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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13020
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74900
Type	doctoral thesis
File Information	Fumihiko_Hattanda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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

学　位　論　文

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

目　次

発表論文目録および学会発表目録　8 頁

1. 緒言　9 頁

2. 略語表　15 頁

3. 第一章　ANCA 関連血管炎の再燃時に認めた抗 NETs 抗体　16 頁

3.1　背景　17 頁

3.2　症例提示　18 頁

3.3　実験方法　20 頁

3.3.1　患者血漿の採取　20 頁

3.3.2　患者血漿中の IgG の抽出　20 頁

3.3.3　健常者好中球の分離　21 頁

3.3.4　NETs を標的とした間接蛍光抗体染色　21 頁

3.3.5　患者 IgG の NETs 誘導率の測定　22 頁

3.3.6　患者血漿の NETs 分解率の測定　22 頁

3.3.7　患者血漿の DNaseI 活性の測定　23 頁

3.3.8　統計解析　23 頁

3.4　実験結果　24 頁

3.4.1　患者血漿中の抗 NETs 抗体の同定　24 頁

3.4.2　患者 IgG の NETs 誘導率の測定　26 頁

3.4.3　患者血漿の NETs 分解率の測定　28 頁

3.4.4　患者血漿の DNaseI 活性の測定　30 頁

3.5　考察　32 頁

3.6　小括　33 頁

4. 第二章　ANCA 関連血管炎患者における抗 NETs 抗体の存在と病的意義　34 頁

4.1　背景　35 頁

4.2　実験方法　36 頁

4.2.1　血漿採取　36 頁

4.2.2　血漿中の IgG の抽出　36 頁

4.2.3　健常者好中球の分離　37 頁

4.2.4　NETs を標的とした間接蛍光抗体染色　37 頁

4.2.5　血漿抽出 IgG の NETs 誘導率の測定　38 頁

4.2.6　血漿の NETs 分解率の測定　38 頁

4.2.7　血漿の DNaseI　活性の測定　39 頁

4.2.8　患者血漿 IgG 溶液の MPO-ANCA 吸収実験　39 頁

4.2.9　ELISA による患者血漿中の ANCA の検索　40 頁

4.2.10　統計解析　40 頁

4.3　実験結果　41 頁

4.3.1　血漿中の抗 NETs 抗体の同定　41 頁

4.3.2　抗 NETs 抗体の有無と臨床パラメータの関連　43 頁

4.3.3　血漿抽出 IgG の NETs 誘導率の解析　45 頁

4.3.4　血漿の NETs 分解率の解析　47 頁

4.3.5　血漿の DNaseI 活性の解析　49 頁

4.3.6　小括　51 頁

4.3.7　抗 NETs 抗体が NETs 分解能に及ぼす影響　52 頁

4.3.8　抗 NETs 抗体の対応抗原の検索　56 頁

4.3.8.1　血漿抽出 IgG の MPO-ANCA 吸収　56 頁

4.3.8.2　ELISA キットを用いた抗 NETs 抗体の対応抗原の検索　58 頁

4.4　考察　60 頁

5.　総括　62 頁

6.　謝辞　63 頁

7.　引用文献　64 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文として投稿中である。

1. Fumihiko Hattanda, Kanako Watanabe, Yoshihiro Kusunoki, Haruki Shida, Sakiko Masuda, Daigo Nakazawa, Saori Nishio, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, and Akihiro Ishizu
   "The presence and possible pathogenesis of anti-neutrophil extracellular trap antibody in patients with microscopic polyangiitis"

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. 八反田文彦，楠 由宏，志田玄貴，中沢大悟，西尾妙織，益田紗季子，外丸詩野，渥美達也，石津明洋
   "ANCA 関連血管炎(AAV)における抗 NETs 抗体の存在と意義"
   第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会，2017 年 4 月 20 日～22 日，福岡.

1． 緒言

好中球は末梢血白血球の 50～70%を占める末梢血中の最多白血球である。好中球は細胞質顆粒内にミエロペルオキシダーゼ myeloperoxidase (MPO)、エラスターゼ、カテプシン G、プロテイナーゼ proteinase 3 (PR3)などの蛋白分解酵素やラクトフェリン、ディフェンシン、LL-37 などの抗菌蛋白を有しており、刺激に応じて病原体の貪食、脱顆粒、活性酸素種 reactive oxygen species (ROS)や炎症性サイトカインの産生を介して病原体の除去を行う[1]。近年、好中球の重要な生体防御機能として好中球細胞外トラップ neutrophil extracellular traps (NETs)が注目されている[2]。1996 年に Takei らは、phorbol myristate acetate (PMA)で好中球を刺激すると好中球内の核の融合とクロマチンの脱凝集が起こり、その後核膜が破壊され、さらに ROS 産生に依存して細胞膜が破裂する現象を発見した[3]。2004 年に Brinkmann らは、好中球が細胞外に放出する細胞内蛋白を混合した DNA 線維を NETs、NETs 形成を伴うアポトーシスやネクローシスとは異なる好中球細胞死を NETosis と定義した[2]。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。

現在 NETosis には suicidal NETosis、vital NETosis と呼ばれる 2 種類の NETosis があると考えられている[4] (**Figure 1**)。Suicidal NETosis は、NETs の形成と同時に好中球細胞膜の破裂を伴う古典的な NETosis である。好中球を PMA で刺激すると、プロテインキナーゼ protein kinase C (PKC)/Raf/Ras/MEK/ERK 経路の活性化が誘導され、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する[5]。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって NADPH oxidase による ROS の産生が亢進し、蛋白のシトルリン化酵素である peptidylarginie deminase 4 (PAD4)が核内に移行する。 核内のヒストン蛋白は強い塩基性を有しており、酸性である DNA と高い親和性で結合しクロマチンの高次構造を維持しているが、PAD4 がカルシウムイオン存在下でヒストン蛋白 H3 のアルギニンをシトルリンに変換すると、クロマチンの脱凝集が生じる[6]。さらに、ROS の産生亢進は細胞質顆粒内の MPO やエラスターゼを核内に移行させ、ヒストン蛋白を切断することでクロマチン脱凝集を促進させる[7]。その結果、核の分葉構造の消失と核膜破裂が起こ

り、細胞内に放出されたクロマチンと細胞内蛋白が混合され、最終的には細胞膜も破裂してDNA線維が細胞外に放出され、NETsが形成される[8]。

これに対しvital NETosisは、好中球が核や細胞質形態を保ったままNETsを放出するというものであり、2010年にPilsczekらによって初めて報告された[9]。Vital NETosisの過程では、まず好中球がToll様受容体toll-like receptor (TLR)や補体受容体などからの刺激を受け、さらに血小板上のグリコプロテインIbと好中球表面のβ2インテグリン (CD18)の結合が生じると核内でDNA成分を含んだ小胞が形成され、核外に放出されて細胞膜側へ移行する[10]。その後DNA成分を含んだ小胞が細胞外に放出されるのと同時に細胞内蛋白も放出され、NETsを形成する。Suicidal NETosisと大きく異なる点として、vital NETosisはROSに非依存的であり、NETs形成後も好中球形態は保たれ、病原体の貪食が可能であり、かつ好中球の寿命も短縮しない[4]。なお、vital NETosisの亜型としてROS依存性に核DNAの代わりにミトコンドリアDNAが放出されるタイプのNETosisも報告されている[11]。

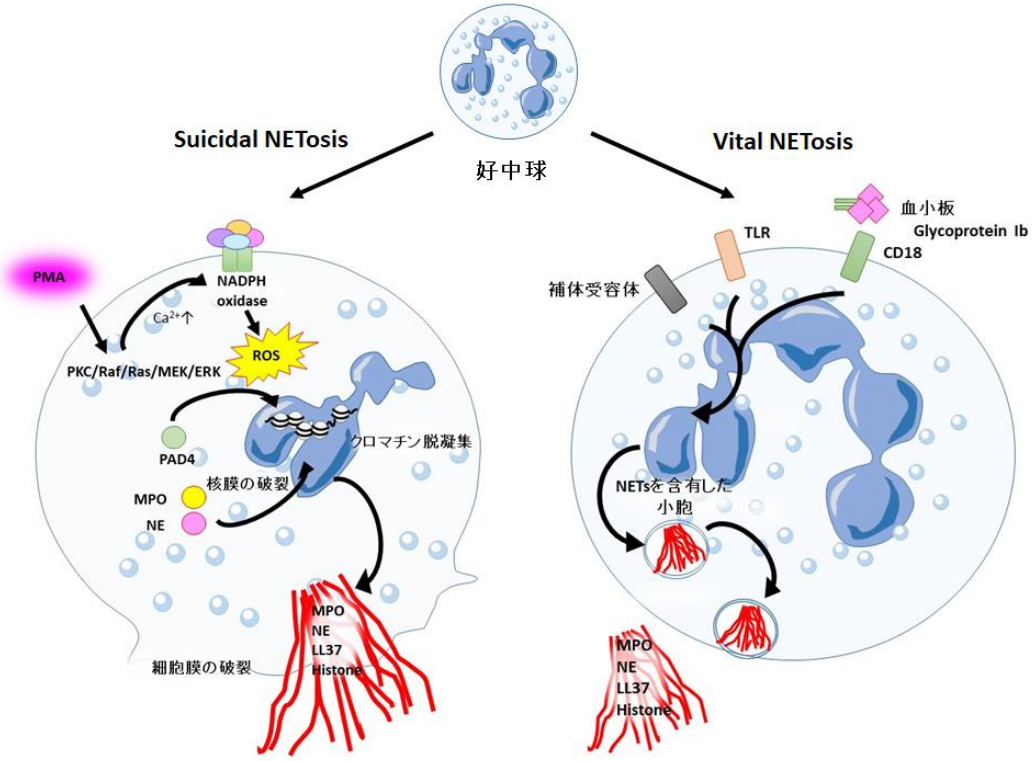


Figure 1. Suicidal NETosis と vital NETosis

Suicidal NETosis は NETs の形成と同時に好中球細胞膜の破裂を伴う古典的な NETosis である。好中球を PMA で刺激すると、PKC/Raf/Ras/MEK/ERK 経路の活性化が誘導され、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって NADPH oxidase による ROS の産生が亢進し、PAD4 の核内移行が起こる。PAD4 がカルシウムイオン存在下でヒストン蛋白 H3 のアルギニンをシトルリンに変換すると、クロマチンの脱凝集が生じる。さらに、ROS の産生亢進は細胞質顆粒内の MPO やエラスターゼを核内に移行させ、ヒストン蛋白を切断することでクロマチン脱凝集を促進させる。最終的には細胞膜も破裂して、細胞内蛋白を混合した DNA 線維が細胞外に放出されることで NETs が形成される。

これに対し vital NETosis は、好中球が TLR や補体受容体などからの刺激を受け、さらに血小板上のグリコプロテイン Ib と好中球表面の β2 インテグリン (CD18)の結合が生じると、核内で DNA 成分を含んだ小胞が形成され、核外に放出されて細胞膜側

へ移行する。その後、DNA 成分を含んだ小胞が細胞外に放出されるのと同時に細胞内蛋白も放出され、NETs を形成する。

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、過剰な NETs の産生は組織障害を生じうるため、NETs の形成と分解は生体内で厳密に制御されている。生体内の主要な NETs 分解因子は血清中の DNase Ⅰ であり、生体内での役割を終えた NETs は血清中の DNase Ⅰにより速やかに分解されるが、DNase Ⅰの活性低下など NETs の分解障害が生じた場合、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[12]。

近年、NETosis の制御異常と抗好中球細胞質抗体 anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)関連血管炎の関連が注目されている。ANCA 関連血管炎は血清中に ANCA の出現を伴う全身性の小型血管炎である。ANCA 関連血管炎には原発性と続発性があり、原発性には顕微鏡的多発血管炎 microscopic polyangiitis (MPA)、多発血管炎性肉芽腫症 granulomatosis with polyangiitis (GPA)、好酸球性多発血管炎性肉腫症 eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA)の 3 疾患が、続発性には抗甲状腺薬のプロピルチオウラシル propylthiouracil (PTU)や降圧薬のヒドララジン、TNF 阻害薬などの薬剤により誘発される薬剤関連 ANCA 関連血管炎がある[13]。ANCA が血管炎を引き起こす機序としては、感染など何らかの誘因により産生された TNF-α をはじめとした炎症性サイトカインが好中球に作用して、細胞膜上に ANCA の対応抗原である MPO や PR3 を表出させ、これらに ANCA が結合すると同時に ANCA の Fc 部分が好中球表面の Fcγ受容体にも結合して好中球の過剰な活性化が誘導され、細胞外への ROS や蛋白分解酵素の放出および炎症性サイトカインの異常産生を起こし血管内皮細胞を障害するとする ANCA-サイトカインシークエンス説が提唱されてきた[14]。

ANCA の病原性についての解明が進む一方で、ANCA の産生メカニズムに関しては不明であった。2009 年に Kessenbrock ら[15]は in vitro の実験系において TNF-α でプライミングした好中球に ANCA 関連血管炎患者の血清より抽出した IgG を添加すると NETs が形成されること、ANCA 関連血管炎患者の腎糸球体の半月体部位に NETs が形成されていること、さらに疾患活動期の患者血清中では寛解期の患者や健常者と比較して生体内の NETs 形成量が多いことを報告した。

Nakazawa ら[16]は、PTU を内服している患者の約 30%で MPO-ANCA が産生されること[17]に着目し、健常者好中球に NETs 誘導剤である PMA と同時に PTU を添加すると DNase Ⅰ抵抗性の異常な NETs が形成されることを発見した。さらに、WKY ラットに PTU を内服させ PMA を腹腔内投与すると、腹膜組織に DNase Ⅰ抵抗性の異常な NETs が蓄積し、血清中に MPO-ANCA が産生され、かつ肺出血および pauci-immune 型の細胞増殖性腎炎が発症することも報告した。これらの結果から、何らかの原因により生体内に過剰な

NETs が形成されたり NETs の分解障害が生じたりすると NETs に含まれる MPO に対する免疫寛容が破綻し、MPO-ANCA が産生される可能性が示された。加えて、MPO-ANCA 関連血管炎患者は健常者と比較して血清の NETs 分解活性および DNase Ⅰ活性が有意に低いことも報告されている[18]。MPO-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 の形成異常や産生亢進が生じた場合、NETs が生体内に長時間残存し、MPO などの細胞内蛋白が細胞外に暴露され続ける。その過程で MPO に何らかの修飾が加わることにより免疫系に非自己と認識され MPO-ANCA の産生が誘導される可能性が考えられる。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)が生じると考えられる[19]。

MPO-ANCA 関連血管炎患者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、MPO-ANCA 値は Birmingham Vascular Activity Scores (BVAS)、Disease Extent Index (DEI)などの疾患活動性スコアと正の相関がある一方で、治療前の MPO-ANCA 値と治療経過は相関せず、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[20]。このことから，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も考えられる。

我々は、ヒドララジン誘発 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こと、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。第一章で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。続いて第二章では、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。

これらの解析を通して、MPO-ANCA 関連血管炎患者の中には抗 NETs 抗体を有する症例が存在し、その一部では抗 NETs 抗体が NETs の産生誘導や分解障害を惹起していることが明らかとなった(**Figure 2**)。

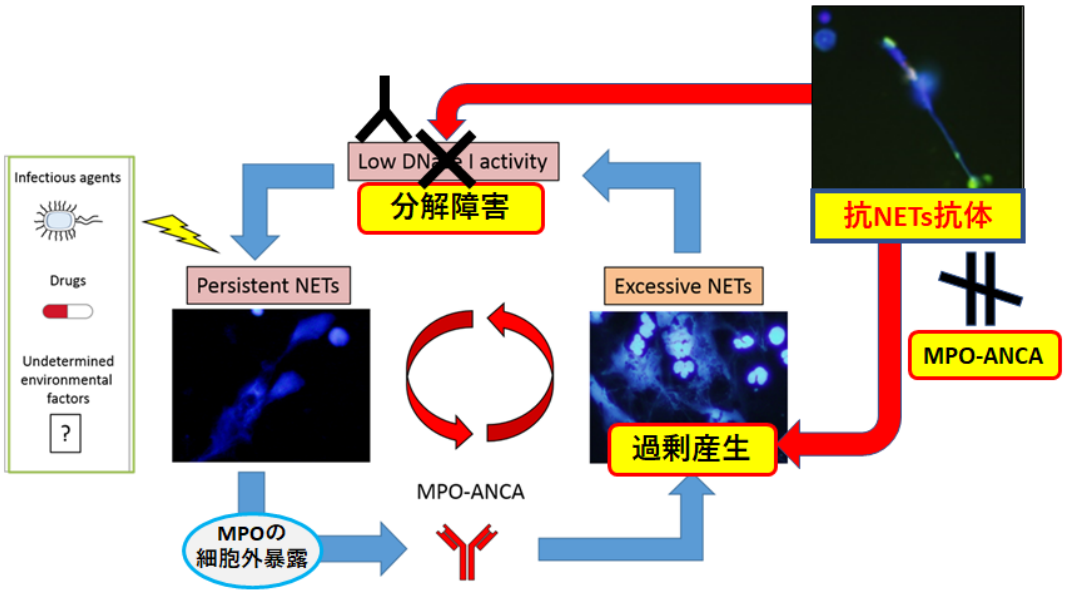


Figure 2. NETs-ANCA 悪循環における抗 NETs 抗体の関与

MPO-ANCA 関連血管炎患者において、NETs の分解障害を背景として、薬剤、感染、シリカ暴露など何らかの環境要因によって NETs の形成異常や産生亢進が生じると、NETs が生体内に長時間残存し、MPO が細胞外に暴露され MPO-ANCA の産生が誘導される。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)が生じると考えられる。一方で治療前の MPO-ANCA 値と治療経過は相関せず、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、MPO-ANCA 関連血管炎の病態形成において MPO-ANCA 以外の要因が NETs-ANCA 悪循環を増幅している可能性も考えられる。本研究では、MPO-ANCA 関連血管炎患者の中に抗 NETs 抗体を有する症例が存在し、その一部では抗 NETs 抗体が NETs の産生誘導や分解障害を惹起していることを示す。

2. 略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

ANCA	aniti-neutrophil cytoplasmic antibody
BVAS	Birmingham Vascular Activity Score (BVAS)
Cit-H3	citrullinated histone H3
DAPI	4’,6-diamidino-2-phenylindole
DEI	Disease Extent Index
DNase	deoxyribonuclease
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGPA	eosinophillic granulomatosis with polyangiitis
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
GPA	granulomatosis with polyangiitis
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobrin G
MNase	monococcal nuclease
MPA	microscopic polyangiitis
MPO	myeloperoxidase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NETs	neutrophil extracellular traps
PAD4	peptidylarginine deminase 4
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PKC	proteinase kinase C
PMA	phorbol myristate acetate
pNPP	p-nitrophenyl phosphate
PR3	proteinase 3
PTU	propylthiouracil
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SLE	systemic lupus erythematosus
TLR	toll-like receptor
TMB	tetramethylbenzidine

3. 第一章

ANCA 関連血管炎の再燃時に認めた抗 NETs 抗体

(Anti-Neutrophil Extracellular Trap Antibody in a Patient with Relapse of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis)

3.1　背景

我々は、降圧薬であるヒドララジンにより誘発された ANCA 関連血管炎の症例を経験した。この症例では、ヒドララジンを休薬したのみで臨床症状が改善したものの、MPO-ANCA は完全には消失せず、16 か月後に MPO-ANCA 値の再上昇と血管炎症状の再燃を認めた。休薬後にヒドララジンは再開しておらず、初発時から再燃時にかけて NETs-ANCA 悪循環が働いた可能性が考えられた。我々は、この NETs-ANCA 悪循環の増幅に抗 NETs 抗体が関与したのではないかと仮説を立てた。そこで、本症例の初発時の血漿①、再燃時の血漿②、治療開始 3 か月後の血漿③、寛解後の血漿④について、抗 NETs 抗体の有無を検索し、それとともに各血漿の NETs の誘導活性や分解活性を調べた。

3.2　症例提示

70 歳代女性。10 年前より高血圧の治療のためヒドララジンを内服していた。前医で受けた尿検査で血尿と蛋白尿を指摘された。その時点で腎機能障害は認めなかった(血清 Cr 0.8mg/dl)。1 か月後の血液検査で腎機能障害を指摘され（血清 Cr 1.6mg/dl）精査加療目的で入院となった。MPO-ANCA 値 107IU/ml と高値であり、胸部画像検査で間質性肺炎を認めた。経皮的腎生検で pauci-immune 型半月体形成性糸球体腎炎の所見であり、MPO-ANCA 関連血管炎と診断した。ヒドララジンの休薬により、血管炎に伴う症状は徐々に改善し、休薬から 10 か月後に血清 Cr 1.1mg/dl、MPO-ANCA 値 13IU/ml まで低下し、間質性肺炎も増悪なく経過した。経過からヒドララジン誘発 ANCA 関連血管炎と判断し、免疫抑制薬は使用せず、ヒドララジンの休薬のみで経過を観察した。しかし、ヒドララジンの休薬から 16 ヶ月後に 38℃台の発熱が出現し、血清 Cr 2.0mg/dl と再び腎機能が悪化した。MPO-ANCA 値 195IU/ml と上昇し、再度経皮的腎生検を施行したところ、pauci-immune 型半月体形成性糸球体腎炎の所見であった。MPO-ANCA 関連血管炎の再燃と診断し、プレドニゾロン 30mg/日(0.5 mg/kg/日)で治療を開始した。治療開始後から速やかに腎機能は改善し、MPO-ANCA 値も 2.4IU/ml まで低下して、寛解に至った(**Figure 3**)。

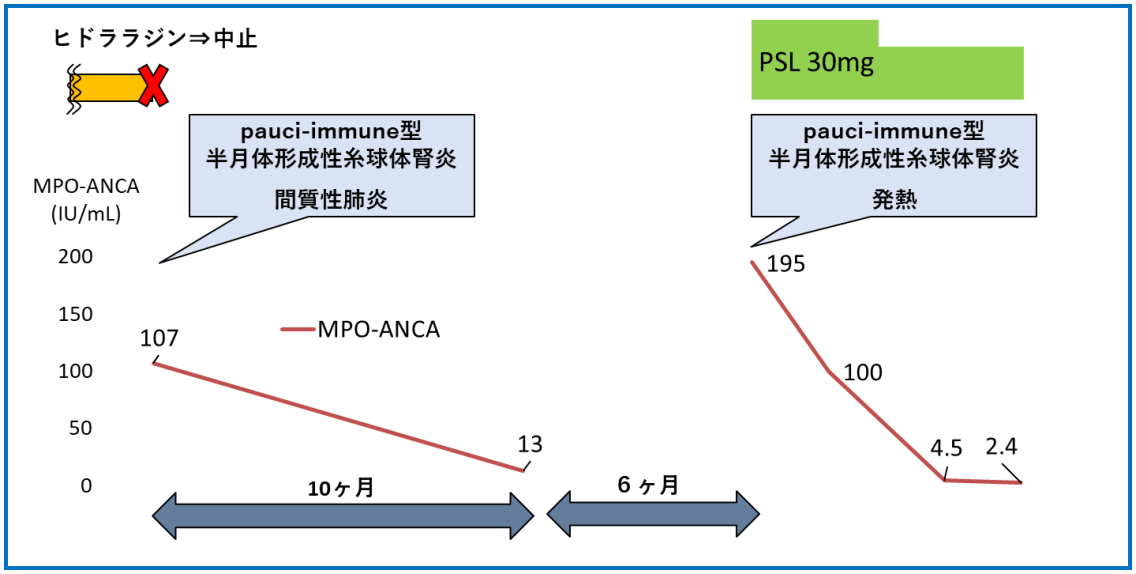


Figure 3. 提示症例の臨床経過

70 歳代女性。10 年前より高血圧の治療のためヒドララジンを内服していた。血尿、蛋白尿、急速な腎機能障害が出現し、MPO-ANCA 値 107IU/ml、pauci-immune 型半月体形成性糸球体腎炎、間質性肺炎を認め、MPO-ANCA 関連血管炎と診断した。ヒドララジンの休薬により 10 か月後には血清 Cr 1.1mg/dl、MPO-ANCA 値 13IU/ml まで低下した。ヒドララジンの休薬から 16 ヶ月後に 38℃台の発熱と腎機能障害(血清 Cr 2.0mg/dl)が出現し、腎再生検により MPO-ANCA 関連血管炎の再燃と診断した。プレドニゾロン 30mg/日(0.5 mg/kg/日)で治療を開始した。治療開始後に腎機能は速やかに改善し、最終的に MPO-ANCA 値 は 2.4IU/ml まで低下して、寛解に至った。

3.3 実験方法

3.3.1　患者血漿の採取

文書によるインフォームドコンセントを得た後、初発時（血漿①)、再燃時（血漿②)、治療開始後3か月時（血漿③)、寛解時（血漿④）に、ヘパリンコーティングした採血管に血液を採取した。採取した血液は20℃、1900×g、15分間遠心分離し、血漿を回収した。検体は使用時まで-80℃で凍結保存した。

3.3.2　患者血漿中のIgGの抽出

採取した患者血漿よりIgGを抽出するため、プロテインGカラム（GE Healthcare、Tokyo、Japan)を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。まず、結合バッファー（20 mM sodium phosphate、pH 7.0)、溶出バッファー（0.1 M glycine-HCl、pH 2.7)、中和バッファー（1 M Tris-HCl、pH 9.0）の3種類の試薬を作製した。次に、プロテインGカラムを室温、200×g、1分間遠心し、カラム内の液体を除去した。その後、結合バッファーをカラムに充填し、カラムを平衡化した。室温、200×g、1分間遠心してカラム内の液体を除去し、患者血漿をカラム内に充填、室温に4分間静置して血漿中のIgGをカラムに結合させた。その後、カラムを200×g、1分間遠心して液体成分を除去し、除去した液体成分をIgG除去後血漿として保存した。一方、カラムには溶出バッファーを添加し、カラムに結合したIgGを抽出し、別のエッペンチューブに回収した。回収したIgG溶液に中和バッファーを添加し、IgG抽出液を中和した。中和したIgG溶液およびIgG除去血漿は、使用時まで-80℃で凍結保存した。なお、回収したサンプル内にエンドトキシンの混入がないことをLimulus test kit (Wako Pure Chemical、Osaka、Japan)を用いて確認した。

3.3.3　健常者好中球の分離

健常者の末梢血をヘパリンコーティングした採血管に採取した。次に血球成分を分離するため、遠沈管の下層にpolymorphprep (Axis-Shield、Oslo、Norway)、上層に採取した血液を重層して、20℃、490×g、40分で遠心分離した。遠心分離後、血漿成分内に2層のbuffy coat（上層；単核球成分、下層；多核顆粒球成分）が形成されたことを確認し、下層のbuffy coatを回収した。PBSで数回洗浄したものを好中球として、以下の実験に使用した。

3.3.4　NETsを標的とした間接蛍光抗体染色

3.3.3の方法で採取した健常者好中球を5%FBS加RPMI-1640で1×10^5/mlに調整し、4ウェル組織培養用カルチャースライドに400μl/wellで播種した。37℃で15分間静置した後、PMA 20nMを添加し、37℃でさらに3時間反応させてNETsを誘導した。その後、室温で4%パラホルムアルデヒドparaformaldehyde (PFA)に15分間浸し、固定を行った。固定した細胞をPBSで洗浄した後、患者血漿より抽出したIgGを250μg/mlに調整し、一次抗体としてNETsに添加した。4℃で一晩反応させた後、PBSで洗浄し、遮光下で二次抗体を添加して室温に1時静置した。その後PBSで洗浄し、solution containing 4’,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories、Burlingame、CA)でDNA染色を行った。標本を蛍光顕微鏡BIOREVO BZ-9000 (Keyence Japan、Osaka、 Japan)にてBZ-Ⅱ観察アプリケーションver.1.40.(Keyence)を用いて観察した。

3.3.5　患者 IgG の NETs 誘導率の測定

3.3.3 の手順で健常者末梢血より好中球を分離、回収した。次に 5%FBS 加 RPMI-1640 で好中球を 1×10^{6}/ml に調整し、4 ウェル細胞培養用カルチャースライドに 400µl/well で播種した。その後、各ウェルに TNF-α を 5ng/ml の濃度で添加し、15 分間 37℃に静置した。患者血漿より抽出した IgG を 250µg/ml の濃度で添加し、37℃で 3 時間反応させた。上清を除去した後、4%PFA で細胞の固定を行った。固定した細胞を PBS で 3 回洗浄し、一次抗体として rabbit anti-citrullinated histone H3 (Cit-H3) antibody (Abcam、Tokyo、Japan) を 100 倍希釈して添加、室温で 60 分間静置した。再度 PBS で 3 回洗浄後、Alexa Fluor 594 標識 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen、Tokyo、Japan) を 500 倍希釈したものを添加して、室温遮光下で、1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後、DAPI を含む封入剤で封入し、DNA 染色を行った。蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 にて BZ-Ⅱ観察アプリケーション ver.1.40.を用いて標本を観察し、各ウェルにつき 6 個所ランダムに 200 倍視野で撮影し、画像内の Cit-H3 陽性細胞数と DAPI 陽性細胞数を Image J (無料ソフトウェア；imagej.nih.gov/ij) を用いて測定し、Cit-H3 陽性細胞率を計測した。

3.3.6　患者血漿の NETs 分解率の測定

3.3.3 の手順で健常者末梢血より好中球を分離・回収し、5%FBS 加 RPMI-1640 で好中球を 1×10^{6}/ml に調整した。4 ウェル細胞培養用カルチャースライドに 400µl/well で播種し、37℃で 15 分間静置した。PMA 100nM を各ウェルに添加し、再度 37℃で 3 時間反応させた。その後、上清を除去し、PBS で 10%に調整した患者血漿を各ウェルに添加して、37℃で 6 時間反応させた。2nM EDTA を添加して血漿中のヌクレアーゼ活性を停止した後、4%PFA で固定した。PBS にて洗浄後、DAPI で DNA 染色を行った。蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 にて BZ-Ⅱ観察アプリケーション ver.1.40.を用いて標本を観察し、各ウェルにつき 6 個所をランダムに 200 倍視野で撮影した。各画像内の DAPI 陽性となる残存した NETs 面積を Image J を用いて測定し、下記の式より NETs 分解率を算出した。

$$\text{NETs 分解率 (\%)} = [1-\{\text{NETs 面積(10\%血漿)} / \text{NETs 面積(PBS)}\}] \times 100$$

3.3.7　患者血漿の DNase Ⅰ 活性の測定

患者血漿中の DNase Ⅰ 活性を ELISA キット (Orgentec GmbH®、Mainz、Germany)を用いて測定した。ELISA プレートに DNase Ⅰに分解される特異的基質が固相化されており、各ウェルに標準サンプルおよび患者血漿を添加して、37℃で 1 時間静置した。その後、ウェル内のサンプルを除去、洗浄し、基質に対する HRP 標識抗体を添加させた後、tetramethylbenzidine (TMB)で発色させマイクロプレートリーダー (Benchmark Plus: BIO-RAD、Tokyo、Japan) を用いて主波長 450nm の条件で吸光度を測定した。標準サンプルの吸光度より標準曲線を作成し、各血漿サンプルの DNase Ⅰ活性を測定した。

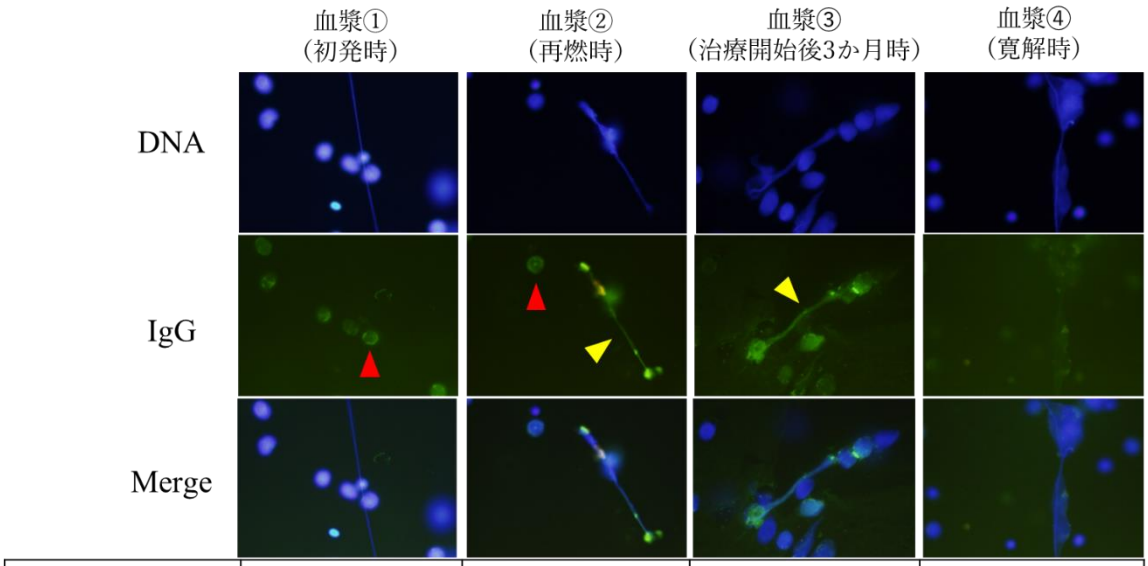
3.3.8　統計解析

統計解析方法は各結果の図の説明に記載した。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。統計解析は GraphPad Prism 7 (GraphPad Software、San Diego、CA) を用いて行った。

3.4　実験結果

3.4.1　患者血漿中の抗 NETs 抗体の同定

患者血漿①(初発時)、血漿②(再燃時)、血漿③(治療開始後 3 か月時)、血漿④(寛解時)について、NETs を標的とした間接蛍光抗体法を行い、血漿中の抗 NETs 抗体の有無を判定した。血漿①と②において、細胞形態を保つ好中球の細胞質に反応する IgG が検出され、ANCA 陽性と判定した(**Figure 4**、赤矢印)。これに対し、血漿③と④では同様の反応は認めず、ANCA 陰性であった。間接蛍光抗体法による ANCA 判定結果は、血漿の MPO-ANCA 値と一致していた。血漿②と③において NETs に反応する IgG が検出され、抗 NETs 抗体陽性と判定された (**Figure 4**、黄矢印)。血漿①と④には NETs への反応は認めず、抗 NETs 抗体は陰性と判定した。



ANCA	+	+	−	−
抗NETs抗体	−	+	+	−
MPO-ANCA(IU/ml)	107	195	4.5	2.4

Figure 4.　患者血漿中の ANCA と抗 NETs 抗体

血漿①（初発時)、血漿②（再燃時)、血漿③（治療開始後 3 か月時)、血漿④（寛解時）について、NETs を標的とした間接蛍光抗体法を行った。血漿①と②では ANCA 陽性であった（赤矢印)。血漿②と③において NETs に反応する IgG が検出され、抗 NETs 抗体陽性と判定した(黄色矢印)。

3.4.2　患者 IgG の NETs 誘導率の測定

次に、各血漿（①初発時、②再燃時、③治療開始後 3 か月時、④寛解時）から抽出した IgG について、NET 誘導率を測定した。NETs 誘導率は、①②③で④に比べて有意に高かった(**Figure 5**)。

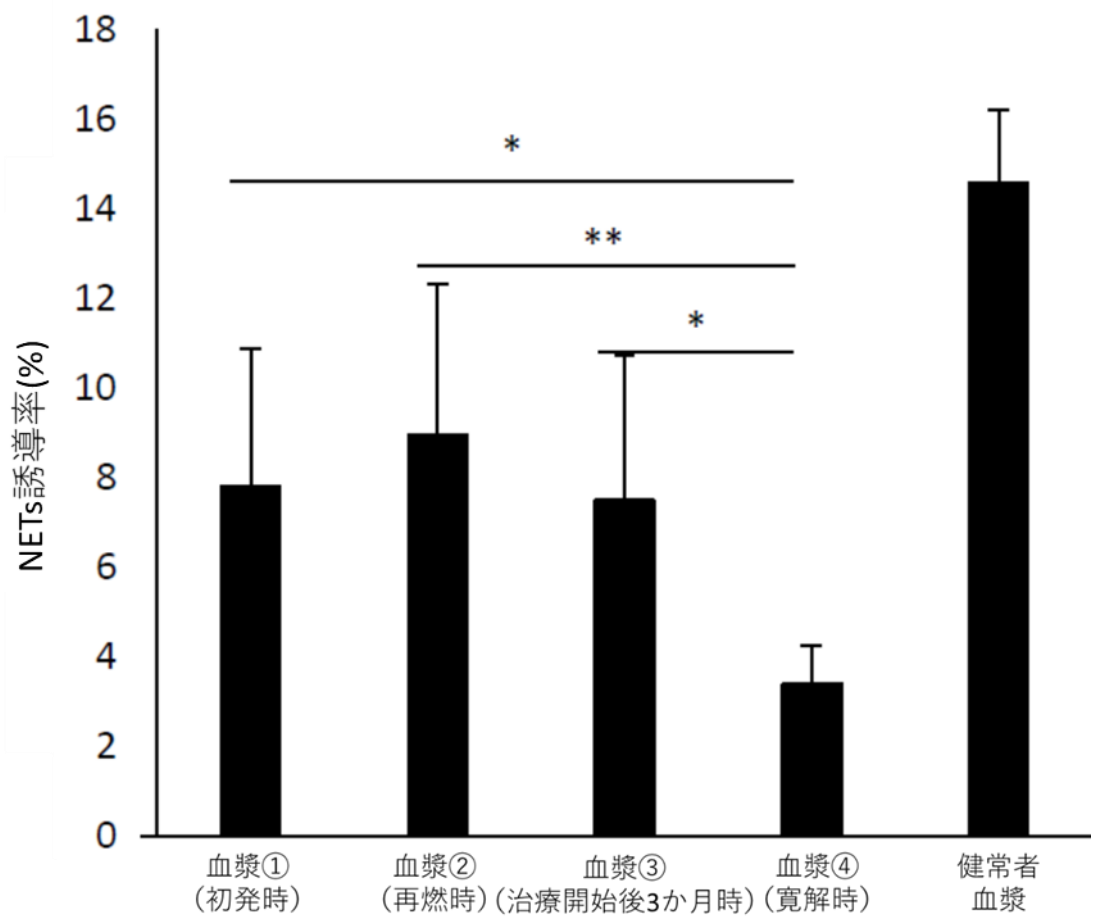


Figure 5. 患者 IgG の NETs 誘導率

初発時（①）、再燃時（②）、治療開始後 3 か月時（③）の NETs 誘導率は、寛解時（④）に比べて有意に高かった。寛解時（④）の NETs 誘導率は健常者と同等であった。統計解析：One-way ANOVA。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。

3.4.3　患者血漿の NETs 分解率の測定

次に、血漿①（初発時）、血漿②（再燃時）、血漿③（治療開始後 3 か月時）、血漿④（寛解時）について、NETs 分解率を測定した。その結果、①～④全ての血漿の NETs 分解率は健常者に比べて有意に低かった(**Figure 6**)。

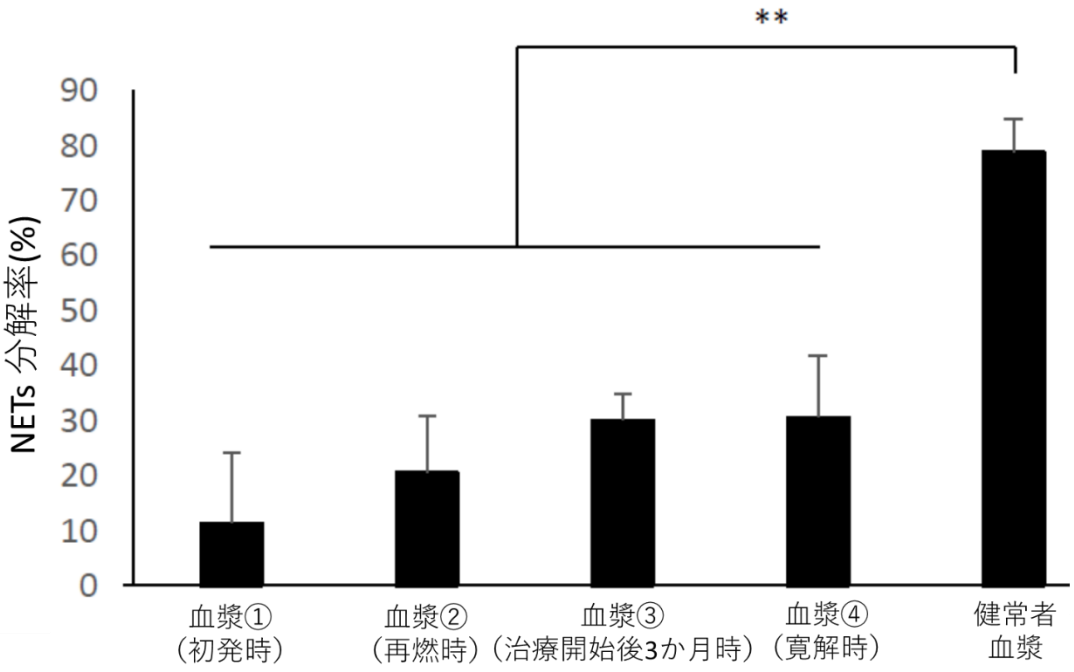


Figure 6. 患者血漿の NETs 分解率

全ての血漿（①～④）の NETs 分解は健常者に比べて有意に低かった。統計解析：One-way ANOVA。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。

3.4.4　患者血漿の DNaseI 活性の測定

次に、血漿①（初発時）、血漿②（再燃時）、血漿③（治療開始後 3 か月時）、血漿④（寛解時）について、DNaseI 活性測定した。その結果、各血漿の DNaseI 活性は、血漿①：21.7%、血漿②：28.3%、血漿③：22.8%、血漿④：33.5%であり、健常者：52.6%±12.1%（平均値±標準偏差）と比較して低値であった（**Figure 7**）。

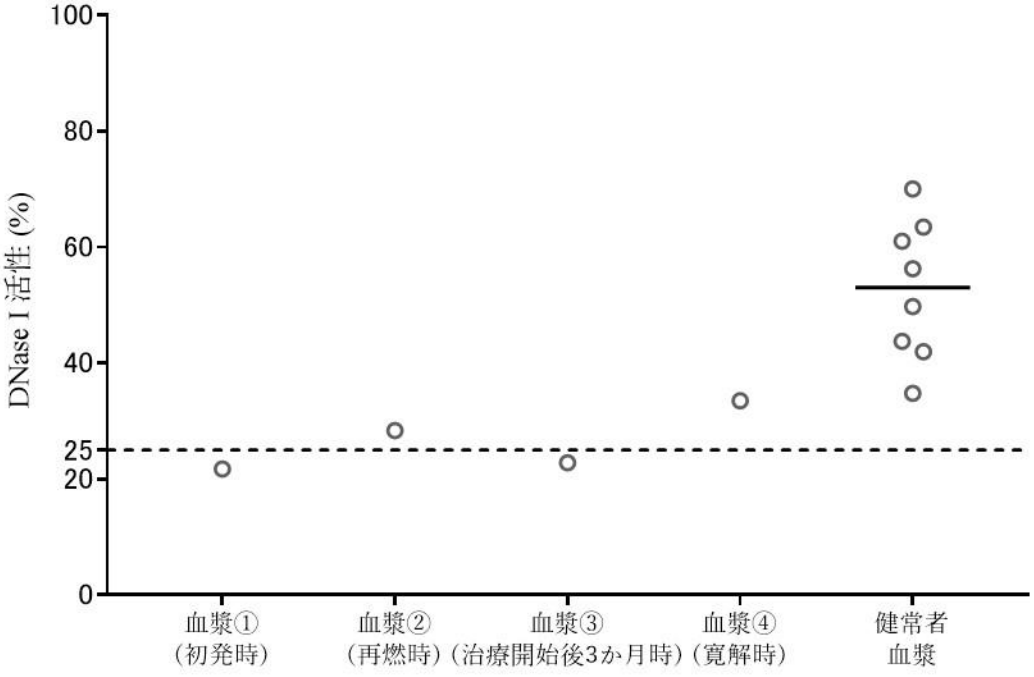


Figure 7. 患者血漿の DNase Ⅰ活性

各血漿の DNaseI 活性は、血漿①：21.7%、血漿②：28.3%、血漿③：22.8%、血漿④：33.5%であり、健常者：52.6%±12.1%（平均値±標準偏差）と比較して低値であった。

3.5　考察

ヒドララジン誘発 ANCA 関連血管炎は薬剤関連 ANCA 関連血管炎に該当し、2009 年の総説では 68 例が報告されている。それによると、ヒドララジンの平均投与期間は 4.7 年、平均投与量は 142 mg/日であった[21]。自己抗体に関しては、MPO-ANCA の他、抗 dsDNA 抗体、抗ヒストン抗体などの抗核抗体を高率に保有し、低補体血症も合併することが特徴である。ヒドララジンによる血管炎発症の機序については明らかではないが、ヒドララジンが好中球細胞内に蓄積し、MPO と結合することで細胞毒性を生じ、好中球細胞死を誘導する。その結果、細胞外に暴露された細胞内蛋白が自己抗原として免疫系に認識され、MPO-ANCA をはじめとした種々の自己抗体が産生されると想定されている[22,23]。近年、PTU による薬剤関連 ANCA 関連血管炎においては、PTU の作用で DNase I に分解されにくい NETs が形成され、NETs の蓄積により MPO-ANCA が産生される機序が明らかとなっている[16]。ヒドララジン誘発 ANCA 関連血管炎においても、好中球細胞死の一形態である NETs が関与している可能性が考えられる。

提示症例では、再燃時（血漿②）と治療開始後 3 か月時（血漿③）において、抗 NETs 抗体が間接蛍光抗体法で陽性であった。本症例の血漿の NETs 分解能は採血の時期、すなわち病勢によらず低値であり、血漿中の DNase Ⅰ活性も同様に低かった。その一方で、初発時、再燃時、治療開始後 3 か月時の血漿（①②③）では NETs 誘導能が高かった。このうち初発時と再燃時（血漿①②）では MPO-ANCA が陽性であり、MPO-ANCA の NETs 誘導能が結果に反映されていると考えられるが、治療開始後 3 か月後の血漿③は ANCA 陰性抗 NETs 抗体陽性であり、抗 NETs 抗体にも NETs 誘導能があることが示唆された。

本症例では、ヒドララジン休薬により血管炎の活動性は一旦改善したものの、MPO-ANCA が完全に陰性化しないまま経過した。遷延した MPO-ANCA が NETs の形成を誘導し、やがて抗 NETs 抗体が産生され、その抗 NETs 抗体にも NETs 誘導能があることにより、ANCA-NETs 悪循環が促進され、MPO-ANCA 関連血管炎の再燃につながった可能性が考えられる。

3.6　小括

ヒドララジン誘発 ANCA 関連血管炎の一例を提示した。ヒドララジンの休薬により血管炎の活動性は一旦改善したものの、16 か月に MPO-ANCA 関連血管炎が再燃した。再燃時には NETs 誘導能を持つ抗 NETs 抗体も産生されており、この抗 NETs 抗体が NETs-ANCA 悪循環を促進させ、MPO-ANCA 関連血管炎の再燃に寄与した可能性が考えられた。

4. 第二章

ANCA 関連血管炎患者における抗 NETs 抗体の存在と病的意義

(The Presence and Pathogenesis of Anti-Neutrophil Extracellular Trap Antibody in Patients with Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis)

4.1　背景

第一章では、MPO-ANCA 関連血管炎患者の中に抗 NETs 抗体を有する症例があり、その抗 NETs 抗体が NETs-ANCA 悪循環を促進する場合があることを示した。これを踏まえ、我々は MPO-ANCA 関連血管炎患者における抗 NETs 抗体の保有頻度を調査し、さらに抗 NETs 抗体陽性患者と陰性患者間での血管炎の臨床症状の違いや、抗 NETs 抗体の NETs 形成ならびに分解に対する影響を評価した。

4.2　実験方法

4.2.1　血漿採取

対象は2008年から2014年の間に北海道大学病院内科Ⅱで診断、治療したMPO-ANCA関連血管炎患者11例と、健常ボランティア4例とした。対象者より文書によるインフォームドコンセントを得た後に、ヘパリンコーティングした採血管に血液を採取した。採取した血液は20℃、1900×g、15分間遠心分離し血漿を回収した。検体は使用時まで-80℃で凍結保存した。

4.2.2　血漿中IgGの抽出

採取した血漿よりIgGを抽出するため、プロテインGカラム(GE Healthcare、Tokyo、Japan)を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。まず、結合バッファー(20 mM sodium phosphate、pH 7.0)、溶出バッファー(0.1 M glycine-HCl、pH 2.7)、中和バッファー（1 M Tris-HCl、pH 9.0）の3種類の試薬を作製した。次に、プロテインGカラムを室温、200×g、1分間遠心し、カラム内の液体を除去した。その後、結合バッファーをカラムに充填し、カラムを平衡化した。室温、200×g、1分間遠心してカラム内の液体を除去し、血漿をカラム内に充填、室温に4分間静置して血漿中のIgGをカラムに結合させた。その後、カラムを200×g、1分間遠心して液体成分を除去し、除去した液体成分をIgG除去後血漿として保存した。一方、カラムには溶出バッファーを添加し、カラムに結合したIgGを抽出し、別のエッペンチューブに回収した。回収したIgG溶液に中和バッファーを添加し、IgG抽出液を中和した。中和したIgG溶液およびIgG除去血漿は、使用時まで-80℃で凍結保存した。なお、回収したサンプル内にエンドトキシンの混入がないことをLimulus test kit (Wako Pure Chemical、Osaka、Japan)を用いて確認した。

4.2.3　健常者好中球の分離

健常者の末梢血をヘパリンコーティングした採血管に採取した。次に血球成分を分離するため、遠沈管の下層にpolymorphprep (Axis-Shield、Oslo、Norway)、上層に採取した血液を重層して、20℃、490×g、40分で遠心分離した。遠心分離後、血漿成分内に2層のbuffy coat（上層；単核球成分、下層；多核顆粒球成分）が形成されたことを確認し、下層のbuffy coatを回収した。PBSで数回洗浄したものを好中球として、以下の実験に使用した。

4.2.4　NETsを標的とした間接蛍光抗体染色

4.2.3の方法で採取した健常者好中球を5%FBS加RPMI-1640で1×10^5/mlに調整し、4ウェル組織培養用カルチャースライドに400μl/wellで播種した。37℃で15分間静置した後、PMA 20nMを添加し、37℃でさらに3時間反応させてNETsを誘導した。その後、室温で4%PFAに15分間浸し、固定を行った。固定した細胞をPBSで洗浄した後、患者血漿より抽出したIgGを250μg/mlに調整し、一次抗体としてNETsに添加した。陽性対照にはrabbit anti-Cit H3 antibodyをPBSで250倍希釈したもの、陰性対照にはnormal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology、Dallas、TX)をPBSで20倍希釈したものを使用した。4℃で一晩反応させた後、PBSで洗浄し、遮光下で二次抗体を添加して室温に1時静置した。なお、二次抗体は、患者IgGに対してはAlexa Fluor®488標識goat anti-human IgG (Invitrogen、Tokyo、Japan)をPBSで500倍希釈したもの、対照にはAlexa Fluor®488標識goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)をPBSで500倍希釈したものを使用した。その後PBSで洗浄し、DAPIでDNA染色を行った。標本を蛍光顕微鏡BIOREVO BZ-9000 (Keyence Japan、Osaka、Japan)にてBZ-Ⅱ観察アプリケーションver.1.40.(Keyence)を用いて観察した。

4.2.5　血漿抽出 IgG の NETs 誘導率の測定

4.2.3 の手順で健常者末梢血より好中球を分離、回収した。次に 5%FBS 加 RPMI-1640 で好中球を 1×10^6/ml に調整し、4 ウェル細胞培養用カルチャースライドに 400 µl/well で播種した。その後、各ウェルに TNF-α を 5ng/ml の濃度で添加し、15 分間 37℃に静置した。患者血漿より抽出した IgG を 250µg/ml の濃度で添加し、37℃で 3 時間反応させた。上清を除去した後、4%PFA で細胞の固定を行った。固定した細胞を PBS で 3 回洗浄し、一次抗体として rabbit anti-citrullinated histone H3 (Cit-H3) antibody (Abcam、Tokyo、Japan) を 100 倍希釈して添加、室温で 60 分間静置した。再度 PBS で 3 回洗浄後、Alexa Fluor 594 標識 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) を 500 倍希釈したものを添加して、室温遮光下で 1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後、DAPI を含む封入剤で封入し、DNA 染色を行った。蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 にて BZ-Ⅱ観察アプリケーション ver.1.40.を用いて標本を観察し、各ウェルにつき 6 個所ランダムに 200 倍視野で撮影し、画像内の Cit-H3 陽性細胞数と DAPI 陽性細胞数を Image J (無料ソフトウェア；imagej.nih.gov/ij) を用いて測定し、Cit-H3 陽性細胞率を計測した。

4.2.6　血漿の NETs 分解率の測定

4.2.3 の手順で健常者末梢血より好中球を分離・回収し、5%FBS 加 RPMI-1640 で好中球を 1×10^6/ml に調整した。4 ウェル細胞培養用カルチャースライドに 400µl/well で播種し、37℃で 15 分間静置した。PMA 100nM を各ウェルに添加し、再度 37℃で 3 時間反応させた。その後、上清を除去し、PBS で 10%に調整した患者血漿を各ウェルに添加して、37℃で 6 時間反応させた。2nM EDTA を添加して血漿中のヌクレアーゼ活性を停止した後、4%PFA で固定した。PBS にて洗浄後、DAPI で DNA 染色を行った。蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 にて BZ-Ⅱ観察アプリケーション ver.1.40.を用いて標本を観察し、各ウェルにつき 6 個所をランダムに 200 倍視野で撮影した。各画像内の DAPI 陽性となる残存した NETs 面積を Image J を用いて測定し、下記の式より NETs 分解率を算出した。

$$\text{NETs 分解率 (\%)} = [1-\{\text{NETs 面積(10\%血漿)} / \text{NETs 面積(PBS)}\}] \times 100$$

4.2.7　血漿の DNase Ⅰ 活性の測定

血漿の DNase Ⅰ 活性を ELISA キット (Orgentec GmbH®、Mainz、Germany)を用いて測定した。ELISA プレートに DNase Ⅰに分解される特異的基質が固相化されており、各ウェルに標準サンプルおよび被検血漿を添加して、37℃で 1 時間静置した。その後、ウェル内のサンプルを除去、洗浄し、基質に対する HRP 標識抗体を添加させた後、tetramethylbenzidine (TMB)で発色させマイクロプレートリーダー (Benchmark Plus: BIO-RAD、Tokyo、Japan) を用いて主波長 450nm の条件で吸光度を測定した。標準サンプルの吸光度より標準曲線を作成し、各血漿サンプルの DNase Ⅰ活性を測定した。

4.2.8 患者血漿 IgG 溶液の MPO-ANCA 吸収実験

患者血漿より抽出した IgG 溶液 250μg/ml および rabbit anti-MPO antibody (Abcam) 5μg/ml それぞれに対し、リコンビナントヒト MPO (rhMPO;Creative BioMart、Shirley、NY) を 10mg/ml の濃度で添加して、室温で 1 時間反応させた。その後 20℃、2400×g、1 分間遠心分離した後、上清を回収し、MPO-ANCA 吸収後 IgG として回収した。次に、4.2.3 と同様の手順で健常者好中球を 4 ウェル細胞培養用カルチャースライドに 1×10^5/ml で播種した後、PMA 20nM で刺激して NETs を作製し、4%PFA で固定した。固定後の細胞に、一次抗体として MPO-ANCA 吸収前と吸収後の anti-MPO antibody および患者血漿 IgG を添加した。4℃で一晩反応させた後、PBS で洗浄し、二次抗体を添加して、室温にて 1 時間遮光下に静置した。その後 PBS で洗浄し、DAPI で DNA 染色した。蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 にて BZ-Ⅱ観察アプリケーション ver.1.40.を用いて観察し、MPO-ANCA 吸収前後の変化を評価した。

4.2.9　ELISA による患者血漿中の ANCA の検索

患者血漿中の MPO-ANCA 以外の ANCA を検索するため、Wieslab®ANCA panel kit (EUROIMMUN DIAGNOSTICA、Malmö、Sweden)を用いた ELISA を行った。同キットにはアズロシジン、BPI、カテプシン G、エラスターゼ、ラクトフェリン、リゾチームの 6 種類の ANCA 抗原が固相化されている。キット付属の希釈液で 80 倍に希釈した患者血漿を各ウェルに入れ、室温で 1 時間反応させた。付属の洗浄液で洗浄後、アルカリホスファターゼ標識 anti-human IgG を各ウェルに添加し、室温で 30 分間静置した。洗浄後、付属の p-nitrophenyl phosphate (pNPP) 溶液を各ウェルに添加して、室温で 1 時間静置し、発色させた。その後、マイクロプレートリーダーを用いて主波長 405 nm で吸光度を測定した。

4.2.10 統計解析

統計解析方法は各結果の図の説明に記載した。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。統計解析は GraphPad Prism 7 (GraphPad Software、San Diego、CA) を用いて行った。

4.3　実験結果

4.3.1　血漿中の抗 NETs 抗体の同定

MPO-ANCA 関連血管炎患者血漿より抽出した IgG 溶液 250μg/ml を一次抗体として、NETs を標的とした間接蛍光抗体法を行った。その結果、MPO-ANCA 関連血管炎患者 11 例中 6 例が抗 NETs 抗体陽性であった(**Figure 8**)。健常者 4 例には抗 NETs 抗体は認めなかった。

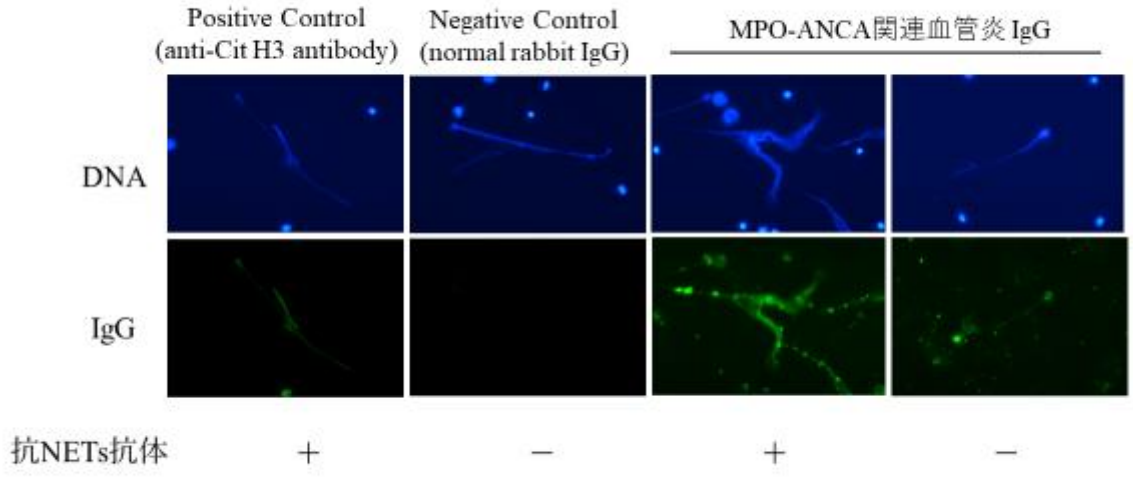


Figure 8.　血漿中の抗 NETs 抗体の同定

MPO-ANCA 関連血管炎患者（n=11）の血漿から抽出した IgG について、抗 NETs 抗体の有無を間接蛍光抗体法で評価した。11 例中 6 例が抗 NETs 抗体陽性であった。代表的な所見を示す。

4.3.2　抗 NETs 抗体の有無と臨床パラメータの関連

次に、対象とした MPO-ANCA 関連血管炎患者 11 例を、4.3.1 で判定した抗 NETs 抗体の陽性 6 例と陰性 5 例の二群に分け、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。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 (**Figure 9A、9B**)。

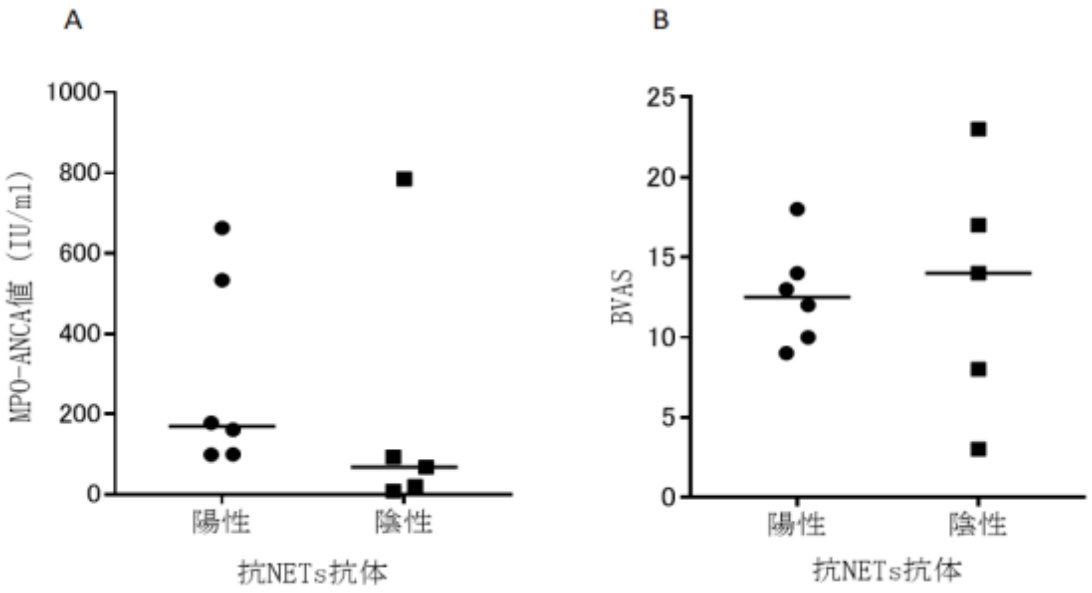


Figure 9. 抗 NETs 抗体の有無と臨床パラメータの比較

抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝6)と陰性患者(n＝5)の間で、MPO-ANCA 値 (A)、BVAS(B)いずれにも有意差は認めなかった。統計解析：Mann-Whitney *U*-検定。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、p<0.05;*、p<0.01;**で表記した。

4.3.3　血漿抽出 IgG の NETs 誘導率の解析

次に、血漿より抽出した IgG の NETs 誘導率を測定し、抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝6)、抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝5)、および健常者(n＝4)の間で比較した。MPO-ANCA 関連血管炎患者は抗 NETs 抗体陽性群、陰性群いずれも健常者と比較して NETs 誘導率が有意に高かったが、抗 NETs 抗体の有無による NETs 誘導率の差は認めなかった (**Figure 10**)。

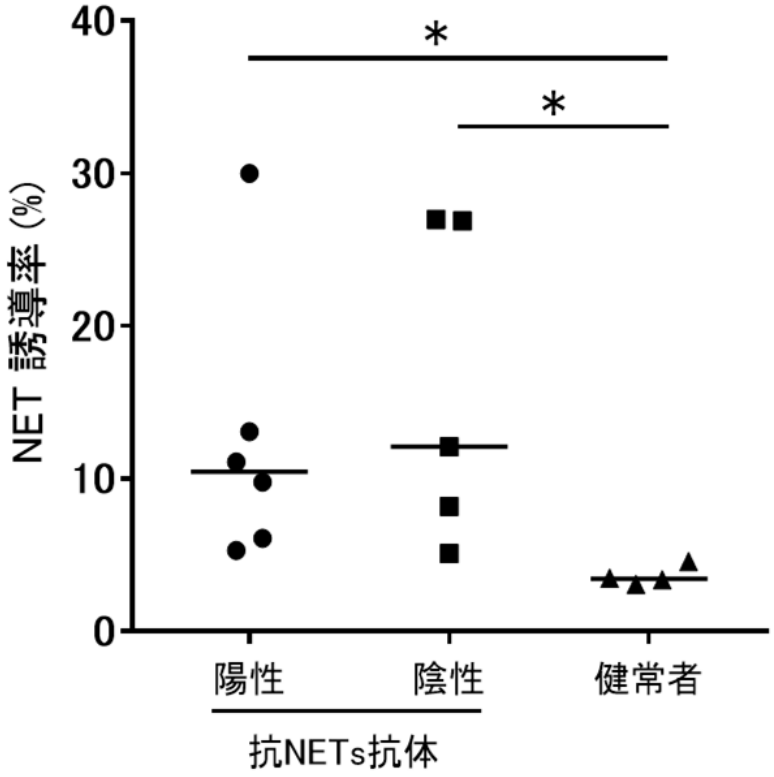


Figure 10. 血漿抽出 IgG の NETs 誘導率の比較

血漿より抽出した IgG の NETs 誘導率を測定し、抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝6)、抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝5)、および健常者(n＝4)の間で比較した。統計解析には Kruskal-Wallis 検定を用い、post-hoc 検定には Dunn の多重比較検定を用いた。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。

4.3.4 血漿の NETs 分解率の解析

次に、血漿の NETs 分解率を測定し、抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝6)、抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝5)、および健常者(n＝4)の間で比較した。MPO-ANCA 関連血管炎では、抗 NETs 抗体陽性群、陰性群いずれも健常者と比較して NETs 分解率が有意に低かったが、抗 NETs 抗体の有無による NETs 分解率の差は認めなかった (Figure 11)。

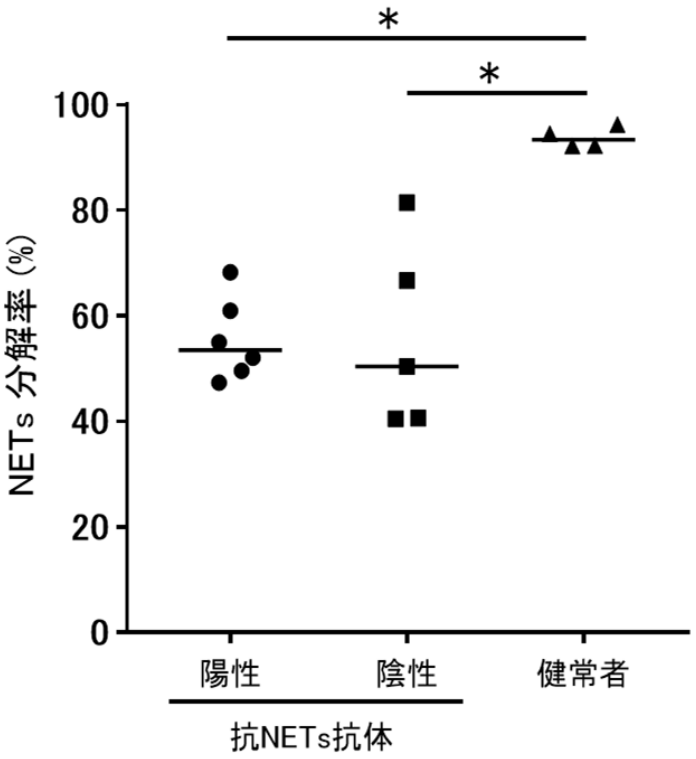


Figure 11. 血漿の NETs 分解率の比較

血漿の NETs 分解率を測定し、抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝6)、抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝5)、および健常者(n＝4)の間で比較した。統計解析には Kruskal-Wallis 検定を用い、post-hoc 検定には Dunn の多重比較検定を用いた。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。

4.3.5　血漿の DNase Ⅰ活性の解析

次に、血漿の DNaseI 活性を測定し、抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝6)、抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝5)、および健常者(n＝4)の間で比較した。MPO-ANCA 関連血管炎では、抗 NETs 抗体陽性群、陰性群いずれも健常者と比較して DNase Ⅰ活性が有意に低かったが、抗 NETs 抗体の有無による DNase Ⅰ活性の差は認めなかった (**Figure 12**)。

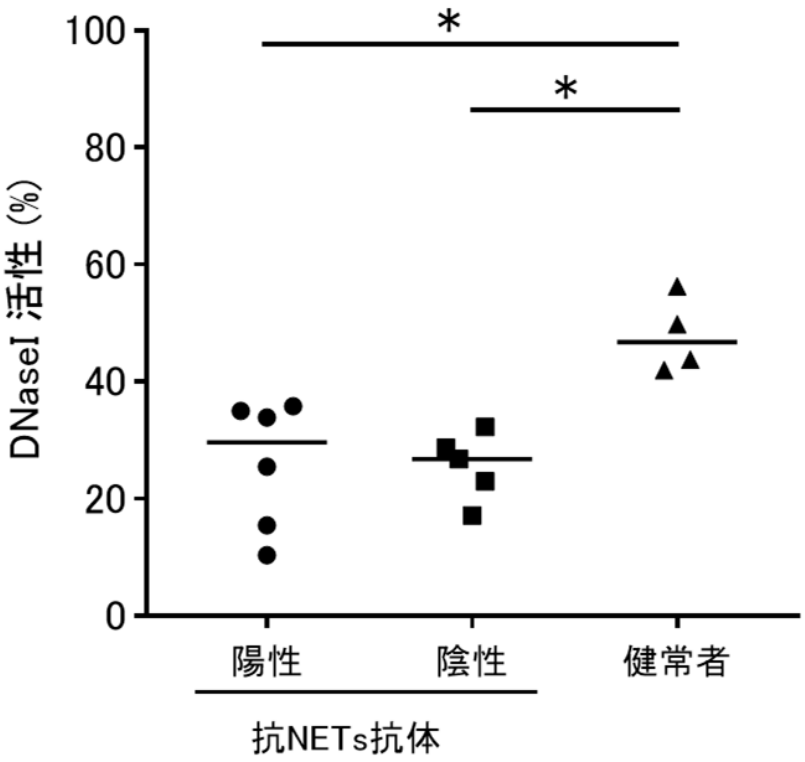


Figure 12. 血漿の DNaseI 活性の比較

血漿の DNaseI 活性を測定し、抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝6)、抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者(n＝5)、および健常者(n＝4)の間で比較した。統計解析には Kruskal-Wallis 検定を用い、post-hoc 検定には Dunn の多重比較検定を用いた。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。

4.3.6　小括

これまでの評価結果を Table 1 に示す。

Table 1　対象患者のまとめ

対象とした MPO-ANCA 関連血管炎患者 11 名および健常者 4 名の臨床的背景ならびに血漿の NETs 誘導率、NETs 分解率、DNaseI 活性の評価結果を示す。測定値は中央値[四分位範囲]で示した。

患者	MPO-ANCA 関連血管炎	抗NETs抗体		健常者
		陽性	陰性	
患者数	11	6	5	4
年齢	70 [65-75]	70 [65-74]	73 [60-78]	32 [21-33]
性別(男性/女性)	2/9	2/4	0/5	2/4
MPO-ANCA値(IU/ml)	100 [68.1-533]	169.5 [99.8-565.5]	68.1 [14.5-439.1]	−
抗核抗体(×)	80 [0-320]	20 [0-160]	80 [80-320]	−
BVAS	13 [9-17]	13 [9-18]	14 [5.5-20]	−
NET 誘導率 (%)	11.1 [6.1-26.9]	10.5 [5.9-17.3]	12.1 [6.7-27.0]	3.2 [3.1-4.6]
NET 分解率 (%)	52.1 [47.4-66.7]	53.5 [49.0-62.8]	50.4 [40.6-74.1]	93.4 [92.1-96.2]
DNaseI 活性 (%)	25.4 [17.2-33.9]	29.7 [14.2-35.2]	23.0 [20.0-27.7]	46.7 [42.0-56.3]

4.3.7　抗 NETs 抗体が NETs 分解能に及ぼす影響

MPO-ANCA 関連血管炎発症の背景に NETs の分解障害があるが[18]、NETs 分解障害の原因として、抗 NETs 抗体あるいはそれ以外の DNase Ⅰ阻害物質の存在が指摘されている[12]。そこで我々は患者血漿から抗体を除去し、抗体除去前後の血漿の NETs 分解能を比較することで、血漿の NETs 分解障害が抗体由来か、それ以外の原因によるかを鑑別することを試みた。「IgG 除去前血漿」、「IgG 除去前血漿＋DNase I」、「IgG 除去血漿」、「IgG 除去血漿＋DNase Ⅰ」の 4 群を作製し、抗 NETs 抗体陰性患者、陽性患者の血漿について、これら 4 群における NETs 分解能を測定した。

抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者では、IgG 除去前血漿と IgG 除去後血漿で NETs 分解能に有意差は認めなかった。また、いずれの血漿も DNase Ⅰを添加すると、NETs 分解率が有意に上昇した(**Figure 12A**)。これらの結果から、抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者の血漿における NETs 分解能の低下は DNase Ⅰの活性低下が原因であり、NETs 分解障害が IgG 除去に依らないため、NETs 分解に影響を及ぼすような IgG は存在していないと考えられた。

抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者では、IgG 除去前血漿に DNase Ⅰを添加しても分解率が改善しなかったが、IgG 除去後血漿に DNase Ⅰを添加すると、NETs 分解率が有意に上昇した(**Figure 12B**)。また、6 例中 2 例で IgG 除去のみで NETs 分解率が飛躍的に回復した血漿があった(**Figure 12C**)。これらの結果から、抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者の血漿中には DNase Ⅰを阻害する物質があり、一部の症例では IgG が DNase Ⅰ活性を阻害していること、また、その IgG は抗 NETs 抗体であることが示唆された。

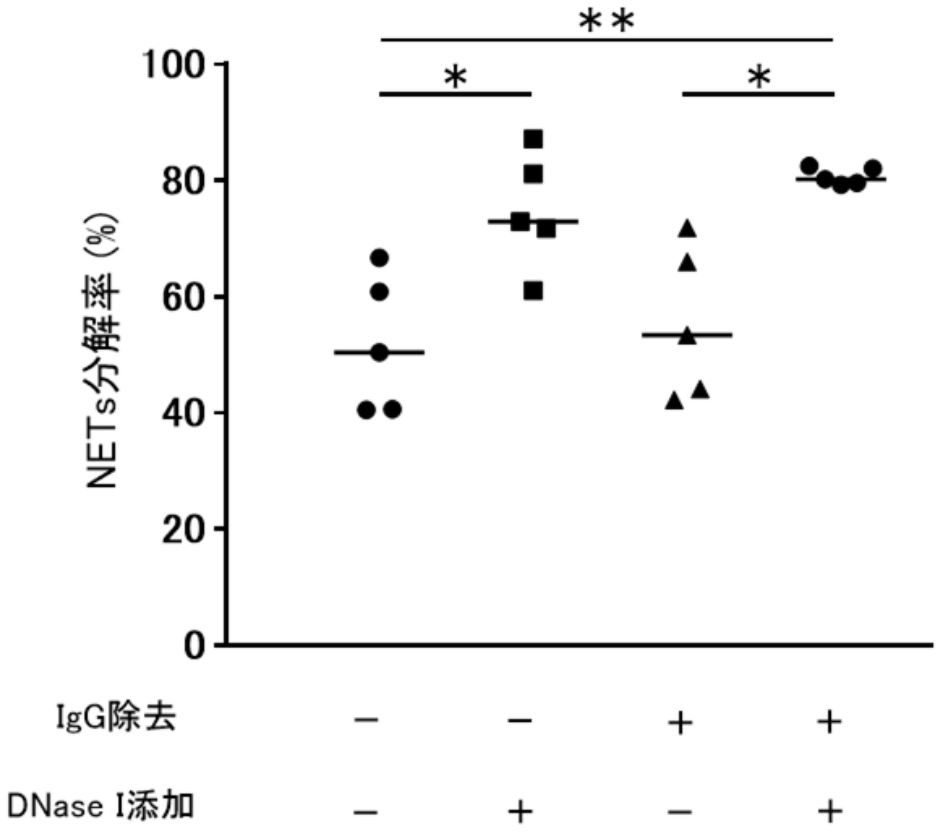


Figure 12A. 抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者の NETs 分解率低下の要因

抗 NETs 抗体陰性 MPO-ANCA 関連血管炎患者では、IgG 除去前血漿と IgG 除去後血漿で NETs 分解率に有意差は認めなかった。また、いずれの血漿も DNase Ⅰを添加すると、NETs 分解率が有意に上昇した($p<0.05$)。統計解析には repeated measured ANOVA を用い、post-hoc 検定には Bonferroni 検定を用いた。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。

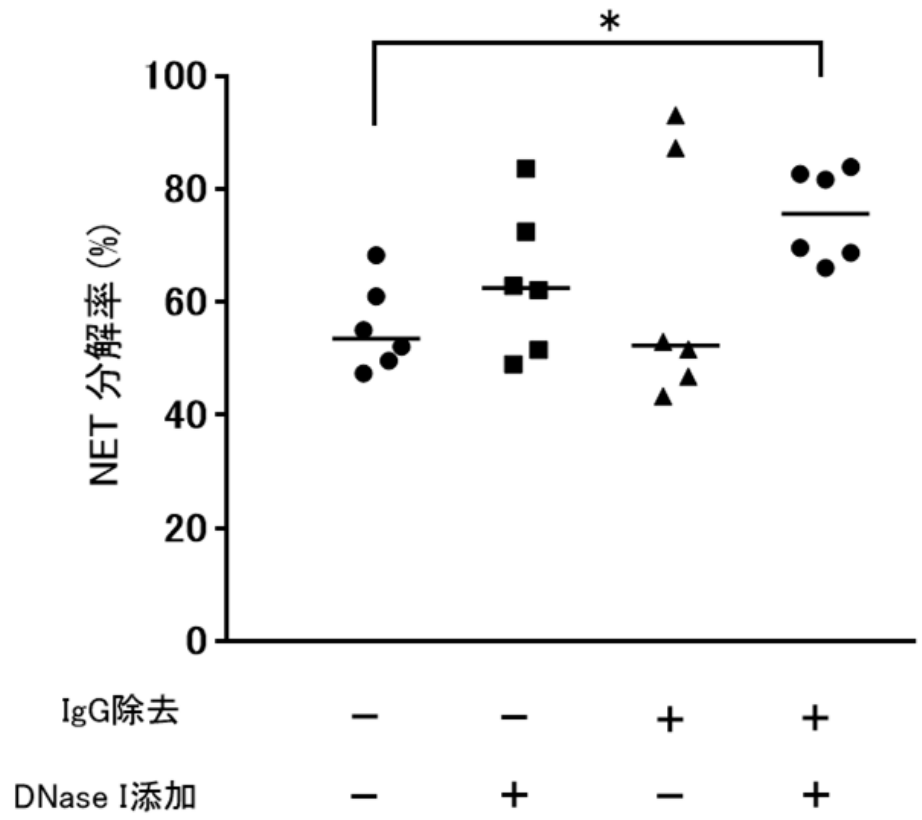


Figure 12B. 抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者の NETs 分解率低下の要因

IgG 除去前血漿に DNase I を添加しても分解率は変化しなかった。しかし、IgG を除去し、かつ DNase I 添加を行うと、NETs 分解率が有意に上昇した($p<0.05$)。また、IgG 除去前後で NETs 分解率に有意差は認めなかったが、6 例中 2 例で IgG 除去のみで NETs 分解率が飛躍的に回復した。統計解析には repeated measured ANOVA を用い、post-hoc 検定には Bonferroni 検定を用いた。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とし、$p<0.05$;*、$p<0.01$;**で表記した。

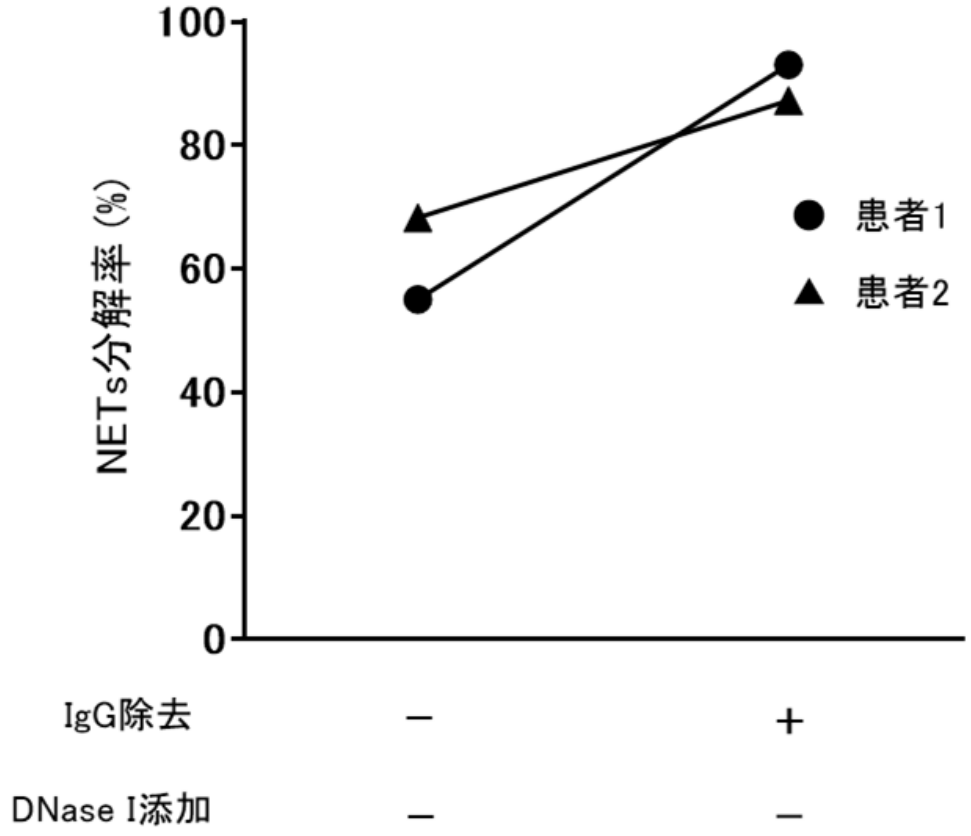


Figure 12C. 抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者 2 例における IgG 除去後の NETs 分解率の変化

抗 NETs 抗体陽性 MPO-ANCA 関連血管炎患者 6 例のうち 2 例で、血漿中の IgG 除去後に NETs 分解率が飛躍的に回復した。

4.3.8　抗 NETs 抗体の対応抗原の検索

4.3.8.1　血漿抽出 IgG の MPO-ANCA 吸収

4.3.7 の結果から、一部の抗 NETs 抗体が DNase　I による NETs 分解を妨げている可能性が考えられた。そこで次に抗 NETs 抗体の対応抗原を検索した。まず、抗 NETs 抗体の対応抗原が MPO と異なるか、つまり抗 NETs 抗体が MPO-ANCA と異なるかを評価した。4.3.7 で確認した DNase Ⅰ活性阻害を有する抗 NETs 抗体保有患者 2 例（患者 1、患者 2）の血漿抽出 IgG 溶液に rhMPO を添加し、MPO-ANCA と rhMPO の複合体を形成させた。その後、遠心分離を行い MPO-ANCA と rhMPO の複合体を沈殿させることで、IgG 溶液中の MPO-ANCA を除去した。MPO-ANCA 吸収前および吸収後の患者血漿抽出 IgG 溶液と、対照として rabbit anti-MPO antibody を用いて、健常者好中球ならびに健常者好中球を PMA で刺激して作製した NETs を標的とした間接蛍光抗体法を行い、MPO-ANCA 吸収後の IgG の好中球蛋白および NETs への反応性を評価した。Rabbit anti-MPO antibody は MPO-ANCA 吸収前では好中球、NETs いずれに対しても反応を認めたが、MPO-ANCA 吸収後は好中球および NETs いずれも陰性に転じた。患者 1、患者 2 の血漿抽出 IgG は MPO-ANCA 吸収前、吸収後いずれも好中球ならびに NETs に対して陽性であった。これらの結果から、患者 1、患者 2 の血漿中に存在する抗 NETs 抗体は、MPO-ANCA 以外の ANCA であることが示唆された(**Figure 13**)。

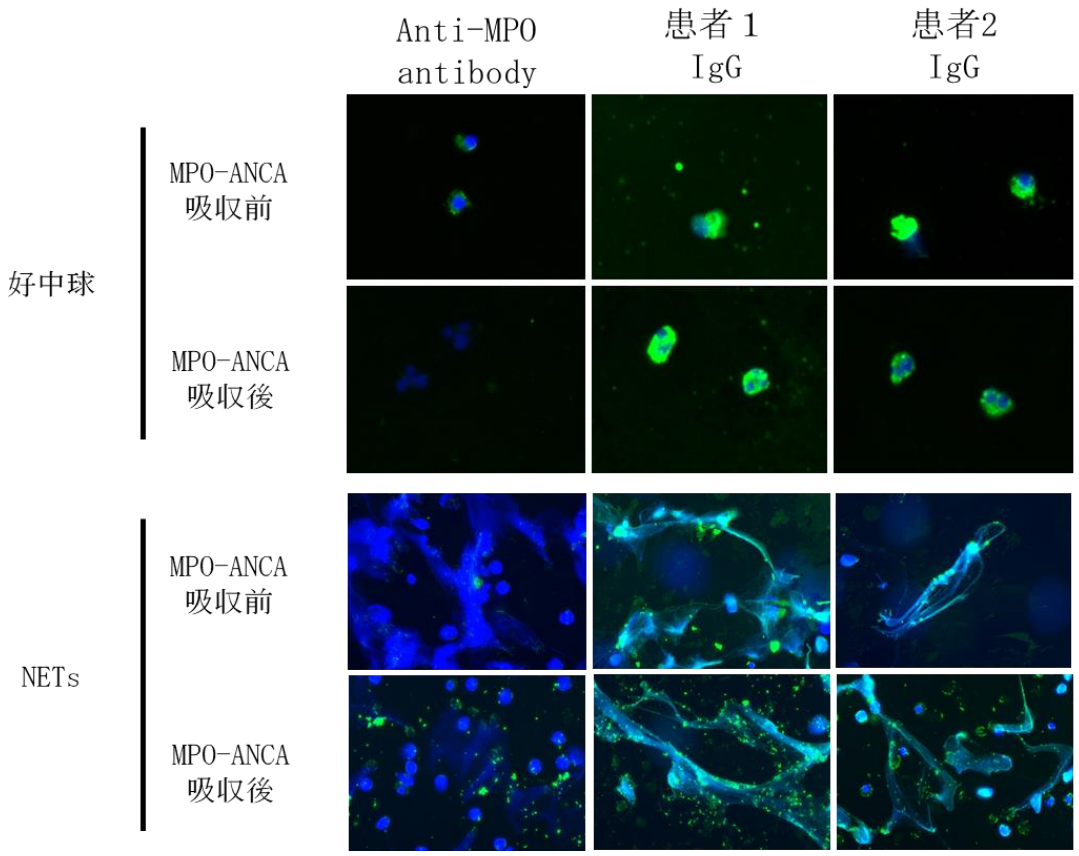


Figure 13. rhMPO を用いた MPO-ANCA 吸収実験

MPO-ANCA 吸収前後の患者血漿抽出 IgG を用いて、好中球（上段)、NETs(下段)を標的とした間接蛍光抗体法を行った。Rabbit anti-MPO antibody は好中球、NETs のいずれに対しても MPO-ANCA 吸収前は陽性であったが、MPO-ANCA 吸収後は陰性に転じた。患者 1、患者 2 の血漿抽出 IgG は MPO-ANCA 吸収前後によらず、好中球、NETs いずれに対しても反応した。

4.3.8.2　ELISA キットを用いた抗 NETs 抗体の対応抗原の検索

次に、Wieslab®ANCA panel kit (EURO DIAGNOSTICA、Malmö、Sweden)を用いた ELISA を行い、患者 1、患者 2 の血漿中に既知の ANCA 抗原であるアズロシジン、BPI、カテプシン G、エラスターゼ、ラクトフェリン、リゾチームに対する自己抗体が含まれていないかを評価した。その結果、患者 1、患者 2 いずれの血漿においても上記蛋白を抗原とする抗体は認めなかった(**Figure 14**)。以上より抗 NETs 抗体の対応抗原は本 ELISA キットで検出可能な ANCA 抗原のいずれでもない好中球蛋白であると考えられた。

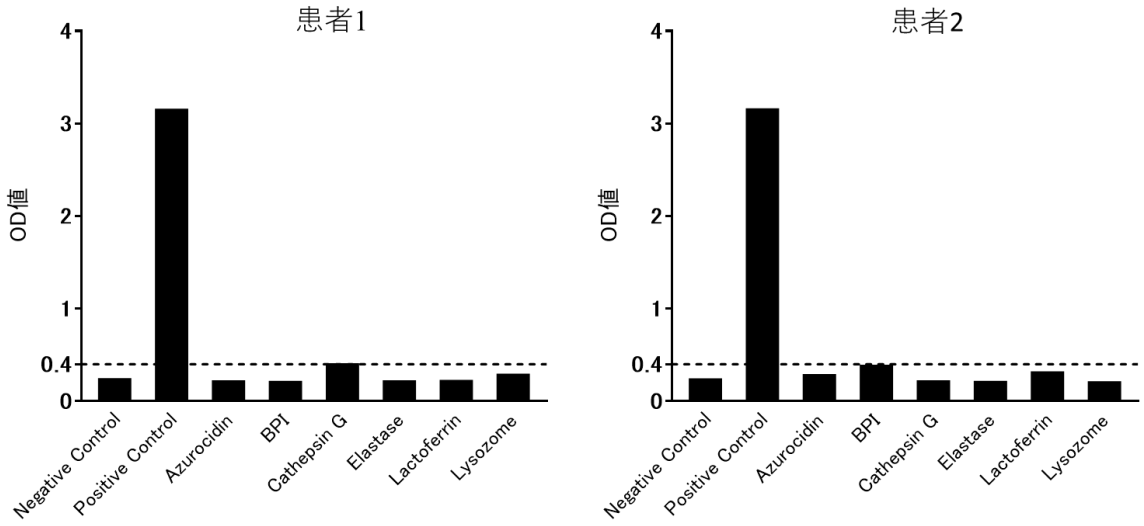


Figure14. Wieslab®ANCA panel kit(ELISA)を用いた抗原検索

患者 1、患者 2 の血漿中に既知の ANCA 抗原であるアズロシジン、BPI、カテプシン G、エラスターゼ、ラクトフェリン、リゾチームに対する自己抗体が含まれていないかを調べた。患者 1、患者 2 の抗 NETs 抗体の対応抗原は、上記蛋白のいずれでもなかった。

4.4　考察

MPO-ANCA 関連血管炎患者 11 例の血漿中の抗 NETs 抗体の存在頻度ならびに NETs 形成や分解に対する影響を解析した結果、11 例中 6 例に間接蛍光抗体法で抗 NETs 抗体を認めた。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)患者において検討した報告があり、SLE 患者 59 例の血漿の NETs 分解能を測定し、NETs 分解率 60%を基準に高分解率群と低分解率群の 2 群に分類したところ、低分解率群の中で、患者血清に DNase Ⅰや monococcal nuclease(MNase)を投与しても NETs 分解率が改善しないが、血清中の抗体成分を除去した血清では NETs 分解能が上昇する群、すなわち抗体の作用により NETs の分解障害が生じているグループが存在していた。さらに NETs 蛋白を固相化した ELISA においてそのグループの血清中の抗NETs抗体量を測定したとこところ、グループ以外の血清と比較して抗NETs抗体量が有意に多かった[12]。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唆された。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、今回我々が同定した抗 NETs 抗体の一部に関しては SLE における既報と同様に、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が示された。

本研究ではさらに抗 NETs 抗体の対応抗原の同定を目的とした解析を行った。注目した DNase Ⅰ活性を阻害する抗 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可能性を示した。NETs に含まれる蛋白成分として DNA の他にヒストン、エラスターゼ、MPO、カテプシン G、ラクトフェリン、ペントラキシン 3、LL-37 など 30 種類以上の抗菌蛋白および蛋白分解酵素が同定されており[24]、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、[25]lysosomal membrane protein-2 (LAMP-2)[26]、bactericidal/permeability increasing protein (BPI)[27]、ラクトフェリン[28]などの好中球細胞内蛋白を抗原とした 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、抗ラクトフェリン抗体が NETs 誘導能を有するなど[28]、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る。

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[29]、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[30]。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。今回の検討で、抗NETs抗体がNETs分解障害を有しうることが確認できた。その対応抗原が同定されれば、抗原蛋白のNETs内での局在や機能、さらにはその抗NETs抗体のNETs分解阻害のメカニズムの詳細が明らかとなる可能となる。抗NETs抗体の産生や作用をコントロールすることでNETsの制御を行うことを目標とし、今後も研究を継続していく。

5. 総括及び結論

第一章では、ヒドララジン誘発 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。それら 2 例の抗 NETs 抗体は、血清中の 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。

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り、今後、そのような機能的抗 NETs 抗体の対応抗原同定を目指した研究を継続する意義は大きいと考えられる。

6. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて下さった、北海道大学大学院医学研究院　免疫・代謝内科学教室　渥美達也教授、並びに北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野　石津明洋教授に謝意を表します。また、当教室腎臓グループ　西尾妙織講師・診療准教授、石川康暢助教、中沢大悟特任助教、JCHO 北海道病院腎・膠原病センターの志田玄貴先生､楠 由宏先生には終始適切なご指導､ご助言を賜りました。深く感謝の意を表します。

実験助手の三崎麻里子さん、斎藤由佳さん、福士なつ美さんより多大なるご協力を頂き感謝申し上げます。その他にもこの論文作成を遂行するにあたり、多くの諸先輩方よりご協力、ご助言、ご支援を頂きました事に心より深く感謝を申し上げます。

最後に、本研究を支えて下さった北海道大学大学院医学研究院　免疫・代謝内科学教室の全ての皆様に心より御礼を申し上げます。

7. 引用文献

1 Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175(2013).

2 Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 1532-1535(2004).

3 Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A. & Sendo, F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of leukocyte biology* **59**, 229-240(1996).

4 Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: how vital is it? *Blood* **122**, 2784-2794(2013).

5 Hakkim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A. & Waldmann, H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature chemical biology* **7**, 75-77(2011).

6 Lewis, H. D., Liddle, J., Coote, J. E., Atkinson, S. J., Barker, M. D., Bax, B. D., Bicker, K. L., Bingham, R. P., Campbell, M., Chen, Y. H., Chung, C. W., Craggs, P. D., Davis, R. P., Eberhard, D., Joberty, G., Lind, K. E., Locke, K., Maller, C., Martinod, K., Patten, C., Polyakova, O., Rise, C. E., Rudiger, M., Sheppard, R. J., Slade, D. J., Thomas, P., Thorpe, J., Yao, G., Drewes, G., Wagner, D. D., Thompson, P. R., Prinjha, R. K. & Wilson, D. M. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nature chemical biology* **11**, 189-191(2015).

7 Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* **191**, 677-691(2010).

8 Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S. & Radic, M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *Journal of innate immunity* **1**, 194-201(2009).

9 Pilsczek, F. H., Salina, D., Poon, K. K., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., Robbins, S. M., Green, F. H., Surette, M. G., Sugai, M., Bowden, M. G., Hussain, M., Zhang, K. & Kubes, P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 7413-7425(2010).

10 Carestia, A., Kaufman, T., Rivadeneyra, L., Landoni, V. I., Pozner, R. G., Negrotto, S., D'Atri, L. P., Gomez, R. M. & Schattner, M. Mediators and molecular pathways involved in the

regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *Journal of leukocyte biology* **99**, 153-162(2016).

11 Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I. & Simon, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell death and differentiation* **16**, 1438-1444(2009).

12 Hakkim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R. E. & Zychlinsky, A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 9813-9818(2010).

13 Jennette, J. C., Falk, R. J., Bacon, P. A., Basu, N., Cid, M. C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L. F., Gross, W. L., Guillevin, L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Jayne, D. R., Kallenberg, C. G., Lamprecht, P., Langford, C. A., Luqmani, R. A., Mahr, A. D., Matteson, E. L., Merkel, P. A., Ozen, S., Pusey, C. D., Rasmussen, N., Rees, A. J., Scott, D. G., Specks, U., Stone, J. H., Takahashi, K. & Watts, R. A. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis and rheumatism* **65**, 1-11(2013).

14 Csernok, E. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and pathogenesis of small vessel vasculitides. *Autoimmunity reviews* **2**, 158-164(2003).

15 Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schonermarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., Grone, H. J., Brinkmann, V. & Jenne, D. E. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine* **15**, 623-625(2009).

16 Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M. & Ishizu, A. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis and rheumatism* **64**, 3779-3787(2012).

17 Wada, N., Mukai, M., Kohno, M., Notoya, A., Ito, T. & Yoshioka, N. Prevalence of serum anti-myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) in patients with Graves' disease treated with propylthiouracil and thiamazole. *Endocrine journal* **49**, 329-334(2002).

18 Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T. & Ishizu, A. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **25**, 990-997(2014).

19 Nakazawa, D., Tomaru, U. & Ishizu, A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clinical and experimental nephrology* **17**, 631-633(2013).

20 Terrier, B., Saadoun, D., Sene, D., Ghillani, P., Amoura, Z., Deray, G., Fautrel, B., Piette, J. C. & Cacoub, P. Antimyeloperoxidase antibodies are a useful marker of disease activity in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Annals of the rheumatic diseases* **68**, 1564-1571(2009).

21 Yokogawa, N. & Vivino, F. B. Hydralazine-induced autoimmune disease: comparison to idiopathic lupus and ANCA-positive vasculitis. *Modern rheumatology* **19**, 338-347(2009).

22 Jiang, X., Khursigara, G. & Rubin, R. L. Transformation of lupus-inducing drugs to cytotoxic products by activated neutrophils. *Science (New York, N.Y.)* **266**, 810-813(1994).

23 Bonaci-Nikolic, B., Nikolic, M. M., Andrejevic, S., Zoric, S. & Bukilica, M. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated autoimmune diseases induced by antithyroid drugs: comparison with idiopathic ANCA vasculitides. *Arthritis research & therapy* **7**, R1072-1081(2005).

24 Pires, R. H., Felix, S. B. & Delcea, M. The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale* **8**, 14193-14202(2016).

25 Lood, C. & Hughes, G. C. Neutrophil extracellular traps as a potential source of autoantigen in cocaine-associated autoimmunity. *Rheumatology (Oxford, England)* **56**, 638-643(2017).

26 Kain, R., Exner, M., Brandes, R., Ziebermayr, R., Cunningham, D., Alderson, C. A., Davidovits, A., Raab, I., Jahn, R., Ashour, O., Spitzauer, S., Sunder-Plassmann, G., Fukuda, M., Klemm, P., Rees, A. J. & Kerjaschki, D. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nature medicine* **14**, 1088-1096(2008).

27 Fukuhara, A., Tanino, Y., Sato, S., Ishii, T., Nikaido, T., Kanazawa, K., Saito, J., Ishida, T., Kanno, M., Watanabe, T. & Munakata, M. Systemic vasculitis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies against bactericidal/permeability increasing protein. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* **52**, 1095-1099(2013).

28 Shida, H., Nakazawa, D., Tateyama, Y., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Hattanda, F., Masuda, S., Tomaru, U., Kawakami, T., Atsumi, T. & Ishizu, A. The Presence of Anti-Lactoferrin Antibodies in a Subgroup of Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis Patients and Their Possible Contribution to Enhancement of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Frontiers in immunology* **7**, 636(2016).

29 Jones, R. B., Furuta, S., Tervaert, J. W., Hauser, T., Luqmani, R., Morgan, M. D., Peh, C. A., Savage, C. O., Segelmark, M., Tesar, V., van Paassen, P., Walsh, M., Westman, K. & Jayne, D.

R. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis: 2-year results of a randomised trial. *Annals of the rheumatic diseases* **74**, 1178-1182(2015).

30 Sada, K. E., Harigai, M., Amano, K., Atsumi, T., Fujimoto, S., Yuzawa, Y., Takasaki, Y., Banno, S., Sugihara, T., Kobayashi, M., Usui, J., Yamagata, K., Homma, S., Dobashi, H., Tsuboi, N., Ishizu, A., Sugiyama, H., Okada, Y., Arimura, Y., Matsuo, S. & Makino, H. Comparison of severity classification in Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in a nationwide, prospective, inception cohort study. *Modern rheumatology* **26**, 730-737(2016).