



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	免疫グロブリン製剤が好中球細胞外トラップ形成および抗好中球細胞質抗体関連血管炎発症に及ぼす影響 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	魚住, 諒
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第13779号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76422
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Uozumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：魚 住 諒

学位論文題名

免疫グロブリン製剤が好中球細胞外トラップ形成および
抗好中球細胞質抗体関連血管炎発症に及ぼす影響

【背景と目的】

IVIG は精製した免疫グロブリンを大量に静注する治療法である。血中の免疫グロブリンが不足する無あるいは低 γ グロブリン血症の他、重症感染症にも効果が認められる。これは、免疫グロブリン製剤が様々な病原体に対する中和抗体を含んでいることによる。さらに、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）や川崎病、ギランバレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経根障害といった疾患にも有効性が確認されている。

抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎（AAV）は、血清中の ANCA 陽性を特徴とする小型血管炎であり、本邦における代表的な AAV は MPO-AAV である。MPO-AAV では好中球が持つミエロペルオキシダーゼ（MPO）をエпитープとする自己抗体である MPO-ANCA に病原性があり、その産生には好中球細胞外トラップ（NETs）の制御異常が関与している。NETs は活性化した好中球が細胞外へ放出する DNA 線維である。放出に際して細胞質内抗菌タンパクである MPO やプロテイナーゼ 3（PR3）が DNA 線維と混合される。この抗菌タンパクが混合された DNA 線維は体内に侵入した病原微生物をトラップし、殺菌するため、NETs は生体防御に不可欠な自然免疫システムである。その一方で、過剰な NETs は、NETs 構成要素に対するトレランスの破綻を誘導し、自己抗体である ANCA の産生を介して MPO-AAV における血管内皮細胞障害を引き起こしてしまう。

最近の研究において、AAV のひとつである好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（EGPA）の末梢神経障害に対する IVIG の有効性が示されている。しかし、本邦における EGPA は AAV 全体の 10%に過ぎず、IVIG が EGPA 以外の AAV に対しても有効か否かを明らかにすることは意義がある。加えて、高齢者の罹患が多い MPO-AAV では、強力な免疫抑制剤を使用する既存の標準治療に代わる新しい治療法の開発が望まれている。そこで本研究では、健康ヒト末梢血由来好中球および MPO-AAV ラットモデルを用いた実験系を構築し、IVIG が NETs の形成に対して抑制的に作用するか、もしそうであるならば、MPO-AAV の発症を抑制できるか、明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

1. 健康ヒト末梢血由来好中球を用いた *in vitro* における NETs 誘導に対する IVIG の影響

健康ヒト末梢血から好中球を分離し、免疫グロブリン製剤添加の有無に分けて前培養した後、NETs 誘導剤を用いて NETs を誘導した。好中球を細胞膜非透過性 DNA 染色試薬で染色し、フローサイトメトリー（FCM）を行った。また、健康者末梢血由来好中球を 4-well チャンバースライド内で同様に処理した。洗浄後、4%パラホルムアルデヒドを用いて室温で 15 分間固定した。再度洗浄を行い、DAPI 入り封入剤を用いて封入した後、蛍光顕微鏡下に観察した。

2. ラットモデルを用いた *in vivo* における MPO-AAV 発症に対する IVIG の影響

本研究では、中沢らが確立した MPO-AAV ラットモデルを使用した。これらのラットは、血漿中の ANCA が陽性となった 8 日目以降、連続 5 日間免疫グロブリン製剤を腹腔内注射する群と、同量の溶媒を腹腔内注射する群に分けた。両ラットとも経時的に採血を行い、血漿中の ANCA 抗体価を測定した。28 日目に解剖して、全身臓器を組織学的に解析した。

3. 健常ヒト末梢血由来好中球を用いた *in vitro* におけるラクトフェリン放出に対する IVIG の影響

近年、好中球における NETs 誘導の内因性制御因子としてラクトフェリンが報告されている。そこで、免疫グロブリン製剤がラクトフェリン放出誘導を介して NETs 形成を抑制するという仮説を立て、免疫グロブリン製剤添加により好中球から放出されるラクトフェリンの量を調べた。

【結果】

臨床的有効血中濃度に相当する免疫グロブリン製剤を添加した好中球では、対照群と比較して NETs 形成が有意に減少していた。また、この傾向は蛍光顕微鏡を用いた NETs の観察においても同様であった。

MPO-AAV ラットモデルにおいて、屠殺後に採取した腹膜組織を用いて NETs を検出する免疫染色を実施し、画像解析により NETs を定量した。その結果、腹膜組織における NETs 形成量は対照群と比べ、臨床的有効血中濃度に相当する免疫グロブリン製剤を腹腔内注射した群において有意に少なかった。また、血漿中の ANCA 抗体価を測定したところ、実験開始後 21 日目および 28 日目において、免疫グロブリン製剤投与群で ANCA 抗体価が有意に低かった。さらに、本モデルにおいて血管炎病変の指標とされる肺泡出血についても比較を行った。肺最大断面中の病巣数をカウントした結果、やはり免疫グロブリン製剤投与群で肺泡出血病巣数が有意に少なかった。

臨床的な有効血中濃度に相当する免疫グロブリン製剤を添加した好中球はラクトフェリンを放出することが *in vitro* で確認された。

【考察】

本研究で得られた結果は、IVIG が NETs 形成に対して抑制的に働く可能性を示唆している。既に IVIG の有効性が確認されている疾患はいくつか存在するが、本研究により、NETs が病態形成に深く関与する AAV についても IVIG が有効である可能性が示された。

AAV に対する現在の標準的寛解導入療法であるグルココルチコイドとシクロホスファミドの併用療法は 90%以上の高い寛解導入率が確認されており、生命予後の改善に大きく貢献してきた。しかし、治療抵抗性を示す患者がいること、寛解後も約 20%の患者で再発が認められること、強力な免疫抑制の結果としての感染症による治療関連死も多く報告されるなど課題も少なくない。NETs は本来、自然免疫システムにおいて必要不可欠であり、IVIG によって NETs 形成を抑制することはグルココルチコイドとシクロホスファミドの併用療法と同様に副作用としての免疫抑制を引き起こすリスクも懸念される。しかし、IVIG が重症感染症に使用されることから分かる通り、IVIG が持つその他の免疫賦活作用によって、そのリスクは相殺されることが期待できる。

ヒトにおける AAV の主たる病変は半月体形成性壊死性糸球体腎炎であるが、本研究で用いた MPO-AAV ラットモデルでは、腎病変は軽度には起こらない。IVIG が AAV における急速進行性腎障害に対して抑制効果を発揮するかは今後の検討課題である。

IVIG が NETs 形成を抑制する詳細なメカニズムは不明であるが、活性化好中球からのラクトフェリン放出が NETs の形成を抑制するという報告がなされている。細胞表面の FcγR に結合した γ グロブリンは、好中球からのラクトフェリン放出を誘導することが報告されており、本研究においても、IVIG は好中球からのラクトフェリン放出を誘導した。さらなる検討が必要であるが、これらの結果は IVIG が好中球からのラクトフェリン放出を介し、NETs 形成を抑制している可能性を示唆している。

【結語】

IVIG は人口の高齢化に伴い患者数が増加している AAV に対し、今後新たな治療法のひとつとなる可能性がある。