

令和元年6月20日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19475

研究課題名(和文) 高齢者のMPO-ANCA産生機序解明とその治療応用

研究課題名(英文) Investigation of ageing-related production of MPO-ANCA

研究代表者

永井 恵 (Nagai, Kei)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00734352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：わが国のANCA関連血管炎(AAV)は、MPO-ANCA陽性例が多く、高齢者に頻発する。高齢AAV患者の好中球では代表的な顆粒蛋白MPOとPR3の細胞内発現量が低下している一方で、わずかではあるがPTX3の細胞内発現量が上昇していることが示唆された。その顆粒蛋白PTX3の機能を知るため、細胞死を誘導する免疫方法を用いたマウスMPO-ANCA産生の動物実験を行ったところ、限られた条件下であるが、PTX3蛋白の同時投与によりMPO-ANCAの産生が抑制された。AAVの病因たるMPO-ANCA産生の制御因子としてPTX3分子が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AAVに対して従来からステロイド薬と免疫抑制薬の併用が治療の基本だが、真菌感染症などの日和見感染の合併が問題であり、新規治療法の開発が望まれている。MPO-ANCAはAAVの病因であり、その産生抑制は治療戦略の一つであるが、抗原たるMPOの欠損は真菌感染を増悪させる。他方、PTX3は日和見感染に防御的に機能することが既知であり、その臨床応用を見据える本研究は、これまでにない日和見感染合併症に配慮したAAVの治療法開発の意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Vasculitis occurs in aged population and is caused by antibody against neutrophilic granule protein, myeloperoxidase (MPO-ANCA), in most asian countries including Japan. We comprehensively tested the level of expression of neutrophil cytoplasmic proteins and revealed highly expressed PTX3, contrary to reduced expression of representative neutrophilic protein such as MPO and PR3. We further examined the functional role of PTX3 in production of MPO-ANCA by an animal model with immunization of MPO and PTX3 at the same time. Under strictly limited condition, titer of MPO-ANCA was reduced comparing to the control group. This suggested the possibility of PTX3 as one of regulators of MPO-ANCA production and pathogenesis of AAV.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：抗好中球細胞質抗体 ミエロペルオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

ANCA 関連血管炎 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis; AAV) は、日本人の急速進行性糸球体腎炎の主な原因であり、生命予後、腎予後とも極めて不良な疾患である。また、欧米では PR3-ANCA による血管炎が多い事に対して、本邦では MPO-ANCA が大多数を占め、かつ高齢者に発症する (Autoimmun Rev 2008;8:29-32)。MPO-ANCA 陽性血管炎は、従来からステロイド薬と免疫抑制薬の併用が治療の基本だが、真菌感染症などの日和見感染の合併が問題であり、その解決のために新規治療法の開発が望まれている。

MPO-ANCA は、高齢者において、好中球の活性化する細菌感染症などの罹患後に産生されることが多い。病原体に対する生体免疫反応としての NETs (Neutrophil extracellular traps) 形成は普遍的な現象であり、PTX3 をはじめとして MPO 以外の好中球顆粒分子も NETs 内に多数含まれ、それらの相互関係も MPO-ANCA 産生に影響すると考えた。あらゆる好中球顆粒には個体差や分化段階による発現量の多寡があり (J Leuko Biol. 1999;66:989-995)、加齢により好中球顆粒の内容が変化することが予想されている。一方で、MPO-ANCA 産生機構において、MPO 以外の好中球顆粒分子の機能に着目した詳細な検討はなされていない。

申請者は細胞死に強く関与する急性炎症性蛋白ペントラクシン 3 (PTX3) に注目した研究にも取り組んできたが (Nagai K et al., Int J Nephrol 2014;297945)、PTX3 は MPO や PR3 同様に好中球の一次顆粒に含まれ、NETs に放出されることも解明された (J Exp Med 2007;204:793-804)。PTX3 は死細胞に結合する事で、死細胞が抗原提示細胞によって貪食される機構を制御し、in vivo において過剰な免疫反応を負に制御する (Blood 2000;96:4300-4306)。血清 PTX3 値がヒト AAV の病勢マーカーである点からも、PTX3 が AAV の発症機構に関与する可能性は高い (Arthritis Rheum. 2001;44:2841-50)。

2. 研究の目的

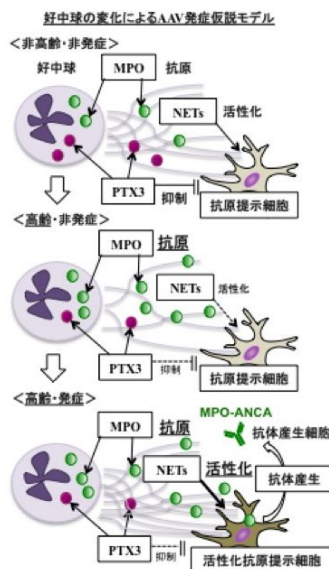


図1 研究の仮説モデル

本研究は、好中球細胞質抗原蛋白 (MPO および PTX3) のバランス、および好中球による免疫応答の違いが、抗原提示細胞の活性化を規定し、ANCA 関連血管炎 (AAV) の発症・非発症が決まる機序を仮説とする。

AAV に対する従来治療は、真菌感染症などの日和見感染の合併が問題となる。MPO-ANCA は AAV の病因であり、その産生抑制は治療戦略の一つであるが、抗原たる MPO の欠損は真菌感染を増悪させる。他方、PTX3 は日和見感染に防御的に機能することが既知であり、その臨床応用を見据える本研究は、これまでにない日和見感染合併症に配慮した AAV の治療法開発の意義を持つ。

NETs には、病原体排除に有効な自己核酸 (DNA やクロマチン線維) や MPO などの活性酸素源が含まれている。細胞外核酸は抗原提示細胞を活性化させ、MPO は抗原となりうるため、好中球の含有分子そのものを解析する事は、MPO-ANCA 産生機構の解明のために重要であると言える。

本研究の目標は、本邦の血管炎の病態形成において重要な MPO-ANCA 産生機構を制御する疾患特異的な治療法の開発である。MPO-ANCA が高齢者の感染罹患後に産生される事実から、以下の発症仮説を立てた。

「ANCA の抗原である MPO は加齢で増加、抗原提示細胞の活性化抑制因子である PTX3 は加齢で減少、さらに感染症罹患時に NETs が大量に放出される条件が満たされた場合、抗原提示細胞が活性化し、抗原を取り込み、MPO-ANCA 産生に至る。」

3. 研究の方法

(1) イメージングフローサイトメトリ法による好中球の解析

定量性を持った詳細なヒト好中球顆粒の解析の実現は本課題に重要である。細胞免疫染色では蛍光強度の定量性や対象細胞数の限界から客観的評価がしばしば困難である。一方、従来のフローサイトメトリ法では、ひとつの細胞に対する蛍光強度のみが検出されるため、解析項目に限られる。そこで申請者は、次世代のフローサイトメトリであるイメージングサイトメトリ (ImageStream Mark II) を活用した。これは、細胞免疫染色の利点である顆粒の局在および大きさ、他の細胞内分子との相互関係を観察でき、かつ、フローサイトメトリ法の利点として、多数の細胞が解析可能であるため、定量性および客観性が得られる。

(2) 新規 MPO-ANCA 産生系の樹立と PTX3 の生体内における機能解明

アルミニウムゲル腹腔内投与も結核菌同様にアジュバント効果があり、その機序として、腹腔内細胞が NETosis を起こし、樹状細胞を活性化させる機構が明らかにされている (Nat Med. 2011; 17: 996-1002)。これらの知見をもとに、アルミニウムゲルのみを腹腔内投与することで *in vivo* で作成した NETosis 細胞を MPO 遺伝子欠損マウスに腹腔内免疫して、MPO-ANCA が産生されるマウスモデル開発を行う。抗原たる MPO とアジュバントたる自己核酸が MPO 遺伝子欠損マウスの腹腔内の抗原提示細胞を活性化すると考える。

先行研究では、加齢によって生体内で NETs の処理が滞り、NETs 形成が遷延する事が問題となるとされるが (Aging Cell. 2014; 13: 690-698) 詳細な分子メカニズムは未だ示されていない。PTX3 は、死細胞が貪食を速やかに行われるように、死細胞に発現するあらゆる分子に結合して機能する (Cell Death Differ. 2009; 16: 465-74)。これらの知見から、新規 MPO-ANCA 産生モデルにおいて、NETosis 細胞と共に PTX3 を腹腔内投与し、コントロール蛋白の投与との病態の比較を行う。抗原提示細胞の活性化、および、血清 MPO-ANCA 濃度を評価項目とする。この検討から、抗原提示細胞の活性化および MPO-ANCA 産生を PTX3 が負に制御しうるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) イメージングフローサイトメトリ法によるヒト好中球の解析

ヒト AAV 患者の好中球に含有する顆粒の定量を試みた。研究施設の附属病院のみの検討となり十分な症例数を獲得することはできなかったものの (IRB#H28-73 (筑附病院), UMIN000022877)、蛍光抗体を用いた細胞内染色法とイメージングフローサイトメトリを用いて健常コントロールとヒト AAV 患者の比較を行うことができた。好中球細胞質蛋白として、既知の MPO、PR3 および PTX3 の発現量および局在を解析した。高齢 AAV 患者の好中球では MPO と PR3 の細胞内発現量が低下している一方で、わずかではあるが PTX3 の細胞内発現量が上昇していた (図 2)。

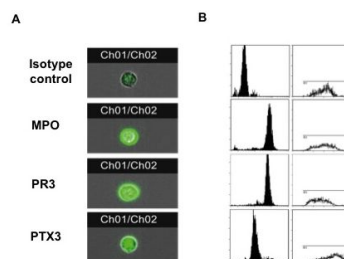


図2 イメージングフローサイトメトリを用いた AAV 患者の好中球細胞質抗原の定量解析
A. 患者末梢血より好中球を単離し、細胞質内を各抗原に対応する一次抗体で染色後、蛍光二次抗体で染色、イメージングサイトメトリで解析した。
B. 蛍光強度、細胞膜との距離 (Internalization) とを各抗原で検討した。

(2) 新規 MPO-ANCA 産生系の樹立

アルミニウムゲル腹腔内投与にアジュバント効果があり、一般的な免疫反応の動物実験に用いられている。野生型マウス (B6 background) へ MPO とアルミニウムゲルを投与したところ、MPO-ANCA は産生されなかった (図 3A)。一方、MPO 遺伝子欠損マウスに同様の操作を行ったところ、MPO-ANCA が産生された (図 3B)。内因性 MPO は MPO 特異的な液性免疫を抑制する効果があると考えられており、先行研究に矛盾しない結果が得られた (Odobasic D et al., Blood. 2013; 121: 4195-4204)。MPO 遺伝子欠損マウスに対して、アルミニウムゲルを投与した場合、腹腔内に死細胞 (図 3C) および NETs (図 3D) が形成されることが確認されたが、細胞質蛋白 PTX3 も同時に放出されることを見出した (図 3E)。従って、PTX3 が MPO-ANCA 産生の場に存在し、その機能調整をしていることが示唆された。

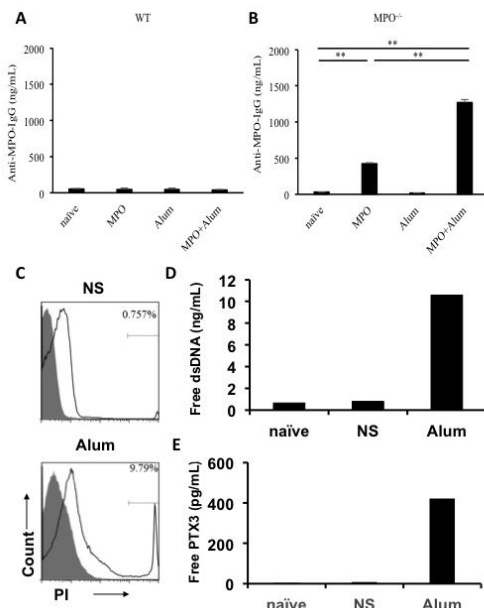


図3 新規 MPO-ANCA 産生モデルの創出

A. MPO 抗原とともに Alum アジュバントを投与した時 (能動免疫)、野生型マウスでは MPO-ANCA が産生されなかった。
B. 同様の免疫を MPO 遺伝子欠損マウスに施したところ、MPO-ANCA が産生された。
C. Alum アジュバントを投与した局所 (腹腔内) では、細胞死が誘導され、死細胞マーカー陽性細胞が検出された。
D. 同様に死細胞が放出する自己核酸の一つ dsDNA が検出される。
E. 好中球細胞質蛋白である PTX3 も同様に検出される。

(3) MPO-ANCA 産生における生体内 PTX3 の機能解明

前項で獲得した MPO-ANCA 産生モデルにおける PTX3 の機能を明らかにするためには、PTX3 遺伝子欠損マウスあるいは特異的中和抗体の樹立が必要となったが、本研究期間に準備することは困難であった。MPO-ANCA 産生モデルにおいて、リコンビナントマウス PTX3 10mcg および vehicle control を同時投与することで、MPO-ANCA の治療モデルを想定して検証した。投与タイミングや投与量により結果が逆転することもあったが、条件設定の限りでは、PTX3 蛋白の同時投与は MPO-ANCA を抑制することができた。従って、PTX3 は AAV の治療法の候補分子と考える。

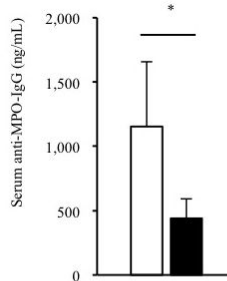


図4 新規MPO-ANCA産生モデルにおけるPTX3投与の治療的意義の検討
MPO抗原+AlumアジュバンドとともにリコンビナントマウスPTX3を投与した場合(■)、Control(□)と比較して、14日後のマウスMPO-ANCAの抗体価(Whole IgG)は低値であった。

4 . 結果のまとめ :

本研究は、わが国の ANCA 関連血管炎 (AAV) は、MPO-ANCA 陽性例が多く、高齢者に頻発する。高齢 AAV 患者の好中球では代表的な顆粒蛋白 MPO と PR3 の細胞内発現量が低下している一方で、わずかではあるが PTX3 の細胞内発現量が上昇していることが示唆された。その顆粒蛋白 PTX3 の機能を知るため、細胞死を誘導する免疫方法を用いたマウス MPO-ANCA 産生の動物実験を行ったところ、限られた条件下であるが、PTX3 蛋白の同時投与により MPO-ANCA の産生が抑制された。AAV の病因たる MPO-ANCA 産生の制御因子として PTX3 分子が期待される。

< 引用文献 >

Nagai K, Aratani Y, Shibuya A, Yamagata K. Involvement of pentraxin-3 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody production induced by aluminum salt adjuvant. Clin Exp Rheumatol, 35: 735-538, 2017

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

PY Gan, A Chan, JD. Ooi, J Dick, **K Nagai**, KM. O' Sullivan, V Oudin, R Shim, AR Kitching, SR Holdsworth. Biologicals targeting T helper cell subset differentiating cytokines are effective in the treatment of murine anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. Kidney Int. in press, 2019 (査読あり)

Nagai K, Aratani Y, Shibuya A, Yamagata K. Involvement of pentraxin-3 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody production induced by aluminum salt adjuvant. Clin Exp Rheumatol, 35: 735-538, 2017 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

Nagai K, Yamagata K. 発熱が MPO への自己免疫応答に与える影響の検討、2019、第 62 回日本腎臓学会学術総会 (名古屋)

Nagai K, Kitching AR, Holdsworth SR, Gan PY. Neutralizing the Th1 effector cytokines, TNF and IFN , in experimental autoimmune myeloperoxidase ANCA associated glomerulonephritis (MPO-ANCA GN), 2018, Kidney Week 2018 (米国、サンディエゴ)

Nagai K, Holdsworth SR, Gan PY. Cytokine targeted therapeutics in experimental GN, 2018, Centre for Inflammatory Disease weekly seminar series (豪州、メルボルン)

Nagai K. Effect of Th1 cytokine blockade in anti-MPO glomerulonephritis/ANCA vasculitis, 2018, Renal Medicine and Baxter Novum Seminars Fridays (スウェーデン、ストックホルム)

Nagai K, Yamagata K. マウス MPO-ANCA 産生モデルにおける抗 PTX3 抗体の検討、2018、第 61 回日本腎臓学会学術総会 (新潟)

永井 恵、ANCA 関連血管炎における PTX3 の機能解析、2017、第 5 回東京理科大学-筑波大学リトリート (野田市)

Nagai K, Yamagata K. Imaging flowcytometry-based analyses of cytoplasmic granules in neutrophils from patients with ANCA associated vasculitis. 2017, 18th Vasculitis and ANCA workshop (東京)

〔図書〕(計 4 件)

永井 恵、山縣邦弘：オーム社、第 4 章 1 腎不全、Common Disease の病態生理と薬物治療、2019、pp.125-133

永井 恵、臼井丈一、山縣邦弘：オーム社、第 4 章 2 糸球体腎炎、Common Disease の病態生理と薬物治療、2019、pp.139-144

永井 恵、山縣邦弘：オーム社、第 4 章 3 ネフローゼ症候群、Common Disease の病態生理と薬物治療、2019、pp.146-152

永井 恵、澁谷 彰：羊土社、実践編 ソーティング 19：プライマリマスト細胞の単離と解析、新版フローサイトメトリー もっと幅広く使いこなせる(実験医学・別冊、最強のステップ UP シリーズ)、2016、pp.240-251

〔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：<https://nephtsukuba.wixsite.com/nephrology-tsukuba>

6. 研究組織

(1)研究分担者(なし)

(2)研究協力者(なし)

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。