



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	MP0-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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	楠, 由宏
Description	配架番号 : 2331
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12809号
Issue Date	2017-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66918
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshihiro_Kusunoki_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 楠 由 宏

主査	教授	清 水 伸 一
審査担当者	副査	教授 篠 原 信 雄
	副査	教授 村 上 正 晃
	副査	准教授 北 村 秀 光

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)

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、近年 MPO-ANCA 産生と NETs 制御異常の関係が注目されている。今回, Propylthiouracil (PTU) および phorbol myristate acetate (PMA)を BALB/c マウスに投与することにより MPO-ANCA 産生モデルマウスを作製し、このマウスへ pan-PAD 阻害薬である Cl-amidine を投与することによって NETs 誘導抑制効果ならびに MPO-ANCA 産生抑制効果を認めた。一方で, NETs は直接的な細胞障害性を有することが知られているが、本研究において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)投与によって in vitro で NETs 誘導抑制効果に加えてその細胞障害性の抑制効果も認めた。これらの結果から, Cl-amidine ならびに rTM は NETs 関連疾患の病態改善に寄与し, MPO-AAV の治療薬の候補になりうる可能性が示された。

審査にあたり、まず副査の篠原教授から PTU および PMA 投与動物モデルは既報ではラットが使用されているが、今回はなぜマウスを選択したのかについて質問があり、申請者は、PAD 阻害薬が高価であることからラットモデルで行う場合、必要量の試薬確保が難しく、また、ラットの既報では表現型がでるものの軽度であったことなどから組織学的に試薬の効果を評価することが困難である可能性が考えられたためであると回答した。また, rTM で

は本実験で示した程度の NETs 抑制効果において臨床的に効果が期待できるのか質問があり、申請者は、rTM の NETs 抑制効果は PMA によって誘導された NETs 中に存在する HMGB1 による二次的な NETs 誘導作用を抑制することを想定しており、PMA による NET 誘導効果は抑制できないと考えられ、そのため、今回の実験では限局的な効果しか示すことはできなかったが、実際の臨床では HMGB1 による NETs の二次的な誘導を抑えることができるため、今回の *in vitro* で示した効果以上に臨床的效果は期待できるのではないかと考えると回答した。

次に、副査の北村准教授から PAD4 を標的とした他の疾患モデルマウスへの投与による既報や、PAD を抑制することによる予想される有害事象について質問があり、申請者は、SLE や炎症性腸疾患、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスなどで PAD 阻害による一定の効果を示した既報があり、また、PAD4 をターゲットとして考えた場合、NETs 抑制による易感染性といった副作用が出現する可能性は考えられ、PAD4 ノックアウトマウスの既報では、胎生致死ではないものの NETs が作られないということで一種の細菌感染症にかかりやすいといった報告があるが、一方で先述の SLE マウスモデルなどへの PAD 阻害薬投与実験では易感染性等の有害事象の報告は無く、本研究においてもそのような徴候はみられなかったと回答した。

次に、副査の村上教授から NETs が新しい細胞死ということだがネクロシスに近いのか、どのように区別しているのかについて質問があり、申請者は、発表当初はアポトーシスやネクロシスと全く異なる細胞死と考えられていたが、近年では、比較的新しい概念であるプログラムされたネクロシスであるネクロプトーシスとの区別がなかなか難しいのではないかと議論になっていると回答した。

さらに PTU 投与により、なぜ MPO-ANCA が作製されるのかについて質問があり、申請者は、感染等で活性化された多核白血球や単球により PTU が硫酸化され、この代謝産物が選択的に MPO に集積して MPO 構造が変化して、構造変化した MPO に対して ANCA が誘導されるといった報告があるが、明らかでない部分も多いと回答した。

最後に主査の清水教授から、本実験では使用した rTM が非常に高濃度であること、ならびに細胞障害性を抑制度の程度は認めるものの、比較的軽度であることについて質問があり、申請者は、本実験では血管内皮細胞の障害度を、今回用いた assay の測定感度以上にするために実臨床よりも高い濃度でヒストンを必要としたため、その分細胞障害性を抑制するために rTM も高濃度を要したことから、*in vivo* の実験では出来る限り臨床的な投与量に近い濃度で行うことを計画しており、また、*in vitro* でも今回用いた assay 以外でより低濃度での評価が可能な系がないか検索できればもう少し臨床に近い濃度で評価できるのではないかと考えていると回答し、審査を通して申請者は質問に対し適切に回答した。

この論文は、PAD 阻害薬による MPO-ANCA 産生抑制効果、および rTM による NETs 誘導抑制効果ならびに NETs の細胞障害性抑制効果を初めて示した点で高く評価され、今後 MPO-ANCA 関連血管炎などの NETs 関連疾患へ創薬につながる事が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。