

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：10101  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K15968  
研究課題名（和文）好中球プログラム細胞死をターゲットにしたANCA関連腎炎の新規治療開発  
  
研究課題名（英文）Programmed cell death in ANCA-associated vasculitis  
  
研究代表者  
中沢 大悟（Nakazawa, Daigo）  
  
北海道大学・大学病院・助教  
  
研究者番号：60724135  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：MPO-ANCA関連血管炎モデルを用いてNETsに関連する分子をターゲットに治療としてリコンビナントトロノモジュリンに着目した。本疾患の病態は、病原性自己抗体であるANCAが、好中球を活性化し全身の微小血管を傷害するが、好中球プログラム細胞死の1つであるNeutrophil Extracellular Traps (NETs)の制御異常が本疾患の病態の中心をなす。in vitroでリコンビナントトロノモジュリンが直接好中球に作用してNETsを抑制し、また血管内皮傷害も抑制することを示した。モデル動物に投与することで血管炎病態を改善することを示した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連腎炎は壊死性半月体形成性糸球体腎炎や肺出血を呈する重篤な疾患であり、近年強力な免疫抑制治療により寛解導入率は向上してきたが、治療関連感染症死が60%と非常に多いため、依然として予後は不良であり、特異的な治療の開発が必要である。本治療は、過剰な免疫抑制を引き起こさずに病態を改善する可能性があり、またすでに敗血症/DIC病態に対して臨床使用され安全性も確認されており、新規治療薬として臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We focused on the effect of recomodulin in ANCA associated vasculitis (AAV). Neutrophil extracellular traps (NETs) are deeply involved in the pathogenesis of AAV and lead to the vascular injury. We showed that in vitro experiment recomodulin inhibit NETs formation and protect endothelium during vascular injury. Furthermore, rTM ameliorated AAV manifestation in AAV model animal. The treatment of rTM would be novel therapeutic agent in AAV patients.

研究分野：腎臓

キーワード：血管炎 腎炎 ANCA NETs

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質抗体(ANCA) 関連血管炎(AAV) は全身の小型血管を主体とする壊死性血管炎である。病原性自己抗体である ANCA が好中球を過剰に活性化し、全身の微小血管を障害することで多臓器不全を引き起こす。特に肺や腎臓では生命予後に関わる肺出血や急速進行性糸球体腎炎を発症するため、早期の適切な治療介入が重要となる。近年、好中球の免疫機構の一つである好中球細胞外トラップ(NETs) が本疾患の病態形成に関与することが明らかとなった。NETs とは好中球の新たに発見された殺菌システムであり、ミエロペルオキシダーゼ(MPO) やヒストンを混合した DNA 線維を細胞外に放出して、外来微生物を効率よく補足し殺菌する。NETs は自然免疫の重要な役割を担う一方で、過剰な NETs はその細胞外ヒストンや殺菌蛋白による血管内皮細胞障害を招く。さらに障害臓器から放出される DNA やヒストンなどの damage-associated molecular patterns (DAMPs) は、toll-like receptor を介して全身の炎症を増幅させるとともに、NETs をさらに誘導して、疾患の悪循環病態を形成することが示唆されている。トロンボモジュリン(TM) は血管内皮細胞表面に発現する糖蛋白であり、プロテイン C の活性化を介した抗凝固作用を持つ。TM の細胞外ドメインで構成される遺伝子組換えトロンボモジュリン(rTM)は、播種性血管内凝固症候群の治療薬として実臨床で使用されている。近年、rTM は抗凝固作用に加えて、細胞障害性ヒストンの中和や補体依存性の免疫反応の制御を介した抗炎症作用が示されていることから、NETs-ヒストンが病態の中心をなす AAV においても治療ターゲットになると仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、AAV 動物モデルに対する rTM の効果を検証し、in vitro の系を用いて血管炎病態における rTM の役割を解析した。

### 3. 研究の方法

【材料と方法】 In vivo 実験: ヒト MPO (400 µg/kg) を WKY ラット (雄性 5 週齢) に免疫して AAV モデルラットを作成した。免疫 14 日目に ANCA 産生を確認の上、21 日目から 42 日目まで rTM (3 mg/kg) または PBS を隔日静脈内投与した (n=6/群)。続いて AAV の自然発症モデルである SCG/Kj マウス (雌性 10-11 週齢) を用いて、MPO-ANCA の産生を確認の上、rTM (1 mg/kg) または PBS を 3 週間隔日腹腔内投与した (n=5/群)。両モデルとも治療終了後に解剖した。肺病変を出血スコア、TUNEL 染色、および NETs マーカーであるシトルリン化ヒストン (CitH3) 免疫染色を用いて組織学的に評価し、腎病変は血尿、腎機能、mRNA 発現 (TNF- $\alpha$ )、病理組織により解析した。循環 NETs は Flow Cytometry (FCM) による Sytox green (SG) 陽性顆粒球率、ANCA 値は間接蛍光抗体法および ELISA 法により測定した。

In vitro 実験: 血管炎病態における rTM の好中球、リンパ球、血管内皮細胞に与える影響を次の 3 つの in vitro の系で検証した。

1) ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果を評価するため、ヒト健常好中球を rTM 前処置の有無に分けて ANCA-IgG で培養し、SG 陽性顆粒球率および CitH3 免疫染色により NETs 誘導率を評価した。次に rTM の好中球へ直接作用を検証するため、好中球と rTM の結合能を FCM および cell adhesion assay により解析した。rTM の好中球への結合部位を検証するため、好中球表面の 2 インテグリン Mac-1 (CD11b/CD18) に着目し、阻害抗体である抗 CD18 モノクローナル抗体 (CD18 mAb) を前処置した好中球および siRNA による Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞 (ヒト前骨髄性白血球細胞株) を用いて rTM との結合性を評価した。2) 自己抗体 ANCA を産生するリンパ球に対する rTM の影響を評価するため、CpG-DNA で刺激した PBMC を rTM で前処置を行い、IgG 産生や炎症性サイトカインのプロファイルを評価した。3) NETs による内皮細胞障害時の rTM の役割を評価するため、ヒストン (100 µg/ml) または ANCA 誘導 NETs を、rTM の前処置の有無に分けたヒト血管内皮細胞培養株 (HuEht) に添加し、LDH 放出試験および BSA-FITC 細胞透過性試験により内皮細胞障害度を評価した。

ヒト AAV 患者における TM の動態: AAV 患者 (n=13) および健常者 (n=10) の血清中の TM (sTM) 値を ELISA 法により測定し、血管炎の活動性 BVAS との関連を評価した。

### 4. 研究成果

In vivo 実験: AAV モデルラットの肺病変において、rTM 群では PBS 群と比較して、肺出血、肺組織中の CitH3 陽性 NETs および TUNEL 陽性域が有意に減少した。腎病変では、腎炎のマーカーである血尿、および腎組織中の TNF- $\alpha$  mRNA 発現が rTM 群において有意に低下した。循環 NETs および免疫 42 日後の ANCA 値も、rTM 群において PBS 群と比較し有意に低値であった。SCG/Kj マウスの PBS 群 (n=2) は治療経過中に死亡したが、rTM 群では PBS 群と比較し、体重減少の有意な抑制、循環 NETs の減少傾向、および ANCA 値の低下傾向を認めた。

In vitro 実験: rTM はヒストンおよび ANCA 誘導 NETs による HuEht の細胞障害を有意に抑制し

た。さらに rTM は ANCA 誘導 NETs の形成を有意に抑制した。rTM は好中球表面への結合能を示し、CD18 mAb を前処置した好中球および Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞では、rTM との結合がいずれも有意に抑制されたことから rTM が Mac-1 依存性に ANCA 誘導 NETs を阻害することが示された。また CpG-DNA 刺激された抗体産生中の PBMC は、種々の炎症性サイトカインが産生されるが、rTM により抑制された。

臨床検体実験：AAV 患者における血清中の sTM 値は、健常者と比較して有意に高値であった。AAV モデル動物に対する rTM 治療により、臓器障害の改善のみならず NETs の減少や ANCA 産生の抑制が示された。Invitro 実験において rTM は ANCA 誘導 NETs の形成を抑制し、また Mac-1 を介した好中球への結合能を示したことから、rTM は好中球 Mac-1 に結合して、ANCA 誘導 NETs の形成過程に必要な Mac-1 依存性の spleentyrosine kinase-NADPH シグナルの活性化 (Hewins P, et al., 2004) を抑制することで、AAV モデルの NETs を抑制したと考えられた。また rTM は PBMC に直接作用して、血管炎病態に関わる種々の炎症性サイトカインの産生を抑制したことから、rTM が PBMC に直接結合して (Kawamoto E, et al., 2016)、向炎症性から抗炎症性の PBMC に phenotype を変えることで、AAV モデルの ANCA の産生抑制に影響したと考えられた。さらに rTM はヒストンおよび ANCA 誘導 NETs による血管内皮細胞障害に対して保護効果を発揮することが示され、血管炎局所の壊死細胞から遊離されるヒストンを中和することで (Nakahara M, et al., 2013)、血管内皮細胞障害を軽減し、AAV モデルの臓器保護に繋がったと考えられた。rTM はこれらの多面的な効果を発揮することで、AAV の中心病態を制御する新規治療薬の候補となる可能性が示唆された。そして AAV 患者では健常者と比較して sTM 値が有意に高値であることが示され、血管内炎症を呈する敗血症 DIC 患者における sTM 動態と同様の結果であった (Lin SM, et al., 2008)。AAV においても血管内炎症を制御するための生体反応として、ANCA 誘導 NETs により傷害された血管内皮細胞から TM が遊離されていることが想定され、rTM の補充が AAV の病態改善に寄与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe-Kusunoki K, Nakazawa D, Kusunoki Y, Kudo T, Hattanda F, Nishio S, Masuda S, Tomaru U, Kondo T, Atsumi T, Ishizu A.	4. 巻 108
2. 論文標題 Recombinant Thrombomodulin Ameliorates Autoimmune Vasculitis via Immune Response Regulation and Tissue Injury Protection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaut.2019.102390.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda S, Watanabe-Kusunoki K, Nakazawa D, Kusunoki Y, Nishio S, Atsumi T.	4. 巻 10
2. 論文標題 6 The Pathogenicity of BPI-ANCA in a Patient With Systemic Vasculitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontier in Immunology	6. 最初と最後の頁 1334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.01334.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----