

平成30年 6月19日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20262

研究課題名(和文) ANCA関連血管炎の早期診断法の確立と中耳炎発症機構の解析

研究課題名(英文) Pathogenic mechanism of otitis media with ANCA associated vasculitis and development of a diagnostic algorithm for early diagnosis

研究代表者

立山 香織 (Tateyama, Kaori)

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：00771958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ANCA(抗体好中球細胞質抗体)関連血管炎は全身をめぐる血管のうち主に細い血管に炎症をきたす結果、生命に危険をおかす臓器障害を生じる疾患である。しばしば、不可逆性の難聴や顔面神経麻痺を合併するような難治性中耳炎や、鞍鼻(鼻が低くなる)をきたすような鼻粘膜の壊死病変など耳鼻咽喉病変で初発する。しかし、初期の段階では診断に有用なANCAが陰性であり診断に難渋することが少なくない。今回、我々は様々なANCA測定方法を用いて、本疾患の早期診断のための検査方法のアルゴリズムを作成し提案した。また、病態解明のために本疾患の発症トリガーとなる中耳への細菌感染の関与について証明する研究を行った。

研究成果の概要(英文)：ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) -associated vasculitis is a disease that causes life threatening organ dysfunction as a result of inflammation mainly in small blood vessels of the whole body. Initial symptom is often seen in ear, nose and throat lesions such as refractory otitis media that complicates irreversible hearing loss and facial nerve paralysis and necrotizing lesions of the nasal mucosa that leads to saddle nose (low nose). However, in the early stage, ANCA which is useful for diagnosis is negative and it is often difficult to diagnose. In this study, we developed and proposed an algorithm of the examination method for early diagnosis of this disease using various ANCA measurement methods. In order to clarify the pathology of the disease, a study was conducted to prove the involvement of bacterial infection in the middle ear, which triggers the onset of the disease.

研究分野：otology

キーワード：抗好中球細胞質抗体 ANCA関連血管炎 ANCA陰性 ANCA関連血管炎性中耳炎 抗LAMP2抗体

1. 研究開始当初の背景

ANCA 関連血管炎は、耳鼻咽喉科領域の諸症状を初発症状として発症し難治性の経過を辿る全身性疾患である。より早期の治療開始が望まれるが、ANCA 陰性例や組織検査にて血管炎の所見が得られない症例が多く存在し、しばしば診断に難渋する。現在既存の ANCA 抗体検査は診断のために重要であるが、頭頸部領域に局限した AAV の約半数は ANCA 陰性であり、ANCA 陰性であっても本疾患を否定できない。その背景として、現在の測定法では ANCA を同定できない可能性や PR3 及び MPO 以外 ANCA 対応抗原 (minor ANCA) が関与している可能性、さらに ANCA 関連血管炎が原因でない未知の疾患の可能性が推察されている。さらに、血管炎の病態に関わる ANCA 対応抗原として、Lysosomal-associated membrane protein-2 (LAMP-2) が注目されており、ANCA 陰性例であっても診断及び再燃時のマーカーとして有効である可能性が示唆されている。

また、ANCA 関連血管炎が頭頸部領域の炎症や肉芽腫性病変をきたすことは知られているが、その病態は不明である。既存の ANCA 関連血管炎のモデルマウスは、肺や腎病変の病態解明に重要な役割を果たしているが、中耳炎の発症機序、さらに難聴や顔面神経麻痺、肥厚性硬膜炎を引き起こす病態を解析する研究は未だ行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、【1】患者血清を用い特に頭頸部領域に局限した ANCA 関連血管炎の早期診断のための検査方法や疾患マーカーの開発、【2】中耳病変を主体とした ANCA 関連血管炎性中耳炎 (OMAAV) の発症機序解明のため、中耳貯留液中の細菌学的検討を行うこと、である。

【1】ANCA 関連血管炎の早期診断のための検査方法、疾患マーカーの検討

臨床的に ANCA 関連血管炎を強く疑う経過や組織診断を認めるが、ANCA 陰性であった症例を集積し、抗原固相方式の異なる ELISA キットを用いた ANCA 測定、minor ANCA 測定、LAMP-2 抗体測定を行った。異なるエピトープ認識し本来 ANCA 陽性であるにも関わらず臨床検査で ANCA 陰性と診断される症例や、minor ANCA が病態に関与する症例がどの程度存在するか調べた。

【2】ANCA 関連血管炎性中耳炎の病態解明 ANCA 関連血管炎合併中耳炎モデルマウスの作製と免疫組織学的解析に先立ち、OMAAV を惹起する起炎菌を明らかにする必要があった。OMAAV の病態解明のため、発症トリガーに細菌感染が関与しているかどうか、どのような細菌が検出されるか、中耳貯留液中の細菌学的検討を行った。

3. 研究の方法

【1】ANCA 関連血管炎の早期診断のための検査方法、疾患マーカーの検討

GPA 患者 (疑い例含む) 29 例の血清を用い、臨床検査とは別に、抗原固相方式の異なる ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) キットによって ANCA を測定した。PR3-ANCA 測定には 3 種類の ELISA キット (direct 法、capture 法、anchor 法) を、MPO-ANCA 測定には 2 種類の ELISA キット (direct 法、capture 法) を使用した。また、間接蛍光抗体法による cytoplasmic (C)、perinuclear (P)-ANCA の有無、minor ANCA (anti-azurocidin antibody、anti-bactericidal permeability increasing protein (BPI) antibody、anti-cathepsin G antibody、anti-elastase antibody、anti-lactoferrin antibody、anti-lysozyme antibody) についても血清学的に検討した。

ELISA 試薬にて抗 LAMP-2 抗体を定量的に測定し、OMAAV13 例と健常者 6 名の抗 LAMP-2 抗体の平均値を比較した。また、OMAAV13 例中、治療開始前であり活動性病変を有する活動期血清 9 例と、維持療法中であり活動性病変のない非活動期血清 5 例についても比較を行った。さらに、病勢の指標となりうるかどうか、抗 LAMP-2 抗体、ANCA、と CRP 値の相関について検討した。

【2】ANCA 関連血管炎性中耳炎の病態解明 OMAAV および、成人滲出性中耳炎 (コントロール群) より採取した中耳貯留液を検体として培養検査、及び上気道感染の原因となる細菌 6 種類 (Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenza, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila, Streptococcus pyogenes) と Staphylococcus aureus について、RT-PCR (real time-polymerase chain reaction) を用いて検出した。

4. 研究成果

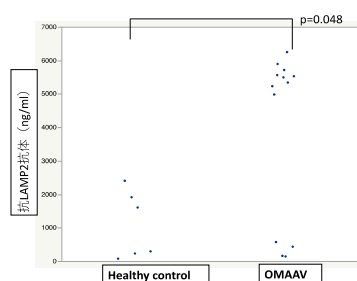
【1】臨床検査にて PR3、MPO-ANCA 陰性であった 17 例中、異なる測定法によって 4 例が PR3、または MPO-ANCA 陽性となり、3 例が minor ANCA 陽性となった (BPI-ANCA2 例、elastase-ANCA1 例)。間接蛍光抗体法による結果も合わせると、17 例中 8 例 (47.1%) が ANCA 陽性となった。ANCA 検出率は 29 例中 12 例 (41.4%) から 29 例中 20 例 (69.0%) となり有意な改善を認めた ($p=0.03$)。ひとつの測定法で陰性でも、異なる測定法で陽性となる場合もあり得ると考えた。また、PR3 及び MPO-ANCA 陰性症例で、その他の ANCA 関連自己抗体 (minor ANCA) 陽性の症例が存在し、病態に関与している可能性が考えられた。

表 1. ANCA negative patients in the clinical test.

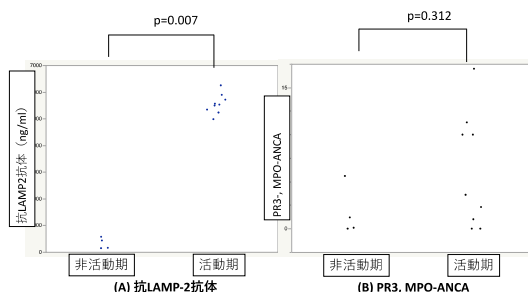
case	age	gender	legion in head	disease	clinical test	direct	capture	anchor PR3	IIF	minor ANCA
			ant. neck.	activity	PR3-MPO	PR3-MPO	PR3-MPO			
13	64	F	E	cat. HP	inactive	-	-	-	-	-
14	79	F	ELK	cat. nose	inactive	+	-	-	-	+(BP)
15	83	F	E	nose	inactive	-	-	-	-	-
16	63	F	EL	nose	inactive	+	-	-	-	-
17	39	F	EL	ear	active	-	-	+	-	-
18	50	M	E	nose	active	-	-	-	-	+(elastase)
19	76	F	EL	cat. nose	active	+	-	-	-	-
20	78	F	E	nose	active	+	-	-	-	-
21	37	F	E	nose	active	-	-	-	-	-
22	67	F	E	cat. HP	active	+	-	-	-	-
23	56	F	EL	nose, larynx	active	-	-	-	-	no data
24	59	M	E	cat. nose, FP	active	-	-	-	-	no data
25	38	M	E	nose	active	-	-	-	-	-
26	76	M	E	ear	active	-	-	-	-	+(BP)
27	58	F	E	ear	active	-	-	-	-	-
28	49	F	E	ear	active	-	-	-	-	+(P)
29	64	F	E	nose	active	-	-	-	-	+(P)

ANCA 関連血管炎性中耳炎における抗 LAMP-2 抗体発現

(A) OMAAV と健常者との比較：健常者は全て ANCA 陰性であることを確認した。抗 LAMP-2 抗体値は OMAAV (3947 ± 609 ng/ml) 健常者(1088 ± 1007ng/ml)であり、OMAAV で有意に高値であった (p=0.003)。



(B) OMAAV 活動期と非活動期血清の比較：OMAAV 活動期血清の抗 LAMP-2 抗体値は 327 ± 168 ng/ml、活動期血清は 5554 ± 372 ng/ml であり、活動期血清で有意に高値であった (p<0.0001)。



(C) 抗 LAMP-2 抗体と CRP 値, ANCA との相関：CRP 値と抗 LAMP-2 抗体は正の相関を示した (r=0.51, p=0.03)。一方、臨床検査で測定した ANCA 値と CRP 値は有意な相関は認めず (r=0.26, p=0.36) 抗 LAMP-2 抗体はより血管炎の病勢を反映すると考えられた。

【2】PCR で 1 つ以上の細菌を検出した 症例は OMAAV14 例中 12 例(86%)、コントロール群は 8 例中 2 例(25%)、培養検査では OMAAV7 例中 1 例(14%)、コントロール群で 4 例中 1 例(25%)であった。OMAAV では中耳への細菌感染が先行し、感染防御をきっかけに惹起された好中球の過剰活性化が自己免疫反応を引き起こしたと考えられた。

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 6 件)

1. Tateyama K, Kodama S, Kishibe K, et al. A novel strategy with combined assays for detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in clinically ANCA-negative granulomatosis with polyangiitis patients. *Auris Nasus Larynx*. 2017;44:735-741. 査読あり

2. Harabuchi Y, Kishibe K, Tateyama K, et al. Clinical features and treatment outcomes of otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (OMAAV): A retrospective analysis of 235 patients from a nationwide survey in Japan. *Mod Rheumatol*. 2017;27:87-94. 査読あり

3. 吉田尚弘, 原淵保明, 岸部幹, 立山香織, 森田由香, 他. ANCA 関連血管炎性中耳炎全国調査ワーキンググループ報告 ANCA 関連血管炎性中耳炎 (Otitis media with ANCA-associated vasculitis:OMAAV) 診断基準 2015 とその解説(解説). *Otol Jpn*. 2016; 26: 37-39. 査読なし

4. 立山香織. ANCA 関連血管炎性中耳炎 (OMAAV). *アレルギーと臨床*. 2017; 37: 40-44. 査読なし

5. 立山香織. ANCA 関連血管炎性中耳炎と肥厚性硬膜炎. *ENTONI*. 2018; 217: 47-51. 査読なし

6. 立山香織, 児玉悟, 渡辺哲生, 他. ANCA 関連血管炎性中耳炎の寛解導入治療後の聴力経過. *Otol Jpn*. 2018;28:19-24. 査読あり

[学会発表](計 6 件)

1. Tateyama K, Yoshida N, Kishibe K, et al. Clinical differences of otitis media with ANCA-associated vasculitis based on the type of ANCA: a retrospective multi-center study in Japan, *International Vasculitis & ANCA Workshop*, 2017, Tokyo

2. Tateyama K, Hirano T, Kodama S, et al. Relationship between minor antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) and otitis media with ANCA-associated vasculitis, 19th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2017, Goldcoast

3. 立山香織、平野隆、鈴木正志、岸部幹、原淵保明. ANCA 関連血管炎性中耳炎における抗 LAMP-2 抗体発現、第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2017、旭川市

4. 立山香織、川野利明、平野隆、岸部幹、岡田昌浩、太田有美、福井英人、原淵保明、鈴木正志. ANCA 関連血管炎性中耳炎のトリガーにおける細菌感染の関与 -中耳貯留液の細菌学的検討-、第 27 回耳科学会総会・学術講演会、2017、横浜市

5. 立山香織、児玉悟、鈴木正志、國本泰臣、岸部幹、原淵保明. ANCA 関連血管炎における minor ANCA 測定の意義、第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会、2016、名古屋市

6. 立山香織、平野隆、渡辺哲生、鈴木正志. ANCA 関連血管炎性中耳炎の治療後聴力経過と予後 —突発性難聴との比較検討—、第 26 回日本耳鼻科学会総会・学術講演会、2016、長野市

〔図書〕(計 1 件)

1. 原淵 保明, 吉田 尚弘, 岸部 幹, 立山 香織, 他 ANCA 関連血管炎中耳炎(OMAAV)診療の手引き, 2016, 金原出版

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

立山香織 (Tateyama, Kaori)
大分大学・医学部・病院特任助教
研究者番号：00771958

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()