

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=23)、RA(関節リウマチ n=20)、HC(健常人コントロール n=21)

次に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 HC 群と比較した血管炎群で最も多い 912 プローブが抽出された。

このうち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、SAMSN1 (Corrected p-value: $3.03E-05$)等が上位に選別された。また血管炎全体および血管炎 7 疾患と HC とを比較して発現亢進および低下の遺伝子を抽出し、GO 解析および Pathway 解析を施行しリスト化した。

血管炎全体および血管炎亜群 Grouping1-8 の 8 比較について、GeneSpringGX11.0.2 を用いて TTEST で遺伝子抽出条件(T Test unpaired unequal variance (Welch) FDR < 0.05, Fold Change > 1.3)で抽出した。

	Total	UP	DOWN
Grouping1_vs_VAS n=23	5,225	2,677	2,548
Grouping2_vs_MRA n=10	791	306	485
Grouping3_vs_ANCA n=8	3,770	1,765	2,005
Grouping4_vs_PAN n=2	753	369	384
Grouping5_vs_Takayasu n=3	572	200	372
Grouping6_vs_MPA n=4	745	383	362
Grouping7_vs_GPA n=2	1,015	500	515
Grouping8_vs_EGPA n=2	1,113	530	583

図 2 血管炎亜群の末梢血遺伝子発現変動のプロファイル

血管炎 23 例を亜群に分類し、健常人 21 例を対照とした遺伝子発現変動プローブ数を示す。

次に症例群間 TTEST (8 比較) で抽出されたプローブ群を UP と DOWN に分けた計 16 プローブリストについて、GenMAPP-MAPPFinder を用いて Pathway 解析を行った。抽出条件は、Z-score > 0 かつ Permute P-value < 0.1。有意な Pathway が抽出されたカテゴリー () 内の数値は有意な Pathway 数をしめす。(図 3)

血管炎、未治療 RA、健常人の 3 群において遺伝子発現プロファイルを解析した。ステロイドを含む治療例を含み、全血での解析という制約があるものの網羅的に血管炎症候群に特徴的な末梢血遺伝子発現のプロファイルの一端を明らかにできた。今後未治例を集積するとともに、細胞特異的データを取得することでより

高精度に鍵分子の同定が可能になるとと思われる。

GO Term	Pathway
G1_vs_VAS_DOWN	○ (8)
G1_vs_VAS_UP	○ (18)
G2_vs_MRA_DOWN	○ (3)
G2_vs_MRA_UP	○ (6)
G3_vs_ANCA_DOWN	○ (4)
G3_vs_ANCA_UP	○ (21)
G4_vs_PAN_DOWN	○ (7)
G4_vs_PAN_UP	○ (7)
G5_vs_Taka_DOWN	○ (4)
G5_vs_Taka_UP	○ (6)
G6_vs_MPA_DOWN	○ (4)
G6_vs_MPA_UP	○ (6)
G7_vs_GPA_DOWN	○ (4)
G7_vs_GPA_UP	○ (6)
G8_vs_EGPA_DOWN	○ (5)
G8_vs_EGPA_UP	○ (10)

図 3 血管炎亜群の末梢血遺伝子発現のパスウェイ解析

血管炎 23 例を亜群に分類し、健常人 21 例を対照とした遺伝子発現変動パスウェイ数を示す。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeuchi T and Suzuki K. CD247 variants and single nucleotide polymorphisms observed in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 2013.

2) 倉沢隆彦、鈴木勝也、竹内勤: 特集 自己免疫疾患の最近の話題と展望 マイクロアレイを用いた自己免疫疾患の解析 *Pharma Medica* vol.31 No.1 メディカルレビュー 2013

2. 学会発表

1) 鈴木勝也、中村誠二、谷野元彦、竹下勝、吉本桂子、亀田秀人、天野宏一、竹内勤、DNA マイクロアレイを用いた関節リウマチ新規活動性マーカーの探索 2013 年 4 月 18 日、第 57 回日本リウマチ学会学術集会、京都

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

定量プロテオーム解析による ANCA 関連血管炎の新規活動性マーカー探索
分担研究者 長谷川均 愛媛大学大学院血液・免疫・感染症内科学 准教授
研究協力者 武森信暁（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）
石崎 淳（愛媛大学大学院血液・免疫・感染症内科学）

研究要旨

【目的】ANCA 関連血管炎(AAV)の詳細な発症機序は不明であり、診断マーカーとなる血清 ANCA 値は必ずしも病態と相関しない場合がある。今回、我々は質量分析 (MS) を用いた患者血清プロテオームの大規模定量解析により、血管炎の活動性、臓器障害を反映する新規マーカータンパク質の探索を行った。【材料と方法】厚生労働省難治性血管炎に関する調査研究班に登録された AAV 患者の血清試料（治療前と治療 6 ヶ月後）を、エンドプロテアーゼ（トリプシン/Lys-C）を用いて消化した後、タンデム MS 解析によりタンパク質の同定をおこなった。同定タンパク質の治療前後における比較定量解析は、3 連四重極型 MS を用いた Selected reaction monitoring(SRM)法により行った。【結果】血清試料(顕微鏡的多発血管炎 4 例、肉芽腫性多発血管炎 2 例、好酸球性肉芽腫性多発血管炎 1 例)のプロテオーム解析により、約 400 タンパク質の同定に成功した。そのうち、血管炎との関連が強く示唆されるタンパク質群（89 種類）を選択し、活動期に極めて高い発現を示すマーカー候補の探索を定量 SRM 解析により行ったところ、炎症関連タンパク質（ORM, S100A8 等）に加えて、血管内皮障害、腎障害や好中球活性化などに関連するマーカー候補タンパク質が新たに明らかになった。

A. 研究目的

ANCA 関連血管炎(AAV)の詳細な発症機序は不明であり、診断マーカーとなる血清 ANCA 値は必ずしも病態と相関しない場合がある。このため、疾患活動性や臓器障害の指標になる新たなバイオマーカーの探索が盛んに行われている。今回、我々は質量分析 (MS) を用いた患者血清プロテオームの大規模定量解析により、血管炎の活動性、臓器障害を反映する新規マーカータンパク質の探索を行った。

B. 研究方法

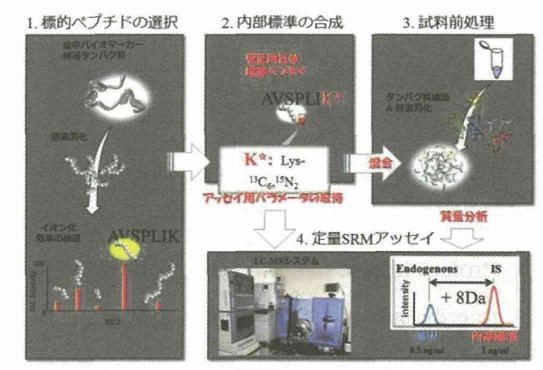
1) ANCA 関連血管炎患者血清

当科および当研究班から分与いただいた活動期（治療前）と非活動期（治療後 6 か月）の 33 名の患者血清を用いた。

2) 定量 selected reaction monitoring (SRM) 法の開発 (図 1)

下記の定量 SRM 法を開発し、数 ng/mL のタンパク質までの定量解析が可能になった。これを用いて血中のタンパク質の検索を行った。

図1 定量SRMアッセイの開発



3) 血清試料のプロテオーム解析 (図2)

AAV 患者の血清試料 (治療前と治療 6 ヶ月後) を、主要 14 種類の血清タンパクをカラムで除去後、エンドプロテアーゼ (トリプシン/Lys-C) を用いて消化し、タンデム MS 解析によりタンパク質の同定を行った。さらにこれらのタンパクのうち、血管炎との関連が示唆されるタンパクを抽出し、33 名の患者血清の治療前後における比較定量解析は、3 連四重極型 MS を用いた SRM 法により行った。またコントロールとして、健常人 12 名の血清も用いた。

図2 解析方法のフローチャート



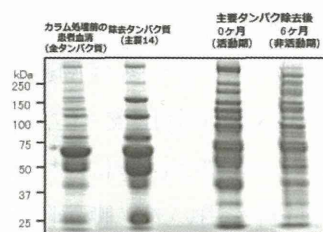
(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、厚生省難治性疾患克服研究事業「難治性血管炎に関する調査研究班」および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ている。

C. 研究結果と考察

1) まずは、7名の AAV 患者 (MPA 4名、GPA 2名、EGPA 1名) の血清試料 (治療前と治療 6 か月後) を、主要 14 種類の血清タンパクをカラムで完全に除去した (図3)。これで 96% の血清タンパクが除去できた。

図3 抗体カラムを用いた主要血清タンパク質 14 種の除去

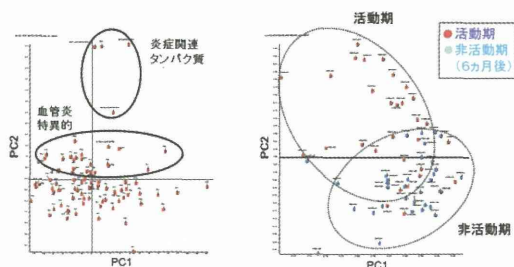


これらのタンパクをエンドプロテアーゼ (トリプシン/Lys-C) を用いて消化し、タンデム MS 解析 (LC-MS/MS) によりタンパク質の同定を行い、約 400 タンパク質の同定に成功した。

2) これらのタンパク質から、治療前後で差のある血管炎との関連が示唆される 89 種のタンパク質を抽出し、33 名の AAV 患者 (MPA 18 名、GPA 12 名、EGPA 3 名) の血清試料 (治療前と治療 6 ヶ月後) と健常人 12 名の血清を定量 SRM にて解析した。図4に示しているように、その主成分分析

による血清プロテームプロファイリングの結果、活動期に特異的なタンパク質プロファイルが明らかになった。

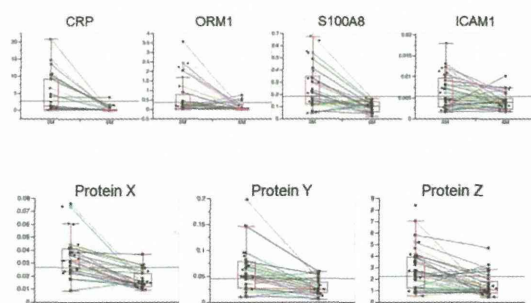
図4 主成分分析による血清プロテームプロファイリング



この結果、新たに10種類以上の炎症関連タンパク質、血管内皮、腎障害や好中球活性化などに関連するマーカー候補タンパク質が明らかになった。

これらの一部のデータ、炎症関連 (CRP、ORM1、S100A8)、血管内皮 (ICAM1) および新たなタンパク質を図5に示す。さらに多くの血清試料を用いて、臓器障害のマーカー検索を行っている。

図5 定量SRM解析結果



D. 健康危険情報
特になし。

E. 研究発表
論文発表

1. Matsumoto T, Hasegawa H, Onishi S, Ishizaki J, Suemori K, Yasukawa M. Protein kinase C inhibitor generates human tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.* 191: 2247-2257, 2013.
2. 長谷川均、松本卓也、安川正貴：樹状細胞のトレランス誘導機能と protein kinase C。臨床免疫・アレルギー科 in press.
3. 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 59: 483-490, 2013.

学会発表

1. 長谷川 均。生理活性物質による安定性のあるヒト制御性T細胞および寛容型樹状細胞の誘導と臨床応用。第41回日本臨床免疫学会総会。シンポジウム。下関。2013年11月28日。
2. 長谷川 均。ステロイド・免疫抑制剤投与下での感染症—膠原病・リウマチ疾患を中心に。第83回日本感染症学会西日本地方会、第56回日本感染症学会中日本地方会、第61回日本化学療法学会西日本地方会共同開催。シンポジウム。大阪。2013年11月8日。
3. 松本卓也、石崎 淳、大西佐知子、末盛浩一郎、安川正貴、長谷川 均。Cキナーゼ阻害剤を用いた安定性のある免疫寛容型樹状細胞の作製とその臨床応用。第57回日本リウマチ学会総会。京都。

2013年4月19日。

4. 大西佐知子、石崎 淳、松本卓也、末盛浩一郎、安川正貴、長谷川 均。小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を利用した全身性エリテマトーデスの新たな自己抗原の検討。第57回日本リウマチ学会総会。京都。2013年4月20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。
2. 実用新案登録
該当なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（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、自己血管内皮細胞に反応する T 細胞クローン VASC-1 を樹立した。VASC-1 はラット培養血管内皮細胞 (REC) と反応して相互に活性化し、小型血管炎を誘導する。REC と反応することによる VASC-1 の活性化は抗 CD1d 抗体により阻害されたことから、VASC-1 は NKT 細胞と考えられた。また、VASC-1 は type I NKT 細胞に invariant な TCR を発現していないこと、ならびに type I NKT 細胞が結合する α -galactosylceramide に結合しないことから、type II NKT 細胞と考えられた。小型血管炎の発症に自己血管内皮細胞反応性 type II NKT 細胞が関与していると考えられる。

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

MPA 患者の血清 IgG に NETs 誘導活性を認めた。血清中の NETs 誘導因子は MPO-ANCA であり、その活性は MPO との結合親和性に依存した。一方、MPA 患者の血清は NETs 分解活性が低く、DNase I 活性が低かった。一部の MPA 患者の血清中には抗 NETs 抗体が検出された。MPA 患者では DNase I 活性が低いこと、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、抗 NETs 抗体が産生されるなどして、ますます NETs が分解されにくい状況となる。すなわち、NETs と MPO-ANCA を介した病態悪循環が形成されていると考えられる。

A. 研究目的

動物モデルや細胞モデル、ヒト検体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。

また、患者血清の DNase I 活性を測定した。さらに患者血清中に抗 NETs 抗体が存在するか検討した。

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 (REC) に反応し、小型血管炎を惹起する T 細胞クローン VASC-1 を樹立した。REC と反応することによる VASC-1 の活性化を観察し、それが抗 CD1d 抗体で阻害されるか検討した。また、VASC-1 の TCR を解析し、同細胞の characterization を行った。

MPA 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。ヒト検体を用いた研究については、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 NKG2D を発現する 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 $\text{IFN-}\gamma^+$ IL-2^+ IL-4^+ IL-10^+ を示したことから、NKT 細胞と考えられた。

VASC-1 と REC は反応し、相互に活性化する。REC と反応することにより、VASC-1 から IL-2、IL-5、IL-6 が産生されるが、この発現誘導は抗 CD1d 抗体により阻害されたことから、VASC-1 が NKT 細胞であることが確認された。NKT 細胞には type I と type II の 2 つのサブセットがある。VASC-1 は type I NKT 細胞に invariant な TCR を発現していないこと、ならびに type I NKT 細胞が結合する α -galactosylceramide に結合しないことから、type II NKT 細胞と考えられた。

MPA 患者の血清 IgG に NETs 誘導活性を認めた。同活性は MPO の添加により吸収されたことから、血清中の NETs 誘導因子は MPO-ANCA であることが確認された。また、その活性は MPO との結合親和性に依存することも明らかとなった。一方、MPA 患者の血清は NETs 分解活性が低く、DNase I 活性が低かった。一部の MPA 患者の血清中には抗 NETs 抗体の存在が確認された。

D. 考察

小型血管炎の発症に自己血管内皮細胞反応性 type II NKT 細胞が関与していると考えられる。VASC-1 が認識する REC 抗原を同定し、type II NKT 細胞が小型血管を障害するメカニズムの詳細を明らかにする必要がある。

MPA 患者では DNase I 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、抗 NETs 抗体が産生されるなどして、ますます NETs が分解されにくい状況となる。すなわち、NETs と MPO-ANCA を介した病態悪循環が形成されていると考えられる。

E. 結論

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を提唱した。血管炎惹起性 NKT 細胞が認識する内皮細胞抗原や、NKT 細胞が産生する血管障害のエフェクタ

一分子が、血管炎の新たな治療標的となる可能性がある。

MPA の病態に NETs-ANCA 悪循環が存在することを示した。NETs を適切に制御することが MPO-ANCA の産生を抑制することにつながり、ひいては MPO-ANCA 関連血管炎の発症予防や治療に寄与する可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- α converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest* 93(1): 72-80, 2013.
- 2) Kawakami T, Ishizu A, Arimura Y, Soma Y. Serum Anti-lysosomal-associated membrane protein-2 antibody levels in cutaneous polyarteritis nodosa. *Acta Derm Venereol* 93(1): 70-73, 2013.
- 3) Michimata R, Watari H, Tomaru U, Sakuragi N, Ishizu A. Human papillomavirus (HPV) 16-positive uterine cervical squamous cell carcinoma with co-infection of HPV 34 has lower incidence in lymph node metastasis than that without co-infection of HPV 34. *Pathobiology* 80(5): 259-264, 2013.
- 4) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Yamamoto T, Atsumi T, Yoshiki T, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Kurokawa MS, Suka M, Makino H, Ozaki S for JMAAV. Prediction of response to treatment by gene expression profiling of peripheral blood in patients with microscopic polyangiitis. *PLoS One* 8(5): e63182, 2013.

- 5) Takeuchi S, Kimura S, Soma Y, Waki M, Yamaguchi M, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A, Kawakami T. Lysosomal-associated membrane protein-2 plays an important role in the pathogenesis of primary cutaneous vasculitis. *Rheumatology* 52(9): 1592-1598, 2013.
- 6) Masuda S, Iwasaki S, Tomaru U, Baba T, Katsumata K, Ishizu A. Possible implication of Fcγ receptor-mediated trogocytosis in susceptibility to systemic autoimmune disease. *Clin Dev Immunol* 2013: 345745, 2013.
- 7) Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol* 17(5): 631-633, 2013.
- 8) Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in MPO-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol* (in press)
- 9) Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Kasahara M, Matsuno Y. Expression of thymoproteasome subunit β5t in type AB thymoma. *J Clin Pathol* (in press)
- 10) Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol* (in press)
- 11) Kawakami T, Okudaira A, Okano T, Takeuchi S, Kimura S, Soma Y, Ishizu A, Arimura Y, Kobayashi S, Ozaki S. Treatment for cutaneous arteritis patients with mononeuritis multiplex and elevated C-reactive protein. *J Dermatol* (in press)
- 12) Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, Mukaida N. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol* (in press)
- 13) 中沢大悟, 外丸詩野, 西尾妙織, 渥美達也, 石津明洋. プロピルチオウラシルと NETs の異常形成・分解異常. *日本臨床* 71 増刊号「血管炎」: 244-249, 2013.
- 14) 飯沼千景, 脇 雅, 山口まどか, 外丸詩野, 石津明洋. 自己反応性 NKT 細胞と血管炎. *日本臨床* 71 増刊号「血管炎」: 502-505, 2013.
- 15) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 山本智宏, 吉木 敬. 血管炎の予後は予測できるか — 予後因子探索の道 —. *分子リウマチ治療* 6(2): 82-86, 2013.
- 16) 石津明洋. 血管炎症候群: 抗好中球細胞質抗体. *分子リウマチ治療* 6(4): 209-213, 2013.
2. 学会発表
- 1) Akihiro Ishizu, Utano Tomaru, Chihiro Iinuma, Masashi Waki, Ai Kawakami, Naomi Sasaki, Takashi Yoshiki. Implication of vascular endothelial cell-reactive NKT cells in pathogenesis of small vessel vasculitis in rats. 16th International Vasculitis and ANCA Workshop April 14-17, 2013. Paris, France.
- 2) Akihiro Ishizu, Utano Tomaru, Taichi Murai, Tomohiro Yamamoto, Tatsuya

- Atsumi, Takashi Yoshiki. Prediction of outcome of treatment by gene expression profiling of peripheral blood in patients with microscopic polyangiitis. 16th International Vasculitis and ANCA Workshop April 14-17, 2013. Paris, France.
- 3) Daigo Nakazawa, Utano Tomaru, Satoshi Jodo, Saori Nishio, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. 16th International Vasculitis and ANCA Workshop April 14-17, 2013. Paris, France.
 - 4) Daigo Nakazawa, Utano Tomaru, Masaharu Yoshida, Saori Nishio, Haruki Shida, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. High induction and low degradation abilities on neutrophil extracellular traps of sera in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. ASN 2013. November 5-10, 2013. Atlanta, GA, USA.
 - 5) 中沢大悟, 外丸詩野, 浄土 智, 渥美達也, 石津明洋. 顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者に合併した深部静脈血栓における過剰な NETs 形成. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 京都, 2013.
 - 6) 中沢大悟, 外丸詩野, 西尾妙織, 渥美達也, 笠原正典, 石津明洋. 好中球細胞外トラップ (NETs) の異常と MPO-ANCA 関連血管炎の発症. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.
 - 7) 川上 愛, 飯沼千景, 脇 雅, 山口まどか, 外丸詩野, 笠原正典, 吉木 敬, 石津明洋. 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 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.
 - 8) 紺野沙織, 外丸詩野, 岸本葉奈, 石津明洋, 笠原正典. プロテアソームの発現異常における免疫応答の変化. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.
 - 9) 今本鉄平, 中沢大悟, 大塚紀幸, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. 顕微鏡的多発血管炎と血栓症は MPO-ANCA と好中球細胞外トラップを介して関連する. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.
 - 10) 山本 岳, 藤井真理子, 大塚紀幸, 光部兼六郎, 櫻井宏治, 外丸詩野, 石津明洋, 笠原正典. HELLP 症候群に合併した hepatic rupture の一剖検例. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.
 - 11) 味藤 静, 外丸詩野, 大塚紀幸, 石津明洋, 笠原正典. リツキシマブ投与後に日和見感染を併発した顕微鏡的多発血管炎の一剖検例. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013.
 - 12) Ai Kawakami, Chihiro Inuma, Masashi Waki, Madoka Yamaguchi, Utano Tomaru, Masanori Kasahara, Akihiro Ishizu. Establishment of NKT cell clone from vasculitis-prone rats, which recognizes autoantigen but not α -galactosylceramide presented by CD1d. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, 千葉, 2013.
 - 13) Saori Konno, Utano Tomaru, Akihiro Ishizu, Masanori Kasahara. Aberrant proteasomal expression affects T cell differentiation and function. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, 千葉, 2013.
 - 14) 岩崎沙里, 藤沢孝志, 鈴木 昭, 石津明洋. 半月体性糸球体腎炎に加え多臓器で肉芽腫形成性血管炎を呈した血清

MPO-ANCA 陽性の血管炎症候群の一部
検例. 第 18 回血管病理研究会, 札幌,
2013.

15) 中沢大悟, 志田玄貴, 西尾妙織, 渥美達
也, 吉田雅治, 外丸詩野, 石津明洋.
MPO-ANCA 関連血管炎患者における
neutrophil extracellular traps (NETs)の制
御異常. 第 18 回血管病理研究会, 札幌,
2013.

16) 石津明洋. 好中球細胞外トラップ
(NETs) の異常と顕微鏡的多発血管炎.
第 26 回北海道腎フォーラム, 札幌, 2013.

17) 石津明洋. ANCA はなぜ産生されるか?
—NETs の異常と ANCA 関連血管炎. 第
37 回関東・甲信越 MMC 研究会, 東京,
2013.

18) 石津明洋. MPO-ANCA 関連血管炎の病
態生理 up-to-date. Vasculitis Forum in
Fukuoka, 福岡, 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録

特願 2008-240155

尾崎承一, 石津明洋

「MPO-ANCA 関連血管炎の被験者に対
する治療の効果を予測する材料を提供す
る方法」

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

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

急性大動脈解離の迅速診断法開発の試みと血管壁への好中球浸潤機構解析

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、高安大動脈炎やベーチェット病に合併する難治性血管疾患で、発症率は低いものの救命には迅速な診断が必須である。本研究では、matrix metalloproteinase9（MMP9）を標的とした AAD の迅速イムノテストを開発し、AAD の診断に有用かを検討した。また、血管壁への好中球の浸潤機構をβ-aminopropionitrile monofumarate と angiotensin II（AngII）投与による AAD マウスモデルとヒト AAD 大動脈組織標本を用いて解析した。今回開発した迅速 MMP9 イムノテストでは、5 分間で測定できる点で迅速性はあるものの、AAD 患者 14 例中 6 例（43%）でしか陽性を示さず、臨床応用には改良が必要と考えられた。マウス AAD モデルでは、大動脈での好中球浸潤のピークは AngII 投与後 24-48 時間にあり、種々のサイトカイン・ケモカインの発現亢進が証明された。また、血管内皮細胞への好中球の接着・浸潤促進作用をもつ ADAM28 の発現が AAD の大動脈や白血球破碎血管炎などの炎症性組織の血管内皮細胞に認められた。これらの結果から、好中球の血管壁への浸潤には血管組織局所で発現されたサイトカイン・ケモカインと ADAM28 などの分子の関与が示唆された。

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り、本邦における頻度は 2.6-5.2 人/10 万人とされている。昨年度の研究により、AAD 患者では血中の matrix metalloproteinase9（MMP9）と angiotensin II（AngII）が高値を示すことを明らかにするとともに、コラーゲンやエラスチンの架橋阻害剤である β-aminopropionitrile monofumarate（BAPN）と AngII 投与により AAD 発症マ

ウスモデルの作製に成功し、好中球由来 MMP9 が AAD 形成に中心的役割を果たすことを示した（Circulation 126:3070-3080, 2012）。AAD は CT などの画像診断法で確定診断されるが、AAD の迅速診断法やスクリーニング法はない。また、好中球の血管壁への浸潤は AAD のみならず血管炎に共通した現象であるが、そのメカニズムに関する情報は限られている。これらの背景から、本年度の研究では AAD の迅速診断法開発の試みと血管壁への好中球浸潤機構について検討した。

B. 研究方法

妊娠テストとして汎用されているアッセイ系と同様な原理に基づいて、迅速 MMP9 イムノテストを開発した。プレート上にサンプルパッド、標識抗体含有パッド、抗体塗布メンブレイン、吸収パッドを設置し、金コロイド標識した抗ヒト MMP9 マウスモノクローナル抗体とウサギ IgG を用い、抗体塗布メンブレイン上に MMP9 の濃度が 450 ng/ml (C1) と 150 ng/ml (C2) に相当する反応線になるように抗ウサギ IgG ヤギ抗体を固定化し、血漿 100 μ l をサンプルパッド上の検体孔に滴下 5 分後に判定窓に出現したテストラインとコントロールライン (C1 と C2) の色調の比較により半定量的に MMP9 濃度を判定した。ヘパリン・クエン酸処理採血管、ヘパリン・EDTA 処理採血管、無遠心血漿真空分離採血管の 3 種類の方法を用いて血漿を調整し、MMP9 測定値の変化をサンドイッチイムノアッセイ法と本迅速イムノテスト法により検討した。測定にあたっては、慶應義塾大学病院救急部を受診した患者 (合計 19 症例) より血漿検体を調整し、迅速 MMP9 イムノテスト、MMP9 サンドイッチイムノアッセイ、FDP、D ダイマー、CRP をそれぞれ測定した。

外科的に切除された AAD 大動脈、白血球破碎血管炎の皮膚、虫垂炎、胆嚢炎の各外科病理パラフィン切片および剖検で得られた気管支肺炎肺組織パラフィン切片を用いて免疫組織染色により ADAM28 の局在を検討した。また、ヒト血管内皮細胞株

(HUVEC) を tumor necrosis factor- α (TNF- α)、

interleukin-1 (IL-1)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、transforming growth factor- β (TGF- β)、phorbtor 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理し、ADAM28 の mRNA 発現を real-time PCR で検討した。さらに、P-selectin をコートしたプレート上に HUVEC を播種し、上記培養液の存在・非存在下での細胞接着率を検討した。

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) を皮下持続投与し、経時的に経過を観察し、血圧測定、生存率、AAD 発症率を 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、AngII 投与 24 時間、48 時間、96 時間後に屠殺し、大動脈における好中球とマクロファージ浸潤の程度を CD11b/Ly6G 陽性細胞と CD11b/F4/80 陽性細胞をフローサイトメータで測定した。さらに、動脈組織で発現した、IL-1、IL-6、TNF- α 、CXCL1、CXCL2、CCL2 (MCP-1) を real-time PCR で定量的に測定した。対照として、BAPN 未処理マウスに AngII 投与して同様な検討を行った。

ヒト血液検体と手術病理検体については、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。解剖承諾書に研究利用に同意をいただいた症例の肺病理組織標本の免疫染色に関しても、慶應義塾大学倫理委員会において承認を受けて実施した。動物実験は、学内での承認を受けて動物実験指針に準拠して行った。

C. 研究結果と考察

(1) MMP9 を標的とした AAD 患者の迅速血液診断法開発の試み

血液中の MMP9 レベルを測定できる迅速イムノテストを開発した。本 MMP9 アッセイ法では、イムノテストプレート中にコントロールとして 150 ng/ml と 450 ng/ml の濃度に相当する反応線を設置し、100 μ l の血漿を添加後出現する反応線をコントロールとの比較により 5 分以内で検出し、150 ng/ml 以下を陰性、150 ng/ml~450 ng/ml を陽性、450 ng/ml 以上を強陽性とした。血漿の調整にあたって 3 種類の方法を検討した結果、ヘパリン・クエン酸処理採血管や無遠心血漿真空分離採血管では MMP9 値がきわめて低値となり、ヘパリン・EDTA 処理採血管のみが有用であった。ヘパリン・EDTA 処理本イムノテストの結果、AAD 患者 14 症例中 6 例が陽性（4 例が陽性で 2 例が強陽性）を示したのに対し、腹腔動脈解離患者 1 名、その他の患者 4 名（背部痛、胆石疑い、失神、胸水それぞれ各 1 名）中 1 名で陽性所見を示した。今回開発した MMP9 イムノテストは、AAD 患者での陽性率が 43%と低く、25%で偽陽性を示すなど、既存の FDP、D ダイマー、CRP 検査法と比較して必ずしも優れているとは言えず、下限のコントロールを 100 ng/ml にしたイムノテストの作製など、実用化にはさらなる改良が必要と考えられた。

(2) 血管壁への好中球浸潤機構解析

BAPN と AngII 投与により AAD を作製し、

経時的に観察すると AngII 投与から 96 時間までに 55%が死亡した。AAD マウスモデルにおける大動脈での好中球の浸潤のピークは AngII 投与から 24~48 時間にあった。また、AAD を発症した大動脈壁では種々のサイトカイン・ケモカイン・増殖因子 (IL-1、IL-6、TNF- α 、CCL2、CXCL1、CXCL2、G-CSF) の産生が 24 時間で最も高値を示した。MMP 近縁遺伝子ファミリーの ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)ファミリーの 1 分子である ADAM28 は、P-selectin glycoprotein ligand-1 との結合により、白血球の血管内皮細胞への接着・浸潤を促進することを我々は報告してきたが、ADAM28 はヒト AAD 大動脈、白血球破碎血管炎、ヒト炎症性組織（気管支肺炎、急性虫垂炎、急性胆嚢炎）での血管内皮細胞において免疫組織学的に発現していることが確認された。HUVEC を用いた検討では、ADAM28 は TNF- α や IL-1 α 刺激により protein kinase C の活性化を介して発現亢進した。また、血管内皮細胞から分泌された分泌型 ADAM28 は白血病細胞株の固相化 P-selectin への接着を特異的に促進した。以上のデータから、AngII による好中球の血管内皮細胞へ接着亢進に ADAM28 が関与する可能性があり、AAD が誘導された動脈壁で産生されたサイトカイン・ケモカインが好中球浸潤をさらに促進し、AAD の進展につながると推定された。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

1. Yoda M., Kimura T., Tohmonda T., Morioka H., Matsumoto M., Okada Y., Toyama Y. and Horiuchi K.: Systemic overexpression of TNF- α -converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo. PLoS One 8(1): e54412, 2013.

2. Mochizuki S. and Okada Y.: ADAM28. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Ed by Rawlings N.D. and Salvesen G.S. Elsevier Ltd, Oxford, UK. pp1136-1139, 2013.

3. 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. pp97-115, 2013.

4. Yoshida H., Nagaoka A., Kusaka- Kikushima A., Tobiishi M., Kawabata K., Sayo T., Sakai S., Sugiyama Y., Enomoto H., Okada Y. and Inoue S.: KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. Proc Natl Acad Sci USA 110:5612-5617, 2013.

5. Abe H., Mochizuki S., Ohara K., Ueno M.,

Ochiai H., Kitagawa Y., Hino O., Sato H. and Okada Y.: Src plays a role in ADAM28 expression in v-src-transformed epithelial cells and human carcinoma cells. Am J Pathol 183:1667-1678, 2013.

6. Yoshida H., Nagaoka A., Nakamura S., Okada Y. and Inoue S.: Murine homologue of the human KIAA1199 is implicated in hyaluronan binding and depolymerization. FEBS Open Bio 3:352-356, 2013.

F. 学会発表

<学会>

Yasunori Okada: MMPs in diagnosis and pathogenesis of cardiovascular disease. Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases. Invited speaker. May 19-24, 2013 (Presentation: May 23). Il Ciocco, Italy.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究平成25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

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 笠岡市民病院皮膚科医長・岡山大学客員研究員
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・病理所見を連携させたデータベースを作成した。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。血管炎の典型例を選び、「皮膚症状からみた血管炎診療の手引き」を編集した（平成26年2月刊行）。学会間の用語統一を実施した。

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 笠岡市民病院皮膚科医長・岡山大学客員研究員

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

1. 皮膚血管炎症例の臨床・検査・病理所見のデジタル化し、連結させたデータベースとして、血管炎研究の重要なリソースとする。
2. 典型的血管炎症例、鑑別すべき疾患を網羅した診断の手引きを刊行する。
3. Chapel-Hill コンセンサス会議（CHCC）2012年で提唱された血管炎の和文病名を日本皮膚科学会学術委員会で検討し、他科と統一させる。

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）

CHCC2012年に準拠して血管炎症例（50症例）を分類し、臨床・病理組織の編集を行う。汎用性の高いエクセルを用いて臨床データと、バーチャルスライドとして取り込んだ病理組織をハイパーリンクで連結する。

既刊「難治性血管炎診断の手引き」（金原出版、2011年）を全面改訂し、血管炎、症候性血管炎、鑑別疾患に関する最新版の「診療の手引き」を刊行する。

C. 研究結果

1. 血管炎データベース

CHCC2012年で提唱された病名をもとに症例を分類し、臨床データ（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）リストを作成した。さらに、エクセルのハイパーリンクを用いて、臨床写真および病理組織所見バーチャルスライドと連結させた（図1）。

2. 血管炎診療の手引きの刊行

収集した症例からCHCC2012年の新病名に準拠して、典型例や鑑別すべき疾患などを選び出した。新病名に沿って診断の手引きを組み替え、病理組織所見をさらに充実させた（図2）。すでに校了しており、平成26年2月に上梓の見込みである。

3. CHCC2012年新病名の和訳承認

提示されていたCHCC2012年新病名の和訳を日本皮膚科学会学術委員会にて承認し、他科と統一された病名を用いる準備が完了した。日本皮膚科学会会員に周知する。

D. 考察

血管炎・血管障害の臨床・病理所見についてのデータベースを作成した。本データベースは、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期待される。データの有効活用と、更なる症例集積が今後の研究課題である。

皮膚病変は血管炎診断に重要である。日常診療に役立つ血管炎の皮膚症状とその病理所見を診療の手引きとして編集した。

血管炎の新病名に対応する和文病名を日本皮膚科学会として承認し併とによって、他科で用いられる病名と齟齬が生じない。

E. 結論

皮膚血管炎の臨床・病理所見に関するデータベース作成し、診療の手引きを刊行し

た。統一された病名を日本皮膚科学会として承認した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表（平成25年度）

1. Iwatsuki K, Nakayama Y, Hamada T, Nakanishi G, Shirafuji Y, Morizane S. : Immunological and structural remodeling in human papillomavirus-induced warts and Bowen disease, *Eur J Dermatol,suppl.23,2*, 25-30,2013.
2. Iwatsuki K, Hamada T, Japan Skin Cancer Society-Lymphoma Study Group.Current therapy of choice for cutaneous lymphomas: complementary to the JDA/JSCS guidelines. *J Dermatol*, 2014,in press.
3. Kamiya K, Aoyama Y, Shirafuji Y, Hamada T, Morizane S, Fujii K, Iwatsuki K.A higher correlation of the antibody activities against the calcium-dependent epitopes of desmoglein 3 quantified by ethylenediaminetetraacetic acid-treated enzyme-linked immunosorbent assay with clinical disease activities of pemphigus vulgaris. *J Dermatol Sci*2013; 70: 190-195.
4. Imai Y, Aochi S, Iwatsuki K, Sano H, Yamanishi K. YKL-40 is a serum biomarker reflecting the severity of cutaneous lesions in psoriatic arthritis. *J Dermatol*. 2013; 40; 294-6.
5. Kurosawa M, Takagi A, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Yokoyama K, Kitajima Y, Aoyama Y, Iwatsuki K, Ikeda S. Epidemiology and clinical characteristics of bullous congenital ichthyosiform erythroderma

(keratinolytic ichthyosis) in Japan: results from a nationwide survey. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68:278-83.

6 . 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.* 2013;40:2-14.

7 . Yamasaki O, Shibata H, Suzuki N, Ikeda K, Takeshima C, Otsuka M, Aoyama Y, Iwatsuki K. Granulocyte colony-stimulating factor-producing squamous cell carcinoma of the skin associated with epithelial-mesenchymal transition, *EJD*, 23, 3, 413-414, 2013.

8 . 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.* 2013; 93:110-1.

9 . Kamiya K, Aoyama Y, Kawase K, Schmidt E, Zillikens D, Kitajima Y, Iwatsuki K. Case of subepidermal blistering disease with autoantibodies to both laminin- γ 1 and laminin- α 3. *J Dermatol.* 2013 [Epub ahead of print]

10. Kamiya K, Yamasaki O, Tachikawa S, Iwatsuki K. Localized cutaneous argyria in a silversmith. *Eur J Dermatol.* 2013; 23 ; 112-3.

11. Nakanishi G, Hasegawa K, Oono T, Koshida S, Fujimoto N, Iwatsuki K, Tanaka H, Tanaka T. Novel and recurrent PORCN gene

mutations in almost unilateral and typical focal dermal hypoplasia patients. *Eur J Dermatol.* 2013 23(1):64-7.

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
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
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

川崎医科大学心臓血管外科 種本和雄

川崎医科大学生理学 I 渡部芳子

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 2001年度から2010年度分の7779例分の高安動脈炎症例臨床調査個人票の検討を進めている。新規登録者は1733例で、毎年の新規登録者数は2004年以降200名前後であった。近年の新規登録者においても、頭頸部病変が多い傾向は不変であった。全7779例のデータを1998年度の報告書と比較すると、白内障と虚血性心疾患を有する比率が増加し、腎動脈狭窄と脳血栓を有する比率は低下していた。治療はステロイド剤の使用率が低下し、免疫抑制剤の使用率が増加していた。プレドニゾロン換算のステロイド剤使用量は1998年度報告書の5mg/日より増加し、中央値7.5mg/日であった。高安動脈炎、巨細胞性動脈炎の新規症例前向き登録は順調に進行している。

A.研究目的

原因、病態などの全貌が明らかになっていない高安動脈炎は、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、都道府県を通じて個人票の形でデータが収集されている。このデータの解析を行い、前向き登録研究の登録状況を検証する。

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、高安動脈炎と巨細胞性動脈炎の新規症例前向き登録を推進する。

C.研究結果

2001年度から2010年度分の調査個人票

7779例分に基づき、合併症と病態変化について解析を行った。前提として、死亡例は翌年の更新手続きがとられないため、本調査票からは死亡の確認はほぼ不可能である。従って、重症度の推移に関する評価には限界がある。

・新規登録者から見た高安動脈炎患者の初期臨床像と経過

期間内に新規登録者が1733例認められた。毎年の新規登録者数は2004年度以降は200名前後であった。発病から登録までの期間（罹患期間）が明らかであったのは1483例で、中央値は1年（最小0年、最大83年）であった。初診から登録までの期間（フォローアップ期間）が明らかであったのは1643例で、中央値は0年（最大58年）であった。死亡の記載は認められなかった。