

201324007B

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）

難治性血管炎に関する調査研究
平成23～25年度総合研究報告書

平成26年(2014年)3月

研究代表者

榎野博史

目 次

I. 平成23～25年度構成員名簿	5
II. 総合研究報告	7
23～25年度総合研究報告書	9
槇野博史（岡山大学大学院医歯薬総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学）	
・基礎・病理研究分科会	11
分科会長 岡田保典（慶應義塾大学医学部病理学）	
・大型血管炎臨床研究分科会	21
分科会長 種本和雄（川崎医科大学心臓血管外科学）	
・中・小型血管炎臨床研究分科会	27
分科会長 有村義宏（杏林大学医学部第一内科）	
・国際研究協力分科会	33
分科会長 藤元昭一（宮崎大学医学部医学科血液・血管先端医療学講座）	
III. 学会発表	39
IV. 平成23年～25年度研究成果に関する刊行物一覧	53

I. 平成 23～25 年度構成員名簿

難治性血管炎に関する調査研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	楨野 博史	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	教 授
研究分担者	岡田 保典	慶應義塾大学医学部病理学	教 授
	種本 和雄	川崎医科大学心臓血管外科	教 授
	有村 義宏	杏林大学医学部第一内科(腎臓・リウマチ膠原病内科)	教 授
	藤元 昭一	宮崎大学医学部医学科血液・血管先端医療学講座	教 授
	鈴木 和男	帝京大学 医学部附属病院安全管理部	教 授
	石津 明洋	北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学	教 授
	土屋 尚之	筑波大学医学医療系分子遺伝疫学	教 授
	長谷川 均	愛媛大学大学院医学系研究科血液・免疫・感染症内科学	准 教 授
	岩月 啓氏	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学	教 授
	竹内 勤	慶應義塾大学医学部リウマチ内科	教 授
	磯部 光章	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科循環制御内科学	教 授
	古森 公浩	名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻病態外科学講座血管外科学	教 授
	小室 一成	東京大学大学院医学系研究科循環器内科学	教 授
	中村 浩士	山口大学医学部地域医療推進学講座	准 教 授
	小櫃由樹生	国際医療福祉大学三田病院血管外科	教 授
	和田 隆志	金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学	教 授
	針谷 正祥	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科薬害監視学	教 授
	藤井 隆夫	京都大学大学院医学研究科リウマチ性疾患制御学講座	准 教 授
	天野 宏一	埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科	教 授
	佐田 憲映	岡山大学病院腎臓・糖尿病・内分泌内科	講 師
	高崎 芳成	順天堂大学医学部膠原病内科学講座	教 授
	本間 栄	東邦大学医学部内科学講座呼吸器内科学分野	教 授
	伊藤 聡	新潟県立リウマチセンターリウマチ科	副 院 長
山田 秀裕	聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科学	教 授	
土橋 浩章	香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科	講 師	
小林 茂人	順天堂大学医学部附属順天堂越谷病院内科学	教 授	
平橋 淳一	東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科	助 教	
濱野 慶朋	東京都健康長寿医療センター 腎臓内科	腎臓内科部長	
猪原登志子	京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター 早期臨床試験部	特 定 助 教	
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講座	助 教
	澤井 高志	岩手医科大学医学部病理学講座	教 授
	菅野 祐幸	信州大学医学部病理組織学講座	教 授
	池田 栄二	山口大学大学院医学系研究科情報解析医学系専攻病理形態学分野	教 授
	小川 誠司	京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学	教 授
	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	講 師
	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	助 教
	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	所 長
	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	教 授
	鈴木 淳一	東京大学先端臨床医学開発講座	准 教 授
	中岡 良和	大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学	助 教
	宮田 哲郎	国際医療福祉大学臨床医学研究センター	教 授

湊谷 謙司	国立循環器病研究センター心臓血管外科	部 長
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	臨床研究部長
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	助 教
渡部 芳子	川崎医科大学生理学1	特任講師
渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科免疫・代謝内科学	講 師
臼井 丈一	筑波大学医学医療系臨床医学域腎臓内科学	講 師
小川 法良	浜松医科大学第三内科	講 師
川上 純	長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科医療科学専攻・展開医療科学	教 授
黒崎 敦子	公益財団法人結核予防会 複十字病院 放射線科	部 長
黒沢美智子	順天堂大学医学部衛生学	准 教 授
駒形 嘉紀	杏林大学・第一内科	准 教 授
坂野 章吾	愛知医科大学腎臓・リウマチ膠原病内科	教 授
中野 正明	新潟大学医学部 保健学科 臨床生体情報学	教 授
中屋 来哉	岩手県立中央病院腎臓内科	医 長
林 太智	筑波大学 医学医療系 内科（膠原病・リウマチ・アレルギー）	准 教 授
速水 芳仁	名古屋市立大学病院腫瘍・免疫内科学	講 師
難波 大夫	名古屋市立大学病院腫瘍・免疫内科学	准 教 授
武曾 恵理	公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科	センター長
村川 洋子	島根大学医学部内科学講座内科学第三内科	准 教 授
山村 昌弘	岡山済生会総合病院内科	診 療 部 長
吉田 雅治	東京医科大学八王子医療センター	教 授
涌井 秀樹	秋田大学医学部血液・腎臓・膠原病内科学	准 教 授
小松田 敦	秋田大学医学部血液・腎臓・リウマチ内科	准 教 授
栗原 泰之	聖マリアンナ医科大学放射線医学	准 教 授
原 章規	金沢大学附属病院救急部	助 教
北川 清樹	金沢医療センター 腎・高血圧・膠原病内科	医 師
遠山 直志	金沢大学附属病院集中治療部	特 任 助 教
川端 雅彦	富山県立中央病院 腎・高血圧内科	部 長
竹田 慎一	黒部市民病院	副 病 院 長
杉原 毅彦	東京都健康長寿医療センター・膠原病・リウマチ内科	副 部 長
川口 鎮司	東京女子医科大学リウマチ膠原病内科	准 教 授
本間 則行	新潟県立新発田病院内科	診 療 部 長
杉山 晃一	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	客員研究員
高橋 啓	東邦大学医療センター大橋病院病理部	教 授
湯村 和子	国際医療福祉大学病院 予防医学センター・腎臓内科	教 授
原渕 保明	旭川医科大学・耳鼻咽喉科	教 授
中島 裕史	千葉大学大学院医学研究院免疫発生学・炎症制御学	教 授
内田 俊也	帝京大学医学部内科	教 授
伊藤 千春	自治医科大学腎臓内科	講 師
岩本 逸夫	国保旭中央病院アレルギー・リウマチセンター	センター長
古田 俊介	千葉大学医学部附属病院臨床試験部	助 教

Ⅱ. 総合研究報告

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）
総括研究報告書

難治性血管炎に関する調査研究

研究代表者 槇野 博史

岡山大学大学院医歯学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 教授

研究要旨

血管炎の病因・病態の究明は依然として進展しておらず、しばしば重要臓器の障害をもたらすが有効な治療法は確立されていない。本研究班は、中小型血管炎分科会・大型血管炎分科会・病理基礎分科会・国際研究協力分科会の4つの分科会で構成して研究を行った。

中小型血管炎分科会では、2つの前向きコホート研究を行った。また、すでに終了したRemIT-JAV研究の解析からわが国のANCA関連血管炎患者の特徴と明らかにした。また好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の診断における問題点も明らかにし、臨床調査個人票の改訂にも取り組んだ。最終的にこれまでの研究成果を基にANCA関連血管炎の診療ガイドラインの改訂を行った。

大型血管炎分科会では、高安動脈炎の臨床調査個人票を用いた疫学的な検討を行い大型血管炎の新規症例を対象とした前向きコホート研究を開始した。高安動脈炎については遺伝学的検討に加え、評価方法・新規治療に関する検討を行った。さらに新たな大型血管炎の動物モデルを作成した。

基礎・病理分科会では、血管炎に関する感受性遺伝子異常、免疫異常による血管炎発症、血管炎の確立と組織内微小環境の変化・破綻、動脈壁の破壊と臨床症状の出現について検討を行った。全面改訂された「皮膚症状からみた血管炎診断の手引き」と進行中の「血管炎症例の病理所見と臨床所見のレポジトリ」は、難治性血管炎の臨床に役立つことが期待される。

国際研究協力分科会では原発性全身性血管炎の分類・診断基準作成のための研究、血漿交換療法に関する介入研究、リツキシマブの維持療法に関する介入研究など多くの国際共同研究へ参加するための体制を構築しわが国からも多くの施設が研究に参加することが可能となった。また国際的な比較研究からわが国のANCA関連血管炎患者の特徴も明らかにした。

研究分担者

有村義宏（杏林大学第一内科・教授），岡田保典（慶應義塾大学医学部病理学・教授）、種本和雄（川崎医科大学心臓血管外科・教授），藤元昭一（宮崎大学医学部医学科血液・血管先端医療学講座・教授），石津明洋（北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学・教授），土屋尚之（筑波大学医学医療系分子遺伝疫学・教授），長谷川均（愛媛大学大学院医学系研究科血液・免疫・感染症内科学・准教授），岩月啓氏（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学・教授），竹内勤（慶應義塾大学医学部リウマチ内科学・教授），磯部光章（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科循環制御内科学・教授），古森公浩（名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻病態外科学講座血管外科学・教授），小室一成（東京大学大学院医学系研究科循環器内科学・教授），中村浩士（山口大学医学部地域医療推進学講座・准教授），針谷正祥（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科薬害監視学・教授），藤井隆夫（京都

大学大学院医学研究科リウマチ性疾患制御学講座・准教授），和田隆志（金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学・教授），天野宏一（埼玉医科大学総合医療センターリウマチ・膠原病内科・教授），高崎芳成（順天堂大学医学部膠原病内科学講座・教授），山田秀裕（聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科学・教授），本間栄（東邦大学医学部内科学講座呼吸器内科学分野・教授），土橋浩章（香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科・講師），伊藤聡（新潟県立リウマチセンターリウマチ科・副院長），小林茂人（順天堂大学医学部付属順天堂越谷病院内科学・教授），平橋淳一（東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科・助教），濱野慶朋（東京都健康長寿医療センター腎臓内科・腎臓内科部長），猪原登志子（京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター早期臨床試験部・特定助教），佐田憲映（岡山大学病院腎臓・糖尿病・内分泌内科・講師）

基礎・病理研究分科会

分科会長	岡田保典	慶應義塾大学医学部病理学	教授
研究分担者	土屋尚之	筑波大学医学医療系分子遺伝疫学	教授
	竹内 勤	慶應義塾大学医学部リウマチ内科学	教授
	石津明洋	北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学	教授
	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
	岩月啓氏	岡山大学大学院医歯薬総合研究科学皮膚科学	教授
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	助教
	池田栄二	山口大学大学院医学系研究科病理形態学	教授
	菅野祐幸	信州大学医学部病理組織学講座	教授
	澤井高志	岩手医科大学病理学教室	教授

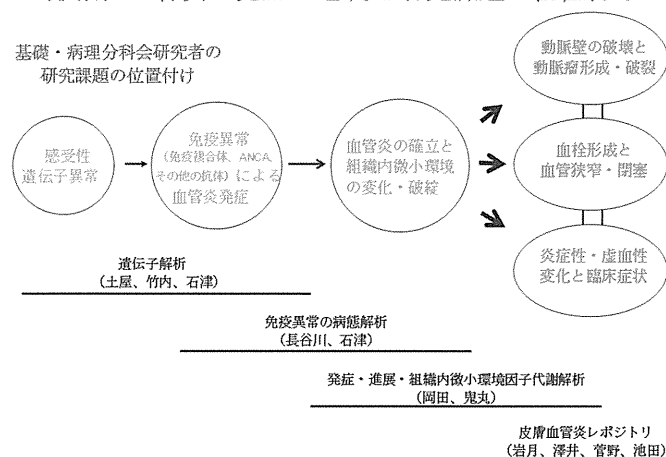
A. 研究目的

基礎・病理研究分科会は、血管炎の病因・病態を究明するとともに、それらに基づいて診断・治療法（臨床応用）の開発を目指すことを目的として本分科会を構成してきた。このため、血管炎に関する感受性遺伝子異常、免疫異常による血管炎発症、血管炎の確立と組織内微小環境の変化・破綻、動脈壁の破壊と臨床症状の出現の各ステップについて、血管炎の先端的研究に取り組む研究者を配置することで研究に取り組んできた（下図）。(1)難治性血管炎における遺伝子解析、(2)難治性血管炎の病態解析、(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、(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の4研究項目のもと、相互に連携を取りながら2011年～2013年の3年間にわたり研究してきた。

具体的な研究プロジェクトとしては、日本人集団におけるANCA関連血管炎(AAV)

の疾患感受性や臨床経過に関連する遺伝子を見出し、ゲノムワイド関連研究に向けての試料収集を行うとともに、患者末梢血の網羅的遺伝子発現解析による遺伝子診断法開発、絶対定量プロテオーム解析システムや小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を利用した自己抗原ライブラリーからのバイオマーカー同定と新規自己抗原の検索を行った。また、自己血管内皮細胞反応性NKT細胞による血管炎誘導機構と種々の原因による好中球細胞外トラップ(NETs)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とともに、動脈瘤や急性大動脈解離(AAD)の形成と動脈壁破壊に関わるマトロプロテアーゼ(MMPとADAM)分子の作用機構を解析した。さらに、皮膚血管炎症例の臨床所見と病理所見のデジタル化データベースを作成し、既刊「皮膚症状からみた血管炎診断の手引き」の改訂を行ってきた。

難治性血管炎の発症・進展と研究課題の位置付け



B. 研究方法

①日本人集団における AAV の疾患感受性遺伝子解析においては、日本人 AAV 271 症例 (MPA 182、GPA 53、EGPA 25 例、分類不能血管炎 11 例) および日本人健常対照群 598 例を対象とした。ANCA の特異性別の分類では、MPO-ANCA 陽性 231 例、PR3-ANCA 陽性 35 例であった。HLA-DPB1 については、MPA 90 例、GPA 50 例、健常対照群 265 例の解析を行った。ANCA 特異性別の分類では、MPO-ANCA 125 例、PR3-ANCA 29 例であった。HLA 遺伝子型は、xMAP 技術に基づく PCR-SSOP 法(WAK-Flow)により決定し、関連研究を施行した。また、日本人 MPO-ANCA 陽性 AAV 232 例および健常対照群 710 例を対象に、TaqMan SNP genotyping assay を用いて遺伝子型を決定し、関連研究を施行した。(土屋)

②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。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 解析、GenMAPP-MAPP Finder を用いて pathway 解析を施行した。(竹内)

③JMAAV 試験に登録された 48 名の患者から、治療前および治療開始 1 週後の時点で末梢血から RNA を抽出し、治療前後で発現変化を示す遺伝子を網羅的に解析し、治療反応性と関連する遺伝子 30 個を抽出した。さらに、重回帰分析法を用いて、治療反応性を最も精度高く予測する遺伝子セットの同定を

進めた。(石津)

④末梢血 CD14 陽性細胞を GM-CSF や IL-4 を加えて培養することで未熟樹状細胞(DCs)を作製し、TNF- α 、IL-1 β 、PGE2 の成熟誘導カクテル刺激により成熟 DCs を誘導した。この成熟過程においてプロテインキナーゼ C 阻害剤(PKCI)を加えて免疫寛容樹状細胞 (tDCs) を誘導し、その表現型と機能について解析した。また、本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) をプロテアーゼ (トリプシン/Lys-C) 消化後、タンデム MS 解析によりタンパク質を同定し、3 連四重極型 MS を用いた Selected reaction monitoring 法で治療前後における比較定量解析を行った。(長谷川)

⑤ANCA 非依存性の中・小型血管炎を発症する env-pX ラットをラット培養血管内皮細胞 (REC) で免疫し、リンパ節細胞から REC に反応する T 細胞クローンを樹立し、VASC-1 と名付けた。VASC-1 と REC の共培養下における活性化を細胞表面分子やサイトカイン産生誘導を指標として調べ、REC による VASC-1 活性化における CD1d の関与と CD1d ダイマーに提示された α -galactosylceramide の結合を特異抗体による阻害実験とフローサイトメトリーにより解析した。また、健常者の好中球に PMA とともにプロピルチオウラシル (PTU) を添加して NETs の形態ならびに DNase I による分解を検討し、ラットを用いて NETs による免疫あるいは PTU 内服と PMA 腹腔内投与の組み合わせで MPO-ANCA 産生と血管炎誘導を観察した。さらに、健常者好中球に MPA 患者血清 (n=38)、SLE 患者血清 (n=23)、健常者血清 (n=8) 由来 IgG を添加して NETs 形成の変化を検討するとともに血清中 DNase I 活性を比較した。(石津)

⑥ヒト大動脈瘤と正常大動脈について CD68、CD31、VEGF-A、ADAM17 の免疫組織染色を行うとともに VEGF-A と ADAM17 についてはウエスタンブロット法で比較・検討した。また、CaCl₂ 塗布によるマウス腹部大動脈瘤モデルを作製し、VEGF-A と ADAM17 の腹部大動脈瘤発生・病態における役割を検討した。さらに、本モデルマウスに可溶性 VEGF-A 受容体 (sFlt-1) を投与し、大動脈瘤発生における VEGF-A の役割について検証するとともに、ADAM17 コンディショナルノックアウトマウスで同モデルを作製し、大動脈瘤形成における ADAM17 の役割を検討した。(岡田)

⑦AAD、非破裂性慢性大動脈瘤、急性心筋梗塞の各患者と健常者の MMP1, 2, 3, 9 や angiotensin II (AngII) 血中レベルを ELISA 系で測定するとともに、AAD と非破裂性慢性大動脈瘤患者の大動脈血管検体について MMP9、好中球エラスターゼ、CD68 の局在を免疫組織染色により検討した。また、カラーゲンやエラスチン架橋阻害物質の β -aminopropionitrile monofumarate (BAPN) を幼若マウスに投与後 Ang II 皮下持続投与により AAD モデルを作製し、大動脈組織における MMP9 と好中球の局在、MMP9 活性検出、dihydroethidium (DHE) 染色による proMMP9 活性化への関与を調べ、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 遺伝子ノックアウトマウスでの AAD 発症に対する効果を検討した。さらに、マウス AAD 大動脈における好中球とマクロファージ浸潤、IL-1、IL-6、TNF- α 、CXCL1、CXCL2、CCL2 発現を定量的に測定した。(岡田)

⑧AAD大動脈、白血球破碎血管炎の皮膚、

虫垂炎、胆嚢炎の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 の局在を検討するとともに、ヒト血管内皮細胞株 (HUVEC) での TNF- α 、IL-1、VEGF、bFGF、TGF- β 、PMA 処理後の ADAM28 の mRNA 発現を real-time PCR で検討した。(岡田)

⑨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、イムノテストプレート上にコントロールとして 150 ng/ml と 450 ng/ml の MMP9 濃度に相当する反応線を設置した迅速 MMP9 イムノテストを開発した。本テストでは、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、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。血漿検体 (合計 19 症例) 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。(岡田)

⑩HUVEC を Angiopoietin-1 (Ang-1)、Nod1、Ang-1+Nod1 存在下で培養し、real-time PCR 法で MCP-1、E-selectin、ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現量を定量し、比較・検討した。(鬼丸)

⑪血管炎症例 (50 例) の臨床・検査・病理所見を収集し、Chapel Hill コンセンサス会議 2012 年で提唱された新病名に準拠して分類し、臨床・病理組織の編集を行った。病理組織所見はバーチャルスライドとして取り込み、エクセルを用いて臨床データと病理組織所見をハイパーリンクで連結した。(岩月)

C. 倫理面への配慮

ヒト検体や臨床情報については、各施設に設置された倫理委員会において承認を受け、同意書を取得して実施した。剖検病理組織標本に関しては、解剖承諾書で研究利用に同意をいただいた症例の病理組織標本を使用することを倫理委員会において承認を受けて行った。多施設共同研究により提供を受けて連結不可能匿名化された試料については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、「遺伝子研究の同意を得た既収集匿名検体」として使用する研究計画を当該施設のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会に諮り、承認を受けて実施した。動物実験に関しては、各施設における承認を受けて動物実験指針に準拠して行った。（詳細は各分担者報告の項参照）

D. 研究結果

1) 難治性血管炎における遺伝子解析

①ヨーロッパ系集団におけるゲノムワイド関連研究(GWAS)により、GPA、PR3-ANCA陽性群とMPA、MPO-ANCA陽性群においてはHLA-DP領域とHLA-DQ領域がそれぞれ最大の遺伝因子であることが示され、HLA領域の重要性が再認識されてきた。本研究では、横断的な多施設共同研究の進展により日本人集団におけるAAV検体の増加を受け、HLA-DRB1領域におけるHLA-DRB1*09:01以外の感受性アリルと抵抗性アリルを検討した結果、MPA、MPO-ANCA陽性AAVにおけるHLA-DRB1*09:01の顕著な関連が確認された。一方、PR3-ANCA陽性AAVにおいては関連の傾向は認められなかった。GPA群においてもMPO-ANCA陽性群ではHLA-DRB1*09:01の増加が認められたが、

PR3-ANCA陽性群では増加が認められなかった。さらに、HLA-DRB1*13:02がMPO-ANCA陽性AAV、PR3-ANCA陽性AAVいずれにおいても抵抗性に関連することが明らかになった。また、HLA-DRB1*11:01がMPO-ANCA陽性AAVの第二の感受性アリルであるとともに、PR3-ANCA陽性AAVとも関連する可能性が示唆された。一方、HLA-DPB1については、ヨーロッパ系集団におけるGPA感受性アリルと報告されているHLA-DPB1*04:01が、MPO-ANCA陽性AAVにおいて有意に減少していた。（土屋）

②日本人集団におけるAAVの疾患感受性遺伝子解析として、複数の自己免疫疾患、膠原病との関連が確立したIRF5、STAT4の一塩基多型(SNP)を対象に、関連研究を施行した。IRF5の3'非翻訳領域に位置し、poly Aシグナルを置換することにより、IRF5のmRNAレベルに強く影響するSNP rs10954213Gアリルが、MPO-ANCA陽性AAVにおいて有意に増加していることが明らかになった。一方、STAT4 rs7574865においては有意な関連が検出されなかった。（土屋）

③血管炎症候群23例、未治療関節リウマチ20例、健常人コントロール21例の3群合計64例を対象症例とし、DNAマイクロアレイを用いた末梢血の網羅的遺伝子発現のバイオマティクス解析を行った。その結果、主成分分析では血管炎群と健常人は異なる群として分類される傾向が認められ、血管炎に特徴的な発現変動遺伝子912プローブを同定した。ANCA関連血管炎のpathway解析では、IL-6をはじめとする炎症性サイトカインシグナルが有意に亢進していた。（竹内）

④MPA患者の治療反応性を治療開始後1週間の時点で反映する末梢血の遺伝子とし

て、IRF7、IFIT1、IFIT5、OASL、CLC、GBP-1、PSMB9、HERC5、CCR1、CD36、MS4A4A、BIRC4BP、PLSCR1、DEFA1/DEFA3、DEFA4、COL9A2 の 16 個の遺伝子を同定した。(石津)

2) 難治性血管炎の病態解析

①末梢血 CD14 陽性細胞の培養実験により、tDCs を誘導する物質として、プロテインキナーゼ C 阻害剤(PKCI)を見出した。PKCI-DCs では、CD40、CD80、CD83、CD86、MHC class I の発現が低下していたが、CD1a、CD11c、MHC class II 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おり、IL-10 と TGF- β 発現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、IL-10 や Foxp3 の発現細胞が有意に増加していた。炎症環境下において、PKCI-DCs は安定であった。PKCI 存在下では NF- κ B 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。また、マウス PKCI-tDCs を作製し、ヒトと同様の表現型と抑制機能を有し、GVHD マウスモデルに投与したところ、GVHD を抑制し、in vivo でも十分働くことを証明した。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。(長谷川)

②質量分析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を探索し、血清試料(MPA 4例、GPA 2例、EGPA 1例)中に約400タンパク質の同定に成功した。これらのうち、血管炎との関連性が強く示唆されるタンパク質群 (89種類) を選

択し、33例のAAV患者の血清試料を用いて、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など)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を新たに明らかとした。(長谷川)

③中・小型血管炎を発症する env-pX ラット由来の自己血管内皮細胞反応性 T 細胞クローン 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することで小型血管炎を誘導することを証明した。また、REC との反応による VASC-1 の活性化は抗 CD1d 抗体により阻害されることから、VASC-1 は NKT 細胞と同定された。VASC-1 は type I NKT 細胞に invariant な TCR を発現していないことや type I NKT 細胞への結合が知られている α -galactosylceramide と相互作用しないことから、type II NKT 細胞と考えられた。(石津)

④好中球に PMA とともに PTU を添加して作製した NETs が形態異常と DNase I による分解に抵抗性を示すことを明らかにするとともに、NETs に含まれる MPO が自己抗原となり MPO-ANCA が産生されて血管炎が発症することを示した。さらに、MPA 患者の血清 IgG には NETs 誘導活性があることを見出し、血清中の NETs 誘導因子が MPO-ANCA であることを示すとともに、その活性が MPO との結合親和性に依存することを証明した。また、MPA 患者の血清は NETs 分解活性と DNase I 活性が低く、一部の患者では抗 NETs 抗体が検出された。(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

①ヒト大動脈瘤検体においては、CD68 陽性マクロファージ浸潤、血管新生、VEGF-A 発現、弾性線維破壊はいずれも正常大動脈と比較して亢進しており、VEGF-A は主に血管壁に浸潤したマクロファージに由来することが明らかとなった。また、CaCl₂ 塗布マウス腹部大動脈瘤血管壁では、マクロファージ浸潤と血管外膜での血管新生の亢進およびエラスチンの波状構造破壊を認め、VEGF-A と VEGF 転写促進因子 (HIF-1 α と HIF-3 α) の mRNA 発現亢進およびマクロファージでの VEGF-A 発現が証明された。本モデルマウスに可溶性 VEGF-A 受容体を投与すると、血管壁における血管新生、マクロファージ浸潤、炎症性サイトカイン (MCP-1、TNF- α および ICAM-1) の発現およびエラスチン分解能を有する MMP9 と MMP2 の酵素活性が抑制され、大動脈瘤発生抑制が示された。(岡田)

②ヒト腹部大動脈瘤組織では ADAM17 および可溶性 TNF- α 発現が亢進しており、ADAM17 は主に大動脈瘤血管壁のマクロファージと血管平滑筋細胞で発現していた。ADAM17 コンディショナルノックアウトマウスで CaCl₂ 塗布腹部大動脈瘤作製実験を行うと、血管壁へのマクロファージ浸潤、炎症性サイトカイン (MCP-1、TNF- α 、ICAM-1) 発現、血管新生、酸化ストレスマーカー (p47、GPX-1、GPX-3) 発現、MMP9 と MMP2 の酵素活性が野生型マウスと比較して有意に抑制され、大動脈瘤の発生も阻害された。(岡田)

③AAD 患者では、血液中 MMP9 と AngII が高値であり、AAD 大動脈中膜の解離面に多数の MMP9 陽性好中球が認められた。こ

れらのデータに基づいて、BAPN 処理した幼若マウスに AngII 皮下持続投与することにより全例で AAD を発症するモデルマウスを開発した。本マウスモデルでの中膜解離部には多数の MMP9 陽性好中球がみられ、DHE 染色陽性とゼラチン分解活性が証明されるとともに、好中球浸潤は非解離部の大動脈内膜にも認められた。AAD 形成は MMP9 ノックアウトマウスではほぼ完全に抑制され、MMP インヒビター投与や抗好中球抗体投与でも有意に抑制された。AAD マウス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 AngII 投与 24 時間で最も高値を示した。また、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発現していることが免疫組織学的に確認された。HUVEC を用いた検討では、ADAM28 は TNF- α や IL-1 α 刺激によりプロテインキナーゼ C の活性化を介して発現亢進し、HUVEC から分泌された 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。(岡田)

④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、ヘパリン・EDTA 処理血漿で検討した結果、AAD 患者 14 症例中 6 例が陽性 (4 例が陽性、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。しかし、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

優れてはいなかった。(岡田)

⑤Nucleotide-binding oligomerization domain ファミリーである Nod1 受容体に着目し、そのリガンドのマウスへの全身投与により川崎病類似冠動脈炎発症モデルを確立してきた。本モデルにおいて血管炎が主として冠動脈や上行大動脈基部に発症する部位特異性を、血管内皮細胞の炎症制御システムである Angiopoietin (Ang)/Tie システムとの関連性を検討した結果、HUVEC における炎症関連因子 (MCP-1、E-selectin、ICAM-1、VCAM-1) 遺伝子発現は、Nod1 リガンド刺激で有意に亢進し、Ang-1 存在下では発現亢進効果が消失ないし有意に抑制されることを示し、Ang/Tie システムは Nod1 リガンド誘発の炎症過程を負に制御するシステムとして重要であ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

①Chapel-Hill コンセンサス会議 2012 年で提唱された病名に従って、症例を分類し、約 50 症例分の臨床データ (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、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。(岩月)

②既刊「難治性血管炎診断の手引き」(金原出版、2011 年) を Chapel-Hill コンセンサス会議 2012 年に合わせて全面改訂し、掲載症例として血管炎 29 例、症候性血管炎 6 例、鑑別疾患 13 例を抽出し、それらの最新版の診療の手引きを編集し、校了した。(槇野、岡田、岩月、佐田)

E. 考察

当分科会では、(1)難治性血管炎における遺伝子解析、(2)難治性血管炎の病態解析、(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、(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の4研究項目のもとに研究を推進してきた。

(1)難治性血管炎における遺伝子解析においては、日本人集団におけるMPA、MPO-ANCA陽性AAV患者ではHLA-DRB1*09:01の顕著な関連が確認され、GPA群においてもMPO-ANCA陽性群でのHLA-DRB1*09:01増加が認められた。ヨーロッパ系集団においてはHLA-DPB1*04:01が頻度の高いアリルとして報告されていることから、HLA領域の遺伝的背景の違いがアジア系とヨーロッパ系集団における発症率の違いの一因となっている可能性が示唆された。一方、HLA-DRB1*09:01はPR3-ANCA陽性AAV患者では関連がないことから、本アリルは臨床分類よりもANCAの抗原特異性に強く関連することが示唆された。また、IRF5のSNP rs10954213GアリルのMPO-ANCA陽性AAV患者における増加は、IRF5 mRNAレベルの低下に関連しており、他の多くの自己免疫疾患では疾患抵抗性に働くアリルであることからMPO-ANCA陽性AAVでは独自のサイトカイン環境を有する可能性が示唆された。

(2)難治性血管炎の病態解析では、免疫寛容樹状細胞 (tDCs) の誘導法を見出し、本細胞の特徴を明らかにすることができた。tDCs は自己免疫や移植免疫において免疫寛容を導くことから、本細胞を用いた細胞治療が期待される。また、AAV患者血清試料を用いたプロテオーム大規模定量解析研究により、活

動期に極めて高い発現を示すマーカー候補分子を見出したことから、今後の詳細な研究によりAAV診断マーカーになる可能性が期待される。本研究項目で得られた重要な研究成果の一つは、MPAの病態形成におけるNETsの重要性を解明できた点である。MPA患者ではDNase I活性が低いため、感染などを契機に形成されたNETsは分解されにくく、一旦MPO-ANCAが産生されるとそれが新たなNETs形成を誘導し、抗NETs抗体の産生などを介してNETs分解抑制に至るといふ、NETs/MPO-ANCA病態悪循環がMPA患者で存在することが示唆された。

(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においては、CaCl₂塗布マウス腹部大動脈瘤モデル実験により、大動脈瘤の発生と進展に慢性炎症とVEGF-Aによる血管新生の重要性が明らかとなった。また、ADAM17コンディショナルノックアウトマウスではCaCl₂塗布腹部大動脈瘤形成が抑制されたことから、動脈瘤形成にADAM17が重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、将来的にADAM17を標的とした治療は血管壁における慢性炎症、血管新生、酸化ストレス抑制を通して血管壁の構造破壊を抑制することで大動脈瘤発生予防に働く可能性が推定された。AADはまれな疾患であるが、迅速な診断と治療が要求される致死率の高い難治性血管疾患であり、高安大動脈炎やベーチェット病患者で比較的合併しやすいことが知られている。本研究項目では、AADを全例で発症するマウスモデルの開発に成功するとともに、AngIIの作用で血管内膜に

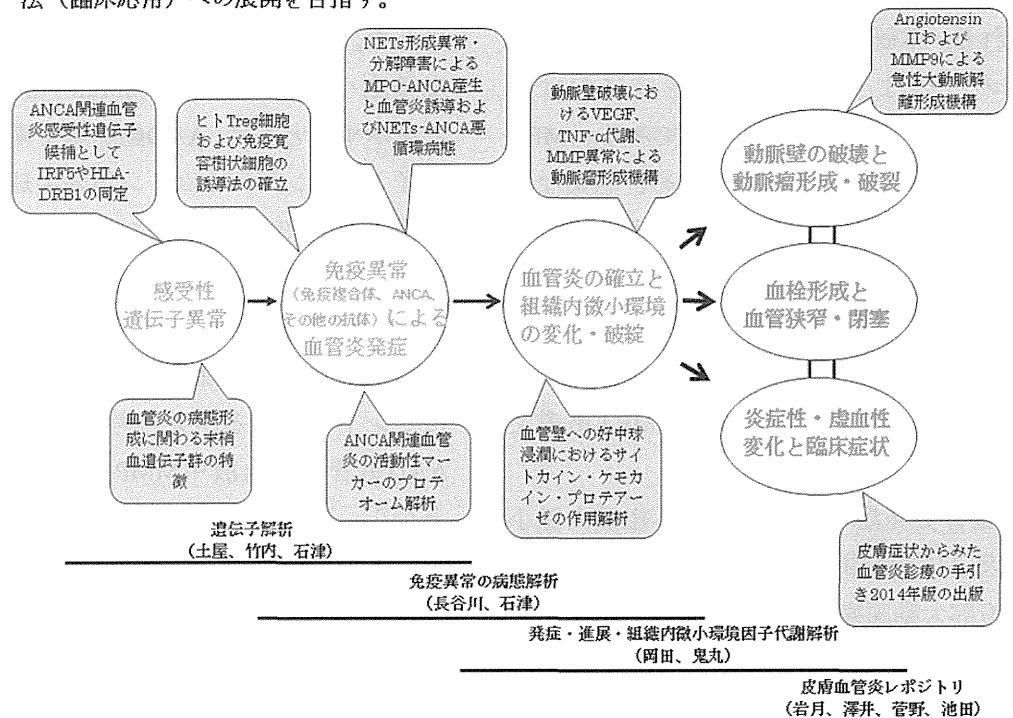
浸潤した好中球がMMP9を産生・分泌し、大動脈壁の組織内微小環境を破壊することがAAD発症に深く関わることを初めて明らかにした。また、AngIIによる好中球の血管内皮細胞へ接着亢進にADAM28が関与することを示すとともに、AAD動脈壁で産生されたサイトカイン・ケモカインが好中球浸潤促進に働くことでAAD進展につながると推定された。多くの血管炎では好中球浸潤が主体をなすことから、これらのデータは今後の難治性血管炎における血管組織破壊機構の解析にヒントを与える所見と考えられる。一方、AAD患者では血液中MMP9が高値となることから、迅速MMP9イムノアッセイ法を開発して患者血漿を用いて検討したが、AAD患者での陽性率が低いことから実用化には本法のさらなる改良が必要と考えられた。

F. 結論

本分科会では、目標として掲げた、血管炎に関する感受性遺伝子異常、免疫異常による血管炎発症、血管炎の確立と組織内微小環境の変化・破綻、動脈壁の破壊と臨床症状の出現の各研究課題について、下図の吹き出しに記載したように一定の成果をあげることができたと考えている。本研究分科会での研究成果が、血管炎の基礎研究を立案に当たって方向性を与えるとともに、Chapel-Hillコンセンサス会議2012年に合わせて全面改訂された「難治性血管炎診断の手引き」と進行中の「血管炎症例の病理所見と臨床所見のレポジトリ」は、希少疾患である難治性血管炎の臨床に役立つことが期待される。

血管炎病因・病態の究明と臨床応用への展開 (平成23-25年)

研究目的：血管炎の病因・病態を究明するとともに、得られたデータに基づいて診断・治療法（臨床応用）への展開を目指す。



大型血管炎臨床研究分科会

分科会長

種本 和雄 川崎医科大学心臓血管外科 教授

分担研究者

磯部 光章 東京医科歯科大学循環器内科 教授

古森 公浩 名古屋大学大学院血管外科 教授

小室 一成 東京大学大学院医学系研究科循環器内科学 教授

中村 浩士 山口大学医学部地域医療推進学講座 准教授

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 教授

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 講師

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 助教

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 所長

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 教授

鈴木 淳一 東京大学先端臨床医学開発講座 准教授

中岡 良和 大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学 助教

宮田 哲郎 国際医療福祉大学臨床医学研究センター 教授

湊谷 謙司 国立循環器病研究センター心臓血管外科 部長

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 部長

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）助教

渡部 芳子 川崎医科大学生理学1 特任講師

A. 研究目的

高安動脈炎、巨細胞性動脈炎、Buerger 病、炎症性大動脈瘤を主な対象疾患として、疫学、病因・病態、診断方法、治療法の選択、予後などについて研究を行い、大型血管炎の推移、重症度、転帰を明らかにし、治療方法の選択について検討を行うとともに、新しい治療法の開発に取り組むことを目的として研究を行った。さらに、これら稀少疾患のなかで、高安動脈炎および巨細胞性動脈炎を前向きに登録するシステムを構築し、将来的に病因病態の探求、治療法の開発に向けた発展性のある研究遂行の土台作りを確立するために、寛解導入治療の現状と有効性に関する観察研究を開始する。

B. 研究方法

我が国における高安動脈炎の疫学調査の方法として、厚生労働省特定疾患治療研究事業における高安動脈炎臨床調査個人票を用いた。すなわち厚生労働省健康局疾病対策課長の許可を得て、都道府県から毎年登録されているデータの提供を受け、そのデータの解析を行った（種本、渡部、内田、中村）。

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は、前向き登録の症例登録が出来るシステムを確立し、本研究班の施設を中心に新規発症症例の登録を進める（種本、内田）。

高安動脈炎の臨床例を解析し、また近年の HLA-DNA 解析法を用いて HLA リスクアレルと臨床的特徴について検討した。さらに、高安動脈炎の造影 MRI の有用性の評価を行った（磯部）。

Buerger 病 24 例と閉塞性動脈硬化症 24 例の動脈病変を用いて免疫組織化学的検討を行った。また Buerger 病と診断された 154 例のうち、重症虚血症状を呈した 103 例を対象とし、肢の予後について検討した。さらに、Buerger 病 15 例の血管内皮機能を %FMD、血流増大率で評価し、有症状の閉塞性動脈硬化症患者 15 例と比較検討を行った（古森）。

高安動脈炎症例でステロイド治療抵抗性の難治例に対して抗 IL-6 受容体抗体 tocilizumab を用いた治療の有用性を検証し、同治療の効果判定に有用なバイオマーカーの探索を行った（小室）。

高安動脈炎の眼病変に対する PET-CT の有用性を検討する目的で、高安動脈炎患者 4 例とそれ以外の疾患患者 5 例に PET-CT を行い、眼病変を評価した。また、高安動脈炎における心臓病変を組織学的に解析する目的で、CD69 欠損マウスに coxsackievirus 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った（中村）。

炎症性腹部大動脈瘤に対する血管内治療（ステントグラフト内挿術）の成績を明らかにするために全国アンケート調査によって得られた症例を含めて同治療症例 13 例の成績について retrospective に検討を行った（小櫃）。

高安動脈炎 173 例を集積し、HLA 解析を行った。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検討した（吉藤）。