

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

C キナーゼ阻害剤を用いた安定性のあるヒト免疫寛容樹状細胞の作製と  
ANCA 抗原特異的制御性 T 細胞の誘導

分担研究者 長谷川均 愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学 准教授  
研究協力者 松本卓也（愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学）

研究要旨

【目的】近年免疫寛容樹状細胞（tDCs）が注目されており、自己免疫、移植免疫において免疫寛容を導き、細胞治療への応用が期待されている。スクリーニングから、tDCs を誘導する物質として、C キナーゼ阻害剤(PKCI)を得た。PKCI にて誘導した樹状細胞(PKCI-DCs)の特徴とそれを用いて ANCA 抗原特異的 Treg 細胞が誘導できたので報告する。【材料と方法】末梢血 CD14 陽性細胞から、GM-CSF, IL-4 を加え、5 日間培養にて未熟 DCs を作成し、さらに 2 日間、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2 の成熟誘導カクテルを加えて成熟 DCs を誘導した。その成熟過程において PKCI を加え、tDCs を誘導した【結果】PKCI-DCs の表面マーカーは CD40, CD80, CD83, CD86, MHC class I の発現は低下していたが、CD1a, CD11c, MHC class II の発現は比較的保たれていた。また、CCR7 の発現も比較的高く、二次リンパ組織への遊走能は維持されていた。サイトカイン産生では、IL-10 と TGF- $\beta$ が著しく増加していた。さらに、PKCI-DCs と共培養した T 細胞は増殖能が低下しており、また IL-10, Foxp3 の発現細胞が有意に増加していた。また、炎症環境下において、PKCI-DCs は安定であった。機序に関しては、PKCI 存在下では NF- $\kappa$ B の発現の低下と細胞内 cAMP の上昇が認められ、tDCs が誘導されることが明らかになった。さらに、PKCI-DCs と相補性 PR3-ANCA のペプチドを用いて、ANCA 抗原特異的 Treg が誘導でき、細胞治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

樹状細胞は抗原提示細胞として、獲得免疫として重要な役割を持つ一方で、同一抗原への無応答性すなわち免疫寛容も誘導できる。近年、免疫寛容樹状細胞（tDCs）が注目されており、

自己免疫、移植免疫において免疫寛容を導き、今後の細胞治療への応用が期待されている。臨床応用には以下の 3 条件が重要である。1) 機能的な制御性 T 細胞(Tregs)が誘導できる(機能面)、2) 2 次リンパ組織に移動できる(遊

走能)、3) 炎症環境下で免疫寛容機能が維持できる (安定性)。tDCs は、IL-10, TGF- $\beta$ , デキサメサゾン, ラパマイシンにより誘導されるが、いずれも上記の3条件をすべて満たさず、臨床的に有効かは不明である。そこで我々は、キナーゼ阻害剤などのライブラリーを用いたスクリーニングから、tDCs を誘導する物質として、C キナーゼ阻害剤 (PKCI) を得た。PKCI にて誘導した樹状細胞 (PKCI-DCs) の特徴とそれを用いて ANCA 抗原特異的 Treg 細胞が誘導できたので報告する。

## B. 研究方法

### 1) 使用した PKCI

Bisindolylmaleimide I (Bis I), Go6983, Ro32-0432 の3種類の conventional PKCI を用いた。

### 2) PKCI-DCs の誘導

健常人の末梢血より、CD14 陽性細胞を分離し、GM-CSF, IL-4 を加え、5日間培養にて未熟樹状細胞 (iDCs) を作成し、さらに2日間、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE2 の成熟誘導カクテルを加えて成熟樹状細胞 (mDCs) を誘導した。その成熟過程において PKCI を加え、tDCs を誘導した。

### 3) PKCI-DCs の機能解析

PKCI-DCs の表現型、サイトカイン産生、貪食能を解析した。2次リンパ組織への遊走能については、CCR7 の発現を解析した。また、allo MLR にて T 細胞の抑制能、Treg の誘導能を検討した。さらに、LPS や procytokine cocktail 刺激にて、炎症環境下での

PKCI-DCs の安定性について検討した。

### 4) PKCI-DCs の免疫寛容を導く機序

DCs 上の共刺激因子の発現には NF- $\kappa$ B、IL-10 の産生には cAMP/CREB が重要な役割を演じており、PKCI 添加後の両者の変化を解析した。

### 5) ANCA 特異的 Treg 細胞の誘導

Complementary PR3-ANCA の T cell epitope と HLADR との関連の報告を参考に cPR3-ANCA 特異的 effector T 細胞を作成し、この peptide と PKCI-DCs にて誘導した CD4<sup>+</sup>T 細胞の上記の effector T 細胞への抑制能にて解析。

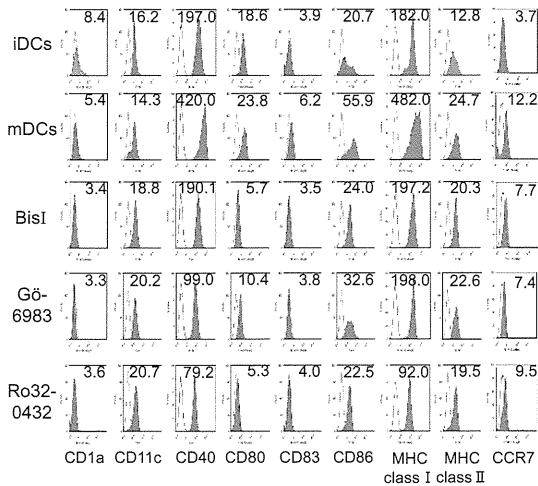
(倫理面への配慮)

ヒト検体の採取にあたっては、愛媛大学臨床研究倫理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。

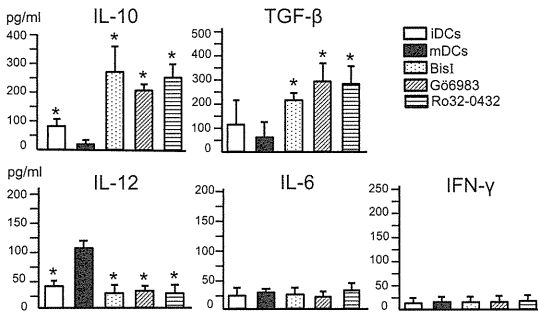
## C. 研究結果と考察

1) PKCI-DCs の表面マーカーに関しては CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, MHC class I の発現は低下していたが、CD1a, CD11c, MHC class II の発現は比較的保たれていた (図1)。また、CCR7 の発現も比較的高く、二次リンパ組織への遊走能は維持されていることが示唆された (図1)。貪食能についても FITC-dextran にて高く維持されていた。サイトカイン産生に関しては、IL-10 と TGF- $\beta$  が mDCs と比較して著しく増加していた (図2)。PKCI-DCs は alloMLR で T 細胞抑制能を示した (図3)。

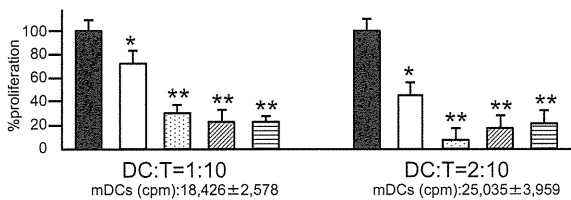
**図 1 tDCs の表現型**



**図 2 PKCI-DCs のサイトカイン産生**



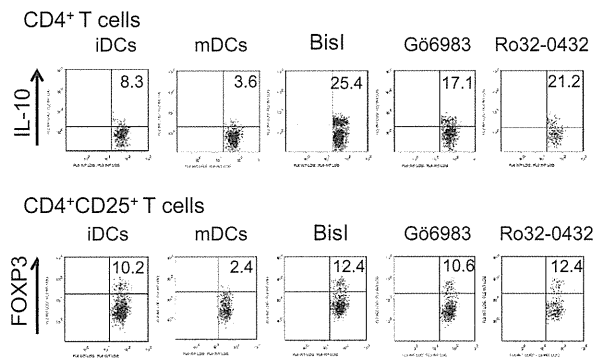
**図 3 alloMLR による T 細胞活性化能の比較**



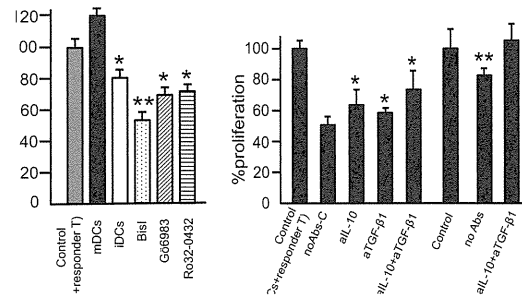
2) PKCI-DCs と共培養した T 細胞には IL-10, Foxp3 の発現細胞が有意に増加していた (図 4)。PKCI-DCs とナイーブ T 細胞との共培養において誘導された T 細胞は、MLR において T 細胞の増殖能を抑制した。

この抑制能は抗 IL-10 抗体、抗 TGF-β 抗体を加えることで一部回復し、transwell の実験ではほぼ 100%回復した (図 5)。このことは、PKCI-DCs を用いて誘導した T 細胞の effector T 細胞への抑制能は IL-10 と TGF-β による抑制性サイトカインに加えて、細胞接触によるものと考えられた。

**図 4 PKCI-DCs は IL-10<sup>+</sup>Tr1 細胞、FOXP3<sup>+</sup>Treg 細胞の産生を亢進する**



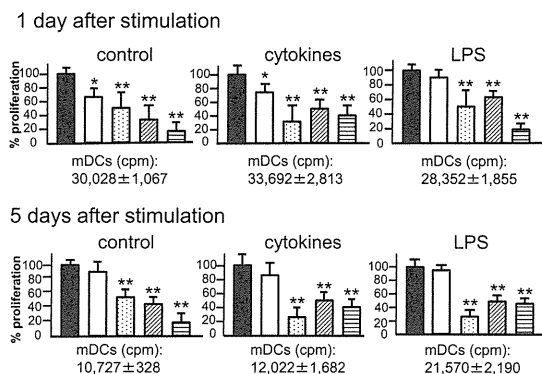
**図 5 PKCI-DCs で誘導された T 細胞の alloMLR**



3) LPS あるいは炎症性サイトカインを加えての炎症刺激下において、PKCI-DCs の表現型は維持されており、IL-10 と TGF-β の産生および T 細胞の抑制能も保持されていた。炎症環境下

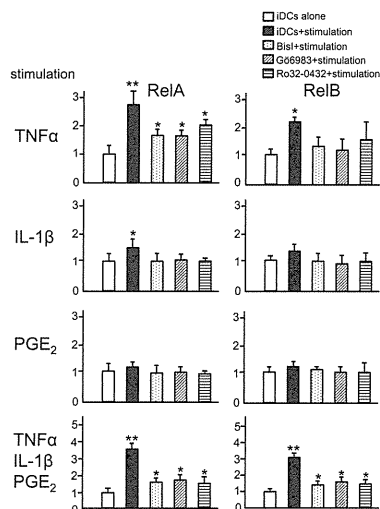
においても安定性があることが確認された (図6)。

**図6 PKCI-DCsの安定性—MLR**

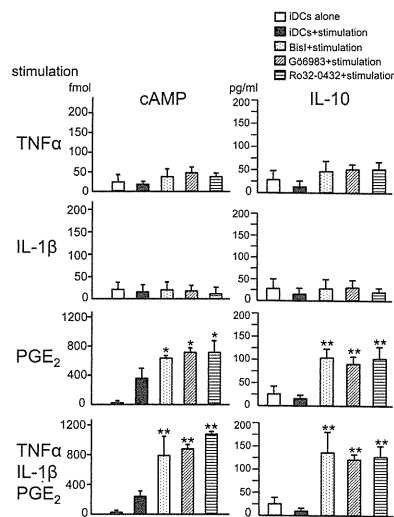


4) DCs 上の共刺激分子の発現に転写因子 NF- $\kappa$ B, IL-10 の産生に cAMP/CREB が重要な役割を果たしており、PKCI 存在下では、核内 NF- $\kappa$ B 発現の低下と細胞内 cAMP の上昇が認められた (図7, 8)。このことは、NF- $\kappa$ B の発現低下で、共刺激分子の発現が低下し、NF- $\kappa$ B の発現低下と細胞内 cAMP の増加による相乗作用で IL-10 の産生が増加する。

**図7 PKCIはDCsのNF- $\kappa$ B活性を阻害する**

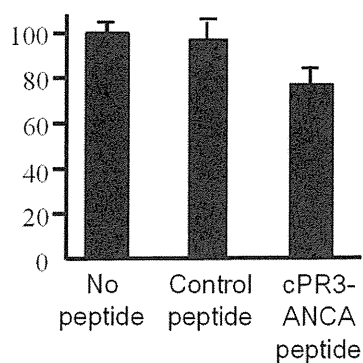


**図8 PKCIはDCs内のcAMPを増加させ、IL-10の産生も増加させる**



5) PKCI-DCs と相補性 PR3-ANCA のペプチドを用いて、ANCA 抗原特異的 Treg が in vitro で誘導された。

**図9 PKCI-DCs と相補性 PR3-ANCA のペプチドを用いて、ANCA 抗原特異的 Treg の誘導**



PKCI で処理した DCs は、臨床応用の 3 条件、即ち、1) 機能的な制御性 T 細胞(Tregs)が誘導できる (機能面)、2) 2 次リンパ組織に移動できる (遊走能)、3) 炎症環境下で免疫寛容機能が維持できる (安定性)、を満たす。

このため、PKCI-DCs は、有力な臨床応用可能な tDCs となることが示唆された。さらに、PKCI-DCs を用いて、ANCA 抗原特異的 Treg が in vitro で誘導でき、細胞治療の可能性が示唆された。

D. 健康危険情報  
特になし。

E. 研究発表

論文発表

1. 松本卓也、長谷川均、安川正貴：免疫トレランスを誘導する樹状細胞を発現させる生理活性物質。臨床免疫・アレルギー科 in press.
2. 長谷川均：ケモカイン CXCL9, CXCL10, CXCL11. 「サイトカインのすべて」。臨床免疫・アレルギー科 2012;57[Suppl. 21]:302-316.

学会発表

1. Matsumoto T, Hasegawa H, Ishizaki J, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M. Protein kinase C inhibitor generates human tolerogenic dendritic cells that induce Tr1 and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. 76th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. Nov 12, 2012, Washington DC, USA.
2. Hasegawa H, Matsumoto T, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M. Analysis of the bioactive molecules that promote the induction of human tolerogenic dendritic cells and application to therapy for Behçet's disease. 15th International Conference on Behçet's

Disease. July 14, 2012, Yokohama, Japan.

3. Hasegawa H, Miyazaki T, Matsumoto T, Onishi S, Suemori K, Nose M, Yasukawa M. Antagonist of CXCL16 ameliorates the progression of vasculitis in arteritis-prone Mch5/lpr mice. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 29, 2012, Tokyo, Japan.
4. Hasegawa H, Matsumoto T, Onishi S, Suemori K, Yasukawa M. Analysis of the bioactive molecules that promote the induction of human tolerogenic dendritic cells and application to therapy for vasculitis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 29, 2012, Tokyo, Japan.
5. 松本卓也、長谷川均、大西佐知子、末盛浩一郎、安川正貴。Cキナーゼ阻害剤、bisindolylmaleimide I による免疫寛容樹状細胞の誘導。第56回日本リウマチ学会総会。東京。2012年4月27日。
6. 長谷川均、金磊、松本卓也、大西佐知子、末盛浩一郎、安川正貴。リゾホスファチジルコリンによるヒト内在性制御性T細胞の抑制機能増強機序。第56回日本リウマチ学会総会。東京。2012年4月26日。

F. 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。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究年度終了報告書

血管炎の発症機序解明と新しい分子標的治療法の開発に関する研究  
研究分担者 石津 明洋 北海道大学大学院保健科学研究院 教授

研究要旨

1. 自己血管内皮細胞反応性 NKT 細胞による血管炎発症機序の解明

ANCA 非依存性の中小型血管炎を発症する env-pX ラットから、自己血管内皮細胞 (EC) に反応する T 細胞クローン 1B8、改め VASC-1 を樹立した。VASC-1 は NKT 細胞であり、EC と反応して相互に活性化し、血管炎を誘導する。VASC-1 が認識する EC 抗原として、sterol carrier protein-2 (SCP-2) を同定した。SCP-2 が血管炎の標的となっている可能性について、さらなる検討が必要である。

2. 顕微鏡的多発血管炎 (MPA) の病態形成における NETs の関与について

好中球に PMA とともにプロピルチオウラシル (PTU) を添加して作製した NETs が形態異常を示し、DNase I による分解に抵抗性を示すこと、また、そのような異常な NETs に含まれる MPO が自己抗原となり、MPO-ANCA が産生されること、さらにその結果として血管炎が発症することを報告した。一方、MPA 患者の血清は健常者の血清に比較して DNase 活性が低く、NETs 分解活性も低い。さらに、MPO-ANCA には NETs 誘導活性があり、その強さは MPO との結合親和性に依存していた。MPA 患者では DNase 活性が低いため、感染等を契機に形成された NETs が分解されにくく、MPO-ANCA が産生される。一旦 MPO-ANCA が産生されると、それが新たな NETs を誘導し、NETs と MPO-ANCA を介した病態悪循環が形成されると考えられる。

A. 研究目的

動物モデルや細胞モデルを用いて血管炎の発症機序を解明し、血管炎の新しい分子標的治療法を開発する。

B. 研究方法

ANCA 非依存性の中小型血管炎を発症する env-pX ラットから、自己血管内皮細胞 (EC) に反応する T 細胞を単離し、VASC-1 と命名した。本研究では、VASC-1 の genotype と phenotype を解析した。また、サル由来の COS7 細胞にラット cDNA ライブラリーをトランスフェクションし、トランスフェクタントライブラリーを作製、VASC-1 との反応性を指標として、VASC-1 が認識する EC 抗原を同定した。

MPA 患者の血清の DNase 活性を測定した。患者血清中の IgG を抽出し、好中球に添加して、NETs の誘導を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。ヒト末梢血の採取に

ついては、北海道大学病院の臨床研究に関する倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

VASC-1 は V $\alpha$ 14 と V $\beta$ 8.6 で構成される TCR を有する CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> ダブルネガティブ T 細胞であり、サイトカインプロファイルは IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-2<sup>-</sup> IL-4<sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup>を示したことから、NKT 細胞と考えられた。VASC-1 と EC は反応し、相互に活性化する。さらに、VASC-1 を野生型ラットに静注することにより血管炎が誘導されたことから、VASC-1 の血管炎惹起性が確かめられている。NKT 細胞は CD1d 分子に提示された糖脂質を認識するとされているが、自己ペプチドを認識するという報告もある。一方、CD1d 分子は動物種間で構造が比較的良く保たれた分子である。そこで、サル由来の COS7 細胞にラット cDNA ライブラリーをトランスフェクションし、約 100 株のトランスフェクタントライブラリーを作製、VASC-1 と共培養し、VASC-1 に IL-2 や IL-5 などの炎症性サイトカイン産生を誘導するトランスフェクタントクロー

ン4D2を見出した。4D2に組み込まれたラット遺伝子はsterol carrier protein-2 (SCP-2)であった。

好中球にPMAとともにプロピルチオウラシル (PTU) を添加して作製したNETsが形態異常を示し、DNase Iによる分解に抵抗性を示すこと、また、このような異常なNETsに含まれるMPOが自己抗原となり、MPO-ANCAが産生されること、さらにその結果として血管炎が発症することを報告した。一方、MPA患者の血清は健常者の血清と比較してDNase活性が低く、NETs分解活性も低い。さらに、MPO-ANCAにはNETs誘導活性があり、その強さはMPOとの結合親和性に依存していた(東京医大 吉田雅治先生との共同研究)。

#### D. 考察

SCP-2はECを含む種々の細胞に発現し、細胞膜のカベオラに結合して脂質輸送やシグナル伝達に関わる分子である。SCP-2が血管炎の標的となっている可能性について、今後明らかにする必要がある。

MPA患者ではDNase活性が低いため、感染等を契機に形成されたNETsが分解されにくく、MPO-ANCAが産生される。一旦MPO-ANCAが産生されると、それが新たなNETsを誘導し、NETsとMPO-ANCA介した病態悪循環が形成されると考えられる。

#### E. 結論

自己EC反応性NKT細胞による血管炎発症モデルを提唱した。血管炎惹起性NKT細胞が認識するSCP-2や、NKT細胞が産生する血管障害のエフェクター分子が、血管炎の新たな治療標的となる可能性がある。

適切なNETsの処理がMPO-ANCAの産生とMPO-ANCA関連血管炎の発症予防や治療に寄与する可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal conformation and impaired

degradation of neutrophil extracellular traps induced by propylthiouracil: Implication of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 64(11): 3779-3787, 2012.

2) Ozaki S, Atsumi T, Hayashi T, Ishizu A, Kobayashi S, Kumagai S, Kurihara Y, Kurokawa MS, Makino H, Nagafuchi H, Nakabayashi K, Nishimoto N, Suka M, Tomino Y, Yamada H, Yamagata K, Yoshida M, Yumura W for the JMAAV Study Group. Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study. *Mod Rheumatol* 22(3): 394-404, 2012.

3) Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol* 3: 333, 2012.

4) Ishizu A, Yoshiki T. Pathogenesis of vasculitis in env-pX rats. *Ann Vasc Dis* 5(3): 296-299, 2012.

5) Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol* 180(3):963-972, 2012.

6) Baba T, Badr MES, Tomaru U, Ishizu A, Mukaida N. Novel process of intrathymic tumor-immune tolerance through CCR2-mediated recruitment of

- Sirp $\alpha^+$  dendritic cells: A murine model. *PLoS ONE* 7(7):e41154, 2012.
- 7) Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE* 7(9): e44113, 2012.
- 8) Tomaru U, Yamada Y, Ishizu A, Kuroda T, Matsuno Y, Kasahara M. Proteasome subunit  $\beta 5t$  expression in cervical ectopic thymoma. *J Clin Pathol* 65(9):858-859, 2012.
- 9) Kawakami T, Ishizu A, Arimura Y, Soma Y. Serum Anti-lysosomal-associated membrane protein-2 antibody levels in cutaneous polyarteritis nodosa. *Acta Derm Venereol* (in press)
- 10) Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol* (in press)
- 11) Ishizu A, Fukaya S, Tomaru U, Katsumata K, Suzuki A, Umemoto Y, Furusaki A, Amasaki Y. Acute renal failure due to thrombotic microangiopathy in patient with scleroderma: Autopsy case report. *Ann Vasc Dis* (in press)
- 12) Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- $\alpha$  converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest* (in press)
- 13) Masuda S, Iwasaki S, Tomaru U, Sato J, Kawakami A, Ichijo K, Sogo S, Baba T, Katsumata K, Kasahara M, Ishizu A. Mechanism of Fc $\gamma$  receptor-mediated trogocytosis-based false-positive results in flow cytometry. *PLoS ONE* (in press)
2. 学会発表
- 1) Ishizu A. Autoreactive NKT cell-mediated small vessel vasculitis in rats. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.
- 2) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Yamamoto T, Yoshiki T, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Kurokawa MS, Suka M, Makino H, Ozaki S. Prediction of prognosis by gene expression profiling of peripheral blood in Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis after standard treatment: JMAAV subanalysis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.
- 3) Nakazawa D, Nishio S, Shibasaki S, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps induced by propylthiouracil are implicated in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.
- 4) Takeuchi S, Soma Y, Waki M, Yamaguchi M, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. The presence of anti-LAMP-2 antibody induces cutaneous vasculitis of rats. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.



- 5) 石津明洋, 外丸詩野, 吉木 敬. 自己血管内皮細胞反応性 NKT 細胞による血管炎発症モデル. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2012.
  - 6) 中沢大悟, 外丸詩野, 石津明洋. プロピルチオウラシルによる NETs (neutrophil extracellular traps) の形成および分解障害と MPO-ANCA の産生: MPO-ANCA 関連血管炎の発症機序. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2012.
  - 7) 川上民裕, 石津明洋, 有村義宏. 皮膚型結節性多発動脈炎における血中抗 LAMP-2 抗体は上昇している. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2012.
  - 8) 山田洋介, 外丸詩野, 木内隆之, 石津明洋, 松野吉宏, 笠原正典. プロテアソーム機能の低下と COPD に対する病理作用. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012.
  - 9) 小野綾子, 外丸詩野, 石津明洋, 小原次郎, 紺野沙織, 笠原正典. プロテアソーム活性の低下が腫瘍微小環境に与える影響: 腫瘍増殖の抑制効果について. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012.
  - 10) 宮武由甲子, 外丸詩野, Noreen Sheehy, 石津明洋, William W. Hall, 笠原正典. 成人 T 細胞白血病 (ATL) の病態における上皮細胞の役割の検討. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012.
  - 11) 今本鉄平, 大塚紀幸, 山田洋介, 外丸詩野, 高階太一, 石津明洋, 笠原正典. 肺腺癌に伴うトルソー症候群により肺高血圧症を合併した一剖検例. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012.
  - 12) 小原次郎, 外丸詩野, 鈴木小百合, 紺野沙織, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの発現異常が T 細胞分化に与える影響について. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012.
  - 13) 石津明洋. 血管炎の新分類と新たな発症メカニズムの提唱. 第 9 回日本病理学会カンファレンス, 山口, 2012.
  - 14) 石津明洋, 外丸詩野, 江部広志, 浄土 智, 藤咲 淳. Churg-Strauss 症候群による多発小腸穿孔により死亡した症例. 第 17 回血管病理研究会, 東京, 2012.
  - 15) Daigo Nakazawa, Utano Tomaru, Saori Nishio, Tatsuya Atsumi, Masanori Kasahara, Akihiro Ishizu. Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) induced by propylthiouracil (PTU): Implication of disordered NETs in MPO-ANCA-associated vasculitis (MPO-AAV). 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 2012.
  - 16) Jiro Ohara, Utano Tomaru, Akihiro Ishizu, Saori Konno, Sayuri Suzuki, Shigeo Murata, Keiji Tanaka, Masanori Kasahara. Skewed T cell development in mice with aberrant expression of thymoproteasome. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会, 神戸, 2012.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

急性大動脈解離（AAD）モデル開発による AAD 発症と進展機構解析

研究分担者 岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室 教授

研究要旨

急性大動脈解離（AAD）は、高安大動脈炎患者では約 3%に発症し、ベーチェット病患者での合併も知られている。AAD は高血圧症や結合組織病患者に発症しやすく、大動脈中膜の障害を基に何らかの因子によって惹起されが、発症原因は不明である。本研究では、AAD、非破裂性慢性大動脈瘤、急性心筋梗塞の各患者と健常者における解析の結果、matrix metalloproteinase9（MMP9）の血中レベルが AAD 患者で有意に高値を示し、angiotensin II（AngII）は AAD と急性心筋梗塞で上昇していた。AAD 大動脈中膜解離面には多数の MMP9 陽性好中球がみられ、血液中の MMP9 が AAD のバイオマーカーになる可能性が示された。幼若マウスに  $\beta$ -aminopropionitrile monofumarate 投与後、AngII を皮下持続投与したところ、24 時間以内に全例で胸部大動脈に AAD が発症し、30%で大動脈破裂を合併した。本マウス大動脈の中膜解離部のみならず非解離部の内膜に多数の MMP9 陽性好中球浸潤がみられ、解離した大動脈組織には MMP9 によるゼラチン分解活性が証明された。AAD 形成は MMP9 ノックアウトマウスでは 90%抑制され、MMP インヒビター投与や抗好中球抗体投与ではそれぞれ 60%と 40%にまで抑制された。これらの結果から、AAD の発症には AngII の作用で血管内膜に浸潤した好中球が MMP9 の作用で大動脈の組織内微小環境を破壊することが深く関わると推定された。

A. 研究目的

急性大動脈解離（AAD）は大動脈中膜の障害を基に何らかの因子によって惹起される予後不良な難治性大動脈疾患である。発症原因は不明であるが、高血圧症（40-60 歳代）や結合組織病（Marfan や Ehlers-Danlos 症候群などの若年者）患者に発症しやすく、本邦における頻度は 2.6-5.2 人/10 万人とされている。高安大動脈炎患者では約 3%に発症し、ベーチェット病患者での合併も知られている。AAD 診断のバイオマーカーはなく、確定診断には CT 画像診断が必須であり、救命には外科的な治療が必要である。

本研究では、AAD 患者血液中の matrix metalloproteinase 1, 2, 3, 9（MMP1, 2, 3, 9）、tissue inhibitor of metalloproteinases-1（TIMP-1）、angiotensin II（AngII）を測定し、AAD 切除大動脈での組織学的所見と比較・検討するとともに、それらのデータを基にマウス AAD モデルを開発し、AAD の発症と進展における好中球由来

MMP9 の役割を解析した。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院を受診した AAD、非破裂性慢性大動脈瘤、急性心筋梗塞の各患者と健常者より血液を得て、血中における MMP1, 2, 3, 9、TIMP-1、AngII レベルをそれぞれの ELISA 系を用いて測定した。また、AAD と非破裂性慢性大動脈瘤患者においては、大動脈置換術時に採取されたヒト大動脈血管検体についてヘマトキシリン・エオジン染色、Elastica van Gieson 染色をするとともに、MMP9、好中球エラスターゼ、CD68、カテプシン K、カテプシン S の局在を免疫組織染色により検討した。ヒト血液検体と大動脈手術検体採取については、慶應義塾大学病院に設置された倫理委員会において承認を受け、同意書を取得している。

コラーゲンやエラスチンの架橋阻害物質の  $\beta$ -aminopropionitrile monofumarate（BAPN）を生後 3 週齢オス幼若マウスに 1g/kg/day の用量で 4 週間投与後、Ang II（1

mg/kg/min)あるいはノルエピネフリン (1.3 mg/kg/min)を皮下持続投与し、AAD 発症の有無を CT scan および屠殺後の病理組織学的検討により確認した。また、AAD 発症大動脈組織における MMP9 と好中球の免疫組織学的局在、in situ zymography による MMP9 活性検出、dihydroethidium staining (DHE) 染色による proMMP9 活性化への関与を検討した。さらに、野生型マウスへの MMP インヒビター投与、抗好中球抗体投与や MMP9 遺伝子欠損マウスでの AAD 発症に対する効果を検討した。

### C. 研究結果と考察

(1) AAD 患者血液中での MMPs、TIMP-1、AngII レベルと AAD 大動脈組織での解析: AAD、非破裂性慢性大動脈瘤、急性心筋梗塞の各患者と健常者より得られた血液中の MMP1, 2, 3, 9、TIMP-1、AngII のうち、MMP9 は AAD 患者で有意に高値を示し、AngII は AAD と急性心筋梗塞で上昇していた。大動脈手術検体では、AAD 大動脈中膜の解離面に多数の好中球がみられ、免疫組織染色によりこれらは MMP9 陽性を示した。一方、非破裂性慢性大動脈瘤内膜の動脈硬化巣には CD68、カテプシン K およびカテプシン S 陽性のマクロファージ浸潤が主体であり、好中球浸潤は軽度であった。MMP9 陽性細胞数は AAD で有意に高値を示し ( $171.8 \pm 97.2$  vs  $47.2 \pm 40.6$  cells/mm<sup>2</sup>)、MMP9 と好中球エラストラーゼの二重免疫染色で MMP9 陽性細胞のほとんどは好中球であることが示された。これらの所見は、血液中の MMP9 が AAD のバイオマーカーになる可能性を示唆しており、AAD の発症・進展に好中球由来 MMP9 や AngII が関与する可能性を示している。

(2) AAD マウスモデルの開発と AAD 発症・進展における MMP9 の役割解析: 幼若マウスに 4 週間 BAPN 投与し、AngII あるいはノルエピネフリンを皮下持続投与したところ、AngII 投与マウスにおいてのみ 24 時間以内に全例で胸部大動脈に AAD が発症し、30% で大動脈破裂を合併した。本マウスの中膜解離部には多数の MMP9 陽性好中球浸潤がみられ、同組織には MMP9 の mRNA とタンパク質発現を認め、DHE 染色陽性とゼラチン

分解活性が証明された。注目すべきことには、AngII 投与後 MMP9 陽性好中球は解離部のみならず非解離部の大動脈内膜にも浸潤していた。対照群とした BAPN 処理マウス群や BAPN とノルエピネフリン投与マウス群では動脈瘤は形成されるものの、AAD の発症は 10%に留まり、MMP9 陽性好中球浸潤は陰性であった。BAPN と AngII 投与による AAD 形成は MMP9 ノックアウトマウスでは 90%抑制され、MMP インヒビター投与や抗好中球抗体投与ではそれぞれ 60%と 40%にまで抑制された。本実験データより、AAD の発症には AngII の作用で血管内膜に浸潤した好中球が MMP9 の作用で大動脈の組織内微小環境を破壊することが深く関わりと推定された。

### D. 健康危険情報

該当なし

### E. 研究発表

1. Kurihara T., Shimizu-Hirota R., Shimoda M., Adachi T., Shimizu H., Weiss S. J., Itoh H., Hori S., Aikawa N. and Okada Y.: Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection. *Circulation* 126:3070-3080, 2012.
2. Funao H., Ishii K., Nagai S., Sasaki A., Hoshikawa T., Aizawa M., Okada Y., Chiba K., Koyasu S., Toyama Y. and Matsumoto M.: Establishment of a real-time quantitative, and reproducible mouse model of staphylococcal osteomyelitis using bioluminescence imaging. *Infect Immun* 80:733-741, 2012.
3. Anzai A., Anzai T., Nagai S., Maekawa Y., Naito K., Kaneko H., Sugano Y., Takahashi T., Abe H., Mochizuki S., Sano M., Yoshikawa T., Okada Y., Koyasu S., Ogawa S. and Fukuda K.: Regulatory role of dendritic cells in post-infarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* 125: 1234-1245, 2012.
4. Nakayama M., Niki Y., Kawasaki T.,

- Takeda Y., Horiuchi K., Sasaki A., Okada Y., Umezawa K., Ikegami H., Toyama Y. and Miyamoto T.: Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide- induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-32 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Res Ther* 2012, 14:R120  
doi:10.1186/ar3850
5. Shirotake S., Miyajima A., Kosaka T., Tanaka N., Kikuchi E., Mikami S., Okada Y. and Oya M.: Regulation of monocyte-chemoattractant protein-1 through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer. *Am J Pathol* 180:1008-1016, 2012.
  6. Kamoi M., Ogawa Y., Nakamura S., Dogru M., Nagai T., Obata H., Ito M., Kaido M., Kawakita T., Okada Y., Kawakami Y., Shimmura S. and Tsubota K.: Accumulation of secretory vesicles in the lacrimal gland epithelia is related to non-Sjögren's type dry eye in visual display terminal users. *PLoS One* 7(9): e43688, 2012.  
doi:10.1371/journal.pone.0043688
  7. Saito K., Horiuchi K., Kimura T., Mizuno ., Yoda M., Morioka H., Akiyama H., Threadgill D., Okada Y., Toyama Y. and Sato K.: Conditional inactivation of TNF- $\alpha$ -converting enzyme in chondroblasts results in an elongated growth plate and shorter long bones. *PLoS One*, in press.
  8. Yoda M., Kimura T., Tohmonda T., Morioka H., Matsumoto M., Okada Y., Toyama Y. and Horiuchi K.: Systemic overexpression of TNF- $\alpha$ -converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo. *PLoS One*, in press.
  9. Mochizuki S. and Okada Y.: ADAM28. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Ed by Rawlings N.D. and Salvesen G. Elsevier Ltd, Oxford, UK. in press.
  10. Okada Y.: Proteinases and matrix degradation. In *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Ed. by Firestein G. S., Budd R. C., Gabriel S. E., McInnes I. B. and O' Dell J. R. 9th edition, Elsevier Saunders. Philadelphia. in press.
  11. Murata M., Noda K., Fukuhara J., Kanda A., Kase S., Saito W., Mashima Y., Mochizuki S., Okada Y. and Ishida S.: Accumulation of soluble vascular adhesion protein-1 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* in press.
- F. 学会発表  
<国内学会>  
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究平成24年度報告書

皮膚血管炎症例の病理組織と臨床所見のレポジトリ作成（平成24年度研究報告）

研究分担者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野  
研究協力者 白藤宜紀 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野  
片山治子 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野

**研究要旨** 皮膚血管炎症例の臨床所見と病理所見をデジタル化してデータベースを作成中である。血管炎症候群・血管病変の研究および診療の有用なリファレンスライブラリとして活用されることが期待される。

研究分担者

岩月啓氏・岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野・教授

研究協力者

白藤宜紀 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野・助教  
片山治子 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野

A. 研究目的

皮膚血管炎症例の臨床所見，検査所見ならびに病理所見のデジタル化・データベース化を行い，将来の血管炎研究の重要なリソースとする

B. 研究方法

（倫理面のへ配慮）

岡山大学倫理委員会の承認を得て，血管炎症例の臨床・病理所見の収集を行う。

（方法）

新 Chapel-Hill 分類に準拠して臨床と病理組織の編集を行う。汎用ソフトを用いたデータベース化を行う。最終年度には既刊の「難治性血管炎診断の手引き」（金原出版、2011年）に典型的病理所見を組み入れ、病名の改称と、診療ガイドラインのサマリーを追記した改訂を行う予定である。

C. 研究結果

1. データベース

データベースのプロトタイプを作した。汎用性が高く，将来的にも継続利用が行い

やすいマイクロソフト・エクセル 2007 を用いた一覧表を作成し，容易に検索やソーティングを行うことができるようにした。

診断名，年齢，性別，皮膚所見，皮膚病理所見，罹患血管レベル，蛍光抗体法，血液検査所見，PR3-，MPO-ANCA などをパラメーターとした，一覧性および検索性を有するテーブルを作成した。

さらに，ハイパーリンクを用いて，臨床写真や組織所見を容易に閲覧することは勿論，バーチャルスライドシステムによって，データベースを有する PC 上で，皮膚病理組織の全体像および任意部位の強拡大像などを，自在に観察することも可能とした。

2. 難治性血管炎診断の手引きの改訂

既刊の改訂に向けて，代表的な病理組織所見を選択している。ANCA 関連血管炎の研究グループと連携をとり，診療ガイドラインのサマリーを改訂版に掲載する計画を進めている。本研究班の最終年度に改訂版を完成させる予定である。

D. 考察

本研究班の最終年度（平成25年度）を目標に血管炎・血管障害の臨床・病理所見についてのリファレンスライブラリを完成させるべく作業を進めている。本データベースが，血管炎症候群・血管病変の研究および診療の有用な資料として活用されること期待している。

E. 結論

皮膚血管炎の臨床・病理所見に関するリ

ファレンスライブラリ化の進捗状況を報告した。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表 (平成24年度)

1. Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, Hisata K, Iwatsuki K. Detection of antibodies against the non-calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris and their pathogenic significance. *Br J Dermatol*. 2012;167(2):252-61
2. Yamamoto T, Hirai Y, Miyake T, Yamasaki O, Morizane S, Iwatsuki K. Oculomucosal and gastrointestinal involvement in Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme. *Eur J Dermatol*. 2012;22(3):380-3.
3. Yanagihara K, Araki N, Watanabe S, Kinebuchi T, Kaku M, Maesaki S, Yamaguchi K, Matsumoto T, Mikamo H, Takesue Y, Kadota JJ, Fujita J, Iwatsuki K, Hino H, Kaneko T, Asagoe K, Ikeda M, Yasuoka A, Kohno S. Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of 857 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 16 medical centers in Japan (2008-2009) Nationwide survey of community-acquired and nosocomial MRSA. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 72: 253-257
4. Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected  $\cdot\cdot$ T-cells. *J Invest Dermatol*. 2012;132(5):1401-8.
5. Yamasaki O, Nagao Y, Sugiyama N, Otsuka M, Iwatsuki K. Surgical management of axillary necrotizing fasciitis: a case report. *J Dermatol*. 2012;39:309-311
6. Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. *J Proteomics* 2012; 75: 1401-1410.
7. Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki K, Hata T, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol*. 2012; 132: 135-143.
8. Tanaka C, Hasegawa M, Fujimoto M, Iwatsuki K, Yamamoto T, Yamada K, Kawa K, Saikawa Y, Toga A, Mase S, Wada T, Takehara K, Yachie A. Phenotypic analysis in a case of hydroa vacciniforme-like eruptions associated with chronic active Epstein-Barr virus disease of  $\cdot\cdot$ T cells. *Br J Dermatol* 2012; 166: 216-218.
9. Hamada T, Umemura H, Aoyama Y, Iwatsuki K. Successful Therapeutic use of targeted narrow-band Ultraviolet B therapy for refractory Hailey-Hailey disease. *Acta Derm Venereol*. 2012 Jun 27. [Epub ahead of print]
10. Yamamoto T, Iwatsuki K. Diversity of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts and their expression patterns in the lytic and latent infections. *J Med Microbiol*. 2012 Jun 14. [Epub ahead of print]
11. Fujii K, Suzuki N, Yamamoto T, Suzuki D, Iwatsuki K. Valproic acid inhibits

proliferation of EB virus-infected natural killer cells. Hematology. 2012 May;17(3):163-9.

12. Yamasaki O, Takeshima C, Ikeda K, Suzuki N, Otsuka M, Kimata Y, Hirakawa S, Iwatsuki K. Stewart-Treves syndrome arising in patients with lymphaticovenular anastomosis for chronic lymphedema of the leg. Eur J Dermatol. 2012 Apr 20. [Epub ahead of print] No abstract available

13. Morizane S, Yamasaki K, Kajita A, Ikeda K, Zhan M, Aoyama Y, Gallo RL, Iwatsuki K. T(H)2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2012 Jul;130(1):259-261. e1. Epub 2012 Apr 21

14. Miyake T, Yamasaki O, Sugi M, Hamada T, Otsuka M, Yanai H, Morishita Y, Iwatsuki K. Primary signet-ring cell/histiocytoid carcinoma of the axilla expressing human epidermal growth factor receptor 2. J Dermatol. 2012 E-pub.

15. Wada H, Tsuboi R, Kato Y, Sugaya M, Tobinai K, Hamada T, Shimamoto T, Noguchi K, Iwatsuki K. Phase I and pharmacokinetic study of the oral histone deacetylase inhibitor vorinostat in Japanese patients with relapsed or refractory cutaneous T-cell lymphoma. J Dermatol. 2012 Apr 16. E-pub.

16. Fujii K, Aochi S, Takeshima C, Ohtsuka M, Hamada T, Asagoe K, Aoyama Y, Morizane S, Iwatsuki K. Eccrine Poromatosis Associated with Polychemotherapy. Acta Derm Venereol. 2012, E-pub.

17. Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki

K, Hata T, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. J Invest Dermatol. 2012 Jan;132(1):135-43.

18. Sugaya M, Hamada T, Kawai K, Yonekura K, Ohtsuka M, Shimauchi T, Tokura Y, Nozaki K, Izutsu K, Suzuki R, Setoyama M, Nagatani T, Koga H, Tani M, Iwatsuki K. Guidelines for the management of cutaneous lymphomas (2011): A consensus statement by the Japanese Skin Cancer Society - Lymphoma Study Group. J Dermatol. 2012 Epub.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

# 【大型血管炎分科会】



厚生労働科学研究費補助金（難治性血管炎に関する調査研究班）  
分担研究年度終了報告書

臨床調査個人票による高安動脈炎の調査研究と前向き症例登録の開始

川崎医科大学心臓血管外科 種本和雄

山口大学医学部地域医療推進学講座 中村浩士

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 内田治仁

**研究要旨** 高安動脈炎症例について都道府県を通じて厚生労働省に登録された臨床調査個人票のデータ解析を昨年に引き続いて行った。のべ26,798例の検討を行ったが、登録症例がゼロである年次が複数見られる都道府県がいくつかみられ、残念ながら都道府県からの登録がなされていない症例が相当数あることがわかった。入力内容についても欠損データも多く、特に手術を受けた症例の術式登録が不正確で、医学的に整合性のない記述も多く登録されていた。

上記より現行の都道府県からの登録制度では実態を把握するには限界があり、前向き登録研究の必要性を再認識し、本研究班参加施設を中心に前向き登録研究をスタートさせた。

A. 研究目的

高安動脈炎はいまだその原因、病態などの全貌が明らかになっておらず、診断・治療法についても確立されていない血管炎であり、特定疾患治療研究事業の疾患に指定され、個人票の形でデータが収集されている。このデータを解析を進めてきたが、現状データ収集の問題点を検討し、今後の前向き症例登録研究の準備を進める。

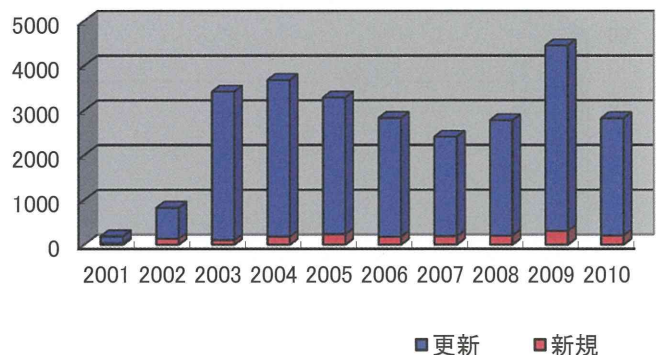
B. 研究方法

都道府県から厚生労働省に登録されている「臨床調査個人票」データの解析を進め、問題点を明らかにすると同時に、今後の登録研究システムを整備する。

C. 研究結果

2001年以降のべ26,798例のデータの検討を進めた。年度別登録全体数は前年度症例数に新規症例を加えて死亡例を引けば、ほぼ数が一致するはずであるが、年度別に大きく減っている年があり、全症例が登録されていない可能性が考えられた。

個人票登録された高安動脈炎患者数



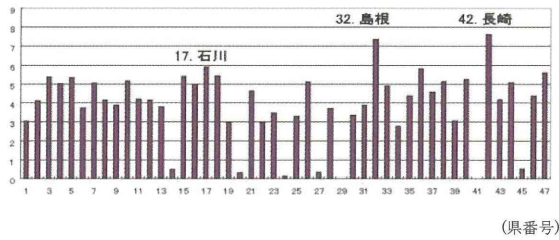
2009年の都道府県別症例数をみると、人口比で大きな差があることは昨年の報告で示したが、一方では症例登録がゼロ、または極端に症例が少ない都道府県があることがわかる。この年度別の症例数は難病情報センター

<http://www.nanbyou.or.jp/entry/1356> で公開されている数と大きく隔たっており、年度によっては半分以下しか臨床調査個人票として厚生労働省に提出されていないことが判明した。

## 2009年都道府県別人口10万人対高安動脈炎患者数

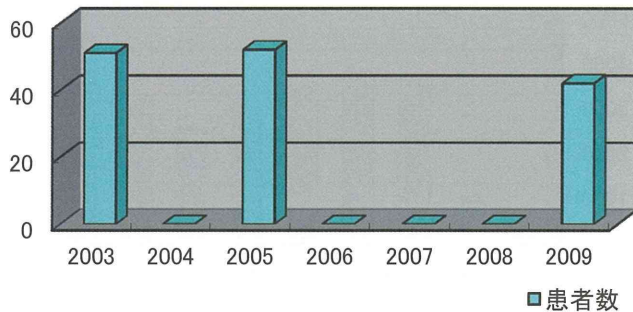
2009年都道府県別人口10万人対患者数

(人/10万人)



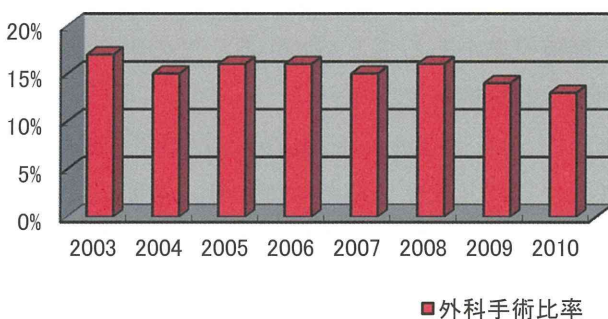
ある都道府県別での更新症例数を示すと、7年間で3年間のデータしか提出されておらず、4年間はこの都道府県から厚生労働省にデータが出されていないことがわかる。他にも全てのデータが出されていないと窺われる都道府県が複数あった。つまり、臨床調査個人票では全国での症例動向を完全には把握できていないことがわかった。

ある都道府県での高安動脈炎患者数



一方で、外科手術を受けた症例数は年々減少していた。

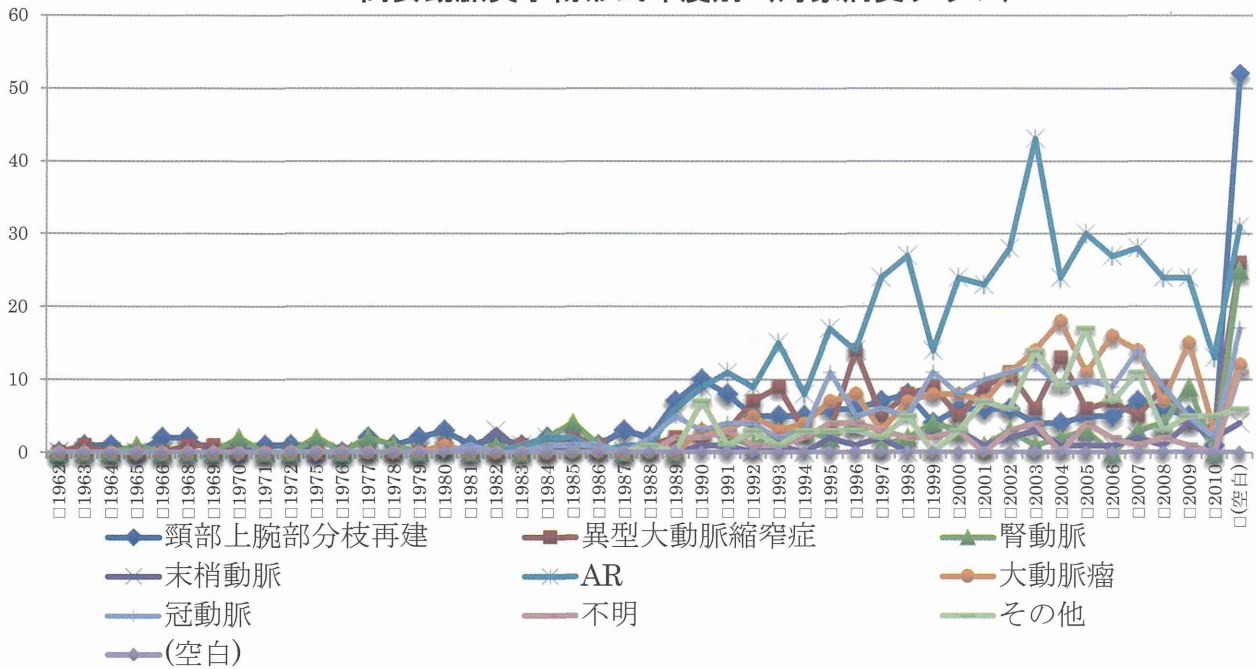
外科手術比率



外科手術の内容についても検討した。臨床調査個人票の手術名を記載する欄は自由記載の形になっており、それがそのまま都道府県で入力されたものが集計される。そのせいか手術名についてはとても医学的に説明できない術式(例:大動脈弁バイパス術)の記載も多くみられた。術式別の集計を行おうにもほとんどの術式が20例以下の症例数であり、前述の不正確記載のこともあって解析に耐えられるデータとして検討することは難しかった。

我が国での高安動脈炎や巨細胞性血管炎を含む大型血管炎の臨床像を明らかにし、現行の分類・診断基準の課題を明らかにすることを目的として、国際的評価基準を取り入れた全国的な患者登録システムを確立し、標準療法の確立に向けた前向き観察コホート研究を開始した。本研究班の参加施設を中心に24施設の参加を依頼し、最長3年間の経過観察を行う研究とした。榎野班長を委員長として「大型血管炎(高安動脈炎と巨細胞性血管炎)の寛解導入治療の現状と有効性に関する観察研究運営委員会」を立ち上げ、すでに岡山大学で倫理委員会の承認を得て、参加施設での倫理委員会承認を進めている。Web登録システムも既に完成しており、平成26年3月末を登録期限として症例登録が始まっている。

高安動脈炎手術形式年度別（対象病変グラフ）



D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

**研究要旨** 副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して心筋保護的に作用することが報告されているが、心血管炎に対するステロイド治療の是非に関して見解は定まっていない。そこで、マウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone の効果を詳細に検討した。マウスウイルス性心筋炎において dexamethasone 早期投与はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、その一因として COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して心筋保護的に作用することが報告されているが、高安病をはじめとした心血管炎に対するステロイド治療の是非に関して見解は定まっていない。

### B. 研究方法

マウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone の効果を詳細に検討した。3週令♂ A/J マウスに coxsackievirus B<sub>3</sub> (CVB3)  $2 \times 10^4$  PFU を腹腔内投与し心筋炎を作成した。CVB3 のみを投与した群 (CVB3 群)、dexamethasone 0.15ml/日を5日間投与した後、6日目に CVB3 を投与した群 (DEX-pre/CVB3 群)、CVB3 を投与した後、dexamethasone 0.15ml/日を5日間投与した群 (DEX-post/CVB3 群) の3群を作成した。14日後にマウスの心筋を採取し、左室内径、壁厚、ウイルス力価 (TCID<sub>50</sub>) を測定し、それぞれ3群間を比較した。また COX-2 阻害実験として、NS-398 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を投与した群 (NS-398/CVB3)、CVB3 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を接種し dexamethasone 連日投与した群 (NS-398/DEX-pre/CVB3 & NS-398/DEX-post/CVB3) の生存分析を行った。

### C. 研究結果

CVB3 群は、左室内径の拡張と壁厚の減少、ウイルス力価の上昇を認めたが、DEX-pre/CVB3、DEX-post/CVB3 群においてはその変化は有意に抑制されていた (図1)。NS-398 を用いた阻害実験ではウイルス接種と共に NS-398 を使用した群の方が全例とも超早期に死亡したが dexamethasone の早期投与により生存率を有意に改善した。

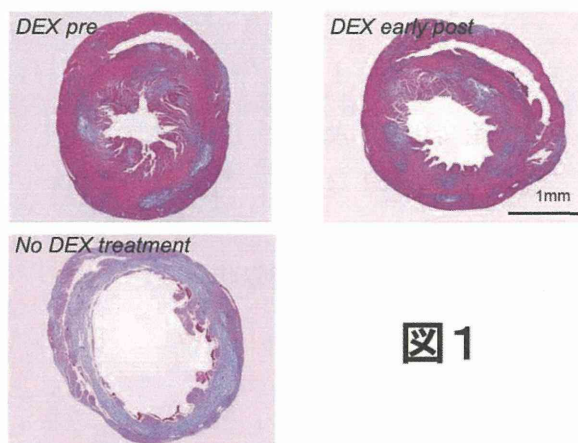


図1

### D. 考察

マウスウイルス性心筋炎において dexamethasone 早期投与はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、その一因として COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。