治療後に寛解が導入され、その後も寛解が維持された 9 症例について 8,793 個の遺伝子を解析し、治療前後で有意な発現変化を示す 88 個の遺伝子を抽出した。次に、抽出された 88 遺伝子の中から再現性の確認された 30 遺伝子を選定して、定量的遺伝子発現解析を行った。この解析に供した症例は 18 症例であり、その内訳は、予後良好群（寛解維持）15 例、予後不良群 3 例（寛解後再燃 2 例、非寛解死亡 1 例）であった。この 18 症例をトレーニングサンプルとして治療後の予後との関連について重回帰分析を行い、治療開始後 1 週間の時点でその後の予後を予測する最適な遺伝子セットを検討した結果、16 個の遺伝子が抽出された。治療前と治療開始 1 週間後の末梢血を用いて、抽出された 16 個の遺伝子の発現変化を調べることで、MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療後の予後を予測できる可能性が示された。

顕微鏡的多発血管炎 (MPA) の病態解明と早期診断に有用な血清ペプチドを、質量分析にて網羅的に探索した。MPA 33 例の治療前後血清、その他の血管炎症候群 (oSv) 20 例及び全身性エリテマトーデス (SLE) 25 例の活動期血清を解析した結果、MPA 治療前に高値で治療後に低下し、oSv 群および SLE 群では殆ど認められない質量電荷比 1523m/z のペプチドを検出し、これがアポリポ蛋白質 A-I (ApoAI) の C 末端 13 アミノ酸残基 (AC13) であると同定した。MPA の ApoAI 血中濃度は、治療前は低値で治療後に基準値と同程度に回復した。AC13 は微小血管内皮細胞からの IL-6 と IL-8 の分泌を促進した。AC13 は MPA の疾患活動性を診断する有用なバイオマーカー候補であり、病変局所に好中球を遊走させ血管炎病態を増悪させる可能性が示された。

A. 研究目的

MPO-ANCA 関連血管炎患者の末梢血を用いて、本疾患の病態や予後に関連する遺伝子群を明らかにし、本疾患の新しい病態診断法を開発する。

顕微鏡的多発血管炎 (MPA) は MPO-ANCA 関連血管炎の 1 つであり、原因不明の難治性疾患である。分子量約 10kD 以下の血清小ペプチドを網羅的に探索し、MPA の病態解明と早期診断に有用なペプチドを検出することを目的とした。

B. 研究方法

MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前および治療開始後 1 週間の末梢血を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、重症度や治療後の予後との相関を検討した。

本研究班の多施設研究で収集された MPA 患者 33 例の血清 57 検体 (治療前及び治療後 1 週間、6 週間) について解析した。対照と

して、その他の血管炎症候群 (other systemic vasculitis, oSv) 20 例 (Wegener 症候群 7 例、Churg-Strauss 症候群 7 例、巨細胞性動脈炎 6 例) 及び全身性エリテマトーデス (SLE) 27 例の活動期血清を用いた。各血清から疎水性担体を用いペプチドを精製し、質量分析にて血清ペプチドを網羅的に定量した。ClinProt 法および Simca 法に

よる統計処理後、MPA 治療前特異的に出現した血清ペプチドを選出した。このペプチドのアミノ酸配列を MS/MS 法にて同定した。

微小血管内皮細胞 (hMVECs) の培養系に合成した当該ペプチドを添加し、炎症性サイトカインの産生に及ぼす影響を ELISA と real time PCR にて検討した。また hMVECs のペプチド添加後発現蛋白質を、非添加の細胞の発現蛋白質と 2 次元ディフレーション イメージ電気泳動 (2D-DIGE) により比較し、ペプチド添加により発現量が変化す

る蛋白質を網羅的に検索した。

(倫理面への配慮)

患者検体の採取にあたっては、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の掲げる遺伝子解析に関する倫理指針に基づき、各々の検体採取機関の倫理審査委員会の承認を受け、全例インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

治療後に寛解が導入され、その後も寛解が維持された MPO-ANCA 関連血管炎 9 症例について、Affymetrix 社 gene chip を用いて 8,793 個の遺伝子を解析し、治療前後で有意な発現変化を示す 88 個の遺伝子を抽出した。次に、抽出された 88 遺伝子の中から再現性の確認された 30 遺伝子を選定して、Applied Biosystems 社 TaqMan Low Density Array による定量的遺伝子発現解析を行った。この解析に供した症例は 18 症例であり、その内訳は、予後良好群 (寛解維持) 15 例、予後不良群 3 例 (寛解後再燃 2 例、非寛解死亡 1 例) であった。この 18 症例をトレーニングサンプルとして治療後の予後との関連について重回帰分析を行い、治療開始後 1 週間の時点でその後の予後を予測する最適な遺伝子セットを検討し、16 個の遺伝子を抽出した。

抽出された 16 個の遺伝子の治療前後の発現変化量から予測したトレーニングサンプル 18 症例の予後は、実際の予後と完全に一致した。次に、トレーニングサンプル以外の 4 症例について、同様に予後を予測した結果、4 症例中 2 症例が予後良好と予測され、2 症例が予後不良と予測された。予後良好と予測された 2 症例はいずれも治療後に寛解が維持された症例であり、予後不良と予測された症例はいずれも寛解後に再燃した症例であった。

MPA 治療前血清で高値を示し、治療により低下し対照疾患活動期で低値である質量電荷比 1523m/z、1738m/z、2503m/z、5600m/z の 4 つのペプチドを検出した。1523m/z のペプチド (p1523) は、全ペプチドの血中濃度により MPA と SLE を判別する多変量解析に

て、MPA と相関が最も強いペプチドとして検出された。p1523 のアミノ酸配列はアポリポ蛋白質 A-I (ApoAI) の C 末端 13 アミノ酸残基の配列と一致し、これを AC13 と命名した。血中 ApoAI 濃度を ELISA にて測定したところ、治療前の MPA 患者では低下しており、治療後 6 週間で健常範囲に回復していた。

MPA の肺・腎・末梢神経・関節・皮膚の各臓器合併症の有無、重症度及び予後と、血中濃度が相関するペプチドが多数検出された。例として、p2453 は末梢神経・関節・皮膚合併症を有する群で有意に高値であり、p6435 は腎合併症群および重症群にて有意に高値を示した。

合成した AC13 を、皮膚または肺由来の 2 種類の hMVECs に添加したところ、培養上清の ELISA にて IL-6 および IL-8 の産生が有意に増加していた。real time RT-PCR にても同様の結果が得られた。また hMVECs に AC13 を添加すると、9 個の蛋白質の発現が有意に変化した。そのうち 2 個は両細胞において発現が増加しており、それらは heat shock 27kDa protein 1 (HSP27) と potassium channel tetramerisation domain containing 12 (KCTD12) であった。

D. 考察

MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前と治療開始 1 週間後の末梢血を用いて、本研究により抽出された 16 個の遺伝子の発現変化を調べることにより、MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療後の予後を予測できる可能性が示された。抽出された 16 個の遺伝子のうち 13 個は治療後に発現が低下する遺伝子で、その中には IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) ファミリーや IFN-induced helicase (IFIH) ファミリー、2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) ファミリーの遺伝子や, guanylate binding protein 1 (GBP1) といった 1 型インターフェロン関連遺伝子、ならびに CD36 や chemokine (C-C motif) receptor 3 (CCR3) といった受容体の遺伝子が含まれており、これらは MPO-ANCA 関連血管炎の病態増悪因子と考えられた。一方、16 個中 3

個は治療後に発現が増加する遺伝子で、そのうち2個は defensin ファミリーの遺伝子であった。Defensin の発現増加がどのような意義を持つかについては、今後の検討課題である。

MPA 患者治療前で高値を示した4個のペプチド中、p1523 は、治療後1週間、6週間及び対照疾患群との何れの比較にても有意差を示し、MPA と SLE を判別する多変量解析でも MPA と強い相関を示したことより、MPA の有用な疾患活動性マーカーとなる可能性が示された。p1738 及び p2503 も同傾向を示し、今後同定予定である。

MPA の臓器合併症の有無や重症度、予後と相関する血清ペプチドは、疾患の進行予測に役立つ可能性がある。今後症例数を増やして解析し、病態への関与等も検討していきたい。

p1523 は ApoAI の C 末端 13 アミノ酸残基であった (AC13)。ApoAI は HDL-コレステロールの代謝に関わる蛋白質であり、抗炎症作用を示し慢性炎症疾患で治療前に血中濃度が減少することが示されている。ApoAI の血中濃度は MPA 治療前で減少し、治療後に健常レベルまで回復した。AC13 は MPA 発症時、疾患特異的に ApoAI からの切断が亢進して増加したと考えられる。

ApoAI から AC13 を切断するエンドペプチダーゼとしては、データベース上の検索結果カテプシン G が最有力であった。このことから MPA の病態として、感染等にて活性化されたマクロファージが好中球を刺激し、MPO が細胞表面にリクルートされ MPO-ANCA 結合により好中球が活性化されると、脱顆粒によりカテプシン G が放出され ApoAI から AC13 が切断される可能性が考えられる。AC13 を添加した hMVECs では、炎症性サイトカイン IL-6 と好中球遊走作用を示す IL-8 の産生が増加し、AC13 は炎症増悪及び局所への好中球遊走を来す可能性が示された。AC13 刺激にて2種類の hMVECs で有意に発現が増加した蛋白質のうち KCTD12 の機能は未だ不明であるが、HSP27 はシャペロン蛋白として働く他、リン酸化されると p38-MAPK 依存性に IL-8 の産生を増加することから、上記の好中球遊走及び炎症増悪

に関与する可能性が考えられた。

E. 結論

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、治療前と治療開始1週間後の末梢血を用いて16個の遺伝子の発現変化を調べることにより、治療後の予後を予測できる可能性を示した。治療開始後の早期に予後を予測することにより、予後不良と予測された場合には嚴重な経過観察や付加的な治療を行うことで、その症例の予後の改善が期待できる。

血清ペプチドの網羅的検索により、MPA の疾患活動性を診断する有用な血液バイオマーカー候補として、ApoAI 由来ペプチド AC13 を検出した。AC13 は血管内皮細胞からの IL-6 及び IL-8 の産生亢進を来し、病変局所への好中球遊走及び炎症増悪により、MPA の病態を悪化させる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukasawa M, Okamoto K, Nakamura M, Mikami K, Shimada S, Tanaka Y, Nagai K, Arito M, Kurokawa MS, Masuko K, Suematsu N, Koizuka I, Kato T. Proteomic analysis of the rat cerebellar flocculus during vestibular compensation. *J Vestib Res* 19: 83-94, 2009.
2. Ishizu A, Abe A, Miyatake Y, Baba T, Iinuma C, Tomaru U, Yoshiki T. Cyclic AMP response element binding protein is implicated in IL-6 production from arthritic synovial cells. *Mod Rheumatol* 20: 134-138, 2010.
3. Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, Ishizu A, Shida T, Osaka M, Sato Y, Saji Y, Ozaki M, Todo S. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 24: 1201-1212, 2010.