

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 志田 玄貴

学位論文題名

Anti-lactoferrin antibodies contribute to enhancement of neutrophil extracellular trap formation and are associated with disease activity of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis

(抗ラクトフェリン抗体は好中球細胞外トラップの形成促進に寄与し、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の疾患活動性に関与する)

【背景と目的】 抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎は、小血管を主体とした pauci-immune 型の壊死性血管炎と、血清中に ANCA の出現を特徴とする疾患である。臨床的には肺出血や、半月体形成性糸球体腎炎による急速進行性腎障害を引き起こし、重篤な経過をたどる。今のところ病因、病態は明らかになっていない。ANCA 関連血管炎には顕微鏡的多発血管炎、多発血管炎性肉芽腫症、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（EGPA）が含まれる。ANCA の病的意義のある主な対応抗原は、myeloperoxidase (MPO) と proteinase 3 (PR3) である。ラクトフェリン (Lf) は好中球の特殊顆粒に含まれ、ANCA の対応抗原のひとつであるが、抗 Lf 抗体 (aLf) の ANCA 関連血管炎における陽性率や病原性については不明である。最近、Lf が好中球細胞外トラップ (NET) の形成を抑制することが報告された。NET は生体防御に重要な機構である一方、NET の過剰形成や分解障害は ANCA 関連血管炎の病態と関連するとされる。我々は、膠原病患者で時に認められる aLf の出現が、ANCA 関連血管炎において、Lf の NET 抑制効果を阻害することで、NET の形成に影響を及ぼし、疾患活動性に関与していると予想した。本研究の目的は ANCA 関連血管炎において、aLf の出現頻度を明らかにし、aLf 陽性患者と陰性患者の臨床像や、疾患活動性との関連について検討を行い、aLf 陽性患者の特徴について明らかにすることである。また、*In vitro* の実験として、NET 形成における aLf の影響について検討を行い、aLf の病原性について明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】 ① 2005 年 1 月から 2014 年 4 月の期間に北海道大学病院 内科Ⅱ、もしくは聖マリアンナ医科大学皮膚科を受診した ANCA 関連血管炎患者の保存血清 65 例（顕微鏡的多発血管炎 41 例、多発血管炎性肉芽腫症 5 例、EGPA 19 例）および健常人ボランティア 10 例について、aLf を enzyme-linked immunosorbent assay で測定した。患者情報を後方視的に収集し、aLf 陽性群と aLf 陰性群の臨床像の特徴について検討した。また、aLf の力価と疾患活動性についての検討をおこなった。本研究は北海道大学大学院保健科学研究所の倫理委員会の審査を受け、承認を得て行われた（承認番号：15-90）

② 健常人の好中球に、NET の誘導物質である phorbol myristate acetate (PMA) 0 もしくは 10 nM とともに、aLf もしくは対照となる IgG を加え、NET の形成を観察、比較検討した。aLf 陽性患者血清から IgG を抽出し、ANCA が含まれていることを間接蛍光抗体法で確認後、少量の PMA とともに好中球に加え、NET の形成を観察した。また、患者血清に Lf を加えて、aLf を吸収したのちに、IgG のみ抽出し、同様の NET 誘導実験をおこ

なった。

【結果】 ① aLf 陽性は 4/65 例 (6.2%) で、全例が EGPA (4/19 例, 21.1%) であった。EGPA 患者において aLf 陽性の 4 例は陰性 16 例に比べて血清 CRP 値(平均±標準偏差: 8.89±4.44 vs. 1.68±0.96 mg/dL, $p < 0.001$), BVAS (平均±標準偏差: 29.8 ±5.97 vs. 14.5 ±12.0, $p < 0.01$), 腎病変の有病率 (4/4 (100 %) : 5/15 (33.3%), $p < 0.05$)が、有意に高かった。それに加えて、aLf の力価と、血清 CRP 値 ($r = 0.550$, $p < 0.05$)および BVAS ($r = 0.670$, $p < 0.01$)に正の相関を認めた。これらの結果は、aLf が EGPA の疾患活動性と関連していることを示している。

② aLf 単独 (1 μ g/mL)では好中球 (1 $\times 10^5$ /mL)の NET 形成を誘導しなかったが、suboptimal な量の PMA (10 nM)とともに刺激すると、NET 形成が著しく促進された。反復試行で促進効果は対照の IgG と比較し、統計的な有意差を認めた。aLf 陽性の EGPA 患者血清から抽出した IgG では、市販の aLf と同じく NETs 形成を促進する作用を認めた。この促進作用はリコンビナント Lf を使用した aLf の吸収によって、完全に相殺された。これらの実験結果から、EGPA 患者の aLf は NET 形成を促進することが示された。

【考察】 本研究では、ANCA 関連血管炎患者において、EGPA 患者で血清中に aLf が陽性になることがあり、aLf 力価は疾患活動性と相関することを示した。その上で、*in vitro* の実験で市販の aLf のみならず、EGPA 患者の aLf が、suboptimal な量の PMA とともに好中球に作用させた場合に、NET 形成を促進する作用があることを示した。aLf 単独では、NET 形成を誘導しなかったことは、Lf が無刺激の状態では好中球の特殊顆粒内に存在することと合致している。一方で、suboptimal な量の PMA とともに aLf を加えた場合では、NET 形成が著しく促進された機序としては 2 つの機序が想定される。ひとつは間接的な機序として、Lf の内在性の抑制効果を阻害することで、suboptimal な量であるはずの PMA の刺激においても、NET の形成が亢進する機序である。もうひとつは、直接的な機序として、suboptimal な量の PMA が好中球上の Lf 表出を増やし、aLf が好中球表面上の Lf との結合を介して、好中球活性化を引き起こし、NET の形成を亢進させる機序である。aLf が、どのような機構で NET 形成を促進するのかについては、さらなる研究が必要である。本研究は、ANCA 関連血管炎、特に EGPA における aLf の意義について注目した初めての研究である。

【結論】 本研究では、まず、ANCA 関連血管炎における aLf の陽性率を明らかにし、EGPA 患者において aLf と疾患活動性との間に関連があることを示した。*in vitro* の実験では、suboptimal な PMA の刺激とともに働く aLf に NET 形成を促進する作用があることを示し、EGPA 患者の血清に認められる aLf も同様の作用を持つことから、aLf は NET 形成を介して EGPA の疾患活動性に関与している可能性を提示した。このことから、EGPA において、aLf の出現が疾患活動性の増悪を予測するマーカーとなり得る可能性を示した。今後は、症例の蓄積とともに、aLf の産生機序、NET 形成促進の具体的な経路の検討が病態解明のためには重要と考える。