

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659171

研究課題名(和文)自己血管内皮細胞反応性NKT細胞による中小型血管炎発症モデル

研究課題名(英文)Medium-to-small vessel vasculitis induced by NKT cells that react with vascular endothelial cells

研究代表者

石津 明洋(Ishizu, Akihiro)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：60321957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：中小型血管炎を発症するモデルラットから単離した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ので、VASC-1はNKT細胞であるといえる。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 $\alpha$ -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。

研究成果の概要(英文)：A T cell clone reactive with rat vascular endothelial cells (REC) was established from the rat model of medium-to-small vessel vasculitis and named VASC-1. Intravenous injection of VASC-1 induced small vessel vasculitis (SVV) in normal recipients. After interaction with REC, several cytokines were produced from VASC-1, which was inhibited by blocking of CD1d on the REC surface. The collective findings indicated VASC-1 as an NKT cell clone. NKT cells are classified into type I and II. Type I NKT cells are characterized by expression of semi-invariant TCRs and potential to bind to marine sponge-derived  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) loaded on CD1d; whereas, type II NKT cells do not manifest the characteristics. VASC-1 exhibited a usage of TCR other than the type I invariant TCR and did not bind to  $\alpha$ -GalCer-loaded CD1d; therefore, it was regarded as a type II NKT cell clone. These evidences suggested that REC-reactive type II NKT cells could be involved in the pathogenesis of SVV.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：血管炎 血管内皮細胞 自己免疫 NKT細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト中・小型血管炎の病因は多様である。免疫複合体の沈着や抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の関与など原因が判明しているものもあるが、未だ原因不明のものも少なくない。応募者らは、免疫複合体ならびに ANCA に非依存的な中・小型血管炎を発症する env-pX ラットの解析において、胸腺で分化障害をきたした自己血管反応性細胞が血管炎の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (Yamazaki H, et al. *Int Immunol* 9: 339-346, 1997; Fugo K, et al. *Am J Pathol* 161: 755-761, 2002; Higuchi M, et al. *J Autoimmun* 20: 43-49, 2003; Hayase H, et al. *Int Immunol* 17: 677-684, 2005)。これまでに、env-pX ラットのリンパ節から自己の血管内皮細胞 (EC) に反応する細胞を単離することに成功し、これを 1B8 と名付けた。1B8 を正常ラットに静注することにより血管炎が誘導されることから、1B8 の血管炎惹起性が確認されている。1B8 は TCR<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> の細胞で、サイトカインプロファイルは IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-2<sup>-</sup> IL-4<sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup> を示す。応募者らは、これらの特性から、1B8 は NKT 細胞ではないかと着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、中・小型血管炎の発症における自己 EC 反応性 NKT 細胞の関与について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 1B8 が NKT 細胞であることを確実にする。
- (2) 1B8 が認識する EC 抗原を同定する。
- (3) 1B8 が EC と反応した後、血管炎を誘導する機序を明らかにする。
- (4) ヒト中小型血管炎における NKT 細胞の関与を証明する。

## 4. 研究成果

1B8 (VASC-1 と改名) はラット培養 EC と反応して相互に活性化し、小型血管炎を誘導する。EC 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 細胞であることが確認された。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  $\alpha$ -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 EC 反応性 type II NKT 細胞が関与していると考えられる。

## 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 17 件)

- 1) 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) DOI: 10.1681/ASN.2013060606. [査読有]

- 2) 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* 44(4): 1005-1015, 2014. DOI: 10.1002/eji.201343434. [査読有]
- 3) 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* 32(1): 149-150, 2014. <http://www.clinexprheumatol.org/pubmed/find-pii.asp?pii=24321560>. [査読有]
- 4) 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* 40(12): 955-961, 2013. DOI: 10.1111/1346-8138.12303. [査読有]
- 5) 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. DOI: 10.1007/s10157-012-0738-8. [査読有]
- 6) Masuda S, Iwasaki S, Tomaru U, Baba T, Katsumata K, Ishizu A. Possible implication of Fc receptor-mediated trogocytosis in susceptibility to systemic autoimmune disease. *Clin Dev Immunol* 2013: 345745, 2013. DOI: 10.1155/2013/345745. [査読有]
- 7) 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. DOI:

- 10.1093/rheumatology/ket159. [査読有]
- 8) 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0063182. [査読有]
- 9) 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. DOI: 10.2340/00015555-1418. [査読有]
- 10) 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. [査読無]
- 11) 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. [査読無]
- 12) 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. [査読無]
- 13) 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. [査読無]
- 14) Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps induced by propylthiouracil: Implication of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 64(11): 3779-3787, 2012. DOI: 10.1002/art.34619. [査読有]
- 15) Ozaki S, Atsumi T, Hayashi T, Ishizu A, Kobayashi S, Kumagai S, Kurihara Y, Kurokawa MS, Makino H, Nagafuchi H, Nakabayashi K, Nishimoto N, Suka M, Tomino Y, Yamada H, Yamagata K, Yoshida M, Yumura W for the JMAAV Study Group. Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study. *Mod Rheumatol* 22(3): 394-404, 2012. DOI: 10.1007/s10165-011-0525-5. [査読有]
- 16) Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol* 3: 333, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00333. [査読有]
- 17) Ishizu A, Yoshiki T. Pathogenesis of vasculitis in env-pX rats. *Ann Vasc Dis* 5(3): 296-299, 2012. DOI: 10.3400/avd.ra.12.00063. [査読有]
- [学会発表](計 19 件)
- 1) Kawakami A, Iinuma C, Waki M, Yamaguchi M, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. Establishment of NKT cell clone from vasculitis-prone rats, which recognizes autoantigen but not  $\alpha$ -galactosylceramide presented by CD1d. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, 千葉, 2013.12.11-13.
- 2) Nakazawa D, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Shida H, Atsumi T, Ishizu A. 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.
- 3) 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, 2013.6.6-8.
- 4) 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, 2013.6.6-8.
- 5) 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, 2013.6.6-8.
- 6) 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

- の一部検例 .第 102 回日本病理学会総会 , 札幌 , 2013.6.6-8.
- 7) 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 .4.18-20.
  - 8) Ishizu A, Tomaru U, Iinuma C, Waki M, Kawakami A, Sasaki N, Yoshiki T. Implication of vascular endothelial cell-reactive NKT cells in pathogenesis of small vessel vasculitis in rats. 16<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop. April 14-17, 2013. Paris, France.
  - 9) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Yamamoto T, Atsumi T, Yoshiki T. Prediction of outcome of treatment by gene expression profiling of peripheral blood in patients with microscopic polyangiitis. 16<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop. April 14-17, 2013. Paris, France.
  - 10) Nakazawa D, Tomaru U, Jodo S, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. 16<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop. April 14-17, 2013. Paris, France.
  - 11) Nakazawa D, Tomaru U, Nishio S, Atsumi T, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) induced by propylthiouracil (PTU): Implication of disordered NETs in MPO-ANCA-associated vasculitis (MPO-AAV). 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 , 神戸 , 2012.12.5-7.
  - 12) 石津明洋 . 血管炎の新分類と新たな発症メカニズムの提唱 . 第 9 回日本病理学会カンファレンス , 山口 , 2012.8.7.
  - 13) 石津明洋, 外丸詩野, 吉木 敬 . 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 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 , 東京 , 2012.4.26-28.
  - 14) 中沢大悟, 外丸詩野, 石津明洋 . プロピルチオウラシルによる NETs (neutrophil extracellular traps)の形成および分解障害と MPO-ANCA の産生 : MPO-ANCA 関連血管炎の発症機序 . 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 , 東京 , 2012.4.26-28.
  - 15) 川上民裕, 石津明洋, 有村義宏 . 皮膚型結節性多発動脈炎における血中抗 LAMP-2 抗体は上昇している . 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 , 東京 , 2012.4.26-28.
  - 16) Ishizu A. Autoreactive NKT cell-mediated small vessel vasculitis in rats. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.
  - 17) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Yamamoto T, Yoshiki T, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Kurokawa MS, Suka M, Makino H, Ozaki S. Prediction of prognosis by gene expression profiling of peripheral blood in Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis after standard treatment: JMAAV subanalysis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.
  - 18) Nakazawa D, Nishio S, Shibasaki S, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal formation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps induced by propylthiouracil are implicated in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.
  - 19) Takeuchi S, Soma Y, Waki M, Yamaguchi M, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. The presence of anti-LAMP-2 antibody induces cutaneous vasculitis of rats. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. March 28-31, 2012. Shinagawa, Tokyo, Japan.
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)
- 名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :
- 取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

北海道大学学術成果コレクション (HUSCAP)  
<http://hdl.handle.net/2115/54623>  
<http://hdl.handle.net/2115/54630>  
<http://hdl.handle.net/2115/54674>  
<http://hdl.handle.net/2115/54864>

## 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：6 0 3 2 1 9 5 7

### (2) 研究分担者なし