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［全文の要約］
Author(s)	八反田，文彦
Description	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：2399 他
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/2115/70543
Type	doctoral thesis
File Information	Fumihiko_Hattanda_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

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)

2018年3月

北 海 道 大 学
八 反 田 文 彦

【背景と目的】抗好中球細胞質抗体関連血管炎は、抗好中球抗体（Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody ：ANCA）が血液中に出現し、全身性の小型血管炎を生じる疾患である。ANCA の詳細な産生機序は未だ不明であるが、近年 ANCA 関連血管炎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。刺激を受け活性化した好中球が細胞死に至る際、好中球は DNA と細胞内蛋白を混合して細胞外に網目状に放出することで NETs を形成し、病原体の捕獲と物理的封じ込めを行い、かつ NETs に含まれる高濃度の抗菌蛋白を曝露させることで細胞死に至った後も効率よく殺菌を行う。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、生体内の主要な NETs 分解因子であるデオキシリボヌクレアーゼⅠ(Deoxyribonuclease Ⅰ:DNase Ⅰ)の活性低下など NETs の分解障害が生じた場合、ミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase ：MPO)などの細胞内蛋白や DNA が長時間細胞外に暴露され、それらを抗原とした自己抗体が産生されうる。ANCA 関連血管炎を発症する患者はこのような NETs の分解障害を背景として、何らかの環境要因によって NETs が生体内に長時間残存することで MPO-ANCA の産生が誘導される可能性がある。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)が生じると考えられる。MPO-ANCA 関連血管炎においてはこのような NETs-ANCA 悪循環が病態形成および悪化の一因を担っていると考えられるが、ANCA 関連血管炎患者の治療後の寛解維持期間と診断時の MPO-ANCA 値や治療後の MPO-ANCA の低下度に関連は認めないことから、ANCA 関連血管炎の病態形成において MPO-ANCA とは別の要因が NETs-ANCA 悪循環を増幅している可能性がある。我々は、ヒドララジン誘発 MPO-ANCA 関連血管炎の症例を経験し、この症例の病態において NETs-ANCA 悪循環が働いている事、また、NETs-ANCA 悪循環の増幅に抗 NETs 抗体が関与していることを見出した。今回我々はこの症例の臨床経過を報告し、経過中の 4 つの異なる時点において採取した患者血漿について、ANCA と抗 NETs 抗体の有無、NETs の誘導活性や分解活性を解析した結果を報告する。さらに、MPO-ANCA 関連血管炎患者における抗 NETs 抗体の存在頻度、ならびに抗 NETs 抗体の NETs 形成や分解に対する影響を解析し、さらに抗 NETs 抗原の対応抗原の同定を試みた。

【対象と方法】第一章(一例解析)：ヒドララジン誘発性の MPO-ANCA 関連血管炎の症例。休薬のみで一旦改善したが再燃し、間接蛍光抗体（IIF）法で再燃時の血清中に抗 NETs 抗体を検出した。同症例の 4 つの異なる時点の血漿：初発時(ANCA 陽性、抗 NETs 抗体陰性)、再燃時（ANCA 陽性、抗 NETs 抗体陽性)、治療後早期（ANCA 陰性、抗 NETs 抗体陽性)、寛解時（ANCA 陰性、抗 NETs 抗体陰性）について NETs 分解能と NETs 誘導能を解析した。第二章(複数例解析)：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、抗 NETs 抗体の有無と血清の NETs 分解能及び NETs 誘導能の関連を解析した。さらに抗 NETs 抗体の対応抗原の検索を IIF 法並びに ELISA 法（ANCA panel kit WIESLAB®, Euro Diagnostica 社）にて行った。

【結果】第一章：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：MPO-ANCA 関連血管炎患者 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）で、患者背景、MPO-ANCA 値、

ならびに血管炎活動性の評価である BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score 2008 version 3)に差があるか検討した。その結果、患者背景、MPO-ANCA 値、BVAS いずれにおいても抗 NETs 抗体陽性群と陰性群の間で有意差は認めなかった。NETs の形成、分解への影響も検討したが、抗 NETs 抗体陽性群と陰性群の間に NETs 誘導能、NETs 分解能および DNaseI 活性について有意差は無かった。しかし、NETs 分解能に関しては、患者血漿に DNase I 添加を添加するといった操作を行ったところ、抗 NETs 抗体陰性血漿では NETs 分解能が有意に増加したのに対し、陽性血漿では NETs 分解能が増加しないものがあった。また、血漿中の IgG を徐々するといった操作を行った後、抗 NETs 抗体陰性血漿の NETs 分解能は増加しなかったが、陽性血漿中 2 例で NETs 分解能が顕著に増加した。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。その対応抗原を ANCA panel kit で検索したが, Azurocidin, BPI, Cathepsin G, Elastase, Lactoferrin のいずれでもなかった。

【考察】第一章では、ヒドララジン誘発 MPO-ANCA 関連血管炎の症例において、血管炎の再燃時の血漿中に抗 NETs 抗体を間接蛍光抗体法で検出した。本症例の抗 NETs 抗体は、NETs を形成してない好中球には反応せず、MPO-ANCA やその他の ANCA とは異なる自己抗体と考えられた。また、機能的には NETs 誘導能を有していた。第二章では、MPO-ANCA 関連血管炎患者 11 例中 6 例に抗 NETs 抗体を認めた。抗 NETs 抗体陽性 6 例中の 2 症例では、血漿中の IgG を除去することによって血漿の NETs 分解能が顕著に増加した。抗 NETs 抗体の存在に関しては全身性エリテマトーデス systemic lupus erythematosus (SLE)患者で検討された報告があり、SLE 患者血漿のうち、NETs 分解能が低い群は、患者血漿中の抗体成分を除去すると NETs 分解能が上昇する、すなわち抗体の作用により NETs の分解障害が生じていた。さらに NETs 蛋白を固相化した ELISA において NETs 分解能が低い群の血漿中の抗 NETs 抗体量を測定したところ、NETs 分解能が高い群と比較し有意に抗 NETs 抗体量が多かった。この報告により、NETs 分解障害を有する SLE 患者の血清中の一群に抗 NETs 抗体が存在し、この抗 NETs 抗体が DNase I による NETs 分解を阻害している可能性が示された。MPO-ANCA 患者において抗 NETs 抗体の存在を明確に示した報告はなく、本研究により、ANCA 関連血管炎患者の一部で抗 NETs 抗体が産生されている事、かつ SLE における上記報告と同様に抗 NETs 抗体が DNase I の働きを阻害し、NETs の分解障害を惹起している事を示した。さらに、抗 NETs 抗体は、血漿中の MPO-ANCA を MPO で吸収しても間接蛍光抗体法における 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も反応したことから、MPO-ANCA 以外の ANCA と考えられた。その対応抗原を ANCA パネルキットで検索したが、同キットで検出可能な ANCA 抗原のいずれでもなかった。これら結果により、一部の ANCA 関連患者の血漿中に存在する DNase I 活性阻害を有する抗 NETs 抗体は、既知の ANCA 抗原以外の好中球蛋白を認識していると考えられた。NETs に含まれる蛋白成分は、DNA の他に 30 種類以上が同定されており、それら蛋白は NETs 形成時に細胞外に暴露され自己抗原となりうる。 ANCA 関連血管炎においては MPO、PR3 以外のエラスターゼ、lysosomal membrane protein-2 (LAMP-2)、bactericidal/permeability increasing protein (BPI)、ラクトフェリンな

どを抗原としたANCA関連血管炎の発症が報告されている。MPO-ANCA以外のANCA関連血管炎とNETsの異常との関連は不明な点が多いが、MPO-ANCA以外のANCAにおいてもNETs形成・分解に対し影響を与える可能性があり、今回注目した抗NETs抗体もNETs内の蛋白を対応抗原とし、DNaseI活性を阻害する機序が考えられた。

【結論】ANCA関連血管炎に対する寛解導入治療として副腎皮質ステロイドにエンドキサンやリツキシマブといった免疫抑制薬、分子標的薬を組み合わせた治療により寛解導入率は向上してきたが、免疫抑制に伴う治療関連感染症死の割合がいまだに多く問題となっている。近年明らかとなったANCA関連血管炎とNETsの病態の関連性を明らかにすることで、免疫抑制治療の他にNETsの制御を目的とした治療がANCAの産生を抑制し、さらにはANCA-NETs悪循環を断ち切る有用な手段となり得る。本研究により、ANCA関連血管炎患者の一部で抗NETs抗体が産生されていることが明らかとなった。しかも、症例により異なる性質の抗NETs抗体が産生されていた。抗NETs抗体のうち、NETs誘導活性を持つものやDNase Ⅰの阻害活性を持つものは、ANCAと協調してNETs-ANCA悪循環を促進させ、ANCA関連血管炎の病態形成に関与する可能性がある。今回行った抗NETs抗体の機能解析及び対応抗原同定を目指した研究は、ANCA-NETs悪循環の病態の理解とNETsの制御を目的として治療開発を目指す点で重要であり、今後も大きな意義を持つと考えられる。