

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16227

研究課題名(和文) 核酸認識TLRを標的としたANCA関連血管炎の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapeutic method targeting nucleic acid recognizing TLRs for ANCA-associated vasculitis

研究代表者

村上 祐輔 (Murakami, Yusuke)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：50757325

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)：ANCA関連血管炎(AAV)は、好中球細胞質の抗原に対する抗体(ANCA、自己抗体)の検出と糸球体腎炎といった多臓器・組織の炎症を特徴とする疾患である。我々は、最近、DNAやRNAを認識するToll様受容体(TLR)が自己免疫性の腎炎に関与することを報告している。そこでAAVモデルマウスを用いて、これらのTLR応答の意義を解析したところ、TLR7阻害抗体およびTLR7ノックアウトで病態の部分的な抑制効果を認めた。これらの結果は、新たな病態形成メカニズムの解明と治療薬の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連血管炎は、難病指定された根治の難しい疾患である。治療法は免疫抑制剤やステロイド製剤の投与であり、副作用の少ない治療法の開発が求められている。またこれらの薬に抵抗を示す患者もいる。本研究では、AAVモデルマウスを用いて、TLR7の病態への関与を検証した。我々は、独自に樹立した抗TLR7阻害抗体やTLR7KOマウスを用いて解析したところ、部分的にAAVの病態を抑制する結果を得た。これらの結果は、新たな病態形成メカニズムの解明と治療薬の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：ANCA-associated vasculitis (AAV) is a disease characterized by the detection of antibodies against neutrophil cytoplasmic antigens (ANCA, autoantibodies) and inflammation of multiple organs and tissues such as glomerulonephritis. We have recently reported that Toll-like receptors (TLRs) that recognize DNA and RNA are involved in autoimmune kidney nephritis. Therefore we analyzed the significance of these TLR responses in an AAV mouse model (SCG/ThpNkc mice) and found that TLR7 knockout had a partial suppressive effect on the pathogenesis. These results may contribute to the elucidation of new pathogenesis-forming mechanisms and the development of therapeutic agents.

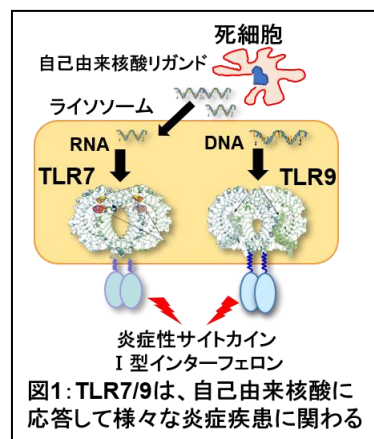
研究分野：免疫学

キーワード：ANCA関連血管炎 自己免疫疾患 核酸認識Toll様受容体

### 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、国の指定難病であり、顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis, MPA)、多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis, GPA) および好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA) の3疾患が含まれる。本邦では、MPA 罹患者が最も多く、約 6000 人おり、GPA と EGPA 罹患者が同数の約 2000 人ずついる。これらの患者で、約 10% が、ステロイド抵抗性で難治化し、腎不全などの致命的な病態に進行することが問題である。先行研究では、好中球の活性化、ANCA 産生、腎不全が正に相関することが知られている。さらに EGPA では、アレルギー性ぜん息や鼻炎といった基礎疾患により好酸球が生体内で増加し、ANCA 産生と合わせて、様々な臓器や血管に炎症を起こすことが知られている。しかし、好酸球増加と ANCA 産生の因果関係や、病態の分子メカニズムはほとんどわかっていない。

申請者らは、核酸を認識する Toll-Like Receptor (TLR) 7 や TLR9 のリガンド応答と炎症疾患の発症との関係について研究を進めてきた。核酸認識 TLR は、主にウイルスや細菌由来の DNA や RNA を認識して、免疫系を活性化することにより生体防御に寄与している。一方で、炎症などで傷害された組織由来の DNA や RNA をも認識することで、自己免疫疾患など様々な炎症疾患の病態に関与することが知られている (図1)。しかし、TLR と ANCA 関連血管炎との関わりはほとんどわかっていない。申請者は、これまでの研究で、TLR7 ノックアウト



(KO) マウス、TLR9KO マウスを用いた解析や、TLR7 および TLR9 のリガンド応答を、それぞれ特異的に阻害する抗体を用いて、疾患モデルでの治療効果の検討を実施してきた。最近の結果から、自己免疫性の腎炎に、TLR7 阻害抗体が著効することを見出しつつある。ANCA 関連血管炎モデルで、腎炎を発症する SCG/kj マウスにおいても TLR7 が発症に関与する可能性がある。また、TLR9 阻害抗体は、ダニ誘導性アレルギー性ぜん息モデルにおいて効果的に肺への好酸球浸潤を抑制する結果を報告している。

### 2. 研究の目的

本研究では、ANCA 関連血管炎モデルマウスを用いて、致命的な腎炎発症に TLR7 または TLR9 がどのように関与し、治療標的になりうるのか検証した。これまでの研究では、好中球の活性化や ANCA 産生、T、B リンパ球の活性化が病態とどのように関与するかについて精力的に行われてきた。しかし、核酸リガンドに対する自然免疫応答と ANCA 関連血管炎との関わりは、ほとんど解明されていない。申請者は、TLR7/9 阻害抗体を用いて、様々な疾患モデルマウスの検討を行ってきた。エンドライソソームに局在する TLR7/9 であっても、例えば、抗体が細胞表面の TLR に結合後、複合体を形成したまま、ライソソームに安定的に到達する経路や、Fc 受容体を介して非特異的に IgG が細胞内に取り込まれる経路があることを確認している。さらに、機能的には、マウスマクロファージを用いた実験で、それぞれの抗体が、TLR7/9 応答を特異的に阻害して、炎症性サイトカイン産生を抑制するデータも取得している。実際、in vivo においても、TLR7 抗体が自己免疫疾患モデルマウスの自己抗体産生を低下させること、TLR9 抗体がアレルギー性喘息モデルマウスの IgE 産生を低下させることを見出している。このように、核酸認識 TLR 応答が炎症疾患に関与することが示唆されつつも、ANCA 関連血管炎における検討は報告されたことはない。そのため、TLR7/9 が治療標的となるのか不明であった。本研究では申請者らが独自に樹立した TLR7 または TLR9 阻害抗体を用いた。このような TLR 応答を特異的に抑制する抗体は、他に報告されていないため独自性の高い解析が可能である。これまでの予備検討と合わせて、ANCA 関連血管炎の病態における TLR7, TLR9 の重要性を解明することで、新たな治療標的として同定し新規治療法の開発につなげることを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、ANCA を産生するマウスとして、SCG/kj マウスを用いた。TLR7 および TLR9 応答の病態における意義を、TLR ノックアウトマウスと疾患モデルマウスと交配して解析する。さらに、これらのマウスに TLR7 または TLR9 阻害抗体を投与して治療効果を評価する。以上の研究の達成を目指して、次の3つの大項目を具体的に実

施する。

(1) TLR7/9 阻害抗体による SCG/kj マウスの腎炎抑制効果

SCG/kj マウスは、ANCA の産生、致死的な腎炎の発症がすでに報告されている。TLR7/9 阻害抗体を週一回、投与して、生存曲線、尿たんぱく量(アルブミン/クレアチニン比)、血中尿素窒素値、ANCA 抗体価をモニタリングし評価する。

(2) TLR7/9 阻害抗体を投与した SCG/kj マウスの脾臓および末梢血解析

マウスから脾臓および末梢血を採取して樹状細胞、マクロファージ/単球、好中球、好酸球、リンパ球など様々な免疫細胞の割合をフローサイトメトリーで比較する。さらに、投与した抗体とは、別のクローンである TLR7, TLR9 抗体を用いて各細胞群での TLR 発現を解析する。

(3) TLR7/9 阻害抗体を投与した SCG/kj マウスの腎臓解析

マウスから腎臓を回収して、炎症性サイトカイン、インターフェロン、ケモカイン産生について、mRNA を精製し、リアルタイム PCR で定量して評価する。また、腎臓の糸球体や間質に免疫細胞が浸潤する。そこで、腎臓を採取し、ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色、PAS 染色などの一般染色や細胞サブセットマーカーの抗体で免疫組織化学染色を実施し、糸球体の変性、腎臓に浸潤する炎症細胞を解析する。

#### 4. 研究成果

SCG/Kj マウス (以下、本モデルマウス) は、16 週齢までに約 80% が死亡するため、まず TLR7/9 阻害抗体を投与して、マウスの生存率を評価した。各群 N=8 匹で実施したところ、TLR7 の阻害で有意に生存率が改善した (図 2)。実際、尿中のアルブミン/クレアチニン比も減弱した。また、血清中の MPO-ANCA も有意差はつかなかったものの部分的に抑制した。

脾臓および腎臓のフローサイトメトリー解析を実施したところ、抗体の投与でパトローリング単球および好中球の割合が減少した。一方、脾臓の T、B リンパ球の割合に変化はなかった。また、腎臓の病理学的な解析で PAS 染色を実施したところ、TLR7 抗体の投与で特徴的な半月体形成の減弱を認めた (図 3)。

一方、TLR ノックアウトマウスでは、TLR7 ノックアウトマウスが先行して樹立できたので解析した。腎臓のフローサイトメトリー解析で、好中球の減少を認めた。脾臓では、各細胞の割合に大きな違いはなかった。

今後、さらに詳細な研究を進めて、本疾患における TLR の意義と治療標的の可能性について検討する予定である。

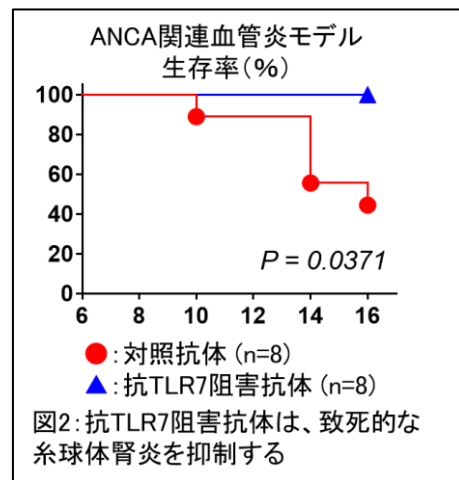


図2: 抗TLR7阻害抗体は、致死的な糸球体腎炎を抑制する

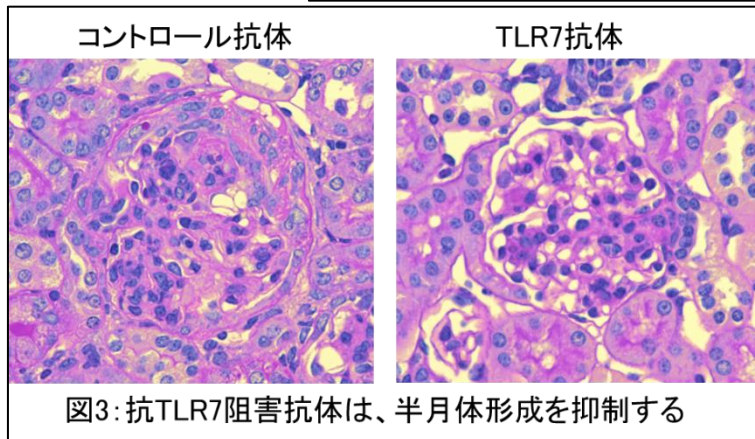


図3: 抗TLR7阻害抗体は、半月体形成を抑制する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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