HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Anti-lactoferrin antibodies contribute to enhancement of neutrophil extracellular trap formation and are associated with disease activity of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis [an abstract of entire text]
Author(s)	志田, 玄貴
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12107号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/61800
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2211
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Haruki_Shida_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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)

2016 年 3 月

北海道大学

志田　玄貴

【背景】

抗好中球細胞質抗体（antineutrophil cytoplasmic antibody; 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．臨床的には肺胞出血や，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．ANCA 関連血管炎には顕微鏡的多発血管炎（microscopic polyangiitis; MPA)，多発血管炎性肉芽腫症（granulomatosis with polyangiitis; GPA)，好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（eosinophilic granulomatosis with polyangiitis; EGPA)が含まれる．病原性があるとされる ANCA の主な対応抗原は，myeloperoxidase (MPO)と proteinase 3 (PR3)である．

ラクトフェリン（lactoferrin; Lf)は好中球の特殊顆粒中に認められ，ANCA の対応抗原の一つである．抗ラクトフェリン抗体（anti-Lf antibody; aLf)は, Lf -ANCA でもあり，自己免疫性膵炎や，潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患の一部や強直性脊椎炎や，全身性エリテマトーデスの患者の血中に認められる．いくつかの既報において，aLf 陽性群では，陰性群と比較して，高い疾患活動性を有することが示されている．しかし，aLf の病原性や，作用機序などの検討は行われていない．また，ANCA 関連血管炎における aLf の陽性率や，病原性については明らかにされていない．

Lf は好中球の活性化により速やかに脱顆粒され放出される．近年，大久保らは Lf が好中球の活性化と細胞死の形態の一種である好中球細胞外トラップ（neutrophil extracellular trap; NET)の内在的な抑制因子として働くことを報告した．NET はクロマチンファイバーと MPO や PR3 といった好中球細胞内タンパクを混合し, 細胞外に放出する好中球の細胞死の一つの形態であり，効率よく侵入微生物を捕捉，殺菌する機構である．NET は主に DNase によって速やかに分解され，一部は貪食細胞によって処理される．NET は生体防御に重要な機構の一つと考えられているが，DNA とともに細胞内タンパクが表出し, 細胞外に暴露されることから, NET の過剰産生や分解障害による抗原暴露の増加は，抗 DNA 抗体や ANCA といった自己抗体の産生や，免疫担当細胞の異常活性化と関連すると考えられている．中沢らは MPO-ANCA 血管炎において, MPO-ANCA による NET 形成亢進と, 分解障害が存在することを示し，NET-ANCA 悪循環が病態形成に関与している可能性を報告した．一方，aLf はいくつかの論文で，好中球の活性化を導く可能性があると報告されていたが，病原性は不明であり，また，NET の形成に関する報告は検索したかぎり認めない．我々は膠原病患者で時に認められる aLf の出現が，Lf の NET 抑制効果を阻害し，NET の形成に影響を及ぼし，病態悪化に関与しているのではないかと予想した．

本研究ではまず，患者保存血清を使用し，ANCA 関連血管炎患者において，aLf の測定を行った．aLf 陽性患者と陰性患者の臨床像を検討し，疾患活動性との相関につ

いて検討を行い, EGPA 患者において aLf が疾患活動性に関連があることを見出した. *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 が NET 形成促進に寄与することを明らかにした.

実験 1

【目的】ANCA 関連血管炎患者における，aLf の陽性率と，aLf 陽性患者と陰性患者の臨床像について明らかにする.

【方法】対象は 2005 年 1 月から 2014 年 4 月に北海道大学内科Ⅱに入院もしくは, 聖マリアンナ医科大学病院皮膚科を受診した ANCA 関連血管炎患者の保存血清，および健常人ボランティアの血清を使用した．aLf 抗体は enzyme-linked immunosorbent assay 法で測定した．aLf の判定閾値には ELISA キットの 10 unit/mL を使用した. 患者情報として, 採血時の年齢, 性別, MPO-ANCA や C reactive protein (CRP)を含む検査データ，疾患活動性を Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) vol.3.0 を用いて評価し，カルテ上から後方視的に収集した．EGPA 患者については，好酸球数，喘息罹患歴を追加で収集した．統計処理は GraphPad Prism 5.0 software を使用し, 適時, Student *t* 検定, Mann-Whitney U 検定, one-way ANOVA，Fisher の正確検定を行った．P 値は 0.05 未満を統計的有意差ありと定義した．本研究は北海道大学大学院保健科学研究院の倫理委員会の審査を受け，承認を得て行われた.

【結果】MPA 41 例，GPA 5 例，EGPA 19 例の計 65 例の ANCA 関連血管炎患者と 10 例の健常人の保存血清を使用した．MPA は年齢が高い傾向にあり，GPA は全て女性であった．MPO-ANCA 陽性率は，MPA で 65.9%，EGPA で 36.8%であり GPA は全症例陰性であった．CRP，BVAS，腎病変の有無に関して，各疾患群間で有意な差は認めなかった.

aLf は ANCA 関連血管炎症例 65 例中 4 例 (6.2%)で aLf が陽性であった．健常人ボランティアは全員陰性を確認した．aLf の陽性者は全て EGPA 患者であり，EGPA 患者における aLf の陽性率は 21.1%であった.

EGPA 患者において aLf の陽性群と陰性群の臨床像の違いを検討した. 年齢, 性別, 喘息罹患歴，末梢血中の好酸球数，MPO-ANCA の陽性率は aLf 陽性群と陰性群の間で有意差を認めなかった. 一方で, aLf 陽性の 4 例は aLf 陰性例と比較して, 血清 CRP 値 (8.89±4.44 vs 1.68±0.96 (平均±SD ,mg/dL), $p<0.001$)，BVAS (29.8 ±5.97 vs. 14.5 ±12.0 (平均±SD), $p<0.01$)，腎病変の有病率 (4 (100) :5 (33.3)(n (%)),$p<0.01$)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 aLf の力価と 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.

実験２

【目的】NET 形成における，aLf の影響について検討する.

【方法】健常人末梢血好中球をチャンバースライドに（1×10^5 /mL)の濃度で播種し，37℃で 15 分間静置したのち, 0 もしくは 10 nM の Phorbol myristate acetate (PMA) とともに aLf もしくは対照となるウサギ IgG で刺激し，37℃，3 時間培養した．4% paraformaldehyde (PFA)で固定し，4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)入りの染色固定液で標本とした，以前の報告と同様に NET 面積を DAPI 陽性面積と定義し，Image J software を使用し，測定した.

２例の EGPA 患者（①aLf 単独陽性, ②aLf, MPO-ANCA 両方陽性)血清を使用し，健常人ボランティアと MPA 患者（③MPO-ANCA 陽性)血清を対照として使用した．患者血清（①，②，③)および，健常人血清から IgG を抽出し，エタノール固定好中球に対する間接蛍光抗体法で ANCA を確認した．同じ患者血清を用いて，リコンビナントヒト Lf により, aLf の吸収処理を行って IgG を抽出した. Lf の残留を ELISA 法で測定し，ELISA の測定感度以下であることを確認した．aLf の残留については ANCA panel kit を使用し，否定した.

健常人好中球をチャンバースライドに播種したのち，0 もしくは 10 nM の PMA と 前実験で使用した患者 IgG (それぞれ aLf の吸収処理前と吸収処理後）もしくは，対照として健常人 IgG を添加した．37℃，3 時間の静置のあと，固定し，DAPI 入りの染色固定液で封入した．NET 面積を DAPI 陽性面積として測定した.

【結果】IgG，aLf 単独もしくは PMA 10 nM 単独の刺激では好中球の NET 形成を誘導しなかったが，この suboptimal な量の PMA 10 nM と aLf の組み合わせで刺激すると，NET 形成が促進され．反復試行で促進効果はウサギ IgG と比較して，統計的な有意差（$p< 0.01$）を認めた.

患者 IgG では，aLf 単独陽性，aLf と MPO-ANCA 両方陽性，MPO-ANCA 陽性の患者血清から抽出した IgG は，ともに perinuclear 型 ANCA が陽性であった.

aLf を含む IgG (患者①，②)は suboptimal な量の PMA 10 nM によって NET 形成が亢進した．そしてこの亢進効果は，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.

【総括】本研究では，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．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．

【結語】aLf は，NET の形成を促進させ，EGPA の活動性に関与している．