

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591199

研究課題名(和文) ANCA関連腎炎発症における好中球細胞外トラップおよび相補的MPOの役割の解析

研究課題名(英文) A role of NETs for damage of renal glomerular endothelial cells in ANCA-associated renal vasculitis

研究代表者

駒形 嘉紀 (Komagata, Yoshinori)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：60281995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ANCA関連血管炎(AAV)の糸球体腎炎組織を抗MPO抗体で免疫染色したところ、細胞外MPOが主にMPO陽性細胞近傍の糸球体毛細血管壁に認められた。MPOは好中球から放出されるNETsに含まれるため、AAV患者の好中球からのNETs産生を調べたところ、健常人と比較して好中球からのfiber状のNETs産生が亢進しており、それは治療による病勢の低下と並行していた。これらにより、AAV患者の腎炎の病態に糸球体血管内皮細胞における好中球からのNETs放出が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pathological examination of renal biopsies from ANCA-associated vasculitis indicated that there was a glomerular infiltration of MPO-positive cells along with deposition of extracellular. Chromatin fibers called NETs are released from neutrophils. It has been known that NETs are implicated in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis (AAV). We observed NETs formation in order to investigate the role of NETs in AAV. Peripheral blood neutrophils from AAV patients were primed with phorbolmyristate acetate(PMA) and the percentage of NETs producing cells were calculated. Neutrophils from active AAV patients produced much more fiber-like NETs than neutrophils from controls. The release of fiber-like NETs was markedly decreased by treatment for AAV. These data suggest the release of NETs by neutrophil at vascular endothelium is important for the pathogenesis of AAV.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学 ANCA関連血管炎 好中球

### 1. 研究開始当初の背景

顕微鏡的多発血管炎 (MPA)をはじめとする ANCA 関連血管炎は高齢者に多く見られ進行性の壊死性糸球体腎炎を呈する予後不良の疾患である。欧米では PR3-ANCA が陽性となる多発血管炎性肉芽腫症 (GPA; Wegener 肉芽腫症) が比較的多いが、本邦においては MPO-ANCA (anti-MPO Ab; 好中球アズール顆粒中にあるミエロペルオキシダーゼに対する抗体) が陽性となる MPA や好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA; Churg-Strauss 症候群) の患者が多い。その病態に MPO-ANCA が直接関与していることがわかっているが MPO 陽性の好中球が患者の糸球体内でどのように腎炎を発症させているのか、そこに好中球が放出する MPO がどのように関与しているのかについての詳細はわかっていない。

申請者らのグループはこれまで、ANCA の発見から始めて約 20 年にわたり ANCA 関連血管炎の臨床および病態解明の研究を行ってきた (Arimura Y, et al. Intern Med. 31:239-43, 1992)。最近では MPO-ANCA 関連の壊死性半月体形成性糸球体腎炎において MPO 陽性細胞が糸球体内に浸潤していること、それらは糸球体糸球壁に局在していること、およびその近傍の毛細血管内皮細胞が障害されていることを示してきた。これらのデータは、糸球体内に浸潤した MPO 陽性である好中球が糸球体毛細血管内皮に接着し MPO を放出することによって細胞障害を引き起こしていることを示唆する。しかし、これらの好中球が糸球体局所においてどのように活性化されるのか、局所の好中球からの MPO の放出とそれに対する MPO-ANCA の反応の詳細、MPO-ANCA 関連腎炎において一般的に糸球体基底膜への IgG の沈着が非常に少ない理由などについては不明であり、MPO-ANCA 関連腎炎の病態解明のためにはこれらの解明が不可欠である。

一方最近、好中球細胞外トラップ (NETs) と呼ばれる好中球が放出するクロマチン線維が ANCA 関連血管炎において重要な役割を持っていることが示唆されている (Kessenbrock K, et al. Nat Med 15:1559, 2009)。もともと NETs は好中球が細菌などを効率よく捕捉するために放出する線維として発見された。元来 ANCA 関連血管炎においてなぜ好中球の細胞質に存在する MPO や proteinase-3 (PR3) などに対する抗体が出現するのかが謎であったが、NETs 中に MPO や PR3 が存在することが示されたために、NETs が ANCA 関連血管炎の発症にどのように関わるのかが非常に注目されている。

### 2. 研究の目的

申請者らのグループはこれまで、MPO-ANCA 関連血管炎にみられる糸球体腎炎において MPO 陽性細胞が糸球体毛細血管内皮に接着しその局所および近傍に MPO を

放出することにより内皮障害を引き起こしていることを示してきた。この MPO 陽性好中球が放出する好中球細胞外トラップ (NETs) の内皮細胞障害および糸球体腎炎発症に果たす役割、腎炎の重症化を防ぐための早期発見の方法を解析することにより MPO-ANCA 関連血管炎の治療を目指すことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) MPO-ANCA 関連腎炎患者の腎生検サンプルを用いた MPO 陽性細胞近傍の免疫染色による解析

糸球体に浸潤した MPO 陽性細胞とその近傍において MPO と MPO-ANCA の免疫複合体が形成され、それによって血管内皮細胞が実際に障害されているかを確かめるために血管内皮細胞を認識する anti-CD34 抗体と anti-MPO, anti-IgG を同時に蛍光染色する。また局所において MPO 陽性細胞により NETs の放出がみられるかどうかをヒストンや DNA を染色して確認する。

さらに、糸球体毛細血管壁への MPO 沈着を拡がる様相により Limited type と Diffuse type とに分けて解析する。

(2) ANCA 関連腎炎患者好中球が放出する NETs の特徴の解析

健常人の末梢血好中球を PMA などで刺激すると一部の好中球が NETosis を起こし NETs を放出するが、上述のように大きく分けて 2 つのタイプの NETs を産生する。何%の好中球がそれぞれのタイプの NETs を産生するかは多少の個人差がある。同様の実験を ANCA 関連血管炎患者の好中球を用いて行い、その形態を観察する。また健常人では見られないタイプの NETs 産生がないかどうかを確認する。また好中球の刺激方法の違い、患者が MPO-ANCA 陽性か PR3-ANCA 陽性か、病気の違い (MPA, GPA, EGPA) など様々な要素の違いによって NETs 産生に違いが生じるかどうかを同時に解析する。NETs の産生量は形態学的な観察によりそれぞれのタイプの NETs を産生する好中球の比率とともに、培養上清中の NETs を ELISA により測定する。ELISA は 1 次抗体に anti-MPO 抗体、2 次抗体に anti-DNA 抗体を用いた Sandwich ELISA の系を確立する。

ANCA 関連腎炎の初発例がいれば、その治療前後の好中球を回収しその NETs 産生を解析する。Steroid pulse 療法など強力な治療をした場合、その後徐々に steroid を減量していく際の NETs 産生の変化も同時に観察する。また治療法の違いによって治療前後での変化に違いがあるかどうか、ANCA 値など実際の病勢と NETs 産生量との間に相関関係がみられないかどうかを解析する。

(3) NETs 放出による腎糸球体内皮細胞傷害のメカニズムの解析

腎系球体内皮細胞株を入手し、好中球との co-culture の系を確立する。その系において健常人の好中球を回収し PMA などによる刺激により産生される NETs が内皮細胞と接触することによりどの程度の細胞傷害が起きるのかを、内皮細胞 DNA のみ BrdU で標識することによりその DNA のダメージを測定する。同様の実験を ANCA 関連腎炎患者の好中球を用いて測定し、健常人との違いについて解析する。特に患者の腎障害の程度と、in vitro での内皮細胞傷害の程度との間に相関関係がないかどうかを解析する。

内皮細胞が NETs により傷害を受けていることが確認できれば、それが 2 種類の NETosis のうちどちらによって起こるのかを検討する。さらに fiber 状に放出された NETs が内皮細胞と接触した際の内皮細胞の形態を走査型電子顕微鏡を用いて検討する。接着因子を含めた内皮細胞上の表面分子のうち何が細胞傷害に重要であるかを解析するため、各種細胞表面分子を抗体をつかってブロックすることで内皮細胞傷害に変化が生じるものがあるかどうか調べる。

#### 4. 研究成果

(1) MPO-ANCA 関連腎炎患者の腎生検サンプルを用いた MPO 陽性細胞近傍の免疫染色による解析

系球体内 MPO 陽性細胞数は系球体旧姓障害度と正に相関した。また細胞外 MPO は主に MPO 陽性細胞近傍の系球体毛細血管壁に認められた。系球体毛細血管壁の MPO 沈着は Limited type と Diffuse type いずれも認められたが、系球体毛細血管壁の壊死病変部位では MPO 沈着は Diffuse type を呈した。同部位の DNA 染色やヒストン染色においては陽性所見が確認された。

MPO-ANCA 関連腎炎の系球体病変に MPO 陽性細胞浸潤、毛細血管壁への MPO 沈着の関与が示唆され、その主な供給源として浸潤好中球の NETs 放出が考えられた。

(2) ANCA 関連腎炎患者好中球が放出する NETs の特徴の解析

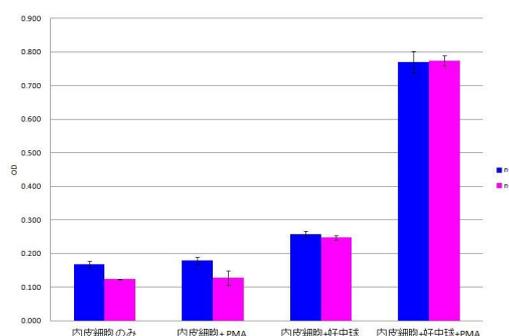
健常人の好中球を刺激した結果、fiber 様の NETs を放出するものと、fiber は放出せず単に細胞融解を起す、2 種類の NETosis が観察された。また、未治療の AAV 患者の好中球を刺激した際は、健常人とは異なるより細かい網状の NETs の形成を認め、NETs の形成量も健常人と比べ多かった。

また、ステロイドや免疫抑制剤による治療の前後で患者好中球から放出される NETs について比較したところ、NETs の産生量は治療による病態の改善と共に減少する傾向にあり、またその NETs の性状も治療前は fiber 様の NETs が多かったのに比べ、治療後は fiber 様の NETs の割合が減少していた。

(3) NETs 放出による腎系球体内皮細胞傷害

#### のメカニズムの解析

系球体内皮細胞に BrdU を取り込ませ、内皮細胞のみを培養した群、内皮細胞に PMA のみを添加培養した群、内皮細胞に好中球のみを添加培養した群、内皮細胞に PMA と好中球を同時に添加培養した群に分け、内皮細胞障害に伴って放出される BrdU を ELISA 法により測定したところ、内皮細胞に PMA や好中球を単独で添加培養しても内皮細胞障害はほとんど起きなかったが、PMA と好中球を同時に添加培養すると、内皮細胞障害が生じた。



好中球と内皮細胞との co-culture で内皮細胞に障害が起きる際は、fiber type の NETs が多く産生されており、fiber 状の NETs による内皮細胞障害が示唆された。また、その障害に関与する好中球や内皮細胞表面上の特定の分子の同定はできなかった。しかし両者の何らかの物理的接触が必要であることが示唆された。

以上のデータより AAV 患者では健常人とは明らかに異なる NETosis を認め、系球体内皮細胞の障害への NETs の関与が示されたことから、AAV の病態形成と病勢の増悪に NETs が重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Nakabayashi K, Fujioka Y, Nagasawa T, Kimura T, Kojima K, Arimura Y, Yamada A: Dual myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-and antiglomerular basement membrane antibody-positive cases associated with prior pulmonary fibrosis: a report of four cases. Clin Exp Nephrol 15:226-234, 2011. 査読あり

Ozaki S, Atsumi T, Hayashi T, Ishizu A, Kobayashi S, Kumagai S, Kurihara Y, Kurokawa MS, Makino H, Nagafuchi H, Nakabayashi K, Nishimoto N, Suka M, Tomino Y, Yamada H, Yamagata K, Yoshida M, Yumura W, Amano K, Arimura Y, Hatta K, Ito S, Kikuchi H, Muso E, Nakashima H, Ohsone Y,

Suzuki Y, Hashimoto H, Koyama A, Matsuo S, Kato H. Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study. *Mod Rheumatol.*22(3):394-404,2012. 査読あり

Yamagata K, Usui J, Sugiyama H, Nitta K, Wada T, Muso E, Arimura Y, Koyama A, Makino H, Matsuo S: Clinical findings on ANCA-associated renal vasculitis from the Japan RPGN registry obtained via a questionnaire survey. *Clin Exp Nephrol.* 2012. 査読あり

Arimura Y, Kawashima S, Yoshihara K, Komagata Y, Kaname S, Yamada A: The role of myeloperoxidase and myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCAs) in the pathogenesis of human MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol.* 2013. 査読あり

Kawashima S, Arimura Y, Sano K, Kudo A, Komagata Y, Kaname S, Kawakami H, Yamada A: Immunopathologic co-localization of MPO, IgG, and C3 in glomeruli in human MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Clinical Nephrology* 79-4:292-301, 2013. 査読あり

[学会発表](計6件)

Komagata Y, Nomura K, Kawashima S, Yoshihara K, Kaname S, Arimura Y, Yamada A: Difference in clinical feature between MPO- and PR3-ANCA-positive Wegener's granulomatosis. 15TH INTERNATIONAL VASCULITIS & ANCA WORKSHOP, NORTH CAROLINA, USA, MAY 15-18 2011.

Kawashima S, Komagata Y, Arimura Y, Yamada A: In situ-immune complex(MPO-anti MPO antibody) relates to glomerular capillary in human-MPO-ANCA associated glomerulonephritis. 15TH INTERNATIONAL VASCULITIS & ANCA WORKSHOP, NORTH CAROLINA, USA, MAY 15-18 2011.

川嶋聡子、福岡利仁、吉原堅、駒形嘉紀、要伸也、有村義宏、山田明：MPO-ANCA関連腎炎における糸球体毛細血管傷害の病理組織学的検討—MPO・免疫グロブリンの関与—。第54回日本腎臓学会学術集会、横浜、平成23年6月15日-17日。

駒形嘉紀、有村義宏、野村和史、齋藤督芸、川嶋聡子、池谷紀子、小路仁、福岡利仁、軽

部美穂、吉原堅、要伸也、中林公正、山田明：Wegener肉芽腫症におけるMPO-ANCA陽性患者とPR3-ANCA陽性患者との臨床像の相違。第55回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、平成23年7月17日-20日。

川嶋聡子、有村義宏、横井陽子、窪田沙也加、吉原堅、駒形嘉紀、要伸也、山田明：MPO陽性細胞浸潤、糸球体毛細血管へのMPO沈着は糸球体壊死と関連する。第55回日本腎臓学会学術総会、横浜、平成24年6月1-3日。

Murakami K, Saito M, Komagata Y, Yoshihara K, Kaname S, Arimura Y, Yamada A, Nakamoto Y, Ishida M, Hikgaki M, Takizawa H, Kawauchi R, Goya T, Fujiwara M, Yazawa T, Kamma H: A case of lung biopsy-proven MPO-ANCA positive granulomatosis with polyangiitis. 16th International Vasculitis & ANCA Workshop, France, April. 14-17, 2013.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

駒形 嘉紀 (KOMAGATA, Yoshinori)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：60281953

### (2) 研究分担者

有村 義宏 (ARIMURA, Yoshihiro)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：40222765