

学 位 論 文 題 名

MPO-ANCA関連血管炎における  
Neutrophil Extracellular Trapsの関与

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

MPO-ANCA 関連血管炎 (MPO-AAV)は欧米に比べてわが国に多い血管炎である。好中球の細胞質に存在するミエロペルオキシダーゼ (MPO) に対する自己抗体 (MPO-ANCA) の出現を伴って、しばしば半月体形成性糸球体腎炎から急速進行性腎障害をきたし、重篤な場合には肺出血をきたして死亡することもある。先行研究において MPO-ANCA の病原性が確認されているが、なぜ MPO-ANCA が産生されるかは不明のままである。そのため、治療は非特異的かつ強力な免疫抑制治療に頼らざるを得ず、疾患を制御することが困難な上、過剰治療による治療関連死が多いことが問題となっており、本研究では MPO-ANCA の産生機序を解析する事を目的とした。

Neutrophil Extracellular Traps (NETs)は 2004 年に報告された好中球の細胞死形態の一つで、食食に引き続き、細胞死に至る好中球が MPO 等の細胞質内抗菌蛋白と核 DNA を細胞外にファイバー状に放出することにより形成され、細胞死に至った後も微生物を捕捉して殺菌する。しかし、近年この NETs が自己免疫疾患と関与すると報告され、特に ANCA 関連血管炎患者の腎糸球体半月体部位や血清で NETs が検出され、病態の悪循環を招いている可能性が指摘されている。一方、パセドウ病の治療薬であるプロピルチオウラシル (PTU)は、投与された患者の 30%に MPO-ANCA 産生を誘導する。PTU の一部は MPO で代謝されることが知られており、本研究では、PTU が NETs の形成や代謝に影響を与え、MPO-ANCA の産生に関与するという仮説を立てた。

【材料と方法】

1. PTU による NETs の形成異常と分解障害

ヒト末梢血から好中球を分離し、20nM の PMA で NETs を誘導し、同時に PTU 20  $\mu$  M 添加の有無に分けて 2 時間培養し、NETs 形態を観察した。NETs 誘導後に 1U/mL の DNase I を加え 15 分反応させた後、PTU 添加の有無による NETs の分解程度を観察した。また、NETs 形成には、好中球の核が脱凝縮を起こし、核と細胞質が融合する準備段階が必要であり、これにはヒストンのシトルリン化が関与している。そこで、PTU 添加の有無で PMA 刺激した好中球から蛋白を抽出し、Western blot 法でヒストンのシトルリン化を検討した。

2. PTU 添加により形成された異常な NETs が MPO-ANCA 産生の原因となっているかを解析するため、二つの動物モデルを作成した。① PTU 添加 NETs 免疫モデル: 8 週齢雄の WKY ラットに *in vitro* でラット好中球から誘導したラット NETs (PTU 添加の有無に分けて) を同量の完全型アジュバントと混合し、0 日目と 7 日目に WKY ラットに免疫した。14 日目と 21 日目にはそれぞれの NETs のみを腹腔内に投与した。② PTU 経口投与に PMA 腹腔内投与を併用したモデル: WKY ラットに PMA(1  $\mu$  g/body)を 0 日目

と7日目に腹腔内注射し、PTU(10mg/day/body)を30日間経口投与した(PTU/PMAラット)。コントロールとしてPMA腹腔内注射のみ行ったラット(PMAラット)を解析した。両ラットとも採血、採尿を行い、MPO-ANCAの産生、生化学検査を行い、30日目に解剖し組織学的に検討した。

【結果】 PMAにより刺激された好中球はMPOとともにクロマチンファイバーを細胞周囲に放出してNETsを形成したのに対し、PMAにPTUを添加して作製したNETsは、MPOとDNAは混合されるものの、クロマチンファイバーは伸展せず、異常な形態を示した。Western blot法でヒストンのシトルリン化を検討したところ、PTUの有無によらずシトルリン化ヒストンが観察された。すなわち、PMAとともにPTUを添加した好中球においても、NETsは形成されているが、その形態が異常であることが確認された。次に、PTU添加の有無で誘導したNETsをDNase I処理により分解する実験を行ったところ、PTUを添加せずに誘導したNETsは分解されるが、PTUを添加して誘導した異常なNETsはDNase Iで分解されず、DNA、MPOとも残存することがわかった。このことから、PTUを添加して誘導される異常な形態のNETsは、DNase Iによる分解障害をきたすことが示唆され、この分解されにくいMPO蛋白を内包するNETsが、MPOに対する免疫寛容を破綻させるという仮説を立て、*in vivo*の実験を行った。PTUを添加しないNETsを免疫したラット(NETs免疫ラット)ではMPO-ANCAは産生されなかったが、PTU添加したNETsを免疫したラット(PTU/NETs免疫ラット)ではANCAの産生を認め、臓器病変として肺出血と肺毛細血管炎が認められた。しかし、腎組織では糸球体には明らかな腎炎の所見は見られなかった。そこで、WKYラットにPTUを経口投与し、同時にPMAを腹腔内注射するモデル(PTU/PMAラット)を作成したところ、MPO-ANCAが産生され、臓器病変としては肺出血が見られ、腎臓の病理所見では、糸球体に巣状分節性の増殖性病変と炎症細胞浸潤を認めた。

【考察】本研究は、PTUによりMPOなどの細胞内蛋白が異常なNETsとともに、細胞外に長期間存在することが、MPOに対する免疫寛容を破綻させ、MPO-ANCAの産生の関与する可能性が示唆した。自然発症の特発性MPO-AAVにおいても、感染症や遺伝要因、環境要因などがNETsの制御異常を惹起し、NETs成分に対する免疫寛容の破綻によりMPO-ANCAが産生される可能性がある。特にNETsを制御するDNase I活性に異常がある患者群が存在する事や、感染症においてはDNase I耐性菌の存在も知られるようになり、こうしたNETs制御異常を起こしうる要因とMPO-ANCAとの関係を解析することが、本疾患のさらなる病因・病態を解明する手がかりになると考えられる。現在、本疾患に対する標準治療とされるステロイドとエンドキサンの併用療法は、生命予後を大きく改善してきたが、治療開始からの短期間での死亡率は依然高く、その原因は疾患そのものよりも治療関連死、特に過剰治療による感染症死が多いと報告されている。この事は、本疾患の病態の本質がわかっていないため、非特異的かつ過剰な免疫抑制治療に依存しているという事態を反映している。こうした現状から、病原性のあるMPO-ANCAの産生機序を解明し、特異的な治療を開発することが強く望まれる。本研究で示したMPO-ANCAの産生にNETsの制御異常が関与しているという概念は、病態に即した新たな特異的治療の開発に結びつく可能性がある。

【結論】PTUにより分解障害を来したNETsは、MPO-ANCAの産生、ならびにMPO-ANCA関連血管炎の発症に関与する可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	笠原	正典
副査	准教授	松本	美佐子
副査	教授	渥美	達也
副査	教授	有賀	正

学位論文題名

## MPO-ANCA関連血管炎における Neutrophil Extracellular Trapsの関与

Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA) 関連血管炎の病態は、病原性自己抗体である MPO-ANCA が好中球を活性化し、好中球殺菌蛋白の脱顆粒や、炎症性サイトカインを放出させて小血管に炎症を惹起するとされているが、MPO-ANCA の産生機序は不明であった。本研究では、MPO-ANCA の産生機序を解明することを目的とし、好中球の殺菌機構である neutrophil extracellular traps (NETs) に着目した。NETs は好中球の貪食に引き続き、細胞死に至る好中球が MPO 等の細胞質内抗菌蛋白と核 DNA を細胞外に放出することにより形成され、自然免疫において重要な役割を担っている。

第一章の研究では NETs の制御異常が MPO-ANCA の産生に関与するという仮説のもと、副作用として高率に MPO-ANCA が出現する抗甲状腺薬プロピルチオウラシル (PTU) を用いて、NETs 形成への影響を解析した。In vitro では、好中球を PMA で刺激することにより NETs を誘導できるが、PMA に PTU を添加して好中球を刺激したところ、NETs の形成異常と DNase I による分解障害が見られた。In vivo ではラットに PTU を経口投与し、さらに PMA を腹腔内注射したところ、MPO-ANCA 関連血管炎の症状を呈したことから、細胞内蛋白である MPO が NETs とともに分解されず細胞外に長期間存在する事で、MPO が自己抗原として認識され、MPO-ANCA の産生につながる可能性が示唆された。

NETs には凝固因子や血小板と結合することで捕捉した細菌を効率よく閉じ込める役割があるが、第二章では MPO-ANCA 関連血管炎の合併症である血栓形成機序に NETs が関与することを示した。血栓症を合併した本疾患の剖検検体を用いて、血栓内における NETs 量を解析したところ、他の原因由来の血栓に比べ有意に NETs が多く存在し、本疾患の血栓形成に

関与している可能性が示唆された。以上、第一章、第二章の研究により、MPO-ANCA 関連血管炎が NETs という自然免疫機構と密接に関連するという新しい概念を提唱した。

質疑応答では、① PTU 添加で誘導される NETs がなぜ分解障害をおこすのか、また分解障害を示す NETs において、なぜ MPO に対する特異的抗体だけが産生されるのかという質問に対して、好中球の MPO で代謝される PTU 代謝産物が DNA のホスホジエステラーゼ結合部位に接着するため、分解障害が起こる可能性があること、また PTU 代謝過程において MPO 内のヘム蛋白に構造変化が起こる事がわかっており、構造修飾された MPO が分解されにくい NETs 内に存続する事が MPO 特異的抗体産生の原因ではないかと考えていると答えた。② NETs の異常が関与する疾患についての報告や関連しそうな疾患があるか、という質問に対して、NETs が形成できない疾患として NADPH を欠損している慢性肉芽腫症があり、本症では NETs が誘導されず感染症にかかりやすいことを指摘した。また、逆に NETs の制御異常が関与する疾患としては SLE を挙げ、本症では抗 NETs 抗体を有する患者群が存在し、その抗体と NETs が結合する事で NETs が分解されにくくなり、NETs 内 DNA が SLE の病態を増悪させるとの報告があると答えた。そして、NETs の関与が推測される疾患として、顆粒球主体の炎症病変を特徴とし、かつ血栓症を合併症とするベーチェット病を挙げた。③ 感染以外の原因で生体内に NETs が過剰に起こるような病態は知られているか、という質問に対しては、NETs 誘導には、核の脱凝縮・分散と MPO 蛋白などの脱顆粒が同時に起こる事が必須とされており、これらを同時に誘導する因子は感染症以外にはまだ知られていないと回答した。④ PTU と PMA による ANCA 関連血管炎のモデルでは、MPO に対する免疫寛容の破綻は中枢性か末梢性かという質問に対しては、生体内に異常な MPO が存続する事による抗体反応であるため、末梢性の免疫寛容の破綻と考えると回答した。

この論文は、*Arthritis and Rheumatism* と *Frontiers in Immunology* に掲載され、今後の MPO-ANCA 関連血管炎の病態解析の進展、ならびに本疾患に対する特異的な新規治療開発に繋がるものと期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。