

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22911

研究課題名（和文）ANCA関連血管炎に関わる血小板由来因子の分子機構と治療剤の探索

研究課題名（英文）Identification of platelet-mediated neutrophil extracellular traps in ANCA-associated vasculitis

研究代表者

松本 紘太郎（MATSUMOTO, Kotaro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00815425

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ANCA関連血管炎患者由来の血小板が液性因子を介して好中球細胞外トラップを誘導することを明らかとした。特に、ANCA関連間質性肺炎では、血小板由来因子であるCXCL4が好中球細胞外トラップを誘導し、遊離したcell-free DNAが血小板のTLR9を刺激することでCXCL4が放出され、さらなる好中球細胞外トラップを誘導するポジティブフィードバック機構を促進する。CXCL4阻害剤は、血小板を介した好中球細胞外トラップ形成を抑制し、血管炎の新規治療とな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

ANCA関連血管炎は血管内皮細胞障害を伴う壊死性血管炎により、血管の閉塞や破綻、臓器障害を来す全身性疾患で、未だ予後不良の疾患である。特に、ANCA関連間質性肺炎は生命予後不良で著効を示す治療薬が存在しない。本研究は、血小板由来液性因子であるCXCL4を阻害することで好中球細胞外トラップを抑制し、血小板を標的としたANCA関連間質性肺炎の新規分子標的治療の創薬基盤となる可能性がある。本研究で得られた知見は好中球細胞外トラップ形成の過剰の病態を呈する他疾患にも適応出来る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Platelets from ANCA-associated vasculitis (AAV) significantly upregulated neutrophil extracellular traps (NETs) formation in vitro. Flow cytometric analysis revealed that the proportion of TLR9 positive platelets was significantly higher in ANCA-associated interstitial lung disease than HCs. CXCL4 released from TLR9 agonist stimulated platelets was significantly enhanced in AAV, which subsequently increased NETs formation. Further, neutralizing anti-CXCL4 antibody significantly inhibited NETs formation enhanced by platelets from AAV. TLR9 signaling and CXCL4 release underlie the key role that platelets play in NETs formation in the pathogenesis of AAV.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ANCA関連血管炎 好中球細胞外トラップ 血小板 自然免疫 網羅的遺伝子発現解析 分子機構 病態 解明 分子標的治療薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA) 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis: AAV) は国により定められた希少指定難病であり、血管内皮細胞障害を伴う壊死性血管炎により全身の諸臓器が機能不全となる、生命予後不良な疾患である。しかしながら、その病態形成機序の詳細が不明であるため、著効を示す治療薬がないことが問題視されている。近年、AAV の病態に“好中球”が血管内皮細胞障害に重要な役割をもつ可能性が指摘されてきた。その機序の1つとして、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) が考えられている。NETs とは活性化好中球が核内のクロマチン網を細胞外へ放出し、形質細胞様樹状細胞を刺激して過剰な免疫応答や炎症反応を誘導し組織障害に關与する細胞壊死形態の1つである。AAV では自己抗体が NETs を誘導する機構が想定されるが、自己抗体は一定の割合で検出されず、自己抗体のみでは AAV の病態を説明出来ない。

2. 研究の目的

血小板は炎症、免疫機構において多岐にわたる機能を持ち、自己免疫疾患においても重要な役割を果たし得る。血管炎についても、血管内の炎症や血栓症への血小板の関与が想定されるが、これまでに血管炎の病態に關与する血小板の役割および血小板の形質変化について明らかにした報告はない。血小板は血管内の炎症や血栓症において重要な役割を担う細胞であり、研究代表者らは AAV での NETs 誘導における血小板の役割を解明し、その中心的な役割を果たす分子を同定することが、新規治療法の確立につながると考えた。具体的には、血管炎患者由来の血小板が NETs を誘導する詳細な機構を明らかにし、血管炎に特徴的な血小板分画あるいは血小板と好中球の相互作用機構での治療標的分子を探索・同定すること、同定された分子を阻害することで病態が改善することを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

AAV に特徴的な血小板あるいは血小板と好中球の相互作用を標的とした AAV の新規治療法の確立を目指し、本研究では血小板由来因子および好中球の相互作用を標的とした NETs 形成の阻害機構を明らかとするべく、以下を実施した。

- (1) 血小板および好中球の相互作用を介した NETs 誘導機構の解明
- (2) 血小板・全血の網羅的遺伝子発現解析
- (3) 血小板由来液性因子を対象とした NETs 誘導因子のスクリーニング
- (4) CXCL4 誘導機構の解明
- (5) CXCL4 阻害による AAV 治療の可能性

4. 研究成果

本研究は令和2年度～令和3年度の2年間実施し、研究期間内に以下を明らかにした。

(1) 血小板および好中球の相互作用を介した NETs 誘導機構の解明

AAV 由来の血小板を含む血漿で健常者好中球を刺激した場合、血小板を含まない血漿で刺激した場合に比べて明らかに NETs 形成を誘導し、AAV 由来血小板は健常者および疾患コントロール群由来血小板と比較して有意に高い NETs 誘導能を持つことを明らかにした。ポイデン・チャンパーを用いたトランスウェルアッセイでは、血小板の好中球への接着よりも、血小板由来の液性因子が NETs の誘導に關与する可能性が示唆された (図1)。

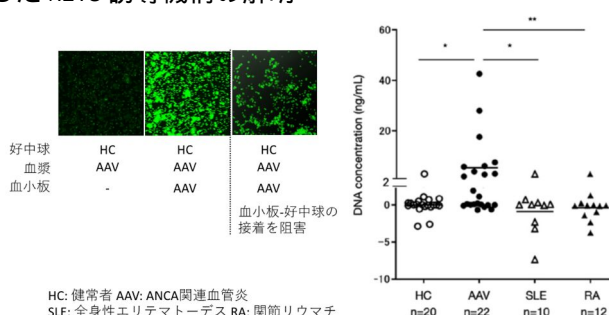


図1 AAV由来血小板を介したNETs誘導

(2) 血小板・全血の網羅的遺伝子発現解析

AAV 由来血小板・全血のメッセンジャーRNA を抽出し、マイクロアレイ解析 (アジレント社) を実施した。AAV 由来血小板は健常者由来血小板と比べて Toll 様受容体 (toll-like receptor: TLR) シグナルおよび液性因子分泌に關連するパスウェイが亢進している可能性が示唆された。全血を用いた遺伝子発現解析およびバリデーショ解析では、好中球上のインテグリン分子である LFA-1 発現が亢進し、血管内皮細胞障害へ關与することを明らかにした [Matsumoto K, Kurasawa T, Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T. Identification of neutrophil 2-

integrin LFA-1 as a potential mechanistic biomarker in ANCA-associated vasculitis via microarray and validation analyses. *Arthritis Res Ther* 2021;23:136.].

(3) 血小板由来液性因子を対象とした NETs 誘導因子のスクリーニング

NETs は共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察し、細胞外二本鎖 DNA の蛍光強度を定量し、複数種の血小板由来液性因子を対象とし、NETs 誘導能を明らかとするためのスクリーニングを実施した。血小板由来のケモカインである CXCL4 が AAV 由来血小板を介した NETs の定量値と相関し、CXCL4 は濃度依存性に NETs 形成を誘導した。

(4) CXCL4 誘導機構の解明

血小板には TLR2・4・9 を含む免疫制御分子が発現していることが知られる。細胞内フローサイトメトリー解析によって、血小板の TLR9 発現は AAV で健常者と比較して高値であったが、TLR2 および TLR4 陽性率は健常者と差を認めなかった。血小板での TLR9 陽性率は肺病変を合併する患者で有意に上昇し、間質性肺炎のマーカーである血清 KL-6 と相関した (図 2)。

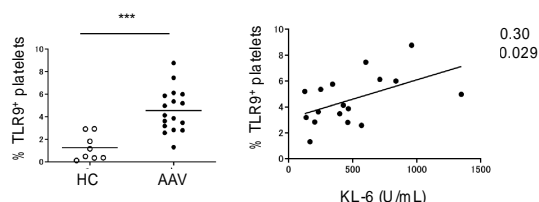


図2 AAV由来血小板におけるTLR9発現

TLR9 のリガンド刺激は血小板からの CXCL4 分泌を促進し、CXCL4 を介して NETs を誘導することを明らかとした。さらに、好中球細胞外トラップによって遊離した cell-free DNA が血小板の TLR9 を刺激することで CXCL4 が分泌され、さらなる好中球細胞外トラップを誘導するポジティブフィードバック機構を促進し、特に、ANCA 関連間質性肺炎への関与が示唆された。

(5) CXCL4 阻害による AAV 治療の可能性

ANCA 関連血管炎由来の血小板によって誘導された NETs 形成は、CXCL4 の阻害剤によって抑制されることを明らかとし (図 3) CXCL4 を阻害することが ANCA 関連血管炎の治療剤となる可能性について報告した [[Matsumoto K, Yasuoka H, Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T. Platelet CXCL4 mediates neutrophil extracellular traps formation in ANCA-associated vasculitis. *Sci Rep* 2021;11:222.](#)]。

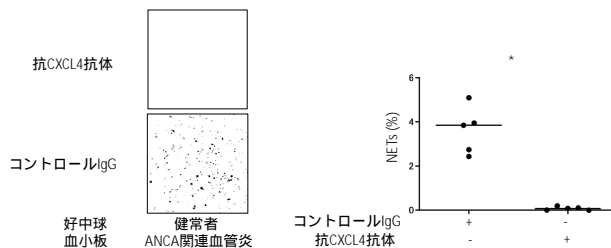


図3 抗CXCL4抗体による血小板介在NETsの阻害

本研究により得られた治療標的分子が起因する NETs 形成の抑制は病態の改善につながり、AAV の新規治療法の確立への橋渡しになると考える (図 4)。血小板を標的とした新規治療法が確立出来れば、重要な死因の1つとなっている強力な免疫抑制治療に関連した感染症を防ぐことが出来、さらなる予後の改善が期待される。血小板由来液性因子である CXCL4 を阻害することで好中球細胞外トラップを抑制し、血小板を標的とした ANCA 関連間質性肺炎の新規分子標的治療の創薬基盤となる可能性がある。本研究で得られた知見は好中球細胞外トラップ形成の過剰の病態を呈する他疾患にも適応出来る可能性がある。

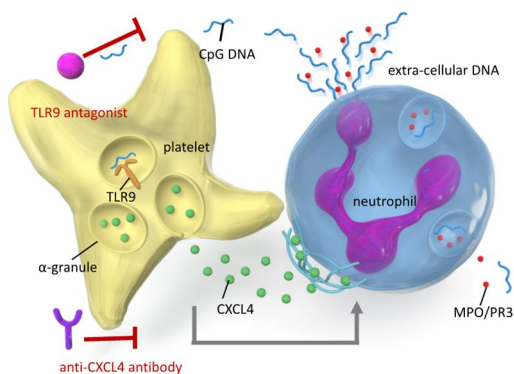


図4 AAVにおける血小板TLR9-CXCL4を介したNETs誘導

< 引用文献 >

[Matsumoto K, Kurasawa T, Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T. Identification of neutrophil 2-integrin LFA-1 as a potential mechanistic biomarker in ANCA-associated vasculitis via microarray and validation analyses. *Arthritis Res Ther* 2021;23:136.](#)

[Matsumoto K, Yasuoka H, Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T. Platelet CXCL4 mediates neutrophil extracellular traps formation in ANCA-associated vasculitis. *Sci Rep* 2021;11:222.](#)

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 2件）

1. 著者名 Kotaro Matsumoto, Hidekata Yasuoka, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Platelet CXCL4 mediates neutrophil extracellular traps formation in ANCA-associated vasculitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific 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） 10.1038/s41598-020-80685-4.	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 Kotaro Matsumoto, Takahiko Kurasawa, Keiko Yoshimoto, Katsuya Suzuki, Tsutomu Takeuchi	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification of neutrophil 2-integrin LFA-1 as a potential mechanistic biomarker in ANCA-associated vasculitis via microarray and validation analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	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） 10.1186/s13075-021-02510-1	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〕

-

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