

Dr T. Hidaka of Shiminomori Hospital in Miyazaki for their kind collaboration in this study.

Funding: This work was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan (H21-General-004 and 20260401).

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

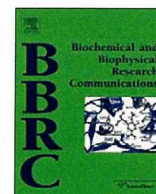
References

- Haugeberg G, Bie R, Bendvold A, Larsen AS, Johnsen V. Primary vasculitis in a Norwegian community hospital: a retrospective study. *Clin Rheumatol* 1998;17:364–8.
- Watts RA, Lane SE, Bentham G, Scott DG. Epidemiology of systemic vasculitis: a ten-year study in the United Kingdom. *Arthritis Rheum* 2000;43:414–9.
- Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gross WL. Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from German vasculitis register. *Arthritis Rheum* 2005;53:93–9.
- Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Guerrero J, Rodriguez-Ledo P, Llorca J. The epidemiology of the systemic vasculitides in northwest Spain: implications of the Chapel Hill Consensus Conference definitions. *Arthritis Rheum* 2003;49:388–93.
- Gatenby PA, Lucas BM, Engelsen O, Ponsonby A, Clements M. Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: could geographic patterns be explained by ambient ultraviolet radiation? *Arthritis Rheum* 2009;61:1417–24.
- Mohammad AJ, Jacobsson LTH, Westman KWA, Sturfelt G, Segelmark M. Incidence and survival rate in Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and polyarteritis nodosa. *Rheumatology* 2009;48:1560–5.
- Matsumoto M, Kobayashi S, Hashimoto H *et al.* Nationwide epidemiological survey of refractory vasculitis (anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis, anti-phospholipid syndrome and temporal arteritis) in Japan. Annual report of the Research Committee on Intractable Vasculitides. the Ministry of Health and Welfare of Japan, 1998;15–23. (in Japanese).
- Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S *et al.* Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in the Miyazaki prefecture: the first population-based, retrospective, epidemiologic study in Japan. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:1016–22.
- Watts RA, Scott DGI, Jayne DRW *et al.* Renal vasculitis in Japan and the UK—are there differences in epidemiology and clinical phenotype? *Nephrology Dial Transplant* 2008;23:3928–31.
- Watts R, Lane S, Hanslik T *et al.* Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis* 2007;66:222–7.
- Ito-Ihara T, Muso E, Kobayashi S *et al.* A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies available in Japan and Europe. *Clin Exp Rheum* 2008;26:1027–33.
- Watts RA, Lane SE, Scott DG *et al.* Epidemiology of vasculitis in Europe. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1156–7.
- Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ *et al.* A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res* 2010;20:1352–60.
- Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY *et al.* Wegener's granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* 1992;116:488–98.
- Chen M, Yu F, Zhang Y, Zhao M. Clinical and pathological characteristics of Chinese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis: a study of 426 patients from a single centre. *Postgrad Med J* 2005;81:723–7.
- Hauer HA, Bajema IM, Van Houwelingen HC *et al.* Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int* 2002;61:80–9.
- Tian C, Gregersen PK, Seldin MF. Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 2008;17:R143–50.
- Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A *et al.* Genetic background of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: association of HLA-DRB1*0901 with microscopic polyangiitis. *J Rheumatol* 2003;30:1534–40.
- Kochi Y, Suzuki A, Yamada R *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun* 2009;32:158–62.
- Basu N, Watts R, Bajema I *et al.* EULAR points to consider in the development of classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1744–50.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Microarray analysis of tonsils in immunoglobulin A nephropathy patients

Kenichiro Iio^a, Yasuyuki Nagasawa^{a,*}, Hirotsugu Iwatani^a, Ryohei Yamamoto^a, Arata Horii^b, Daisuke Okuzaki^c, Yoshiyuki Furumatsu^a, Hidenori Inohara^b, Hiroshi Nojima^c, Enyu Imai^a, Yoshitaka Isaka^a, Hiromi Rakugi^a

^a Department of Geriatric Medicine and Nephrology, Osaka University, Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Department of Otolaryngology, Osaka University, Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^c Department of Molecular Genetics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2010

Available online 6 February 2010

Keywords:

Immunoglobulin A nephropathy

Tonsil

Gene expression

APOBEC2

Tonsillectomy

ABSTRACT

Background: Recently, combination of tonsillectomy and steroid pulse therapy was reported to be effective as the treatment of the immunoglobulin A nephropathy (IgAN). However, the gene expression difference between the tonsils in patients with IgAN and those in control patients is not established.

Methods: We performed tonsillectomy combined with steroid pulse as a treatment to IgAN, analyzed the gene expression in the tonsils ($N = 23$) using microarray, compared with those with patients suffering from chronic tonsillitis ($N = 22$). From some candidate genes related with IgAN, we confirmed the apolipoprotein B messenger RNA-editing enzyme catalytic polypeptides 2 (APOBEC2) gene expression in the tonsil and we also analyzed its expression levels and clinical features.

Results: Up-regulated genes seem to be categorized into two groups. One group belongs to the muscle related genes which might be caused by structural differences. The other group includes the immune system-related genes, such as APOBEC2, CALB2, DUSP27, and CXCL11. APOBEC2 was positively stained in the epithelium and the peripheral region of the germinal center in both tonsils. APOBEC2 expression level was negatively related with serum igg level, but did not correlate with clinical course after tonsillectomy.

Conclusion: We confirmed gene expression differences related with immune system and muscle structure. The APOBEC2 was confirmed to be elevated in the tonsils with IgAN patients, and the gene expression level was negatively related with serum igg level in overall patients. These results might be helpful to reveal the mechanism of IgAN.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Immunoglobulin A nephropathy (IgAN) is the most common form of primary glomerulonephritis in the world [1]. It is characterized by IgA deposition to glomerular mesangial cells in pathological point of view and sometimes macroscopic hematuria after upper respiratory infection in clinical point of view. Since it was firstly reported by Berger in 1968, the etiology and cause of the disease has been an ultimate mystery. Recently, polymorphisms related with progression of IgAN were reported in a comprehensive manner from our group, but the origin of the disease has remained unclear [2]. In 1997, Koyama et al. reported that 39% of the patients with IgAN end up in dialysis or death in 20 year, which turned out to be of poor prognosis [3]. But there is no specific therapy to the disease, although anti-platelet drug, corticosteroid, angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin II receptor blocker are clinically used.

In consideration of the high frequency in general and especially in the young and the poor renal prognosis of the disease, some strong therapeutic strategy had been urgently needed. It is also a well known fact that in upper respiratory infection such as tonsillitis, IgAN patients often manifest the deterioration of urinary findings; macroscopic hematuria. Tonsil is one of the important immune organs, constituting the ring of Waldeyer whose function is considered to be closely related to mucosal immune system. Therefore, recently, tonsillectomy is a focus of much attention in treating these diseases.

In the wake of this trend, recently, combination of tonsillectomy and steroid pulse therapy was reported to be effective [4–6] and tonsillectomy alone was reported to have a favorable effect to the IgAN [7], while there is some controversial opinion against tonsillectomy in IgAN [8]. However, the gene expression difference between the tonsils in patients with IgAN and those in control patients is not established.

We performed tonsillectomy combined with steroid pulse as a treatment to IgAN, analyzed the gene expression in the tonsils using microarray, and compared them with those with patients

* Corresponding author. Fax: +81 6 6879 3857.

E-mail address: nagasawa@kid.med.osaka-u.ac.jp (Y. Nagasawa).

suffering from chronic tonsillitis. From some candidate genes related with IgAN, we confirmed the apolipoprotein B messenger RNA-editing enzyme catalytic polypeptides 2 (APOBEC2) gene expression in the tonsil and we also analyzed its expression levels and clinical features.

Materials and methods

Patients enrollment. Tonsil tissues of the IgAN patients were obtained from 73 consecutive patients who were over 17 years old, undergoing tonsillectomy at Osaka university hospital from 2004, April to 2007, May. The diagnosis of the IgAN in these patients was confirmed by the renal biopsy prior to the tonsillectomy. From these 73 patients, we picked up all patients whose proteinuria and hematuria were perfectly ameliorated within 2 years after tonsillectomy and steroid pulse therapy, because the tonsils in these patients might be related with IgAN. Twenty-three patients fulfilled the criteria. The 22 control tonsil tissues were obtained from the patients suffering from chronic tonsillitis at tonsillectomy. One sample of tonsil tissues in IgAN patients group was eliminated because of the small amounts of RNA. Patients characteristics are described in Table 1.

Written informed consent was obtained from all participating subjects. This study was approved by the ethical committee of Osaka University Graduate School of Medicine, which abides by the Helsinki Declaration on ethical principles for medical research involving human subjects.

DNA microarray analysis. The quality of the RNA samples was examined using the RNA 6000 Nano LabChip Kit (p/n 5065–4476) on the Agilent 2100 Bioanalyzer (G2940BA; Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA). Total RNA (500 ng) from 23 IgAN patients or 22 control patients was reverse-transcribed using oligo-dT primers containing the T7 RNA polymerase promoter sequence, and the cDNAs were then subjected to in vitro transcription using T7 RNA polymerase to label cDNAs with Cy3 or Cy5 (CyDye, GE healthcare, Bio-sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Cy-labeled cRNA from IgAN patients (1 mg) was mixed with the same amount of reverse color Cy-labeled product from an equal amount of pooled cRNA from control patients. Labeled cRNAs were fragmented to an average size of approximately 50–100 nt by heating at 60 °C in the presence of 10 mM ZnCl₂, and the samples were then added to a hybridization buffer. Hybridizations with the Agilent's whole human genome microarray (Hu44K) (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, US) were conducted at 40 °C. After hybridization, slides were washed and scanned using an Agilent confocal laser scanner (G2565BA). Fluorescence intensities on scanned images were quantified, corrected for background noise and normalized. Fluorophore

reversal (dye swap) duplicates were used in two-color DNA microarray experiments.

Quantitative real-time PCR. In order to quantify the expression of mRNA, real-time SYBR-Green PCR analysis was performed. Briefly, 0.4 µg of RNA was converted to single-strand DNA using random primers and SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). Each cDNA was mixed with 0.2 µM forward and reverse primers, and 10.0 µl of GYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA, US). PCR was performed with an Applied Biosystems 7900 real-time PCR system. The primer sets had the following sequences: Human CALB2 forward, 5'-acattgacgagcatgagctg-3'; Human CALB2 reverse, 5'-ggtag agcttccctgcctct-3'; Human DUSP27 forward, 5'-aaggacacagaggagga gca-3'; Human DUSP27 reverse, 5'-ctgcatctgagaccatcga-3'; Human PIGR forward, 5'-aacgggagagaaggaagtgg-3'; Human PIGR reverse, 5'-gtggagatggctgggaaga-3'; Human APOBEC2 forward, 5'-accatttggagctggacaac-3'; Human APOBEC2 reverse, 5'-ccttgggtgagcaattagg a-3'; Human CXCL11 forward, 5'-agtctggaaaaggatctc-3'; Human CXCL11 reverse, 5'-tcaccaccttctatcctc-3'; GAPDH forward, 5'-gagtc aacggattggctgt-3'; GAPDH reverse, 5'-ttgatttggaggatctc-3'.

Quantitative real-time PCR of APOBEC2 using large IgAN patient samples. To confirm the up-regulation of APOBEC2 in IgAN patients, we analyzed the APOBEC2 expression level using more tonsil samples from 73 IgAN patients. This extended IgAN patients includes the original IgAN patients and the patients whose proteinuria and hematuria did not ameliorated after tonsillectomy or whose observation periods was not sufficient after tonsillectomy. There was no significant difference of clinical parameters between the original IgAN patients group and the extended IgAN patients group except period to remission of proteinuria and hematuria (shown in Table 1). The quantitative real-time PCR analysis was performed using the same primers.

Histological analysis of APOBEC2 in human tonsil tissue. For histological analysis of human tonsil, the tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS just after tonsillectomy. Immunostaining was done using anti-human APOBEC2 rabbit antibody (Abcam plc, Cambridge, UK). Sections were incubated at 4 °C overnight with APOBEC2 antibody, washed three times with PBS and incubated at room temperature for 30 min together with the biotinylated secondary antibody. After another washing with PBS, the sections were incubated at room temperature for 30 min with VECTASTAIN elite ABC Reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, US), and in peroxidase substrate solution for 40 s.

Analysis of APOBEC2 gene expression levels and clinical features. The relationship between the APOBEC2 expression level and clinical features were analyzed in IgAN patients and in overall patients including control patients. Clinical course after tonsillectomy between the IgAN patients with high APOBEC2 level and those with low APOBEC2 level were analyzed by Kaplan–Meier method.

Table 1
Patient characteristics.

	IgAN group (N = 23)	Extended IgAN group (N = 73)	Control group (N = 22)
Age	32 (24–46)	32 (24–45)	31 (20–40)
Sex (female)	11/23	41/73	12/22
GFR**	92.3 ± 23.2	91.1 ± 25.8	124.2 ± 41.5
Proteinuria	0.38 (0.10–0.51)	0.50 (0.24–0.95)	0
IgA	320 (225–392)	300.5 (230.3–371.8)	261 (211–394)
ASO**	80 (60–320)	46 (31–97)	320 (160–2560)
ASK*	53 (34.5–100.5)	80 (40–320)	119.9 (49.5–234.4)
C3	119.1 ± 18.3	125.7 ± 22.6	104 (86–122.5)
C4	19 (18–23.3)	21.5 (18.0–26.0)	22 (20–25.5)
CH50	41.2 ± 8.5	43.1 ± 9.2	45.8 (38.2–49.4)
History of macrohematuria	10/23	32/73	0/22
Period to remission of proteinuria (month)	3.9 (0.6–6.5)	–	–
Period to remission of hematuria (month)	6.5 (5.1–10.7)	–	–

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

Statistical analysis. Normally distributed continuous variables were expressed as means \pm SD, and non-normally distributed continuous variables as median (interquartile range). Categorical variables were expressed as proportions. All analyses were based on available data without any imputation method. For comparison between the two groups, the Student *t*-test was used for normally distributed continuous variables, the Mann–Whitney test for non-normally distributed continuous variables, and χ^2 test for categorical variables. Variables with skewed distribution were entered to univariate and multivariate regression model after log transformation. Correlation between two variables was examined by linear regression analysis. Correlation coefficients were calculated using Pearson's method. Kaplan–Meier analysis using Log-rank test was used to compare survival rate. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using JMP for windows version 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, US).

Results

Clinical characteristics of 23 IgAN patients and 22 control patients are presented in Table 1. Mean glomerular filtration rate (GFR) in IgAN patients was 92.3 ml/min, while GFR in control

group was 124.2 ml/min. GFR was calculated using GFR estimated equation [9]. Urinary protein in IgAN patients was 0.38 (0.1–0.51) g/day. ASO and ASK in control group were significantly higher than those in IgAN patients, probably because control group patients included many patients suffering from chronic tonsillitis such as streptococcal infection.

After the mRNA quality was checked, microarray analysis was performed. Up-regulated genes and down-regulated genes in IgAN were summarized in Tables 2 and 3, respectively. Up-regulated genes seem to be categorized into two groups. One group belongs to the muscle related genes such as myosin, heavy polypeptide 1, small muscle protein, and troponin T3. Tonsils in chronic tonsillitis patients were obviously larger than those in IgAN patients. The structural difference in the tonsils between in IgAN patients and in chronic tonsillitis was known [10]. The up-regulation of these kinds of muscle structure genes might be caused by these structural differences. The other group includes the immune system-related genes, such as CALB2, DUSP27, APOBEC2, and CXCL11. In down-regulated genes, PIGR was also immune-related genes.

The immune system-related genes whose fold changes were more than 2 or less than 1/2 were considered to be related with IgAN. Therefore, we confirmed the fold change of CALB2, DUSP27, APOBEC2, CXCL11, PIGR using real-time PCR methods (data not

Table 2
Up-regulated genes in tonsils of IgAN compared with those of tonsillitis.

Gene No.	Fold change	Primary sequence name	Sequence description
1	3.44597	AF319957	FKSG22
2	3.3604	MYH1*	Myosin, heavy polypeptide 1 (MYH1)
3	3.2843	CALB2	Calbindin 2, 29 kDa (calretinin) (CALB2)
4	2.48523	DUSP27	DUSP27
5	2.19025	HBG1	Hemoglobin, gamma A (HBG1)
6	2.12117	APOBEC2	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2 (APOBEC2)
7	2.10019	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11)
8	2.08785	NEB	Nebulin (NEB)
9	2.07118	SLN	Sarcophilin (SLN)
10	2.04012	SMPX*	Small muscle protein, X-linked (SMPX)
11	2.0029	TNNT3	Troponin T3, skeletal, fast (TNNT3)
12	1.98673	FNDC5	Fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5)
13	1.97052	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) (SPP1)
14	1.91718	RAI3	Retinoic acid induced 3 (RAI3)
15	1.91314	FLG	Filaggrin (FLG)
16	1.71255	C20orf85	Chromosome 20 open reading frame 85 (C20orf85)
17	1.56927	CEACAM7	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7 (CEACAM7)
18	1.56623	LGALS7	Lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7) (LGALS7)
19	1.52044	GSTA2	Glutathione S-transferase A2 (GSTA2)
20	1.51056	C7	Complement component 7 (C7)

Table 3
Down-regulated genes in tonsils of IgAN compared with those of tonsillitis.

Gene No.	Fold change	Primary sequence name	Sequence description
1	-5.70085	NM_152399	Hypothetical protein FLJ30834 (FLJ30834)
2	-3.8934	ALB	Albumin (ALB)
3	-2.89827	C20orf114	Chromosome 20 open reading frame 114 (C20orf114)
4	-2.48895	CGREF1	Cell growth regulator with EF hand domain 1 (CGREF1)
5	-2.35137	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)
6	-2.31104	CHGB	Chromogranin B (secretogranin 1) (CHGB)
7	-2.26152	AI916628	AI916628 wa28h04.x1 NCL_CGAP_Kid11 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2299447 3'
8	-2.24077	PLUNC	Palate, lung and nasal epithelium carcinoma associated (PLUNC), transcript variant 1
9	-2.23702	THC2439430	ALU8_HUMAN (P39195) Alu subfamily SX sequence
10	-2.19688	SCGB3A1	Secretoglobin, family 3A, member 1 (SCGB3A1)
11	-2.18676	DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1), transcript variant 2
12	-2.07256	BPIL1	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1 (BPIL1)
13	-1.94105	RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1 (RASD1)
14	-1.93965	MUC5B	Mucin 5B precursor
15	-1.60687	RPS26	Ribosomal protein S26 (RPS26)
16	-1.59478	AZGP1	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc (AZGP1)
17	-1.55093	TF	Transferrin (TF)
18	-1.52548	CASC5	Cancer susceptibility candidate 5 (CASC5), transcript variant 1
19	-1.50124	SERPINA5	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5 (SERPINA5)

shown). From these candidate genes, we made further analysis for the APOBEC2 because the function of the gene remained unknown, but the function of this gene family is considered to be one of the key switches of B cells proliferation in immune system [11,12].

We measured the APOBEC2 gene expression level, but there was no significant difference in clinical features between IgAN group and control group. No statistical difference might be caused by small sample size, because APOBEC2 in IgAN patients tended to be higher than that in control group. There were other tonsil samples which were not used in the original microarray analysis, because we picked up the tonsils from IgAN patients whose proteinuria and hematuria were completely ameliorated. As shown in Table 1, there was no significant difference between original IgAN group and the enlarged IgAN group. We measured the APOBEC2 gene expression level of enlarged IgAN patients, and there was statistically significant difference between those in the enlarged IgAN patients and those in control group (Fig. 1).

We investigated the distribution of APOBEC2 gene in patients and control tonsils. APOBEC2 was positively stained in the epithelium and the peripheral region of the germinal center in tonsils (Fig. 2). There was no obvious difference of the distribution pattern between in tonsil of the IgAN and in that of control tonsil.

We analyzed the relationship between the APOBEC2 gene expression and clinical features of the IgAN patients and overall ($N=95$) patients using simple and multiple regression analysis

(Table 4). Only IgG was negatively related with APOBEC2 in simple and multiple regression analysis ($r = -0.27$, $P < 0.05$). This relation between APOBEC2 gene expression level and IgG was shown in Fig. 3. When expanded IgAN patients were divided into two groups according to the median of APOBEC2, there is no significant difference of time to remission of proteinuria and hematuria between high APOBEC2 group and low APOBEC2 group in Kaplan–Meier analysis using Logrank test (Fig. 4).

Discussion

We analyzed the gene expression level in tonsils with IgAN patients and compared with those with control patients. The genes related with immune system and muscle structure were elevated in IgAN patients. APOBEC2, which was considered to be related with B cell proliferation, was confirmed to be elevated in the tonsils with IgAN patients, and the gene expression level was negatively related with serum IgG level in overall patients.

The tonsil in IgAN has several characteristics compared with that in chronic tonsillitis. The difference of the tonsil was categorized into two groups. First category of characteristics is the change in tonsillar histological structure. T cell nodules in tonsil with IgAN patients were enlarged, especially in younger patients, and a few T

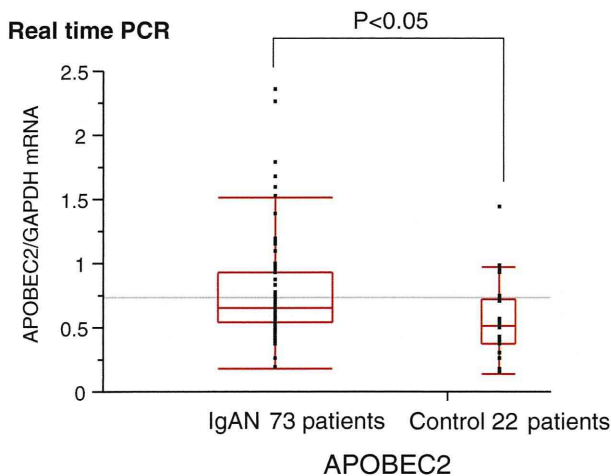


Fig. 1. Tonsillar APOBEC2 gene expression level in extended IgAN patients group and in control patients. APOBEC2 in IgA patients ($N=73$) is higher than that in control patients ($N=22$) ($P < 0.05$).

Table 4

Simple and multiple regression analysis of the factors which have influence upon APOBEC2 gene expression level.

	IgAN patients		Overall patients	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
Sex (female)	0.18	NS	0.12	NS
Age	0.12	NS	0.16	NS
GFR	0.013	NS	-0.13	NS
C3	-0.032	NS	-0.088	NS
C4	-0.019	NS	-0.064	NS
IgA	-0.038	NS	0.059	NS
IgG	-0.19	NS	-0.27	$P = 0.011^*$
U-P/U-Cr	-0.13	NS	-	-
			Overall patients	
			β	<i>P</i>
Sex (female)			0.11	0.036*
Age			0.23	0.095
GFR			-	NS
IgG			-0.00058	0.0041**
R^2			0.14	

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

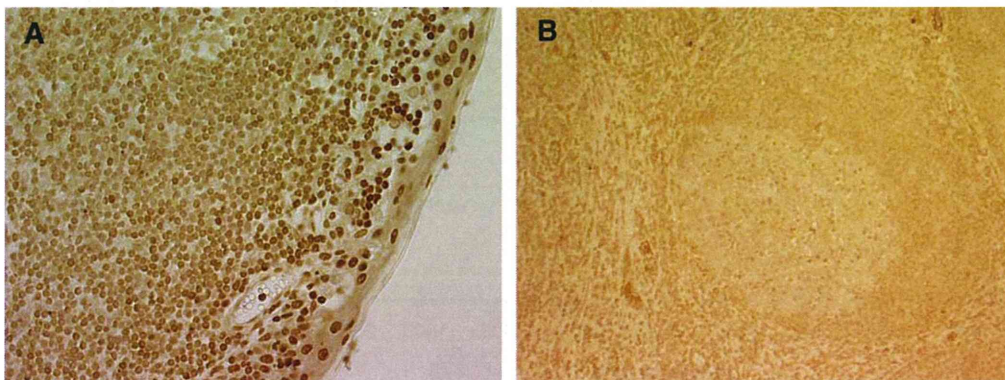


Fig. 2. Immunohistochemistry analysis of APOBEC2 in tonsil. (A) APOBEC2 staining in epithelium of tonsil in IgAN patient ($\times 400$ magnification). (B) APOBEC2 staining in germinal center of tonsil in IgAN patient ($\times 200$ magnification).

cell nodule contain high endothelial venules and nonlymphoid cells, while T cell nodules in patients with chronic tonsillitis do not expand, and nonlymphoid cells and high endothelial venules are distributed peripherally around the nodules [10,13]. These kinds of structural difference might be related with the up-regulation of the genes related with muscle and fibrosis, such as myosin, nebulin, sarcoplamin, small muscle protein shown in Table 2.

Second, tonsillar cells in IgAN patients were different from those in chronic tonsillitis patients. In control patients with recurrent tonsillitis, IgG secreting cells were predominant, while in the IgAN patients, the plasma cells percentage was of an inversion [14]. The molecules related with immune system, such as CD31 and CD51 were also reported to be changed in patients with IgAN [15]. Recently it was reported that under stimulation with unmethylated deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotide (CpG-ODN), the productions of IgA, B cell Activation Factor (BAFF) and IFN-gamma from tonsillar mononuclear cells were significantly higher in IgAN patients than in non-IgAN patients [16]. This report might suggest that hyper-immune response to microbial DNA might be present in IgAN patients. These kinds of differences in immune cells and immune-related molecules between IgAN patients and control patients might be reflected in the up and down regulation of immune-related genes in our study, such as calbindin 2, DUSP27, APOBEC2, CXCL11, PIGR, shown in Tables 2 and 3.

APOBEC2 belongs to the family of apolipoprotein B messenger RNA-editing enzyme catalytic (APOBEC) polypeptides, which deaminates mRNA and single-strand DNA [11]. The APOBEC2 deamination activity is impaired by mutations predicted to interfere with oligomerization and substrate access. The APOBEC2 structure suggests how mutations in patients with hyper-IgM-2 syndrome inactivated activation-induced cytidine deaminase (AID), resulting in defective antibody maturation [12]. These reports suggested that the APOBEC2 might be related with the immune system. Moreover, the APOBEC2 contains the functional NF- κ B response elements in the 5' untranslated region, and its expression is regulated by pro-inflammatory cytokines via NF- κ B activation [17]. The APOBEC2 expression level in tonsils with IgAN patients was higher than that in tonsils with control (see Fig. 1). The focal infection in tonsils with IgAN might cause up-regulation of APOBEC2 via inflammatory cytokines and transcriptional factors including NF-

KB, resulting in the decrease of serum IgG (see Fig. 3). This kind of activation of APOBEC2 might apply not only to the tonsils in IgAN, but also to those in chronic tonsillitis. Therefore the relationship between IgG and APOBEC2 was analyzed in overall patients. The higher expression level of APOBEC2 in tonsils with IgAN might be caused by strong inflammatory change or some genetic background of immune response. APOBEC2 was distributed around germinal center and there was no difference of the distribution between in IgAN patients and in control patients (see Fig. 2). The up-regulation of APOBEC2 occurred around germinal center without clear distribution changes in IgAN patients, where the IgG and IgA were produced by B cells, cooperating with T cells.

In clinical view point, unfortunately, APOBEC2 expression level did not correlated with clinical course after tonsillectomy (see Fig. 4). There are several explanations for this phenomenon. First, APOBEC2 might be associated with pathogenesis of IgAN, not with disease activity. Second, the expression level of APOBEC2 in tonsil might be representative for the mucosal immune condition in whole body, but the main place where pathogenetic IgA was pro-

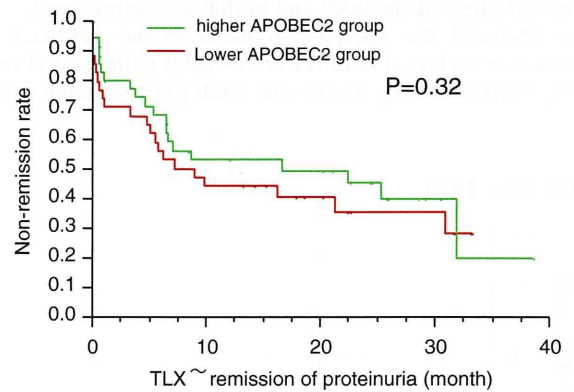


Fig. 4. Kaplan-Meier analysis of clinical course after tonsillectomy. The median of APOBEC2 is used as cut-off. There is no significant difference of time to remission of proteinuria and hematuria between high APOBEC2 group and low APOBEC2 group ($P = 0.32$).

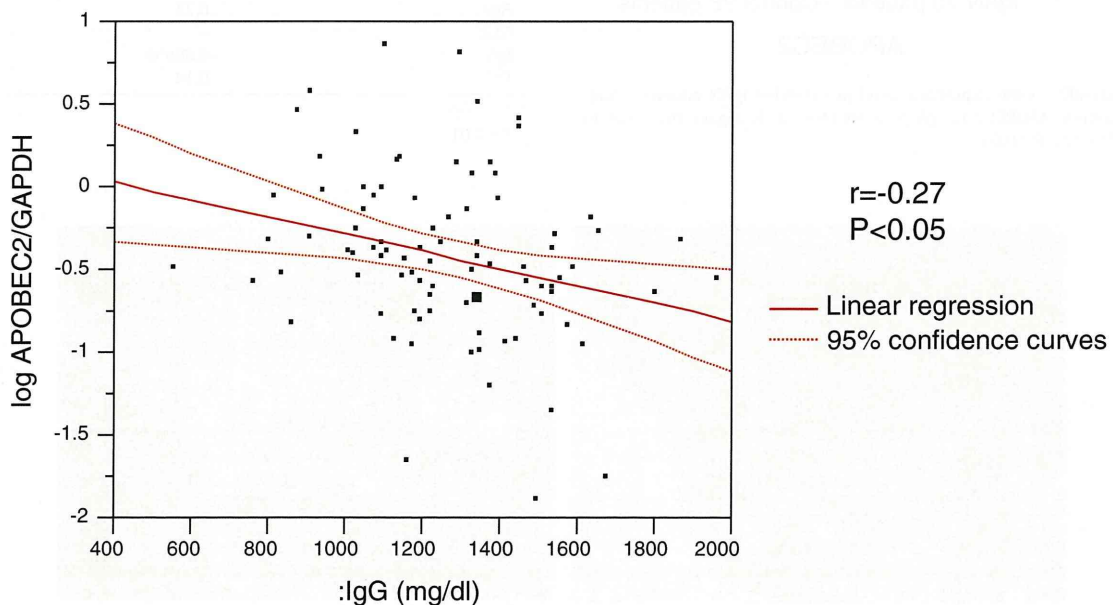


Fig. 3. Serum IgG and APOBEC2 gene level in overall patients ($N = 95$). There was significant negative correlation between IgG and APOBEC2 gene expression level ($r = -0.27$, $P < 0.05$).

duced might exist in other mucosal immune organs, such as lymph nodes in the upper respiratory organs or upper gastrointestinal tract. Third, there are other important factors which make the IgAN keep disease activity than APOBEC2 in tonsil or other immune system. Anyway, APOBEC2 expression may be indicator for diagnosis of IgAN, but not be predictor of the effectiveness of tonsillectomy and steroid pulse therapy in IgAN patients.

In this study, there were several limitations. First, there is no clear evidence that proves that the elevation of APOBEC2 has been directly caused by IgAN itself. There is still some possibility that APOBEC2 elevation means the simple association. In this point, since the function of APOBEC2 remains unknown, direct proof is very difficult, but further analysis will be necessary. Second, the microarray analysis was preformed using whole tonsil samples. The tonsil consists of many kinds of cells, such as various kinds of B cells and T cells. After fractionation of cells of tonsil, analysis could focus each cell function or activity.

In conclusion, we confirmed that the genes related with immune system and muscle structure were elevated in tonsils in IgAN patients, compared with those in control patients. The APOBEC2 was confirmed to be elevated in the tonsils with IgAN patients, and the gene expression level was negatively related with serum IgG level in overall patients. These results might be helpful to reveal the mechanism of IgAN.

References

- [1] E. Pettersson, IgA nephropathy: 30 years on, *J. Intern. Med.* 242 (1997) 349–353.
- [2] R. Yamamoto, Y. Nagasawa, T. Shoji, K. Inoue, T. Uehata, T. Kaneko, T. Okada, A. Yamauchi, Y. Tsubakihara, E. Imai, Y. Isaka, H. Rakugi, A candidate gene approach to genetic prognostic factors of IgA nephropathy – a result of Polymorphism REsearch to Distinguish genetic factors Contributing To progression of IgA Nephropathy (PREDICT-IgAN), *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (2009) 3686–3694.
- [3] A. Koyama, M. Igarashi, M. Kobayashi, Natural history and risk factors for immunoglobulin A nephropathy in Japan. Research Group on Progressive Renal Diseases, *Am. J. Kidney Dis.* 29 (1997) 526–532.
- [4] O. Hotta, M. Miyazaki, T. Furuta, S. Tomioka, S. Chiba, I. Horigome, K. Abe, Y. Taguma, Tonsillectomy and steroid pulse therapy significantly impact on clinical remission in patients with IgA nephropathy, *Am. J. Kidney Dis.* 38 (2001) 736–743.
- [5] M. Miyazaki, O. Hotta, A. Komatsuda, S. Nakai, T. Shoji, C. Yasunaga, Y. Taguma, A multicenter prospective cohort study of tonsillectomy and steroid therapy in Japanese patients with IgA nephropathy: a 5-year report, *Contrib. Nephrol.* 157 (2007) 94–98.
- [6] H. Komatsu, S. Fujimoto, S. Hara, Y. Sato, K. Yamada, K. Kitamura, Effect of tonsillectomy plus steroid pulse therapy on clinical remission of IgA nephropathy: a controlled study, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3 (2008) 1301–1307.
- [7] Y. Xie, S. Nishi, M. Ueno, N. Imai, M. Sakatsume, I. Narita, Y. Suzuki, K. Akazawa, H. Shimada, M. Arakawa, F. Gejyo, The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy, *Kidney Int.* 63 (2003) 1861–1867.
- [8] G.B. Appel, M. Waldman, The IgA nephropathy treatment dilemma, *Kidney Int.* 69 (2006) 1939–1944.
- [9] A.S. Levey, J. Coresh, T. Greene, L.A. Stevens, Y.L. Zhang, S. Hendriksen, J.W. Kusek, F. Van Lente, Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate, *Ann. Intern. Med.* 145 (2006) 247–254.
- [10] Y. Xie, X. Chen, S. Nishi, I. Narita, F. Gejyo, Relationship between tonsils and IgA nephropathy as well as indications of tonsillectomy, *Kidney Int.* 65 (2004) 1135–1144.
- [11] S.G. Conticello, C.J. Thomas, S.K. Petersen-Mahrt, M.S. Neuberger, Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases, *Mol. Biol. Evol.* 22 (2005) 367–377.
- [12] C. Prochnow, R. Bransteitter, M.G. Klein, M.F. Goodman, X.S. Chen, The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID, *Nature* 445 (2007) 447–451.
- [13] M. Kawaguchi, T. Sakai, A. Sakamaki, S. Ishizawa, Y. Baba, Y. Masuda, F. Koizumi, Expanded primary T nodules in the palatine tonsils from patients with IgA nephropathy, *Acta Otolaryngol. Suppl.* 508 (1993) 36–42.
- [14] M.C. Bene, G. Faure, B. Hurault de Ligny, M. Kessler, J. Duheille, Immunoglobulin A nephropathy. Quantitative immunohistomorphometry of the tonsillar plasma cells evidences an inversion of the immunoglobulin A versus immunoglobulin G secreting cell balance, *J. Clin. Invest.* 71 (1983) 1342–1347.
- [15] A. Kennel-De March, M.C. Bene, B. Hurault de Ligny, M. Kessler, G.C. Faure, Enhanced expression of CD31 and CD54 on tonsillar high endothelial venules in IgA nephropathy, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84 (1997) 158–165.
- [16] T. Goto, N. Bandoh, T. Yoshizaki, H. Nozawa, M. Takahara, S. Ueda, T. Hayashi, Y. Harabuchi, Increase in B-cell-activation factor (BAFF) and IFN-gamma productions by tonsillar mononuclear cells stimulated with deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in patients with IgA nephropathy, *Clin. Immunol.* 126 (2008) 260–269.
- [17] T. Matsumoto, H. Marusawa, Y. Endo, Y. Ueda, Y. Matsumoto, T. Chiba, Expression of APOBEC2 is transcriptionally regulated by NF-kappaB in human hepatocytes, *FEBS Lett.* 580 (2006) 731–735.

高齢者の急速進行性糸球体腎炎で 大量免疫抑制療法は必要か？

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分野 臼井丈一，山縣邦弘

ポイント

現 状

- 急速進行性糸球体腎炎(RPGN)は高齢者に好発する。
- 本邦の「RPGNの診療指針」では、ANCA陽性RPGNの場合、高齢者であっても必要に応じ免疫抑制療法を含む初期治療法を推奨している。
- 「RPGNの診療指針 初版」の普及に伴い、RPGNの腎予後、生命予後ともに経年的に改善傾向にある。

対 案

- 免疫抑制療法に関連する感染症が問題視されている。
- 感染症は本邦のRPGNの死因の第1位である。
- その他、血栓塞栓症、骨粗鬆症、心血管病変等に注意が必要である。
- 海外の検討でも65歳以上の高齢者への免疫抑制薬の使用は、死亡を有意に増加させるとされている。

議 論

- 感染症への対策として、「RPGNの診療指針 初版」では初期治療での副腎皮質ステロイドの早期の減量が推奨されている。
- この推奨にもかかわらず、近年においても死亡原因の第1位は感染症である。
- 一方、免疫抑制療法の軽減と長期生存例の増加に伴い、再燃症例の増加が指摘されている。

展 望

- 初期治療時のみならず、寛解維持療法における感染症対策の必要性を検討するべきである。
- 本邦のRPGNにおける感染症対策の指針の作成が求められる。
- さらなる生命予後の改善を目標とし、初期治療、寛解維持治療のプロトコールの改良、新規治療法の開発が必要である。

現状——現在にいたる歴史的背景

急速進行性糸球体腎炎 (rapidly progressive glomerulonephritis : RPGN) は、WHO により「急性あるいは潜在性に発症する肉眼的血尿，蛋白尿，貧血，急速に進行する腎不全症候群」と定義されて

いる¹⁾。RPGN は病理学的には、多数の糸球体に細胞性から線維細胞性の半月体の形成を認める半月体形成性壊死性糸球体腎炎 (necrotizing crescentic glomerulonephritis) が典型像である。腎疾患のうちで腎予後、生命予後ともに不良な難病である。もっとも症例数の多い病型であるミエロペル

Table 1. 臨床所見のスコア化による重症度分類

スコア	血清クレアチニン(mg/dl) *	年齢(歳)	肺病変の有無	血清 CRP(mg/dl) *
0	[] <3	<60	なし	<2.6
1	3 ≤ [] <6	60~69	—	2.6~10
2	6 ≤ []	≥70	あり	>10
3	透析療法	—	—	—

*初期治療時の測定値.

臨床所見学的重症度	総スコア
Grade I	0~2
Grade II	3~5
Grade III	6~7
Grade IV	8~9

オキシダーゼ (myeloperoxidase : MPO) 型抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody : ANCA) 陽性の RPGN を含め自己免疫疾患が多く、重症例では大量の免疫抑制療法を必要とする症例も少なくない。

厚生労働省特定疾患進行性腎障害 RPGN 分科会では、1996 年度より本邦における RPGN の現状把握と診療指針作成ならびにデータベース構築を目的として全国個別症例アンケート調査を実施し、2001 年度時点で集積された 715 例のわが国の RPGN 症例の検討をもとに 2002 年時点での「RPGN の診療指針」(以下、初版とする)を刊行した²⁾。この診療指針では RPGN の診断指針、臨床病期分類、病理病期分類に加え、全国調査の中でもっとも症例数の多い病型である MPO-ANCA 陽性 RPGN を中心に全国アンケート調査から得られた症例の予後の中で、もっとも予後改善を期待できる治療法を提案している。

「RPGN の診療指針 初版」では、臨床重症度に基づいた MPO-ANCA 陽性 RPGN の診療アルゴリズムが提唱されている。臨床所見をスコア化した重症度分類を Table 1 に示す。年齢、血清クレアチニン、肺病変の有無、血清 CRP の四つの因子で規定される。MPO-ANCA 陽性 RPGN の診療アルゴリズムは、治療開始時の臨床重症度、年齢、

透析施行の有無により、4 群に分類して治療法が示されている。ちなみに「RPGN の診療指針 第二版」では、MPO-ANCA に限定せず ANCA 陽性 RPGN としてこの診療アルゴリズムは提示されている (Fig. 1)。

従来、ANCA 関連血管炎の治療法はとくに欧米に多い Wegener 肉芽腫症の治療を基本に発展してきており、この治療をそのまま日本人に適用すると、本邦に多い高齢者中心の MPO-ANCA 陽性 RPGN では治療早期の死亡率がきわめて高率であることが問題となる²⁾。そこでこの診療アルゴリズムでは同じ重症度であっても、経口副腎皮質ステロイド単独から cyclophosphamide (CY) 併用投与まで幅をもたせ、同一の重症度であっても 70 歳以上の高齢者には 1 ランクマイルドな治療を行うことを推奨している。もちろん高齢者であっても臨床重症度の高い重症例では、ステロイドパルス療法や CY 投与を推奨している。

RPGN に対するステロイドパルス療法の有効性は 1980 年代より報告されているが、本邦で多数を占める MPO-ANCA 陽性 RPGN の高齢者症例への有効性のエビデンスは乏しい。「RPGN の診療指針 初版」の層別解析では、経口副腎皮質ステロイドと比較し、腎予後、生命予後に関する有効性は認められていないが、諸外国を含む過去の

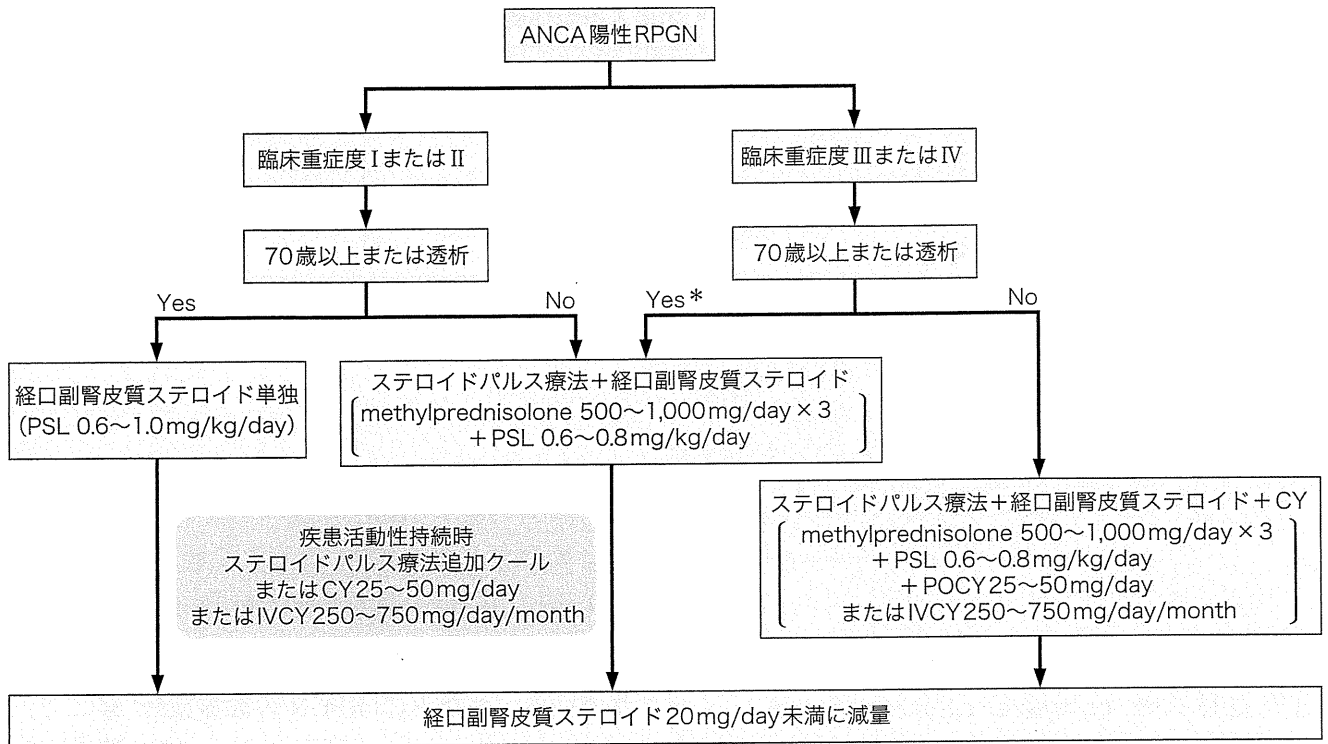


Fig. 1. ANCA 陽性 RPGN の治療指針

* 70 歳以上では、ステロイドパルス療法を行わないなど、さらにもう 1 ランク治療を弱めた治療法も考慮される。

有効性の報告，活動性の高い自己免疫疾患である病態を考慮し，主治医の判断をもとに選択すべき第一選択の治療法として推奨されている。また，副腎皮質ステロイドと CY の併用投与に関しても「RPGN の診療指針 初版」の層別解析において，腎予後，生命予後に関する有効性は認められていないが，ステロイドパルス療法実施群の重症例（臨床重症度Ⅲ + Ⅳ群）に限定した比較検討から生命予後を改善させることが示されている。

ステロイドパルス療法や CY の併用投与に関するこれらの有効性から，たとえ高齢者であっても感染合併例等の日和見感染の危険性が高い症例を除き，MPO-ANCA 陽性 RPGN 重症例での診療指針の一選択肢として大量免疫抑制療法は推奨されている。近年米国から報告された ANCA 関連腎炎高齢者症例（80 歳以上，2001 年以降の治療症例）の検討では，免疫抑制療法実施例（副腎皮質ステロイド単独も含む，50 例）のほうが非実施例（11 例）と比較し，生命予後，腎予後ともに良好であった³⁾。

対案——今の問題点

「RPGN の診療指針 初版」の層別解析において，ステロイドパルス療法の実施による感染症死を含めた生命予後の悪化には否定的であるものの，高齢者における CY 併用症例での死亡率の高さが問題となった。また，その死亡原因として 50% が感染症によることが判明した。さらに副腎皮質ステロイドの維持投与量が prednisolone (PSL) 換算 20 mg/day 未滿の症例群で，20 mg/day 以上投与群と比較し生命予後が良好であることが明らかとなり，初期治療における速やかな副腎皮質ステロイドの減量が重要視されている。

「RPGN の診療指針 初版」での MPO-ANCA 陽性 RPGN の診療アルゴリズムにおいて，副腎皮質ステロイドの投与量を 4~8 週以内に PSL 換算 20 mg/day 未滿へ減量を図ることが推奨されている。諸外国の報告をみると，フランスからの血管炎の検討において 65 歳以上の高齢者への免疫抑制薬の使用は死亡を有意に増加させるとされてい

Table 2. RPGN における生命予後

			6ヵ月		12ヵ月		24ヵ月	
			観察症例数	%	観察症例数	%	観察症例数	%
一次性	抗 GBM 抗体型半月体形成性糸球体腎炎	1998 年以前	39	83.5	29	80.5	28	80.5
		1999～2001 年	18	88.9	15	88.9	15	82.5
		2002 年以降	22	81.1	14	81.1	14	81.1
	Pauci-immune 型半月体形成性糸球体腎炎***	1998 年以前	342	81.1	254	76.2	230	72.4
		1999～2001 年	147	84.5	113	81.5	103	75.6
		2002 年以降	240	89.7	165	87.4	134	82.1
全身性	Goodpasture 症候群***	1998 年以前	14	71.4	9	63.5	6	54.4
		1999～2001 年	5	60.0	3	60.0	3	60.0
		2002 年以降	8	62.5	5	37.5	1	37.5
	全身性エリテマトーデス	1998 年以前	50	85.9	42	85.9	42	83.8
		1999～2001 年	5	60.0	3	60.0	3	60.0
		2002 年以降	10	90.0	9	90.0	8	78.8
	Wegener 肉芽腫症	1998 年以前	23	78.3	18	78.3	18	78.3
		1999～2001 年	9	66.7	6	66.7	5	53.3
		2002 年以降	13	67.7	8	67.7	6	67.7
	顕微鏡的多発血管炎**	1998 年以前	157	68.4	102	65.7	90	61.2
		1999～2001 年	57	77.9	39	77.9	37	73.6
		2002 年以降	126	82.6	81	79.3	57	73.3
	全体***	1998 年以前	883	79.2	643	75.5	586	72.0
		1999～2001 年	321	80.1	228	78.3	211	72.8
		2002 年以降	556	86.1	365	82.8	281	77.7

* 1998 年以前群と 1999～2001 年群間で $p < 0.05$.

** 1998 年以前群と 2002 年以降群間で $p < 0.05$.

GBM : glomerular basement membrane.

る⁴⁾。また、欧州における多施設前向き比較検討試験でも、ANCA 関連血管炎における死因の約半数は感染症であり、血管炎自体による死亡を上回っているとされる⁵⁾。

両者の比較——もしくは解決のための模索

「RPGN の診療指針 初版」が刊行された 2002 年度以降も継続して実施された全国調査により追加集積された症例を含めた 1,772 例のデータをもとに、「RPGN の診療指針 初版」を発表前後の変化を中心に予後や治療法の変化を検討してい

る⁶⁾。この時代的変遷の解析をもととして、2010 年度における「RPGN の診療指針 第二版」が公表されている⁷⁾。

生命予後、腎予後の検討は治療開始の年代により明らかに異なっている。RPGN の生命予後を Table 2 に示す。生命予後、腎予後ともに改善がみられ、RPGN 全体の 6ヵ月生命予後は 1998 年以前治療開始群の 79.2% から 2002 年以降治療開始群では 86.1% まで改善している。6ヵ月腎予後も 1998 年以前治療開始群の 73.3% から、2002 年以降治療開始群では 81.8% まで改善している。

Table 3. RPGN における死因

	1998 年以前		1999~2001 年		2002 年以降	
対象患者数(人)	884		321		568	
死亡患者総数(人)(%)	351	39.71%	110	34.27%	102	17.96%
平均経過観察期間(月)(範囲(月))	59.4(0.0~213.6)		36.8(0.0~98.8)		17.5(0~59.2)	
感染症(人)(%)	169	48.1%	42	38.2%	57	55.9%
播種性血管内凝固症候群(人)(%)	57	16.2%	18	16.4%	16	15.7%
呼吸不全(人)(%)	102	29.1%	27	24.5%	25	24.5%
感染性肺炎(人)(%)	109	31.1%	20	18.2%	28	27.5%
原疾患に伴う肺病変(人)(%)	32	9.1%	5	4.5%	4	3.9%
間質性肺炎(人)(%)	37	10.5%	16	14.5%	20	19.6%
肺胞出血(人)(%)	48	13.7%	8	7.3%	12	11.8%
脳出血(人)(%)	18	5.1%	5	4.5%	4	3.9%
くも膜下出血(人)(%)	4	1.1%	1	0.9%	2	2.0%
うっ血性心不全(人)(%)	35	10.0%	14	12.7%	6	5.9%
急性心筋梗塞(人)(%)	3	0.9%	6	5.5%	1	1.0%
消化管出血(人)(%)	33	9.4%	15	13.6%	7	6.9%
多臓器不全(人)(%)	36	10.3%	17	15.5%	12	11.8%
その他(人)(%)	17	4.8%	27	24.5%	16	15.7%

Table 4. RPGN における初期治療法(全体)

a. RPGN における初期治療法(全体)	1998 年以前		1999~2001 年		2002 年以降		全 体	
副腎皮質ステロイド, 免疫抑制薬ともなし	90	12.23%	19	6.23%	26	4.79%	135	8.52%
経口副腎皮質ステロイドのみ	138	18.75%	57	18.69%	128	23.57%	323	20.39%
ステロイドパルス療法+経口副腎皮質ステロイド	360	48.91%	153	50.16%	278	51.20%	791	49.94%
免疫抑制薬+経口副腎皮質ステロイド	58	7.88%	33	10.82%	25	4.60%	116	7.32%
免疫抑制薬+ステロイドパルス療法+経口副腎皮質ステロイド	87	11.82%	43	14.10%	86	15.84%	216	13.64%
免疫抑制薬のみ	3	0.41%	0	0.00%	0	0.00%	3	0.19%
b. MPO-ANCA 型 RPGN における初期治療法	1998 年以前		1999~2001 年		2002 年以降		全 体	
副腎皮質ステロイド, 免疫抑制薬ともなし	28	7.69%	5	2.91%	10	2.66%	43	4.71%
経口副腎皮質ステロイドのみ	70	19.23%	28	16.28%	91	24.20%	189	20.72%
ステロイドパルス療法+経口副腎皮質ステロイド	186	51.10%	93	54.07%	198	52.66%	477	52.30%
免疫抑制薬+経口副腎皮質ステロイド	33	9.07%	18	10.47%	18	4.79%	69	7.57%
免疫抑制薬+ステロイドパルス療法+経口副腎皮質ステロイド	45	12.36%	28	16.28%	59	15.69%	132	14.47%
免疫抑制薬のみ	2	0.55%	0	0.00%	0	0.00%	2	0.22%
体重あたり初期副腎皮質ステロイド量, PSL 換算(mg/kg/day)	0.85*	(0.400)	0.77	(0.307)	0.71*	(0.279)	0.78	(0.342)

*両群間で $p < 0.05$.

RPGN 患者の死亡原因は従来から感染症によるものが主体であったが、「RPGN の診療指針 初版」の普及, 感染症対策としてのマイルドな治療法

の推奨, 早期の副腎皮質ステロイドの減量, および近年の治療法の進歩により, 死亡率は大きく改善したものの, 2002 年以降治療開始群においても

Table 5. 多変量解析 (COX 比例ハザードモデル, ステップワイズ法) による死亡に影響を与える因子

予後因子	死 亡		
	HR	(95%CI)	p
年齢(対照：59 歳以下)			
60～69 歳	2.284	(1.383-3.772)	0.001
70 歳以上	4.286	(2.649-6.936)	0.000
血清 CRP(対照：<2.6 mg/dl)			
2.6～10 mg/dl	0.776	(0.538-1.120)	0.176
>10 mg/dl	1.315	(0.886-1.951)	0.175
肺病変(対照：なし)	2.169	(1.508-3.119)	0.000
血清クレアチニン(対照：<3 mg/dl)			
3～6 mg/dl	2.250	(1.474-3.434)	0.000
>6 mg/dl	2.492	(1.636-3.797)	0.000
初期副腎皮質ステロイド投与量 PSL 換算(対照：<0.6 mg/kg/day)			
0.6～0.8 mg/kg/day	1.555	(0.996-2.429)	0.052
0.8～1.0 mg/kg/day	1.645	(1.005-2.692)	0.048
>1.0 mg/kg/day	2.132	(1.296-3.506)	0.003

other variables considered：性別, ANCA サブクラス, CY 投与.
Forward selection method, critical $F_{in} = 0.05 / F_{out} = 0.1$.

死因の 55.9% が感染症である (Table 3). ANCA 関連血管炎の発症, 進展機構における細菌感染症の関与も指摘されており, 病因論を含め感染症に対してのさらなる対処法, ならびに病因に対する追求が求められる.

Table 4 に, 本邦の RPGN 症例の初期治療の内訳の「RPGN の診療指針 初版」発刊前後での変化を示す. 近年の早期発見の効果, 疾患に対する理解, 治療法の進歩により, 免疫抑制療法を投薬されずに経過観察される症例は減少している. 病型別ではもっとも症例数の多い MPO-ANCA 陽性 RPGN では, 経口副腎皮質ステロイド単独あるいは, ステロイドパルス療法+経口副腎皮質ステロイドを行い, 免疫抑制薬を使用しない症例が全体の 76.9% を占めている. 一方, ステロイドパルス療法+経口副腎皮質ステロイドに加え免疫抑制薬を投与する, 強力な免疫抑制療法を選択される患者も増加しており, 症例により治療法選択が行われていることが示唆される. さらに経口副腎皮質ステロイドの初期治療における投与量は, 体重あたり PSL 換算 0.71 mg/kg/day まで減少してい

る.

生命予後に有意に影響を与える因子を検討すると, 年齢, 肺病変の有無, 治療開始時腎機能に加え, 経口副腎皮質ステロイド体重あたり PSL 換算 >0.8 mg/kg/day において有意に生命予後が不良であることがわかる (Table 5). 副腎皮質ステロイド投与量と生命予後の関連性の背景因子として, 重症例への高用量の副腎皮質ステロイドの必要性以外に副腎皮質ステロイド量に依存した感染症死があるものと推察される. 現在でも感染症への対策が, RPGN 生命予後のさらなる改善のため重要な課題として残されている. 一方, ANCA 関連血管炎に関する報告から, すべての感染症が死亡にいたるわけではないことも事実であり, 感染症罹患時にはその早期発見, 適切な治療が重要である⁵⁾. その他, 高齢者症例への副腎皮質ステロイドの投与時には, 骨粗鬆症, 血栓塞栓症, 心血管病変等への注意が必要である.

近年 ANCA 陽性 RPGN では再燃率の有意な増加が確認され, 初期治療後の寛解維持治療の重要性が示唆されている. 本分科会が実施した RPGN

1,772 例の全国アンケート調査では、MPO-ANCA 陽性 RPGN の再燃率は 17.4%、PR3-ANCA 陽性 RPGN の再燃率は 25.9% に達している⁷⁾。ANCA 陽性 RPGN では予後の改善に伴う長期観察例の増加がある一方、近年、初期治療における免疫抑制薬、とくに CY を投与せず、副腎皮質ステロイドの使用量を減じるなどのマイルドな治療法が行われるようになった影響と考えられている。

副腎皮質ステロイド単独での初期治療により、血管炎による炎症所見のコントロールが可能となっても、ANCA の陰性化の図れない症例や再燃例が少なからず存在し、初期治療後の再燃予防を目的に免疫抑制薬の投与を行うなどの工夫が必要と考えられる。高齢者が多く日和見感染が多発することなどを考慮すると、副作用の少ない、安全性の高い免疫抑制薬の使用が望まれる。このような点から mizoribine, azathioprine 等の使用法の工夫により、慢性期の再燃予防を考慮する必要となる。

今後の展望——もしくはまとめ

先に述べたとおり、RPGN 重症例では高齢者であっても大量の免疫抑制療法が必要な症例が少なからず存在する。初期治療における免疫抑制薬に関して、経口 CY、および感染等の副作用を軽減、総投与量を減らし、しかも同等の臨床効果があるとの報告がみられる経静脈大量 CY に代わり、他の免疫抑制薬、生物学的製剤の有効性が諸外国から報告され、CY に代わる選択薬の開発・確立が期待されている。これらの諸外国からの成果を踏まえ、本邦に高頻度な MPO-ANCA 陽性 RPGN に対する免疫抑制薬、新規治療薬の有効性の検討が必要である。また、歴史的に本邦の RPGN 症例ではステロイドパルス療法が実施される症例が多いものの、その要否、有効性についての前向き研究はきわめて限られている。本邦の RPGN 初期治療ではいまだ大半の症例においてステロイドパルス

療法が実施されている事実があり、この有効性を客観的に評価する必要がある。その他、大量免疫グロブリン療法や血漿交換療法の適応や実施方法の検証が必要である。

初期治療時の感染症対策のみならず、寛解維持療法時の感染症対策の必要性の検討、およびその指針の作成が望まれる。同時に、本邦の RPGN における寛解維持療法の指針の確立が急務である。RPGN 診療では感染症を含めた合併症対策が重要であるが、腎機能障害の合併等により他疾患における合併症対策とは異なる対応が必要となることが多い。とくに疾患活動性マーカーと日和見感染症発症を明確に鑑別できる指標の開発、日和見感染に対する予防的治療法の確立が望まれる。また、副腎皮質ステロイドを高齢者に多用するため骨粗鬆症対策がきわめて重要であるが、本邦での腎機能障害時のビスホスホネート製剤の投与に関しては一部では禁忌として扱われ、今後腎障害への影響、副作用調査を含めその安全性の再評価が望まれる。

文 献

- 1) Churg J et al : Classification of glomerular disease. Renal Disease : Classification And Atlas of Glomerular Diseases, 2nd Ed, ed by Churg J et al, Igaku-Shoin, Tokyo, p11, 1995
- 2) 急速進行性糸球体腎炎診療指針作成合同委員会 : 急速進行性腎炎症候群の診療指針. 日腎会誌 44 : 55, 2002
- 3) Bomback AS et al : ANCA-associated glomerulonephritis in the very elderly. Kidney Int, 2011, in press
- 4) Mouthon L et al : Polyarteritis nodosa and Churg-Strauss angiitis : characteristics and outcome in 38 patients over 65 years. Medicine (Baltimore) 81 : 27, 2002
- 5) Turnbull J, Harper L : Adverse effects of therapy for ANCA-associated vasculitis. Best Pract Res Clin Rheumatol 23 : 391, 2009
- 6) Koyama A et al : A nationwide survey of rapidly progressive glomerulonephritis in Japan : etiology, prognosis and treatment diversity. Clin Exp Nephrol 13 : 633, 2009
- 7) 急速進行性糸球体腎炎診療指針作成 WG : 急速進行性腎炎症候群の診療指針 : 第二版. 日腎会誌, 2011, in press

ANCA 関連血管炎の発症機序 Up to Date

大久保光修* 平橋淳一*

抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody : ANCA) 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis : AAV) は小血管の壊死性血管炎と抗好中球細胞質抗体陽性の特徴とし、臨床的にしばしば急速進行性糸球体腎炎 (rapidly progressive glomerulonephritis : RPGN) を呈する難治性の全身性血管炎疾患群である。この疾患群には顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis : MPA), 多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis : GPA [旧名 : Wegener 肉芽腫症]), 好酸球性肉芽腫性多発血管炎 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis : EGPA), アレルギー性肉芽腫性血管炎 / Churg-Strauss 症候群 (allergic granulomatous angiitis : AGA/CSS) が含まれるが、わが国ではミエロペルオキシダーゼ (MPO)-ANCA 陽性の MPA が圧倒的に多いことが特徴である¹⁾。環境、遺伝因子を背景とした自己免疫異常により ANCA が産生され、ANCA を結合した活性化好中球は細胞毒性のある活性酸素種やプロテアーゼを放出して血管内皮障害をもたらす。以上が従来からの知見から想定された ANCA 血管炎の発症メカニズムであるが、最近の免疫学・分子生物学の著しい進歩や臨床からのフィードバックにより AAV の分子メカニズムがさらに解明され、新しい側面をみせはじめた。

1. 発症にかかわる環境因子と遺伝因子

1) 環境因子

抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody : ANCA) 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis : AAV) の発症にかかわる環境因子として、シリカや重金属への暴露、薬剤として抗甲状腺薬のプロピルチオウラシル (PTU) が古くから知られている^{2)~5)}。Yashiro らによれば

阪神淡路大震災後数年間、ミエロペルオキシダーゼ (MPO)-ANCA 陽性の AAV の増加が観察されており、これは何らかの環境化学物質が AAV 発症に関連していることを示唆する⁶⁾。また環境因子として *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 感染が発症および再燃に関連することが報告されている⁷⁾。しかし、これらの環境因子だけで発症を説明することはできず、遺伝的な感受性が背景となっていることがわかってきた(図 1)。

〔キーワード〕

顕微鏡的多発血管炎
ミエロペルオキシダーゼ
好中球細胞外捕獲現象
制御性 T 細胞
リツキシマブ
補体

2) 遺伝因子

多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis : GPA) とヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen : HLA) の関連については、ドイツにおけるサンプルサイズの大きな研究で *HLA-DPBI**04 : 01 との関連が示されている⁸⁾。日本人では顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis) との関連が示されている⁹⁾。

* OKUBO Koshu, HIRAHASHI Junichi / 東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

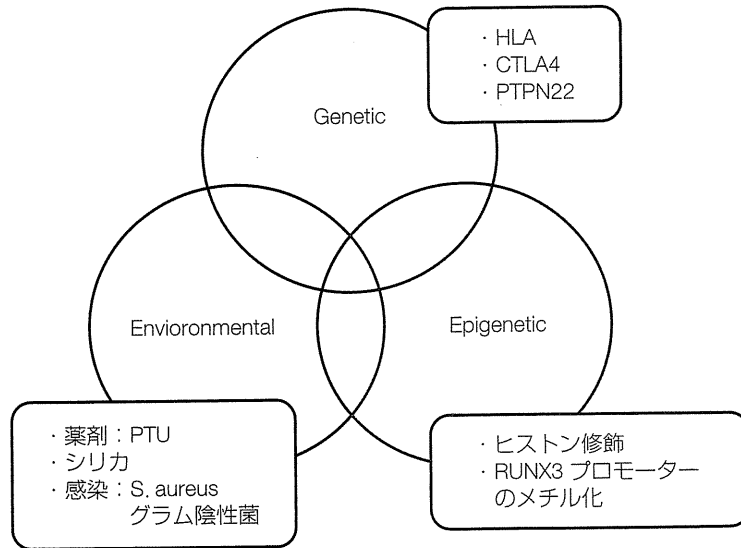


図 1. ANCA 血管炎の Background

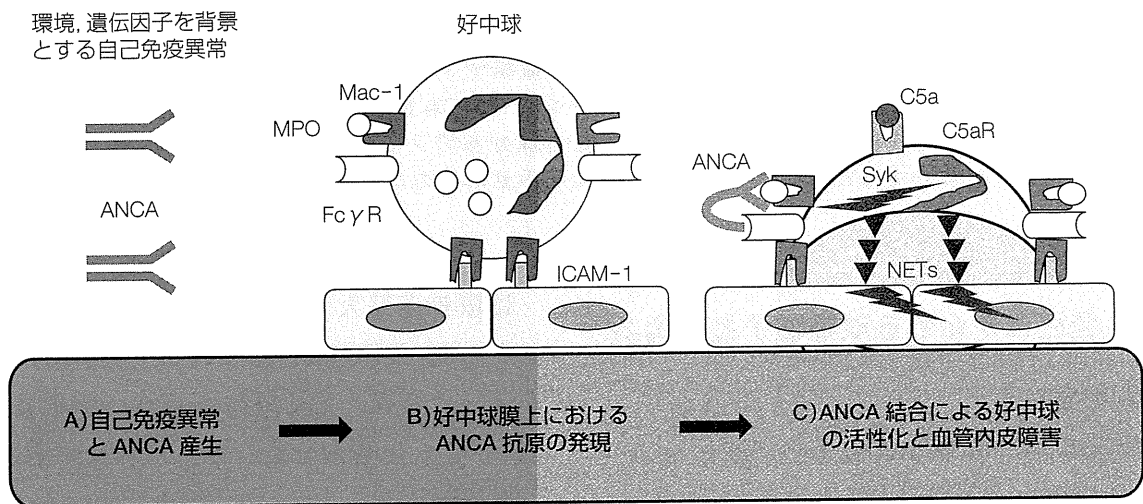


図 2. ANCA 血管炎の発症メカニズム

yangiitis : MPA) 50 例を対象とした研究により、DRB1*09:01, DQB1*03:03 と関連することが示されている⁹⁾。HLA 以外の疾患関連遺伝子として T 細胞の活性化を制御する CTLA4 や PTPN22 が報告されている¹⁰⁾が、これらは 1 型糖尿病や自己免疫性甲状腺疾患を含む複数の自己免疫疾患とも関連がある。また Ciavatta らは、ANCA 抗原である MPO および proteinase (PR)3 発現量の増加のメカニズムについて新しい知見を

見出した¹¹⁾。すなわち、AAV 患者では MPO や PR3 の転写の制御蛋白である RUNX3 の機能が抑制されているため、これらの細胞膜上への発現が制御できないというエピジェネティック制御の異常が発症の一因であるというものである。これは RUNX3 プロモーター領域の DNA メチル化が何らかの要因により増加しているためと考察されている。

2. 発症の分子生物学的メカニズム

AAV 発症にかかわる分子生物学的メカニズムの概略を図2に示す。

- A) 遺伝因子、環境因子背景とした自己免疫の異常により ANCA が産生される。ANCA 産生のメカニズムとしては次項に示した相補的 PR3 説と分子相同性説の2つの説が有力である。
- B) 感染症などを契機に好中球がプライミングを受け、ANCA 抗原(MPO や PR3 など)が感作好中球膜上に発現する。
- C) ANCA が好中球上に発現した ANCA 抗原と Fc 受容体(FcR)を架橋することにより Syk チロシンキナーゼなどの細胞内シグナルを活性化し、蛋白分解酵素や活性酸素種(reactive oxygen species: ROS) および NETs(後述)とよばれるクロマチン構造物を放出させて血管内皮細胞障害を引き起こす(図2)。

A) ANCA 産生のメカニズム

A-1) ANCA 産生機序の2つの仮説

Pendergraft ら⁷⁾は、AAV 患者において PR3 に対応する蛋白である相補的 PR3(complementary PR3: cPR3)が存在し、これに対して抗体が産生され、さらにこの抗体に対する抗体(抗イディオタイプ抗体)が ANCA としてもととの PR3 に対して抗原抗体反応を起こすというメカニズムを提唱した。また、興味深いことに cPR3 は *S. aureus* と相同性があり、*S. aureus* 感染症が PR3 陽性 AAV の発症に関与している可能性も指摘された⁷⁾。これを支持する臨床的観察として、Stegeman らは GPA 患者の多くが *S. aureus* を起因菌とする慢性副鼻腔炎を有しており(AAV 発症の相対危険度 7.16)、ST 合剤を予防的に投与することにより AAV 再発が 60%減少したと報告している¹²⁾。

また Kain らは、新たな ANCA の標的分子として好中球の小胞体膜上や血管内皮に発現する lysosomal-associated membrane protein である LAMP-2 に注目した¹³⁾。LAMP-2 のアミノ酸配列はグラム陰性菌の線毛吸着糸 FimH と相同性があるとし、グラム陰性菌感染が免疫学的交差反応を引き起こして抗 LAMP-2 抗体を産生するという、分子相同性説が提唱された。ただし抗 LAMP-2 抗体の病原性についてはいまだ議論が分かれており、今後もエビデンスの蓄積と多施設での検証が必要である。

最近 Nagao らは、MPO-ANCA が腎糸球体内皮細胞上および好中球細胞膜上に発現する moesin とよばれる分子を認識することを新規に見出し、AAV 発症の新規メカニズムとして注目されている¹⁴⁾。moesin は細胞膜と細胞骨格フィラメントであるアクチンを結ぶリンカー蛋白として知られている。

A-2) 自己免疫の異常

これまでの研究から Teff(CD4⁺エフェクター T 細胞)が AAV 患者の血液や肉芽組織、腎臓において増加していることがわかっている^{15)~19)}。制御性 T 細胞(Treg)は Teff の活性をコントロールしているが、最近 Treg の質的かつ量的な異常が AAV 発症に関与していることが報告された²⁰⁾。Nogueira らは AAV 患者において血中 IL-17 が増加することから、Th17 細胞の増加が疾患の活動性に関与しているとした²¹⁾。また、AAV 患者においてサイトメガロウイルス感染が CD4⁺CD28⁻ T 細胞の増加および感染症発生率、死亡率の増加と相関することが報告され注目されている(図3)²²⁾。CD28 は T 細胞活性化における共刺激因子受容体として知られている。CD4⁺CD28⁻ T 細胞は組織に浸潤して細胞毒性を発揮する T 細胞群として、急性冠動脈疾患などの循環器領域においても話題となっている²³⁾。

B 細胞除去抗体である抗 CD20 抗体(リツキシマブ: RIT)がシクロホスファミド(CY)と匹敵す

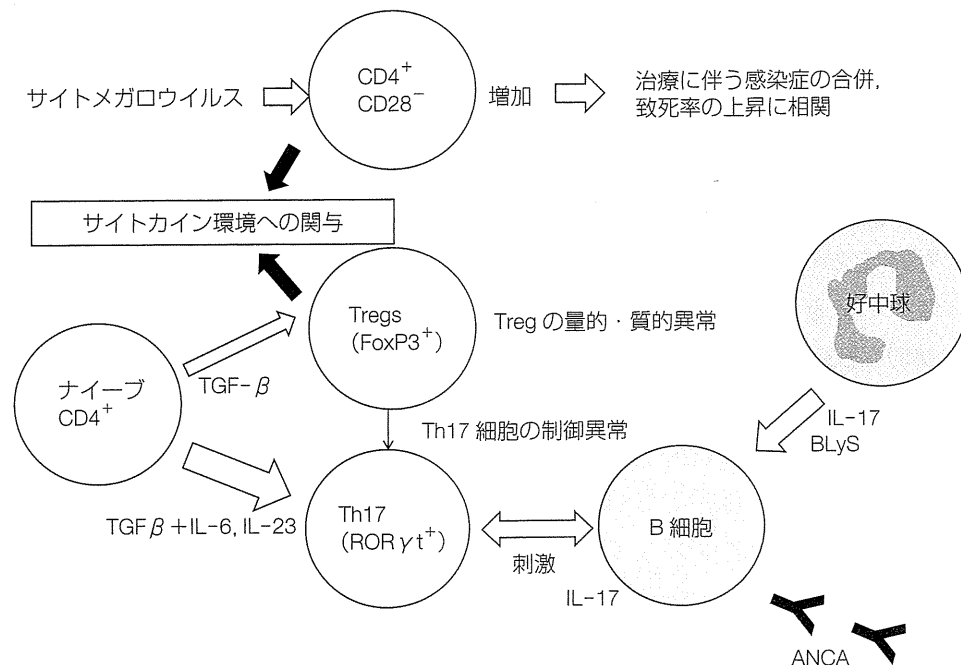


図 3. B 細胞, T 細胞の関与

る効果を認めるというランダム化比較臨床試験²⁴⁾の結果より, AAV における B 細胞機能異常に大きな注目が集まっている. 好中球が大量に産生する B リンパ球刺激因子 (BLyS, 別名 BAFF) の血中濃度が AAV 活動期に高値となる²⁵⁾²⁶⁾. また, B 細胞刺激因子 APRIL (a proliferation inducing-ligand) は樹状細胞を含むさまざまな細胞から産生され, B 細胞の長期生存・クラススイッチに関与し, AAV 患者の血中で APRIL 濃度が高いことが知られている²⁷⁾. 以上のことから BLyS と APRIL は新たな治療の標的となっている.

B) 好中球膜上への ANCA 抗原発現の調節異常

Membrane PR3 (mPR3) の発現に必要な CD177/NB1 を好中球細胞膜上につなぎとめるアダプター蛋白として β_2 インテグリンである Mac-1 が必須であることがわかっている²⁸⁾²⁹⁾が, それ以外にも mPR3 発現の調節経路がある可能性も指摘されている³⁰⁾. また MPO や PR3 の細胞膜上の発現異常については前述のように, RUNX3 プロモーターの DNA メチル化異常という, エピ

ジェネティック制御の関与が一因であると報告されている¹¹⁾.

C) ANCA による好中球の活性化と血管内皮障害

C-1) ANCA には病原性がある

ANCA は AAV の疾患マーカーとして認識されてきたが, その病原性については長いあいだ不明であった. 2002 年, Xiao らは MPO ノックアウトマウスを用いた実験で MPO-ANCA が AAV における腎炎の発症に必須であることを報告し, ANCA の病原性をはじめて証明した³¹⁾³²⁾. また, B 細胞除去抗体であるリツキシマブが治療効果を認めるという臨床的観察²⁴⁾は B 細胞異常および ANCA が発症に関与する可能性を示唆する. Bansal らの, MPO-ANCA 陽性の MPA 患者から出生した新生児に生下時より肺胞出血および腎機能障害が認められたという症例報告は, 胎盤を通過した ANCA が病因となる可能性を指摘した³³⁾. 一方 PR3-ANCA の病原性に関しては現時点で証明されておらず, 適切な動物モデルの開

発が待たれる。

C-2) NETs(neutrophil extracellular traps)

長年の常識をくつがえして好中球は細菌感染などにより顆粒状蛋白分解酵素とクロマチンからなる線維網 NETs(neutrophil extracellular traps)を細胞外に放出して細菌を死滅させることが最近になって発見された³⁴⁾。この NETs は DNA と抗微生物活性をもつ蛋白であるエラスターゼ、カテプシン-G, LL-37, ヒストンなどを含んでいる。

2009年, Kessenbrock らは AAV による血管内皮細胞障害にも NETs が関与していると報告した³⁵⁾。ANCA が MPO や PR3 を認識して好中球を活性化することにより血管内皮細胞への強固な接着を促進し, 感染の非存在下においても active に NETs が放出されることにより血管内皮細胞が障害されるとした。NETs が放出されるメカニズムはまだ明らかではないが, NADPH oxidase 阻害薬により NETs 放出が阻害されること³⁶⁾, NADPH oxidase 欠損患者(慢性肉芽腫症)の好中球では NETs の放出がみられないこと³⁷⁾は, NETs 放出において ROS が重要な役割をもつことを示唆する。NETs の制御が今後新たな血管炎治療の目標となるかもしれない。

C-3) 補体の関与

ANCA 関連腎炎によるヒトの傷害糸球体において補体因子の沈着が顕著であることが報告されてきた。とくに MAC, C3d, factorB の沈着が認められ, C4d 沈着は陰性であった³⁸⁾ことは, 補体系のなかでも classical pathway ではなく alternative pathway が強く関わっていることを示す。また, C5a 受容体ノックアウトマウスや C5a 受容体拮抗薬の投与により AAV が惹起されないことから³⁹⁾現在 C5a 受容体拮抗薬が臨床試験の段階に入っている。なお, 日本ではすでに 2010 年に C5a 受容体拮抗薬エクリズマブは発作性夜間血色素尿症に対して保険適用となっている。

おわりに

現在のところ ANCA 関連血管炎に対する標準的治療はステロイドやシクロホスファミドを中心とした免疫抑制薬の組み合わせである。最近, 抗 CD20 抗体リツキシマブの寛解導入療法としての有効性が示されたが, 依然として感染をはじめとする有害事象の問題は解決されていない。ANCA 血管炎の治療開始後 1 年の死亡リスクは, 血管炎の活動性よりも治療に伴う有害事象との関連の方がはるかに大きいと報告された⁴⁰⁾。とくにわが国では ANCA 血管炎は高齢者に多いことから, 感染, 発がん, 心血管系疾患などに悪影響を及ぼさない治療薬の開発が待たれている。基礎研究の成果から新たな治療薬が開発され, ランダム化比較臨床試験の実施により早期に臨床の現場に導入されることが期待される。

文 献

- 1) 佐田憲映ほか: 臨床個人調査票を用いた難治性血管炎治療における診療行動解析. 厚生労働科学研究費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 平成 21 年度総括・分担研究報告書: 100-101, 2010
- 2) de Lind van Wijngaarden RA *et al*: Hypotheses on the etiology of antineutrophilcytoplasmic autoantibody associated vasculitis: the cause is hidden, but result is known. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 237-252, 2008
- 3) Chen M *et al*: Proteasomal processing of nuclear autoantigens in systemic autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4: 117-22, 2005
- 4) Albert D *et al*: Wegener's granulomatosis: Possible role of environmental agents in its pathogenesis. *Arthritis Rheum* 51: 656-664, 2004
- 5) Gunton JE *et al*: Prevalence of positive antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in patients receiving anti-thyroid medication. *Eur J Endocrinol* 142: 587, 2000
- 6) Yashiro M *et al*: Significantly high regional morbidity of MPO-ANCA-related angitis and/or nephritis with respiratory tract involvement

- after the 1995 great earthquake in Kobe (Japan). *Am J Kidney Dis* **35** : 885-889, 2000
- 7) Pendergraft WF 3rd *et al* : Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* **10** : 72-79, 2004
 - 8) Heckmann M *et al* : The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping. *Ann Rheum Dis* **67** : 972-979, 2008
 - 9) Tsutiya N *et al* : Association of HLA-DRB1*0901-DQB1*0303 haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese. *Genes Immun* **7** : 81-84, 2006
 - 10) Carr EJ *et al* : Confirmation of the genetic association of CTLA4 and PTPN22 with ANCA-associated vasculitis. *BMC Med Genet* **10** : 121, 2009
 - 11) Ciavatta DJ *et al* : Epigenetic basis for aberrant upregulation of autoantigen genes in humans with ANCA vasculitis. *J Clin Invest* **120** : 3209-3219, 2010
 - 12) Stegeman CA *et al* : Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapse of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *N Engl J Med* **335** : 16-20, 1996
 - 13) Kain R *et al* : Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* **14** : 1088-1096, 2008
 - 14) Nagao T *et al* : Direct activation of glomerular endothelial cells by anti-moesin activity of anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol Dial Transplant* in press, 2011
 - 15) Abdulahad WH *et al* : Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* **70** : 938-947, 2006
 - 16) Ludviksson BR *et al* : Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern : reversal with IL-10. *J Immunol* **160** : 3602-3609, 1998
 - 17) Lamprecht P *et al* : Granuloma formation in ANCA-associated vasculitides. *APMIS Suppl* **127** : 32-36, 2009
 - 18) Abdulahad WH *et al* : Urinary CD4+ effector memory T cells reflect renal disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* **60** : 2830-2838, 2009
 - 19) Marinaki S *et al* : Abnormalities of CD4 T cell subpopulations in ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* **140** : 181-191, 2005
 - 20) Morgan MD *et al* : Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells. *Immunology* **130** : 64-73, 2010
 - 21) Nogueira E *et al* : Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* **25** : 2209-2217, 2010
 - 22) Morgan MD *et al* : CD4+CD28- T cell expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) is driven by latent cytomegalovirus infection and is associated with an increased risk of infection and mortality. *Arthritis Rheum* **63** : 2127-2137, 2011
 - 23) Liuzzo G *et al* : Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* **100** : 2135-2139, 1999
 - 24) Stone JH *et al* : Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* **363** : 221-232, 2010
 - 25) Schneeweis C *et al* : Increased levels of BlyS and sVCAM-1 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (AAV). *Clin Exp Rheumatol* **28** : 62-66, 2010
 - 26) Bader L *et al* : B-lymphocyte activating factor levels are increased in patients with Wegener's granulomatosis and inversely correlated with ANCA titer. *Clin Rheumatol* **29** : 1031-1035, 2010
 - 27) Guadagnoli M *et al* : Development and characterization of APRIL antagonistic monoclonal antibodies for treatment of B-cell lymphomas. *Blood* **117** : 6856-6865, 2011
 - 28) Jerke U *et al* : Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB-1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. *J Biol Chem* **286** : 7070-7081, 2011
 - 29) Abdgawad M *et al* : Elevated neutrophil membrane expression of proteinase 3 is dependent upon CD177 expression. *Clin Exp Immunol* **161** : 89-97, 2010
 - 30) N Hu *et al* : Coexpression of CD177 and membrane proteinase 3 on neutrophils in antineuro-