

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07602

研究課題名(和文) ANCA関連血管炎の病態形成におけるTLR9の役割の解析

研究課題名(英文) Role of TLR9 in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis

研究代表者

古田 俊介 (Furuta, Shunsuke)

千葉大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：10422221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ANCA関連血管炎(AAV)患者における血清サイトカイン値の測定では、IL-1Ra、IL-5、IL-15の上昇が認められたが、IL-6の上昇は認めなかった。当初の計画ではAAV活動期にはTLR9の刺激を介しB細胞が活性化されIL-6の産生が誘導されると予測していたが、患者検体の結果は予想と異なっていた。B細胞内NF-κBシグナルを活性化させるものとしてBAFFとAPRILに注目し、初発AAV患者の血清BAFF、APRILを健常者や大血管炎患者と比較したところ、BAFF、APRIL共にAAVで有意に上昇していた。さらにAAV活動性の指標であるCRPの値と血清中BAFF濃度が有意に相関していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果より、1)AAVの発症にBAFFが重要な役割を果たしていること、2)Rituximabの投与によりAAVは沈静化するがBAFFの発現自体は減少していないことが明らかとなった。AAVの治療において、寛解時にはB細胞除去が重要であるが、その後の再燃に関してはBAFFの発現も考慮に入れるべきであると考えられた。BAFFに対する抗体製剤は既に市販されている(Belimumab、AAVに対しては未承認)。BelimumabはAAVに対する有効性を示せなかったという先行研究も存在するが、今回の結果を踏まえると病期によっては有効な治療選択肢になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：First, we found serum IL-1Ra, IL-5 and IL-15 levels were increased in ANCA-associated vasculitis (AAV) patients, however, IL-6 level was not increased. Although we originally supposed that TLR9 stimulated B cells and induced to release IL-6 in AAV patients, the results were different. Thus, we focused BAFF and APRIL as other candidates activating NF-κB signaling in B cells in AAV patients. Next, we measured serum BAFF and APRIL levels of AAV patients. We found those were significantly higher in AAV patients than in healthy controls and large vessel vasculitis patients. In addition, we found serum BAFF levels in AAV patients were correlated with serum CRP levels, which were considered as an indicator of the disease activity of AAV.

研究分野：膠原病内科学

キーワード：ANCA関連血管炎 BAFF APRIL TLR9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ANCA 関連血管炎(AAV)は全身性の小型血管炎を特徴とする自己免疫疾患で、本邦では年間約1400人が発症すると推計されている。詳細な病態は未だ不明だが、好中球細胞質に含まれるミエロペルオキシダーゼ(MPO)やプロテイナーゼ3(PR3)に対する自己抗体(MPO-ANCA, PR3-ANCA)の産生と、好中球による生体防御システムである好中球細胞外トラップ(NETs)の異常が深く関与すると考えられている(Kidney Int. 2013;84:244)。AAVは、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、多発血管炎性肉芽腫症(GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)の3病型に分けられ、本邦ではMPAの頻度が高い。近年の診断技術と治療法の進歩により5年生存率は80%を超えるが、しばしば再発を繰り返し、治療抵抗性の難治性病態も少なからず存在するため、新規治療ターゲットの同定と特異性の高い治療戦略の確立が急務である

動物モデルにおいて自己抗体であるANCAに病原性が確認されていること(J Clin Invest. 2002;110:955)、B細胞の活性化や血清BAFFレベルとAAVの疾患活動性が相関すること(J Allergy Clin Immunol 1999;103:885、J Autoimmun 2005;25:298)からAAVの病態におけるB細胞の重要性が示唆され、その後、Rituximab(抗CD20抗体)を用いたB細胞除去療法がAAVに試みられようになり、臨床試験でその有効性が証明された(N Engl J Med. 2010;363:221)。RituximabによるB細胞の除去は、B細胞によるANCA産生を抑制することでAAVを沈静化させると考えられているが、ANCA陰性症例でもRituximabによるB細胞の除去がAAVを改善させることが示されており(Arthritis Rheum. 2012;64:3760)、AAVの病態形成におけるB細胞の役割がANCAの産生に留まらないことが示唆される。

一方、AAV患者のゲノム解析によりToll様受容体ファミリー分子TLR9の変異とAAV発症との関連が複数の施設より報告された(Ann Rheum Dis. 2014;73:890、Ann Rheum Dis. 2016;75:1687)。TLR9は、細胞内エンドソームに局在し、細菌やウイルスに由来する非メチル化CpGモチーフを含むDNAを認識して自然免疫系を活性化する。TLR9刺激は、interferon-regulatory factor(IRF)ファミリー分子とnuclear factor- κ B(NF- κ B)の主に2つの経路を活性化し、標的遺伝子の転写を活性化させる。TLR9刺激によるIRFファミリーの発現はI型インターフェロンの発現誘導に重要な役割を果たし、一方、TLR9刺激によるNF- κ Bの活性化は、IL-6やTNF- α 等の炎症性サイトカインの発現を誘導する。MPA患者ではNETsの産生過剰や処理遅延が認められることから、TLR9によるNETs内非メチル化CpG DNAの認識、それに続くIFRファミリーやNF- κ Bの活性化が病態形成に関与している可能性が推測されるが、その詳細は依然不明である。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では、マウスAAVモデルを用いてB細胞に発現するTLR9のAAV発症における役割、及びその分子メカニズムを明らかにし、TLR9、或はNF- κ Bを始めとするTLR9下流分子を標的としたAAVの新規治療法の開発に向けた基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

1)AAV患者血清中の各種サイトカイン濃度の定量、2)初発AAV患者血清中のBAFF、APRIL濃度の定量、3)BAFF濃度とAAV臨床指標との関連、4)Rituximab投与前後におけるBAFF、APRIL濃度の定量、5)Astrocyte特異的BAFF発現マウスの作成、6)Astrocyte特異的BAFF発現マウスの組織学的解析を行なった。

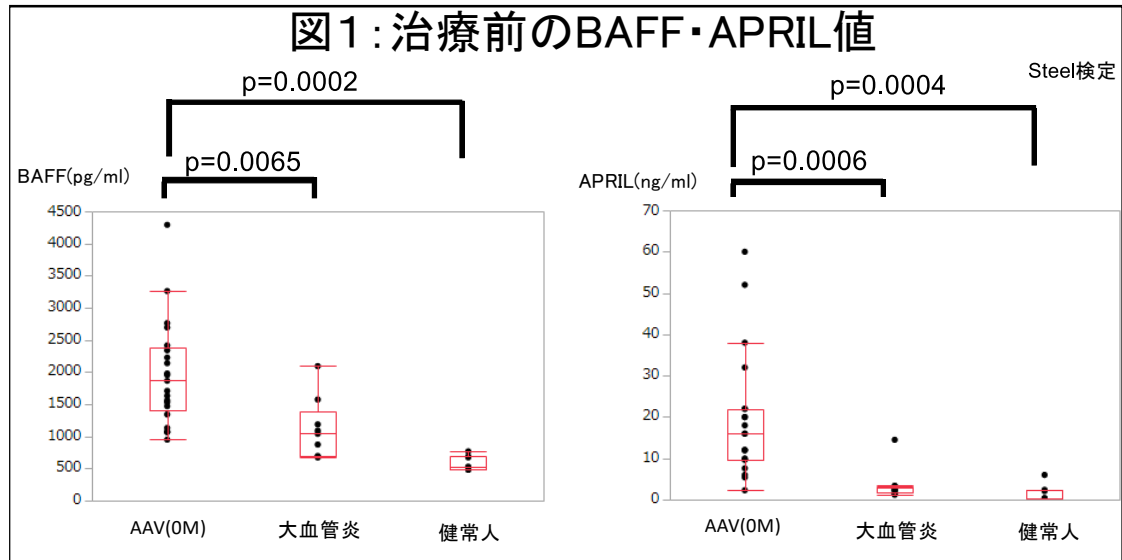
4. 研究成果

1) AAV 患者血清中の各種サイトカイン濃度の定量

AAV 患者 32 人の血清中各種サイトカイン濃度をマルチプレックスアッセイにより測定したところ、IL-1Ra、IL-5、IL-15、IP-10 などの上昇が認められたが、IL-6 の上昇は認められなかった。

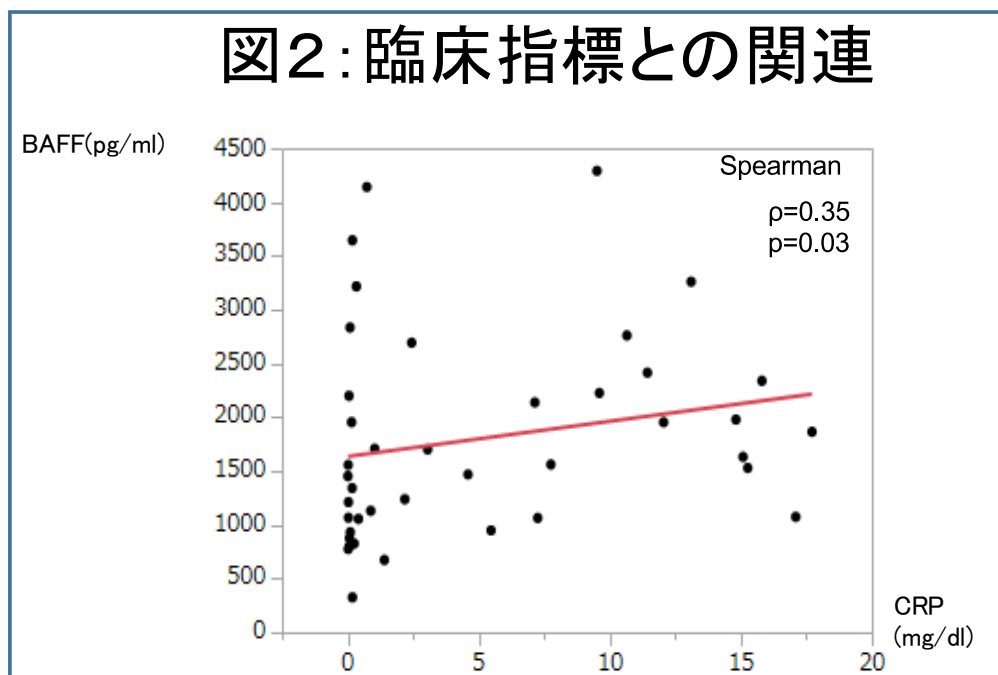
2) 初発 AAV 患者血清中の BAFF、APRIL 濃度の定量

当初の計画では、AAV の活動期には TLR9 の刺激を介して B 細胞が活性化され IL-6 の産生が誘導されることを予測していたが、患者血清を用いた検討の結果は予想と異なっていたため、B 細胞内 NF-kB シグナルを活性化させるものとして、B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF)、A proliferation-inducing ligand (APRIL) を想定した。21 人の初発 AAV 患者血清中の BAFF と APRIL を測定し、健常者や大血管炎患者のものと比較したところ、BAFF、APRIL 共に AAV 患者で優位に上昇していた(図 1)。



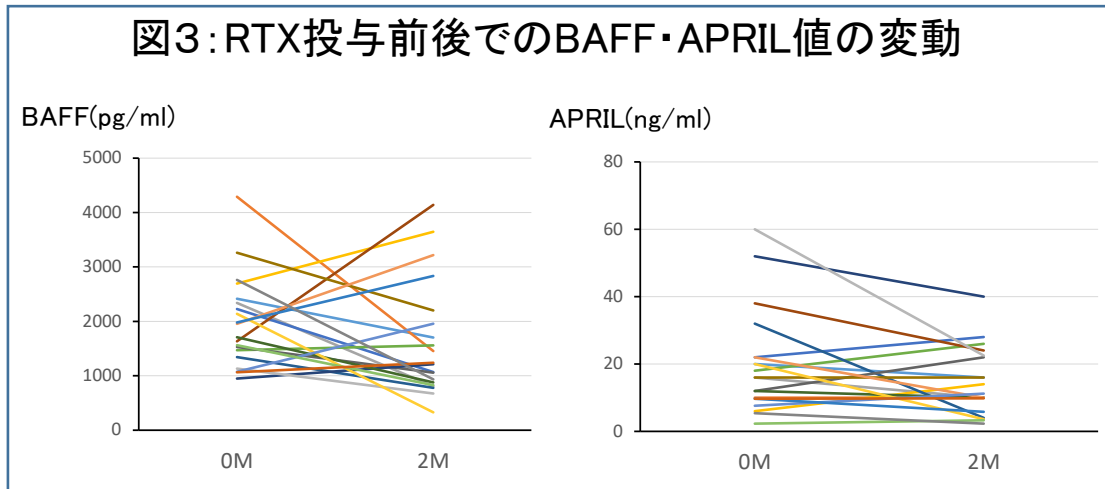
3) BAFF 濃度と AAV 臨床指標との関連

さらに AAV 活動性の臨床指標である CRP と血清中 BAFF 濃度との相関を検討したところ、BAFF の値と CRP 値は優位に相関していることが認められた(図 2)。



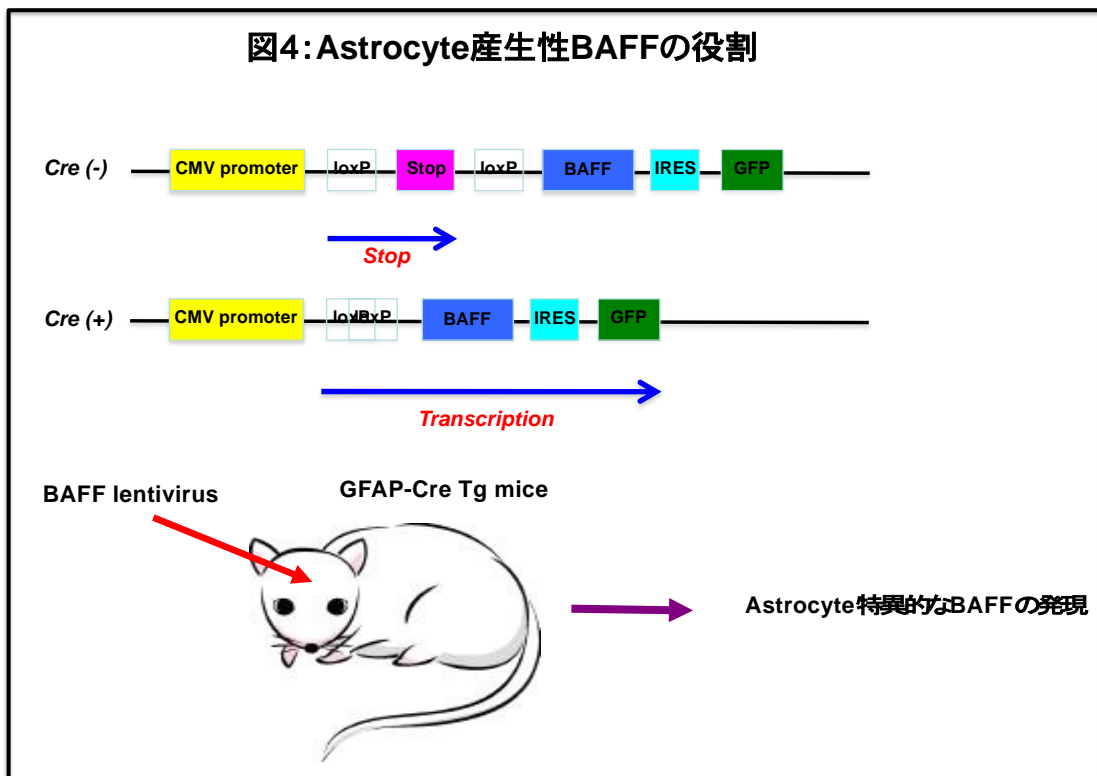
4) Rituximab 投与前後における BAFF、APRIL 濃度の定量

次に BAFF、APRIL 濃度が Rituximab による治療の前後でどのように推移するか検討したところ、BAFF や APRIL の濃度は治療前後で変化がないことが明らかとなった(図 3)。



5) Astrocyte 特異的 BAFF 発現マウスの作成

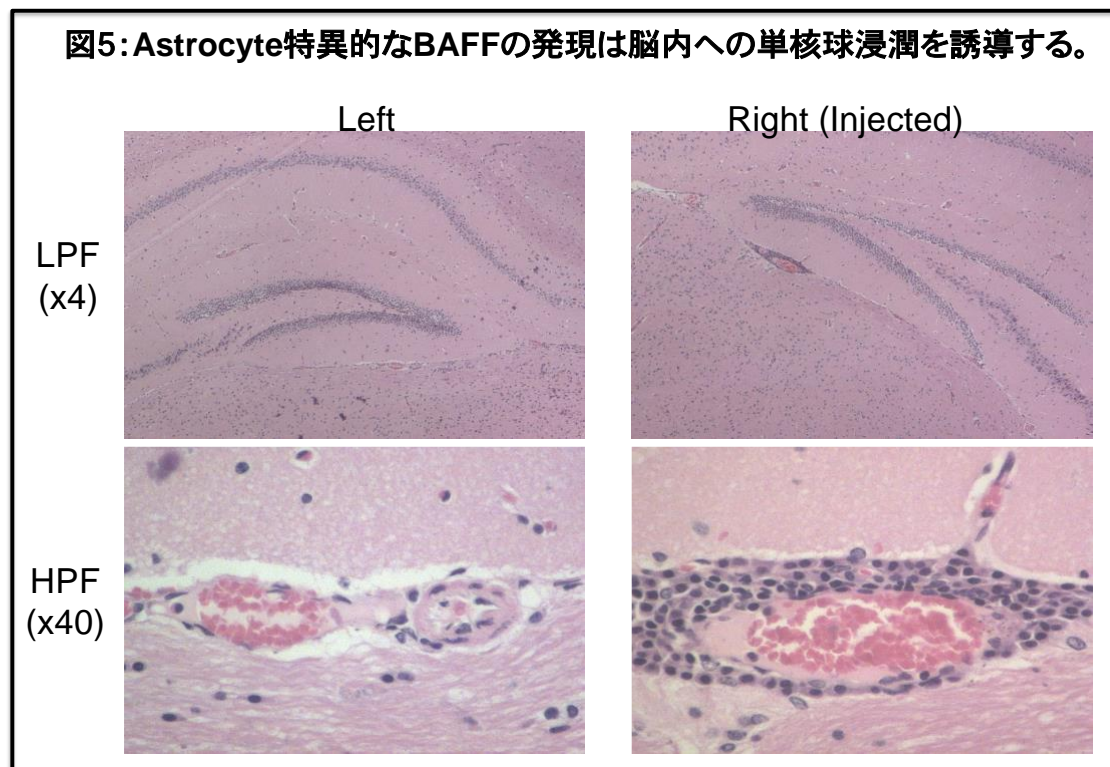
上記 1)～4)の結果は、BAFFは AAV 発症において重要な役割を果たしていることを示唆している。そこで次に組織特異的な BAFF の発現が炎症の形成にどのような影響を及ぼすか明らかにするために組織特異的 BAFF 発現マウスを作成した。脳 astrocyte 特異的に Cre recombinase を発現するマウスにレンチウイルスを用いて図 4 に示す BAFF を含む遺伝子を導入した。本マウスでは脳 astrocyte のみで BAFF を発現する(図 4)。



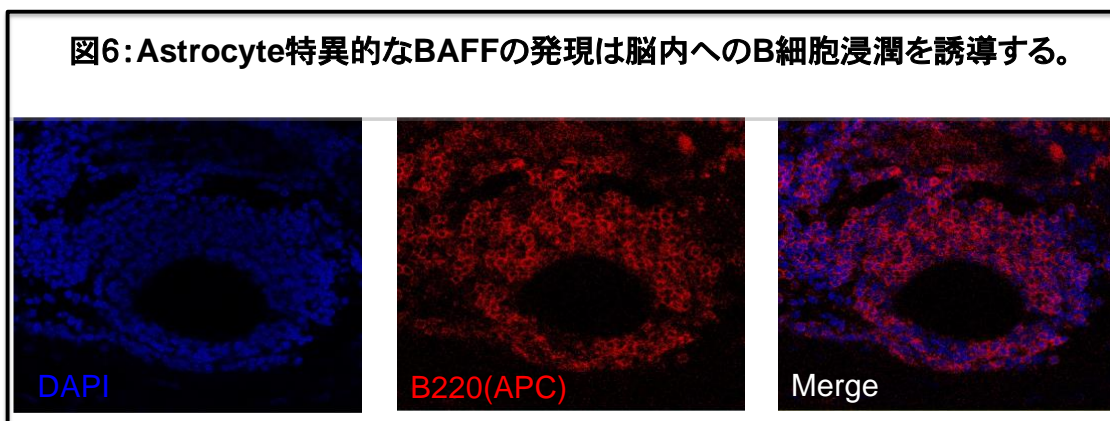
6) Astrocyte 特異的 BAFF 発現マウスの組織学的解析

上記 5) 遺伝子導入 4 週後に脳の組織学的な検討を行なったところ、遺伝子導入したマウスの脳

に単核球の浸潤が認められた(図5)。



次に浸潤した細胞を同定するために脳組織の免疫染色を行なったところ、浸潤した細胞は B 細胞であることが明らかとなった(図6)。



以上の結果より組織特異的な BAFF の発現は同部位への B 細胞浸潤を惹起することが明らかとなった。

今回の結果より、1) AAV の発症に BAFF が重要な役割を果たしていること(図1、図2)、2) Rituximab の投与により AAV は沈静化するが BAFF の発現自体は減少していないこと(図3)、3) 組織特異的な BAFF の発現は同部位への B 細胞の浸潤を促すこと(図5、図6)が明らかとなり、AAV の治療において、寛解時には B 細胞除去が重要であるが、その後の再燃に関しては BAFF の発現も考慮に入れるべきであると考えられた。

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
研究分担者	中島 裕史 (Nakajima Hiroshi) (00322024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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