

令和元年5月16日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09364

研究課題名(和文) 自己免疫性肝疾患におけるNETs・EETsの病態への関与

研究課題名(英文) Involvement of NETs and EETs in autoimmune liver disease

研究代表者

大平 弘正(Ohira, Hiromaas)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90274951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肝炎(AIH)と原発性胆汁性肝硬変(PBC)において、NETs、EETsという新たな自然免疫に關与する概念と病態との關連を明らかとすることを目的とした。PBCではEETsは確認できなかったが、AIH患者の肝臓においてNETsの存在が初めて明らかとなり、AIH患者血清中に存在する抗好中球細胞質抗体(ANCA)がNETsを誘導することが示唆された。また、NETsの血清マーカーであるcfDNAと抗体産生に關与するBAFFとの相関も得られ、AIHの免疫病態にNETsが關連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、他の自己免疫性疾患においてはNeutrophil Extracellular Traps (NETs)と病態との關連が報告されている。自己免疫性肝疾患である自己免疫性肝炎(AIH)においては、抗好中球細胞質抗体(ANCA)を含む種々の自己抗体の出現、抗体産生に關与するBAFF濃度の増加、発症早期に好中球の浸潤が觀察されるが、NETsの存在や意義は不明であった。今回、AIH患者の肝臓におけるNETsの存在とAIH患者血清中に存在するANCAがNETsを誘導することが明らかとなったことから、AIHの免疫病態の解明に繋がる成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the relationship between NETs and EETs, new innate immunity concepts and pathologies in autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cholangitis (PBC). Although EETs could not be confirmed in PBC, the presence of NETs was first revealed in the liver of AIH patients. In addition, it was suggested that ANCA present in AIH patient serum induces NETs in vitro. The correlation between serum marker cfDNA and BAFF involved in antibody production was also obtained, suggesting that NETs are related to AIH immunopathology.

研究分野：消化器病学

キーワード：自己免疫性肝炎 NETs 抗好中球細胞質抗体 ラクトフェリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Neutrophil Extracellular Traps (NETs)は活性化した好中球が自らの二重鎖DNA (dsDNA) にミエロペキシダーゼ (MPO) やエラスターゼなどの抗菌蛋白を絡ませた網状の構造物を細胞外に放出し、病原微生物からの生体を守る防御機構である。近年、NETsが様々な自己免疫疾患の病態に関与することが注目され、生体内で過剰なNETs産生や制御されないNETsが存続すると、自己抗体の産生や臓器障害に関与することが示されている。一方、好中球のみならず好酸球においてもEETsと呼ばれる現象が報告されている。その構成成分はミトコンドリア由来DNAとMBP (major basic protein)、ECP (eosinophil cationic protein)、EPOなどの好酸球顆粒蛋白である。何らかの機序で好酸球が活性化するとEETsが形成され、NETsと同様に臓器障害に関与するとされる。

2. 研究の目的

自己免疫性肝疾患である自己免疫性肝炎 (AIH) と原発性胆汁性肝硬変 (PBC) において、NETs、EETs という新たな自然免疫に関与する概念と自己免疫性肝疾患の病態との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AIH と PBC における NETs、EETs の存在の確認

① 生検肝組織における NETs、EETs の同定

Shiogamaらが報告 (Acta Histochem Cytochem 2016) したホルマリン固定パラフィン切片を用いて好中球細胞質成分のラクトフェリン免疫染色とssDNA免疫染色を行い、肝組織内での網目状構造 (NETs) の存在を確認する。

PBCのEETsが確認できなかったため、以後、AIHにおけるNETsに焦点を絞って研究を進めた。

② circulating free DNA (cfDNA) と DNaseI 活性の測定

NETsの確認法として報告されている血液中のcirculating free DNA (Margraf S, et al. Schock 2008) と NETs 分解に関与するDNaseI活性 (Frese S, Nat Rev Immunol 2011) をAIH患者血清を用いて既報に準じて測定する。

(2) NETs陽性例のBAFFおよび血清サイトカインアッセイ

肝組織およびcfDNA測定を行ったAIH患者血清中のBAFF測定 (ELISA法) および各種サイトカインアッセイ (Bio-Plex Proサイトカインアッセイキット) を行う。NETs陽性との関連、cfDNAとの相関を検討する。

(3) AIH における ANCA 対応抗原の同定

健常人好中球あるいはHL60細胞を用いて、Cell fraction kits (Bio Vision)にて細胞質成分を抽出する。上記にて抽出した蛋白を二次元電気泳動で分離後、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜に転写し、蛍光抗体法 ANCA 陽性の AIH 患者血清 (1次抗体) とビオチン標識抗ヒトIgG抗体 (2次抗体) を用いてWestern blottingを施行する。疾患群のみ陽性の蛋白スポットと同じ分子量、等電点を示すスポットを別途に抽出蛋白を二次元電気泳動で分離したゲルより切り出しアミノ酸解析を行う。併せて好中球細胞質抗原 FtsZ 蛋白も用いてWestern blottingを施行する。また、既知のANCA抗原を用いたELISA法にて検討する。

(4) ANCAによるNETsの誘導

NETsの確認はSYTOX green染色 (5 μM, Lifetechnology.com) を用いて行う。健常人から好中球を末梢血から分離し、培養プレートに 1.0×10^6 cells/wellで分注しする。ANCA陽性AIH患者血清からIgG分画を抽出し、wellに添加しNETs誘導を蛍光顕微鏡下に確認する。

(5) CpG DNAを用いた実験動物での検討

CpG DNAを用いてANCA対応抗原蛋白に対する自己抗体を産生するマウスの作成を行う。既報 (Abe K, Ohira H, et al. Fukushima J Med Sci 2007) に準じて8週齢のB57BK/6NCrjマウスに50 μgのCpGDNA (5' -TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3') をアジュバンドとして、抗原蛋白50 μgと共に3回尾根部へ皮下投与する。28日後にALT測定を肝組織の観察を行う。

4. 研究成果

(1) AIH における NETs の存在

① 自己免疫性肝炎 (AIH) 患者生検肝組織におけるNETsの存在の確認をShiogamaらが報告に従いホルマリン固定パラフィン切片を用いて好中球細胞質成分のラクトフェリン免疫染色とssDNA免疫染色を行い、肝組織内での網目状構造 (NETs) の存在を確認した (図1)。35例のAIH組織のうち、9例においてNETsが確認された。

② 血液中のNETsの確認法であるcirculating free DNA (cfDNA)を30例のAIH患者血清で検討すると、図1に示す様にAIH (468.3±175.3 ng/ml) とC型慢性肝炎 (CHC, 30例 318.6±83.8 ng/ml)、健常人 (Control, 30例 355.0±53.9 ng/ml) と有意にAIHで高値でありNETsの存在が裏付けされた。しかし、肝組織におけるNETsの陽性・陰性との明らかな関連は認められなかった。DNaseI活性の測定は安定せず有意な結果は得られなかった。

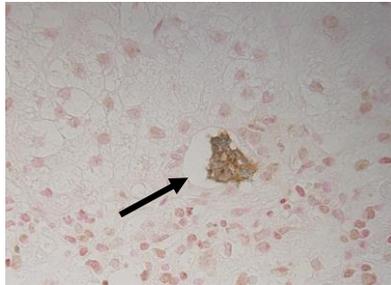


図1 肝組織における NETs 染色

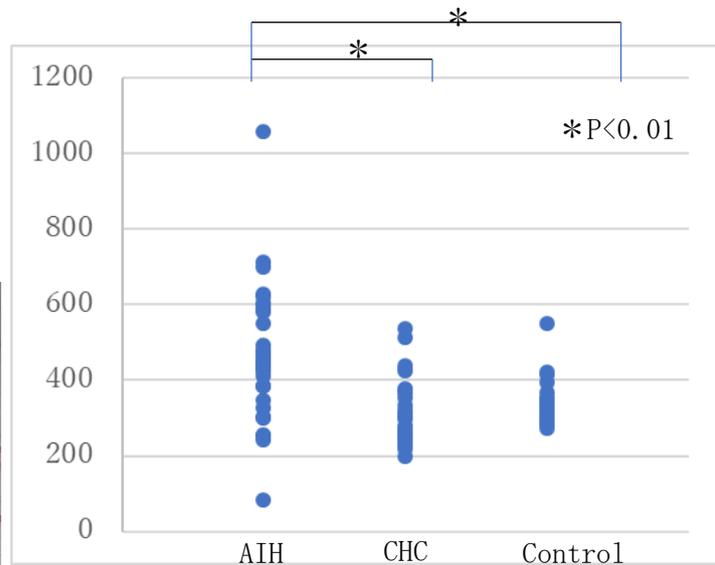


図2 cfDNA

(2) NETs陽性例のBAFFおよび血清サイトカインアッセイ

生検肝組織にてNETsの存在を確認している35例のAIH患者血清中の各種サイトカイン(IFN α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、GM-CSF、IFN γ 、TNF α)をBio-PlexProサイトカインアッセイキットを用いて測定した。感度以上となり評価できたサイトカインはIL-10、IFN γ 、TNF α のサイトカインであり、それぞれNETs陽性、陰性で比較すると、IL-10 (5.5 \pm 8.9、4.5 \pm 5.0 g/ml)、IFN γ (1.1 \pm 0.9、0.6 \pm 0.4 g/ml)、TNF α (16.8 \pm 11.4、16.2 \pm 6.3 g/ml)と両群間に明らかな有意差は認めなかった。また、血液中のNETsの確認法であるcfDNAを測定した45例のAIH患者血清とこれらサイトカインの関連をみると、IL-10($r=0.211$, $p=0.1641$)、IFN γ ($r=-0.02025$, $p=0.895$)、TNF α ($r=0.2243$, $p=0.1386$)と有意差な相関は認めなかった。同様にBAFFとの相関を検討したところ、図2の様に $r=0.3009$ 、 $p=0.0472$ と有意な正の相関が認められた。

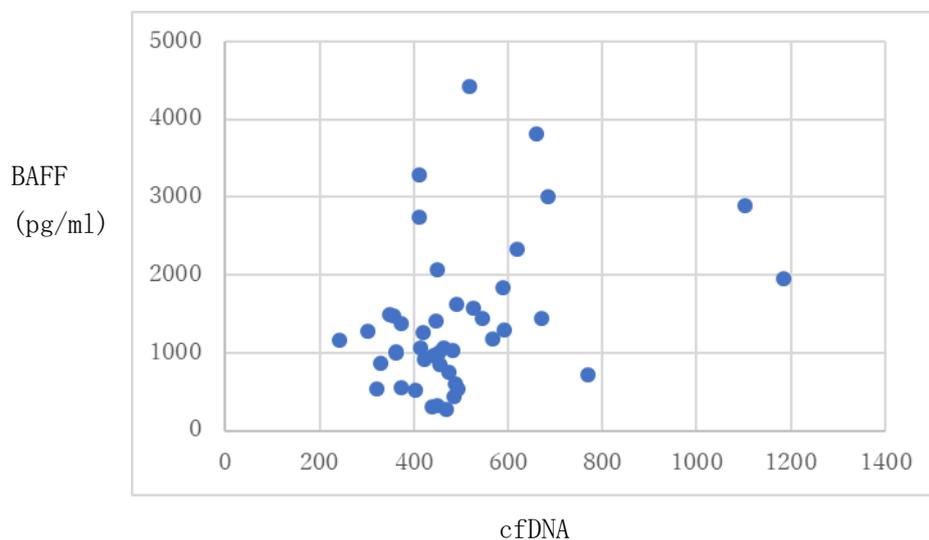


図3 cfDNAとBAFFの相関

(3) AIHにおけるANCA対応抗原の同定

AIHにおける対応抗原の同定においては、好中球細胞質抗原ならびにHL60細胞抗原蛋白を用いた検討においても、有意な蛋白陽性スポットが検出されなかった。そこでANCA panel kitを用いて46検体について測定を行った。陽性の検体はPR3、MPO、BPI、Elastase、Cathepsin G、Lysozome、Lactoferrinがそれぞれ、26検体(56.5%)、8検体(17.4%)、19検体(41.3%)、23検体(50.0%)、19検体(41.3%)、32検体(69.6%)、5検体(10.9%)で陽性所見が得られた。なお、好中球細胞質抗原FtsZ蛋白を用いた検討においても、蛋白陽性スポットが検出されたが、AIHに特異性は認めなかった。

(4) ANCAによるNETsの誘導

健康人末梢血 (10 ml) から好中球を分離・培養し、ANCA 抗体 (ラクトフェリン) 陽性患者血清から抽出した IgG 分画を各 well に添加し NETs 誘導を実施した。コントロールとして健康人の好中球を TNF α (20 ng/ml) および PMA 刺激 (25nM) にて NETs が形成 (SYTOX 5 μ M で蛍光染色し蛍光顕微鏡下に観察) されることを確認している (図 4a)。当初の検討で好中球の接着が不十分であったため、培養類洞内皮細胞と好中球 (1×10^6 /well) を共培養し、AIH 患者血清から分離した IgG 分画 (0.5mg/500 μ l) を 3 時間添加し、無水エタノールで固定後に蛍光顕微鏡下に観察し NETs 形成されることを確認した (図 4b)。一方、コントロールの ANCA 陰性血清では NETs 形成が認められなかったことから、AIH 患者血清中存在する ANCA が NETs 形成に関与することが示唆された。

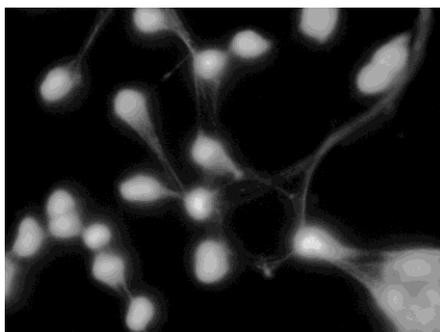


図 4a 陽性コントロール

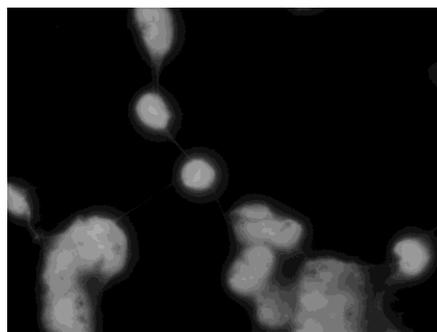


図 4b AIH 血清 (IgG 分画)

(5) CpG DNA を用いた実験動物での検討

CpGDNA を用いた実験動物の検討では、AIH 患者血清で確認された ANCA の中で、対応抗原としてラクトフェリンを用いて、8 週齢の B57BK/6NCrj マウスに 50 μ g の CpGDNA (5' -TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3') をアジュバンドとして、ラクトフェリン蛋白 50 μ g と共に 3 回 (day0、10、20) 尾根部へ皮下投与し、28 日目で採血と肝臓を摘出した。血清 ALT 値はコントロール、CpG 単独投与、ラクトフェリン単独投与、CpG+ラクトフェリン投与で、それぞれ 42+/-6.3 U/l、40+/-6.3 U/l、87+/-67.7 U/l と CpG+ラクトフェリン投与において他の群に比し有意 ($p=0.0317$) に高値であった。HE 染色においても CpG+ラクトフェリン投与では肝内炎症が確認された。

これまでの成果から AIH 患者の肝臓において NETs の存在が初めて明らかとなり、AIH 患者血清中に存在する ANCA が NETs を誘導することが示唆された。今後、AIH の病態との関連をさらに検討する価値がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：渡辺浩志

ローマ字氏名：Watanabe Hiroshi

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40336467

研究分担者氏名：高橋敦史

ローマ字氏名：Takahashi Atsushi

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：40404868

研究分担者氏名：阿部和道

ローマ字氏名：Abe Kazumichi

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：3046128

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。