

令和元年6月21日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09913

研究課題名(和文) 膠原病疾患における好中球NETsの役割の検討と治療への応用

研究課題名(英文) Examination of role of neutrophil NETs in collagen disease and application to treatment

研究代表者

井田 弘明 (Ida, Hiroaki)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60363496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：活性化好中球から排出されるクロマチン網であるNETsには、多くの細胞内構成蛋白が含まれ、細菌の捕捉以外の殺菌作用のみならず、血栓形成、癌転移、そして膠原病疾患の発症や自己抗体産生にも大きな役割を果たしている。殺菌作用以外は総じて、NETsは各疾患に悪影響を及ぼしている。本研究では、RA患者1例、成人発症ステイル病患者1例、家族性地中海熱患者5例についてiPS細胞を樹立した。健康者iPS細胞由来好中球にPMA添加、NETsを検出した。コルヒチン添加でNETs産生は阻害できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠原病疾患、自己炎症性疾患において、NETsの構成成分の内容、NETsの量、刺激に対する反応の違いが各疾患で異なり、病変局所のみならず、全身症状にも影響を与え、病態形成に重要な役割を果たしている可能性が高い。好中球は寿命が短く解析が難しい細胞であるが、iPS細胞より誘導した好中球は比較的寿命が長いので、解析が行いやすい。コルヒチンでNETs産生が阻害できないことから、今後、NETs産生阻害薬の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：NETs, which are chromatin nets excreted from activated neutrophils, contain many intracellular component proteins, and not only bactericidal activity other than bacterial capture, but also thrombus formation, cancer metastasis, and the onset of collagen disease. It also plays a major role in autoantibody production. As a whole, NETs have an adverse effect on each disease except for bactericidal activity. In this study, iPS cells were established in 1 RA patient, 1 adult-onset Still's disease patient, and 5 familial Mediterranean fever patients. PMA addition and NETs were detected in normal human iPS cell-derived neutrophils. Addition of colchicine failed to inhibit NETs production.

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：NETs 好中球 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

膠原病疾患の多くは自己免疫疾患であり、T細胞やB細胞の獲得免疫が主体であると考えられていた。しかし、Toll like receptor の発見やその後の研究の進歩によって、自然免疫も獲得免疫に変わらないほど重要な役割をしていることが分かってきた。末梢血中最多の好中球において、その細胞数と膠原病疾患の病勢が関連していることは、研究からも申請者の臨床経験からも明らかであり、膠原病疾患における好中球の役割を検討することは重要であると思われる。2004年にBrinkmannらは、活性化好中球は他の細胞と異なり、核内のクロマチンを細胞外へ放出することを発見した(Science 303:1532-5, 2004)。このクロマチン網は NETs (neutrophil extracellular traps) と呼ばれ、細菌の捕捉以外に NETs そのものに殺菌作用があることも報告された。その後の研究で NETs は、血栓形成(PNAS 107: 15880-5, 2010)や癌転移(J Clin Invest 123:3446-58, 2013)に重要な役割をしていること、また、膠原病疾患の全身性エリテマトーデス(SLE)の発症に重要な働きをしていること(J Clin Invest 123:2981-93, 2013)、関節リウマチ(RA)では、NETs に含まれるヒストン 4 をシトルリン化した抗原に対する抗体が、RA 患者の 60%以上に陽性であったこと(Ann Rheum Dis 73:1414-22, 2014)など、様々な役割が判明した。

#### 2. 研究の目的

最近、家族性地中海熱(FMF)患者の NETs が、FMF の病態形成に重要な役割を果たしている報告があった(Ann Rheum Dis 75:269-77, 2016)。FMF 患者末梢血中の好中球は、有熱期のみ NETs を排出、NETs にはヒストンやエラスターゼに加え、IL-1b を含んでいた。これは、FMF 患者における抗 IL-1 製剤の有効性を説明するひとつの現象と思われる。同様に膠原病疾患においても、好中球から排出される NETs の構成成分の内容、NETs の量、刺激に対する反応の違いが各疾患で異なり、病変局所のみならず、全身症状にも影響を与え、病態形成に重要な役割を果たしているのではないかと、という発想に至った。これらを証明することが、本研究の目的である。

#### 3. 研究の方法

患者から毎回好中球を分離することは難しく、実験のための好中球数の確保も困難である。京都大学 iPS 研究所と共同で、疾患特異的 iPS 細胞を作成する。対象疾患は、家族性地中海熱、関節リウマチ、成人発症 Still 病である。疾患特異的 iPS 細胞から純度の高い好中球へ分化させる条件決めを行う。また、患者末梢血から好中球を分離する方法も確立する。iPS 細胞から好中球へ分化可能となった場合、PMA 刺激が一般的であるが、NETs 産生の条件決めを行う。コルヒチンや種々のコンパウンドを使用して、NETs 産生阻害薬を同定する。

#### 4. 研究成果

- (1) RA 患者 1 例、成人発症スティル病患者 1 例、家族性地中海熱患者 5 例について iPS 細胞を樹立した。
- (2) 好中球への分化の条件決めが確立され、健常者 iPS 細胞から純度の高い好中球が得られるようになった。
- (3) RA 患者からネガティブセレクションで好中球を分離、98%以上の純度で採血から 30 分以内に分離可能となった。
- (4) 健常者 iPS 細胞由来好中球を 24 穴プレートで培養、底に円形のガラススライドを挿入、PMA 刺激後、DNA(ヘキスト)、ヒストン(標識モノクローナル抗体)、MPO(標識モノクローナル抗体)、エラスターゼ(標識モノクローナル抗体)、で NETs を検出した。
- (5) コルヒチン添加で NETs 産生は阻害できなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Koga T, Kaieda S, Okamoto M, Masuda K, Fujimoto K, Sakamoto S, Nakamura M, Tominaga M, Kawayama T, Fujimoto K, Hoshino T, Ida H. Successful treatment of rapidly progressive unclassifiable idiopathic interstitial pneumonia with anti-melanoma

differentiation-associated gene-5 antibody by intensive immunosuppressive therapy. Intern Med. 2018 Apr 1;57(7):1039-1043. doi: 10.2169/internalmedicine.9553-17.

Sugi S, Kaieda S, Irie KI, Ida H. Limbic Encephalitis in Association with Systemic Lupus Erythematosus. Intern Med. 2018 Oct 15;57(20):3059. doi: 10.2169/internalmedicine.1009-18.

Yaita K, Sugi S, Hayashi M, Koga T, Ebata T, Sakai Y, Kaieda S, Ida H, Watanabe H. The co-existence of Lemierre's syndrome and Bezold's abscesses due to Streptococcus constellatus: A case report. Medicine (Baltimore). 2018 Jun;97(26):e11228. doi: 10.1097/MD.00000000000011228.

Yoshida N, Okamoto M, Kaieda S, Fujimoto K, Ebata T, Tajiri M, Nakamura M, Tominaga M, Wakasugi D, Kawayama T, Kuwana M, Mimori T, Ida H, Hoshino T. Association of anti-aminoacyl-transfer RNA synthetase antibody and anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody with the therapeutic response of polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung disease. Respir Investig. 2017 Jan;55(1):24-32. doi: 10.1016/j.resinv.2016.08.007.

Kaieda S, Yoshida N, Minezaki M, Ushijima S, Wakasugi D, Miura S, Uchiyama Y, Ida H, Hoshino T. The successful treatment of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-positive hypertrophic pachymeningitis in patients with the limited form of granulomatosis with polyangiitis using methotrexate: two case reports. Intern Med. 2017;56(8):959-65. doi: 10.2169/internalmedicine.56.7742.

Okamoto M, Fujimoto K, Sadohara J, Furuya K, Kaieda S, Miyamura T, Suematsu E, Kitasato Y, Kawayama T, Ida H, Ichiki M, Hoshino T. A retrospective cohort study of outcome in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. Respir Investig. 2016 Nov;54(6):445-453. doi: 10.1016/j.resinv.2016.05.004.

Ueda N, Ida H, Washio M, Miyahara H, Tokunaga S, Tanaka F, Takahashi H, Kusuhara K, Ohmura K, Nakayama M, Ohara O, Nishikomori R, Minota S, Takei S, Fujii T, Ishigatsubo Y, Tsukamoto H, Tahira T, Horiuchi T. Clinical and genetic features of patients with TNFRSF1A variants in Japan: findings of a nationwide survey. Arthritis Rheumatol. 2016 Nov;68(11):2760-2771. doi: 10.1002/art.39793.

〔学会発表〕(計 4 件)

井田弘明 ランチョンセミナー30 リウマチ医が知っておきたい自己炎症症候群 第62回 日本リウマチ学会総会. 2018.4.26-28. 東京都

井田弘明 自己炎症症候群の過去・現在・未来 第1回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術総会 2018.1.20-21 東京

井田弘明 教育講演6 生体で最も危険なサイトカイン IL-1の自己炎症症候群における役割  
第38回日本炎症・再生医学会 2017.7.18-19 大阪府

井田弘明 教育研修講演25 リウマチ医のための不明熱ABC 第61回日本リウマチ学会総  
会. 2017.4.20-22. 福岡市

〔図書〕(計 2 件)

井田弘明 Editorial 不明熱の鑑別疾患 日本内科学会誌 106 巻 11 号 p2311-2313  
2017 年

井田弘明 自己炎症症候群 膠原病・リウマチ・アレルギー研修ノート p452-4  
2016 年 診断と治療社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：海江田 信二郎  
ローマ字氏名：(KAIEDA shinjiro)  
所属研究機関名：久留米大学医学部  
部局名：呼吸器・神経・膠原病内科  
職名：講師  
研究者番号(8桁)：20330798

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。