



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 [全文の要約]
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	http://hdl.handle.net/2115/81877
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 : 2605
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Takashi_Kudo_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文 (要約)

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)

2021 年 3 月
北 海 道 大 学
工 藤 孝 司
Takashi Kudo

【緒言】

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が引き起こされる代表的な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 ではミエロペルオキシダーゼ (MPO) などを抗原とした病原性自己抗体 ANCA が好中球に作用して過剰な NETs と血管内皮傷害を誘導し壊死性血管炎を引き起こす。一方 SLE では、免疫複合体成分が好中球に作用して IFN signature 等の向炎症シグナルを誘導する NETs が生じることが近年解明されつつあり、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 は感染症時に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 NETs 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、活性酸素種 (ROS) などの刺激により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。脳や腎臓の虚血再灌流傷害モデル動物において、CypD の阻害薬や遺伝子除去が壊死抑制を介して臓器を保護することが示され、様々な疾患にプログラムネクローシスを標的とする治療が注目されている。

本研究では、ANCA 刺激により誘発される NETs 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。

【方法】

①ヒトの自己免疫疾患における *CypD* 依存性ネクロ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* 遺伝子除去の効果をそれぞれ検証した.

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 MPO-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*^{-/-}マウスから単離した好中球をマウス control-IgG または MPO-ANCA-IgG で培養し, Live imaging ならびに透過型電子顕微鏡で NETs 形態を評価した. NETs 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) 血管内皮細胞傷害における *CypD* の役割を検証するため, 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 のモデルとして 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*^{-/-}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*^{+/+}マウス (n=6/群) と *CypD*^{-/-}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*^{-/-}マウスと N3 世代まで戻し交配し, 雌性 15-16 週齢の *CypD*^{+/+}マウス (n=7/群) と *CypD*^{-/-}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*^{-/-}マウス (n=9/群) に TLR7 アゴニストであるイミキモド (IMQ) 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。一方、コントロールの SLE や微小変化型ネフローゼではこれらの陽性所見は見られなかった。

②ヒト好中球において CsA はミトコンドリアからの mitoROS および 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 Sytox 陽性の 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*^{-/-}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、ANCA 移入 *CypD*^{+/+}マウスは投与 24 時間後に半月体形成性糸球体腎炎と肺傷害を認めたが、*CypD*^{-/-}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障害が軽減した。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*^{-/-}マウスは *CypD*^{+/+}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障害が軽減し、生存解析では生存率が上昇する傾向が見られた。しかし 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、脾臓の重量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 移入モデルでは, *CypD* 欠損マウスで NETs 形成, 壊死病変, ならびに臓器障害が軽減し, ANCA 産生 AAV 自然発症モデルにおいても *CypD* 遺伝子除去により臓器病変が改善した. しかし, MPO-ANCA の産生低下は見らず, CypD の獲得免疫系へ影響は少ないことが示唆された. さらに 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 の治療の主体は強力な免疫抑制治療であり, 病態の上流を制御することは可能であるが, 免疫抑制による感染症死が多いこと, 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分子メカニズム的に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.