

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16575

研究課題名（和文）ANCA関連血管炎における好中球細胞外トラップのDNase抵抗性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of DNase resistance acquisition mechanism of neutrophil extracellular traps in ANCA-associated vasculitis

研究代表者

益田 紗季子（Masuda, Sakiko）

北海道大学・保健科学研究院・講師

研究者番号：10763617

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：DNase I感受性NETsあるいはDNase I抵抗性NETsのタンパクを網羅的に比較し、NETsにDNase I抵抗性を付与すると考えられるタンパク候補を18種類絞り込んだ。NETs誘導時に候補タンパクを加えると、5つのタンパクで正常NETsの形成が抑制され、DNase I抵抗性の異常なNETs形成が主体となった。そのうちの1つのタンパクに対する阻害抗体をNETs誘導時に加えると、正常および異常なNETs形成が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連血管炎では分解因子DNase Iに抵抗性を持つNETsが産生され、その結果自己抗体の産生や組織障害が誘導される。本研究では、NETsにDNase I抵抗性を付与する可能性のあるタンパクを絞り込んだ。そのうちの1つのタンパクに対する阻害抗体は異常なDNase I抵抗性NETsの産生を抑制したことから、本研究の成果はDNase I抵抗性NETsが関連する疾患の治療に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The proteins of DNase I-sensitive NETs or DNase I-resistant NETs were compared by proteomics analysis, and narrowed down 18 protein candidates that are considered to confer DNase I resistance to NETs. When candidate proteins were added during NET induction, the formation of normal NET was suppressed by the five proteins, and the formation of abnormal NET resistant to DNase I became the main component. Addition of an inhibitory antibody to one of these proteins during NETs induction suppressed the formation of normal and abnormal NETs.

研究分野：実験病理学

キーワード：ANCA関連血管炎 好中球細胞外トラップ NETs DNase I

1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎は ANCA の産生と全身の小型血管炎を特徴とする難病である。高齢者に好発し、半月体形成性壊死性糸球体腎炎を発症して腎不全に至る重篤な疾患である。疾患特異的な治療法がなく、プレドニゾロンと免疫抑制剤のシクロフォスファミドによる治療が標準治療とされている。しかし、約 20% が再燃し、免疫抑制による感染症死も問題となっている。免疫抑制剤に代わる疾患特異的な治療法を開発するためには、ANCA 関連血管炎の病因病態の解明が必須である。

ANCA 関連血管炎では、ANCA 自体に病原性があることが知られていたが、近年その病因病態に neutrophil extracellular traps (NETs) が関与することが明らかとなってきた。NETs は病原微生物の感染などによって活性化した好中球が放出する網状構造物で、DNA と MPO などの殺菌酵素が絡み合った構造をとる。生体防御に不可欠な殺菌機構であるが、自己組織を損傷する恐れもあり、役割を終えた NETs は血漿中の DNase I により速やかに分解される。ANCA 関連血管炎においては、TNF- α でプライミングされた好中球に ANCA が作用することにより NETs が誘導されることや、腎糸球体の半月体部位に NETs の沈着が見られることなどが報告されている。

研究代表者らはこれまでに、ANCA 関連血管炎患者では血漿中の DNase I 活性が低下し NETs 分解能が低下していること、ANCA 産生の副作用がある抗甲状腺薬プロピルチオウラシル (PTU) を NETs 誘導剤である phorbol myristate acetate (PMA) と同時に好中球に添加すると、異常な形態を示す NETs が形成され、その NETs は DNase I 抵抗性を示すこと、

ANCA 関連血管炎のひとつである多発血管炎性肉芽腫症 (GPA) の肺の壊死性肉芽腫内に DNase I 抵抗性 NETs が沈着していることを明らかにした。

一連の研究から、ANCA 関連血管炎では、血漿 DNase I 活性が低下していることに加え、NETs 自体が DNase I 抵抗性を獲得している可能性があり、両者が合わさって NETs 分解障害の要因となっていると考えられる。この NETs 分解障害により、NETs が長期間免疫細胞に暴露され続けることで、自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、自己抗体の産生そして ANCA 関連血管炎の発症につながっていると考えられる。生体内では DNase I 感受性であるはずの NETs が DNase I 抵抗性を獲得するメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

ANCA 関連血管炎や PTU の作用により誘導される DNase I 抵抗性 NETs に着目し、NETs に DNase I 抵抗性が付与される機序を明らかにする。さらに DNase I 抵抗性 NETs の形成を抑制する治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) プロテオミクス解析

In vitro サンプルとして好中球に PMA 単独あるいは PMA+PTU を添加し誘導した DNase I 感受性 NETs と DNase I 抵抗性 NETs、組織サンプルとして GPA あるいは結核の肺壊死性肉芽腫病変で認められた DNase I 感受性 NETs と DNase I 抵抗性 NETs それぞれをプロテオミクス解析により比較し、NETs の DNase I 抵抗性に関与すると考えられるタンパク候補を抽出した (図 1)。

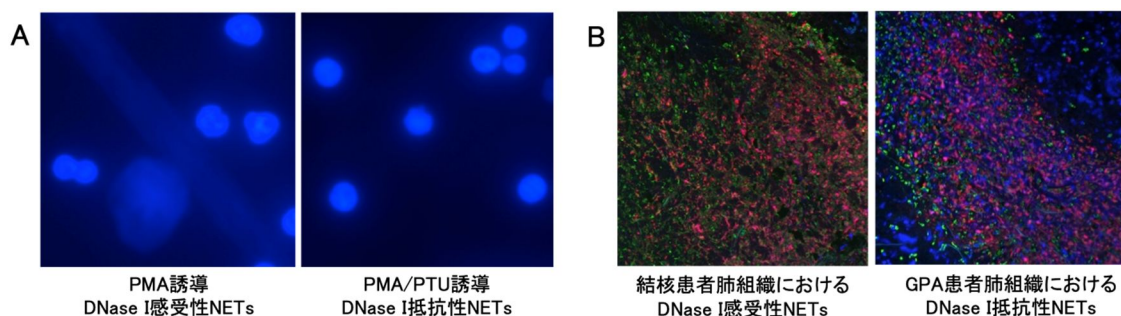


図 1. プロテオミクス解析に用いたサンプル

- A. 好中球に PMA 単独あるいは PMA と PTU を添加して誘導した NETs. 青: DNA
- B. 結核あるいは GPA 患者の肺の壊死性肉芽腫病変に認められた NETs. 青: DNA、赤: シトルリン化ヒストン (NETs)、緑: ミエロペルオキシダーゼ

(2) 候補タンパクおよびその阻害抗体が NETs 形成に及ぼす影響

In vitro での NETs 誘導系に上記により抽出したタンパクを添加し、形成される NETs の形状や DNase I 感受性に变化が生じるかどうかを確認した。また、タンパクに対する阻害抗体を添加し、NETs の DNase I 抵抗性が解除されることを確認した。

4. 研究成果

(1) 組織サンプルおよび in vitro サンプルを用いたプロテオミクス解析

GPA と結核のバックグラウンド肺および肺病変部の組織を用いたプロテオミクス解析では 864 種類のタンパクが同定され、GPA のバックグラウンド肺と比較して、GPA の病変部で増加したタンパクは 84 種類認められた。結核病変部と比較し、GPA 病変部で増加したタンパクは 24 種類認められた。追加で文献検索等を行い、NETs の DNase I 抵抗性に関与する可能性のあるタンパクとして、最終的に 14 個のタンパクまで絞り込んだ。In vitro サンプルを用いたプロテオミクス解析では PMA 単独あるいは PMA + PTU を添加後 0~6 時間反応後の好中球を比較した結果、2344 個のタンパクが同定された。ヒートマップにより、PTU 添加による異常なタンパクの増減が認められた。文献検索等により最終的には 4 個のタンパクまで絞り込んだ。

(2) 候補タンパクが NETs 形成に及ぼす影響

組織サンプルから抽出された 14 個のタンパク及び in vitro サンプルから抽出された 4 個のタンパク、計 18 個のタンパクについて検討を行なった。PMA を用いた in vitro NETs 誘導系に 18 種類のリコンビナントタンパクを添加することで NETs 形成や DNase I 感受性に影響を与えるかどうかスクリーニングを行なった (図 2)。その結果、13 個のリコンビナントタンパク添加では NETs 形成に影響は見られなかったが、5 個のリコンビナントタンパクの添加により、正常な NETs の形成が抑制され、異常な DNase I 抵抗性 NETs の形成が主体となった。そのうちの 1 つのタンパクに対する阻害抗体を NETs 誘導系に添加すると異常な NETs を含めた NETs 形成が抑制された。今後は残りの 4 つのタンパクに対する阻害抗体が異常な NETs の形成を抑制するかどうか検討する予定である。この阻害抗体は異常な NETs 形成を抑制することから、DNase I 抵抗性 NETs が病因病態に関与する ANCA 関連結果炎などの疾患の治療に応用できる可能性がある。

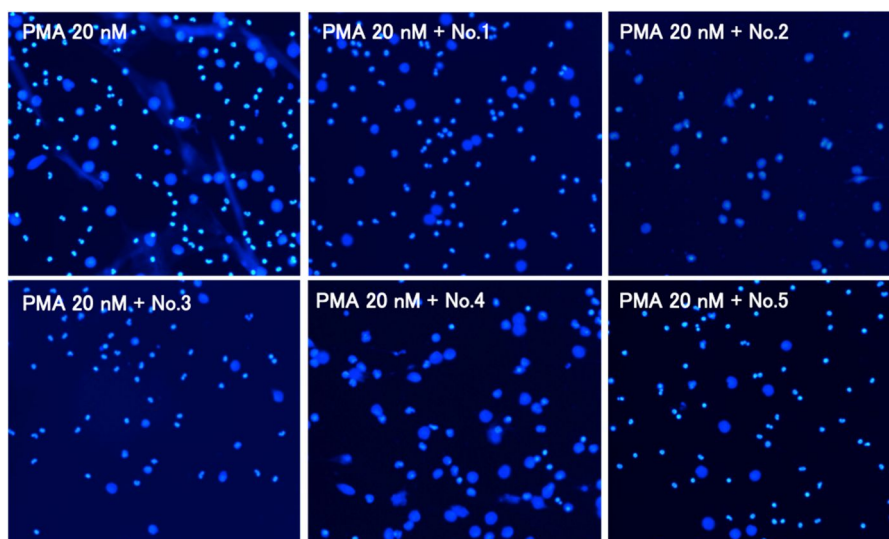


図 2. リコンビナントタンパク添加によるスクリーニング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uozumi Ryo, Iguchi Risa, Masuda Sakiko, Nishibata Yuka, Nakazawa Daigo, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro	4. 巻 30
2. 論文標題 Pharmaceutical immunoglobulins reduce neutrophil extracellular trap formation and ameliorate the development of MPO-ANCA-associated vasculitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 544 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1602292	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 Nonokawa Mayu, Suzuki Ku, Hayashi Hideyuki, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Nakazawa Daigo, Tanaka Satoshi, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Native myeloperoxidase is required to make the experimental vasculitis model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-019-2084-7	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 -
1. 著者名 Watanabe-Kusunoki Kanako, Nakazawa Daigo, Kusunoki Yoshihiro, Kudo Takashi, Hattanda Fumihiko, Nishio Saori, Masuda Sakiko, Tomaru Utano, Kondo Takeshi, Atsumi Tatsuya, Ishizu Akihiro	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 ~ 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 Nonokawa Mayu, Shimizu Tomohiro, Yoshinari Miku, Hashimoto Yamato, Nakamura Yusuke, Takahashi Daisuke, Asano Tsuyoshi, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Nakazawa Daigo, Tanaka Satoshi, Tomaru Utano, Iwasaki Norimasa, Ishizu Akihiro	4. 巻 190
2. 論文標題 Association of Neutrophil Extracellular Traps with the Development of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2282 ~ 2289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.07.008	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 -

1. 著者名 Ota Hiroki, Sato Chisa, Igarashi Akira, Inoue Sumito, Masuda Sakiko, Ishizu Akihiro, Watanabe Masafumi	4. 巻 59
2. 論文標題 Spontaneously regressed granulomatosis with polyangiitis: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 372 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.12.002	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 Senda Arisa, Sasai Ryutaro, Kato Kurumi, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Ishizu Akihiro, Takahara Noriko	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of glomerulonephritis in a case of systemic lupus erythematosus and antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis overlap syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-021-00682-y	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 -

1. 著者名 Masuda Sakiko, Kato Kurumi, Ishibashi Misato, Nishibata Yuka, Sugimoto Ayako, Nakazawa Daigo, Tanaka Satoshi, Tomaru Utano, Tsujino Ichizo, Ishizu Akihiro	4. 巻 125
2. 論文標題 Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulation under hypoxia induces nuclear swelling with DNA outflow but not extracellular trap formation of neutrophils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	6. 最初と最後の頁 104754 ~ 104754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexmp.2022.104754	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 -

1. 著者名 Kawakami Tamihiro, Yokoyama Kae, Ikeda Takaharu, Nishibata Yuka, Masuda Sakiko, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Presence of neutrophil extracellular traps in superficial venous thrombosis of Behcet's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16391	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 益田紗季子, 北野翔大, 西端友香, 外丸詩野, 石津明洋
2. 発表標題 好中球細胞外トラップにDNase I抵抗性を付与するタンパクの探索
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田 啓貴, 佐藤 千紗, 五十嵐 朗, 邨野 浩義, 梁 秀鼎, 町田 浩祥, 佐藤 建人, 中野 寛之, 根本 貴子, 西脇 道子, 木村 友美, 山内 啓子, 佐藤 正道, 井上 純人, 渡辺 昌文, 益田 紗季子, 石津 明洋
2. 発表標題 多発血管炎性肉芽腫症(GPA)の自然退縮における,好中球細胞外トラップ(NETs)分解について 当院で経験した1症例を通して
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋
2. 発表標題 myosin light chain6を認識する抗好中球細胞外トラップ(NETs)抗体はNETs分解阻害活性を持つ
3. 学会等名 日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益田紗季子, 西端友香, 田中敏, 外丸詩野, 辻野一三, 石津明洋
2. 発表標題 低酸素環境が好中球細胞外トラップ形成へ与える影響
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎 沙理, 益田 紗季子, 石津 明洋, 大塚 拓也, 牧田 啓史, 深澤 雄一郎, 辻 隆裕
2. 発表標題 腎生検組織におけるNeutrophil Extracellular Traps(NETs)の検討
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水智弘, 野々川茉佑, 西端友香, 益田紗季子, 高橋大介, 浅野毅, 田中敏, 外丸詩野, 岩崎倫政, 石津明洋
2. 発表標題 特発性大腿骨頭壊死症の発生における好中球細胞外トラップの関与
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 益田紗季子, 石橋美郷, 加藤くるみ, 西端友香, 田中敏, 外丸詩野, 辻野一三, 石津明洋
2. 発表標題 肺基礎疾患を有する肺炎患者における分解抵抗性好中球細胞外トラップの形成
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野々川茉佑, 西端友香, 益田紗季子, 石津明洋, 清水智弘, 高橋大介, 浅野毅, 岩崎倫政, 田中敏, 外丸詩野
2. 発表標題 特発性大腿骨頭壊死症の発生における好中球細胞外トラップの関与
3. 学会等名 北海道医学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 益田紗季子, 野々川茉佑, 西端友香, 岩崎沙理, 辻隆裕, 田中敏, 外丸詩野, 川上民裕, 石津明洋
2. 発表標題 ANCA関連血管炎(AAV)の壊死性病変部における好中球細胞外トラップ(NETs)の存在と病的意義
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 シクロフィリンDをターゲットとしたANCA関連壊死性血管炎に対する新規治療薬の開発
2. 発表標題 工藤孝司, 中沢大悟, 白鳥里佳, 楠加奈子, 西尾妙織, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也
3. 学会等名 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 益田紗季子, 西端友香, 中沢大悟, 外丸詩野, 川上民裕, 渥美達也, 石津明洋
2. 発表標題 ANCA関連血管炎の壊死性病変部における好中球細胞外トラップの存在と病的意義
3. 学会等名 日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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