

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590390

研究課題名（和文）血管炎発症機序の解明と新しい分子標的治療法および病態診断法の開発

研究課題名（英文）Pathogenesis of vasculitis and novel diagnostic and therapeutic strategies

研究代表者

石津 明洋（ISHIZU AKIHIRO）

北海道大学・大学院保健科学研究所・教授

研究者番号：60321957

研究成果の概要（和文）：

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反応性血管炎惹起性 T 細胞を単離した。この T 細胞の標的分子や血管傷害機構を明らかにすることにより、血管炎の新しい分子標的治療法の開発が可能となる。また、顕微鏡的多発血管炎患者の治療前および治療開始 1 週間後の末梢血を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。治療前後の末梢血における 16 個の遺伝子の発現変化を調べることにより、患者予後を治療開始後の早期に予測できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Autoreactive vasculitogenic T cell clones were established from env-pX rats, which develop medium to small-sized vasculitis. Identification of the T cell target and the mechanism of vascular injury induced by the T cells might result in the development of novel therapeutic strategies for vasculitis. The transcriptome analysis was performed using the peripheral blood obtained from patients with microscopic polyangiitis (MPA) before and 1 week after the treatment. Sixteen genes were nominated as distinguished indicators that could predict prognosis of patients with MPA at an early point during the therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：血管炎、自己反応性 T 細胞、網羅的遺伝子発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

血管炎は血管自体が標的となる炎症性疾患である。中・小型動脈が侵される結節性多発動脈炎や細小血管が侵される顕微鏡的多発血管炎など、傷害される血管のサイズによりいくつかの疾患に分類されるが、背景には

共通して自己免疫現象が存在すると考えられている。しかしながら、詳細な発症機序は不明であるため、治療としてはステロイド剤を中心とした非特異的な免疫抑制療法が行われるにとどまり、現在なお救命率が低い難治性疾患である。本研究では、血管炎の発症

機序を解明し、発症機序に即した新しい分子標的治療法ならびに病態診断法を開発するため、以下の2つのプロジェクトを展開する。

## 2. 研究の目的

(1) 結節性多発動脈炎類似の壊死性血管炎を発症する env-pX ラットを用いた血管炎発症機序の解明と、発症機序に即した新しい分子標的治療法の開発を行う。

(2) 顕微鏡的多発血管炎患者の末梢血を用いたトランスクリプトーム解析により、血管炎の治療反応性の予測を目的とした新しい遺伝子診断ツールを開発する。

## 3. 研究の方法

(1) env-pX ラットでは胸腺におけるT細胞の分化に異常があり、自己血管反応性T細胞が出現して血管炎発症に関わると考えられている。本研究では、env-pX ラットから血管炎惹起性T細胞を抽出し、その対応抗原を同定することにより、血管炎の標的分子を明らかにする。また、血管炎惹起性T細胞の移入による新しい血管炎誘導モデルを作製し、このモデルにおける血管傷害メカニズムの詳細を解析して血管炎に対する新しい分子標的治療法を開発する。さらに、env-pX ラットと正常ラットの胸腺フレームワークにおける遺伝子発現を網羅的に解析し、血管炎標的分子に反応するT細胞が胸腺で除去されない機構を明らかにする。

(2) 顕微鏡的多発血管炎のトランスクリプトーム解析では、治療前および治療直後の患者末梢血を採取し、治療後の予後に相関して発現変動を示す遺伝子群を明らかにし、それら遺伝子群を用いた新しい病態診断法を開発する。

## 4. 研究成果

(1) 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反応性T細胞を単離した。単離したT細胞は、TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>NKR-P1A<sup>-</sup>の形質を有する double negative T細胞であった。TCR V $\beta$  鎖はV $\beta$ 8.6を用い、CDR3領域のアミノ酸配列はRPWGGRFであった。このT細胞のサイトカイン/ケモカインプロファイルを解析したところ、IL-2(-), IL-4(+), IL-10(-), IL-17(-), IFN- $\gamma$ (+), MCP-1(+), MIP-1 $\alpha$ (+), MIP-1 $\beta$ (+), rantes(+), eotaxin(-)を示した。このT細胞を野生型ラットに静注することにより、肺その他の組織に血管炎が誘導されたことから、単離した自己血管内皮細胞反応性T細胞は血管炎惹起性T細胞であると考えられた。

(2) 顕微鏡的多発血管炎患者の治療前および治療開始1週間後の末梢血を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。治療後に寛解が

導入され、その後も寛解が維持された9症例について8,793個の遺伝子を解析し、治療前後で有意な発現変化を示す88個の遺伝子を抽出した。次に、抽出された88遺伝子の中から再現性の確認された30遺伝子を選定して、定量的遺伝子発現解析を行った。この解析に供した症例は18症例であり、その内訳は、予後良好群(寛解維持)15例、予後不良群3例(寛解後再燃2例、非寛解死亡1例)であった。この18症例をトレーニングサンプルとして治療後の予後との関連について重回帰分析を行い、治療開始後1週間の時点でその後の予後を予測する最適な遺伝子セットを検討した結果、16個の遺伝子が抽出された。治療前と治療開始1週間後の末梢血を用いて、抽出された16個の遺伝子の発現変化を調べることにより、MPO-ANCA関連血管炎患者の治療後の予後を予測できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

- 1) Watari H, Michimata R, Yasuda M, Ishizu A, Xiong Y, Hassan MK, Sakuragi N. High prevalence of multiple human papillomavirus infection in Japanese patients with invasive uterine cervical cancer. Pathobiology (in press) (査読有)
- 2) Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Tomaru U, Katsumata K, Kasahara M, Ishizu A. Plasma-dependent, antibody- and Fc $\gamma$  receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. Cytometry A 79A(1): 46-56, 2011. (査読有)
- 3) Furuya M, Nagahama K, Ishizu A, Otsuka N, Nagashima Y, Aoki I. Complexity of tumor vasculature and molecular targeting therapies. Front Biosci (Elite Ed) 3:549-61, 2011. (査読有)
- 4) Shinohara N, Takahashi M, Kamishima T, Ikushima H, Otsuka N, Ishizu A, Sazawa A, Kanayama H, Nonomura K. The incidence and the mechanism of sunitinib-induced thyroid atrophy in patients with metastatic renal cell carcinoma. Br J Cancer 104(2):241-247, 2011. (査読有)

- 5) JCS Joint Working Group (Ozaki S, Ando M, Isobe M, Kobayashi S, Matsunaga N, Miyata T, Nakabayashi K, Nakajima Y, Nose M, Ohta T, Shigematsu H, Sueishi K, Tanemoto K, Yoshida A, Yoshida M, Yutani C, Arimura Y, Fukaya S, Hamaguchi S, Hashimoto H, Hiromura K, Ishizu A, Iwai T, Kaneko K, Kataoka H, Kawana S, Kida I, Kobayashi Y, Komori K, Masaki H, Matsumoto T, Nagaoka T, Nagasawa K, Nojima Y, Okada M, Okazaki T, Sakamoto I, Shigematsu K, Shiiya N, Takahashi A, Takizawa H, Yamada H, Yoshida S, Fukui T, Horie M, Koike T, Kumagai S, Sasajima T. Guideline for management of vasculitis syndrome (JCS 2008). *Circ J*. 2011 75(2):474-503. (査読有)
- 6) Ishizu A, Abe A, Miyatake Y, Baba T, Iinuma C, Tomaru U, Yoshiki T. Cyclic AMP response element binding protein is implicated in IL-6 production from arthritic synovial cells. *Mod Rheumatol* 20(2): 134-138, 2010. (査読有)
- 7) Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, Ishizu A, Shida T, Osaka M, Sato Y, Saji Y, Ozaki M, Todo S. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 24(5): 1201-1212, 2010. (査読有)
- 8) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 山本智宏, 吉木 敬. トランスクリプトミクスによる血管炎関連因子の探索. *炎症と免疫* 18: 509-513, 2010. (査読無)
- 9) Tomaru U, Ishizu A, Murata S, Miyatake Y, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Baba T, Iwasaki S, Fugo K, Otsuka N, Tanaka K, Kasahara M. Exclusive expression of proteasome subunit  $\beta 5t$  in the human thymic cortex. *Blood* 113(21): 5186-5191, 2009. (査読有)
- 10) Sasaki N, Ogawa Y, Iinuma C, Tomaru U, Katsumata K, Otsuka N, Kasahara M, Yoshiki T, Ishizu A. Human endogenous retrovirus-R env glycoprotein as possible autoantigen in autoimmune disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(9): 889-896, 2009. (査読有)
- 11) 石津明洋, 吉木 敬. env-pX ラットの血管炎発症機序. *脈管学* 49: 17-20, 2009. (査読無)
- 12) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎の予後予測因子の探索. *脈管学* 49: 45-51, 2009. (査読無)
- 13) Baba T, Iwasaki S, Maruoka T, Suzuki A, Tomaru U, Ikeda H, Yoshiki T, Kasahara M, Ishizu A. Rat CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> macrophages kill tumor cells through an NKG2D- and granzyme/perforin-dependent mechanism. *J Immunol* 180(5): 2999-3006, 2008. (査読有)
- [学会発表] (計 36 件)
- 1) Ozaki S, Makino H, Tomino Y, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Ishizu A, Kurokawa M, Suka M, Nagafuchi H. First prospective trial, JMAAV, in Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2010. 8. 22-27, Kobe, Japan.
- 2) Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Katsumata K, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. Serum-dependent, antibody and Fc $\gamma$  receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2010. 8. 22-27, Kobe, Japan.
- 3) Tomaru U, Suzuki S, Ishizu A, Takahashi S, Ohara J, Miyatake Y, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Skewed T cell development in mice with ectopic expression of thymoproteasome. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2010. 8. 22-27, Kobe, Japan.
- 4) 石津明洋, 外丸詩野, 吉木 敬. 血管炎惹起性 T 細胞クローンの樹立と解析. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010. 4. 22-25, 神戸ポートピアホテル (神戸).
- 5) 石津明洋, 外丸詩野, 吉木 敬, 湯村和

- 子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 黒川真奈絵, 須賀万智, 尾崎承一. JMAAV トランスクリプトーム解析. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010. 4. 22-25, 神戸ポートピアホテル (神戸).
- 6) 高桑由希子, 黒川真奈絵, 大岡正道, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 石津明洋, 須賀万智, 尾崎承一, 加藤智啓, 増子佳世. 顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的検索. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010. 4. 22-25, 神戸ポートピアホテル (神戸).
- 7) 須賀万智, 永渕裕子, 湯村和子, 山縣邦弘, 山田秀裕, 熊谷俊一, 石津明洋, 黒川真奈絵, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎における疾患活動性と QOL への影響. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2010. 4. 22-25, 神戸ポートピアホテル (神戸).
- 8) 飯沼千景, 脇 雅, 山口まどか, 佐々木直美, 外丸詩野, 石津明洋. 血管炎惹起性 T 細胞クローンの樹立と解析. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 京王プラザホテル (東京).
- 9) 益田紗季子, 岩崎沙理, 馬場智久, 勝俣一晃, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. ヒト末梢血に検出される CD8 陽性単球・顆粒球の解析. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 京王プラザホテル (東京).
- 10) 鈴木小百合, 外丸詩野, 高橋里実, 小原次郎, 風巻 拓, 小野綾子, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの異所性発現による T 細胞分化の異常. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 京王プラザホテル (東京).
- 11) 高橋里実, 外丸詩野, 鈴木小百合, 小野綾子, 宮武由甲子, 風巻 拓, 小原次郎, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典. プロテアソームの機能異常による病理作用. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 京王プラザホテル (東京).
- 12) 深谷進司, 外丸詩野, 松井由希, 保田晋介, 堀田哲也, 片岡 浩, 渥美達也, 小池隆夫, 笠原正典, 石津明洋. TNF- $\alpha$  変換酵素 (TACE) トランスジェニックマウスの解析. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 京王プラザホテル (東京).
- 13) 山田洋介, 外丸詩野, 木内隆之, 丸川活司, 笠原正典, 石津明洋, 松野吉宏. プロテアソームサブユニット・5t の胸腺腫における発現. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 京王プラザホテル (東京).
- 14) 木内隆之, 外丸詩野, 高田明生, 石津明洋. von Recklinghausen 病による動脈破裂の病理組織学検討. 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 京王プラザホテル (東京).
- 15) 石津明洋. A 演説 (学術研究賞) モデル動物の解析による自己免疫疾患発症機序の多面的理解. 第 55 回日本病理学会秋期特別総会, 2009. 11. 19-20, 九段会館 (東京).
- 16) 石津明洋, 外丸詩野, 岩崎沙理, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2009. 4. 23-26, グランドプリンスホテル新高輪 (東京).
- 17) 石津明洋, 外丸詩野, 岩崎沙理, 飯沼千景, 村井太一, 山本智宏, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 1-3, 国立京都国際会館 (京都).
- 18) 飯沼千景, 佐々木直美, 岩崎沙理, 外丸詩野, 石津明洋. 自己血管内皮細胞反応性ラット T 細胞の解析. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 1-3, 国立京都国際会館 (京都).
- 19) 外丸詩野, 石津明洋, 高橋里実, 鈴木小百合, 小原次郎, 風巻 拓, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. プロテアソームのキモトリプシン様活性の異常と病態形成に関する検討. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 1-3, 国立京都国際会館 (京都).
- 20) 鈴木小百合, 外丸詩野, 石津明洋, 高橋里実, 小原次郎, 風巻 拓, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの発現と T 細胞分化に關す

- る検討. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 1-3, 国立京都国際会館 (京都).
- 21) 岩崎沙理, 馬場智久, 益田紗季子, 勝俣一晃, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. ヒト末梢血に検出される CD8 陽性単球の解析. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 1-3, 国立京都国際会館 (京都).
- 22) Iinuma C, Waki M, Yamaguchi M, Sasaki N, Tomaru U, Ishizu A. Establishment and analysis of vasculitogenic T cell clone. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009. 12. 2-4, 大阪国際会議場 (大阪).
- 23) Suzuki S, Tomaru U, Ishizu A, Takahashi S, Ohara J, Kazamaki T, Miyatake Y, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Skewed T cell development in mice with ectopic expression of thymoproteasome. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009. 12. 2-4, 大阪国際会議場 (大阪).
- 24) Masuda S, Iwasaki S, Baba T, Katsumata K, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. Analysis of CD8 positive monocytes and granulocytes in human peripheral blood. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009. 12. 2-4, 大阪国際会議場 (大阪).
- 25) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Nishihira J, Yoshiki T, Ozaki S. Gene expression profiling of peripheral blood before and after treatment of patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: transcriptomics in JMAAV study. APLAR, 2008, 9. 23-27, Yokohama, Japan.
- 26) 石津明洋, 外丸詩野, 飯沼千景, 岩崎沙理, 佐々木直美, 馬場智久, 笠原正典, 吉木 敬. 自己血管内皮細胞反応性ラット T 細胞の解析. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008. 4. 20-23, ロイトン札幌 (札幌).
- 27) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 西平順, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15-17, ホテル日航金沢 (金沢).
- 28) 石津明洋, 外丸詩野, 岩崎沙理, 飯沼千景, 佐藤亜矢, 佐々木直美, 馬場智久, 笠原正典, 吉木 敬. 自己血管内皮細胞反応性ラット T 細胞の解析. 第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15-17, ホテル日航金沢 (金沢).
- 29) 外丸詩野, 石津明洋, 宮武由甲子, 高橋里美, 小原次郎, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの発現と T 細胞分化に関する検討. 第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15-17, ホテル日航金沢 (金沢).
- 30) 外丸詩野, 石津明洋, 宮武由甲子, 鈴木小百合, 風巻 拓, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. ヒト組織におけるプロテアソームサブユニット・5t 発現に関する検討. 第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15-17, ホテル日航金沢 (金沢).
- 31) 馬場智久, 岩崎沙理, 外丸詩野, 池田仁, 吉木 敬, 笠原正典, 向田直史, 石津明洋. CD4/CD8 double positive マクロファージの発見と自然免疫系における新しいエフェクター細胞としての展開. 第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15-17, ホテル日航金沢 (金沢).
- 32) 岩崎沙理, 馬場智久, 勝俣一晃, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. ヒト末梢血における CD8 陽性単球の解析. 第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15-17, ホテル日航金沢 (金沢).
- 33) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 吉木敬, 尾崎承一. 顕微鏡的多発血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第 54 回日本病理学会秋期特別総会, 2008. 11. 20-21, 松山市総合コミュニケーションセンター (松山).
- 34) Ishizu A, Tomaru U, Iwasaki S, Iinuma C, Baba T, Sasaki N, Kasahara M, Yoshiki T. The mechanism of vascular injury induced by T-cells autoreactive with endothelial cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008. 12. 1-3, 国立京都国際会館 (京都).
- 35) Tomaru U, Ishizu A, Miyatake Y, Murata S, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Tanaka K, Kasahara M. Preferential expression of proteasome subunit・5t in the human thymus. 第

38 回日本免疫学会総会・学術集会,  
2008.12.1-3, 国立京都国際会館(京都).

- 36) Iwasaki S, Baba T, Masuda S, Katsumata  
K, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. CD8+  
monocytes in human peripheral blood.  
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会,  
2008.12.1-3, 国立京都国際会館(京都).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 自己免疫疾患の被験者に対する治療効果の予測方法

発明者: 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一,

吉木 敬, 尾崎承一

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 2007-253402, 2008-240155

出願年月日: 2008 年 12 月

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.hs.hokudai.ac.jp/graduate/  
study/member/index.html](http://www.hs.hokudai.ac.jp/graduate/study/member/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石津 明洋 (ISHIZU AKIHIRO)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号: 60321957

### (2) 研究分担者

外丸 詩野 (TOMARU UTANO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 20360901

岩崎 沙理 (IWASAKI SARI)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教

(H21: 助教→客員研究員)

研究者番号: 60455631