

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659472

研究課題名(和文) 抗好中球細胞質抗体関連血管炎のNETs形成を標的とする新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development a novel therapy targeting NETs formation for anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis

研究代表者

針谷 正祥(Harigai, Masayoshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20238207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎の病態形成への好中球のneutrophil extracellular traps (NETs)形成の関与、および全身性血管炎モデルの作成を検討した。MPO-ANCA陽性IgGは補体存在下でNETs形成を促進する可能性が示された。第2に、高力価のウサギ抗マウスMPO抗体とCandida albicans water-soluble fractionをC57BL6マウスに投与したが、明らかな血管炎の発症は認められなかった。第3にANCA関連血管炎患者末梢血中のサイトカイン、ケモカインを網羅的に測定し、その存在を確認した。

研究成果の概要(英文)：Objective: We investigated involvement of neutrophil extracellular traps (NETs) formation in pathogenesis of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis and tried to develop a murine model of systemic vasculitis. Methods: We separated neutrophils from peripheral blood using a magnet beads-based negative selection method. Immunoglobulin G (IgG) fraction of Myeloperoxidase (MPO)-ANCA positive serum was prepared using Protein A column. A murine model of systemic vasculitis was explored using Candida albicans water-soluble fraction (CAWS) and house-made rabbit anti-mouse MPO polyclonal antibody. Results. IgG fraction of MPO-ANCA positive serum induced NETs formation in the presence of recombinant C5a. CAWS and house-made rabbit anti-mouse MPO polyclonal antibody could not induce systemic vasculitis in C57BL6 mice. We measured panel of cytokines and chemokines in sera from patients with ANCA-associated vasculitis. All cytokines and chemokines were measurable in them.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学 抗好中球細胞質抗体関連血管炎

## 1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎はわが国で増加の著しい血管炎の一つであり、患者血清中にはミエロペルオキシダーゼ(MPO)特異的 ANCA(MPO-ANCA)またはプロテイナーゼ 3(PR3)特異的 ANCA が高率に検出され、病態形成に寄与している。ANCA 関連血管炎は全身性炎症性疾患であり、腎、肺、神経系に高率に臓器病変を形成する。近年、Kessenbrock らは好中球の neutrophil extracellular traps (NETs)形成が患者由来 ANCA 陽性 IgG で誘導され、NETs 内には toll-like receptor 9 (TLR9) ligand である DNA および LL37 が存在し、患者腎組織においても NETs 形成と inteferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 誘導遺伝子である MxA の発現が認められることを報告した(Nat Med 2009;15:623)。

(註: DNA および LL37 は TLR9 を介して IFN- $\alpha$ 産生を誘導する因子として知られている。)また、補体 C5 の活性化成分である C5a も IFN- $\alpha$ でプライミングされた健常人好中球の NETs 形成を刺激することも報告されている。好中球の NETs 形成は生理的には細菌などに対する感染防御機構として発見されたが、これらの報告によって、ANCA 関連血管炎の病態形成に関与する可能性が示された。しかし、ANCA 関連血管炎における NETs 形成の詳細な分子機構と治療応用の可能性は明らかではない。

研究代表者は、難治性血管炎調査研究班の研究分担者として、ANCA 関連血管炎のコホート研究の立ち上げと運用を行ってきた。詳細な解析は現在進行中であるが、高用量ステロイドとシクロホスファミドを中心とする免疫抑制療法の導入により ANCA 関連血管炎の予後は改善されたものの、高い再燃率と感染症をはじめとする治療の副作用が未解

決の問題として残っている。そこで、従来の免疫抑制治療とは異なる視点での治療法の開発が急務と考え、NETs 形成・netosis 抑制による ANCA 関連血管炎の治療法 (NETs targeted therapy) 開発を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ANCA 関連血管炎の病態形成への好中球の NETs 形成と netosis の関与、および治療応用の可能性を、患者検体を用いた *ex vivo* 実験と血管炎マウスモデルを用いた *in vivo* 実験により検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)好中球の NETs 形成能の検討

#### ①ヒト末梢血好中球の精製

ヒト末梢血 10ml に HetaSep (Veritas 社)2ml を添加し、転倒混和後 10 分間静置後、上清を新たな試験管に移した。EasySep Neg Human Neutrophil Kit(Veritas 社)を用い、キットの説明書に従って、negative selection によって、末梢血好中球を精製した。精製した好中球の純度を flow cytometer により測定し、90%以上が CD16 陽性であることを確認した。

#### ②免疫組織染色による NETs の検出

細胞培養用 24 穴プレートに poly-L-lysine コート カバーガラスを入れ、10% FBS / HBSS(+) に懸濁した好中球を  $5 \times 10^4$  / well ( $2 \times 10^5$  / ml を  $250 \mu$ l) で培養した。各種刺激を加えたのち、カバーガラスを取り出し、Phosphate Buffered Saline (PBS)で細胞を洗浄後、4% パラホルムアルデヒド / PBS で固定した。0.2% TritonX-100 / PBS で透過処理後、3% ウシ血清アルブミン / PBS で非特異的反応をブロックした。次にウサギ抗 Neutrophil Elastase 抗体を室温にて 1 時間反応させ、PBS で洗浄後、FITC 標識ヤギ抗

ウサギ IgG を室温にて 1 時間反応させた。  
PBS で洗浄後、Hoechst 33258 にて核染色  
を行い、封入した。

③ヒト抗 MPO-ANCA 抗体を含む IgG 精製  
抗 MPO 抗体価高値の患者末梢血から血清を  
分離し、Affigel ProteinA MAPS II を用いて  
IgG を精製後、蛋白濃度を測定した。

(2) 全身性血管炎モデルマウスの作成

①抗マウス MPO 抗体の作成

TiterMax Gold を用いてリコンビナントマ  
ウス MPO (R&D) にて家兔を 3 回免疫した。血  
清中の抗マウス MPO 抗体を下記②の方法で測  
定し、高い抗体価が得られたことを確認後、  
末梢血を採取した。末梢血から血清を分離し、  
Affigel ProteinA MAPS II を用いて IgG を精  
製後、蛋白濃度を測定した。

②抗マウス MPO 抗体測定

リコンビナントマウス MPO を PBS で 2  $\mu$   
g/ml に溶解し、96 穴 ELISA 用プレートに固  
相化した。ブロックエースでブロッキングし、  
PBS-Tween にて洗浄した。PBS で希釈した  
兔血清 100  $\mu$  l を加え 2 時間反応後、  
PBS-Tween にて洗浄し、ペルオキシダーゼ  
標識抗ウサギ IgG 抗体を 2 時間反応させた。  
PBS-Tween にて洗浄後、TMB (3, 3', 5,  
5'-tetramethylbenzidine) で発色させ、  
450nm にて吸光度を測定した。

③マウスにおける血管炎の誘導

第 1 のモデルとして、Candida albicans  
water-soluble fraction (CAWS) (東京薬科大  
学薬学部免疫学教室三浦典子先生より供与)  
4mg/匹を C57BL6 マウスに day 0 および day 5  
に腹腔内投与し、同日に抗マウス MPO 抗体ま  
たはウサギ IgG (Sigma Aldrich) 2mg/匹を静  
脈内投与した。CAWS を投与せず、抗マウス  
MPO 抗体 2mg/匹のみを投与したマウスもコン  
トロールとして用意した。day 10 に肺および

腎臓を摘出し組織切片を作成した。

第 2 の血管炎モデルとして、  
lipopolysaccharide (LPS) 10  $\mu$  g を腹腔内投  
与し、2 時間後に抗マウス MPO 抗体またはウ  
サギ IgG 100  $\mu$  g/体重 1g を投与し、day 6 に  
肺および腎臓を摘出し組織切片を作成した。  
マウスから採血し血清を分離後、尿素窒素お  
よびクレアチニンを測定した。

(3) ANCA 関連血管炎患者における血清サイト  
カイン、ケモカインパネルの測定

Observational cohort study of remission  
induction therapy in Japanese patients  
with ANCA-associated vasculitis and  
rapidly progressive glomerulonephritis  
(RemIT-JAV-RPGN) に登録された ANCA 関連  
血管炎患者の血清中のサイトカインを、マル  
チプレックスサスペンションアレイを用い  
て測定した。今回の検討では、IL-1 $\beta$ 、IL-2、  
IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、  
IL-13、IL-15、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、Eotaxin、  
FGF-basic、G-CSF、GM-CSF、MIP-1 $\alpha$ 、  
PDGF-bb、RANTES、VEGF を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 好中球の NETs 形成能の検討

①ヒト末梢血好中球の精製

健常人末梢血好中球を HetaSep および  
EasySep Neg Human Neutrophil Kit にて  
精製し、FITC 標識抗ヒト CD16 抗体で染色し  
た。図 1 のように、91%の細胞が CD16 陽性で  
あることが flow cytometer にて確認された。

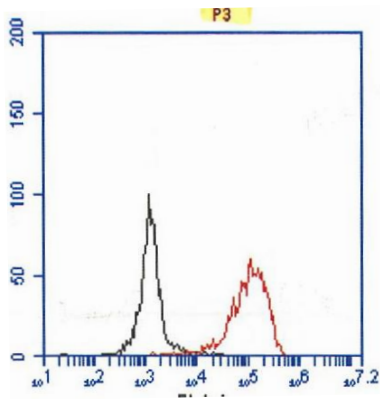


図1 精製した好中球のCD16発現(黒:isotype control, 赤:抗CD16抗体)

②免疫組織染色によるNETsの検出

健康人末梢血好中球をカバーガラス上でphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)にて3時間刺激し、抗Neutrophil Elastase抗体にてNETsを染色した。図2に示すようにPMA 100nM、3時間刺激によりNETs形成が確認された。

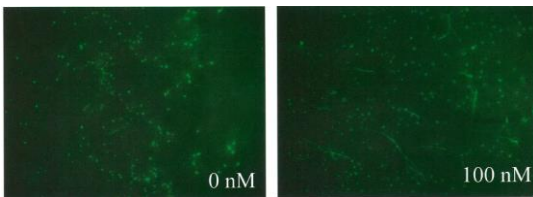


図2 PMAによる好中球のNETs誘導(3時間) PMAにて24時間刺激した場合には、図3に示すように無刺激でも軽度の細胞の膨隆が認められたが、PMA 20nM, 100nMのいずれにおいても明らかなNETs形成が確認できた。

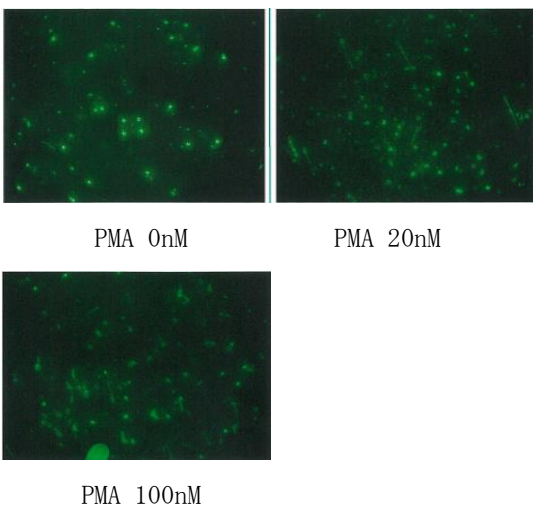


図3 PMAによる好中球のNETs誘導(24時間)

次にC5a 100ng/mlで15分間プライミングした後に、抗MPO-ANCA抗体高力価患者由来IgGまたは健康人由来IgGを250μg/mlで添加し、3時間刺激した。図4に示すように、C5a単独刺激のみで軽度の細胞の膨張を認めた。抗MPO抗体高力価患者由来IgGを添加したところ。さらに細胞の膨化が進み、NETs形成が促進された。一方、図4に示した健康人由来IgGを加えた場合には、C5a単独と明らかな差は見られなかったが、一部の健康人由来IgGでNETs形成が軽度促進される場合が見られた。

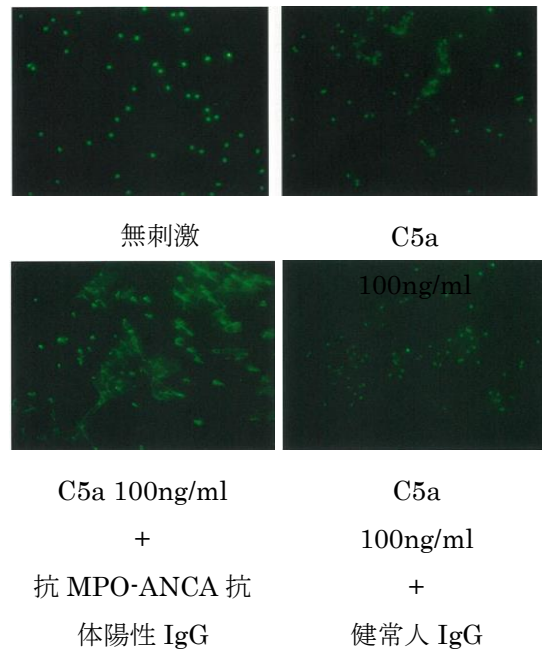


図4 補体成分C5aおよび抗MPO-ANCA抗体陽性IgGによるNETsの誘導

以上の検討から、抗MPO-ANCA抗体陽性IgGにはNETs形成を促進する働きがあることが示された。複数の患者血清を用いた検討を行ったところ、NETs形成を促進する抗MPO-ANCA抗体陽性IgGと促進作用が明らかではない抗MPO-ANCA抗体陽性IgGが見られた。その違いおよび、一部健康人での軽度のNETs促進能に関しては今後の検討課題と考えられた。

## (2) 全身性血管炎モデルマウスの作成

### ① 抗マウス MPO 抗体の作成

リコンビナントマウス MPO で 3 回免疫したウサギから末梢血を採取し、Affigel ProteinA MAPS II を用いて 60mg の IgG が得られた。

### ② マウスにおける血管炎の誘導

上記①で作成したウサギ抗マウス MPO 抗体を用いて、CAWS による全身性血管炎モデルの作成を検討した。

1 回目の検討では、無処置マウス (N 群) (n=3)、CAWS+ウサギ IgG 投与マウス (C 群) (n=2)、CAWS+ウサギ抗マウス MPO 抗体 (CM 群) (n=3) を作成した。CAWS は 4mg/匹を Day 0, Day 5 に投与した。

表 1 に示すように、尿蛋白、尿潜血反応は N 群と比較して C 群、CM 群の Day 10 において変化はなかった。末梢血で測定した BUN は N 群と比較して、C 群、CM 群の Day 10 において上昇していたが、Cr は不変であった。

Day 10 にこれらのマウスから肺および腎臓を摘出し、固定後、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い組織学的に検討した。肺、腎のいずれにおいても有意な炎症所見は認められなかった。

表 1 CAWS を用いた全身性血管炎モデル作成 (第 1 回)

	尿蛋白 (mg/dl)	尿潜血	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)
N 群	100	全例 (-)	22.0	0.1
C 群	65	全例 (-)	33.5	0.1
CM 群	100	全例 (-)	33.4	0.1

2 回目の検討では、ウサギ抗マウス MPO 抗体単独投与群 (M 群) (n=3)、CAWS+ウサギ IgG 投与マウス (C 群) (n=3)、CAWS+ウサギ抗マウス MPO 抗体 (CM 群) (n=3) を作成した。

CAWS は 8mg/匹を Day 0, Day 5 に投与した。

表 2 に示すように、尿蛋白、尿潜血反応、BUN、Cr のいずれの指標においても、有意な変化を認めなかった。1 回目と同様に、Day 10 にこれらのマウスから肺および腎臓を摘出し、固定後、HE 染色を行い組織学的に検討したが、有意な炎症所見は認められなかった。

表 2 CAWS を用いた全身性血管炎モデル作成 (第 2 回)

	尿蛋白	尿潜血	BUN	Cr
M 群	100	全例 (-)	32.9	0.17
C 群	65	3 例 (-) 1 例 (+)	26.1	0.17
CM 群	100	全例 (-)	33.4	0.12

Day 10 における測定値を示す。表 1 に示したように、無処置マウスは尿蛋白が 100mg/dl 程度検出されることを確認している。

そこで CAWS とは異なる刺激で全身性血管炎モデルマウスを作成するために、LPS+ウサギ IgG (L 群) (n=3) と LPS+ウサギ抗マウス MPO 抗体 (LM 群) (n=3) を作成した。尿蛋白、尿潜血反応、BUN、Cr を測定したが、いずれの指標においても有意な変化を認めなかった。Day 6 にこれらのマウスから肺および腎臓を摘出し、固定後、HE 染色を行い組織学的に検討したが、有意な炎症所見は認められなかった。

以上の検討から、いずれの全身性血管炎モデルにおいても、我々が作成したウサギ抗マウス MPO 抗体は血管炎惹起作用を持たないと考えられた。既報では MPO ノックアウトマウスを用いて作成したマウス抗マウス MPO 抗体が使用されており、免疫した動物種の差が今回血管炎を誘導できなかった原因の一つとして考えられた。

CAWS と抗 MPO 抗体を用いた全身性血管炎モ

デル自体の作成が出来なかったため、その後には予定していた新規治療標的の検討は実施出来なかった。

(3) ANCA 関連血管炎患者における血清サイトカイン、ケモカインパネルの測定

好中球の netosis には炎症性サイトカイン・ケモカインが関与する。これまでに、ANCA 関連血管炎の血清中の限られた種類のサイトカイン・ケモカインを測定した報告はあるが、網羅的な測定は報告されていない。そこで、RemIT-JAV-RPGN に登録された顕微鏡的多発血管炎患者 30 名の治療開始前、6 か月後の血清を用いて、方法に示したサイトカイン、ケモカインを測定した。これらのすべてのサイトカイン、ケモカインが患者血清中に測定可能な濃度で存在していた。

## 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 2 件)

1. Ken-ei Sada, Masahiro Yamamura, Masayoshi Harigai, et al. Classification and characteristics of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in a nationwide, prospective, inception cohort study. *Arthritis Research & Therapy* (査読有) 16: 2014:R101
2. Kawasaki A, Inoue N, Ajimi C, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Sumida T, Tohma S, Miyasaka N, Matsuo S, Ozaki S, Hashimoto H, Makino H, Harigai M, Tsuchiya N. Association of IRF5 polymorphism with MPO-ANCA positive vasculitis in a Japanese population. *Genes Immun.* (査読有) 14(8): 2013:527-9

[学会発表] (計 1 件)

1. High Clinical Remission Rate With

Relatively High Incidence Of Serious Infection In Newly-Onset ANCA - Associated Vasculitides In Japan - A Report From The Nationwide Prospective Cohort Study. Harigai Masayoshi, et al. ACR/ARHP Annual Meeting, San Diego, October 25-30, 2013.

[図書] (計 1 件)

1. 針谷正祥. 羊土社. 免疫・アレルギー疾患イラストレイテッド 基礎編 免疫のしくみ サイトカイン、2013、77-86

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等: なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

針谷 正祥 (Masayoshi Harigai)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄付講座教授  
研究者番号: 20238207

### (2) 研究分担者

南木 敏宏 (Toshihiro Nanki)  
帝京大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00282749  
  
宮坂 信之 (Nobuyuki Miyasaka)  
東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号: 30157622

### (3) 連携研究者

該当なし ( )  
研究者番号: