



Title	ANCA関連血管炎の病態形成におけるシクロフィリンD依存性プログラム細胞死の役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	工藤, 孝司
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14487号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/81876">http://hdl.handle.net/2115/81876</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2605
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Takashi_Kudo_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

## 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 工藤 孝司

### 学位論文題名

ANCA 関連血管炎の病態形成におけるシクロフィリン D 依存性プログラム細胞死の役割  
(The role of Cyclophilin D dependent necrosis  
in the pathogenesis of ANCA associated vasculitis)

【背景と目的】抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) は、病原性自己抗体の産生とともに臓器障害を引き起こされる自己免疫疾患である。全身性エリテマトーデス (SLE) は臨床的に糸球体腎炎や肺病変等の AAV と類似する症状を有することがあり、両疾患は病態機序的にも自然免疫機構である好中球細胞外トラップ (NETs) の制御が関与するが、病理組織学的には AAV は壊死性血管炎を呈し、SLE は慢性炎症による臓器障害を特徴とする違いがある。AAV では病原性自己抗体 ANCA が過剰な NETs を誘導し血管内皮傷害を引き起こす一方、SLE では、免疫複合体が NETs を誘導し向炎症シグナルを亢進させることが近年報告され、これらの違いが病理組織学的特徴を反映している可能性がある。NETs は侵入微生物を効率よく殺菌する免疫システムであると同時に、特定の分子によって制御される能動的な壊死 (ネクローシス) の一形態であるが、ANCA を介した NET 形成のシグナル伝達経路は不明である。制御された壊死を司る分子の一つであるシクロフィリン D (CypD) は、ミトコンドリアの膜透過性遷移孔 (mPTP) を開口させ、ミトコンドリア内から過剰な ROS やシトクロム c (Cyt c) を細胞質へ流出させることでネクローシスを引き起こす。本研究では、ANCA 刺激により誘発される NET 形成、ならびに ANCA-NETs による血管内皮細胞傷害が、CypD 依存性にネクローシスが起これ、AAV の壊死性血管炎の病態形成に関与していると仮説を立てた。

【材料と方法】①ヒトの自己免疫疾患における CypD 依存性ネクローシスの関与を検証するために、AAV, SLE と診断された患者の腎生検検体を用いて TUNEL 染色, Cyt c 染色を行った。②In vitro 実験: ANCA 誘導 NETs における CypD 阻害薬と CypD 遺伝子除去の効果それぞれ検証した。1) ヒト健常好中球を CypD 阻害薬 (CsA) の前処置の有無に分けてヒト control-IgG と ANCA-IgG で培養し、NETs 形成を評価した。2) C57BL/6 野生型 (WT) マウスと *CypD*<sup>-/-</sup>マウスから単離した好中球をマウス control-IgG または ANCA-IgG で培養し、Live imaging ならびに透過型電子顕微鏡で NET 形態を評価した。NET 形成に関わるシグナル分子を RNA シークエンスによる網羅的解析とプログラム細胞死関連分子に着目した免疫染色で評価した。3) ANCA-NETs により傷害された血管内皮細胞に CypD 阻害薬を投与し、細胞透過性試験により内皮傷害を評価した。③In vivo 実験: AAV, SLE における *CypD* 遺伝子の役割を解析するため、AAV においては ANCA 移入モデルと AAV 自然発症の 2 種類のモデルマウスを用い、SLE においては TLR7 刺激誘導 SLE 様マウスを用いた。1) ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスを樹立し、*CypD* の遺伝子除去の効果を検証した。まず、マウス骨髄細胞株 (WEHI-3) からイオン交換クロマトグラフィーにより抽出したマウス MPO を *MPO*<sup>-/-</sup>マウスに免疫し、MPO-ANCA を産生するマウスを作成した。産生された抗体を含んだマウス血清を雌性 10 週齢の *CypD*<sup>+/+</sup>マウス (n=6/群) と *CypD*<sup>-/-</sup>マウス (n=5/群) にそれぞれ移入し、AAV を誘導した。2) AAV 自然発症モデルマウスである SCG/Kj マウスを *CypD*<sup>-/-</sup>マウスと N3 世代まで戻し交配し、雌性 15-16 週齢の

*CypD*<sup>+/+</sup>マウス (n=7/群) と *CypD*<sup>-/-</sup>マウス (n=8/群) を評価した。3) 雌性 7 週齢 WT マウス (n=8/群) と *CypD*<sup>-/-</sup>マウス (n=9/群) に TLR7 アゴニストを週 3 回, 8 週間塗布することにより SLE を誘導し, 15 週齢で解剖した。それぞれのモデルマウスにおいて, 生化学的検査 (腎機能, アルブミン尿, 血尿), 自己抗体測定 (MPO-ANCA, 抗 ds-DNA 抗体), 循環好中球 NETs (FACS, 蛍光顕微鏡), 病理組織学的評価 (肺と腎の組織評価), プログラムネクローシスに関わる組織免疫染色を行った。

【結果】①AAV のヒト腎生検検体において, 血管壊死部位に TUNEL 陽性細胞ならびに Cyt c 陽性細胞が同定されたが, SLE や微小変化型ネフローゼでは見られなかった。②ヒト好中球において CsA はミトコンドリアからの ROS, Cyt c の放出抑制とともに ANCA-NETs の誘導を抑えた。また WT マウス好中球は MPO-ANCA により NETs が誘導され, 電子顕微鏡による観察では, 核膜, 細胞膜の破綻を示したが, この現象は *CypD*<sup>-/-</sup>マウス好中球で有意に抑制された。RNA シークエンス解析では, ANCA 誘導 NETs に特異的な炎症シグナルの発現亢進が見られた。さらに, ANCA 誘導 NETs により惹起される血管内皮細胞傷害は CsA 投与により有意に抑制された。③ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスにおいて, *CypD*<sup>+/+</sup>マウスは半月体形成性糸球体腎炎と肺傷害を認めたが, *CypD*<sup>-/-</sup>マウスでは循環 NETs が減少し, 腎や肺組織の TUNEL 陽性細胞の有意な減少とともに臓器傷害が軽減した。SCG/Kj マウスと *CypD* 欠損マウスの戻し交配による解析では, *CypD*<sup>-/-</sup>マウスは *CypD*<sup>+/+</sup>マウスと比べて腎や肺組織の TUNEL 陽性細胞の有意な減少とともに臓器傷害が軽減し, 生存解析では生存率が上昇する傾向が見られた。MPO-ANCA の産生レベルには差は見られなかった。SLE 誘導モデルマウスでは, 壊死病変が見られず, *CypD* 遺伝子欠損の有無によって腎炎 (腎機能, アルブミン尿, 組織), 自己抗体の産生に差は見られなかった。

【考察】ヒト腎生検検体の解析により, AAV の壊死性血管炎は *CypD* 依存性ネクローシスが関与し, この現象は *in vitro* の実験により, 自己抗体 ANCA により誘導される *CypD* を介した NETs 形成, 血管内皮細胞傷害に起因することが示唆された。*CypD* の役割をモデル動物で検証したところ, ANCA 移入モデルや ANCA 産生 AAV 自然発症モデルにおいて, *CypD* 欠損マウスで壊死病変の改善とともに臓器障害が軽減したが, 自己抗体の産生低下は見られず, *CypD* の獲得免疫系へ影響は少ないことが示唆された。SLE では, ヒト腎生検検体ならびにモデルマウスにおいて壊死病変は乏しく, *CypD* 遺伝子欠損が SLE 誘導マウスに与える影響も見られなかったことから, *CypD* は自己免疫病態の中でも, NETs がエフェクターとして作用する壊死病態に関与することが示唆された。現在の AAV 治療の主体は免疫抑制治療であり, 病態の上流を制御することはできるが, 感染症死が多く, 壊死病態を制御できないために臓器障害が残ることが課題である。本研究では, *CypD* を標的とした治療が, 免疫抑制を起こさずに, 血管局所で誘導される壊死を制御することで血管炎病態を改善する可能性を示した。

【結論】AAV の壊死病態に *CypD* 依存性ネクローシスが関与し, *CypD* を標的とした治療が本疾患の新たな治療戦略となる可能性がある。