

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 25 年度 第 2 回班会議

プ ロ グ ラ ム

日時：平成 25 年 12 月 13 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 25 年度第 2 回班会議 プログラム

平成 25 年 12 月 13 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 西嶋 康浩
- II. 研究班の活動報告 10:10~10:40
研究代表者 榎野 博史
- III. 病理・基礎研究分科会 10:40~12:00
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内科学 竹内 勤
- ③ 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
愛媛大学大学院生体統御内科学 長谷川 均
- ④ 平成 25 年度 榎野班研究報告
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
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

昼食 12:00 ~ 13:00

IV. 大型血管炎の臨床研究分科会

13:00~14:20

分科会報告

分科会長 種本 和雄

各個研究報告

① 高安動脈炎臨床調査個人票解析

川崎医科大学心臓血管外科 種本 和雄

② Effects of Immunosuppressive and Biological Agents on Refractory Takayasu Arteritis Patients Unresponsive to Glucocorticoid Treatment

東京医科歯科大学循環器内科 磯部 光章

③ バージャー病患者における FMD 測定の意義に関する検討

名古屋大学大学院血管外科 古森 公浩

④ 難治性高安動脈炎に対する tocilizumab 治療の安全性と有効性について

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 小室 一成

⑤ 高安動脈炎における心臓病変の検討

山口大学医学部地域医療推進学講座 中村 浩士

⑥ 高安動脈炎疾患感受性因子としての HLA および GWAS 研究

京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 吉藤 元

V. 中・小型血管炎の臨床研究分科会

14:20 ~15:30

分科会報告

分科会長 有村 義宏

各個研究報告

- ① 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

- ② 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 (RemIT-JAV)

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

- ③ ANCA 関連血管炎の寛解維持療法に関する前向き観察研究 (Co-RemIT-JAV)

金沢大学附属病院腎臓内科 和田 隆志

- ④ 我が国の好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) の実態と分類・診断基準の妥当性の検討：新たな分類基準の作成の試みーANCA 陰性 EGPA と HES の鑑別について

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

- ⑤ Wegener 肉芽腫症および顕微鏡的多発血管炎の特定疾患臨床個人調査票の調査項目の改訂

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

VI. 国際研究協力分科会

15:30 ~16:40

分科会報告

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

京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター 猪原登志子

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 2013」

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してきた。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た。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 細胞誘導を検討し、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顕微鏡的多発血管炎 (MPA) における好中球細胞外トラップの形成・分解異常を細胞ならびに個体レベルで解析してきた。さらに、ヒト急性大動脈解離の迅速診断法の開発を試み、好中球の血管壁への浸潤機構を検討した。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た。

1) 難治性血管炎における遺伝子解析 (土屋、竹内、石津)

①「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」を含めた多施設共同研究としてゲノム DNA 収集を継続し、サンプルサイズが 322 検体 (MPO-ANCA 陽性 251, PR3-ANCA 陽性 38) にまで増加した。これらの検体を用いて、ヨーロッパ系集団における AAV のゲノムワイド関連研究 (GWAS) においてもっとも顕著な関連が検出されている *HLA class II* 領域について日本人集団における詳細な検討を加えるため、*DRB1*、*DPB1* のアリルタイピングを施行した。その結果、*HLA class II* 領域には、すでに MPO-ANCA 陽性群との関連を報告した *HLA-DRB1*09:01* 以外にも複数の感受性因子、抵抗性因子が存在し、MPO-ANCA 陽性群と PR3-ANCA 陽性群の *HLA class II* 領域における遺伝的背景には、共通性と異質性が存在することが示唆された (土屋)。

②血管炎症候群および関節リウマチ患者、健常者の末梢血からトータル RNA を抽出した後、最新の DNA チップを用いて網羅的に遺伝子発現を検討した。多面的なバイオインフォマティクスアプローチにより血管炎病態に関連する遺伝子群の候補を抽出した。(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 35 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プロテインキナーゼC阻害剤を用いたヒト寛容型樹状細胞を作製し、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)。
- 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 細胞を単離し、本細胞が炎症性サイトカインの産生誘導と炎症抑制性サイトカインの産生低下を介して血管炎の発症に関与し、通常の NKT 細胞とは異なり、糖脂質以外の抗原を認識している可能性を示唆した (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 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示し、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することを明らかにした。また、MPA 患者血清は健常者血清に比較して DNase I 活性と NETs 分解活性が低く、MPA 患者中には抗 NETs 抗体を有する症例が存在することを見出した。これらから、MPA 患者では DNase I 活性が低いいため、感染などを契機に形成された NETs が分解されにくくなり、MPO-ANCA 産生が新たな NETs 形成を誘導し、抗 NETs 抗体の産生による NETs 分解性抑制が生じ、NETs と MPO-ANCA を介した悪循環病態が存在すると推定された (石津)。
- ②抗 MMP9 マウスモノクローナル抗体を用いた迅速イムノテストを開発し、ヒト急性大動脈解離 (AAD) 患者血漿中の MMP9 測定が AAD のスクリーニングテストとして有効かを検討した。その結果、本テストの感度や特異性をさらに改良する必要があると考えられた。また、マウス AAD モデルでの解析から AAD を発症した大動脈で好中球浸潤を誘導するケモカインの産生亢進が示され、ヒト血管内皮細胞での好中球浸潤における分子機構の一部が明らかとなった (岡田)。
- ③Nod1 リガンドで誘導される川崎病類似冠動脈炎においては、Angiopietin/Tie システムが Nod1 リガンド誘発性炎症を負に制御する可能性が示唆された (鬼丸)。

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)。
- ②既刊「皮膚症状からみた血管炎診断の手引き」を、Chapel Hill 2012 に準拠して改訂版している (岩月)。

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、長谷部成美¹、川崎綾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】われわれは、本研究班を中心とする多施設共同研究により、日本人集団における顕微鏡的多発血管炎(MPA)が、東アジア集団にはほぼ特異的に存在する *HLA-DRB1*09:01-DQB1*03:03* ハプロタイプに有意に関連することを、少数検体における解析により報告した(Tsuchiya et al., 2003, Tsuchiya et al., 2006)。一方、ヨーロッパにおける多施設共同研究によるゲノムワイド関連研究(GWAS)では、多発血管炎性肉芽腫症(GPA)およびPR3-ANCA 陽性血管炎群においては *HLA-DP* 領域、MPA およびMPO-ANCA 陽性血管炎群においては *HLA-DR-DQ* 領域に最も強い関連が報告された(Lyons et al., 2012)。また、北米における GPA を対象とした GWAS では、最も強い関連は *HLA-DPA1, DPB1* 領域に観察され、imputation の結果、*HLA-DPB1*04* アリルが強く関連すると報告された(Xie et al., 2013)。

アジア系集団とヨーロッパ系集団における ANCA 関連血管炎(AAV)の疫学的な違いが両集団の HLA class II アリル頻度の違いにより説明しうるか否かを検討するためには、日本人集団における各 AAV 亜群の *HLA class II* の関連研究が必要である。本年度は、共同研究の進展によるサンプルサイズの増加を受け、日本人集団における *HLA-DRB1*09:01* の関連を確認するとともに、これ以外の感受性因子、抵抗性因子の探索を行った。さらに、*HLA-DPB1* の関連研究を施行した。

【方法】今年度新たに収集された試料を含めた MPA 182 例、GPA 53 例、好酸球性多発血管炎性肉芽腫(EGPA) 25 例と健常対照群 598 例を解析した。自己抗体による分類では、MPO-ANCA 陽性 233 例、PR3-ANCA 陽性 35 例であった。xMAP 技術に基づく PCR-SSOP 法により、*HLA-DRB1* および *DPB1* アリルタイピングを行った。

【結果】 MPO-ANCA 陽性群における *HLA-DRB1*09:01* の増加が確認された ($P=2.3 \times 10^{-5}$)。一方、PR3-ANCA 陽性群では *DRB1*09:01* の有意な関連は検出されなかった。一方、陽性率は低いものの、*DRB1*11:01* の増加が MPO-ANCA 陽性群、PR3-ANCA 陽性群のいずれにおいても検出された(それぞれ $P=0.033, 0.008$)。また、*DRB1*13:02* の有意な減少が MPA, GPA 両群において検出された(それぞれ $P=0.0042, 0.006$)。興味深いことに、*DRB1*04:05* は、MPO-ANCA 陽性群では有意な減少($P=0.0037$)を示したのに対し、PR3-ANCA 陽性群では増加傾向を示し、両群間の差は有意差に到達した($P=0.037$)。*HLA-DPB1* 領域においては、PR3-ANCA 陽性群では、ヨーロッパ系集団同様、*DPB1*04:01* の増加傾向が観察されたが、MPO-ANCA 陽性群では有意に減少していた($P=0.048$)。

【結論】 *HLA class II* 領域には *HLA-DRB1*09:01* 以外にも複数の感受性因子、抵抗性因子が存在すること、MPO-ANCA 陽性群と PR3-ANCA 陽性群の *HLA class II* 領域における遺伝的背景には、共通性と異質性が存在す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 同 助教
倉沢 隆彦 同 大学院生

(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、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 合併血管炎を対象とした網羅的発現解析による検討を行った。また当科の RA 合併血管炎例を解析し、生物学的製剤時代における臨床的特徴を明らかにした。平成 24 年度は原発性血管炎症候群にも対象を広げ予備的に網羅的遺伝子解析を行った。平成 25 年度は、例数を増やして新たに解析するとともにバイオインフォマティクスを用い詳細に検討を行うこととした。

(対象および方法) 血管炎症候群 23 例(男性 7、女性 16)、未治療関節リウマチ(RA)20 例(男性 4、女性 16)、健常人コントロール(HC)21 例(男性 5、女性 16)の 3 群合計 64 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 8x60k (ver2.0)チップを用いて、網羅的に遺伝子発現データを取得した。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。さらに GeneSpringGX11.0.2 を用いて Gene Ontology(GO)解析、GenMAPP-MAPP Finder を用いて Pathway 解析を施行した。

(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、血管炎群と健常人が分類される傾向が認められた。(図 1) 発現変動遺伝子の抽出を試みたところ、 $P < 0.05$ を統計学的有意すると HC 群と比較した血管炎群で最も多い 912 プロブが抽出された。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、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。

(考察) 本研究では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。今後未治療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期待される。

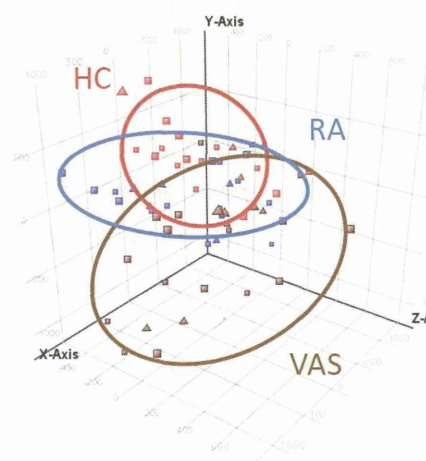


図1 末梢血遺伝子発現プロファイルの主成分分析 3D PCA スコアを 3D 散布図にて表示。
VAS(血管炎 n=23)、RA(関節リウマチ n=20)、
HC(健常人コントロール n=21) △男性、□女性

III-③

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

愛媛大学 血液・免疫・感染症内科学

長谷川均

愛媛大学プロテオサイエンスセンター

武森信暁

【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試みた。

【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) 法によりおこなった。

【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, MMP9 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。現在、内部標準用の安定同位体標識ペプチドと SRM を組み合わせた絶対定量解析システムを用いて、さらに多検体試料 (n=33) による新規マーカー候補のバリデーション解析を進めている。

【結論】 高感度質量分析法を用いた定量プロテオーム解析により、AAV 患者の血清試料に含まれる微量タンパク質 (ng/ml レベル) の治療前後における発現変動プロファイルを明らかにし、活動期および臓器障害に特異的に高い発現を示す新規マーカー候補を同定することに成功した。

III-④

平成 25 年度 榎野班研究報告

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 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ラット血管内皮細胞 (REC) で繰り返し刺激することにより、REC 依存的に増殖亢進を示す T 細胞クローン VASC-1 を樹立した。VASC-1 を野生型ラットに静注することにより小型血管炎が誘導されたことから、VASC-1 は小型血管炎の発症に関わっていると考えられる。VASC-1 は V α 14 と V β 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- γ ⁺ IL-2⁺ IL-4⁺ IL-10⁺ を示した。また、REC と反応し、IL-2、IL-5、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生した。一方、VASC-1 における TGF- β の発現は REC と反応することにより低下した。REC と反応後の炎症性サイトカイン発現は抗 CD1d 抗体により阻害されたが、VASC-1 は α -galactosylceramide を添加した CD1d dimer には結合しなかった。以上より、VASC-1 は REC に反応する invariant な NKT 細胞であり、炎症性サイトカインの産生誘導と炎症抑制性サイトカインの産生低下を介して小型血管炎の発症に関与すると考えられる。また、通常の NKT 細胞とは異なり、糖脂質以外の抗原を認識している可能性が考えられる。

2. 顕微鏡的多発血管炎患者における NETs の形成異常と分解障害

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、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)。また、MPA 患者の血清は健常者の血清に比較して DNase I 活性が低く、NETs 分解活性も低い。さらに、MPA 患者の中には抗 NETs 抗体を有する症例も認められた。すなわち、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さらに NETs が分解されにくい状況となり、NETs と MPO-ANCA 介した悪循環病態が形成されると考えられる。

III-⑤

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

岡田保典 慶應義塾大学医学部病理学教室

昨年度の研究により、ヒト急性大動脈解離 (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。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、本年度の研究では以下の2点について検討した。

(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 イムノテストは、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いる。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 μl 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・EDTA 処理採血管を用いた時のみが有効であった。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 名のうち 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、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 時間にあり、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。培養血管内皮細胞を用いた検討では、ADAM28 は TNF-α や IL-1α 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 は白血球細胞株の固相化 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。

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（平成 25 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

【研究の背景】皮膚血管炎臨床研究において、各症例の臨床データを病理組織所見とともに登録することは貴重な知財となる。

【研究目的】血管炎症例の臨床データを病理組織所見とリンクさせたデジタル化データベースとする。そのデータをもとに代表的血管炎の診断の手引きを刊行する。

【方法】平成 23 年に岡山大学倫理委員会の承認を得て、血管炎症例の臨床像・検査所見を集積し、同時に生検材料の病理組織所見をバーチャルスライドとして取り込む。Chapel-Hill コンセンサス会議(2012)に準拠して、血管炎の診断に役立つアトラス集を刊行する。

【平成 25 年度までの成果】当科における皮膚血管炎の代表的症例（GCA, PAN, GPA, EGPA, MPA, IgA 血管炎, クリオグロブリン血症性血管炎、低補体性蕁麻疹様血管炎など）の基本臨床診療情報、血液検査所見を集積し、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。Chapel-Hill 病名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。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 2012 年の新病名に改訂し、病理組織所見に典型例の写真を加えた。平成 25 年 2 月に改訂版を上梓できる見込みである。

【今後の研究展開】データベースの公開を予定しており、血管炎の臨床、病理の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。

IV. 大型血管炎分科会報告

分科会長：種本 和雄（川崎医科大学心臓血管外科）

研究分担者

磯部 光章（東京医科歯科大学循環器内科）
古森 公浩（名古屋大学大学院血管外科）
小室 一成（大阪大学大学院医学系研究科・循環器内科学）
中村 浩士（山口大学医学部地域医療推進学講座）

研究協力者

小川 誠司（京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学）
井上 芳徳（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科血管・応用外科学）
内田 治仁（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）
岩井 武尚（慶友会 つくば血管センター・NPO 法人バージャー病研究所）
森下 竜一（大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学）
鈴木 淳一（東京大学先端臨床医学開発講座）
中岡 良和（大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学）
宮田 哲郎（山王メディカルセンター 血管病センター）
湊谷 謙司（国立循環器病研究センター心臓血管外科）
佐伯 行彦（独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター 臨床研究部）
吉藤 元（京都大学大学院医学研究科 内科学講座臨床免疫学（免疫・膠原病内科））
渡部 芳子（川崎医科大学生理学1）

大型血管炎部会では、高安動脈炎新規症例の背景、病態、治療法および臨床経過について前向きに登録することによって本疾患の実態を掴む研究を班会議全体の協力を得ながら進めている。また、バージャー病の遺伝子治療臨床試験の再開に向けて準備が進んでいる中で、参加施設での手続きの準備も始めている。

1) 高安動脈炎臨床調査個人票解析（種本、渡部）

2001年度から2010年度分の7779例分の臨床調査個人票の提供を受けて引き続き検討を続けている。期間内の新規登録者は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。全7779例のデータを1998年度の報告書と比較すると、臨床症状では頭部虚血症状と全身症状を有する比率が増加していた。合併症の有病率はほぼ不変であった。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やや増加していた。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/日で新規患者の登録5年後に見られた量と同等であり、これが現在の慢性期の標準的な維持量であると推察された。

2) 大型血管炎（高安動脈炎と巨細胞性動脈炎）寛解導入治療の現状と有効性に関する観察研究（種本、内田）

前向き登録研究として進めているが、現在までに新規症例13例の登録が行われた。

3) ステロイド抵抗性高安動脈炎に対する免疫抑制剤および生物学的製剤の効果 (磯部)

44 例の高安動脈炎患者の中で、ステロイドの初期治療に抵抗性示した患者、およびステロイド減量に伴って再燃を示した患者が 29 例みられた。そのうちステロイド追加治療に反応しなかった 24 例のなかで、22 例に免疫抑制剤が投与された。免疫抑制剤が無効であった 6 例に生物学的製剤が使用された。全体としてステロイド抵抗性および依存性患者の 64% で、ステロイドに加えた免疫抑制剤 and/or 生物学的製剤で寛解を維持することが出来た。

4) バージャー病患者における FMD 測定の意義に関する検討 (古森)

内皮機能の測定法として確立されている%FMD をバージャー病患者に適応して内皮機能の測定を行った。対照として閉塞性動脈硬化症患者に比して有意差がなく、バージャー病患者においても内皮機能が低下していることを示した。

5) 難治性高安動脈炎に対する tocilizumab 治療の安全性と有効性について (小室、中岡)

高安動脈炎難治症例に対して tocilizumab を投与するパイロットスタディを行っていたが、従来の 4 症例に加えて、新たに 7 症例の投与を行い、その効果と安全性について検討を加えた。

6) 高安動脈炎における心臓病変の検討 (中村)

実験的に CD69 欠損マウスに Cocksachie B3 ウイルスを腹腔内接種して大型血管炎モデルを作成し、大動脈および心臓の組織学的検討を行い、心臓および血管周囲に起こった炎症性細胞浸潤像について報告している。

7) 高安動脈炎疾患感受性因子としての HLA および GWAS 研究 (吉藤)

高安動脈炎 173 例を集積し、HLA 解析により病態に自己免疫機序が関与することを示唆する新しい知見を得ている。また、多施設共同研究により高安動脈炎 379 例のゲノムワイド研究 (GWAS) を行い、高安動脈炎疾患感受性因子を同定した。さらにこのリスクアレルと臨床像との関連についての関連も示した。

IV-①

高安動脈炎臨床調査個人票解析

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

2001年度から2010年度分の臨床調査個人票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（最小0年、最大58年）であった。死亡の記載は認められなかった。

新規登録者の登録までの罹患期間

1. 患者の初期臨床像

このうち登録までの罹患期間が1年以内であった879例を抽出し、初回登録時の症状の分析を行った。無記入（欠測）の欄は「なし」と見なして集計した。平成10年度報告書における初発症状との比較を行った。

結果は表に示した。平成10年度のデータと比較し、眼症状を除くほぼ全ての症状について有症状率が増加していた。平成10年度のデータは「初発症状」であるため、この度の初回登録時より症状が軽度である可能性、ならびに「初発症状」は文字記入であるため項目を網羅できていなかった可能性が考えられた。初回登録時の傾向としては、以前からの報告どおり頭部・上肢の症状が高率であった。また、登録時には半数以上の症例において全身症状（発熱・全身倦怠感・易疲労感）を有していた。心症状と呼吸器症状を有する比率は「タイプ」にて冠動脈病変ならびに肺動脈病変を有する比率と同等であった。初回登録時の合併症として、最多は高血圧で約30%に、次いで大動脈弁閉鎖不全症が約25%に、大動脈瘤が14%に、眼症状と脳虚血発作が11%に認められた。

2. 臨床像の経過

これらの880例の登録後追跡期間は、中央値1年（最短0年—最長10年）であった。この中から追跡期間が5年以上得られた156例を抽出し、それぞれの最終の更新書に基づき、症状、合併症、および重症度の変化を検討した。最終更新時においては、全身症状と頭痛を有する比率は著明に減少し、上肢症状も減少傾向であった。これらは薬物によって軽快が得られやすい症状であると考えられた。その他の症状は不変かやや減少であった。合併症は、高血圧を除く全ての項目で減少した。内科的治療はステロイドの一日使用量が減少し、抗凝固療法と免疫抑制剤の使用率が増加していた。観血的治療を受けたものが32例（20.5%）、そのうち手術を受けたものが28例（17.9%）、血管内治療を受けたものが6例（3.8%）認められた。重症度は軽症化が25.8%、不変が63.3%、重症化が10.8%認められた。重症化したのは初診時の重症度が1ないし2であった例で、初診時の重症度が3以上であ

った例は過半数が改善を示した。観血的治療を受けたものにおいては悪化は1例のみで、他は不変ないし改善であった。

今後、経過の悪化・改善の関連要因については更に検討を重ねる予定である。

全例データから見た我が国の高安動脈炎患者の臨床像の現状

次に、全7779例の最終更新時の調査票に基づき、慢性期を含めた我が国の高安動脈炎患者の症状、合併症の現状についてまとめた。無記入（欠測）の欄は「なし」と見なして集計した。平成10年度報告書と比較し、臨床症状では頭部虚血症状と全身症状を有する比率がやや増加していた。合併症の有病率はほぼ不変であった。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やや増加していた。プレドニゾロン換算のステロイド剤使用量は、平成10年度報告書の5mg/日より増加し、中央値7.5mg/日で新規患者の登録5年後にみられた量と同等であり、これが現在の慢性期の標準的な維持量であると推定された。重症度分類の分布は2度が約40%で、その他も含め平成10年度報告書とほぼ同様であった。

死亡の記載があったのは僅か13例であった。死因は不明で推定も困難であったが、手術関連の死亡は無いと推定された。重症度が低い高齢者（症例3, 4, 6, 12など）では、非関連死亡の可能性も考えられた。重症度4, 5にも拘らずステロイドも免疫抑制剤も使用記載がなく白血球も低値の(9, 10)症例では、後遺症の血管病変や本症以外の原因による死亡も考えられた。

IV-②

Effects of Immunosuppressive and Biological Agents on Refractory Takayasu Arteritis Patients Unresponsive to Glucocorticoid Treatment

東京医科歯科大学循環器内科 磯部光章、大東寛和、前嶋康浩、田村夏子
同薬害監視学講座 針谷正祥

Background: We aimed to investigate the effects of immunosuppressive and biological agents on refractory Takayasu arteritis (TA) patients resistant to or dependent on glucocorticoids.

Methods and Results: Forty-four consecutive TA patients were enrolled, and the clinical characteristics and effectiveness of the immunosuppressive and biological agents in achieving and maintaining remission among glucocorticoid-resistant or glucocorticoid-dependent patients were investigated. Fifteen patients showed favorable response to the initial glucocorticoid treatment, and 29 patients exhibited resistance to initial glucocorticoid treatment or relapsed with tapering glucocorticoid. Of the 29 patients, 5 responded to additional glucocorticoid treatment, and 22 of the remaining 24 glucocorticoid-resistant or glucocorticoid-dependent patients were prescribed immunosuppressive agents. Methotrexate was the most commonly used in these patients as the first-line treatment. In total, 10 patients maintained remission using immunosuppressive agents, with the effectiveness of each agent about 20%. The only significant difference between patients who were and were not able to achieve and maintain remission with immunosuppressive agents was the presence of the HLA-B52 allele ($p < 0.0001$). Biological agents were administered to 6 patients refractory to immunosuppressive agents. All patients were administered TNF inhibitors as the first-line treatment, and 3 patients maintained remission. Anti-IL-6 receptor antibody was administered to 2 patients who were resistant to the TNF inhibitors, and 1 patient achieved and maintained remission.

Conclusion: In our cohort, 64% of the glucocorticoid-resistant or glucocorticoid-dependent patients maintained remission through a combined treatment with glucocorticoid, immunosuppressive agents, and/or biological agents. The combined use of immunosuppressive and biological agents appears to be promising treatment options for achieving and maintaining remission in refractory TA patients.

IV-③

バージャー病患者における FMD 測定の意義に関する検討

名古屋大学大学院血管外科 杉本 昌之、古森 公浩

【目的】

バージャー病患者では内皮依存性の血管拡張反応の低下が患肢以外の末梢血管においても報告されているが、病態との関連は不明である。近年、非侵襲的な血管内皮機能の評価法である血流依存性血管拡張反応 (FMD; flow mediated dilation) が簡便に測定可能となった。FMD は ASO などの動脈硬化性疾患患者においては有用性が確立され、現在、保険適応ともなった。その一方でバージャー病患者では FMD 測定の意義は明らかになっていない。今回、バージャー病患者における FMD 測定の意義・有用性について検討した。

【対象と方法】

1980～2012 年に重症虚血症状 (潰瘍・壊死) にて当科入院し、現在も定期通院中のバージャー病患者 (B 群; N=15) において、%FMD、血流増大率を測定・評価した。有症状 (Fontaine II 度以上) の ASO 患者 (A 群; N=15) を対照とした。

【結果】

平均年齢は B 群で 62.5 ± 11.5 歳 [44-78]、A 群 68.0 ± 4.9 歳 [61-80]。両群間で平均 %FMD に有意差を認めなかった。高齢バージャー病患者では ASO のリスク因子の合併が多く、%FMD の低下はその影響も考えられた。一方、ASO のリスク因子を持たない若年患者においても %FMD は低値であり、バージャー病においても全身性の内皮機能障害を FMD 測定によって評価することが可能と考えられた。ASO のリスク因子を持たない高齢のバージャー病患者では、虚血症状が長期寛解していても %FMD は低値のままであった。病勢と %FMD 測定値の相関については今回の調査では明らかにできなかった。

【結論】

FMD 測定は 1) 非侵襲的な検査であること、2) Systemic な評価であり測定対象が患肢に限らないこと、3) 従来の各種診断基準には含まれていない機能的な評価であること、が長所である。今回はサンプル数も少なく予備的試験の域を出ないものの、FMD 測定はバージャー病診断の有用な補助手段となる可能性があると思われた。

IV-④

難治性高安動脈炎に対する tocilizumab 治療の安全性と有効性について

研究分担者 東京大学大学院医学系研究科循環器内科学 小室 一成

研究協力者 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 中岡 良和

(背景と目的) 高安動脈炎の治療はステロイドが第一選択で使用されるが、一時的に寛解に至ってもその減量過程で再燃が多く見られ、ステロイド治療抵抗性の難治性症例に対する治療法は未だ未確立である。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 (TCZ) 治療を 2008 年から 2012 年にかけて 4 症例に対して 2 年以上投与して、その安全性と有効性を示唆する結果を得ている (Nakaoka et al. Nakaoka et al. *Int Heart J. in press*)。今回、難治性高安動脈炎患者でより多くの症例に対して TCZ 治療を施行して、その安全性と有効性を検討した。

(方法と結果) 2012 年 4 月以降にステロイド治療抵抗性を示す高安動脈炎患者に対して TCZ (8mg/k g/月) を 2 年間継続投与することとした。症例は上記パイロットスタディの継続症例が 2 症例(女性 2 名、年齢は 20 歳~22 歳)、今回新規に TCZ を開始した症例が 7 症例 (女性 7 名、年齢は 18 歳~58 歳)。新規症例ではいずれの症例でもプレドニゾロンに加えて免疫抑制剤が TCZ 治療開始前に用いられていた。継続症例 2 例では特に重篤な副作用は観察中に見られず、依然として寛解が維持されている。また新規投与症例のうち 1 例では、TCZ 投与開始後 1 カ月で重篤な下血がみられ、その原因はその後の治療経過からは TCZ との因果関係は否定的であった。それ以外の症例では重篤な副作用は何れも観察されなかった。新規投与症例のうち 1 例では合併症として両側腎動脈狭窄による腎血管性高血圧の合併が見られ、ステロイドと他の免疫抑制剤併用では腎血管形成術後の再狭窄が 2 回繰り返し見られたが、TCZ 開始後には再狭窄は観察されず、降圧剤の使用量も TCZ 治療継続とともに著明な減量に成功した。

(結語) 難治性高安動脈炎に対する TCZ 治療は安全に施行することが可能である。また、腎血管性高血圧で再狭窄を繰り返す症例で有効性があると期待出来る。今後、更に多くの症例で TCZ の安全性と有効性を検討することで医師主導型治験等へ展開する必要がある。