

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08581

研究課題名(和文)シクロフィリンDをターゲットとしたANCA関連血管炎の新規治療開発

研究課題名(英文)Cyclophilin D is a novel therapeutic target in ANCA 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)：ANCA関連血管炎は、病原性自己抗体の産生とともに血管壊死により臓器障害が引き起こされる自己免疫疾患である。本研究では壊死誘導因子の一種であるシクロフィリンD(CypD)に着目し、CypDの制御が好中球の異常活性化と血管内皮細胞傷害を抑制することを解明した。2種類のモデルマウスにおいて、CypD遺伝子の除去により臓器障害が改善することを明らかにした。現在のAAVの治療の主体は強力な免疫抑制治療だが、免疫抑制による感染症死が多いこと等が問題である。本研究の結果から、CypDを新たな治療標的とすることで、免疫抑制を起こさずに、AAVの臓器障害が改善する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎は、外来微生物の侵入を阻止する好中球を異常に活性化する自己抗体であるANCAが何らかの機序で作られます。そのANCAにより活性化された好中球が体中の毛細血管で暴走し、腎臓や肺の毛細血管に壊死を引き起こして急激な腎不全や肺出血をきたす難病の一つです。治療は強力な免疫抑制薬が必要ですが、免疫力を低下させることで感染症による副作用が多いことが課題であり、本研究では免疫を抑制せずに好中球の暴走を阻止する治療の開発を目的としてCyclophilinDという標的を見つけ、治療効果を動物モデルで検証しました。今後は患者さんへの応用が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (AAV) is an autoimmune disease characterized by necrotizing vasculitis. Dysregulated neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to the development of necrosis in AAV, however, the specific therapy based on NETs physiology remains to be established. The authors discovered the therapeutic target molecule, Cyclophilin D (CypD), by analyzing the transcriptome profiling of ANCA-induced NETs using RNA sequencing. Animal studies revealed that genetic deficiency of CypD in murine AAV models ameliorated vascular necrosis via the regulation of NETs and endothelial injury. These findings suggest that the CypD might become a novel and specific therapeutic target of vascular necrosis in autoimmune vasculitis.

研究分野：腎臓病

キーワード：腎炎 ANCA関連血管炎 好中球

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) 関連血管炎は、外来微生物の侵入を阻止する好中球を異常に活性化する自己抗体である ANCA が何らかの機序で作られます。その ANCA により活性化された好中球が体中の毛細血管で暴走し、腎臓や肺の毛細血管に壊死を引き起こして急激な腎不全や肺出血をきたす難病の一つです。その病態には自然免疫機構である好中球細胞外トラップ (NETs) の制御が関与することが知られています。本疾患ではミエロペルオキシダーゼ (MPO) などを抗原とした病原性自己抗体 ANCA が好中球に作用して過剰な NETs と血管内皮傷害を誘導し壊死性血管炎を引き起こします。NETs は感染症時には侵入微生物を効率よく殺菌する免疫システムであると同時に、特定の分子によって制御される能動的な壊死 (ネクローシス) の一形態ですが、ANCA を介した NETs 形成のシグナル伝達経路は不明です。制御された壊死を司る分子の一つであるシクロフィリン D (CypD) は、活性酸素種 (ROS) などの刺激によりミトコンドリアの膜透過性遷移孔 (mPTP) を開口させ、ミトコンドリア内から過剰な ROS を細胞質へ流出させることでネクローシスを引き起こすことが知られています。本疾患の治療は強力な免疫抑制薬が必要ですが、免疫力を低下させることで感染症による副作用が多いことが課題であり、本研究では免疫を抑制せずに好中球の暴走を阻止する治療の開発を目的として CyclophilinD という標的を見つけ、治療効果を動物モデルで検証しました。今後は患者さんへの応用が期待されます。

2. 研究の目的

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) は、病原性自己抗体の産生とともに臓器障害が引き起こされる代表的な自己免疫疾患である。その病態には自然免疫機構である好中球細胞外トラップ (NETs) の制御が関与することが知られている。AAV ではミエロペルオキシダーゼ (MPO) などを抗原とした病原性自己抗体 ANCA が好中球に作用し、過剰な NETs と血管内皮傷害を誘導し壊死性血管炎を引き起こす。NETs は感染症時には侵入微生物を効率よく殺菌する免疫システムであると同時に、特定の分子によって制御される能動的な壊死 (ネクローシス) の一形態だが、ANCA を介した NETs 形成のシグナル伝達経路は不明である。制御された壊死を司る分子の一つであるシクロフィリン D (CypD) は、活性酸素種 (ROS) などの刺激によりミトコンドリアの膜透過性遷移孔 (mPTP) を開口させ、ミトコンドリア内から過剰な ROS を細胞質へ流出させることでネクローシスを引き起こすことが知られている。そこで我々は、ANCA 刺激により誘発される NETs 形成、ならびに ANCA-NETs による血管内皮細胞傷害において、CypD 依存性にネクローシスが起ると仮説を立て、AAV の壊死性血管炎の病態形成への関与を解析した。

3. 研究の方法

我々は ANCA 誘導 NETs における CypD 阻害薬と CypD 遺伝子除去の効果をそれぞれ検証した。また、ANCA 誘導 NETs のシグナル因子を解析するために RNA シークエンス解析を行った。さらに血管内皮細胞傷害における CypD の役割を検証するために ANCA-NETs により傷害された血管内皮細胞に CypD 阻害薬を投与し、細胞透過性試験により内皮傷害を評価した。次に、AAV における CypD 遺伝子の役割を解析するために、ANCA 移入モデルと AAV 自然発症の 2 種類のモデルマウスを用いて CypD の遺伝子除去の効果を検証した。

結果は、ヒト好中球において CypD 阻害薬はミトコンドリアからの ROS およびシトクロム c の放出抑制を介して ANCA-NETs の誘導を抑えた。またマウス好中球は MPO-ANCA により NETs が誘導されたが、CypD 遺伝子を除去したマウス好中球では有意に抑制された。RNA シークエンス解析では、ANCA 誘導 NETs で炎症性シグナルの亢進を認め、上流調節因子解析により、そのシグナル変化を抑制する制御因子として CypD 阻害薬が特定された。さらに、ANCA 誘導 NETs により誘導される血管内皮細胞傷害は CypD 阻害薬投与により有意に抑制された。2 種類の AAV モデルマウスにおいては、CypD 遺伝子除去により血管内皮の壊死は抑制され、免疫抑制を介さずに半月体性糸球体腎炎を改善させた。

4. 研究成果

In vitro の実験により、自己抗体 ANCA により誘導される CypD を介した NETs 形成、血管内皮細胞傷害に起因することが示唆された。CypD の役割をモデル動物で検証したところ、ANCA 移入モデルでは、CypD 欠損マウスで NETs 形成、壊死病変、ならびに臓器障害が軽減し、ANCA 産生 AAV 自然発症モデルにおいても CypD 遺伝子除去により臓器病変が改善した。しかし、MPO-ANCA の産生低下は見られず、CypD の獲得免疫系へ影響は少ないことが示唆された。さらに SLE では、ヒト腎生検検体ならびにモデルマウスにおいて壊死病変、NETs 形成は乏しく、CypD 遺伝子欠損が SLE 誘導マウスに与える影響も見られなかったことから、CypD は自己免疫病態の中でも、NETs

がエフェクターとして作用する壊死病態に関与することが示唆された。現在の AAV の治療の主体は強力な免疫抑制治療であり、病態の上流を制御することは可能であるが、免疫抑制による感染症死が多いこと、壊死病態を制御できないために臓器障害が残ることが課題である。本研究では、CypD を標的とした治療が、免疫抑制を起こさずに、血管局所で誘導される壊死を分子メカニズム的に制御することで血管炎病態を改善する可能性を示した。本研究では壊死誘導因子の一種であるシクロフィリン D (CypD) に着目し、CypD の制御が NETs の誘導を抑制し、血管内皮細胞傷害を抑制することを解明した。さらに、2 種類の AAV モデルマウスにおいて、CypD 遺伝子の除去により NETs が抑制され、臓器障害が改善することを明らかにした。本研究の結果から、CypD を新たな治療標的とすることで、免疫抑制を起こさずに、AAV の臓器障害が改善する可能性が示唆された。

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 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kudo Takashi, Nakazawa Daigo, Watanabe Kusunoki Kanako, Kanda Masatoshi, Shiratori Aso Satoka, Abe Nobuya, Nishio Saori, Koga Jun ichiro, Iwasaki Sari, Tsuji Takahiro, Fukasawa Yuichiro, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Masuda Sakiko, Tomaru Utano, Murakami Masaaki, Aratani Yasuaki, Ishizu Akihiro, Atsumi Tatsuya | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 Regulation of NETosis and Inflammation by Cyclophilin D in Myeloperoxidase Positive Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Associated Vasculitis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 71 ~ 83 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.42314 | 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi Kudo, Daigo Nakazawa |
| 2. 発表標題 CYPD DEFICIENCY AMELIORATES AUTOIMMUNE VASCULITIS IN MOUSE MODEL VIA THE INHIBITION OF PROGRAMMED NECROSIS |
| 3. 学会等名 57th ERA-EDTA Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|