HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	遺伝子組換えトロンボモジュリンは免疫制御や組織保護を介して血管炎病態を改善する
Author(s)	楠, 加奈子
Description	配架番号：2524
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14060号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14060
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77897
Type	doctoral thesis
File Information	Kanako_Kusunoki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

遺伝子組換えトロンボモジュリンは

免疫制御や組織保護を介して

血管炎病態を改善する

(Recombinant thrombomodulin ameliorates autoimmune vasculitis via immune response regulation and tissue injury protection)

2020 年 3 月

北　海　道　大　学

楠　加奈子

Kanako Kusunoki

学　位　論　文

遺伝子組換えトロンボモジュリンは

免疫制御や組織保護を介して

血管炎病態を改善する

(Recombinant thrombomodulin ameliorates autoimmune vasculitis via immune response regulation and tissue injury protection)

2020 年 3 月

北　海　道　大　学

楠　加奈子

Kanako Kusunoki

目次

1. 発表論文目録及び学会発表目録 1
2. 要旨 3
3. 略語表 7
4. 緒言 9

5. 第一章　ANCA 関連血管炎モデル動物に対する rTM の治療効果の検討 13
5.1 緒言 14
5.2 方法 15
5.2.1 動物と治療 15
5.2.1.1 ANCA 関連血管炎モデルラット 15
5.2.1.2 SCG/Kj マウス 15
5.2.1.3 治療 15
5.2.2 評価 17
5.2.2.1 組織学的検討 17
5.2.2.2 生化学検査 17
5.2.2.3 RNA の抽出と Real-time PCR 17
5.2.2.4 循環血液中の NETs 18
5.2.2.5 血清 ANCA 値の測定 18
5.2.2.5.1 間接蛍光抗体法 18
5.2.2.5.2 ELISA 法 18
5.2.3 統計学的解析 19
5.3 結果 20
5.3.1 肺および腎病変 20
5.3.1.1 ANCA 関連血管炎モデルラット 20
5.3.1.1.1 肺出血の検討 20
5.3.1.1.2 肺における NETs の検討 22
5.3.1.1.3 肺における壊死細胞の検討 24
5.3.1.1.4 血尿および腎機能の検討 26
5.3.1.1.5 腎臓の組織学的検討 27

5.3.1.1.6　腎臓における TNF-α 遺伝子発現量の検討 28
5.3.1.2　SCG/Kj マウス 29
5.3.1.2.1　生存率の検討 29
5.3.1.2.2　体重減少の検討 30
5.3.1.2.3　血尿および腎機能の検討 31
5.3.1.2.4　腎臓の組織学的検討 32
5.3.2　循環血液中の NETs 33
5.3.2.1　FCM および live cell imaging による評価 33
5.3.2.2　血清 DNA による評価 35
5.3.3　血清 ANCA 36
5.4　考察 39
5.5　結語 40

6.　第二章　ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果の検討 41
6.1　緒言 42
6.2　方法 44
6.2.1　好中球の分離 44
6.2.2　Immunoglobulin G (IgG) の抽出 44
6.2.3　NETs の誘導と評価 44
6.2.4　CitH3 免疫染色 44
6.2.5　NETs の培養上清中のヒストン濃度の測定 44
6.2.6　HL-60 の培養 45
6.2.7　rTM と好中球との結合実験 45
6.2.7.1　FCM 45
6.2.7.2　好中球を用いた cell adhesion assay 45
6.2.7.3　HL-60 細胞を用いた cell adhesion assay 46
6.2.7.3.1　HL-60 細胞の Mac-1 ノックダウン実験 46
6.2.7.3.2　Cell adhesion assay 46
6.2.8　統計学的解析 46
6.3　結果 47
6.3.1　ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果 47
6.3.2　ANCA 誘導 NETs の培養上清中のヒストン濃度の検討 50

6.3.3　rTM と好中球との結合に関する検討.....51
6.3.3.1　FCM による評価.....51
6.3.3.2　Cell adhesion assay による評価.....52
6.3.4　β2 インテグリン阻害による rTM と好中球との結合への影響.....53
6.3.4.1　CD18mAb を用いた検討.....53
6.3.4.2　Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞を用いた検討.....54
6.4　考察.....56
6.5　結語.....59

7.　第三章　ANCA 誘導 NETs の血管内皮細胞障害に対する rTM の効果の検討
7.1　緒言.....61
7.2　方法.....62
7.2.1　HuEht の培養.....62
7.2.2　ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞障害性および rTM の効果.....62
7.2.3　ヒストンの HuEht に対する細胞障害性の評価および rTM の効果.....63
7.2.4　統計学的解析.....63
7.3　結果.....64
7.3.1　ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞障害性および rTM の効果.....64
7.3.2　ヒストンの HuEht に対する細胞障害性の評価.....65
7.3.3　ヒストンの血管内皮細胞障害に対する rTM の効果.....66
7.4　考察.....67
7.5　結語.....68

8.　第四章　抗体産生細胞に対する rTM の効果の検討.....69
8.1　緒言.....70
8.2　方法.....71
8.2.1　PBMC の分離.....71
8.2.2　PBMC の培養.....71
8.2.3　PBMC の培養上清中の IgG の測定.....71
8.2.4　PBMC の培養上清中のサイトカインの測定.....71
8.2.5　rTM と DNA との結合能についての検討.....71
8.2.6　統計学的解析.....71

8.3　結果 72
8.3.1　PBMC の IgG 産生に対する rTM の効果 72
8.3.2　PBMC の炎症性サイトカイン産生に対する rTM の効果 73
8.3.3　rTM と DNA との結合能についての検討 75
8.4　考察 76
8.5　結語 77

9.　第五章　ANCA 関連血管炎患者における血清 TM 値の検討 78
9.1　緒言 79
9.2　対象 80
9.3　方法 80
9.4　結果 81
9.4.1　対象患者背景 81
9.4.2　sTM 値の解析結果 82
9.4.3　AAV の疾患活動性と sTM 値との関連 83
9.5　考察 84
9.6　結語 85

10.　総合考察 86
11.　総括および結論 88
12.　謝辞 89
13.　利益相反 90
14.　引用文献 91

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

1. Kanako Watanabe-Kusunoki, Daigo Nakazawa, Yoshihiro Kusunoki, Takashi Kudo, Fumihiko Hattanda, Saori Nishio, Sakiko Masuda, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Recombinant thrombomodulin ameliorates autoimmune vasculitis via immune response regulation and tissue injury protection. *Journal of Autoimmunity.*

本研究の一部は以下の学会に発表した.

2. Kanako Watanabe, Daigo Nakazawa, Yoshihiro Kusunoki, Fumihiko Hattanda, Saori Nishio, Sakiko Masuda, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Effects of Recombinant Thrombomodulin on Experimental Autoimmune Vasculitis via the Inhibition of Neutrophil Extracellular Traps, The 55th ERA-EDTA Congress, Copenhagen, Denmark, May 24-27, 2018

3. 渡邉 加奈子, 中沢 大悟, 西尾 妙織, 渥美 達也 :「血管炎モデルに対する好中球細胞外トラップ (NETs) 制御を介した遺伝子組換えトロンボモジュリン (rTM) の効果」第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018 年 6 月 8-10 日, 新潟

4. Kanako Watanabe, Daigo Nakazawa, Yoshihiro Kusunoki, Fumihiko Hattanda, Saori Nishio, Sakiko Masuda, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Recombinant Thrombomodulin (rTM) Reduced Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation and Improved Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA)-Associated Vasculitis in Murine Models, The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo, Japan, June 28-30, 2018

5. Kanako Kusunoki, Daigo Nakazawa, Yoshihiro Kusunoki, Fumihiko Hattanda, Saori Nishio, Sakiko Masuda, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Recombinant Thrombomodulin Ameliorates Vasculitis via the Inhibition of Neutrophil Extracellular Traps, The 56th ERA-EDTA Congress, Budapest, Hungary, June 13-16, 2019

要旨

【背景と目的】 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) は全身の小型血管を主体とする壊死性血管炎による症候群である. 病原性自己抗体である ANCA が好中球を過剰に活性化し, 全身の微小血管を障害することで多臓器不全を引き起こす. 特に肺や腎臓では生命予後に関わる肺胞出血や急速進行性糸球体腎炎を発症するため, 早期の適切な治療介入が重要となる. 近年, 好中球の免疫機構の一つである好中球細胞外トラップ (NETs) が本疾患の病態形成に関与することが明らかとなった. NETs とは好中球の新たに発見された殺菌システムであり, ミエロペルオキシダーゼ (MPO) やヒストンを混合した DNA 線維を細胞外に放出して, 外来微生物を効率よく補足し殺菌する. NETs は自然免疫の重要な役割を担う一方で, 過剰な NETs はその細胞外ヒストンや殺菌蛋白による血管内皮細胞障害を招く. さらに障害臓器から放出される DNA やヒストンなどの damage-associated molecular patterns (DAMPs) は, toll-like receptor を介して全身の炎症を増幅させるとともに, NETs をさらに誘導して, 疾患の悪循環病態を形成することが示唆されている.
トロンボモジュリン (TM) は血管内皮細胞表面に発現する糖蛋白であり, プロテイン C の活性化を介した抗凝固作用を持つ. TM の細胞外ドメインで構成される遺伝子組換えトロンボモジュリン (rTM) は, 播種性血管内凝固症候群の治療薬として実臨床で使用されている. 近年, rTM は抗凝固作用に加えて, 細胞障害性ヒストンの中和や補体依存性免疫反応の制御を介した抗炎症作用が示されていることから, NETs-ヒストンが病態の中心をなす AAV においても治療薬になると仮説を立てた. 本研究では, AAV 動物モデルに対する rTM の効果を検証し, in vitro の系を用いて血管炎病態における rTM の役割を解析した.

【材料と方法】 ①In vivo 実験: ヒト MPO (400 μg/kg) を WKY ラット (雄性 5 週齢) に免疫して AAV モデルラットを作成した. 免疫 14 日目に ANCA 産生を確認の上, 21 日目から 42 日目まで rTM (3 mg/kg) または PBS を隔日静脈内投与した (n=6/群). 続いて AAV の自然発症モデルである SCG/Kj マウス (雌性 10-11 週齢) を用いて, MPO-ANCA の産生を確認の上, rTM (1 mg/kg) または PBS を 3 週間隔日腹腔内投与した (n=5/群). 両モデルとも治療終了後に解剖し

た. 肺病変を出血スコア, TUNEL 染色, および NETs マーカーであるシトルリン化ヒストン (CitH3) 免疫染色を用いて組織学的に評価し, 腎病変は血尿, 腎機能, mRNA 発現 (TNF-α), 病理組織により解析した. 循環 NETs は Flow Cytometry (FCM) による Sytox green (SG) 陽性顆粒球率, ANCA 値は間接蛍光抗体法および ELISA 法により測定した.
②In vitro 実験: 血管炎病態における rTM の好中球, リンパ球, 血管内皮細胞に与える影響を次の 3 つの in vitro の系で検証した.
1) ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果を評価するため, ヒト健常好中球を rTM 前処置の有無に分けて ANCA-IgG で培養し, SG 陽性顆粒球率および CitH3 免疫染色により NETs 誘導率を評価した. 次に rTM の好中球へ直接作用を検証するため, 好中球と rTM の結合能を FCM および cell adhesion assay により解析した. rTM の好中球への結合部位を検証するため, 好中球表面の β2 インテグリン Mac-1 (CD11b/CD18) に着目し, 阻害抗体である抗 CD18 モノクローナル抗体 (CD18 mAb) を前処置した好中球および siRNA による Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞 (ヒト前骨髄性白血病細胞株) を用いて rTM との結合性を評価した. 2) 自己抗体 ANCA を産生するリンパ球に対する rTM の影響を評価するため, CpG-DNA で刺激した PBMC を rTM で前処置を行い, IgG 産生や炎症性サイトカインのプロファイルを評価した. 3) NETs による内皮細胞障害時の rTM の役割を評価するため, ヒストン (100 μg/ml) または ANCA 誘導 NETs を, rTM の前処置の有無に分けたヒト血管内皮細胞培養株 (HuEht) に添加し, LDH 放出試験および BSA-FITC 細胞透過性試験により内皮細胞障害度を評価した.
③ヒト AAV 患者における TM の動態: AAV 患者 (n=13) および健常者 (n=10) の血清中の TM (sTM) 値を ELISA 法により測定し, 血管炎の活動性 BVAS との関連を評価した.

【結果】 ①In vivo 実験: AAV モデルラットの肺病変において, rTM 群では PBS 群と比較して, 肺出血, 肺組織中の CitH3 陽性 NETs および TUNEL 陽性域が有意に減少した. 腎病変では, 腎炎のマーカーである血尿, および腎組織中の TNF-α mRNA 発現が rTM 群において有意に低下した. 循環 NETs および免疫 42 日後の ANCA 値も, rTM 群において PBS 群と比較し有意に低値であった.
SCG/Kj マウスの PBS 群 (n=2) は治療経過中に死亡したが, rTM 群では PBS 群

と比較し，体重減少の有意な抑制，循環 NETs の減少傾向，および ANCA 値の低下傾向を認めた.
②In vitro 実験: rTM はヒストンおよび ANCA 誘導 NETs による HuEht の細胞障害を有意に抑制した．さらに rTM は ANCA 誘導 NETs の形成を有意に抑制した. rTM は好中球表面への結合能を示し, CD18 mAb を前処置した好中球および Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞では, rTM との結合がいずれも有意に抑制されたことから rTM が Mac-1 依存性に ANCA 誘導 NETs を阻害することが示された．また CpG-DNA 刺激された抗体産生中の PBMC は，種々の炎症性サイトカインが産生されるが, rTM により抑制された.
③ヒト AAV 患者における TM の動態: AAV 患者における血清中の sTM 値は，健常者と比較して有意に高値であった.

【考察】 AAV モデル動物に対する rTM 治療により，臓器障害の改善のみならず NETs の減少や ANCA 産生の抑制が示された. In vitro 実験において rTM は ANCA 誘導 NETs の形成を抑制し，また Mac-1 を介した好中球への結合能を示したことから, rTM は好中球 Mac-1 に結合して, ANCA 誘導 NETs の形成過程に必要な Mac-1 依存性の spleen tyrosine kinase-NADPH シグナルの活性化 (Hewins et al., 2004) を抑制することで, AAV モデルの NETs を抑制したと考えられた. また rTM は PBMC に直接作用して，血管炎病態に関わる種々の炎症性サイトカインの産生を抑制したことから, rTM が PBMC に直接結合して (Kawamoto et al., 2016)，向炎症性から抗炎症性の PBMC に phenotype を変えることで, AAV モデルの ANCA の産生抑制に影響したと考えられた．さらに rTM はヒストンおよび ANCA 誘導 NETs による血管内皮細胞障害に対して保護効果を発揮することが示され，血管炎局所の壊死細胞から遊離されるヒストンを中和することで (Nakahara et al., 2013)，血管内皮細胞障害を軽減し, AAV モデルの臓器保護に繋がったと考えられた. rTM はこれらの多面的な効果を発揮することで, AAV の中心病態を制御する新規治療薬の候補となる可能性が示唆された．そして AAV 患者では健常者と比較して sTM 値が有意に高値であることが示され，血管内炎症を呈する敗血症 DIC 患者における sTM 動態と同様の結果であった (Lin et al., 2008). AAV においても血管内炎症を制御するための生体反応として， ANCA 誘導 NETs により傷害された血管内皮細胞から TM が遊離されていることが想定され, rTM の補充が AAV の病態改善に寄与する可能性が考えられた.

【結論】 rTM は NETs-ヒストンの制御を介した局所の消炎，ならびに ANCA の抑制を介して，多面的に AAV の病態を改善する可能性がある．

略語表

AAV	ANCA-associated Vasculitis
ANCA	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody
APC	Activated Protein C
BSA	Bovine Serum Albumin
BUN	Blood Urea Nitrogen
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
cDNA	Complementary DNA
CitH3	Citrullinated Histone 3
Cr	Creatinine
CRP	C-reactive Protein
DAMPs	Damage-associated Molecular Patterns
DAPI	4’, 6-Diamidine-2’-Phenylindole Dihydrochloride
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase	Deoxyribonuclease
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
FBS	Fetal Bovine Serum
FCM	Flow Cytometry
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
HE	Hematoxylin and Eosin
hMPO	Human Myeloperoxidase
HSA	Human Serum Albumin
HuEht	Immortalized Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line Established by the Electroporation of pIRES-hTERT-hygr
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
LDH	Lactate Dehydrogenase

MPO Myeloperoxidase
NETs Neutrophil Extracellular Traps
N.S. Not Significant
PAD4 Peptidylarginine Deiminase 4
PAM Periodic Acid-Methenamine-Silver
PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS Phosphate Buffered Saline
PFA Paraformaldehyde
PMA Phorbol Myristate Acetate
RNA Ribonucleic Acid
ROS Reactive Oxygen Species
rTM Recombinant Thrombomodulin
SCG/Kj Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-forming/Kinjoh
SD Standard Deviation
SG Sytox Green
SSC Side Scatter
sTM Serum Thrombomodulin
Syk Spleen Tyrosine Kinase
TLR Toll-like Receptor
TM Thrombomodulin
TNF-α Tumor Necrosis Factor-α
TUNEL Terminal Deoxynucleotidyl Transferase–mediated Digoxigenin-Deoxyuridine Nick-End Labeling
WKY Wistar Kyoto

緒言

抗好中球細胞質抗体 (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA) 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis: AAV) は, ANCA の産生を特徴とする小型血管主体の壊死性血管炎であり, 肺や腎が主要な標的臓器である (Jennette and Falk, 1997) (Jennette et al., 2013). 肺胞出血や急速進行性糸球体腎炎などの致死的な病態を来すことがあり, 早期の適切な治療介入が重要となる. ANCA は好中球表面に表出された自己抗原に結合することで, 好中球を過剰に活性化させ, 活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) や蛋白分解酵素を放出して血管内皮細胞を障害し, 微小血管炎を引き起こす (Kallenberg, 2011). この過剰に活性化された好中球の産物が neutrophil extracellular traps (NETs) であることが近年報告された (Brinkmann et al., 2004). NETs とは好中球の新たに発見された殺菌システムであり, myeloperoxidase (MPO) や neutrophil elastase などの細胞内殺菌蛋白およびヒストンを混合した DNA 線維を細胞外に放出することで自然免疫の重要な役割を担う (Figure 1). 一方で過剰な NETs は, 構成成分であるヒストンや metalloproteinases による血管内皮細胞障害を招く (Hakkim et al., 2010) (Schreiber et al., 2017) (Kumar et al., 2015) (Nakazawa et al., 2017). また障害臓器から DNA やヒストンなどの damage-associated molecular patterns (DAMPs) を放出させ, toll-like receptor (TLR) を介して炎症を増幅させるとともに (Mulay et al., 2016), NETs をさらに誘導して (Nakazawa et al., 2017), 悪循環病態を形成することが示唆されている (Gupta and Kaplan, 2016). さらに, AAV 患者は NETs の分解障害を有しており, DNA とともに細胞外に放出された MPO が長時間局所に存在することにより, MPO に対する免疫寛容が破綻して MPO-ANCA が産生され, AAV 発症に繋がる可能性が示されている (Nakazawa et al., 2012a) (Nakazawa et al., 2014). 以上から, NETs は AAV の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている (Nakazawa et al., 2018). 現在の AAV に対する治療は, 自己抗体を産生する B リンパ球を抑制する観点から, ステロイドやシクロフォスファミド, リツキシマブなどの非特異的かつ過剰な免疫抑制療法に依存する例が多く, 過剰治療による治療関連死も多い. このため, NETs を標的とした特異的治療の開発は, AAV への新たな治療戦略として期待されている.

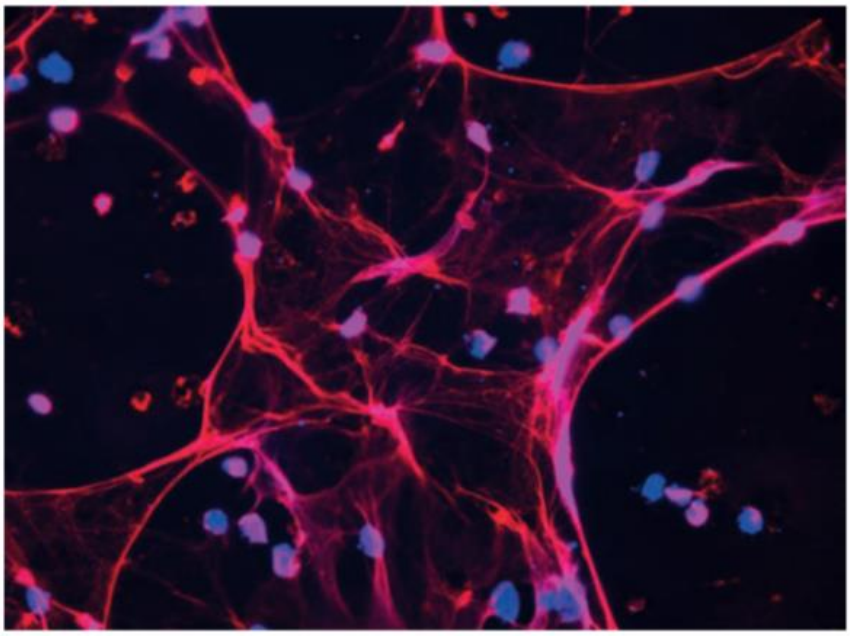


Figure 1.　Neutrophil extracellular traps (NETs)
赤は MPO，青は DNA (Hoechst) を示す.
(Gupta and Kaplan, 2016) より引用改変.

トロンボモジュリン (Thrombomodulin: TM) は血管内皮細胞表面に発現する細胞膜貫通型タンパク質である (Maruyama et al., 1985). 5 つの領域に分けられ，ドメイン 1 はレクチン様領域，ドメイン 2 は epidermal growth factor (EGF) 様領域，ドメイン 3 は O 型糖鎖結合領域であり，ドメイン 1 から 3 までが細胞外領域である．ドメイン 4 は細胞膜貫通領域，ドメイン 5 は細胞内領域である (Figure 2). TM はトロンビンと結合してプロテイン C を活性化させ (activated protein C: APC)，抗凝固作用を発揮する (Loghmani and Conway, 2018). 加えて, TM の抗炎症作用が示唆されており (Conway et al., 2002), high mobility group box 1 (Abeyama et al., 2005), lipopolysaccharide (Shi et al., 2008)，ヒストン (Nakahara et al., 2013) などの細胞障害性を中和することが示されている．さらに TM は補体依存性免疫反応を制御する可能性も示唆されている (Van de Wouwer et al., 2006).

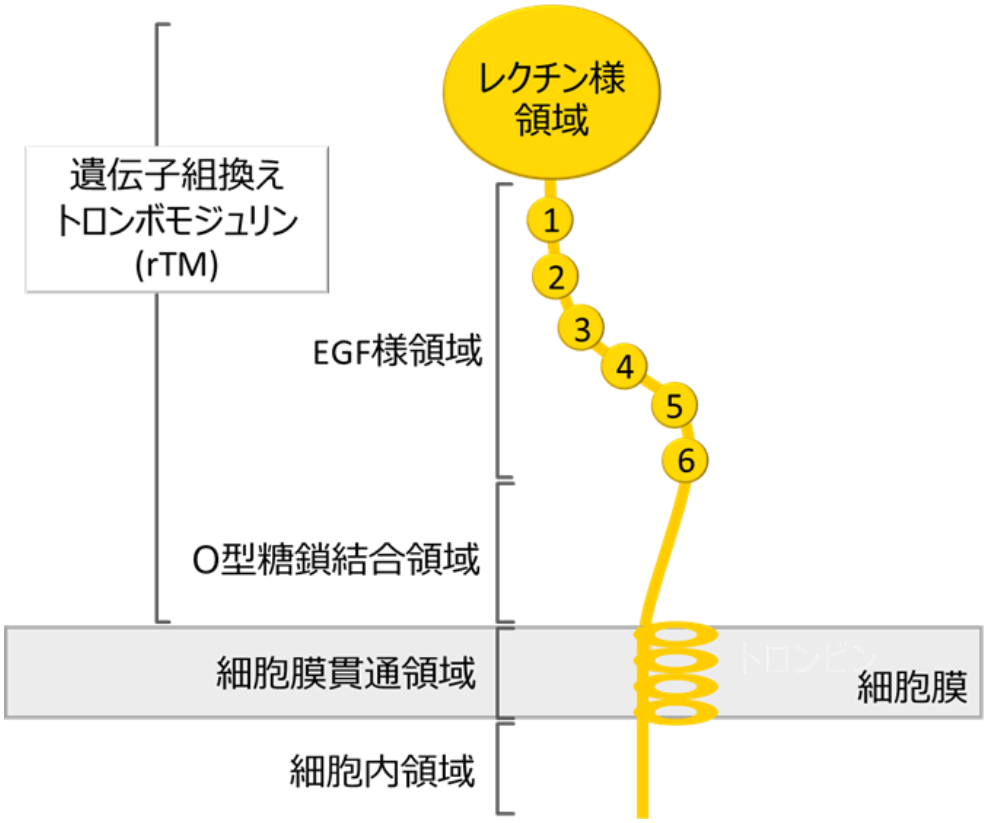


Figure 2.　トロンボモジュリンの構造

ドメイン 1 はレクチン様領域，ドメイン 2 は EGF 様領域，ドメイン 3 は O 型糖鎖結合領域であり，ドメイン 1 から 3 までが細胞外領域である．ドメイン 4 は細胞膜貫通領域，ドメイン 5 は細胞内領域である．

遺伝子組換えトロンボモジュリン (Recombinant thrombomodulin: rTM) は TM の細胞外ドメインで構成され，日本において播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation: DIC) の治療薬として広く使用されている. 近年, 腎炎や腎虚血再灌流障害の動物モデルに対する rTM 治療の抗炎症作用が示されており (Ikeguchi et al., 2002) (Tachibana et al., 2019) (Ozaki et al., 2008), さらに rTM は細胞外ヒストンに直接結合して中和することで, 動物モデルの血栓症の改善効果が示されている (Nakahara et al., 2013). 細胞外ヒストンは NETs の主要な構成成分であり，血管内皮障害を惹起する重要な因子であることから (Saffarzadeh et al., 2012), rTM の抗炎症作用により NETs を制御することで, AAV の病態を改善できる可能性があると考えた.

以上より，本研究では NETs を標的とした AAV に対する新規治療薬の候補として rTM に着目した. 第一章では AAV 動物モデルに対する rTM の治療効果について, 第二章では ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果について, 第三章では ANCA 誘導 NETs の血管内皮細胞障害に対する rTM の効果について述べる. 第四章ではさらに抗体産生細胞に対する rTM の効果について検証した. 第五章では AAV 患者における血清 TM 値の検証結果について述べる.

第一章

ANCA 関連血管炎モデル動物に対する

rTM の治療効果の検討

緒言

AAV は肺や腎を主要標的臓器とする全身性血管炎であり, その病態には病原性自己抗体 ANCA により誘導される NETs が関与している (Kallenberg, 2011). NETs は細胞内殺菌蛋白やヒストンを混合した DNA 線維を細胞外に放出して微生物を効率よく殺菌する好中球の自然免疫機構であるが (Brinkmann et al., 2004), ヒストンなど漏出蛋白の一部は細胞障害性成分を含んでいるため, 直接的な血管内皮細胞障害を介して臓器障害を招く (Gupta and Kaplan, 2016). この NETs による局所の炎症病態は AAV の超急性期から生じており, NETs は AAV の新たな治療ターゲットとなりうる. 本研究では rTM の細胞障害性ヒストンの中和作用に着目し, rTM が NETs 制御を介して AAV の臓器保護作用を示すと仮説を立て, AAV モデル動物を用いて検証した. AAV モデル動物には, human myeloperoxidase (hMPO) の能動免疫による誘導型 AAV モデルラット (Little et al., 2009), および AAV 自然発症マウスである Spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming/Kinjoh (SCG/Kj) マウス (Kinjoh et al., 1993) を用いた.

方法

1　動物と治療

1.1　ANCA 関連血管炎モデルラット

Wistar Kyoto (WKY) ラット (Japan Charles River) を用いた. Day 0 に complete Freund's adjuvant (Merck) に溶解した 400 μg/kg の hMPO (RayBiotech) を用いて, 5 週齢の雄の WKY ラット (n=6/群) に免疫を行った (AAV 群). コントロール群 (n=5/群) では 400 μg/kg の HSA (Merck) を用いて同様に免疫を行った. 800 ng/rat の Pertussis toxin (Merck) を day 0 と day 2 に腹腔内注射した. 以上, 既報に従い AAV モデルラットを作成した (Little et al., 2009).

1.2　SCG/Kj マウス

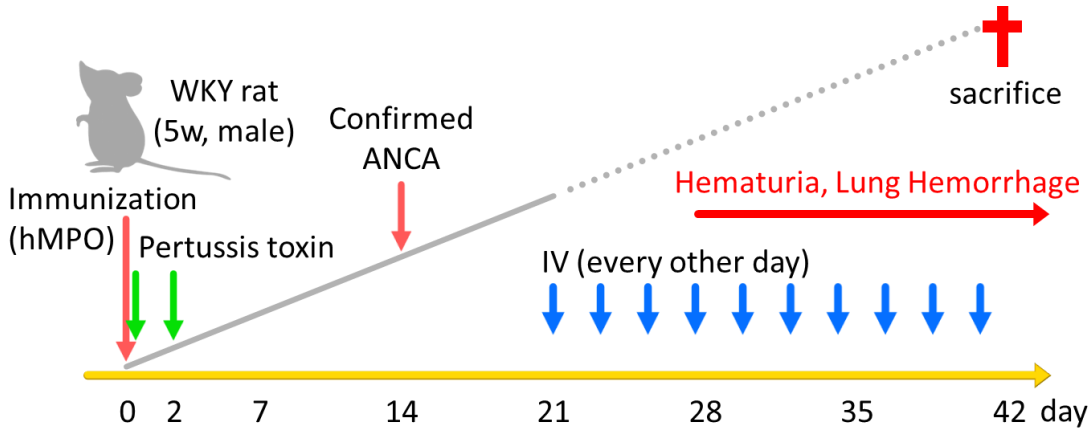
AAV を自然発症する SCG/Kj マウス (10-11 週齢の雌, National Institutes of Biomedical Innovation, Health, and Nutrition) (n=5/群) を用いた.

なお, 動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認のもと, 北海道大学動物実験に関する規定に従い行った (承認番号: 15-0034 および 17-0016).

1.3　治療

hMPO を免疫した AAV モデルラット, ならびに HSA を免疫したコントロール群のラットに Day 21 から day 42 まで, 3 mg/kg の rTM (Asahi Kasei Pharma) または phosphate-buffered saline (PBS) を隔日静脈内注射した. hMPO を免疫した AAV モデルラットにおいて, day 14 に抗 hMPO 抗体（間接蛍光抗体法）の産生を確認した. すべてのラットを day 42 に屠殺して採血と解剖を行った.

SCG/Kj マウスでは MPO-ANCA の産生を確認した上で, 1 mg/kg の rTM または PBS を腹腔内投与した (3 週間, 隔日). その後に屠殺して採血と解剖を行った (下記 Figure 3, 4 参照).



	Immunization	Intravenous injection (IV)
1 (n=5)	HSA (400μg/kg)	PBS
2 (n=5)	HSA (400μg/kg)	rTM (3mg/kg)
3 (n=6)	hMPO (400μg/kg)	PBS
4 (n=6)	hMPO (400μg/kg)	rTM (3mg/kg)

Figure 3.　AAV モデルラットに対する治療方法

hMPO を免疫した AAV モデルラット，ならびに HSA を免疫したコントロール群のラットに Day 21 から day 42 まで，3 mg/kg の rTM または PBS を隔日静脈内注射した．すべてのラットを day 42 に屠殺して採血と解剖を行った．

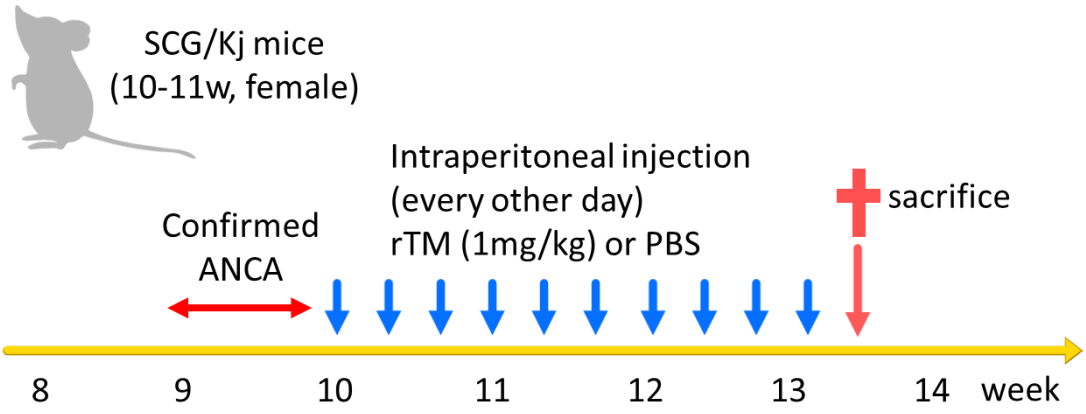


Figure 4.　SCG/Kj マウスに対する治療方法

SCG/Kj マウスの MPO-ANCA の産生を確認した上で，1 mg/kg の rTM または PBS を腹腔内投与した (3 週間，隔日)．その後に屠殺して採血と解剖を行った．

2　評価

2.1　組織学的検討

解剖時に肺と腎臓を採取した. 10% ホルマリン固定後に作成したパラフィン包埋切片は, hematoxylin and eosin (HE) 染色 (肺) および periodic acid-methenamine-silver (PAM) 染色 (腎臓) を行った. また蛍光免疫染色のため, 肺と腎臓を 4% PFA で 2 時間固定後に 30% スクロースで 24 時間脱水し, O.C.T. compound (Sakura) に包埋して 5 μm の凍結超薄切片を作成した.

肺出血は HE 染色にて既報 (Little et al., 2009) に従い定量評価した (0 =出血なし, 1 =1 領域, 2 =2-5 領域, 3 =6-12 領域, 4 =>12 領域). 肺の組織障害を terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) 染色で評価した. また ANCA によって誘導される NETs の形成には, peptidylarginine deiminase-4 (PAD4) の活性化によりヒストン蛋白がシトルリン化 (Citrullinated histone: CitH3) されて起こる核の脱凝縮が重要であり, 肺組織の NETs を CitH3 染色で評価した. TUNEL 陽性細胞, ならびに CitH3 陽性細胞は, 1 スライドあたり 5 視野 (倍率 100 倍) をランダムに撮像し, ImageJ software にて mean luminance value を測定して, NETs および壊死細胞を定量評価した. 腎の PAM 染色では, 1 スライドあたり 300 個の糸球体を観察し, 糸球体病変 (半月体, 管内細胞増殖) を評価した.

2.2　生化学検査

屠殺前に代謝ケージを用いて蓄尿を行い, 血尿は dipstick (Siemens) を用いて評価した. 腎機能の指標である血清中の blood urea nitrogen (BUN) の測定は, 岸本研究所に依頼した.

2.3　RNA の抽出と Real-time PCR

本研究では Qiagen mRNA Extraction Kit (Qiagen) を用いて, ラットの腎臓から mRNA を抽出した. 抽出した mRNA は濃度を調整後, SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) による逆転写により cDNA とした. SYBR Green Dye Detection System による Real-time PCR 法で, ラット tumor necrosis factor (TNF)-α mRNA の発現を定量し, ハウスキーピング遺伝子であるラット Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) mRNA の発現量にて標準化した. 下記のプラ

イマーを使用した.

TNF-α: F-TACTCCCAGGTTCTCTTCAAGG, R-GGAGGCTGACTTTCTCCTGGTA.
GAPDH: F-ATGGGAGTTGCTGTTGAAGTCA, R-CCGAGGGCCCACTAAAGG.

2.4　循環血液中の NETs

AAV モデルラット, ならびに AAV 自然発症マウス体内の循環血液中の NETs を呈する好中球を評価するため, 解剖時の血液全血を EDTA 管に採取した. 赤血球溶血バッファーを用いて溶血した後に, 5 μM の Sytox Green (SG) を添加し, 室温で 15 分間インキュベートした. フローサイトメーターで forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) により顆粒球をゲートし, SG 陽性好中球を循環 NETs として定量した. 同様に SG 陽性 NETs を蛍光顕微鏡による live cell imaging で形態的に評価した.

血清中の NETs を含む死細胞由来の可溶性 DNA を PICO Green dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) により評価した.

2.5　血清 ANCA 値の測定

2.5.1　間接蛍光抗体法

4% paraformaldehyde (PFA) により固定したヒト好中球標本に, 160 倍に希釈したラットの血清を添加し, 37℃で 60 分培養した. PBS で 3 回洗浄後に, 250 倍希釈の FITC-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch) を 60 分室温で反応させた. PBS で 3 回洗浄後に 4', 6-Diamidine-2'-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich)を含む封入剤で封入し, 蛍光顕微鏡で観察した. 各スライドの mean luminance value を ImageJ software にて解析し, ANCA 値を定量評価した.

2.5.2　ELISA 法

ELISA 法による SCG/Kj マウスの血清 MPO-ANCA 値の測定は, A-CLIP 研究所に依頼した.

3　統計学的解析

Student の t 検定を用いて統計学的評価を行い, p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした. 統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad) を用いて行った.

結果

1　肺および腎病変

1.1　ANCA 関連血管炎モデルラット

1.1.1　肺出血の検討

AAV モデルラットでは解剖時に肉眼的に肺出血点が確認され, rTM 群では PBS 群と比較して出血病変が軽度であった. HE 染色による組織学的検討では, AAV モデルラットにおいてびまん性に肺胞出血を認めたが, rTM 投与群では軽減しており肺出血スコアは有意に低値であった (Figure 5, 6).

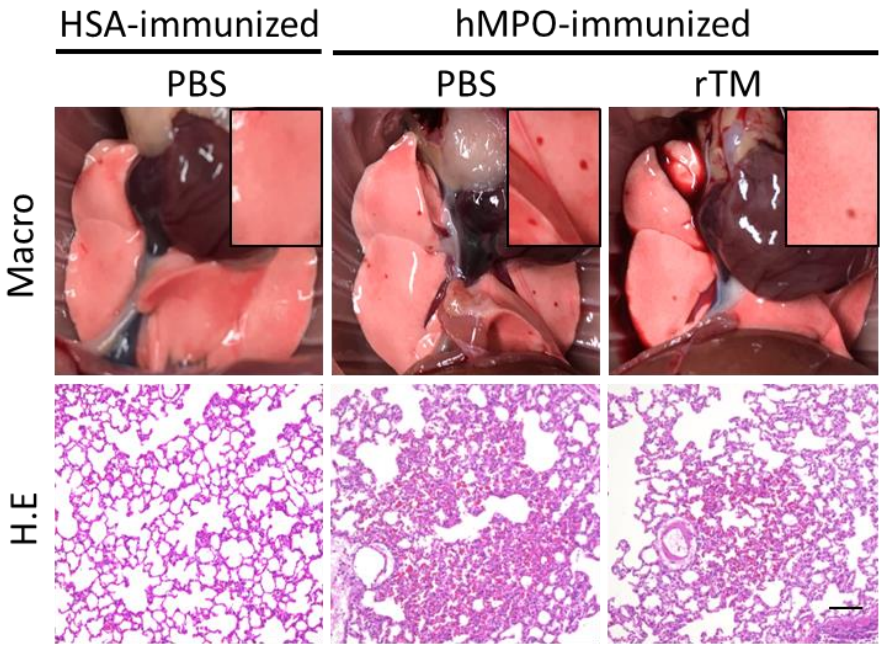


Figure 5.　AAV モデルラットにおける肺出血の検討
上段は解剖時の肺の肉眼所見, 下段は肺の HE 染色による組織学的所見を示す. AAV モデルラットでは解剖時に肉眼的に肺出血点が確認され, rTM 群では PBS 群と比較して出血病変が軽度であった. HE 染色による組織学的検討では, AAV モデルラットにおいてびまん性に肺胞出血を認めたが, rTM 投与群では軽減していた. Scale bar: 100μm.

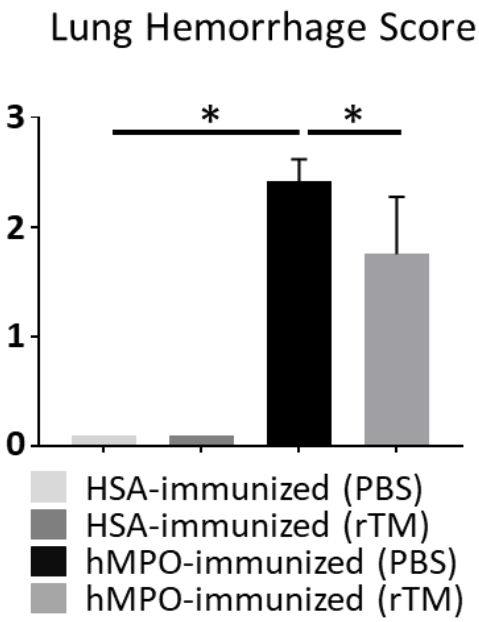


Figure 6.　HE 染色による組織学的肺出血数の評価

AAV モデルラットの rTM 群では PBS 群と比較して肺出血スコアが有意に低値であった. 0 =出血なし, 1 =1 領域, 2 =2-5 領域, 3 =6-12 領域, 4 =>12 領域としてスコア化した. データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群, コントロールラット: n=5/群. *p<0.05.

1.1.2　肺における NETs の検討

NETs の形成過程であるヒストンのシトルリン化を NETs マーカーとして, 肺に浸潤する NETs を CitH3 免疫染色で評価した. CitH3 陽性 NETs は AAV モデルラットの肺に広範囲にびまん性に観察されたが, rTM 群では NETs の形成が有意に抑制されていた (Figure 7, 8).

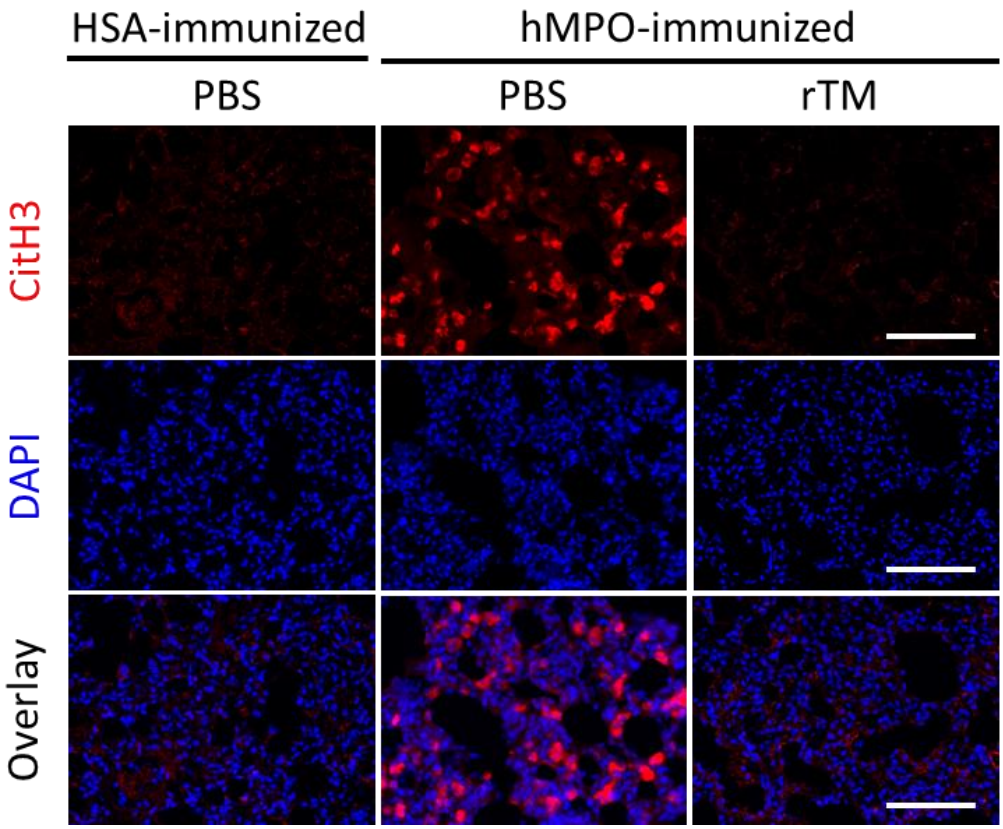


Figure 7.　AAV モデルラットの肺における NETs の検討

CitH3 陽性 NETs は AAV モデルラットの肺に広範囲にびまん性に観察されたが, rTM 群では NETs の形成が抑制されていた. 赤は CitH3, 青は DAPI を示す. Scale bar: 100μm.

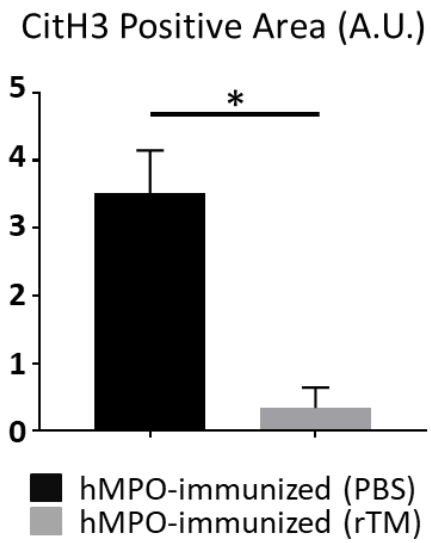


Figure 8.　CitH3 免疫染色による肺 NETs の評価

肺に浸潤する CitH3 陽性 NETs は AAV モデルラットの rTM 群において PBS 群と比較し有意に抑制されていた. データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群. *p<0.05.

1.1.3　肺における壊死細胞の検討

肺における壊死細胞を TUNEL 染色を用いて評価した. AAV モデルラットの rTM 群では PBS 群と比較して, TUNEL 陽性細胞が有意に少なかった (Figure 9, 10). HE 染色をベースにした酵素抗体法による TUNEL 染色により, 肺胞上皮細胞および免疫細胞が TUNEL 陽性細胞であると同定した (Figure 11).

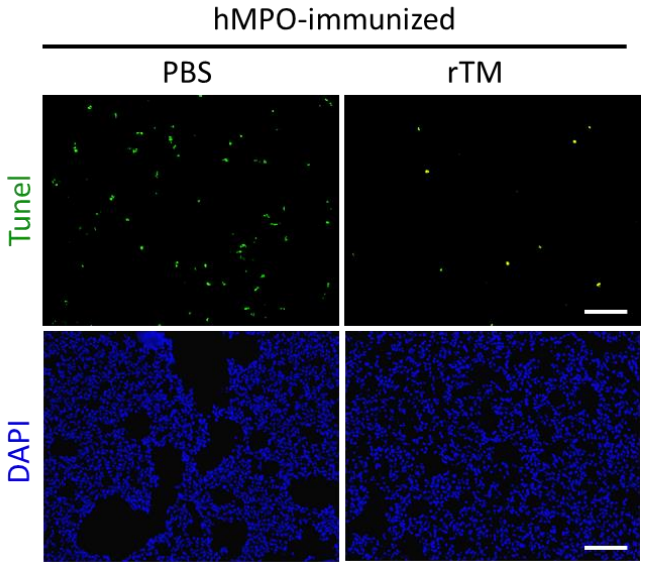


Figure 9.　AAV モデルラットの肺における壊死細胞の検討

AAV モデルラットの rTM 群では PBS 群と比較して, 肺における TUNEL 陽性細胞が少なかった. 緑は TUNEL, 青は DAPI を示す. Scale bar: 100μm.

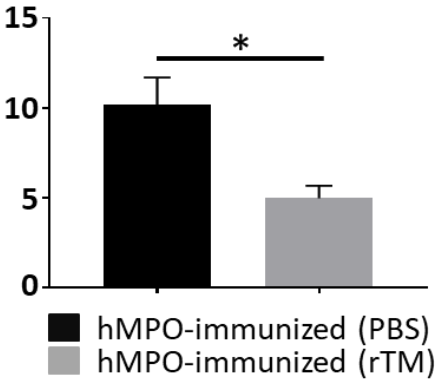


Figure 10.　TUNEL 染色による肺壊死細胞の評価

AAV モデルラットの rTM 群では PBS 群と比較し肺の TUNEL 陽性細胞が有意に少なかった．データは平均±標準誤差で示した．AAV モデルラット：n=6/群．*p<0.05.

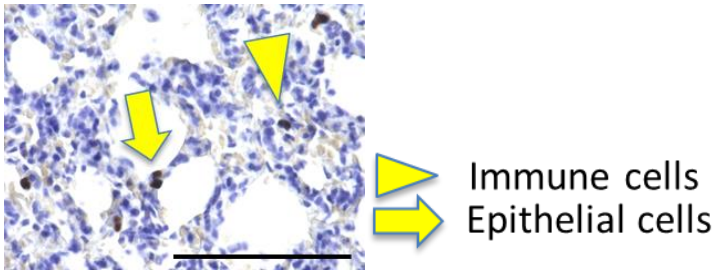


Figure 11.　酵素抗体法による肺 TUNEL 染色の検討

酵素抗体法による TUNEL 染色により，肺胞上皮細胞および免疫細胞が TUNEL 陽性細胞であると同定された．矢印は肺胞上皮細胞，三角は免疫細胞を示す．紫はヘマトキシリン染色を示す．Scale bar: 100μm.

1.1.4　血尿および腎機能の検討

AAV モデルラットの rTM 群では PBS 群と比較して，血尿が有意に低値であった．血清 BUN 値はいずれの群でも正常域であり，有意な差を認めなかった (Figure 12).

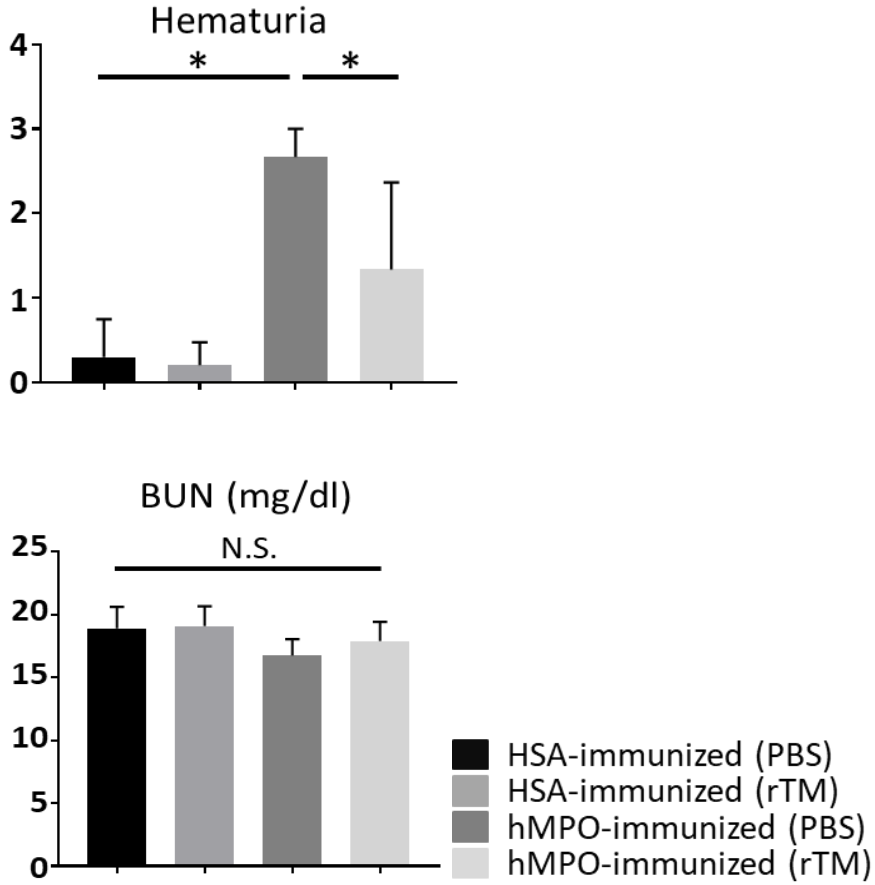


Figure 12.　AAV モデルラットにおける血尿および腎機能の検討

上段は血尿，下段は血清 BUN を示す. AAV モデルラットの rTM 群では PBS 群と比較して，血尿が有意に低値であった．血清 BUN 値はいずれの群でも正常域であり，有意な差を認めなかった．データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群，コントロールラット: n=5/群. *p<0.05. N.S. = not significant.

1.1.5　腎臓の組織学的検討

腎臓の糸球体病変を PAM 染色で評価した. AAV モデルラットにおいて増殖性腎炎や硬化病変の所見が観察されたが, いずれも少数であり, rTM 群と PBS 群とで有意な差は認められなかった (Figure 13, 14). 半月体の形成はいずれの群においてもみられなかった.

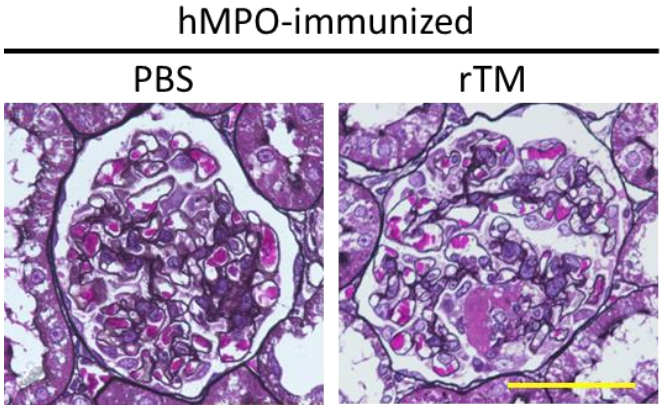


Figure 13.　AAV モデルラットの腎臓の組織学的検討 (PAM 染色)

AAV モデルラットにおいて増殖性腎炎や硬化病変の所見が観察された. 半月体の形成はいずれの群においてもみられなかった. Scale bar: 50μm.

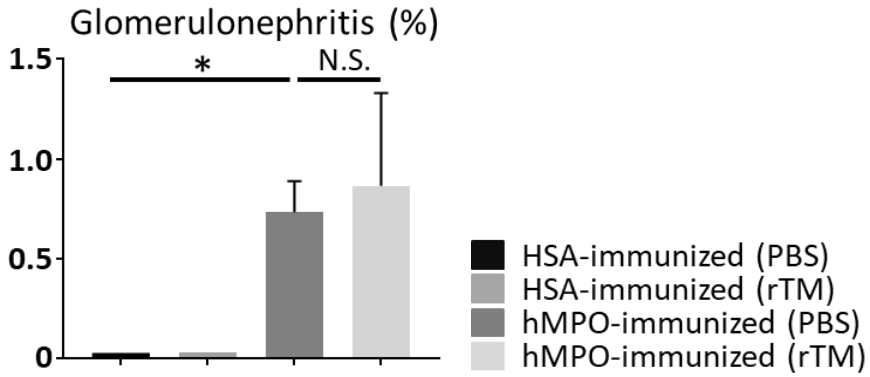


Figure 14.　PAM 染色による腎糸球体病変の評価

rTM 群と PBS 群とで糸球体病変の有意な差は認められなかった. データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群, コントロールラット: n=5/群.

*p<0.05. N.S. = not significant.

1.1.6　腎臓における TNF-α 遺伝子発現量の検討

AAV モデルラットの腎臓では TNF-α の遺伝子発現量は増加しており, rTM 群においては PBS 群と比較して有意に発現量が減少した (Figure 15).

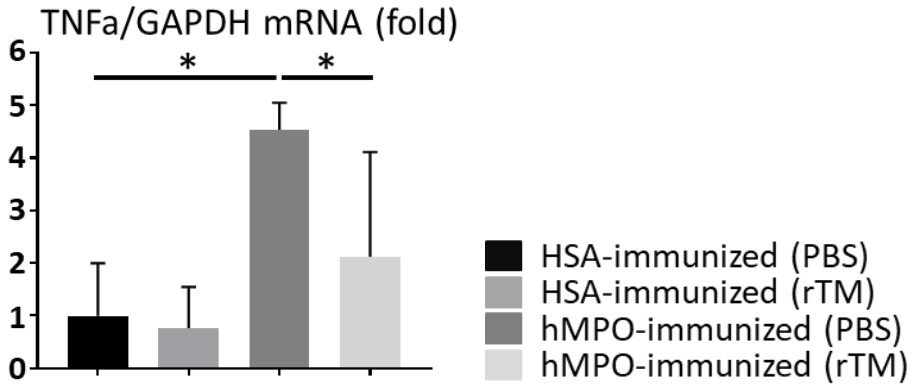


Figure 15.　AAV モデルラットの腎臓における TNF-α 遺伝子発現量の検討

AAV モデルラットの腎臓では TNF-α の遺伝子発現量は増加しており, rTM 群においては PBS 群と比較して有意に発現量が減少した. データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群, コントロールラット: n=5/群. *p<0.05.

2　SCG/Kj マウス

1.2.1　生存率の検討

SCG/Kj マウス (n=5/群) のうち PBS 群の n=2 は治療中に死亡した (Figure 16).

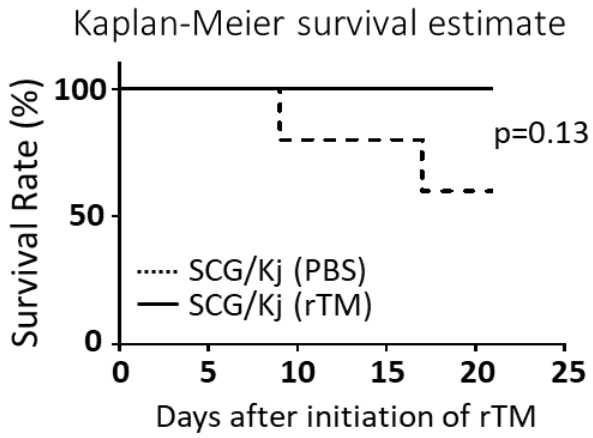


Figure 16.　SCG/Kj マウスの生存率の検討 (カプランマイヤー曲線)

SCG/Kj マウスの PBS 群の n=2 は治療中に死亡した. n=5/群.

1.2.2　体重減少の検討

体重減少は血管炎の疾患活動性の指標であるが, 解剖時の PBS 投与群の SCG/Kj マウスの体重は, rTM 群に比べて有意に少なかった (Figure 17).

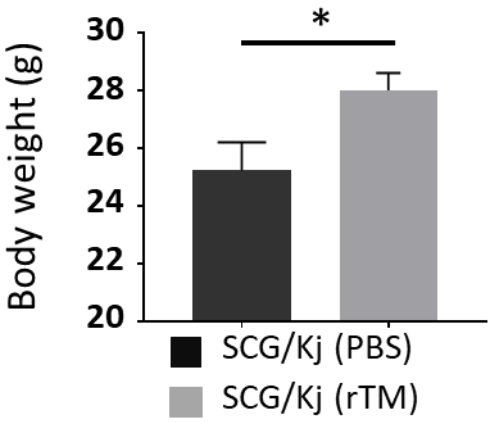


Figure 17.　SCG/Kj マウスの解剖時の体重

解剖時の PBS 投与群の SCG/Kj マウスの体重は, rTM 群に比べて有意に少なかった. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. *p<0.05.

1.2.3　血尿および腎機能の検討

SCG/Kj マウスでは, rTM 群および PBS 群のいずれにおいても，血尿および血清 BUN 値に有意な差を認めなかった (Figure 18).

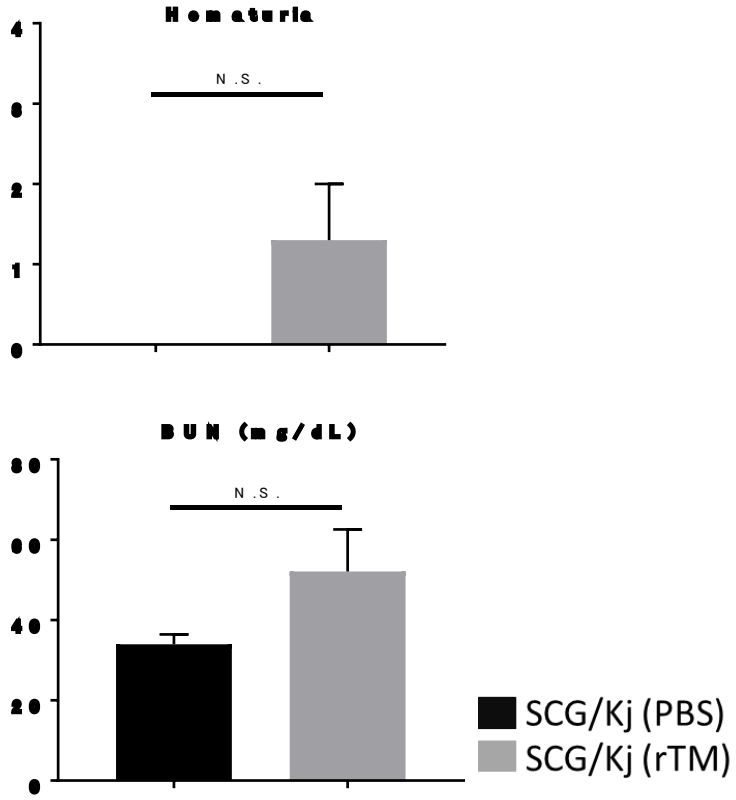


Figure 18.　SCG/Kj マウスにおける血尿および腎機能

上段は血尿，下段は血清 BUN を示す. SCG/Kj マウスでは, rTM 群および PBS 群のいずれにおいても，血尿および血清 BUN 値に有意な差を認めなかった. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. N.S. = not significant.

1.2.4　腎臓の組織学的検討

腎臓の糸球体病変を PAM 染色で評価した. SCG/Kj マウスでは, rTM 群と PBS 群の両群において半月体形成, 内皮細胞障害, 硬化病変を多数認めた. rTM 群と PBS 群とで有意な差は認められなかった (Figure 19).

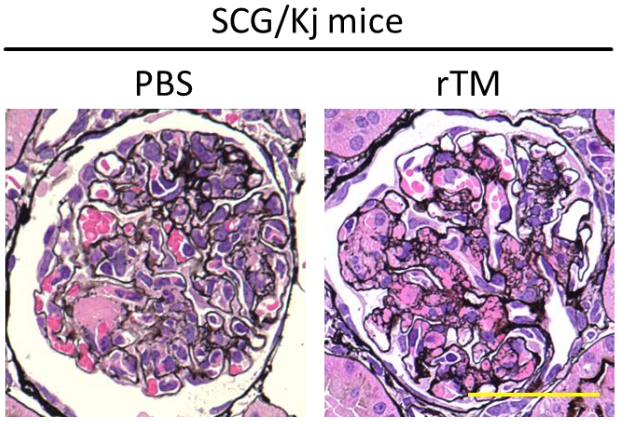


Figure 19.　SCG/Kj マウスの腎臓の組織学的検討 (PAM 染色)
SCG/Kj マウスでは, rTM 群と PBS 群の両群において半月体形成, 内皮細胞障害, 硬化病変を多数認めた. rTM 群と PBS 群とで有意な差は認められなかった.
Scale bar: 50μm.

2　循環血液中の NETs

2.1　FCM および live cell imaging による評価

AAV モデルラットおよび SCG/Kj マウスの末梢血を採取し, FCM により FSC と SSC から好中球分画を抽出して, SG 陽性好中球を循環血液中の NETs として評価した. HSA 免疫ラットに比べて AAV モデルラットの循環 NETs は増加したが, rTM 治療で AAV モデルラットの循環 NETs は有意に減少した (Figure 20). 同様に SCG/Kj マウスでは, rTM 群において循環 NETs が少ない傾向を示した (FCM および Live cell imaging による評価, Figure 21).

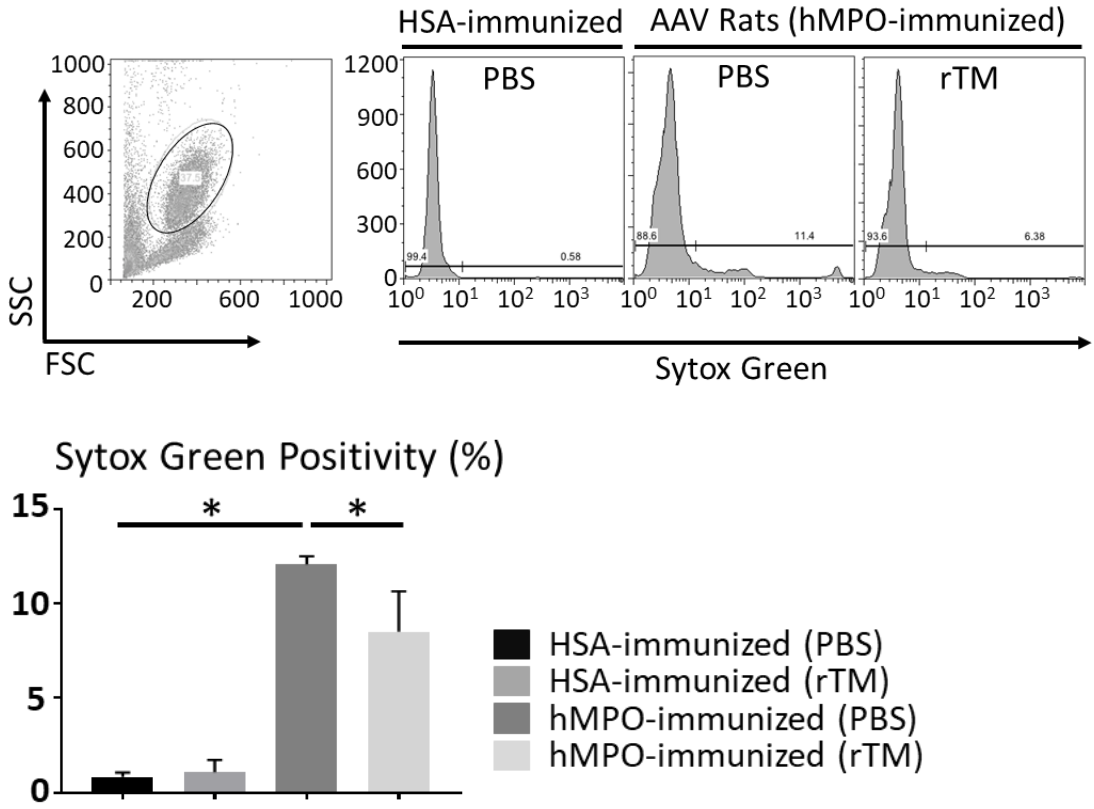


Figure 20.　AAV モデルラットの FCM による循環 NETs の評価

上段は forward scatter と side scatter による好中球分画の抽出, および SG 陽性好中球のヒストグラムを示す. 下段は SG 陽性好中球率を示す. HSA 免疫ラットに比べて AAV モデルラットの循環 NETs は増加したが, rTM 治療で AAV モデルラットの循環 NETs は有意に減少した. データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群, コントロールラット: n=5/群. *p<0.05.

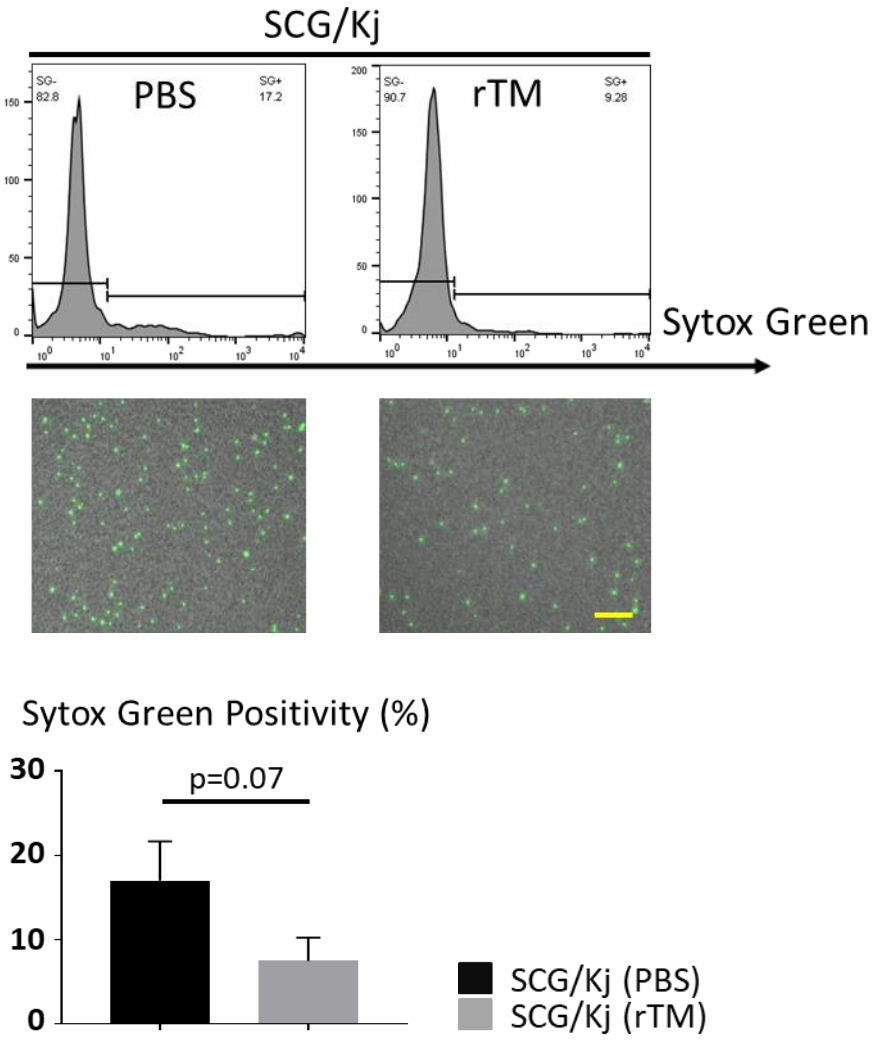


Figure 21.　SCG/Kj マウスの FCM および live cell imaging による循環 NETs 評価
上段は FCM による SG 陽性好中球のヒストグラムを示す. 中段は live cell imaging による SG 陽性好中球を示す. 下段は FCM による SG 陽性好中球率を示す. SCG/Kj マウスでは, rTM 群において循環 NETs が少ない傾向を示した. 緑は SG を示す. Scale bar: 50μm. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群.

2.2　血清 DNA による評価

血清中の NETs を含む死細胞由来の可溶性 DNA は, AAV モデルラットでは rTM 群において有意に低値であった. SCG/Kj マウスでは rTM 群と PBS 群との間に差を認めなかった (Figure 22).

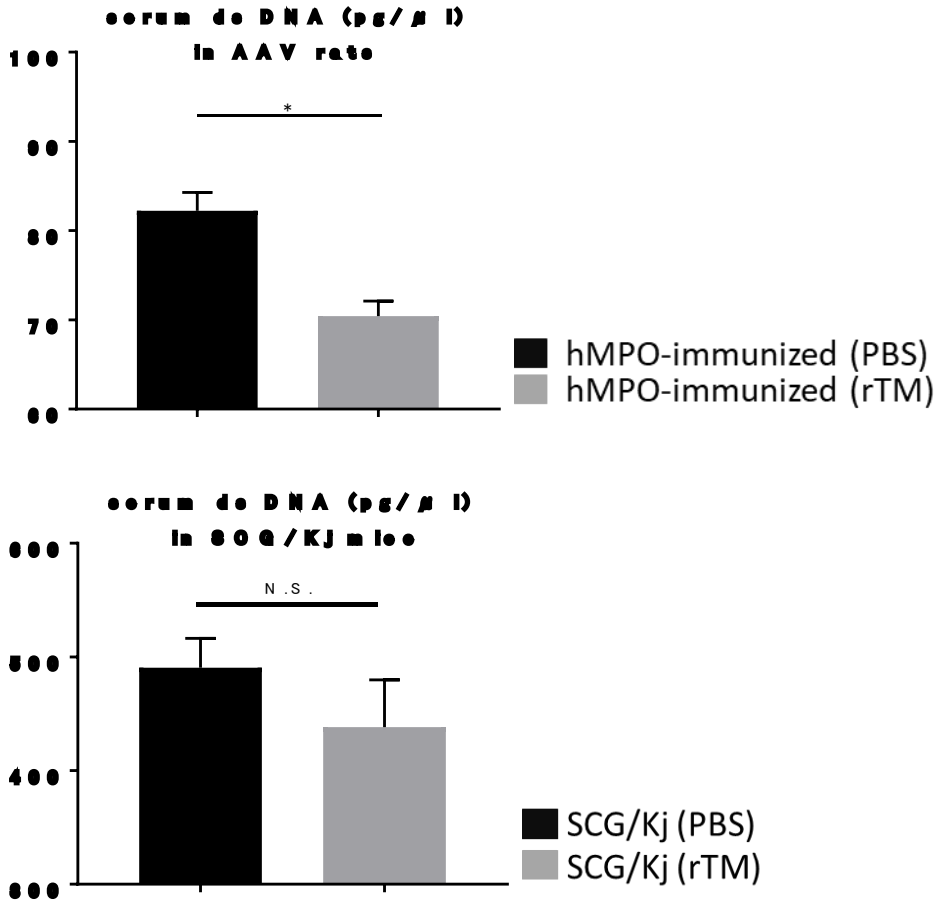


Figure 22.　血清 DNA による循環 NETs の評価

上段は AAV モデルラット，下段は SCG/Kj マウスの血清 DNA 値を示す. AAV モデルラットでは rTM 群において有意に低値であった. SCG/Kj マウスでは rTM 群と PBS 群との間に差を認めなかった. データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群, SCG/Kj マウス: n=5/群. *p<0.05. N.S. = not significant.

3　血清 ANCA

AAV モデルラットの血清 ANCA 値は間接蛍光抗体法により評価した. hMPO 免疫後の day14 では, すべての AAV モデルラットにおいて同等の ANCA の産生を確認した. rTM および PBS による治療終了後の day42 では, rTM 群において ANCA 値が有意に低値であった (Figure 23).

SCG/Kj マウスの血清 MPO-ANCA 値は ELISA 法により評価した. 治療開始前の 10 週齢の SCG/Kj マウスすべてで MPO-ANCA の産生を確認した. rTM および PBS による治療終了後の day21 では, PBS 群の全例で MPO-ANCA 値が上昇したが, rTM 群の 60%で MPO-ANCA 値の減少を認めた (Figure 24).

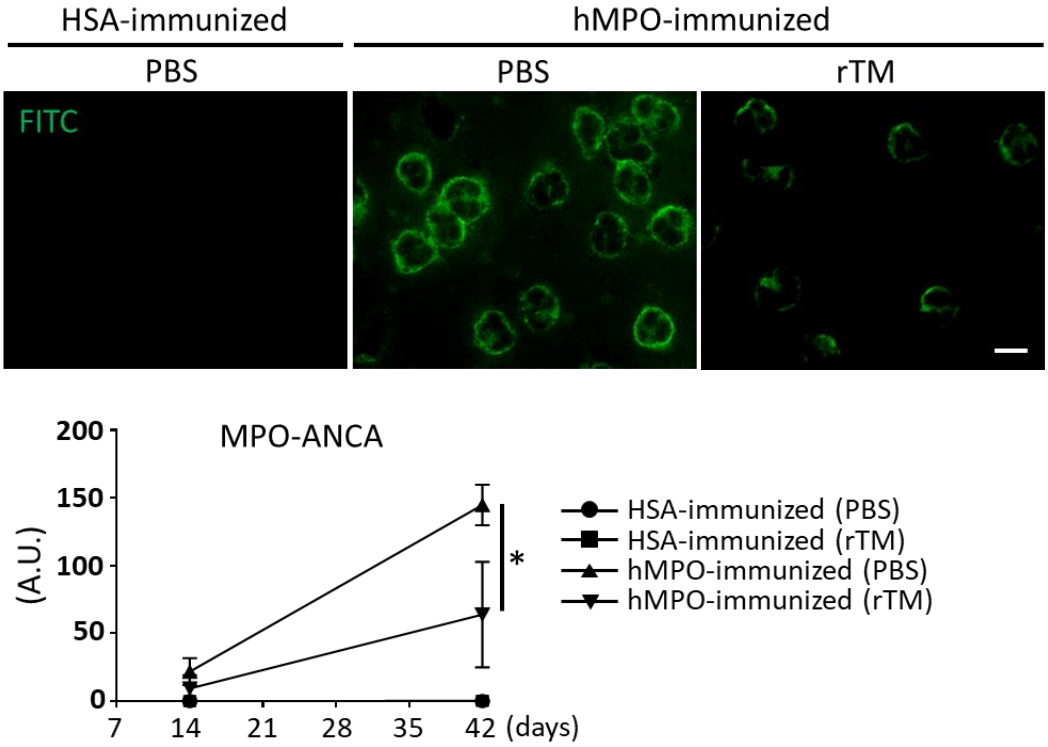


Figure 23. AAV モデルラットにおける間接蛍光抗体法を用いた血清 ANCA 評価
上段は治療終了後の day42 における血清 ANCA を示す. 下段は ImageJ を用いた血清 ANCA の定量評価を示す. hMPO 免疫後の day14 では, すべての AAV モデルラットにおいて同等の ANCA の産生を確認した. rTM および PBS による治療終了後の day42 では, rTM 群において ANCA 値が有意に低値であった. 緑は FITC を示す. Scale bar: 10μm. データは平均±標準誤差で示した. AAV モデルラット: n=6/群, コントロールラット: n=5/群. *p<0.05.

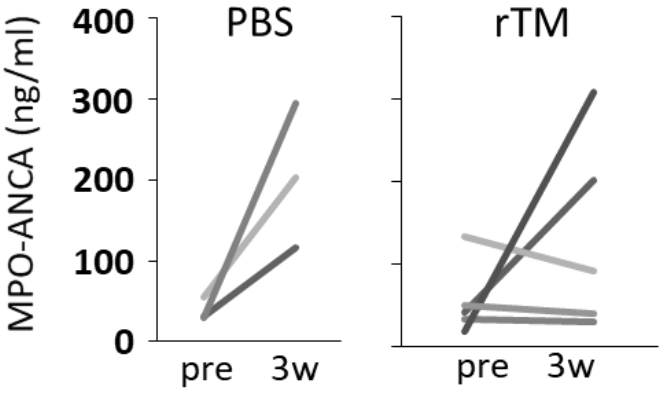


Figure 24.　SCG/Kj マウスにおける ELISA 法を用いた血清 ANCA 評価
治療開始前および治療終了後の SCG/Kj マウスにおける血清 ANCA の推移を示す. 治療開始前の 10 週齢の SCG/Kj マウスすべてで MPO-ANCA の産生を確認した. rTM および PBS による治療終了後の day21 では, PBS 群の全例で MPO-ANCA 値が上昇したが, rTM 群の 60%で MPO-ANCA 値の減少を認めた.

考察

hMPO 能動免疫による誘導型 AAV モデルラットと, AAV 自然発症マウスを用いて rTM の効果を検証した. 誘導型 AAV ラットの実験では, rTM 治療により, 循環 NETs および組織中の NETs が減少し, ANCA 値の低下とともに肺障害や腎障害などの臓器障害が軽減した. 自然発症モデルマウスである SCG/Kj マウスへの rTM 治療は, 体重減少の抑制, 循環 NETs の減少, および ANCA 値の低下を示す傾向が見られたが, 他の臓器病変においては rTM の効果は認めず, 自然発症モデル特有の表現系のばらつきが大きいことや, 治療経過中に死亡で脱落したマウスがいたことが影響したと考えられる.

rTM は DIC に対する治療薬として, 抗凝固作用による臓器保護を期待して実臨床で用いられている (Saito et al., 2007). AAV においても, 血管内皮障害や NETs を介した過凝固が病態の進展に関与している (Nakazawa et al., 2012b). しかし, ラットにおける APC の発現はヒトと比較して低く, rTM による抗凝固作用はラットにおいては発揮されない (Mohri et al., 1997) ため, 本実験での rTM は抗凝固を介したものではなく, ヒストン中和などの血管内皮保護作用により AAV が改善すると仮説を立てたところ, 血管炎による臓器障害の改善のみならず NETs の減少や ANCA 産生の抑制など免疫系に与える影響も示唆された.

AAV モデルにおける rTM の多面的な影響を検証するため, 第二章で rTM の NETs 抑制分子メカニズムを解明し, 第三章では NETs による血管内皮細胞障害における rTM の保護効果, 第四章では rTM による ANCA 産生抑制の機序について検証する.

結語

rTM は AAV モデル動物の NETs と ANCA を減少させるとともに, 臓器障害を軽減した.

第二章

ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果の検討

緒言

第一章では, rTM が循環 NETs および組織中の NETs の減少とともに, AAV の臓器障害を改善したことを示した. AAV モデル動物体内の NETs の減少の機序については, 1) NETs を誘導する ANCA の産生自体が減少したことによる間接的な影響, 2) NETs や障害臓器から放出されるヒストン誘導性 NETs (Nakazawa et al., 2017) に対する rTM のヒストン中和作用 (Nakahara et al., 2013), 3) rTM が好中球へ直接作用して NETs を抑制する可能性が想定される. 3)の好中球への rTM の直接作用については未解明であり, 本章では rTM の ANCA 誘導 NETs に対する抑制効果, およびその分子メカニズムを明らかにすることを目的として実験を行った. MPO-ANCA による NETs 誘導機序は, 好中球の対応抗原である細胞内 MPO が TNF-α 等の刺激で細胞表面に表出されて MPO-ANCA の Fab 領域と結合し, さらに ANCA-Fc 部が Fcγ 受容体と架橋結合して好中球内の NADPH 活性→ヒストンシトルリン化→核の脱凝縮→NETs 放出に至ると考えられている (Kallenberg, 2011).

まず, AAV 患者血清から抽出した IgG (ANCA-IgG) を健常者由来好中球と反応させて NETs を誘導し, rTM による NETs 抑制効果を評価した. この NETs 抑制効果が, NETs を構成するヒストンに対する rTM の中和作用によるのか, 好中球に対する rTM の直接作用によるのかを明らかにするために, ANCA 誘導 NETs の培養上清中のヒストン濃度の検討, および rTM と好中球との結合能の検討を行った. そして, rTM と好中球との結合に関わる分子について検証した. この結合分子の候補として, 単核球と rTM との結合分子の一つである, 細胞接着分子 β2 インテグリンの Mac-1 (CD11b/CD18) を挙げた (Kawamoto et al., 2016). Mac-1 は好中球表面に発現し, ANCA 誘導 NETs の形成過程の ANCA-Fc 部と Fcγ 受容体の架橋に関わるため (Radford et al., 2000) (Hewins et al., 2004), rTM が Mac-1 に結合して ANCA の架橋を阻害して NETs 誘導を抑制すると仮説を立てた. rTM と好中球との結合における Mac-1 の関与を評価するために, 抗 CD18 モノクローナル抗体に加えて, ヒト前骨髄性白血病細胞株である human promyelocytic leukemia cells (HL-60) の Mac-1 ノックダウン細胞を用いた. HL-60 細胞は, all-trans-retinoic acid (ATRA) を添加して顆粒球に分化誘導することで, 細胞表面に Mac-1 が発現することが知られている (Drayson et al., 2001). 分化 HL-60 細胞の

Mac-1 発現, および siRNA を用いた Mac-1 ノックダウンを確認の上, 実験を行った.

方法

1　好中球の分離

Polymorph Prep (Axis-Shield) を用いた比重遠心分離により, 健常人末梢血から好中球を分離した.

2　Immunoglobulin G (IgG) の抽出

IgG 濃縮用スピンカラムである Protein G HP SpinTrap (GE Healthcare) を用いて, 健常人または MPO-AAV 患者の血清から IgG を抽出した. 患者末梢血は書面による同意を得た上で採取し, 分離した血清は-80°C 下で保管した.

3　NETs の誘導と評価

分離した健常人の好中球を, RPMI 1640 培地 (Merck) で 1×10^6 cells/ml となるよう調整し, マイクロスライドに播種した後, 5%二酸化炭素インキュベーター内で 37°C 下で培養した. rTM (200 μg/ml) または PBS を 15 分間, 続けて TNF-α (5 ng/ml) を 30 分間 pre-treatment した後, 健常人または MPO-AAV 患者血清から抽出した IgG (ANCA-IgG) (200 μg/ml) とともに 3 時間培養した. 形成された NETs を CitH3 免疫染色および FCM による SG 陽性好中球率により評価した.

4　CitH3 免疫染色

4% PFA により標本を固定した後, 100 倍に希釈した rabbit anti-CitH3 antibody (Abcam) を添加して 4℃で 24 時間インキュベートした. PBS で 3 回洗浄後に, 500 倍希釈の alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) を 60 分室温で反応させた. PBS で 3 回洗浄後に DAPI を含む封入剤で封入し, 蛍光顕微鏡で観察した. CitH3 陽性 NETs 数を ImageJ software にて解析し, DAPI 陽性好中球数により標準化した.

5　NETs の培養上清中のヒストン濃度の測定

分離した健常人の好中球 (1×10^6 cells/ml) を, TNF-α (5 ng/ml) により 30 分間前処置した後, a) 培地 (ネガティブコントロール), b) 健常人血清 (10 %希釈), c) AAV 患者血清 (10 %希釈), d) phorbol myristate acetate (PMA) (100 nM) (ポジティ

ブコントロール) とともに 4 時間培養した. 培養上清中のヒストン濃度を, histone-DNA complex として ELISA 法により測定した (Roche). なお血清を添加した群では, 血清中のヒストン濃度を同方法で測定し減算した.

6　HL-60 細胞の培養

ヒト前骨髄性白血病細胞株である HL-60 細胞は, 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した RPMI 1640 培地 (Merck) を用いて継代培養を行った.

7　rTM と好中球との結合実験

7.1　FCM

分離した健常人の好中球 (2×10^6 cells/ml) を, His-tag 融合 rTM (200 μg/ml) (Asahi Kasei Pharma) とともに 37°C で 3 時間培養した. Fc レセプターブロッキング抗体 (Thermo Fisher Scientific) を氷上で 20 分間反応させた後, 2% FBS を添加した PBS で置換し, allophycocyanin (Dojindo) を標識した anti-His tag antibody (Abcam) とともに 30 分間暗室で反応させた. アイソタイプコントロール抗体は mouse IgG1 antibody (Merck) を用いた. rTM 結合好中球を BD FACS Calibur™ (BD Biosciences) により測定し, FlowJo software (BD Biosciences) を用いて定量評価した.

7.2　好中球を用いた cell adhesion assay

rTM (200 μg/ml), bovine serum albumin (BSA) (200 μg/ml), および intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (10 μg/ml) (PeproTech) をそれぞれ 96-well V-bottom plate に 100 μl/well 添加し, 4°C で 72 時間静置して固相化した. 分離した健常人の好中球を, $MgCl_2$ (2 mM) および $MnCl_2$ (2 mM) を添加した RPMI 1640 培地で 2×10^5 cells/ml となるよう調整し, calcein を標識させた後, CD18-blocking monoclonal antibody (CD18 mAb) (50 μg/ml) (Thermo Fisher Scientific) または control IgG (50 μg/ml) (Merck) とともに 37°C で 60 分間培養した. 96-well V-bottom plate に培養液を各 100μl 添加し, 37°C で 5 分間培養した後, 5 分間 1,000 rpm で遠心した. 各 well の中央部に蓄積した非結合細胞を SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) で測定し, 好中球の各固相化分子に対する結合率を評価した.

7.3　HL-60 細胞を用いた cell adhesion assay

7.3.1　HL-60 細胞の Mac-1 ノックダウン実験

対数増殖期の HL-60 細胞を 1 トランスフェクションあたり 1×10^6 細胞用意し, R-buffer 10 μl および 4 種類の Mac-1 特異的 small interfering RNA (siRNA) (Dharmacon) あるいはコントロール siRNA (500 nM) を加え, Neon transfection system (Thermo Fisher Scientific) を用いてエレクトロポレーション法によるトランスフェクションを施行した. Mac-1 特異的 siRNA の target 配列を下記に示す.

GUAAUGAUCAGGUGGUGAA, GCCAGAGAAUCCAGUGUGA,
GAGAUCUUGUUUAACGAUU, GAACCAGACUGUCAUAUGG.

HL-60 細胞は ATRA (1 μM) を添加して顆粒球に分化誘導後, 24 時間後と 48 時間後にそれぞれトランスフェクションを行い, 細胞は温めた RPMI1640 培地で培養した. 48 時間後のトランスフェクションから 24 時間後に細胞を回収し, 先述のように Qiagen mRNA Extraction Kit を用いて mRNA を抽出し, SuperScript III による逆転写により cDNA の合成を行った. SYBR Green Dye Detection System による Real-time PCR 法で Mac-1 mRNA の発現を定量し, ハウスキーピング遺伝子である GAPDH mRNA の発現量にて標準化した. プライマーは, エクソン境界を挟むように設計した下記配列を使用した.

Mac-1: F-GCCGGTGAAATATGCTGTCT, R-GCGGTCCCATATGACAGTCT.
GAPDH: F-GGGAAGCTTGTCATCAATGGA, R-TCTGGCTCCTGGAAGATGGT.

7.3.2　Cell adhesion assay

Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞を用いて, 先述と同様の方法で cell adhesion assay を施行した.

8　統計学的解析

Student の t 検定を用いて統計学的評価を行い, p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした. 統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad) を用いて行った.

結果

1　ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果

ANCA-IgG により刺激した好中球では，コントロールと比較して，CitH3 陽性かつ核腫大を呈する NETs の形成が有意に多く認められた．これらの ANCA 誘導 NETs は，rTM 群において PBS 群と比較し有意に減少した (Figure 25, 26). FCM による SG 陽性好中球率の評価においても，ANCA 誘導 NETs は rTM 群において PBS 群と比較し有意に低値であった (Figure 27).

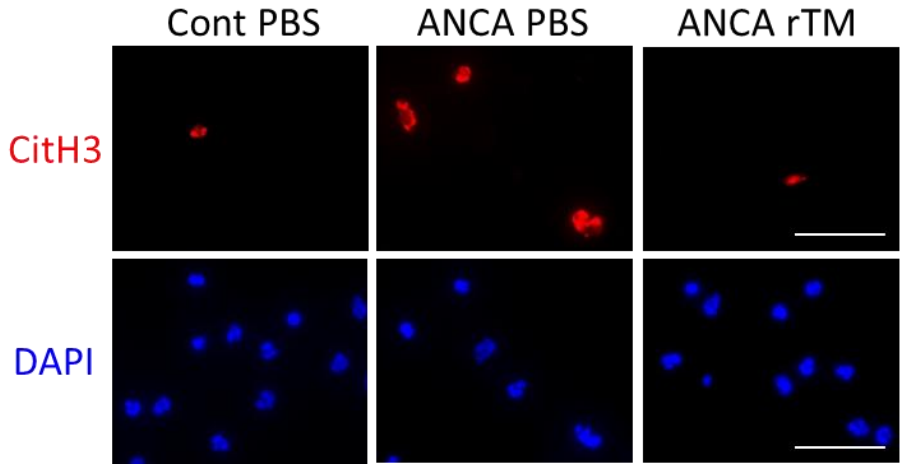


Figure 25.　ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果 (CitH3 免疫染色)

ANCA-IgG により刺激した好中球では，コントロールと比較して，CitH3 陽性かつ核腫大を呈する NETs の形成が有意に多く認められた．これらの ANCA 誘導 NETs は，rTM 群において PBS 群と比較し有意に減少した．赤は CitH3，青は DAPI を示す. Scale bar: 50μm.

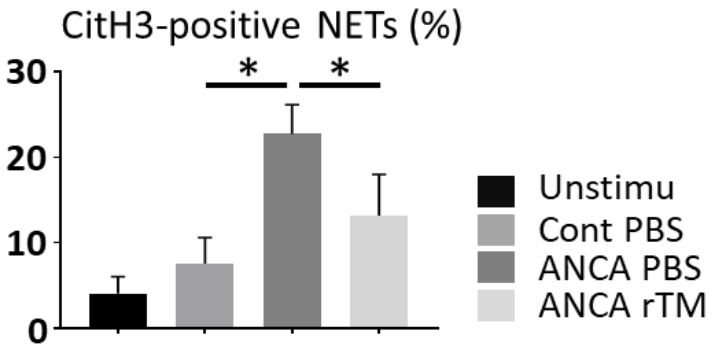


Figure 26.　CitH3 免疫染色による ANCA 誘導 NETs の評価
データは平均±標準誤差で示した. N=3. *p<0.05.

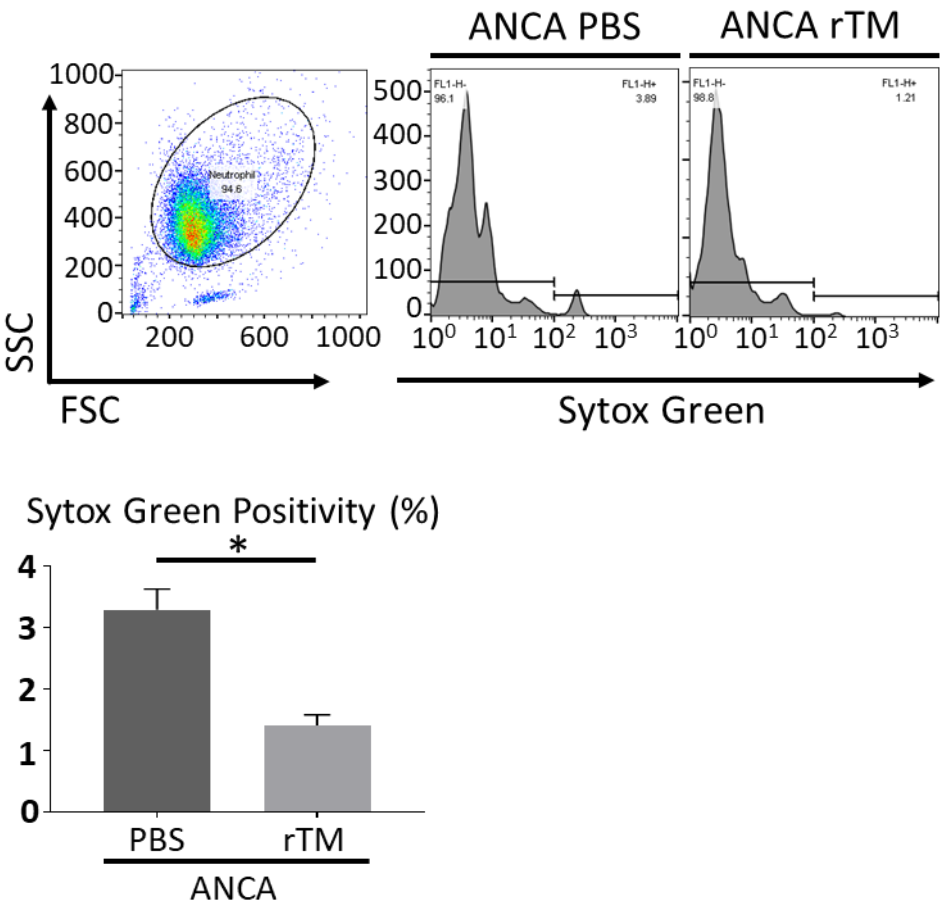


Figure 27.　ANCA 誘導 NETs に対する rTM の効果 (FCM)

上段は forward scatter と side scatter による好中球分画の抽出，および SG 陽性好中球のヒストグラムを示す．下段は SG 陽性好中球率を示す. ANCA 誘導 NETs は rTM 群において PBS 群と比較し有意に低値であった．データは平均±標準誤差で示した. N=3. *p<0.05.

2　ANCA 誘導 NETs の培養上清中のヒストン濃度の検討

AAV 患者血清により誘導した NETs の培養上清中のヒストン濃度は, 健常者血清により刺激した群と同等であり, 有意な差は認めなかった (Figure 28). 1 で示された ANCA 誘導 NETs に対する rTM の抑制効果は, NETs を構成するヒストンの中和作用の他に, 好中球への直接作用の影響が示唆された.

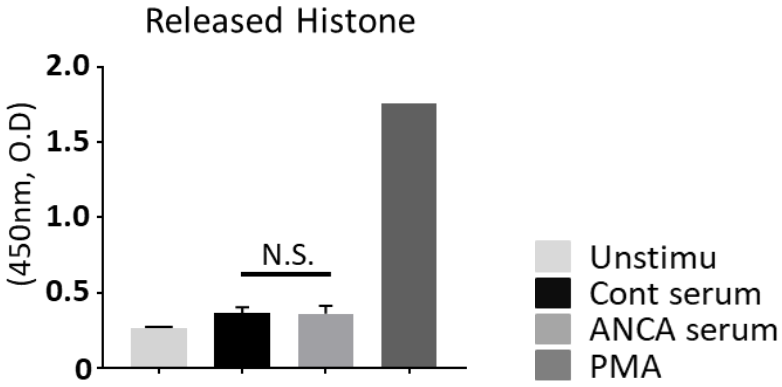


Figure 28.　NETs の培養上清中のヒストン濃度の検討

AAV 患者血清により誘導した NETs の培養上清中のヒストン濃度は, 健常者血清により刺激した群と同等であり, 有意な差は認めなかった. 培養上清中のヒストン濃度は, histone-DNA complex として ELISA 法により測定した. データは平均±標準誤差で示した. N=4. N.S. = not significant.

3　rTM と好中球との結合に関する検討

3.1　FCM による評価

His-tag 融合 rTM を添加した好中球では，非添加の好中球と比較し，His-tag 陽性好中球数が有意に増加した (Figure 29).

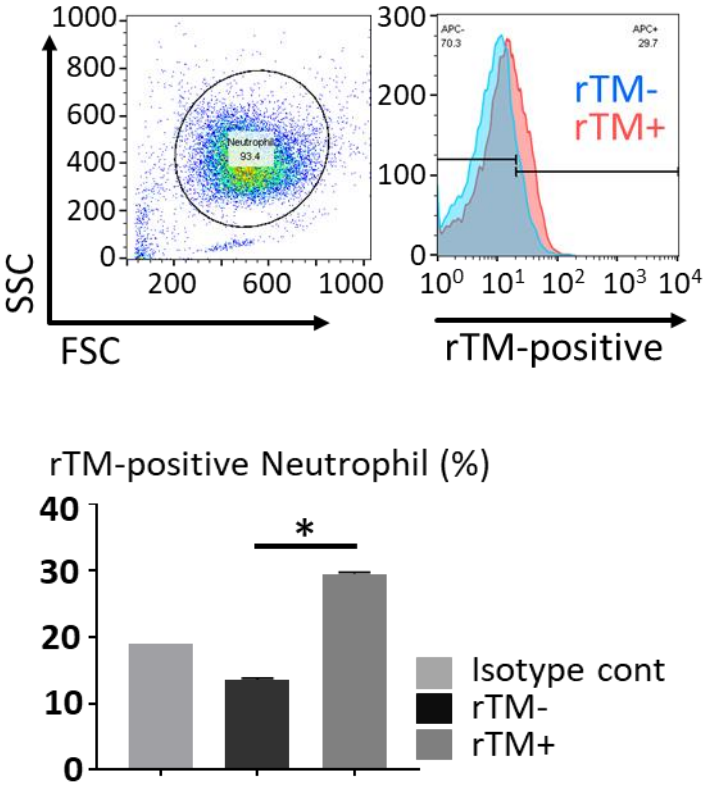


Figure 29.　rTM と好中球との結合に関する検討 (FCM)

上段は forward scatter と side scatter による好中球分画の抽出，および His-tag 陽性好中球のヒストグラムを示す．下段は His-tag 陽性好中球率を示す．His-tag 融合 rTM を添加した好中球では，非添加の好中球と比較し，His-tag 陽性好中球数が有意に増加した．データは平均±標準誤差で示した．N=3. *$p<0.05$.

3.2　Cell adhesion assay による評価

好中球の約 50 %は ICAM-1 固相化 well に, 約 35 %は BSA 固相化 well に結合した. 前者をポジティブコントロール, 後者をネガティブコントロールと設定して評価したところ, 好中球の rTM への結合率は, BSA と比較して有意な増加を認めた (Figure 30). 以上から, rTM は好中球へ直接結合することが示された.

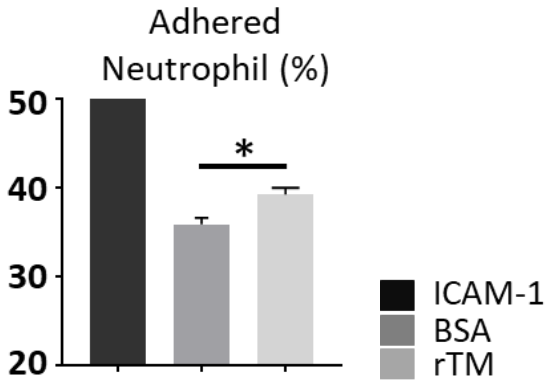


Figure 30.　rTM と好中球との結合に関する検討 (cell adhesion assay)

好中球の rTM への結合率は, BSA と比較して有意な増加を認めた. データは平均±標準誤差で示した. N=5. *p<0.05.

4　β2 インテグリン阻害による rTM と好中球との結合への影響

4.1　CD18 mAb を用いた検討

好中球表面に発現する β2 インテグリン (Mac-1: CD11b/CD18) を介して, rTM が好中球に結合すると仮説し, CD18mAb を前処置した好中球を用いて cell adhesion assay を行った. CD18 を阻害した好中球では, rTM との結合が有意に抑制され, β2 インテグリンをリガンドとする ICAM-1 との結合と同様の結果であった (Figure 31).

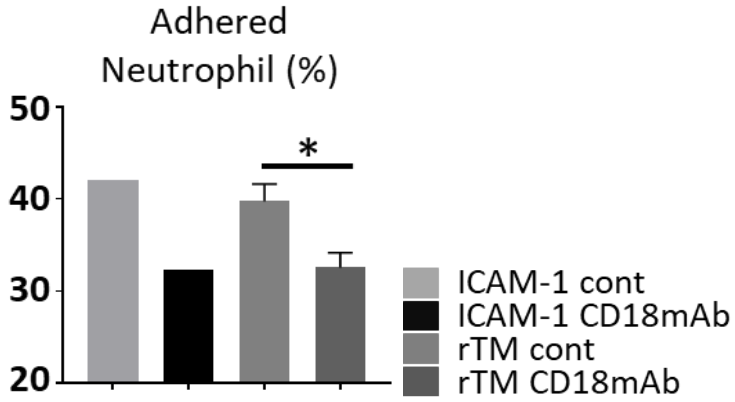


Figure 31.　CD18 mAb による β2 インテグリン阻害下での rTM と好中球との結合率 (cell adhesion assay)

CD18 を阻害した好中球では, rTM との結合が有意に抑制され, β2 インテグリンをリガンドとする ICAM-1 との結合と同様の結果であった. データは平均±標準誤差で示した. N=3. *p<0.05.

4.2　Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞を用いた検討

ATRA により顆粒球へ分化誘導した HL-60 細胞における, 2 回目のトランスフェクション後 24 時間の Mac-1 のノックダウン効率を確認した. コントロール siRNA に対し, Mac-1 特異的 siRNA を用いてトランスフェクションした群において, 約 60 %の Mac-1 mRNA 発現の低下を認めた (Figure 32). この Mac-1 mRNA 発現量に対応し, Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞を用いた cell adhesion assay では, rTM および ICAM-1 への有意な結合の低下を認めた (Figure 33).

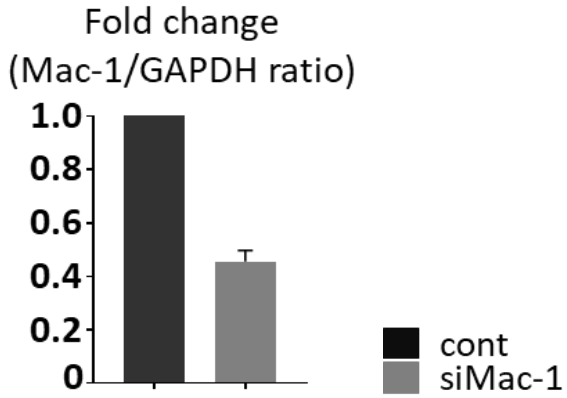


Figure 32.　HL-60 細胞における siRNA を用いた Mac-1 ノックダウン

Mac-1 特異的 siRNA (siMac-1) およびコントロール siRNA (cont) を用いたトランスフェクション後の Mac-1 mRNA 発現量. siMac-1 を用いてトランスフェクションした群において, 約 60 %の Mac-1 mRNA 発現の低下を認めた. データは平均±標準誤差で示した. N=3.

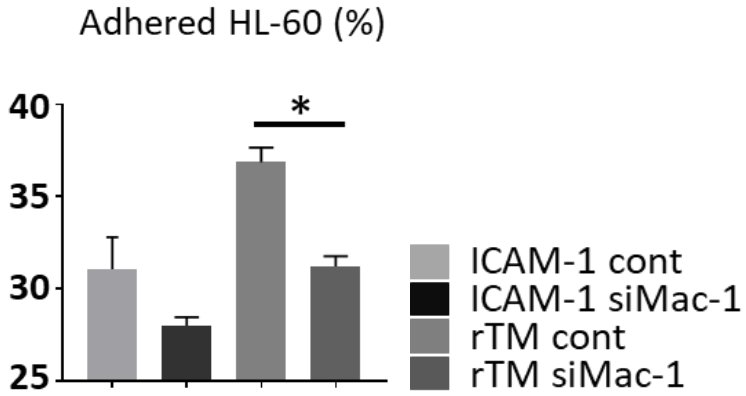


Figure 33. Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞と rTM との結合率 (cell adhesion assay)
Mac-1 ノックダウン HL-60 細胞を用いた cell adhesion assay では, rTM および ICAM-1 への有意な結合の低下を認めた. データは平均±標準誤差で示した. N=5. *p<0.05.

考察

本実験により, rTM は ANCA 誘導 NETs の形成を有意に抑制することが示された. そして rTM は好中球の Mac-1 依存性に, 好中球へ結合することも示された. Mac-1 は好中球表面に発現する細胞接着分子 β2 インテグリンの一つである. ANCA による好中球の活性化は Mac-1 依存的であり (Radford et al., 2000), 抗 CD18 抗体阻害によって, NADPH 酸化酵素の活性化に必須である spleen tyrosine kinase (Syk) のリン酸化が抑制されることが示されている (Hewins et al., 2004). また, TNF-α による好中球プライミングにより活性化された Mac-1 は (Montecucco et al., 2008), ICAM-3 を介した好中球間の相互作用を高め (Neelamegham et al., 2000), ANCA 抗原の好中球表面への発現を促す (Brachemi et al., 2007). その結果, ANCA-Fab 領域が好中球の対応抗原と結合することができ, 次いで ANCA-Fc 部と Fcγ 受容体-Mac1 複合体の結合を介して Syk 依存性の NADPH 酸化酵素の活性化から NETs 形成に至る (Figure 34). その誘導された NETs は, 血管内皮細胞に発現する ICAM-1 に結合して, 血管の炎症を惹起する (Halbwachs and Lesavre, 2012). これらの知見と本研究実験結果から, rTM は好中球表面の Mac-1 に結合することで, ANCA 誘導 NETs の形成過程に必要な Syk 依存性の NADPH 酸化酵素の活性化を阻害し, さらに好中球間の相互作用を抑えることで, ANCA 誘導 NETs の形成を抑制したと考えられる (Figure 35).

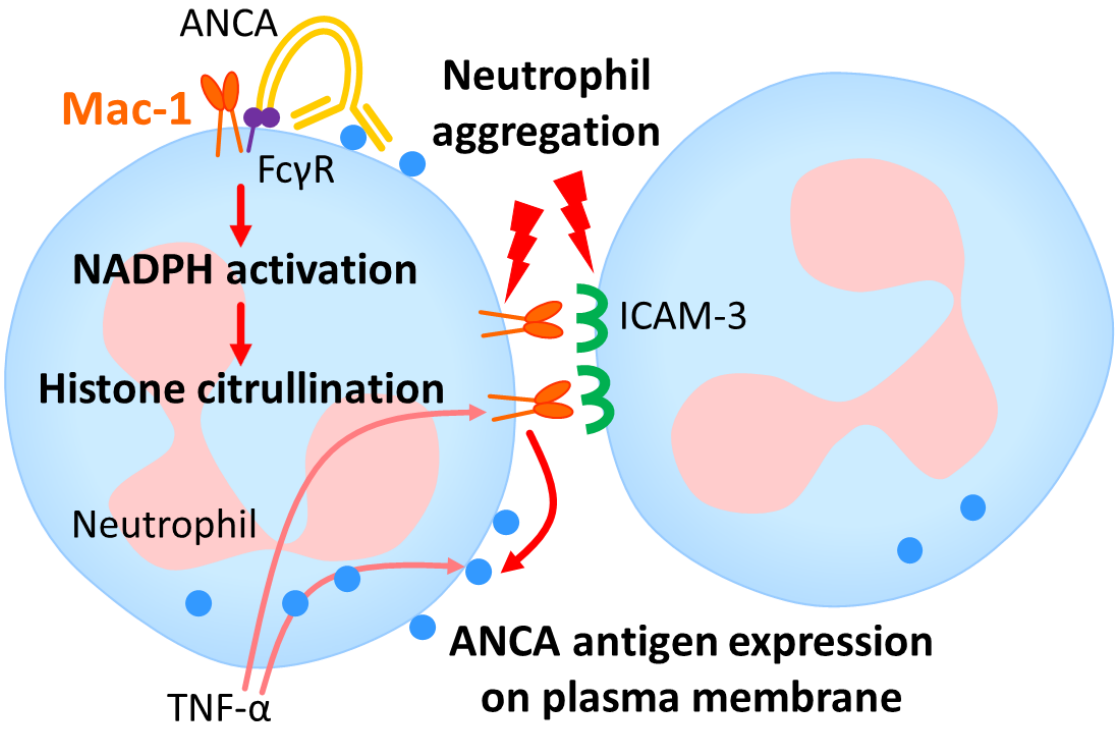


Figure 34.　ANCA 誘導 NETs の形成機序

ANCA による好中球の活性化は Mac-1 依存的であり，抗 CD18 抗体阻害によって, NADPH 酸化酵素の活性化に必須である Syk のリン酸化が抑制されることが示されている．また, TNF-α による好中球プライミングにより活性化された Mac-1 は, ICAM-3 を介した好中球間の相互作用を高め, ANCA 抗原の好中球表面への発現を促す．その結果, ANCA-Fab 領域が好中球の対応抗原と結合することができ，次いで ANCA-Fc 部と Fcγ 受容体-Mac1 複合体の結合を介して Syk 依存性の NADPH 酸化酵素の活性化から NETs 形成に至る．

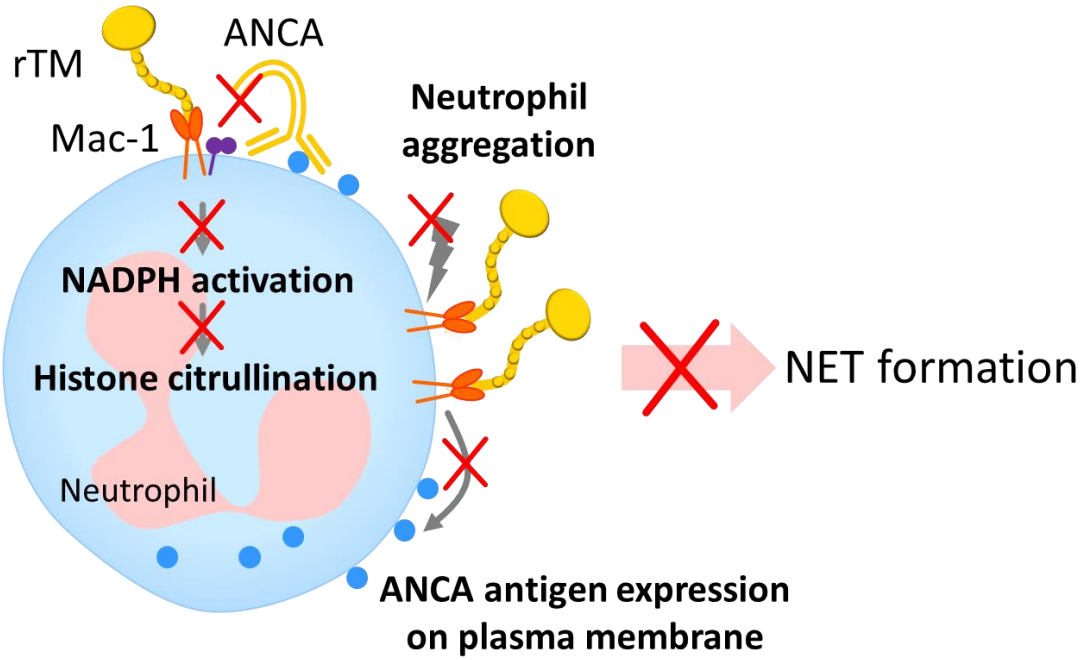


Figure 35.　rTM による ANCA 誘導 NETs の形成抑制機序
rTM は好中球表面の Mac-1 に結合することで, ANCA 誘導 NETs の形成過程に必要な Syk 依存性の NADPH 酸化酵素の活性化を阻害し，さらに好中球間の相互作用を抑えることで, ANCA 誘導 NETs の形成を抑制する.

結語

rTM は好中球表面の Mac-1 への結合を介して, ANCA 誘導 NETs の形成を阻害した.

第三章

ANCA 誘導 NETs の血管内皮細胞障害に対する rTM の効果の検討

緒言

第一章では, rTM による AAV モデル動物の臓器障害の改善効果を示した. 本章では, rTM の臓器保護効果の機序を解明するため, 血管炎の局所で起こる血管内皮障害に対する rTM の影響を検証した. 敗血症時に遊離される細胞障害性ヒストンは, 血管内皮細胞障害を介して病態を助長することが報告されており (Xu et al., 2009) (Hou et al., 2013) (Chen et al., 2014), 本研究では ANCA 誘導 NETs およびヒストンが血管内皮細胞に与える影響, そして rTM の血管内皮細胞に対する保護効果を明らかにすることを目的とし, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞である HuEht を用いて実験を行った.

方法

1　HuEht (Immortalized human umbilical vein endothelial cell line established by the electroporation of pIRES-hTERT-hygr) の培養
ヒト臍帯静脈血管内皮細胞である HuEht は, HuMedia-EG2 培地 (Kurabo) を用いて継代培養を行った.

2　ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞障害性の評価および rTM の効果
Collagen type I (Corning) をコーティングした 1.0-μm 24-well culture inserts (Corning) に, HuEht ($5x10^4$ cells/ml) を 500 μl/well 添加し, 37°C で 48 時間培養した. 分離した健常人の好中球 ($2×10^6$ cells/ml) を, TNF-α (5 ng/ml) により 30 分間前処置した後, ANCA-IgG (200 μg/ml) または健常者 IgG とともに 3 時間共培養して NETs を誘導した. HuEht と rTM (200 μg/ml) または PBS を 1 時間共培養した後, 培地を除いて, 誘導した NETs 培養液 (100 μl/well) と rTM (200 μg/ml) を添加した. 37°C で 3 時間培養後, FITC-conjugated BSA (BSA-FITC) (Merck) を用いた細胞透過性試験 (Jerke et al., 2015) により HuEht の細胞障害度を評価した. BSA-FITC を用いた細胞透過性試験は, 障害された血管内皮細胞の間隙を BSA が透過することを利用しており, 模式図を下記に示す (Figure 36).

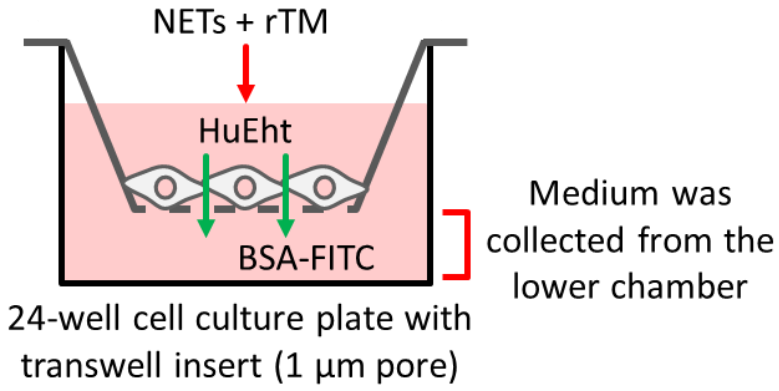


Figure 36.　BSA-FITC を用いた細胞透過性試験の模式図

3　ヒストンの HuEht に対する細胞障害性の評価および rTM の効果

96-well plate に $5x10^4$ cells/ml に調整した HuEht を 100 µl/well 添加し, 一晩培養した. 培地を交換した後, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml の未分画ヒストン (Sigma Aldrich) を添加した. 37°C で 5 時間培養後, cytotoxicity LDH assay kit-WST (Dojindo) を用いた LDH 放出試験により, HuEht の細胞障害度を評価した. ヒストンの血管内皮細胞障害に対する rTM の効果については, rTM (0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml) と HuEht を 1 時間共培養した後に未分画ヒストン (100 µg/ml) を添加し, 37°C で 4 時間培養し, LDH 放出試験を用いて評価した.

4　統計学的解析

Student の t 検定を用いて統計学的評価を行い, p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした. 統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad) を用いて行った.

結果

1　ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞障害性および rTM の効果

ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞障害性を, BSA-FITC を用いた細胞透過性試験により評価し, rTM の血管内皮保護作用を検証した. 結果, ANCA 誘導 NETs による細胞障害性は, rTM を添加することにより有意に改善した (Figure 37).

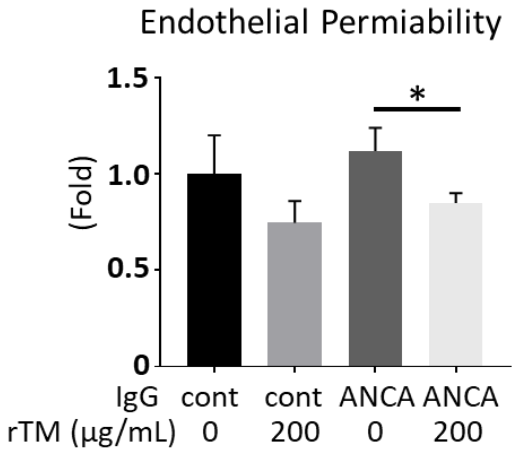


Figure 37.　ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞障害性および rTM の効果

Collagen type I をコーティングした 1.0-μm 24-well culture inserts で培養した HuEht に, ANCA 誘導 NETs と rTM (200 μg/ml) を添加し, 3 時間後に BSA-FITC を用いた細胞透過性試験により細胞障害度を評価した. ANCA 誘導 NETs による細胞障害性は, rTM を添加することにより有意に改善した. データは平均±標準誤差で示した. N=5. *p<0.05.

2　ヒストンの HuEht に対する細胞障害性の評価

ヒストンの HuEht に対する細胞障害性を LDH 放出試験により評価した結果, ヒストンの濃度依存性に HuEht の細胞障害度の上昇を認めた (Figure 38).

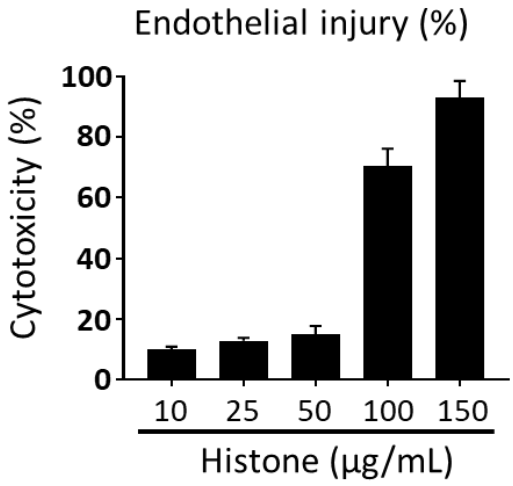


Figure 38.　ヒストンの HuEht に対する細胞障害性

HuEht とヒストン (10–150 μg/ml) を 5 時間共培養した後, HuEht の細胞障害度を LDH 放出試験により評価した. ヒストンの濃度依存性に HuEht の細胞障害度の上昇を認めた. データは平均±標準誤差で示した. N=5.

3　ヒストンの血管内皮細胞障害に対する rTM の効果

ヒストンの血管内皮細胞障害に対する rTM の効果を LDH 放出試験により評価した結果, rTM の濃度依存性にヒストンの血管内皮細胞障害は減少した. また 200 μg/ml 以上の濃度の rTM では, ヒストンの血管内皮細胞障害を有意に改善させた (Figure 39).

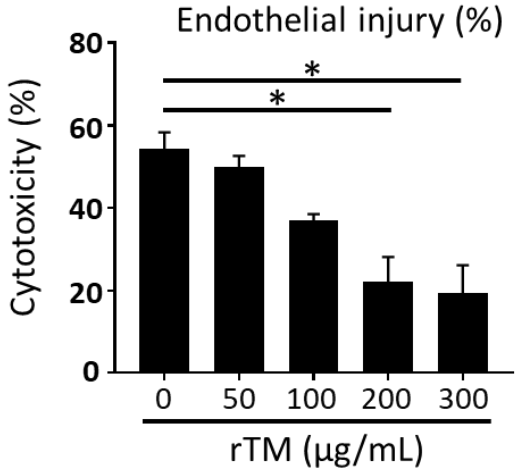


Figure 39.　ヒストンの血管内皮細胞障害に対する rTM の効果

HuEht と rTM (0–300 μg/ml) を 1 時間共培養した後, ヒストン (100 μg/ml) を添加し, 4 時間後に LDH 放出試験により HuEht の細胞障害度を評価した. rTM の濃度依存性にヒストンの血管内皮細胞障害は減少した. また 200 μg/ml 以上の濃度の rTM では, ヒストンの血管内皮細胞障害を有意に改善させた. データは平均±標準誤差で示した. N=5. *p<0.05.

考察

本実験から, ANCA 誘導 NETs およびヒストンは血管内皮細胞を直接障害し, rTM は血管内皮細胞障害に対して保護効果を発揮することが示された. rTM は第二章で述べた機序により ANCA による NETs の誘導を抑制し, また血管炎局所の壊死細胞から遊離されるヒストンを中和することで (Nakahara et al., 2013), 血管内皮細胞障害を軽減したと考えられた. 以上から, rTM は ANCA 誘導 NETs の形成抑制による全身の炎症病態の制御に加えて, ANCA 誘導 NETs やヒストンによる局所の微小血管炎を制御し, さらにヒストンによる TLR を介した炎症の悪循環病態 (Mulay et al., 2016) を断つことで, AAV モデル動物の臓器障害を抑制した可能性が考えられた.

結語

rTM は ANCA 誘導 NETs およびヒストンによる血管内皮細胞障害を抑制した.

第四章

抗体産生細胞に対する rTM の効果の検討

緒言

AAV モデル動物に対する rTM 治療は, ANCA 値の減少とともに臓器障害を改善したことを第一章で示した. ANCA 値の減少の機序については, 自己抗原となる NETs の減少に加えて, NETs の細胞外 DNA が B 細胞や樹状細胞の TLR9 を介した抗体産生作用があることから (Hemmi et al., 2000) (Hurtado et al., 2008), NETs の減少による TLR9 を介した作用が想定される. 第一章において, AAV モデルラットの血清 DNA 値が rTM 群において低値であったことからも, この機序は支持されると考えられる. 一方で, rTM が抗体産生細胞へ直接作用を及ぼす可能性については未解明である. 本章では, 抗体産生細胞に対する rTM の効果を検証し, rTM による ANCA 抑制の機序を明らかにすることを目的として実験を行った.

DNA の塩基のうち, シトシンやグアニンに富んだ非メチル化 CpG モチーフは微生物 DNA 中に多くみられ, TLR9 を介して抗体産生細胞を刺激し, 抗体産生や炎症性サイトカイン産生を亢進させることが知られている (Hemmi et al., 2000). 本実験では, CpG モチーフを含むオリゴデオキシリボヌクレチオドのうち, B 細胞に対して高い活性をもつ B-クラス TLR9 リガンド (CpG-B) を用いて, 健常者から分離した末梢血単核球 (PBMC) を刺激し, 抗体産生および炎症性サイトカイン産生を促した. そして, rTM が PBMC への結合を介して (Kawamoto et al., 2016) 及ぼす作用について検討した.

方法

1　PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) の分離

Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) を用いた比重遠心分離により, 健常人末梢血から PBMC を分離した.

2　PBMC の培養

分離した健常人の PBMC を, 10% FBS を添加した RPMI 1640 培地で 1×10^6 cells/ml となるよう調整し, 6-well plate に播種した. rTM (200 μg/ml) を 30 分間 pre-treatment した後, CpG-B である ODN 2006 (10 μg/ml) (Miltenyi Biotec) および Interleukin (IL)-2 (PeproTech) (10 ng/ml) とともに 37 °C で 7 日間共培養した.

3　PBMC の培養上清中の IgG の測定

PBMC の培養上清中の IgG 濃度を ELISA 法により測定した (Assaypro).

4　PBMC の培養上清中のサイトカインの測定

PBMC の培養上清中の種々のサイトカイン濃度を, Proteome Profiler Array Human Cytokine Array (R&D Systems) により評価した. ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare) を用いて化学発光を撮影し, ImageJ software により定量した後, reference spots の発現量にて標準化した.

5　rTM と DNA との結合能についての検討

rTM および BSA (10 μg/ml, 100 μg/ml) をそれぞれ 96-well plate に 100 μl/well 添加し, 4°C で 24 時間静置して固相化した. PBS で洗浄後に, ラットの complementary DNA (cDNA) (10 ng/μl) を添加し, 室温で 2 時間振盪させた. 培養上清中の cDNA 濃度を, NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した. DNA と rTM との結合を cDNA の実験前後の濃度の変化率として評価した.

6　統計学的解析

Student の t 検定を用いて統計学的評価を行い, p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした. 統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad) を用いて行った.

結果

1　PBMC の IgG 産生に対する rTM の効果

rTM による PBMC の抗体産生能への影響を評価するため， CpG-B 刺激下 PBMC の培養上清中の IgG 濃度を ELISA 法により測定した．結果, CpG-B 刺激下 PBMC は IgG を産生したが, rTM による IgG 産生抑制効果はみられなかった (Figure 40).

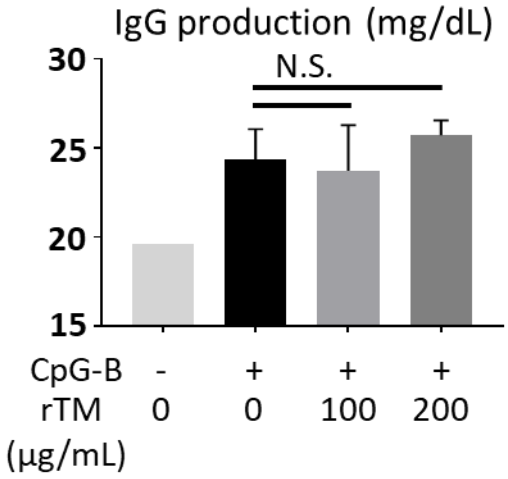


Figure 40.　PBMC の IgG 産生に対する rTM の効果

PBMC を rTM (200 μg/ml) により 30 分間前処置した後, CpG-B (10 μg/ml) および IL-2 (10 ng/ml) とともに 7 日間共培養し，培養上清中の IgG 濃度を ELISA 法により測定した. CpG-B 刺激下 PBMC は IgG を産生したが, rTM による IgG 産生抑制効果はみられなかった．データは平均±標準誤差で示した．N=5. N.S. = not significant.

2　PBMC の炎症性サイトカイン産生に対する rTM の効果

上記 1 の実験において, rTM による抗体産生抑制作用は見られなかったが, rTM は PBMC に結合するため, 抗体産生中の PBMC の表現系に何らかの影響を与えると仮説し, サイトカインプロファイルを調べた. Proteome Profiler Array Human Cytokine Array を用いて PBMC の培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果, CpG-B 刺激下 PBMC は CCL5, IL-8 および TNF-α などの血管炎病態に関連のある種々の炎症性サイトカインの産生を認め, rTM の添加により, これら全ての炎症性サイトカインの産生が減少した (Figure 41, 42).

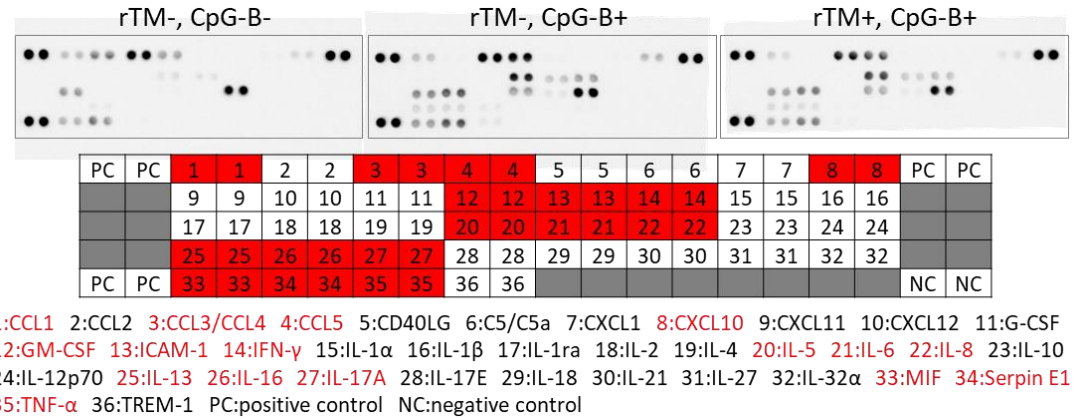


Figure 41.　PBMC の炎症性サイトカイン産生に対する rTM の効果

PBMC を rTM (200 µg/ml) により 30 分間前処置した後, CpG-B (10 µg/ml) および IL-2 (10 ng/ml) とともに 7 日間共培養し, 培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を Proteome Profiler Array Human Cytokine Array により評価した. rTM により発現が減少した炎症性サイトカインを赤で示す. N=3 の培養上清を混合して実験を行った.

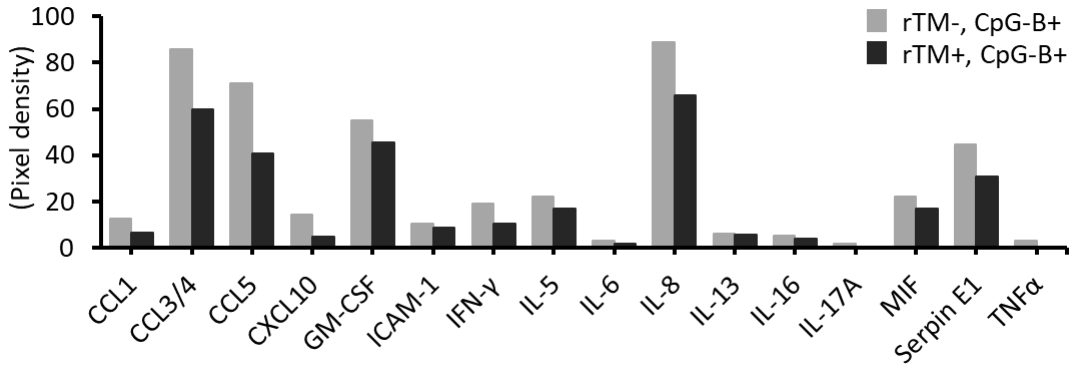


Figure 42.　各炎症性サイトカイン濃度の定量評価

Proteome Profiler Array Human Cytokine Array により評価した各炎症性サイトカイン濃度を ImageJ software により定量し, reference spots の発現量にて標準化した. rTM の添加により種々の炎症性サイトカインの産生が減少した. N=3 の培養上清を混合して実験を行った.

3　rTM と DNA との結合能についての検討

rTM の CpG-B 刺激下 PBMC への炎症性サイトカイン産生抑制効果が, rTM の CpG-B への中和作用による可能性を考慮して, rTM と DNA との結合実験を行った. 結果, rTM の DNA への結合能はみられず, rTM が直接 PBMC に作用してサイトカインの産生を抑制したことが示唆された (Figure 43).

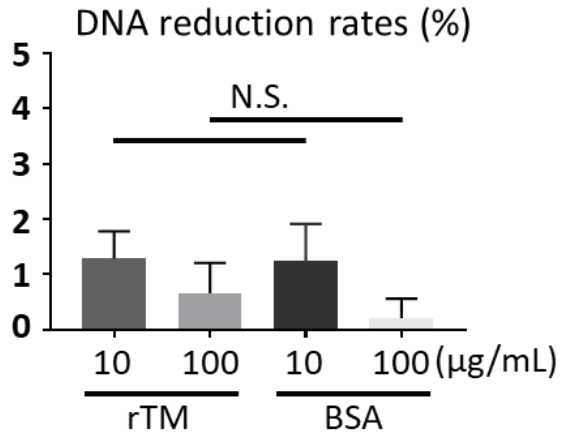


Figure 43.　rTM と DNA との結合能についての検討

rTM または BSA を固相化した 96-well plate に, cDNA (10 ng/μl) を添加し, 2 時間後の培養上清中の cDNA 濃度を測定して, DNA と rTM との結合を cDNA の実験前後の濃度の変化率として評価した. rTM の DNA への結合能はみられなかった. データは平均±標準誤差で示した. N=4. N.S. = not significant.

考察

本実験から, rTM は抗体産生細胞に直接作用して, 種々の炎症性サイトカインの産生を抑制することが示された.

rTM は樹状細胞の機能を免疫原性から免疫寛容性へと変化させることで, 気管支喘息モデル動物の病態を改善した報告がある (Takagi et al., 2011). また脳脊髄炎モデル動物に対する rTM 治療は, 血中の炎症性サイトカインの抑制とともに病態を改善したと報告されている (Uzawa et al., 2018). rTM は Mac-1 や LFA-1 を介して PBMC に結合することが知られており (Kawamoto et al., 2016), 本実験の結果から, rTM がこれらの受容体を介して抗体産生状態の PBMC に結合し, 向炎症状態から抗炎症性の PBMC に phenotype を変えたと考えられた. In vitro での本実験で, rTM が直接 IgG の産生を抑制しなかったが, これらのリンパ球の性状を変えたことが, AAV モデル動物体内での自己抗体 ANCA の産生抑制に繋がった可能性がある.

結語

rTM は抗体産生細胞の種々の炎症性サイトカインの産生を減少させた.

第五章

ANCA 関連血管炎患者における血清 TM 値の検討

緒言

これまで rTM について, AAV モデル動物に対する NETs 制御を伴った病態改善効果, ならびに好中球やリンパ球への結合を介した NETs 制御や抗炎症効果を実証し, 全身の炎症病態の制御機構について考察してきた. 本章では, AAV 患者における rTM の役割を検討するため, 血清 TM (serum thrombomodulin: sTM) 値に着目した.

血管内皮細胞障害が生じると, 血管内皮に発現する TM が切断されて sTM 値が上昇し (Ishii et al., 1991), 敗血症や DIC (Lin et al., 2008), 全身性エリテマトーデス (Boehme et al., 1994) などの疾患において sTM が高値となり病勢との関連も指摘されている. 一方, 炎症性サイトカインは血管内皮細胞上の TM の発現を低下させる作用があり, 重症例では sTM が低値となる報告もある (Matthay, 2001). AAV 患者では, 血管内皮障害のために sTM が遊離されると仮説し, 血管炎の疾患活動性との関連を評価した.

対象

2011 年から 2016 年の間に北海道大学病院内科IIへ入院または通院加療された MPO-ANCA 陽性 AAV 患者 13 例, および健常者 10 例を対象とした. AAV の診断は厚生労働省の診断基準を用いて行った. AAV の疾患活動性評価は Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) (Mukhtyar et al., 2009) を用いて行った.

なお高度の腎機能障害や感染症は結果に影響するため, 検体採取時に血清 Cr >3.4 mg/dL であった患者, ならびに感染症を有していた患者は除外した.

本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行した. 患者血清および健常者血清の使用については, 研究課題名「ANCA 関連血管炎における病原性自己抗体の役割と制御方法を解明する研究」として北海道大学病院倫理審査委員会で承認された (承認番号: 16-68).

方法

対象患者より採取した末梢血より, 血清トロンボモジュリン (serum thrombomodulin: sTM) 濃度の測定を化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) (LSI medience) を用いて行った.

Student の t 検定を用いて統計学的評価を行い, p 値が 0.05 未満を統計学的有意とした.

結果

1　対象患者背景

対象患者背景を Table 1 に示す. 健常群, AAV 群の年齢中央値 (四分位範囲) はそれぞれ 31 (30-35) 歳, 74 (58-79) 歳であった. AAV 患者の BVAS スコアの中央値 (四分位範囲) は 12 (0-15) であった. MPO-ANCA 値の中央値 (四分位範囲) は 23.6 (4-300) U/mL であった.

Table 1　対象患者背景

Clinical characteristics of the patients with MPA and healthy controls.

	Healthy controls n=10	AAV patients n=13
No. male/female	6/4	3/10
Age (years)	31 (30–35)	74 (58–79)
Active/remission	NA	9/4
Initial/recurrent disease	NA	11/2
Treated/untreated	NA	1/12
BVAS	NA	12 (0–15)
Cr (mg/dL)	NA	1.55 (0.84–3.16)
CRP (mg/dL)	NA	0.64 (0.02–2.15)
ANCA (U/mL)	NA	23.6 (4–300)

データは中央値 (四分位範囲) で示した.

BVAS = Birmingham Vasculitis Activity Score, NA = not applicable.

2　sTM 値の解析結果

MPO-ANCA 陽性 AAV 患者の sTM 値は 32.5 ± 16.4 ng/ml (平均値±SD) であり, 健常群の sTM 値 (13.4 ± 3.3 ng/ml) と比較して有意に上昇していた (Figure 44).

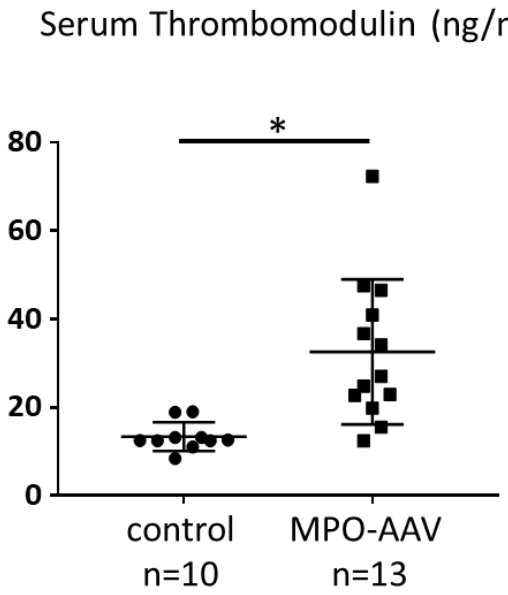


Figure 44.　sTM 値の測定結果

健常人および AAV 患者の sTM 値を測定し解析した. AAV 患者の sTM 値は健常群と比較して有意に上昇していた. 健常人: n=10, AAV 患者: n=13. データは平均±標準偏差で示した. *p<0.05.

3　AAV の疾患活動性と sTM 値との関連

MPO-ANCA 陽性 AAV 患者において BVAS と sTM 値の相関を解析したところ, 相関関係は認めなかった (Figure 45).

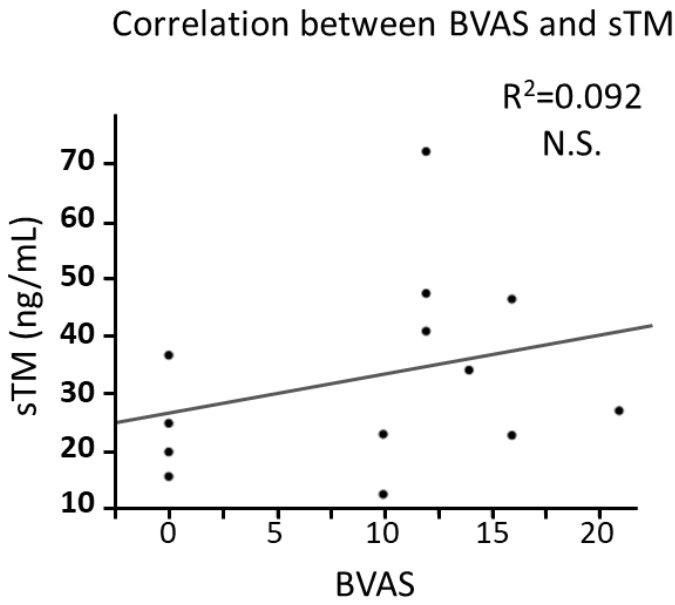


Figure 45.　BVAS と sTM 値の相関

AAV 患者における BVAS と sTM 値の相関を解析した. 相関関係は認めなかった. N=13. N.S. = not significant.

考察

本研究から, AAV 患者では健常者と比較して sTM 値が有意に高値であることが示された. 敗血症患者の既報と同様の結果であったが, 敗血症での sTM 上昇の意義は, 血管内皮障害により TM が切断されて可溶性 sTM となり, 過凝固の抑制や血管内皮を保護する作用により血管内の炎症を終息させる生体反応であると想定され, rTM の補充療法が臨床応用されている.

血管炎でも同様に sTM の高値を示したことから, ANCA 誘導 NETs により傷害された血管内皮細胞から TM が遊離され, 血管内炎症を制御するために生体反応として遊離されていることが想定される.

AAV 患者における sTM 値と BVAS の相関関係が見られなかったのは, 血管の炎症の程度に応じて sTM は遊離されると想定されるが, sTM 自体の臓器保護効果により BVAS を相殺した可能性が考えられる. また重症感染症などで高度に傷害された血管内皮細胞は, 侵入微生物の全身播種を防止するため TM の発現抑制, 遊離 sTM 減少により凝固で封じ込める生理的反応があるとされ, sTM 濃度は必ずしも病態の重症度と一致しないことも相関しなかった原因であると想定される. 一方で, rTM 投与後の血中 TM 濃度は, rTM 非投与の AAV 患者における内因性 sTM 値と比較して高値であり (Moll et al., 2004), rTM の補充は内因性 sTM の血管内炎症の終息作用を超えて AAV の病態改善に寄与する可能性があり, 今後の治療ターゲットになると考えられた.

結語

AAV 患者では健常者と比較して sTM 値が有意に高値であった.

総合考察

本研究では, rTM 治療により AAV モデル動物の臓器障害を改善したことを示し, その機序として以下 (1)-(3) を実証した: (1) rTM が好中球表面の Mac-1 への結合を介して, ANCA による NETs の誘導を抑制した. (2) rTM が抗体産生細胞の機能を抗炎症性へと導き, ANCA の産生を抑制した. (3) rTM が NETs の誘導抑制ならびに NETs を構成するヒストンの中和により, 血管内皮細胞障害を軽減した. これらはすべて AAV の病態形成に重要な役割を果たしており, rTM は多面的に AAV の病態を改善する可能性が示唆された (Figure 46).

現在の AAV に対する治療は免疫抑制治療が主体であるが, 抗体産生細胞を抑制して, その下流にある毛細血管局所の炎症や壊死を制御するまでには一定の時間を要し, その間にも組織障害が進行する. 本研究結果から, rTM は超急性期から生じている NETs や DAMPs による局所の微小血管炎を制御する新規治療薬となる可能性が示唆される. また本研究の動物実験では rTM がラットの凝固系に作用しないため凝固線溶に関する評価はできなかったが, 血管炎の病態は NETs や DAMPs を介した過凝固状態も病態の進展に関与するため, 抗凝固作用のある rTM はヒトの血管炎にはさらなる効果が期待される. 一方, 喘息動物モデルや糸球体基底膜腎炎モデルにおいても rTM の効果が報告されきており, rTM は AAV 以外の他の自己免疫疾患に対する治療薬となる可能性もある.

本研究で用いた AAV モデルラットは腎病変の発現が乏しく, 腎炎に対する rTM の治療効果を組織学的に評価できなかった点, SCG/Kj マウスの無治療群において早期死亡がみられたため, サンプルサイズが少なく rTM の治療効果を十分に評価できなかった点については, 本研究の limitation であり, 今後の検討課題である.

以上, rTM は ANCA 誘導 NETs の制御およびヒストンの中和を介して局所の微小血管炎を制御し, また好中球やリンパ球に結合して NETs や ANCA の産生を抑制することで, AAV の中心病態を制御する. rTM は TM に内在するこれらの多面的な臓器保護効果を増強させることで, AAV 病態を改善へ導く新たな治療戦略として期待される.

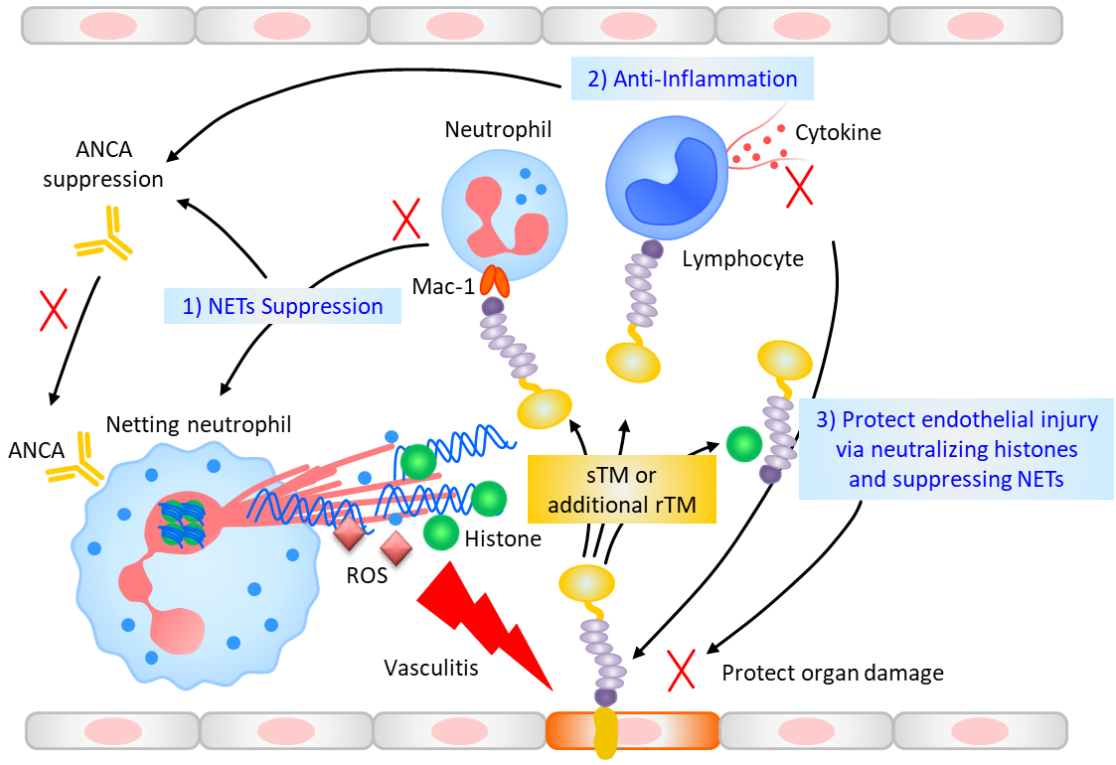


Figure 46.　rTM の AAV に対する多面的効果

TM は血管内皮細胞表面に発現し，プロテイン C の活性化を介した抗凝固作用を持つ. AAV における過剰な NETs が，その構成成分である細胞障害性ヒストンなどにより血管内皮細胞障害を引き起こすと, TM が血管内皮細胞から離断して可溶性の sTM となり，以下の内因性の抗炎症作用を発揮して血管内皮細胞を保護する働きを持つ: (1) 好中球表面の Mac-1 への結合を介して, ANCA による NETs の誘導を抑制する. (2) 抗体産生細胞の機能を抗炎症性へと導き, ANCA の産生や炎症性サイトカインの産生を抑制する. (3) NETs の誘導抑制ならびに NETs を構成するヒストンの中和により，血管内皮細胞障害を軽減する. rTM は, TM に内在するこれらの多面的効果を増強させることで, AAV 病態を改善へ導く新規治療薬となる可能性がある.

総括および結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである.

・rTM は AAV モデル動物の NETs と ANCA を減少させるとともに, 臓器障害を軽減した.

・rTM は好中球表面の Mac-1 への結合を介して,ANCA 誘導 NETs の形成を阻害した.

・rTM は ANCA 誘導 NETs およびヒストンによる血管内皮細胞障害を抑制した.

・rTM は PBMC の種々の炎症性サイトカインの産生を減少させた.

・AAV 患者では健常者と比較して sTM 値が有意に高値であった.

第一章で示した rTM による AAV モデル動物の臓器障害の改善効果には, rTM が好中球へ直接結合して NETs の誘導を抑制する機構が関与していることを第二章で実証した. また rTM は, ANCA 誘導 NETs およびヒストンによる血管内皮細胞障害に対して保護効果を発揮することを第三章で示した. さらに rTM の抗体産生細胞に対する直接的な抗炎症作用が第四章で示され, AAV モデル動物における ANCA 値の抑制に繋がったと考えられた. そして第五章では AAV 患者における sTM 値が高値であることが明らかとなり, TM に内在するこれらの多面的な抗炎症作用を rTM が増強することで, AAV の病態を多面的に改善する可能性が示唆された. 以上から, 本研究は rTM が AAV の全身の炎症病態を制御する新たな治療薬の候補となりうることを示した.

謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです. 同教室教授 渥美達也先生ならびに保健科学研究院病態解析学分野教授 石津明洋先生には, 本研究の実施の機会を与えていただき, その遂行にあたって終始, ご指導をいただきました. ここに深謝の意を表します.

本教室助教 中沢大悟先生には, 本研究の遂行にあたり, 実験計画, 方法, 結果の解釈ならびに考察の組み立てをはじめ, 終始, 丁寧かつ熱心にご指導をいただきました. ここに心より深く感謝の意を表します.

本大学病理学講座分子病理学分野准教授 外丸詩野先生には, 実験の遂行にあたって終始, ご指導ならびにご助言をいただきました。深く感謝いたします.

本教室講師 西尾妙織先生には, 恵まれた実験環境を用意いただき, さらに日々の実験に対するご指導ならびにご助言をいただきました. 深く感謝いたします。

本分野膠原病グループ助教 Olga Amengual 先生には, 学会発表における英語プレゼンテーションをはじめ, 多くのご指導をいただきました. 深く感謝の意を表します.

楠由宏先生, 八反田文彦先生, 谷村瞬先生, ならびに保健科学研究院病態解析学分野助教 益田紗季子先生には, 研究を遂行するにあたり多くのご助言, ご指導をいただきました. ここに深謝いたします.

大学院生の武田紗夜先生, 工藤孝司先生, 白鳥里佳先生には, 同じ大学院の仲間として, 研究遂行にあたり日頃より有益なご助言をいただきました. 心より感謝を申し上げます.

また, 当時腎グループ実験助手として勤務されていた三﨑麻里子さん, 齋藤由佳さん, 福士なつ美さん, 現実験助手の島田和子さん, 石塚えりさんにも日々の実験のご協力をいただき, 深謝致します.

この他にもこの論文作成にあたり, ここには記載できないほど多くの御協力をいただきました. 重ねまして心より感謝申し上げます.

最後に, いつも温かく見守ってくれた両親, そして大きな理解を示し支え続けてくれた夫と娘に心から感謝致します.

利益相反

この研究で使用した rTM は旭化成ファーマから提供を受けたものである.

引用文献

Abeyama, K., Stern, D.M., Ito, Y., Kawahara, K., Yoshimoto, Y., Tanaka, M., Uchimura, T., Ida, N., Yamazaki, Y., Yamada, S., et al. (2005). The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. J Clin Invest *115*, 1267-1274.

Boehme, M.W., Nawroth, P.P., Kling, E., Lin, J., Amiral, J., Riedesel, J., Raeth, U., and Scherbaum, W.A. (1994). Serum thrombomodulin. A novel marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum *37*, 572-577.

Brachemi, S., Mambole, A., Fakhouri, F., Mouthon, L., Guillevin, L., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2007). Increased membrane expression of proteinase 3 during neutrophil adhesion in the presence of anti proteinase 3 antibodies. J Am Soc Nephrol *18*, 2330-2339.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science *303*, 1532–1535.

Chen, R., Kang, R., Fan, X.G., and Tang, D. (2014). Release and activity of histone in diseases. Cell Death Dis *5*, e1370.

Conway, E.M., Van de Wouwer, M., Pollefeyt, S., Jurk, K., Van Aken, H., De Vriese, A., Weitz, J.I., Weiler, H., Hellings, P.W., Schaeffer, P., et al. (2002). The Lectin-like Domain of Thrombomodulin Confers Protection from Neutrophil-mediated Tissue Damage by Suppressing Adhesion Molecule Expression via Nuclear Factor κB and Mitogen-activated Protein Kinase Pathways. J Exp Med *196*, 565-577.

Drayson, M.T., Michell, R.H., Durham, J., and Brown, G. (2001). Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL60 cell differentiation initiated by 1,25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans-retinoic acid. Exp Cell Res *266*, 126-

134.

Gupta, S., and Kaplan, M.J. (2016). The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. Nat Rev Nephrol *12*, 402-413.

Hakkim, A., Furnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 9813-9818.

Halbwachs, L., and Lesavre, P. (2012). Endothelium-neutrophil interactions in ANCA-associated diseases. J Am Soc Nephrol *23*, 1449-1461.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature *408*, 740-745.

Hewins, P., Williams, J.M., Wakelam, M.J., and Savage, C.O. (2004). Activation of Syk in neutrophils by antineutrophil cytoplasm antibodies occurs via Fcgamma receptors and CD18. J Am Soc Nephrol *15*, 796-808.

Hou, W., Zhang, Q., Yan, Z., Chen, R., Zeh Iii, H.J., Kang, R., Lotze, M.T., and Tang, D. (2013). Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. Cell Death Dis *4*, e966.

Hurtado, P.R., Jeffs, L., Nitschke, J., Patel, M., Sarvestani, G., Cassidy, J., Hissaria, P., Gillis, D., and Peh, C.A. (2008). CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. BMC Immunol *9*, 34.

Ikeguchi, H., Maruyama, S., Morita, Y., Fujita, Y., Kato, T., Natori, Y., Akatsu, H., Campbell, W., Okada, N., Okada, H., et al. (2002). Effects of human soluble thrombomodulin on experimental glomerulonephritis. Kidney Int *61*, 490-501.

Ishii, H., Uchiyama, H., Kazama, M. (1991). Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. Thromb Haemost *65*, 618-623.

Jennette, J.C., and Falk, R.J. (1997). Small-vessel vasculitis. N Engl J Med *337*, 1512-1523.

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., et al. (2013). 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. Arthritis Rheum *65*, 1-11.

Jerke, U., Hernandez, D.P., Beaudette, P., Korkmaz, B., Dittmar, G., and Kettritz, R. (2015). Neutrophil serine proteases exert proteolytic activity on endothelial cells. Kidney Int *88*, 764-775.

Kallenberg, C.G. (2011). Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. Ann Rheum Dis *70* Suppl 1, i59-63.

Kawamoto, E., Okamoto, T., Takagi, Y., Honda, G., Suzuki, K., Imai, H., and Shimaoka, M. (2016). LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. Biochem Biophys Res Commun *473*, 1005-1012.

Kinjoh, K., Kyogoku, M., and Good, R.A. (1993). Genetic selection for crescent formation yields mouse strain with rapidly progressive glomerulonephritis and small vessel vasculitis. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 3413-3417.

Kumar, S.V., Kulkarni, O.P., Mulay, S.R., Darisipudi, M.N., Romoli, S., Thomasova, D., Scherbaum, C.R., Hohenstein, B., Hugo, C., Muller, S., et al. (2015). Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. J Am Soc Nephrol *26*, 2399-2413.

Lin, S.M., Wang, Y.M., Lin, H.C., Lee, K.Y., Huang, C.D., Liu, C.Y., Wang, C.H., and

Kuo, H.P. (2008). Serum thrombomodulin level relates to the clinical course of disseminated intravascular coagulation, multiorgan dysfunction syndrome, and mortality in patients with sepsis. Crit Care Med *36*, 683-689.

Little, M.A., Smyth, L., Salama, A.D., Mukherjee, S., Smith, J., Haskard, D., Nourshargh, S., Cook, H.T., and Pusey, C.D. (2009). Experimental autoimmune vasculitis: an animal model of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis. Am J Pathol *174*, 1212-1220.

Loghmani, H., and Conway, E.M. (2018). Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. Blood *132*, 148-158.

Maruyama, I., Bell, C., and Majerus, P.W. (1985). Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. J Cell Biol *101*, 363-371.

Matthay, M.A. (2001). Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. N Engl J Med *344*, 759-762.

Mohri, M., Gonda, Y., Oka, M., Aoki, Y., Gomi, K., Kiyota, T., Sugihara, T., Yamamoto, S., Ishida, T., Maruyama, I. (1997). The antithrombotic effects of recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM) on tissue factor-induced disseminated intravascular coagulation in crab-eating monkeys (Macaca fascicularis). Blood Coagul Fibrinolysis *8*, 274-283.

Moll, S., Lindley, C., Pescatore, S., Morrison, D., Tsuruta, K., Mohri, M., Serada, M., Sata, M., Shimizu, H., Yamada, K., et al. (2004). Phase I study of a novel recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123. J Thromb Haemost *2*, 1745-1751.

Montecucco, F., Steffens, S., Burger, F., Da Costa, A., Bianchi, G., Bertolotto, M., Mach, F., Dallegri, F., and Ottonello, L. (2008). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. Cell

Signal *20*, 557-568.

Mukhtyar, C., Lee, R., Brown, D., Carruthers, D., Dasgupta, B., Dubey, S., Flossmann, O., Hall, C., Hollywood, J., Jayne, D., et al. (2009). Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). Ann Rheum Dis *68*, 1827-1832.

Mulay, S.R., Linkermann, A., and Anders, H.J. (2016). Necroinflammation in Kidney Disease. J Am Soc Nephrol *27*, 27-39.

Nakahara, M., Ito, T., Kawahara, K., Yamamoto, M., Nagasato, T., Shrestha, B., Yamada, S., Miyauchi, T., Higuchi, K., Takenaka, T., et al. (2013). Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. PLoS One *8*, e75961.

Nakazawa, D., Kumar, S.V., Marschner, J., Desai, J., Holderied, A., Rath, L., Kraft, F., Lei, Y., Fukasawa, Y., Moeckel, G.W., et al. (2017). Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. J Am Soc Nephrol *28*, 1753-1768.

Nakazawa, D., Marschner, J.A., Platen, L., and Anders, H.J. (2018). Extracellular traps in kidney disease. Kidney Int *94*, 1087-1098.

Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T., and Ishizu, A. (2014). Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. J Am Soc Nephrol *25*, 990-997.

Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M., and Ishizu, A. (2012a). 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 Rheum *64*, 3779-3787.

Nakazawa, D., Tomaru, U., Yamamoto, C., Jodo, S., and Ishizu, A. (2012b). Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. Front

Immunol *3*, 333.

Neelamegham, S., Taylor, A.D., Shankaran, H., Smith, C.W., and Simon, S.I. (2000). Shear and Time-Dependent Changes in Mac-1, LFA-1, and ICAM-3 Binding Regulate Neutrophil Homotypic Adhesion. J Immunol *164*, 3798-3805.

Ozaki, T., Anas, C., Maruyama, S., Yamamoto, T., Yasuda, K., Morita, Y., Ito, Y., Gotoh, M., Yuzawa, Y., and Matsuo, S. (2008). Intrarenal administration of recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischaemic acute renal failure. Nephrol Dial Transplant *23*, 110-119.

Radford, D.J., Savage, C.O., and Nash, G.B. (2000). Treatment of rolling neutrophils with antineutrophil cytoplasmic antibodies causes conversion to firm integrin-mediated adhesion. Arthritis Rheum *43*, 1337-1345.

Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S.P., Lohmeyer, J., and Preissner, K.T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. PLoS One *7*, e32366.

Saito, H., Maruyama, I., Shimazaki, S., Yamamoto, Y., Aikawa, N., Ohno, R., Hirayama, A., Matsuda, T., Asakura, H., Nakashima, M., et al. (2007). Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. J Thromb Haemost *5*, 31-41.

Schreiber, A., Rousselle, A., Becker, J.U., von Massenhausen, A., Linkermann, A., and Kettritz, R. (2017). Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. Proc Natl Acad Sci U S A *114*, E9618-E9625.

Shi, C.S., Shi, G.Y., Hsiao, H.M., Kao, Y.C., Kuo, K.L., Ma, C.Y., Kuo, C.H., Chang, B.I., Chang, C.F., Lin, C.H., et al. (2008). Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced

inflammatory response. Blood *112*, 3661-3670.

Tachibana, S., Iyoda, M., Matsumoto, K., Wada, Y., Suzuki, T., Iseri, K., Kanazawa, N., and Shibata, T. (2019). Recombinant human soluble thrombomodulin attenuates anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats through anti-inflammatory effects. Nephrol Dial Transplant *34*, 774-782.

Takagi, T., Taguchi, O., Toda, M., Ruiz, D.B., Bernabe, P.G., D'Alessandro-Gabazza, C.N., Miyake, Y., Kobayashi, T., Aoki, S., Chiba, F., et al. (2011). Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med *183*, 31-42.

Uzawa, A., Mori, M., Masuda, H., Ohtani, R., Uchida, T., and Kuwabara, S. (2018). Recombinant thrombomodulin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing high mobility group box 1 and inflammatory cytokines. Clin Exp Immunol *193*, 47-54.

Van de Wouwer, M., Plaisance, S., De Vriese, A., Waelkens, E., Collen, D., Persson, J., Daha, M.R., and Conway, E.M. (2006). The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis. J Thromb Haemost *4*, 1813-1824.

Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F., and Esmon, C.T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. Nat Med *15*, 1318-1321.

中沢大悟, 西尾妙織, 外丸詩野, 渥美達也, 石津明洋. (2014). 血管炎の発症機序と NETs. 日本腎臓学会誌 56, 117-123.

中沢大悟, 石津明洋. (2015). ANCA 関連腎炎. 腎と透析 78, 727-732.