

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
難治性血管炎の医療水準・患者QOL向上に資する研究班
分担研究報告書

令和4年度 臨床病理分科会活動報告

AAVの上気道生検組織の病理学的特徴の解明

研究分担者：

宮崎 龍彦 東海国立大学機構 岐阜大学医学部附属病院 教授
石津 明洋 北海道大学大学院 保健科学研究所 教授

研究協力者：

小川 弥生 北海道腎病理センター 副理事長
中沢 大悟 北海道大学病院 リウマチ・腎臓内科 助教
武曾 恵理 財) 田附興風会医学研究所北野病院 腎臓内科 客員研究員
黒川真奈絵 聖マリアンナ医科大学大学院疾患バイオマーカー・標的分子制御学 大学院教授

研究要旨 血管炎病理学的所見における未解明問題として、AAVの上気道生検組織の病理学的特徴を明らかにする課題に取り組んだ。ANCA関連血管炎（AAV）にはGPAの様に上気道の壊死性肉芽腫性病変を形成するものがある。一方で成人の難治性中耳炎のなかにも同一機序で発症するANCA関連血管炎性中耳炎(otitis media with ANCA associated vasculitis (OMAAV))があり、GPAとの異同が論議されている。そこで、OMAAVの組織学的診断パラメーターを抽出し、GPA、MPAとの移動を含む診断基準の策定を行うことを企図して解析に取り組んだ。プレリミナリーな解析では、AAVの上気道生検組織の特徴として、1)筋性動・静脈炎、2)筋性動・静脈の閉塞、の2点が正の相関を示すパラメーターとして、3)浮腫、4)好酸球浸潤、5)形質細胞浸潤が負の相関を示すパラメーターとして挙げられた。次に、これらのパラメーターの妥当性を統計学的に検証するため、研究分担者、研究協力者で全組織像をシェアして評価するにあたり、対象症例を training set と、検出したパラメーターを validate する testing set にほぼ偏り無く分け得た。これらのグループ分けを使って、さらに WG 座長の組織において若手病理医に評価させたところ、データの再現性に問題があることが示唆され、その原因を調べたところ、HE染色標本のみで弾性線維染色のない症例では評価に偏りが出ることが明らかとなった。そこで、再度弾性線維染色を追加して組織像をシェアし、最終解析中である。

A. 研究目的

ANCA関連血管炎（AAV）にはGPAなど上気道の壊死性肉芽腫性病変を形成するものがある。成人の難治性中耳炎のなかにも同一機序で発症するANCA関連血管炎性中耳炎(otitis media with ANCA associated vasculitis (OMAAV))があり、GPAとの異同が論議されている。OMAAVは早期診断が難しく、重

篤な合併症を生じたり、致命的になったりすることもある。GPAが鼻、耳、眼、上気道および肺の壊死性肉芽腫性病変、全身の中小血管の壊死性肉芽腫性血管炎、腎の壊死性半月体形成性腎炎をトリアスとするが、GPAに伴う中耳炎では顔面神経麻痺や肥厚性硬膜炎を合併することが多い。また、MPO-ANCA陽性で急激に進行する感音性難聴や顔面神経麻痺を

伴う中耳炎もある。これら ANCA 関連血管炎に伴う中耳炎を OMAAV と呼ぶ。しかし、OMAAV の組織学的な特徴や診断基準は未だ確立されていない。そこで、我々は臨床病理分科会メンバーで OMAAV の組織学的パラメーターを抽出し、GPA, MPA との異同を含む診断基準の策定を行うことを企図し、OMAAV 症例の組織学的特徴の解析に取り組んでいる。

B. 研究方法

対象症例：旭川医科大学で 2000 年から 2017 年までに生検された OMAAV 病変 34 例、および対照症例として慢性副鼻腔炎 32 例、慢性中耳炎 5 例、喉頭肉芽腫 10 例。合わせて 81 症例、206 プレパラートを解析対象とした。解析方法 プレリミナリーな解析として、二重盲検法にて、岐阜大学医学部附属病院病理部の若手病理専門医 4 名がダブルチェックで組織学的パラメーターについて定性的もしくは半定量的に評価した。組織学的パラメーターは、①びらん、②浮腫、③炎症細胞浸潤全体、④線維化、⑤リンパ球浸潤、⑥好中球浸潤、⑦好酸球浸潤、⑧形質細胞浸潤、⑨マクロファージ浸潤を半定量（0～3 の 4 段階）で評価し、①表層の壊死物、②小血管壁の炎症細胞浸潤、③血管内皮へのアンカリング、④肉芽腫形成、⑤筋性動・静脈の閉塞、⑥筋性動静脈の血管炎、⑦小血管増生、⑧不整な血管増生、⑨肉芽様隆起性病変を定性的に評価（あり＝1、なし＝0）、さらに①壊死物の厚み、②ラッセル小体の強拡大 1 視野あたりの数を定量的に評価した。また、①線維化のパターン、②被覆上皮の種類、③主な浸潤細胞については、記述としてデータを蓄積した。

次の段階として、上記の群を Training Set と Testing Set に分けて、研究分担者・研究協力者でその組織像をシェアし、プレリミナリーな解析で見いだしたパラメーターが反映されるか否かを解析すべく、対照群を Training set と Testing set に分け、再度プレリミナリーな解析を WG 座長の施設内で行った。

(倫理面への配慮)

人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に則って実施した。

C. 研究結果

プレリミナリーな解析で有意差を認めた、1)筋性動・静脈炎の有無 (図 1a)、2)筋性動・静脈の閉塞の有無 (図 1b) を正の相関を示す組織学的パラメーター候補、3)浮腫 (図 1c)、4)好酸球浸潤 (図 1d)、5)形質細胞浸潤 (図 1d) を負の相関を示す組織学的パラメーター候補として見いだした (図 2)。

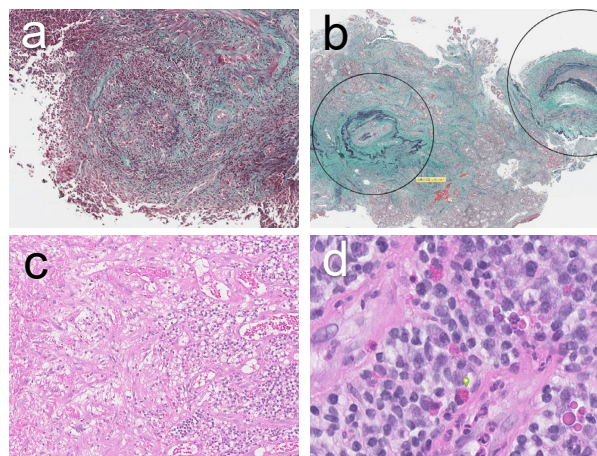


図 1 組織学的診断マーカー候補 筋性血管の血管炎 (a)、筋性動静脈の閉塞性病変 (b)、浮腫 (c)、好酸球浸潤 (矢印)、形質細胞浸潤 (矢頭) (d)

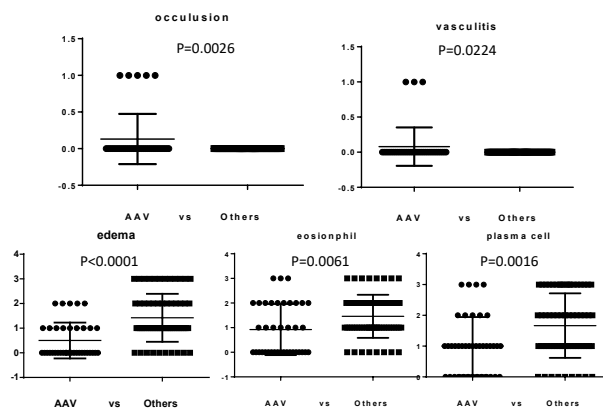


図 2 各組織学的パラメーターのスコア

これら各パラメーターの妥当性を検証するために、Training Set と Testing set に分けた。同一患者からの複数生検があるものに関しては、検体を絞り込み、OMAAV 症例数を当初の 34 例から 17 例に訂正した。男女比ほぼ同じで、平均年齢も ± 2 歳以内に収めることができた。(図 3)

All OMAAV				OMAAV Group 1				OMAAV Group 2			
28 女	1501111	1		28 女	1501111	1		49 女	1303668	1,7	
49 男	1303668	1,7						59 男	1804559	1	
55 男	1501613	1						56 女	1502617	1	
56 男	1505641	1		56 男	1505641	1		59 女	1804735	1	
59 女	1804735	1						59 男	1705585	1	
59 男	1705585	1		59 男	1705585	1		62 男	1404629	1,2	
62 男	1404629	1,2						63 男	1504163	1,2	
63 男	1504163	1,2		63 男	1504163	1,2		63 男	1600198		2, A, B
63 男	1600198		2, A, B					64 男	1604597	1	
64 男	1604597	1		64 男	1604597	1		70 男	1303576	1	
70 男	1303576	1						73 女	1602170	1	
73 女	1602170	1		73 女	1602170	1		76 男	1300195	1	
76 男	1300195	1						81 男	1607788	1,2	
81 男	1607788	1,2		81 男	1607788	1,2		82 女	1504033	1	
82 女	1504033	1		82 女	1504033	1		83 女	1400568	1	
83 女	1400568	1		83 女	1400568	1		63.47699			
63.47699				63.375				63.55556			

All nonOMAAV				nonOMAAV Group 1				nonOMAAV Group 2			
37 女	1701289	1		39 男	1701289	1		37 女	1701289	1	
53 女	1604896	1		53 女	1604896	1		56 女	1603801	1,2	
56 女	1603801	1,2		56 女	1603801	1,2		60 女	1604695	1	
56 女	1605977	1		56 女	1605977	1		64 女	1602088	1	
60 女	1604695	1						64 女	1602088	1	
64 女	1602088	1		64 女	1602088	1		68 女	1506694	1	
68 女	1506694	1		68 女	1506694	1		72 男	1705011	1,5	
72 男	1705011	1,5		72 男	1705011	1,5		79 男	1605726	1	
79 男	1605726	1						58.81818 男3			
58.81818 男3				58.5 男2				59.2 男1			
58.5 男2				54				54			

図3 OMAAV 症例と non-OMAAV 症例の training group / studying group へのグループ分け

このグループ分けを用いて、再度 WG 座長の施設内で若手病理医の協力のもと再現性実験を行ったところ、HE 染色標本のみで弾性線維染色の無い症例では再現性に問題が見いだされた。そこで、全症例弾性線維染色を施行して、training set 評価用の解説ビデオを作成し、WG メンバーに配布し、現在 validation を進行中である。

D. 考察

組織学的診断マーカーの候補となる所見について、筋性動静脈の活動性のある血管炎、筋性動静脈の閉塞～瘢痕様変化についてはこの疾患がもともと ANCA associated vasculitis であることから自明の理である。おそらく他施設間の validation において、有意なマーカーとして統計学的妥当性が証明されることが予測される。

一方で、negative な組織学的診断マーカー候補となった浮腫、形質細胞浸潤、好酸球浸潤については、陰性対照症例に多くの好酸球性副鼻腔炎による鼻ポリープが含まれていたことがその要因の一つであると考えられる。一方で、実際の OMAAV 症例の組織像を考察すると、その多くは強いリンパ球・組織球・好中球浸潤を伴う肉芽腫性炎を特徴としており、これら negative な組織学的診断マーカー候補に

についても validation において有意な統計学的所見を得られることが予測される。

これらの結果から導き出される組織学的診断マーカーを今後、OMAAV の診断基準に反映させられることが期待される。

E. 結論

OMAAV の組織学的診断マーカー探索を行った。その結果、positive な診断パラメーター候補として筋性動静脈の活動性血管炎、筋性動静脈の閉塞・瘢痕様変化が、negative な診断パラメーター候補として浮腫、好酸球浸潤、形質細胞浸潤が見いだされた。validation を経て、OMAAV の診断基準への反映が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tozaki N., Tawada C., Niwa H., Mizutani Y., Shu E., Kawase A., Miwa Y., Ohnishi H., Sasai H., Miyako K., Hosokawa J., Kato A., Kobayashi K., Miyazaki T., Shirakami Y., Shimizu M., Iwata H. A case of VEXAS syndrome (vacuoles, E1 enzyme, X-linked, autoinflammatory, somatic) with decreased oxidative stress levels after oral prednisone and tocilizumab treatment. *Front Med (Lausanne)*.9:1046820, 2022. doi: 10.3389/fmed.2022.1046820
- 2) Nishibata Y, Nonokawa M, Tamura Y, Higashi R, Suzuki K, Hayashi H, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of intermolecular epitope spreading in the production of anti-glomerular basement membrane antibody in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 40(4): 691-704, 2022. doi: 10.55563/clinexprheumatol/60q9du.
- 3) Senda A, Sasai R, Kato K, Nishibata Y, Masuda S, Ishizu A, Takahara N. Involvement of Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Glomerulonephritis in a Case

- of Systemic Lupus Erythematosus and Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Overlap Syndrome. *Clin Exp Nephrol Case Rep* 11(3): 339-346, 2022. doi: 10.1007/s13730-021-00682-y.
- 4) Yoshinari M, Hattanda F, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. A novel anti-neutrophil extracellular trap antibody targeting myosin light chain 6 in microscopic polyangiitis. *J Rheumatol* 49(11): 1286-1288, 2022. doi: 10.3899/jrheum.211266.
- 5) Kawakami T, Nakade I, Tamura Y, Ito F, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Typical cutaneous small-vessel vasculitis induced by combined injection of anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibody and anti-LAMP-2 antibody in normal rats. *J Dermatol* 49(12): 1233-1237, 2022. doi: 10.1111/1346-8138.
- 6) Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Arimura Y, Amano K, Yuzawa Y, Sada KE, Atsumi T, Dobashi H, Hasegawa H, Harigai M, Matsuo S, Makino H, Ishizu A. Low disease activity of microscopic polyangiitis in patients with anti-myosin light chain 6 antibody that disrupts actin rearrangement necessary for neutrophil extracellular trap formation. *Arthritis Res Ther* 24(1): 274, 2023. doi: 10.1186/s13075-022-02974-9.
- 7) Kudo T, Nakazawa D, Watanabe-Kusunoki K, Kanda M, Shiratori-Aso S, Abe N, Nishio S, Koga J, Iwasaki S, Tsuji T, Fukasawa Y, Yamasaki M, Watanabe M, Masuda S, Tomaru U, Murakami M, Aratani Y, Ishizu A, Atsumi T. Cyclophilin D regulates NETosis and inflammation in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheumatol* 75(1): 71-83, 2023. doi: 10.1002/art.42314.
- 8) Nakazawa D, Takeda Y, Kanda M, Tomaru U, Ogawa H, Kudo T, Shiratori-Aso S, Watanabe-Kusunoki K, Ueda Y, Miyoshi A, Hattanda F, Nishio S, Uozumi R, Ishizu A, Atsumi T. Transcriptional dynamics of granulocytes in direct-response to SARS-CoV-2. *FEBS Open Bio* 13(1): 60-71, 2023. doi: 10.1002/2211-5463.13500.
- 9) Ishizu A, Kawakami T, Kanno H, Takahashi K, Miyazaki T, Ikeda E, Oharaseki T, Ogawa Y, Onimaru M, Kurata M, Nakazawa D, Muso E, Harigai M. [Expert Perspectives on Pathological Findings in Vasculitis](#). *Mod Rheumatol* 33(1): 1-11, 2023. doi: 10.1093/mr/roac043.
- 10) Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Sakiko M, Tomaru U, Ishizu A. Similar deposition of neutrophil extracellular traps in the dermis among COVID-19-associated IgA vasculitis, post-COVID-19 vaccination IgA vasculitis, and COVID-19-unrelated IgA vasculitis. *J Dermatol* (in press)
- 11) Inoue D, Uchida T, Komatsu S, Sugisaki K, Yamada M, Ogawa H, Ishizu A, Oda T. Anti-PLA2R Antibody Development During NELL1-Associated Membranous Glomerulonephritis Treatment: A Case Report. *Kidney Med* (in press)
- 12) 中沢大悟, 石津明洋. 解説: ANCA 関連血管炎における補体制御. *リウマチ科* 68(5): 613-619, 2022.
2. 学会発表
- 1) Ishizu A, Taniguchi M, Arai S, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Shimizu T, Sinko W, Nagakura T, Terada Y. Preclinical studies of a novel cathepsin C inhibitor in MPO-ANCA-associated vasculitis model. *EULAR 2022, Copenhagen*
- 2) Ishizu A. Recent basic studies in ANCA-associated vasculitis. *KCR 2022, online*
- 3) Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A. Production mechanism of anti-glomerular basement membrane antibody in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *International Vasculitis and ANCA Workshop 2022, online*
- 4) Ishizu A, Nakazawa D, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Kawakami T. SARS-CoV-2-associated vasculopathy and vasculitis – an enigmatic disease. 第 66 回日本リウマチ学会シンポジウム
- 5) Ishizu A. 病理学的視点の血管炎診断の進歩. 第 52 回日本皮膚免疫アレルギー学会シンポジウム
- 6) Ishizu A. ANCA 関連血管炎の病態における補体の

役割. 第 32 回日本リウマチ学会関東支部学術集会教育講演

- 7) 第 27 回日本血管病理研究会ワークショップ: 血管炎コンサルテーションシステムの運用とそこで見いだされた稀少症例・コンサルタントの意見が分かれた症例
症例 1. 血管壁に好酸球浸潤を認める大腸生検組織—血管炎? 腸炎?
症例提示と解説 小川弥生
指定発言 上杉憲子
症例 2. 組織構築の異常があるが炎症細胞浸潤がない側頭動脈生検組織—GCA or not?
症例提示と解説 大原関利章
指定発言 池田栄二
- 8) 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. MPO-ANCA 関連血管炎モデルにおける新規好中球機能制御化合物薬の抑制効果. 第 66 回日本リウマチ学会
- 9) 中出一生, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. プルトン型チロシンキナーゼ阻害剤チラブルチニブによる MPO-ANCA 関連血管炎誘導モデルの発症抑制. 第 66 回日本リウマチ学会
- 10) 小川帆貴, 横田隼一, 清水智弘, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 岩崎倫政, 石津明洋. 全身性エリテマトーデスへのステロイドパルスが好中球細胞外トラップ形成に及ぼす影響. 第 66 回日本リウマチ学会
- 11) 益田紗季子, 北野翔大, 西端友香, 外丸詩野, 石津明洋. 好中球細胞外トラップに DNase I 抵抗性を付与するタンパクの探索. 第 111 回日本病理学会
- 12) 益田紗季子, 西端友香, 外丸詩野, 横山華英, 池田高治, 川上民裕, 石津明洋. COVID-19 発症後および COVID-19 ワクチン接種後 IgA 血管炎の皮膚生検組織における好中球細胞外トラップの沈着—COVID-19 非関連 IgA 血管炎との比較. 第 27 回日本血管病理研究会
- 13) 宮崎龍彦. 血管炎の病理診断のキホン. 第 26 回日

本病理学会中部支部スライドセミナー.

- 14) 小川弥生, 長南新太, 藤田裕美, 山下智久. 尿閉で発症し、腎生検では壊死性動脈炎を認めたサルコイドーシスの 1 例. 第 27 回日本血管病理研究会
- 15) 西端友香, 佐藤雅之, 長森恒久, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 無症候性血尿を呈した抗糸球体基底膜 (GBM) 抗体陽性症例の血清を用いた抗体解析. 第 27 回日本血管病理研究会
- 16) 川上民裕, 中出一生, 田村宥人, 伊藤吹夕, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 皮膚血管炎動物モデルの完成. 第 27 回日本血管病理研究会
- 17) 工藤悠輔, 原花梨, 村山迪史, 加賀早苗, 表原里実, 岩井孝仁, 進藤由衣香, 菊池桃佳, 加藤将, 外丸詩野, 松野吉宏, 石津明洋. 巨細胞性動脈炎の診断に寄与する新たな超音波所見: 生検所見との比較に基づく検討. 第 27 回日本血管病理研究会
- 18) 小林一博, 酒々井夏子, 岩田浩明, 宮崎龍彦. VEXAS 症候群の一例. 第 27 回日本血管病理研究会
- 19) 宮崎龍彦, 小林一博, 酒々井夏子, 松本宗和, 黒田隆弘. 組換え近交系膠原病モデルに見いだされた皮膚炎・皮膚血管炎ブローンマウスの解析. 第 4 回血管炎病因病態研究会
- 20) 中出一生, 田村宥人, 橋本美由, 荒井粹心, 谷口舞, 小川帆貴, 西端友香, 益田紗季子, 中沢大悟, 外丸詩野, 有座夕子, 石津明洋. プルトン型チロシンキナーゼ阻害剤チラブルチニブによる MPO-ANCA 関連血管炎誘導モデルの発症抑制. 第 4 回血管炎病因病態研究会
- H. 知的財産権の出願・登録
なし