

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 楠 由宏

学位論文題名

MPO-ANCA 関連血管炎に対する
Peptidylarginine deiminase 阻害薬の効果および
好中球細胞外トラップの血管内皮細胞障害に対する
リコンビナントトロンボモジュリンの効果

(The Effect of Peptidylarginine Deiminase Inhibitor on MPO-ANCA-Associated Vasculitis and the Effect of Recombinant Thrombomodulin on Vascular Endothelial Cytotoxicity of Neutrophil Extracellular Traps)

【背景と目的】 MPO-ANCA 関連血管炎 (MPO-AAV)はミエロペルオキシダーゼ(MPO)を対応抗原とする抗好中球細胞質抗体 MPO-ANCA 産生を特徴とする小型血管炎であり、腎臓や肺を好発臓器とする。MPO-ANCA は病原性自己抗体であることが知られているが、近年、MPO-ANCA 産生に好中球細胞外トラップ (NETs)の制御異常が関与しているという報告があり、MPO-ANCA と NETs の関係が注目されている。NETs は、好中球が MPO やエラスターゼなど殺菌蛋白に装飾された DNA 線維を放出する細胞死の一形態であり、自然免疫において重要な役割を果たしていると考えられている。その一方で、NETs が適切に処理されなければ、本来は細胞内に存在する DNA や蛋白が細胞外に露出した状態となり、それらが自己抗原として認識される可能性が指摘されている。さらに、NETs は血管内皮細胞に対しての直接的な細胞障害性も知られており、その本体は細胞外ヒストンである可能性が指摘されている。また、血管内皮細胞表面に表出しているトロンボモジュリンが細胞外ヒストンに結合するという報告もある。我々は、NETs 形成に不可欠な過程である peptidylarginine deiminase 4 (PAD4)の活性化を阻害することでMPO-ANCA産生ならびに血管炎の発症が抑えられる可能性を考えた。さらに、トロンボモジュリンの遺伝子組み換え産物であるリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)によって NETs の血管内皮細胞障害性の軽減ならびに NETs 関連疾患の病態改善が期待できると考えた。本研究の目的は①PAD 阻害薬ならびに②rTMによって NETs 関連疾患である MPO-ANCA 関連血管炎の病態改善へ寄与できるか検証することである。

【材料と方法】 ① *In vitro* では、健常者末梢血から分離した好中球に NETs 誘導物質である phorbol myristate acetate (PMA)を 20nM 単独、または PMA に加えて 20 μ M の抗甲状腺薬であるプロピルチオウラシル(PTU)を添加して誘導される NETs に対して、PAD 阻害剤である Cl-amidine による前投与の影響を検討した。 *In vivo* では MPO-AAV 発症マウスモデルとして使用する系統を選択するために BALB/c, B6/J, B6/N, NZW, DBA の 5 系統のマウスにそれぞれ PTU を経口投与し、さらに PMA を腹腔内投与して day28 に屠殺して採血、解剖し評価した。次段階として、BALB/c マウスを選択し、PTU および PMA を投与することによって MPO-ANCA 産生モデ

ルマウスを作製し、このマウスを2群に分けて、一方には Cl-amidine を連日腹腔内投与し、もう一方の群には PBS を連日腹腔内投与し、2週間後に解剖して血液・組織学的所見を比較した。

②100 μ g/ml の rTM で1時間前培養した健常人末梢血由来の好中球 1×10^6 /ml に 40nM の PMA を添加して4時間培養し、citH3 陽性面積を測定して前培養のない好中球と比較した。次に、10～150 μ g/ml の未分画ヒストンもしくは 40nM の PMA で誘導した NETs をヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)へ添加し4時間培養後にヒストン添加群は LDH 放出試験で、NETs 添加群は WST-8 試験で細胞障害性を評価した。

【結果】①*In vitro* では PMA 刺激ならびに PTU と PMA による刺激にて誘導される NETs 形成は、Cl-amidine により有意に抑制された。*In vivo* では、5系統のマウスにおいて MPO-ANCA 産生が BALB/c および NZW にて他の系統よりも高値であった(BALB/c 100.4 \pm 12.0ng/ml, NZW 96.1 \pm 12.8ng/ml, B6/J 31.6 \pm 5.79ng/ml, B6/N 41.3 \pm 0.89ng/ml, DBA 32.0 \pm 4.06ng/ml)。一方で、どの系統においても血管炎を示唆する所見は認めなかった。次に、BALB/c マウスを用いた Cl-amidine 投与実験では Cl-amidine 投与群において腹膜における NETs の形成が抑制され、血中 MPO-ANCA 値が PBS 投与群に比べて有意に低値であった(132 \pm 41.6 vs 32.3 \pm 31ng/ml, $p < 0.05$)。②rTM100ng/ml による1時間の前培養にて PMA によって誘導される NETs は有意に抑制された。ヒストンならびに NETs による HUVEC への細胞障害性は rTM による前培養によって有意に抑制された。

【考察】本研究では、PAD 阻害剤である Cl-amidine がヒストン H3 のシトルリン化を阻害し、*in vitro*, *in vivo* にて既報の NETs 形成抑制作用を確認した。さらに新知見として *in vivo* において Cl-amidine が MPO-ANCA 産生を抑制することを明らかにし、既報の過剰な NETs 形成が MPO-ANCA 産生に関与しているとする説が支持された。尚、本研究で作製したマウスモデルでは、既報のラットモデルと異なり血管炎の表現型を得ることができなかつたため、マウスモデルにおいて PMA および PTU の増量や投与期間の延長などが血管炎発症を誘導しうるのか、今後の検証が必要である。

さらに本研究では rTM の NETs 誘導抑制効果を示した。NETs の構成成分である HMGB-1 は好中球の TLR4 を介して NETs を誘導するという既報があり、本実験ではこの経路が rTM によって抑制された可能性を考えた。ただし、PMA により誘導される NETs は rTM では抑制されないという相反する報告もあり、今後さらに詳しい探求が必要である。また、本研究では rTM による前培養を行うことによって HUVEC に対するヒストンの細胞障害性が抑制されることを実証した。さらに、ヒストンと同様に NETs 自体の細胞障害性も rTM によって抑制されることが明らかになった。細胞外ヒストンは NETs の有する細胞障害性の主因である可能性が報告されており、本研究にて得られた rTM の NETs による血管内皮細胞障害に対する抑制効果は主にヒストンに対する効果である可能性が考えられた。今後、NETs 成分に含まれるヒストンの濃度を測定し、そのことを明らかにする必要がある。

【結論】本研究により Cl-amidine は NETs の形成阻害ならびに MPO-ANCA 産生を抑制することが示された。Cl-amidine は MPO-AAV の治療薬の候補になり得ることが示唆され、MPO-AAV の今後の治療法の開発の一端に寄与するものと考えられる。さらに、本研究では rTM は PMA 誘導 NETosis の抑制、ならびに NETs による細胞障害性の軽減効果を認めた。rTM は、すでに産生された NETs による細胞障害性を抑制しつつ、新たな NETs 産生を抑制することで NETs に関連した病態の改善に寄与する可能性を示した。