

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08353

研究課題名（和文）慢性移植片対宿主病の病態における好中球細胞外トラップの役割の解明

研究課題名（英文）The role of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of chronic GVHD

研究代表者

山下 浩平（Yamashita, Kouhei）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80402858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：好中球の新たな細胞外殺菌機構として知られる好中球細胞外トラップ（neutrophil extracellular traps: NETs）は、細胞外へ放出した組織傷害性の強いヒストンや抗菌タンパクにより、種々の免疫・炎症・血栓性疾患の病態形成に関与することが報告されている。本研究では、同種造血細胞移植後の重篤な合併症の一つである慢性移植片対宿主病（GVHD）や、代表的な全身性炎症性疾患の一つである川崎病を対象として研究を進め、これらの病態形成におけるNETsの役割の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、代表的な炎症性疾患の一つである川崎病における血管炎病変の形成にNETsが重要な役割を果たすことを、疾患モデルマウスや患者検体を用いた解析により明らかにした。本研究遂行時、COVID-19関連川崎病類似疾患（小児多系統炎症性症候群：MIS-C）が欧米を中心に報告され、MIS-Cと古典的川崎病との関係について、トピックスとなった。今回明らかにした所見から、MIS-Cと古典的川崎病は病態を共有しており、MIS-Cはその重症型である、という仮説を立て、報告した（Ann Rheum Dis, 2020）。他の研究者からも我々の仮説の妥当性が示され、MIS-Cの理解が進んだ。

研究成果の概要（英文）：Neutrophil extracellular traps (NETs), a novel extracellular killing mechanism of neutrophils, are involved in the pathogenesis of immune, inflammatory, or thrombotic diseases, due to harmful proteins such as histone and anti-microbial peptides, released extracellularly from neutrophils. In this study, we revealed an important role of NETs, at least in part, in the pathogenesis of chronic GVHD, one of the serious complications after allogeneic hematopoietic cell transplantation, or Kawasaki disease, one of the representative systemic vascular inflammatory diseases.

研究分野：血液内科学

キーワード：好中球細胞外トラップ 移植片対宿主病 川崎病 炎症性疾患 自然免疫 PAD阻害薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

好中球の新たな殺菌機構として知られるようになった「好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs)」は、殺菌により感染防御に寄与する一方、細胞外へ放出した傷害活性の強いヒストンや顆粒抗菌ペプチドなどにより組織傷害や臓器不全を引き起こすことが報告されている。そして NETs は、その直接的な作用により、血管内皮細胞障害による動脈・静脈・微小血管における血栓症や痛風などの関節炎、またその間接的な作用により、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患、その他癌の転移、臓器の線維化など様々な疾患の病態に深く関与することが数多く報告されている。

我々はこれまでに、NETs 産生に活性酸素種の一つである一重項酸素が必須であること (Nishinaka Y et al. BBRC 2011)、高濃度尿酸の刺激により NETs 産生が誘導されること (Arai Y et al. BBRC 2014)、そして同種造血細胞移植後の合併症である移植後微小血管症や IgG4 関連疾患の一種である自己免疫性膵炎の病態形成に NETs が深く関与すること (Arai Y et al. Biol Blood Marrow transplant 2013, Arai Y et al. J Immunol 2015, Minaga K et al. J Gastroenterol 2020) を報告した。また、同種免疫寛容の破綻が主因と考えられる不育症の病態において、疾患モデルマウスやヒト流産の検体を用いた解析から NETs がエフェクターとして作用すること (Mizugishi K et al. J Biol Chem 2015, Mizugishi K and Yamashita K. FASEB J 2017) を明らかにした。

このような背景をもとに、本研究では同種造血細胞移植の重大な合併症の一つである慢性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) の病態における NETs の役割について、免疫制御の異常によって過剰に炎症が惹起すると考えられている他の炎症性疾患の病態を参考にしながら明らかにしていきたい。

### 2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」でも述べたように、本研究は、同種造血細胞移植の合併症の一つである慢性 GVHD の病態における NETs の役割を明らかにすることが主目的である。この目的を達成するため、免疫制御の異常により過剰な炎症が引き起こされる難治性の炎症性疾患 (川崎病など) の病態と対比して、同種または自己免疫寛容の破綻の観点から、病態解明へアプローチする。そして、NETs 産生の制御により慢性 GVHD の発症や重症度の低減を目指す。この研究を進めていくことによって、最終的に同種または自己免疫寛容における自然免疫系の重要性の一端を明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

研究の方法として、血清や生検組織などの患者検体を用いた研究、疾患モデルマウスを用いた研究、がある。

#### 患者検体を用いた研究

GVHD 患者や川崎病患者の血清を健常人好中球に投与して、NETs 産生の程度を種々の指標を用いて定量的に測定し、疾患未発症群や健常人の血清と比較検討する。また、GVHD 患者の皮膚や腸管、川崎病患者の血管などの生検組織標本検体から、シトルリン化ヒストンやミエロペロキシダーゼなどに対する抗体を用いて NETs を検出し、定量的に評価する。さらに、NETs とともに炎症の発現や調節に寄与すると考えられる単球・マクロファージ、リンパ球、樹状細胞様形質細胞 (pDC) などの細胞数や割合、分布などを調べる。

#### 疾患モデルマウスを用いた研究

GVHD モデルマウスは、8-12 週齢 B10.D2 雄マウスの T 細胞除去骨髓細胞 ( $1 \times 10^7$ /匹) と同量の脾細胞とを、0.8 Gy 照射した 8-12 週齢 BALB/c 雌マウスへ輸注することにより作成する。コントロールとして、同条件の BALB/c 同系移植を使用する。また、川崎病モデルマウスは、真菌由来物質である CAWS (candida albicans water-soluble fraction) を 4-8 週齢 B6 雄マウスへ連日 5 日間腹腔内投与することにより作成する。コントロールとして、PBS を投与するマウスを使用する。

これらの GVHD や川崎病モデルマウスに NETs 産生抑制薬として PAD (protein arginine deiminase) 阻害薬である Cl-amidine や DNA 分解酵素などを投与する。GVHD の評価は GVHD skin score や採取した皮膚の組織染色を行い、種々の処理により GVHD の発症や重症度が低減するか否かを検討する。また、GVHD 発症に関わると考えられる種々の液性因子 (サイトカインやケモカインなど) について、その発現を ELISA 法や定量 PCR 法を用いて測定する。川崎病の血管炎の評価は、大動脈基部や冠動脈周囲における好中球などの炎症細胞浸潤の有無や血清 CRP 値、IL-6 値などを用いて行い、種々の処理により炎症の発現や重症度が低減するか否かを検討する。さらに、病変部位における NETs の検出は、組織標本においてシトルリン化ヒストン (Cit-H3) に対する抗体や、ミエロペロキシダーゼなどの好中球顆粒蛋白に対する抗体を用いて、蛍光顕微鏡などで観察する。さらに、病変部位における浸潤細胞については、それぞれの特異的な抗体を用いて同定する。

#### 4. 研究成果

当初は慢性 GVHD について研究を開始したが、研究年度途中で COVID-19 が世界的に流行し、COVID-19 の重篤な合併症として、川崎病類似疾患 (Kawasaki-like disease) と呼ばれる小児多系統炎症性症候群 (MIS-C) が欧米を中心に報告された。この中で、MIS-C がこれまでの川崎病 (古典的川崎病) と病態生理学的に違いがあるのか、それとも同一スペクトラムであるのか、が世界的に重要な争点となった。本研究に関連して、この課題の解決が急務であると考え、川崎病を中心に研究を進めた。

##### 患者の血清を用いた NETs 産生能の *in vitro* 測定系の確立

(1) 健常人好中球を患者の血清で刺激をして、蛍光試薬 Cytox Green を用いた DNA 染色やシトルリン化ヒストンに対する蛍光標識抗体を用いた免疫染色により NETs 産生量が画像的に測定できること、(2) 尿酸結晶刺激による NETs 産生がコントロールとして有用であること、(3) 川崎病患者の急性期に得た血清による刺激が、非炎症時 (回復期) や健常人血清と比べ、NETs 産生を有意に増加させ、NETs 産生量は臨床的重症度と相関していること、を明らかにした (図 1)。

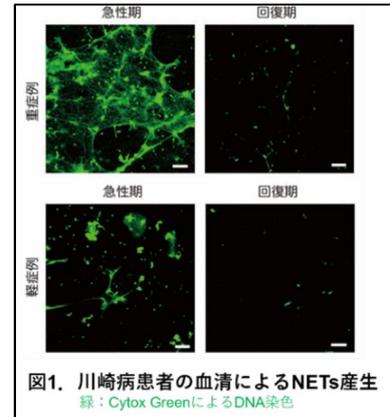


図1. 川崎病患者の血清によるNETs産生  
緑: Cytox GreenによるDNA染色

##### モデルマウスを用いた研究

(1) CAWS 誘発血管炎を有する川崎病モデルマウスを確立し、心臓の大動脈基部や冠動脈周囲に特異的に血管炎が発症することを確認した (図 2)。そして、(2) その血管炎部位に浸潤する細胞は、そのほとんどが好中球であること、(3) 検出された好中球は PAD4 や Cit-H3 に対する抗体が陽性であり、多くの NETs 産生が認められることを明らかにした (図 3)。



図2. 川崎病モデルマウスの心臓断面図  
HE染色、大動脈基部、冠動脈周囲に特異的に血管炎を発症。  
(RA: 右房, RV: 右室, LA: 左房, LV: 左室, Ao: 大動脈)

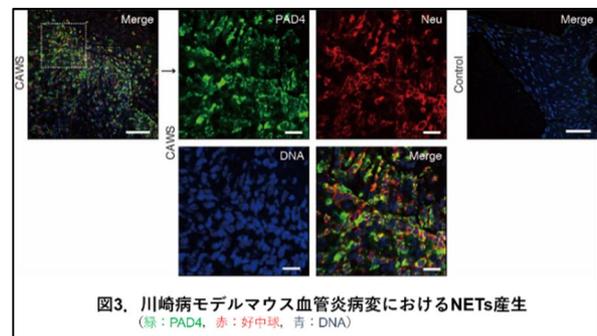


図3. 川崎病モデルマウス血管炎病変におけるNETs産生  
(緑: PAD4, 赤: 好中球, 青: DNA)

これらの所見から、我々は MIS-C は古典的川崎病と病態を共有し、SARS-CoV-2 感染を契機として自然免疫系の過剰な活性化が惹起された重篤な疾患群であると考察し、学会誌へ報告した (引用文献)。

#### < 引用文献 >

Yamashita K, Takaori-Kondo A, Mizugishi K. Exaggerated neutrophil extracellular trap formation in Kawasaki disease: A key phenomenon behind the outbreak in western countries? *Ann Rheum Dis*, 2020 Aug 21:annrheumdis-2020-218593.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita K, Takaori-Kondo A, Mizugishi K.	4. 巻 Aug 21
2. 論文標題 Exaggerated neutrophil extracellular trap formation in Kawasaki disease: A key phenomenon behind the outbreak in western countries?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis	6. 最初と最後の頁 2020-218593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2020-218593.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ : <a href="https://hematol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/defense.html">https://hematol.kuhp.kyoto-u.ac.jp/research/defense.html</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------