HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗好中球細胞質抗体関連血管炎における抗好中球細胞外トラップ抗体の存在と病的意義に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	八反田, 文彦
Description	配架番号：2399
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13020号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70542
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Fumihiko_Hattanda_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　八反田　文彦

主査　教授　村　上　正　晃
審査担当者　副査　教授　廣　瀬　哲　郎
副査　教授　有　賀　　正
副査　教授　有　川　二　郎

学 位 論 文 題 名

抗好中球細胞質抗体関連血管炎における抗好中球細胞外トラップ抗体の存在と
病的意義に関する研究
(Studies on the Presence and Pathogenesis of Anti-Neutrophil Extracellular Trap Antibody in Patients with Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis)

Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody(MPO-ANCA) 関連血管炎は全身性の小型血管炎を生じる疾患であり、その発症機序と好中球細胞死の一形態である好中球細胞外トラップ(Neutrophil Extracellular Traps :NETs)の関連が注目されている。NETs は感染に対する生体防御において重要な役割を担っているが、MPO-ANCA 関連血管炎患者は NETs の分解障害を有しており、NETs に含まれる MPO が細胞外に暴露されることで自己抗原となり MPO-ANCA が産生される。一旦 MPO-ANCA が産生されれば、MPO-ANCA によって NETs 形成が誘導され、NETs と ANCA を介した悪循環 (NETs-ANCA 悪循環)が生じ病態を悪化させる。一方で、MPO-ANCA と別の要因が NETs-ANCA 悪循環を増悪する可能性がある。第一章では、ヒドララジン誘発 MPO-ANCA 関連血管炎の患者血漿を用いた解析を行った。本患者は降圧薬であるヒドララジン内服中に MPO-ANCA 関連血管炎を発症し、ヒドララジンの休薬のみで改善したが再燃し、ステロイド治療で寛解に至った。本患者の 4 つの異なる時点の血漿：初発時、再燃時、治療後早期、寛解時を用いた間接蛍光抗体 (IIF) 法で、再燃時、治療後早期の血漿中に抗 NETs 抗体を検出した。また、NETs 分解能はすべての時期の血漿で低値であり、NETs 誘導能は初発時、再燃時、治療開始早期の 3 つの時点で高値であった。第二章では、MPO-ANCA 関連血管炎患者 11 例の血漿について抗 NETs 抗体の有無を IIF 法で判定し、11 例中 6 例に抗 NETs 抗体を検出した。抗 NETs 抗体陰性血漿 (n=5) と陽性血漿 (n=6) の間で NETs 誘導能、NETs 分解能に有意差はなかった。しかし、抗 NETs 抗体陽性例の血漿では DNase I を添加しても NETs 分解能が増加しないものがあり、陽性血漿中 2 例で血漿中の IgG を除去したのみで NETs 分解能が顕著に増加し、血漿中の IgG が NETs 分解障害を引き起こしていると考えられた。それら 2 例の抗 NETs 抗体は、MPO で吸収しても IIF 法における NETs への反応性は失われず、また、NETs を誘導していない好中球の細胞質に反応したことから、MPO-ANCA 以外の ANCA と考えられた。それら 2 例の抗 NETs 抗体の対応抗原として好中球細胞内蛋白(Azurocidin、BPI、Cathepsin G、Elastase、Lactoferrin) を ELISA 法で検討したが、それらいずれでもなかった。以上の結果から、MPO-ANCA 関連血管炎患者の一部では抗 NETs 抗体が産生されていた。しかも、症例により

異なる性質の抗 NETs 抗体が産生されており、一部の抗 NETs 抗体は DNase I の働きを阻害し、NETs の分解障害を惹起している可能性を示した。

質疑応答では、副査の廣瀬哲郎教授より NETs を分解する因子として、DNaseI 以外のものが関与するかという質問があった。それに対して、NETs 分解の因子は DNase 以外については不明であると回答した。また、NETs に含まれる DNA に対する抗体（抗 DNA 抗体）が DNase の活性阻害を引き起こす可能性はないかという質問があった。それに対し、全身性エリテマトーデス患者では抗 DNA 抗体が NETs の分解を阻害する可能性が報告されているが、本研究の対象患者においては抗 DNA 抗体陰性例が多く、我々が検討した抗 NETs 抗体は抗 DNA 抗体と異なる抗体であると回答した。次に、副査の有賀正教授からは PTU やヒドララジンといった薬剤が、分解障害を伴う異常 NETs の形成をおこす機序について質問があった。それに対して、PTU に関しては、PTU の代謝産物が DNA のホスホジエステラーゼ結合部位に接着し、NETs の分解障害を起こす可能性はある。しかし、その他薬剤誘発性 MPO-ANCA 関連血管炎における NETs 分解障害の詳細な機序は明らかではないと回答した。さらに、ANCA 関連血管炎患者の血液中で生じた NETs は分解障害を有しているかという質問があった。それに対し MPO-ANCA 患者血漿中の NETs は分解障害を有することは報告されていると回答した。また、抗 NETS 抗体の結合（IIF）の結果は標本とする好中球の個体差で変化するかという質問があった。それに対し、今回の検討では個体差は生じなかったと回答した。また、抗 NETs 抗体が健常人好中球に作用し NETs が産生される機序について質問があったが、その機序はまだ明らかでない回答した。次に、副査の有川二郎教授からは抗 NETs 抗体の IIF 法の判定方法に関して感度や特異度、また抗 NETs 抗体の定量的評価の可能性について質問があった。それに対し、本検討で抗 NETs 抗体の陽性の判定は IIF 法で NETs 成分に対する強い陽性像のみの判定であり、NETs 抗体陽性像の定量評価も試みたが、IIF 法の判定結果と相同性が得られていないと回答した。主査の村上正晃教授より、抗 NETs 抗体陽性患者において、血漿中の IgG 除去を行った際に NETs 分解能が改善する 2 例を示しているが、MPO-ANCA が除去された事による影響ではないかと質問があった。それに対して、MPO-ANCA 除去による NETs 分解障害が改善したことは否定できないが、その 2 例においては MPO-ANCA 除去実験で MPO-ANCA と異なる抗 NETs 抗体を有していることは確認できており、その抗体の対応抗原が同定できれば、抗 NETs 抗体が NETs 分解に対する影響を検討できると回答した。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充分な資格を有するものと判定した。