

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293082

研究課題名(和文) 顕微鏡的多発血管炎の克服に向けた基礎・臨床包括的アプローチ

研究課題名(英文) Basic and clinical strategy to overcome microscopic polyangiitis

研究代表者

石津 明洋 (Ishizu, Akihiro)

北海道大学・保健学研究科・教授

研究者番号：60321957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroでのNETs形成は、ヒストン脱イミノ化に不可欠なPADの阻害薬Cl-amidineにより有意に抑制された。In vivoでも、Cl-amidineにより腹膜NETsの形成、血中MPO-ANCA産生が有意に抑制された。

治療前後の末梢血の遺伝子(IRF7, IFIT1, IFIT5, OASL, CLC, GBP-1, PSMB9, HERC5, CCR1, CD36, MS4A4A, BIRC4BP, PLSCR1, DEFA1/DEFA3, DEFA4, COL9A2)の発現変化を指標とすることで、MPAの治療反応性不良群を感度85.7%、特異度96.9%で予測可能であった。

研究成果の概要(英文)：In vitro neutrophil extracellular trap (NET) formation was inhibited significantly by a peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitor Cl-amidine. Serum MPO-ANCA titers of mice given Cl-amidine were significantly lower than those of control mice. The amounts of peritoneal NETs in the mice given Cl-amidine was significantly smaller than those in control mice.

Response to remission induction therapy can be predicted by monitoring the altered expressions of the 16 genes, including IRF7, IFIT1, IFIT5, OASL, CLC, GBP-1, PSMB9, HERC5, CCR1, CD36, MS4A4A, BIRC4BP, PLSCR1, DEFA1/DEFA3, DEFA4, and COL9A2, in the peripheral blood at an early point of treatment in MPA patients with high sensitivity (85.7%) and specificity (96.9%).

研究分野：病理学

キーワード：顕微鏡的多発血管炎 好中球細胞外トラップ PAD阻害薬 治療反応性予測

1. 研究開始当初の背景

MPO-ANCA の出現を伴う顕微鏡的多発血管炎 (MPA) は、欧米に比べて本邦に多い血管炎である。高齢者に好発し、しばしば半月体形成性壊死性糸球体腎炎から急速進行性腎障害をきたす。重篤な場合には肺出血などの合併症を伴って死亡することもある。病因としては自己免疫機序が想定されているものの、その詳細は不明であるため、治療としては非特異的な免疫抑制療法が行われるにとどまり、治療に難渋することも少なくない。

そこで、研究代表者らは MPA の本邦における標準的治療プロトコルの策定を目的として、多施設共同前向き臨床試験 JMAAV を実施した (研究代表者: 聖マリアンナ医科大学: 尾崎承一教授)。JMAAV 試験では、全国から集められた MPA 患者 48 症例に対し、重症度別に策定された治療が施され、18 ヶ月間のフォローアップが行われた。その結果、策定した治療プロトコルによる寛解導入率は 89.4% と高いものであったが、一方で再燃率が 19.0% であり、死亡率も 10.6% であった。

この結果を踏まえ、研究代表者らは MPA の予後改善のために、次の 2 点を解決することが必要であるとの着想に至った。ひとつは MPA の原因究明である。先行研究により、MPO-ANCA 自体の病原性が確認されているが、患者でなぜ MPO-ANCA が産生されるかは不明であった。この点について、研究代表者らは抗甲状腺薬プロピルチオウラシル (PTU) などの薬剤が MPO-ANCA の産生を誘導し、MPA を誘発する可能性があることをヒントに、好中球細胞死の一形態である好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) の異常が MPA 発症の一因となっていることを突き止めた。生体内において NETs の異常を誘導し、MPO-ANCA の産生に引き続いて MPA を発症する動物モデルを作製すれば、発症機序に即した特異的な分子標的治療法の開発が可能になり、本疾患患者のさらなる予後改善につながると思われる。

もうひとつは、治療開始後の早期に治療効果を予測する病態診断方法の確立である。JMAAV 試験では、初診時の重症度別に策定されたプロトコルに従い治療を行い、ほとんどの症例で一旦は寛解が得られた。しかしながら、そのうちの約 2 割が再燃し、その後の治療を難しくした。現状では治療効果の判定に少なくとも 1 ヶ月半の経過観察を要するが、治療開始後の早期に非寛解症例や再燃症例を予測できれば、薬剤の変更により寛解を誘導し、また、厳重な経過観察や付加的治療によって再燃を未然に防ぐことにより、治療予後を改善することが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

MPA のさらなる予後改善を目的として、基礎・臨床包括的なアプローチを行う。基礎的

に即した新たな分子標的治療法の開発を目指す。臨床的には、治療開始後の早期に治療効果を予測する新たな病態診断法を確立する。

3. 研究の方法

1) MPA の動物モデルの開発

マウスに PTU と phorbol myristate acetate (PMA) を投与し、MPA のマウスモデルを作製する。作製した MPA モデルマウスに、NETs 形成に不可欠なヒストン脱イミノ化の過程を阻害する peptidylarginine deiminase (PAD) の阻害薬 Cl-amidine を投与し、その発症抑制効果、治療効果を検討する。

2) MPA に対する標準的治療の効果を治療開始後の早期に予測する方法の確立

MPA に対する標準的治療の効果を治療開始後の早期に予測する方法の精度を前向きに検証する。この検証には、連携研究者 (杏林大学医学部第一内科 有村義宏、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 佐田憲映) の所属する各施設において、研究倫理審査委員会の承認を得たうえで、書面によるインフォームド・コンセントが得られた MPA 患者 32 名の末梢血 64 サンプル (治療前と治療開始の 1 週間後のペアサンプル) を用いる。すでに抽出しているマーカー遺伝子 16 個 (IRF7, IFIT1, IFIT5, OASL, CLC, GBP-1, PSMB9, HERC5, CCR1, CD36, MS4A4A, BIRC4BP, PLSCR1, DEFA1/DEFA3, DEFA4, COL9A2) について、治療前後での発現変化を multiplex real-time RT-PCR 法により測定し、6 ヶ月後の治療効果を予測する。実際の治療効果と照合し、その精度 (感度と特異度) を検証する。

4. 研究成果

In vitro で誘導される NETs 形成は、Cl-amidine により有意に抑制された。In vivo でも、Cl-amidine 投与群において腹膜における NETs の形成が抑制され、血中 MPO-ANCA 値が PBS 投与群に比べて有意に低値であった。

治療開始前後に末梢血の 16 個の遺伝子の発現変化を調べることにより、MPA の治療反応性不良群を感度 85.7%、特異度 96.9% で治療開始後の早期に予測可能であった。治療の効果が判明するのに、通常は 1 ヶ月程度を要するのが現状である。この間に治療反応性不良群を一部でも抽出できれば、厳重な経過観察や付加的治療を行うことなどにより、MPA の予後を改善することにつながる可能性がある。

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 15 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* 25(6): 990-997, 2014. DOI: 10.1681/ASN.2013060606. (査読有)
2. Iinuma C, Waki M, Kawakami A, Yamaguchi M, Tomaru U, Sasaki N, Masuda S, Matsui Y, Iwasaki S, Baba T, Kasahara M, Yoshiki T, Paletta D, Herrmann T, Ishizu A. Establishment of vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from rat model of autoimmune vasculitis. *Int Immunol* 27(2): 105-114, 2015. DOI: 10.1093/intimm/dxu088. (査読有)
 3. Iwasaki S, Suzuki A, Fujisawa T, Sato T, Shirai S, Kamigaki M, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Fatal cardiac small vessel involvement in ANCA-associated vasculitis: an autopsy case report. *Cardiovasc Pathol* 24(6): 408-410, 2015. DOI: 10.1016/j.carpath.2015.07.005. (査読有)
 4. Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J Autoimmun* 67: 19-28, 2016. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.08.018. (査読有)
 5. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta* 459: 89-93, 2016. DOI: 10.1016/j.cca.2016.05.029. (査読有)
 6. Kusunoki Y, Nakazawa D, Shida H, Hattanda F, Miyoshi A, Masuda S, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. Peptidylarginine deiminase inhibitor suppresses neutrophil extracellular trap formation and MPO-ANCA production. *Front Immunol* 7: 227, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00227. (査読有)
 7. Matsuda Y, Hamayasu H, Seki A, Nonaka K, Wang T, Matsumoto T, Hamano Y, Sumikura H, Kumasaka T, Murayama S, Ishizu A, Shimizu A, Sugihara T, Arai T. Presence of citrullinated histone H3-positive neutrophils in microscopic polyangiitis from the early phase: An autopsy proven case. *Pathol Int* 66(8): 466-471, 2016. DOI: 10.1111/pin.12434. (査読有)
 8. Sada KE, Harigai M, Amano K, Atsumi T, Fujimoto S, Yuzawa Y, Takasaki Y, Banno S, Sugihara T, Kobayashi M, Usui J, Yamagata K, Homma S, Dobasi H, Tsuboi N, Ishizu A, Sugiyama H, Okada Y, Arimura Y, Matsuo S, Makino H, for Research Committee of Intractable Vasculitis Syndrome and Research Committee of Intractable Renal Disease of the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. Comparison of severity classification in Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in a nationwide, prospective, inception cohort study. *Mod Rheumatol* 26(5): 730-737, 2016. DOI: 10.3109/14397595.2016.1140274. (査読有)
 9. Shida H, Nakazawa D, Tateyama Y, Miyoshi A, Kusunoki Y, Hattanda F, Masuda S, Tomaru U, Kawakami T, Atsumi T, Ishizu A. The presence of anti-lactoferrin antibodies in a subgroup of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis patients and their possible contribution to enhancement of neutrophil extracellular trap formation. *Front Immunol* 7: 636, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00636. (査読有)
 10. Nishioka Y, Yamaguchi M, Kawakami A, Munehiro M, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Type II natural killer T cells that recognize sterol carrier protein 2 are implicated in vascular inflammation in the rat model of systemic connective tissue diseases. *Am J Pathol* 187(1): 176-186, 2017. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.09.014. (査読有)
 11. 中沢大悟, 西尾妙織, 外丸詩野, 渥美達也, 石津明洋 血管炎の発症機序とNETs. *日本腎臓学会誌* 56(2): 117-123, 2014. (査読無)
 12. 山村昌弘, 佐田憲映, 針谷正祥, 藤井隆夫, 石津明洋, 有村義宏, 榎野博史 1. 免疫と内科疾患 その病態と治療最前線. 5) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の病態と治療の最前線. *日本内科学会雑誌* 103(9): 2012-2129, 2014. (査読無)

13. 石津明洋 . 好中球細胞外トラップの異常と MPO-ANCA 関連血管炎 . 日本小児腎臓学雑誌 27(2): 81-85, 2014. (査読無)
 14. 石津明洋 . 特集2: NETsの臨床における意義 . NETsと血管炎 . 日本血栓止血学会誌 27(1): 42-48, 2016. (査読無)
 15. 石津明洋 . ANCA関連血管炎の病態メカニズム . 日本臨床免疫学会会誌 39(6): 491-496, 2016. (査読無)
- [学会発表](計 21 件)
1. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. NETs-ANCA vicious cycle in MPO-ANCA-associated vasculitis. International Concurrent Workshop Vasculitis, immunity, and inflammation. 2014.4.26. グランドプリンスホテル新高輪, 東京都港区.
 2. 石津明洋 . ANCA による血管傷害機序 . 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム「ANCA 関連血管炎のアップデート」. 2014.4.26. グランドプリンスホテル新高輪, 東京都港区, 2014 .
 3. 石津明洋 . 好中球細胞外トラップの異常と MPO-ANCA 関連血管炎 . 第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会教育講演 . 2014.6.5. 秋田ビューホテル, 秋田県秋田市 .
 4. Ishizu A, Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Yoshida M. NETs-ANCA vicious cycle in MPO-ANCA-associated vasculitis. 17th International Vasculitis and ANCA Workshop. 2015.4.21. The Business Design Centre, Islington, London.
 5. Ishizu A, Iinuma C, Waki M, Yamaguchi M, Kawakami A, Nishioka Y, Sasaki N, Tomaru U, Yoshiki T, Paletta D, Herrmann T. Establishment of vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from rat model of autoimmune vasculitis. 17th International Vasculitis and ANCA Workshop. 2015.4.21. The Business Design Centre, Islington, London.
 6. 志田玄貴, 中沢大悟, 外丸詩野, 川上民裕, 渥美達也, 石津明洋 . 抗ラクトフェリン抗体の病原性 . 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会ワークショップ「血管炎」. 2015.4.24. 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市 .
 7. 石津明洋 . MPO-ANCA 関連血管炎における NETs-ANCA 悪循環 . 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム「ANCA 関連血管炎の Update」. 2015.4.25. 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市 .
 8. Ishizu A, Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T. Macrophages transiently reinforce neutrophil extracellular trap (NET)-related immunity and thereafter remove neutrophils that undergo NETosis. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 . 2015.11.18. 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市 .
 9. Nishioka Y, Yamaguchi M, Kawakami A, Munehiro M, Tomaru U, Ishizu A. Identification of autoantigen recognized by rat vascular endothelial cell-reactive vasculitis-inducible type II NKT cell clone. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 . 2015.11.18. 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市 .
 10. 佐田憲映, 針谷正祥, 臼井丈一, 山縣邦弘, 本間 栄, 土橋浩章, 石津明洋, 杉山 斉, 岡田保典, 有村義宏, 榎野博史 . 前向きコホート研究 RemIT-JAV-RPGN における抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の寛解に関する検討 . 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 2016.4.21. パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市 .
 11. 志田玄貴, 中沢大悟, 八反田文彦, 楠 由宏, 益田紗季子, 外丸詩野, 川上民裕, 渥美達也, 石津明洋 . 抗ラクトフェリン抗体は好酸球性多発血管炎性肉芽腫症において好中球細胞外トラップの形成を促進し, 疾患活動性に関与する . 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 2016.4.23. パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市 .
 12. 楠 由宏, 中沢大悟, 志田玄貴, 八反田文彦, 益田紗季子, 外丸詩野, 西尾妙織, 渥美達也, 石津明洋 . Peptidylarginine deiminase 4 阻害薬は好中球細胞外トラップの形成阻害を介して MPO-ANCA 産生を抑制する . 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 2016.4.23. パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市 .
 13. 石津明洋 . ANCA 関連血管炎の臨床病理学的特徴と好中球細胞外トラップ NETs . 第 105 回日本病理学会総会シンポジウム「血管炎の病理学」. 2016.5.12. 仙台国際センター, 宮城県仙台市 .

14. 西岡佑介, 山口まどか, 川上 愛, 宗廣真矢, 山田真衣, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 自己血管内皮細胞反応性小型血管炎惹起性 type II NKT 細胞が認識する分子の同定. 第 105 回日本病理学会総会. 2016.5.13. 仙台国際センター, 宮城県仙台市.
15. 石津明洋. 血管炎新分類 (CHCC2012) と皮膚血管炎の位置づけ 病理医の視線で. 第 115 回日本皮膚科学会総会教育講演「血管炎の新分類と皮膚血管炎の位置づけ」. 2016.6.5. 国立京都国際会館, 京都府京都市.
16. 石津明洋. 皮膚科領域でみる血管炎の病理組織像からのアプローチ. 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会シンポジウム「血管炎の診断と治療の未来像」. 2016.11.5. 京王プラザホテル, 東京都新宿区.
17. Nishioka Y, Yamaguchi M, Kawakami A, Sonoda T, Yamada M, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Type II NKT cells that recognize sterol carrier protein 2 are implicated in vascular inflammation in the rat model of systemic connective tissue diseases. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会. 2016.12.5. 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県宜野湾市.
18. Nishioka Y, Yamaguchi M, Kawakami A, Munehiro M, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Rat type II NKT cell clone pathogenic for small vessel vasculitis recognizes sterol carrier protein 2. The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop. 2017.3.27. 伊藤国際学術センター, 東京都文京区.
19. Ogawa Y, Joh K, Muso E, Kondo N, Takagi Y, Ishizu A. Pathological analysis on the role of small vessel vasculitis and tubule-interstitial lesions in ANCA-associated nephritis. The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop. 2017.3.28. 伊藤国際学術センター, 東京都文京区.
20. Kusunoki Y, Nakazawa D, Shida H, Hattanda F, Miyoshi A, Masuda S, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. The effect of peptidylarginine deiminase inhibitor on NET formation and MPO-ANCA production in mouse model. The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop. 2017.3.28. 東京大学安田講堂, 東京都文京区.
21. Sada KE, Harigai M, Usui J, Tsuboi N, Dobashi H, Ishizu A, Sugiyama H, Yamagata K, Homma S, Okada Y, Arimura Y. Usefulness of concomitant cyclophosphamide for treatment of generalized or severe patients with microscopic polyangiitis or granulomatosis with polyangiitis in Japan. The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop. 2017.3.28. 東京大学安田講堂, 東京都文京区.

〔図書〕(計 2 件)

1. 石津明洋. E. 血管炎 6a. ANCA 関連血管炎 総論. リウマチ病学テキスト (改訂第 2 版) 262-264, 2015.
2. 石津明洋, 外丸詩野, 堀田哲也. 顕微鏡的多発血管炎の再燃に対するリツキシマブ投与後に, 呼吸不全で死亡した女性. 臨床病理検討会の進め方・活かし方 CPC の作法 17-24, 2016.

〔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〕

ホームページ等
 北海道大学学術成果コレクション (HUSCAP)
<http://hdl.handle.net/2115/54674>
<http://hdl.handle.net/2115/59840>
<http://hdl.handle.net/2115/61171>
<http://hdl.handle.net/2115/62351>
<http://hdl.handle.net/2115/62574>
<http://hdl.handle.net/2115/63950>
<http://hdl.handle.net/2115/64033>
<http://hdl.handle.net/2115/64475>

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・准教授
研究者番号：20360901

(3)連携研究者

有村義宏 (Arimura, Yoshihiro)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：40222765

佐田憲映 (Sada, Ken-ei)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
講師
研究者番号：70423308

(4)研究協力者なし