

て ANCA 血管炎に対する免疫抑制療法への血漿交換療法追加による生命予後と腎予後の改善の有無を評価する無作為比較試験が、国際共同臨床試験として 2010 年より開始されている。本分科会メンバーを中心に参画へ向けて検討を加え、1 施設では倫理委員会の承認も得られ、他施設でも申請に向け検討がなされている。今後、日本国内の体制の確立後に国際事務局（英国 Oxford 大学）と契約を締結し、国際共同臨床試験を開始する予定である。

3) AAV (ANCA-associated vasculitis) の国際比較研究の検討

Cambridge 大学より MPA-ANCA 関連血管炎に関して、outcome も含めた日英比較を行いたいと打診があり、本分科会の数施設を中心に共同で協力していくことを考慮している。さらに、他の AAV に関しても疫学を中心とした国際比較研究の打診があり、実現の可能性を検討していく予定である。

4) 基礎研究の国際交流へ向けて

分担者の平橋らは、EPA とアスピリンの併用療法により、ステロイドや免疫抑制剤を使用せず寛解導入に成功した腎限局型の ANCA 血管炎の症例を報告している (Ann Intern Med 2012)。この治療法の有効性に関し、免疫学的メカニズムについての基礎研究も行っている。この臨床および基礎的検討により、本治療法の国際的普及を目指す。

分担者の濱野らは、血管炎自然発症モデルマウス SCG/Kj の遺伝解析で、MPO-ANCA 産生遺伝子座の単一の位置的候補遺伝子を同定し、ヒト・マウス間の orthology を利用してヒトの候補遺伝子も同定した。2012 年も引き続き機能解析を進め、基礎研究の国際的交流も目指す。

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

難治性血管炎に関する調査研究

平成24年度 第2回班会議

プログラム

日時：平成24年12月14日（金）10：00～
場所：都市センターホテル 6階「606会議室」
東京都千代田区平河町2-4-1
TEL：03-3265-8211
FAX：03-5216-8819

研究代表者 榎野博史

厚生労働省「難治性血管炎に関する調査研究班」

平成24年度第2回班会議 プログラム

平成24年12月14日（金）

- I. 厚生労働省より基調講演 10:00~10:10
厚生労働省健康局疾病対策課 中尾 武史
- II. 研究班の活動報告 10:10~10:30
研究代表者 榎野 博史
- III. 病理・基礎研究分科会 10:30~11:40
分科会報告
分科会長 岡田 保典
- 各個研究報告
- ① 日本人集団における ANCA 関連血管炎の疾患感受性遺伝子解析
筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻 土屋 尚之
- ② 血管炎患者末梢血の mRNA 網羅的発現解析
慶應義塾大学医学部リウマチ 竹内 勤
- ③ 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
愛媛大学大学院生体統御内科学 長谷川 均
- ④ 難治性血管炎に関する調査研究報告
北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 石津 明洋
- ⑤ 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
慶應義塾大学医学部病理学教室 岡田 保典
- ⑥ 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
岡山大学大学院皮膚科学 岩月 啓氏

IV. 大型血管炎の臨床研究分科会

11:40~12:40

分科会報告

分科会長 種本 和雄

各個研究報告

① 新規発症症例の前向き登録研究

川崎医科大学心臓血管外科 種本 和雄

② ウイルス性心筋炎に対するグルコシルチコイドの心筋保護効果の検討

山口大学医学部地域医療推進学講座 中村 浩士

③ MRIによる高安動脈炎の活動性評価の検討

東京医科歯科大学循環器内科 磯部 光章

④ 重症虚血肢バージャー病患者の長期予後に関する追跡調査

名古屋大学大学院血管外科 古森 公浩

⑤ 難治性高安動脈炎に対する tocilizumab 治療の効果判定に有用なサロゲートマーカーの探索

大阪大学大学院医学系研究科・循環器内科学 小室 一成

昼食 12:40 ~ 13:40

V. 中・小型血管炎の臨床研究分科会

13:40 ~14:50

分科会報告

分科会長 有村 義宏

各個研究報告

① EGPA の新たな分類基準の作成の試み

埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科 天野 宏一

② 「ANCA 関連血管炎の臨床調査個人票改訂計画」の今後の工程について

順天堂大学膠原病内科 高崎 芳成
聖マリアンナ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科 山田 秀裕

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 藤井 隆夫

- ③ 抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎・急速進行性糸球体腎炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科薬害監視学講座 針谷 正祥

- ④ 一1 RemIT-JAV 研究中間解析：治療開始後6か月間の重篤感染症解析

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科薬害監視学講座 針谷 正祥

- 一2 RemIT-JAV 研究中間解析：有効性に関する解析

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 佐田 憲映

- ⑤ ANCA 関連血管炎の寛解維持療法に関する前向き観察研究

金沢大学附属病院腎臓内科 和田 隆志

VI. 国際研究協力分科会
分科会報告

14:50 ~15:40

分科会長 藤元 昭一

順天堂越谷病院内科 小林 茂人

東京大学病院腎臓内科 平橋 淳一

東京都健康長寿医療センター腎臓内科 濱野 慶朋

抄 録 集

Ⅲ 基礎・病理分科会報告

「血管炎病因・病態の究明と臨床応用への展開 2012」

分科会長 岡田保典 慶應義塾大学医学部病理学

研究分担者 土屋尚之 筑波大学医学医療系分子遺伝疫学
竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科学
長谷川均 愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学
石津明洋 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学
岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬総合研究科学皮膚科学

研究協力者 鬼丸満穂 九州大学大学院医学研究院病理病態学
池田栄二 山口大学大学院医学系研究科病理形態学
菅野祐幸 信州大学医学部病理組織学講座

基礎・病理分科会では、血管炎の病因・病態の究明とそれに基づいた診断・治療法の開発を目指す。日本人集団における難治性血管炎患者を対象として、複数の疾患感受性候補遺伝子に関して関連を検討するとともに、ゲノムワイド関連研究をめざした試料の収集を進める。また、免疫寛容樹状細胞の誘導とANCA抗原特異的な制御性T細胞誘導を検討するとともに、自己血管内皮細胞反応性NKT細胞クローンの血管炎誘導機構とプロピルチオウラシルによる好中球細胞外トラップの形成・分解異常によるMPO-ANCA誘導作用を細胞レベルならびに個体レベルで明らかにする。さらに、ヒト急性大動脈解離や同マウスモデルでの血管壁破壊におけるMMP (matrix metalloproteinase) 分子の役割を解析する。また、皮膚血管炎の症例を増やしてレポジトリの作成をさらに進める。これらの研究を、以下の4研究項目に分けて連携を取りながら遂行する。

1) 難治性血管炎における遺伝子解析 (土屋、竹内、石津)

①候補遺伝子アプローチによる日本人集団の ANCA 関連血管炎における疾患感受性候補解析に関しては、サンプルサイズを223 (うちMPO-ANCA陽性群が191)まで増加した。これらの検体を用いて、MPO-ANCA陽性群と *STAT4*、*IRF5*、*UBE2L3* の関連を確認あるいは新たに検出した。また、「中小型血管炎分科会」および「進行性腎障害に関する調査研究班」との共同研究として、ゲノムワイド関連研究をめざしたゲノムDNA収集をさらに継続している (土屋)。

②原発性血管炎患者、関節リウマチ患者、健常者の末梢血からトータル RNA を抽出し、Whole Human Genome Microarray 4x44k チップを用いて、網羅的に遺伝子発現を検討した。発現プロファイルの成分分析で3群が明瞭に分類され、血管炎に特徴的な発現遺伝子候補がいくつか明らかとなった (竹内)。

③MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療反応性を予測する末梢血遺伝子診断法の精度を検証するため、新規18症例の治療前後の血液を収集した (石津)。

2) 難治性血管炎の病態解析 (長谷川、石津)

①炎症状況下においても安定性のあるヒト寛容型樹状細胞の作製し、本寛容型樹状細胞と complimentary PR3-ANCAペプチドを用いたPR3-ANCA抗原特異的制御性T細胞誘導による新たな細胞療法の可能性を示した (長谷川)。

②絶対定量プロテオーム解析システムを用いて、ANCA関連血管炎の活動期と非活動期のプロテオーム動態を計測し、新たな活動期の候補バイオマーカーを見出した (長谷川、愛媛大学プロテオーム医学研究センター共同)。

③env-pXラットにおけるANCA非依存性血管炎の発症に関わる自己血管内皮細胞反応性NKT-17細胞を単離し、本細胞と反応する抗原がsterol carrier protein-2 (SCP-2)であることを同定した (石津)。

3) 血管炎発症と進展における組織内微小環境因子代謝解析 (岡田、石津、鬼丸)

①抗甲状腺薬プロピルチオウラシルとPMAを好中球に添加して作製したNETsがDNase I分解抵抗性をもつ形態異常を示し、本NETs中のMPOを自己抗原としたMPO-ANCAの産生により血管炎が発症することを報告した。また、MPA患者血清は健常者血清に比較してDNase活性やNETs分解活性が低く、MPO-ANCAにはMPO結合親和性依存性のNETs誘導活性があることを明らかにし、MPAではNETsとMPO-ANCAを介した病態悪循環が形成されていることが示唆された (石津)。

②ヒト急性大動脈解離における組織内微小環境因子代謝酵素MMPの役割を解析する目的で、急性大動脈解離患者血液中でのMMP1、2、3、9、TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) およびangiotensin II (AngII) を測定した。その結果、MMP9は健常者、非破裂性大動脈瘤患者、急性心筋梗塞患者に比べて有意に高値を示し、AngIIは急性大動脈解離と急性心筋梗塞患者で高値を示した (岡田)。

③上記のヒト大動脈解離のデータに基づいて全例で急性大動脈解離を発症するマウスモデルを開発した。本マウスでの急性大動脈解離はMMP9遺伝子欠損マウスではほぼ完全に阻止されることから、大動脈の組織破壊にMMP9が重要であることが示された (岡田)。

4) 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 (岩月、池田、菅野)

①皮膚血管炎の患者情報、検査所見、治療などの臨床情報のデータベース化を進めるとともに、病理組織所見をバーチャルスライド化し、皮膚カラー写真とともに、臨床・病理所見がリンクしたレポジトリを作成した (岩月、池田、菅野)。

III-①

日本人集団における ANCA 関連血管炎の疾患感受性遺伝子解析

【演者】土屋尚之¹、川崎綾¹、長谷部成美¹、井上尚哉¹、青木真志¹、安心院千裕¹、伊東郁恵¹、住田孝之²、古川宏³、當間重人³、小林茂人⁴、橋本博史⁵、山田秀裕⁶、尾崎承一⁶、松尾清一⁷、宮坂信之⁸、針谷正祥^{8,9}、佐田憲映¹⁰、槇野博史¹⁰

【所属】¹筑波大学医学医療系分子遺伝疫学研究室、²同・内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）、³国立病院機構相模原病院臨床研究センター、⁴順天堂大学附属順天堂越谷病院内科、⁵順天堂大学医学部、⁶聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科、⁷名古屋大学腎臓内科学、⁸東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科、⁹東京医科歯科大学薬害監視学、³岡山大学腎・免疫・内分泌代謝内科学

【目的】昨年度の本研究班において、全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性強皮症(SSc)、関節リウマチ(RA)に関連する *STAT4*, *IRF5*, *BLK* 領域の SNP と日本人 ANCA 関連血管炎(AAV)との関連に関する中間成績を報告した。今年度は、サンプルサイズをふやして上記遺伝子の関連を検討するとともに、新たに *UBE2L3*, *TNIP1* の関連を検討した。

【方法】今年度新たに収集された試料を含め、顕微鏡的多発血管炎(MPA) 151 例、多発血管炎性肉芽腫症(GPA) 43 例、好酸球性肉芽腫性多発血管炎(CSS/EGPA) 21 例、分類不能血管炎(いずれも MPO-ANCA 陽性) 8 例を含む ANCA 関連血管炎(AAV) 223 例と健常対照群 511 例を対象とした。自己抗体による分類では、MPO-ANCA 陽性 191 例、PR3-ANCA 陽性 29 例であった。解析対象とした一塩基多型(SNP)は、全身性自己免疫疾患との関連が確立している、*STAT4* イントロンの rs7574865、*IRF5* の poly A シグナルに位置する rs10954213、*BLK* 上流領域の rs13277113、*TNIP1* (ABIN-1)イントロンの rs7708392、*UBE2L3* 上流領域の rs131654 である。患者試料は、平成 11~13 年度厚生労働省難治性血管炎に関する調査研究班、平成 21 年度厚生労働省「抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の genomic DNA 収集に関する研究班」(JMAAV および RemIT-JAV 登録者を対象)、国立病院機構相模原病院臨床研究センターおよび東京医科歯科大学関連病院ネットワークにおいて収集された。

【結果】SLE、RA、SSc におけるリスク遺伝子型である *STAT4* rs7574865 T/T 遺伝子型が、MPO-ANCA 陽性群において有意に増加していた。一方、*IRF5* においては、SSc においてノンリスク遺伝子型であり、*IRF5* mRNA の低下と関連する rs10954213G/G 遺伝子型が、MPO-ANCA 陽性群、MPA 群において有意に増加していた。また、SLE、SSc と関連する *UBE2L3* rs131654 遺伝子型が、MPO-ANCA 陽性群、MPA 群に有意に関連していた。*TNIP1* rs7708392 は単独では有意な関連を示さなかったものの、同じ NF- κ B 経路における機能が知られている *UBE2L3* との遺伝子間相互作用の可能性が示唆された。*BLK* rs13277113 では、有意な関連は検出されなかった。

【結論】SLE、SSc に関連する *STAT4*, *UBE2L3* 遺伝子型は MPO-ANCA 陽性血管炎とも関連すること、*IRF5* では、SSc におけるノンリスク遺伝子型が MPO-ANCA 陽性群、MPA 群に増加していることが示唆された。

III-②

血管炎患者末梢血の mRNA 網羅的発現解析

研究分担者 竹内 勤 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 教授
研究協力者 鈴木 勝也 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 助教

(背景および目的) 血管炎の病態形成には、ANCA を初めとする自己抗体、炎症性細胞と、それらに発現される接着分子や細胞障害顆粒が密接に関与している。しかし、関節リウマチの TNF- α に代表される病態形成の鍵を握る責任分子の同定には至っていない。キメラ型抗 CD20 抗体リツキシマブが IVCY に対して非劣性である事が ANCA 関連腎血管炎で 2010 年に初めて海外で証明されたものの、病態関連分子に関する情報は不明な点が多く、有効な分子標的治療法の開発は進んでいない。本研究では、ANCA 関連血管炎、巨細胞性動脈炎、高安大動脈炎、RA 合併血管炎などの血管炎症候群を対象として、臨床データおよび患者末梢血を用いた網羅的遺伝子発現解析により病態関連の鍵分子の同定を目指す。

平成 23 年度は、患者末梢血検体のサンプリングならびに RA 合併血管炎における基礎的な検討を行った。また当科の RA 合併血管炎例を解析し、その臨床的特徴を抽出した。平成 24 年度は、血管炎症候群例において網羅的遺伝子解析を行った。

(対象および方法) 血管炎 9 例(男性 3、女性 6)、未治療関節リウマチ(RA) 10 例(男性 3、女性 6)、健常人コントロール 10 例(男性 7、女性 3)の 3 群合計 29 例を対象症例とした。末梢血より total RNA を抽出し、Agilent 社製の Whole Human Genome Microarray 4x44k (ver1.0) チップを用いて、網羅的に遺伝子発現データを取得した。データ前処理として 75 percentile shift normalization 法によりアレイ間補正を行った。発現プロファイル全体でのサンプルの分類傾向を確認するために主成分分析を行った。次に 3 群間の発現変動遺伝子を抽出するために ANOVA 検定をし、多重検定補正、Post Hoc 検定を加えた。

(結果) Boxplot 描写によりマイクロアレイデータのシグナル分布を確認し、各群に明確な差は認められなかった。次に主成分分析を行なったところ、図 1 に示すように分布の約 80% を説明できる X-Y 平面において 3 群が明瞭に分類される傾向が認められた。発現変動遺伝子の抽出を試みたところ、 $P < 0.05$ を統計学的有意とすると 1336 プローブが抽出された。Post hoc 検定を加え、健常人コントロール群と比較した血管炎群で最も多い 1320 プローブが抽出された。血管炎群に特徴的な発現遺伝子のうち免疫関連の GO Term を有するものを抽出したところ、IFNB1 (Corrected p-value: $1.31E-07$)、MIF (macrophage migration inhibitory factor, $2.86E-06$)、TNFSF14 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14, $2.57E-04$) 等が上位に選別された。

(考察および今後の方針) 上記結果より血管炎群に特徴的な末梢血のプロファイルの一端が明らかとなった。IFN β は高安動脈炎を悪化させた例や多発性硬化症に対する治療中の血管炎発症例の報告があり、病態に関与している可能性も考えられた。今後、血管炎における IFN β の役割に加え、抽出された他の免疫関連遺伝子についても検討を進めていく予定である。現在、症例をさらに集積中で、新たな別の対象群およびアレイを用いた網羅的解析を進めている。

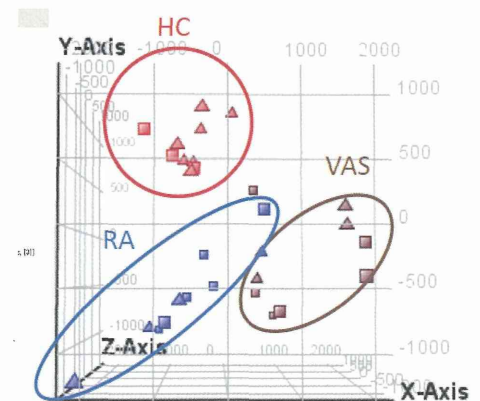


図1 末梢血遺伝子発現プロファイルの主成分分析 3D PCA スコアを 3D 散布図にて表示。VAS(血管炎 n=9)、RA(関節リウマチ n=10)、HC(健常人コントロール n=10) △男性、□女性

III-③

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

愛媛大学生体統御内科学 長谷川 均

【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。tDCs の誘導には、IL-10 やデキサメサゾンなどにより誘導されるが、いずれも一長一短があり、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。

【材料と方法】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- α , IL-1 β , 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

【結果】PKCI-DCs の特徴を以下に述べる。表面マーカーに関しては 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。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- β が mDCs と比較して著しく増加していた。さらに、PKCI-DCs による T 細胞の増殖抑制機能や制御性 T 細胞の誘導機能について検討した。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。PKCI-DCs の T 細胞の増殖能は、共培養において抗 IL-10 抗体、抗 TGF- β 抗体を加えることで一部回復したが、不十分で transwell の実験でさらに回復した。このことは、PKCI-DCs の T 細胞抑制能は IL-10 および TGF- β の産生だけでなく、Treg による細胞接触が重要な役割を果たすことが明らかになった。また、PKCI-DCs の安定性を検討するために炎症状態において、表面マーカー、機能、サイトカインの産生について解析した。PKCI-DCs の表現型、IL-10 と TGF- β の産生、T 細胞の抑制能についても維持されていた。機序に関しては、PKCI 存在下では NF κ 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 *in vitro* で誘導でき、細胞治療の可能性が示唆された。

III-④

難治性血管炎に関する調査研究報告

北海道大学大学院保健科学研究院

病態解析学分野 石津 明洋

1. 自己血管内皮細胞反応性NKT-17細胞による血管炎発症機序の解明

env-pX ラットは ANCA 非依存性の中小型血管炎を発症する。これまでの解析により、本ラットでは自己血管反応性 T 細胞による自己免疫性血管炎が発症すると考えられている。我々は、env-pX ラットのリンパ節細胞を血管内皮細胞 (EC) で繰り返し刺激することにより、EC 依存的に増殖亢進を示す T 細胞クローン 1B8、改め VASC-1 を樹立した。VASC-1 は $V\alpha 14$ と $V\beta 8.6$ で構成される TCR を有する CD4 CD8 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 $IFN-\gamma^+$ $IL-2$ $IL-4^+$ $IL-10^+$ を示した。また、neuropilin 1 と ROR γ t を発現し、IL-17 を産生することから、VASC-1 は NKT-17 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。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、現在解析中である。

2. 顕微鏡的多発血管炎の病態形成における NETs の関与について

活性化され細胞死に至った好中球は NETs (neutrophil extracellular traps) を形成する。顕微鏡的多発血管炎 (MPA) の糸球体病変局所において NETs が形成されていることが報告され、NETs が MPA の病態形成に関与している可能性が注目されている。一方、抗甲状腺薬プロピルチオウラシル (PTU) を投与された患者では、約 30% に MPO-ANCA が出現し、その一部は血管炎を発症する。我々は、好中球に phorbol myristate acetate (PMA) とともに 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 (東京医大 吉田雅治先生との共同研究)。すなわち、MPA を発症する患者では DNase 活性が低いいため、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。

III-⑤

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

岡田保典 慶應義塾大学医学部病理学教室

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疾患であり、発症原因は不明である。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、ヒト AAD 患者血液中の matrix metalloproteinase-1, 2, 3, 9 (MMP1, 2, 3 and 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 の役割を検討した。

(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 レベルを ELISA 系で測定したところ、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。大動脈置換術時に採取した AAD 大動脈中膜の解離面には多数の好中球がみられ、免疫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 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 ± 97.2 vs 47.2 ± 40.6 cells/mm²)、MMP9 と好中球エラスタ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しており、AAD の発症・進展に好中球由来 MMP9 や AngII が関与することを示唆している。

(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

3 週齢の幼若雄マウスに β -aminopropionitrile monofumarate (BAPN) を 4 週間投与後に 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 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、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 の発症や 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 を分泌することで解離が生じると推定された。

III-⑥

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

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

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ことを目的に研究を進めている。平成 24 年度は、岡山大学倫理委員会の承認を得て、当科における皮膚血管炎の代表的症例の年齢・性別，診断名などの基本診療情報，血液検査所見などのデータベースを作成した。可能な限りの病理組織所見をバーチャルスライドシステムに取り込んだ。現在、Chapel-Hill 分類に準じて典型例を選定し、病理組織のリファレンスライブラリを作成中である。同時に、既刊「皮膚症状からみた血管炎診断の手引き」（金原出版、2011 年）を新しい分類名に改訂し、病理組織所見に典型例の写真を加え、他班との協力のもとで ANCA 関連血管炎治療指針のサマリーを追記するなどの改訂を実施中である。平成 25 年度（本研究班の最終年度）に改訂版を上梓できるように準備中である。

IV. 大型血管炎分科会報告

- ① 新規発症症例の前向き登録研究
川崎医科大学心臓血管外科
種本 和雄

- ② ウイルス性心筋炎に対するグルココルチコイドの心筋保護効果の検討
山口大学医学部地域医療推進学講座 中村 浩士
山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学 矢野 雅文
慶應義塾大学循環器内科 佐野 元昭、福田 恵一

- ③ MRI による高安動脈炎の活動性評価の検討
東京医科歯科大学循環器内科
磯部 光章・加藤 陽子

- ④ 重症虚血肢バージャー病患者の長期予後に関する追跡調査
名古屋大学大学院血管外科
杉本 昌之・古森 公浩

- ⑤ 難治性高安動脈炎に対する tocilizumab 治療の効果判定に有用なサロゲートマーカーの探索
大阪大学大学院医学系研究科・循環器内科学
小室 一成・中岡 良和

IV-①

新規発症症例の前向き登録研究

川崎医科大学心臓血管外科 種本和雄

厚生労働省健康局疾病対策課より高安動脈炎の臨床調査個人票のデータの提供を受け、その解析と検討を行った。2001年から2010年の10年間、のべ26,798件の個人票のデータが提供された。このうち、新規症例は1,771件、更新がのべ25,027件であった。年次別に症例数の変動が見られる。「難病情報センター」のHPに公開されている受給者症例数と比較すると、今回提供されたデータは年度によっては50%以下の年次もあり、残念ながら全数のデータが提供されているのではない模様である。

外科手術症例、カテーテル治療症例の解析も行ったが、何れの術式も年間10例以下で、50例に達している術式はほとんどなく、解析に耐えるデータではなかった。また、術式の記載もテキスト記載のため、医学的に理解不能な内容が書かれているものも散見された。今後、臨床調査個人票の改訂にあたっては、術式はポップアップ式にするか、リストからの選択形式としないと正確な術式、治療内容を知ることは出来ないと感じられた。

前向き登録研究を行うために高安動脈炎を多く扱っている医療機関名を臨床調査個人票から知ることが出来ないかと考えて問い合わせたが、残念ながら医療機関の情報は厚生労働省にはないとのご返答であった。

上記より、きちんとした病態把握、発症要因の分析、臨床経過、治療実態とその効果を知るためには前向き登録研究を行うことが必須と考えられたため、その準備作業を進めた。すなわち、槇野班長を研究代表者として「大型血管炎（高安病と巨細胞性動脈炎）の寛解導入治療の現状と有効性に関する観察研究」を立ち上げ、本研究班参加施設を中心に24施設に依頼して、新たに診断された患者の前向き登録研究を開始している。登録項目、進捗状況などを中心に報告する。

IV-②

ウイルス性心筋炎に対するグルココルチコイドの心筋保護効果の検討

山口大学医学部地域医療推進学講座

中村浩士

山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学

矢野雅文

慶應義塾大学循環器内科

佐野元昭、福田恵一

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。3週令♂A/J マウスに coxsackievirus B₃ (CVB3) 2×10^4 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 (TCID₅₀) 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。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。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。以上より、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。

IV-③

MRIによる高安動脈炎の活動性評価の検討

東京医科歯科大学循環器内科

磯部光章・加藤陽子

【はじめに】高安動脈炎の活動性評価におけるMRIの意義については報告があるが症例数が少ない。CRPが上昇した患者においてLGE陽性になったと報告、LGEの定量評価を試み、Signal to noise ratio (SNR) = SI (signal intensity) vessel/SD (standard deviation) noise の変化が、Active群のほうが大きいと報告がある。LGE陽性を示す理由は、①血管の炎症による血管壁の浮腫がLGE陽性を示す②繊維化した組織がLGE陽性を示すの2通りが考えられる。

【目的】高安動脈炎患者の活動性評価におけるLGEの意義について検討した。

【方法】57名の高安動脈炎患者をActive群（臨床症状が不安定で2年以内に免疫抑制剤の増量や追加を必要とした患者）とInactive群（臨床症状が安定し2年以上免疫抑制剤の投与量が一定している患者）に分類した。各患者の大血管MRIを撮影し、大動脈および総頸動脈の14箇所（1）の壁厚を測定した。遅延造影を撮影し、最も壁厚の厚い箇所において、造影前(pre)および造影終了時(post)のSNR (SI_{vessel}/SD_{noise})とCNR (SI_{vessel}- SI_{background})/SD_{noise})を測定した。また、SNR ratio = SNR(post)/SNR(pre), CNR ratio = CNR(post)/CNR(pre)と定義した。

【結果】Active群は19名、Inactive群31名が解析可能であった。Active群はInactive群よりも年齢が低く(31.7±11.0歳 vs. 48.1±13.8歳 (p<0.01))、CRPが高かった(0.88±1.28mg/dl vs. 0.14±0.16mg/dl (p<0.01))。①最大壁厚と撮影のタイミングは、Active群とInactive群に有意差はなかった。1)最大壁厚 (Active群: 3.28±0.52mm vs. Inactive群: 3.36±0.45mm (p=0.57)) 2)撮影のタイミング (Active群: 32.74±9.43分 vs. Inactive群: 37.06±10.35分 (p=0.14)) ②SNR ratioはInactive群のほうがActive群よりも大きく (Active群: 5.82±3.80 vs. Inactive群: 9.22±6.40 (p=0.04)) CNR ratio (Active群: 10.65±13.82 vs. Inactive群: 30.23±46.14 (p=0.08))は差がなかった。

【結語】LGEから活動期の高安病の炎症を鑑別することは困難であり、炎症が終わって長期間を経た大動脈でも強いLGEを認める。

IV-④

重症虚血肢バージャー病患者の長期予後に関する追跡調査

名古屋大学大学院血管外科

杉本 昌之、古森 公浩

【目的と方法】

バージャー病患者における足趾壊死・潰瘍は禁煙を含む生活指導・内科的治療のみで軽快・治癒する例も少なからず見られるなど、その予後はASOの重症虚血肢とは大きく異なる。当科のバージャー病重症虚血肢患者における肢の長期予後について検討した。検討に必要な情報は主に診療記録の参照により収集した。

【対象】1980～2010年に当科にてバージャー病と診断・入院し診療情報が得られた154例のうち、重症虚血症状を呈した103例（うち女性7例）を対象とした。

【結果】発症年齢は 38.0 ± 9.7 才（平均±SD），観察期間は 147 ± 136 ヶ月（中央値97ヶ月）。症状は安静時痛33例，潰瘍65例（足趾59例，手指2例，両方2例），壊疽5例であった。16例が禁煙の遵守と薬物療法のみで保存的に治癒した。20例が喫煙続行もしくは経過中に喫煙再開を申告した。外科手術として胸部・腰部交感神経切除術を66例，バイパス術を29例で施行。17例では交感神経切除とバイパス術を同時または二期的に行った。骨髄単核球移植による血管新生治療（TACT）は4例で施行。交感神経切除のみ行った48例では経過中2肢で大切断に至った。下腿動脈へのバイパスは22例23肢で，開存率は5年67.0%，10年45.6%であり，2ヶ月以内の早期閉塞が3割を占めた。非禁煙者（10例）の2肢でグラフト閉塞から大切断に至ったが，禁煙者（12例）では閉塞後も大切断は要さなかった。また，非喫煙者TACTの3例で症状改善を見たが，1例では大切断を要した。発症20年後の救肢率は禁煙群の90%に対し，非禁煙群では69%と不良な傾向であったが，今回の検討では長期予後に有意差は認めなかった（ $P=0.15$ ）。長期軽快症例での喫煙再開が多いことなどが理由と考えられた。

IV-⑤

難治性高安動脈炎に対する tocilizumab 治療の効果判定に有用なサロゲートマーカーの探索

大阪大学大学院医学系研究科・循環器内科学

研究分担者 小室 一成

研究協力者 中岡 良和

(背景と目的) 難治性高安動脈炎の治療はステロイドが第一選択であるが、一時的に寛解に至ってもその減量過程で再燃することが多い。再燃時にはステロイドと各種免疫抑制剤を併用することが推奨されているが、ステロイド治療抵抗性症例に対する治療法は未だ未確立で、効果的な治療法の確立が必要である。我々は難治性高安動脈炎患者に対する抗 IL-6 受容体抗体 tocilizumab による治療の安全性と有効性の検討をこれまで行っている。本年度は、その治療効果の判定に有用なサロゲートマーカーの同定を目的として tocilizumab 治療前後での血清サイトカイン濃度の解析を行った。

(方法と結果) ステロイド治療抵抗性の高安動脈炎症候群で tocilizumab (8mg/kg/月) 治療を施行した4症例(男性1名、女性3名、年齢は21~43歳)で、MAGPIX(ミリポア社)を用いてサイトカイン24種類の血清濃度を測定した。ELISAの検討で予め得ていた情報と一致して、MAGPIXでも全症例で血清IL-6は治療開始後に一旦上昇した後、治療経過とともに減少した。いずれの症例でも、IL-6と類似の変動傾向を示すサイトカインが複数種類同定されたが、4症例全てで共通の傾向を示すサイトカインは同定できなかった。

(結語) 難治性高安動脈炎のトシリズマブ治療の効果判定に血清IL-6濃度測定は有用な可能性が示唆されるが、他のサイトカインについては今後解析する症例数を増やして検討する必要がある。