

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 中沢 大悟

学位論文題名

MPO-ANCA 関連血管炎における Neutrophil Extracellular Traps の関与

【背景と目的】

MPO-ANCA 関連血管炎 (MPO-AAV)は欧米に比べてわが国に多い血管炎である。好中球の細胞質に存在するミエロペルオキシダーゼ (MPO) に対する自己抗体 (MPO-ANCA) の出現を伴って、しばしば半月体形成性糸球体腎炎から急速進行性腎障害をきたし、重篤な場合には肺出血をきたして死亡することもある。先行研究において MPO-ANCA の病原性が確認されているが、なぜ MPO-ANCA が産生されるかは不明のままである。そのため、治療は非特異的かつ強力な免疫抑制治療に頼らざるを得ず、疾患を制御することが困難な上、過剰治療による治療関連死が多いことが問題となっており、本研究では MPO-ANCA の産生機序を解析する事を目的とした。

Neutrophil Extracellular Traps (NETs)は 2004 年に報告された好中球の細胞死形態の一つで、貪食に引き続き、細胞死に至る好中球が MPO 等の細胞質内抗菌蛋白と核 DNA を細胞外にファイバー状に放出することにより形成され、細胞死に至った後も微生物を捕捉して殺菌する。しかし、近年この NETs が自己免疫疾患と関与すると報告され、特に ANCA 関連血管炎患者の腎糸球体半月体部位や血清で NETs が検出され、病態の悪循環を招いている可能性が指摘されている。一方、バセドウ病の治療薬であるプロピルチオウラシル (PTU)は、投与された患者の 30%に MPO-ANCA 産生を誘導する。PTU の一部は MPO で代謝されることが知られており、本研究では、PTU が NETs の形成や代謝に影響を与え、MPO-ANCA の産生に関与するという仮説を立てた。

【材料と方法】

1. PTU による NETs の形成異常と分解障害

ヒト末梢血から好中球を分離し、20nM の PMA で NETs を誘導し、同時に PTU 20 μ M 添加の有無に分けて 2 時間培養し、NETs 形態を観察した。NETs 誘導後に 1U/mL の DNase I を加え 15 分反応させた後、PTU 添加の有無による NETs の分解程度を観察した。また、NETs 形成には、好中球の核が脱凝縮を起こし、核と細胞質が融合する準備段階が必要であり、これにはヒストンのシトルリン化が関与している。そこで、PTU 添加の有無で PMA 刺激した好中球から蛋白を抽出し、Western blot 法でヒストンのシトルリン化を検討した。

2. PTU 添加により形成された異常な NETs が MPO-ANCA 産生の原因となっているかを解析するため、二つの動物モデルを作成した。① PTU 添加 NETs 免疫モデル: 8 週齢雄の WKY ラットに *in vitro* でラット好中球から誘導したラット NETs (PTU 添加の有無に分けて) を同量の完全型アジュバントと混合し、0 日目と 7 日目に WKY ラットに免疫した。14 日目と 21 日目にはそれぞれの NETs のみを腹腔内に投与した。② PTU 経口投与に PMA 腹腔内投与を併用したモデル: WKY ラットに PMA(1 μ g/body)を 0 日目

と7日目に腹腔内注射し、PTU(10mg/day/body)を30日間経口投与した(PTU/PMAラット)。コントロールとしてPMA腹腔内注射のみ行ったラット(PMAラット)を解析した。両ラットとも採血、採尿を行い、MPO-ANCAの産生、生化学検査を行い、30日目に解剖し組織学的に検討した。

【結果】 PMAにより刺激された好中球はMPOとともにクロマチンファイバーを細胞周囲に放出してNETsを形成したのに対し、PMAにPTUを添加して作製したNETsは、MPOとDNAは混合されるものの、クロマチンファイバーは伸展せず、異常な形態を示した。Western blot法でヒストンのシトルリン化を検討したところ、PTUの有無によらずシトルリン化ヒストンが観察された。すなわち、PMAとともにPTUを添加した好中球においても、NETsは形成されているが、その形態が異常であることが確認された。次に、PTU添加の有無で誘導したNETsをDNase I処理により分解する実験を行ったところ、PTUを添加せずに誘導したNETsは分解されるが、PTUを添加して誘導した異常なNETsはDNase Iで分解されず、DNA、MPOとも残存することがわかった。このことから、PTUを添加して誘導される異常な形態のNETsは、DNase Iによる分解障害をきたすことが示唆され、この分解されにくいMPO蛋白を内包するNETsが、MPOに対する免疫寛容を破綻させるという仮説を立て、*in vivo*の実験を行った。PTUを添加しないNETsを免疫したラット(NETs免疫ラット)ではMPO-ANCAは産生されなかったが、PTU添加したNETsを免疫したラット(PTU/NETs免疫ラット)ではANCAの産生を認め、臓器病変として肺胞出血と肺毛細血管炎が認められた。しかし、腎組織では糸球体には明らかな腎炎の所見は見られなかった。そこで、WKYラットにPTUを経口投与し、同時にPMAを腹腔内注射するモデル(PTU/PMAラット)を作成したところ、MPO-ANCAが産生され、臓器病変としては肺出血が見られ、腎臓の病理所見では、糸球体に巣状分節性の増殖性病変と炎症細胞浸潤を認めた。

【考察】 本研究は、PTUによりMPOなどの細胞内蛋白が異常なNETsとともに、細胞外に長期間存在することが、MPOに対する免疫寛容を破綻させ、MPO-ANCAの産生の関与する可能性が示唆した。自然発症の特発性MPO-AAVにおいても、感染症や遺伝要因、環境要因などがNETsの制御異常を惹起し、NETs成分に対する免疫寛容の破綻によりMPO-ANCAが産生される可能性がある。特にNETsを制御するDNase I活性に異常がある患者群が存在する事や、感染症においてはDNase I耐性菌の存在も知られるようになり、こうしたNETs制御異常を起こしうる要因とMPO-ANCAとの関係を解析することが、本疾患のさらなる病因・病態を解明する手がかりになると考えられる。現在、本疾患に対する標準治療とされるステロイドとエンドキサンの併用療法は、生命予後を大きく改善してきたが、治療開始からの短期間での死亡率は依然高く、その原因は疾患そのものよりも治療関連死、特に過剰治療による感染症死が多いと報告されている。この事は、本疾患の病態の本質がわかっていないため、非特異的かつ過剰な免疫抑制治療に依存しているという事態を反映している。こうした現状から、病原性のあるMPO-ANCAの産生機序を解明し、特異的な治療を開発することが強く望まれる。本研究で示したMPO-ANCAの産生にNETsの制御異常が関与しているという概念は、病態に即した新たな特異的治療の開発に結びつく可能性がある。

【結論】 PTUにより分解障害を来したNETsは、MPO-ANCAの産生、ならびにMPO-ANCA関連血管炎の発症に関与する可能性がある。