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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13779
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78620
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Uozumi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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

魚住　諒

北海道大学大学院

保健科学専攻保健科学コース

2019 年度

目次

目次 2
要約 5
第 1 章 免疫グロブリン大量静注療法（IVIG）と MPO-ANCA 関連血管炎（MPO-AAV）への適応 9
1-1 概要 10
1-2 緒言 11
1-3 IVIG とは 12
1-4 IVIG の適応症 14
1-5 AAV とは 15
1-6 AAV の病態形成機序 16
1-7 本研究の目的 18
1-8 参考文献 19
第 2 章 免疫グロブリン製剤が NETs 形成および AAV 発症に及ぼす影響 22
2-1 概要 23
2-2 緒言 24
2-3 材料と方法 25
2-4 結果 29
2-5 考察 40
2-6 参考文献 43
第 3 章 総括 46
3-1 免疫グロブリン製剤が NETs 形成および AAV 発症に及ぼす影響 47
3-2 今後の課題と展望 48
謝辞 49

略語一覧

AAV	：	ANCA-associated vasculitis
ANCA	：	anti-neutrophil cytoplasmic antibody
Cit H3	：	citrullinated histone 3
DAPI	：	4',6-diamidino-2-phenylindole
EDTA	：	ethylenediaminetetraacetic acid
EGPA	：	eosinophilic granulomatosis with polyangiitis
FBS	：	fetal bovine serum
Fc γ R	：	Fc γ receptor
FFPE	：	formalin-fixed paraffin-embedded
HSA	：	human serum albumin
Ig	：	Immunoglobulin
IL	：	Interleukin
ITP	：	idiopathic thrombocytopenic purpura
IVIG	：	intravenous immunoglobulin
MPA	：	microscopic polyangiitis
MPO	：	myeloperoxidase
NETs	：	neutrophil extracellular traps

PBS	:	phosphate buffered saline
PMA	:	phorbol myristate acetate
PMNs	:	polymorphonuclear cells
PR3	:	proteinase 3
PTU	:	propylthiouracil
SLE	:	systemic lupus erythematosus
TNF	:	tumor necrosis factor
WKY	:	Wistar Kyoto

要約

【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）をエピト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、健常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. 健常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

健常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、健常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胞出血についても比較を行った。肺最大割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胞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も分かる通り、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、腎病変は軽度にしか起こらない。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。

第 1 章

免疫グロブリン大量静注療法（IVIG）と

MPO-ANCA 関連血管炎（MPO-AAV）への適応

1-1 概要

IVIG とは免疫グロブリンを大量に静注する治療法である。IVIG は、無または低γグロブリン血症や重症感染症に対するγグロブリンの補充療法としての意義を持つ他に、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、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などに対する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る。本邦における代表的な AAV である MPO-AAV の血管内皮細胞障害において、ANCA により誘導される好中球細胞外トラップ（NETs）が重要な役割を果たすことが明らかとなった。加えて、NETs の制御異常は ANCA の産生原因にもなっている。

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。しかしながら、本邦における EGPA は AAV の中の 10%に過ぎず、IVIG が EGPA 以外の AAV に有効か否かを明らかにすることは意義がある。また、高齢者の罹患が多い MPO-AAV では既存の標準治療である免疫抑制治療に代わる新たな治療法の開発が求められている。

以上のような背景を踏まえ、本研究では、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。

1-2 緒言

第 1 章では、はじめに免疫グロブリン大量静注療法（IVIG）とは何かを述べ、現在の適応症を列挙する。次に、本研究の対象である抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎（AAV）について概説し、現在考えられている病態形成機序をまとめる。そして、それらを踏まえた上で、本研究の目的を説明する。

1-3 IVIG とは

IVIG とは免疫グロブリンを大量に静注する治療法であり、通常、体重 1 Kg あたり 400 mg のγグロブリンを 5 日間連続で投与する。IVIG に使用するγグロブリン製剤は、多数の健常ドナーから得たプール血漿に由来する γ グロブリンを、静注可能な製剤に精製して作られる。

γグロブリン製剤は 1950 年代、無γグロブリン血症の治療薬として Burton らによって開発された。この製剤はヒトの血漿から γ グロブリン分画を精製したものであったが、精製過程で生じた IgG の凝集体が補体系を非特異的に活性化してしまい、その結果としてアナフィラキシー様症状を引き起こすことから静注での使用はできず、筋注用製剤として使用された。この製剤は筋注用であったため、注射局所の疼痛や投与量の限界、吸収に時間がかかる等の欠点があった。これら欠点の克服を目的として、静注可能な γ グロブリン製剤作製のため研究開発が進められた。その結果、現在では複数の γ グロブリン製剤が臨床応用されており、それらは大きく非完全分子型と完全分子型に大別される（図 1）。

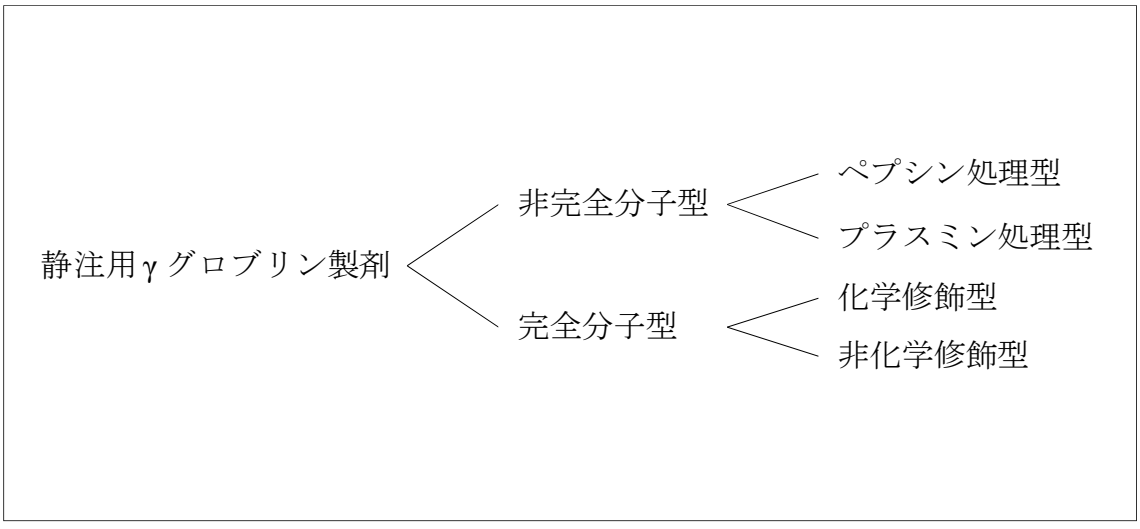


図 1. 静注用γグロブリン製剤の分類

静注可能な γ グロブリン製剤としてはじめに登場したのは、ペプシンやプラスミンといった酵素によって処理された非完全分子型 γ グロブリン製剤であった。筋注用 γ グロブリン製剤において、非特異的な補体の活性化やアナフィラキシー様症状の主たる要因であった IgG 凝集体の形成にはγグロブリンの Fc 部分が関与しており、酵素処理で Fc 部分を除去することによって、それらの副作用は抑制された。しかし、酵素処理を施すことに伴い、体内における半減期が短くなるという新たな欠点が生まれた。

その後登場した完全分子型γグロブリン製剤は、Fc 部分を保持したまま、様々な処理によって IgG の凝集を防ぐ工夫がなされた。完全分子型 γ グロブリンは化学修飾型と非化学修飾型に分類されるが、前者は γ グロブリンのヒンジ部に存在する S-S 結合をスルホ化あるいはアルキル化し、γグロブリンの精製中に起こる IgG の凝集を防いでいる。後者はポリエチレングリコール処理やイオン交換樹脂処理により、可能な限り IgG の構造や機能、サブクラスの組成等に影響を及ぼさないよう工夫されており、インタクト型とも呼ばれる[1][2]。現在、本邦で頻用されているのは化学修飾型であり、なかでもスルホ化製剤が多い。本論文中、第 2 章以降で述べる AAV に対する免疫グロブリン製剤の効果に関する研究においても、スルホ化γグロブリンを使用した。

1-4 IVIG の適応症

IVIG は、無および低γグロブリン血症[3][4]、ならびに重症感染症[5]に対するγグロブリンの補充療法としての意義を持つ他に、種々の疾患に対する治療効果も有している。1981 年、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）患者に対し IVIG を行うと血小板数が劇的に回復することが Imbach らによって報告された[6]。その後、多くの追試がなされ[7][8]、現在では IVIG が ITP の治療法として確立されている[9]。それ以降も、IVIG の様々な疾患に対する有効性が検討され、その結果として現在は ITP の他、川崎病[10]、ギランバレー症候群[11]、慢性炎症性脱髄性多発神経根障害[12]などが保険適応となっている。

1-5 AAV とは

血管に一次的な炎症を認める疾患を血管炎という。血管炎は、侵される血管の太さにより、大型血管炎、中型血管炎、小型血管炎に大別される。このうち大型血管炎には高安動脈炎や巨細胞性動脈炎が、中型血管炎には結節性多発動脈炎や川崎病が、小型血管炎には AAV や免疫複合体性小型血管炎が含まれる[13]。

AAV は血清中の ANCA 陽性を特徴とし、原発性 AAV と続発性 AAV に分類される。原発性 AAV とは顕微鏡的多発血管炎（MPA）、多発血管炎性肉芽腫症（GPA）、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（EGPA）を指し、続発性 AAV はプロピルチオウラシル（PTU）やヒドララジンなどの薬剤によって誘発される薬剤関連 AAV を指す[14]。

ANCA には、間接蛍光抗体法で核周囲が陽性となる perinuclear ANCA（P-ANCA）と細胞質がびまん性に陽性となる cytoplasmic ANCA（C-ANCA）が存在し、前者の対応抗原がミエロペルオキシダーゼ（MPO）、後者の対応抗原がプロテイナーゼ 3（PR3）である。本邦における MPA は 95%以上が MPO-ANCA 陽性となり、これは欧米よりも高い割合である[15]。また、GPA についても、本邦では MPO-ANCA 陽性と PR3-ANCA 陽性の割合が変わらないが、欧米においては大半が PR3-ANCA 陽性である。このように、同じ AAV であっても陽性となる ANCA の種類は地域または人種によって異なり、特に本邦においては MPO-ANCA 陽性の割合が高い。

MPO-AAV 患者では半月体形成性壊死性糸球体腎炎を原因とする急速進行性腎障害を高率に発症し、重篤な場合には肺胞毛細血管炎が原因の肺出血をきたす。

1-6 AAV の病態形成機序

ANCA は疾患マーカーであると同時に、それ自体が病原性を持つことが明らかになっている[16]。ANCA が血管壁を障害するメカニズムを以下に示す。細菌感染などを契機としてマクロファージが産生する炎症性サイトカインが好中球に作用すると、好中球細胞膜に MPO や PR3 が表出する。表出した ANCA 抗原に対し ANCA が結合する、あるいは好中球細胞膜上もしくは細胞膜付近において MPO や PR3 と結合した ANCA の Fc 部分が、好中球細胞膜上の Fcγ 受容体（FcγR）に結合する。その結果、好中球の異常な活性化が生じ、サイトカインの異常産生や活性酸素種の放出を誘導し、最終的に血管内皮細胞の障害を引き起こす。

これに加えて、近年、ANCA が誘導する好中球細胞外トラップ（NETs）による血管内皮細胞障害も明らかになった[17][18]。NETs は活性化した好中球が細胞外に放出する DNA 線維であり、2004 年に Brinkmann らによって報告された[19]。好中球に phorbol myristate acetate（PMA）や IL-8 の刺激が入ると、クロマチンの脱凝縮が段階的に起こり、核が膨張する。続いて、核質が細胞質に流出し、最終的に細胞膜を突き破る。その際、MPO や PR3、ラクトフェリンといった細胞質内抗菌タンパクと DNA 線維の混合が生じる。抗菌タンパクをまぶした状態で細胞外に放出された 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。

NETs は生体防御に必要不可欠な自然免疫システムである一方、過剰な NETs 形成は ANCA 産生の原因となりうる。生体内における NETs の主要な分解因子は DNase Iであり、MPA 患者では血漿中の DNase I活性が低下していることが分かっている[20]。また、抗甲状腺薬である PTU が投与されている患者では、約

30%に MPO-ANCA が産生されることも報告されている。これは、PTU の投与により、DNase I 抵抗性の NETs が形成されるためであることが実験的に示されている[21]。MPA の患者においては、何らかの要因により体内で NETs が分解されにくい背景があり、そこへ DNase I 抵抗性の NETs が形成されると NETs の残存が生じる。その結果、NETs の構成要素のひとつである MPO に対するトレランスが破綻し、MPO-ANCA が産生される。産生された MPO-ANCA は好中球を刺激して、さらなる NETs を誘導する [20]。これを NETs-ANCA 悪循環と呼ぶ（図 2)。

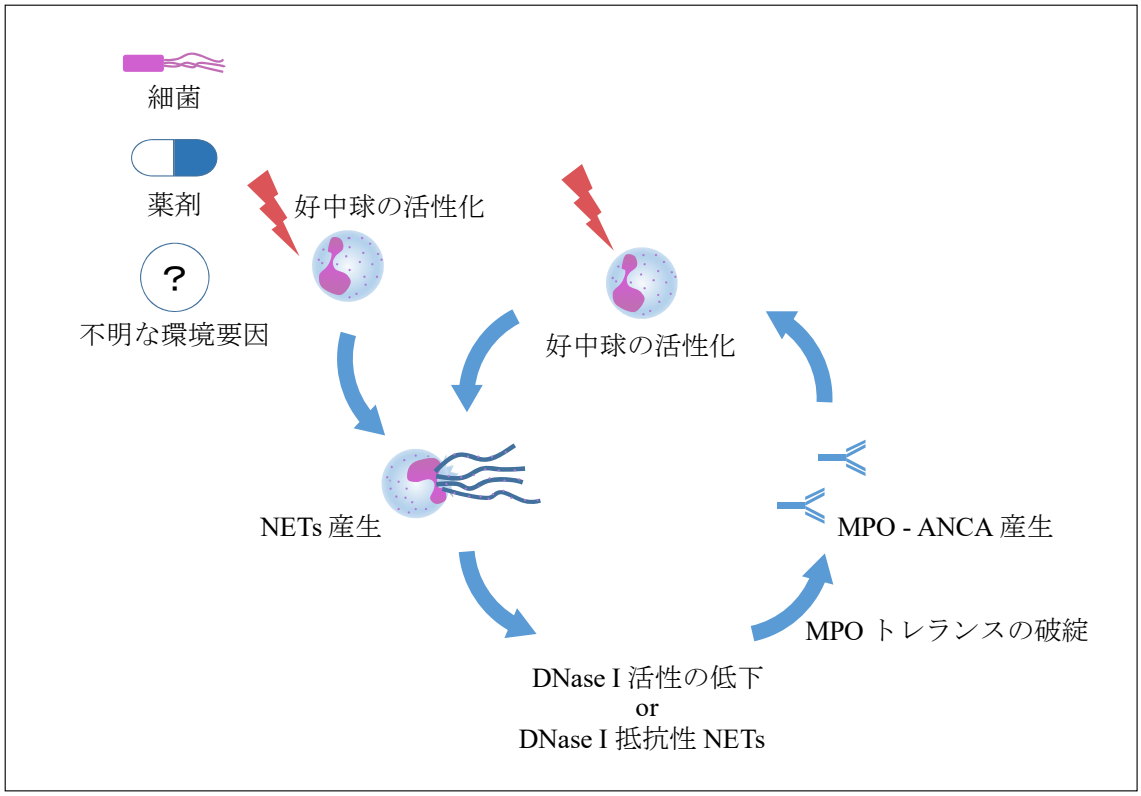


図 2. NETs-ANCA 悪循環

1-7 本研究の目的

EGPA における、特に慢性期の血管炎関連末梢神経障害に対する IVIG の有効性が示されている[12]。しかしながら、IVIG が末梢神経に対し直接的に作用しているのか、それとも神経障害の原因となっている血管炎を抑制し、神経機能を間接的に改善しているのか、明らかではない。AAV の疫学研究によれば、本邦における EGPA の患者数は AAV の中のおよそ 10%にとどまっている[15]。そのため、IVIG が EGPA と同様に他の AAV に対しても有効か否かを調べることは意義があるといえる。

現在、AAV の標準的寛解導入療法としてグルココルチコイドとシクロホスファミドの併用療法が用いられている。この治療法は 90%以上の高い寛解導入率が確認されているが、治療抵抗性を示す患者があり、また、一旦寛解が得られても、そのうちの約 20%に再発を認める。加えて、高齢者の罹患が多い AAV では、強力な免疫抑制治療は日和見感染症などの重篤な副作用を誘発し、治療に難渋することも少なくない。このことからも、AAV に対する新たな治療法の開発が強く求められている。

以上のような背景を踏まえ、本研究では、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、細胞レベルならびに実験動物を用いた個体レベルで明らかにすることを目的とした。

1-8 参考文献

1） Muso, E. (2005). Immunosupportive effect of intravenous immunoglobulin therapy for MPO-ANCA positive microscopic polyangiitis associated with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. 医学のあゆみ, *214*(1), 113–119.

2） 川杉和夫. (2003). 免疫グロブリン大量療法の現状と今後. 日本臨床免疫学会誌, *26*(3), 87–95.

3） Makatsori M., Kiani-Alikhan S., Manson A., Verma N., Leandro M., Gurugama N., et al. (2014). Hypogammaglobulinaemia after rituximab treatment-incidence and outcomes. *QJM*, *107*(10), 821-828.

4） Shillitoe, B., Bangs, C., Guzman, D., Gennery, A. R., Longhurst, H. J., Slatter, M., et al. (2018). The United Kingdom Primary Immune Deficiency (UKPID) registry 2012 to 2017. *Clin Exp Immunol, 192*(3), 284-291.

5） Punit J., Niyati V., & Anna K. (2015). Role of intravenous immune globulin in streptococcal toxic shock syndrome and *Clostridium difficile* infection. *Am J Health Syst Pharm.*, *72*(12), 1013-1019.

6） Imbach P., Barandun S., Baumgartner C., Hirt A., Hofer F., & Wagner H. (1981). High-dose intravenous gammaglobulin therapy of refractory, in particular idiopathic thrombocytopenia in childhood. *Helv Paediatr Acta*, *36*(1), 81-86.

7） Fehr J., Hofmann V., & Rappeler U. (1982). Transient reversal of thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura by high-dose intravenous gamma globulin. *N Engl J Med., 306*(21), 1254-1258.

8） Bussel J., Kimberly R., Inman R., Cunningham-Randles C., Ceung N., Smithwick E., et al. (1983). Intravenous gammaglobulin treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood, 62*(2), 480-486.

9） Salama A. (2017). Emerging drugs for immune thrombocytopenia (ITP). *Expert Opin Emerg Drugs, 22*(1), 27-38.

10） Liu, Y., Lin, M., Wang, J., & Wu, M. (2018). State-of-the-art acute phase management of Kawasaki disease after 2017 scientific statement from the American Heart Association. *Pediatr Neonatol.*, *59*(6), 543–552.

11）Restrepo J., Rodrigues Y., Gonzalez P., Chang C., Gershwin E., &Manuel A. (2018). The immunotherapy of Guillain-Barre syndrome. *Expert Opin Biol Ther.*, *18*(6), 619-631.

12）Koike, H., Akiyama, K., Saito, T., & Sobue, G. (2015). Intravenous immunoglobulin for chronic residual peripheral neuropathy in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg–Strauss syndrome): a multicenter, double-blind trial. *J Neurol.*, *262*(3), 752–759.

13）Jenette J., Falk R., Bacon P., Basu N., Cid M., Ferrario F., et al. (2013). 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum., 65*(1), 1-11.

14）石津明洋. (2016). ANCA 関連血管炎の病態メカニズム. *Jpn J Clin Immunol., 39*(6), 491-496.

15）Sada, K., Yamamura, M., Harigai, M., Fujii, T., Dobashi, H., Takasaki, Y., et al. (2014). Classification and characteristics of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in a nationwide, prospective, inception cohort study. *Arthritis Res Ther.*, *16*(2), 1–10.

16）Jennette, J. &Falk, R. (2014). Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease*. Nat Rev Rheumatol., 10*(8), 463-473.

17）Döring, Y., Weber, C. & Soehnlein, O. (2013). Footprints of Neutrophil Extracellular Traps as Predictors of Cardiovascular Risk, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, *33*(8), 1735–1736.

18）Grayson, P. & Kaplan, M. (2016). At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.*, *99*(2), 253-264.

19）Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science, 303*(5663), 1532-1535.

20）Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T. & Ishizu A. (2014). Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol., 25*(5), 990-997.

21）Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., et al. (2012). 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*(11), 3779–3787.

第 2 章

免疫グロブリン製剤が NETs 形成および AAV 発症に及ぼす影響

（論文掲載確定: *Modern Rheumatology*）

2-1　概要

MPO-AAV は糸球体をはじめとする全身の小型血管が侵される壊死性血管炎で、自己免疫疾患のひとつである。好中球が持つ MPO に対する自己抗体である MPO-ANCA に病原性がある。NETs は、病原微生物の侵入刺激に対して好中球が放出する DNA 線維であり、MPO-ANCA の産生に NETs の制御異常が関与している。IVIG は一部の自己免疫疾患において自己抗体の産生を抑制し、その病勢を抑制するが、MPO-AAV に対する有効性やその有効機序は不明である。そこで本研究では、免疫グロブリン製剤のひとつである IVIG-S が NETs の形成を抑制し、ひいては MPO-AAV の発症を抑制できるか、健常者の末梢血好中球を用いた *in vitro* の実験系、ならびに MPO-AAV のラットモデルを用いて検討した。その結果、IVIG-S は NETs の形成を抑制し、ANCA の抗体価を経時的に低下させることが確認された。IVIG は MPO-AAV に対する有効な治療法となりうることが示唆された。

2-2　緒言

第 2 章では、健常ヒト末梢血由来好中球および PTU と PMA で誘導する MPO-AAV ラットモデルを用いて、IVIG が NETs 形成および MPO-AAV の発症に対して与える影響について解析した。

2-3　材料と方法

2-3-1　健常ヒト末梢血由来好中球の分離

本研究は北海道大学大学院保健科学研究院倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：16-83）。健常ボランティア 5 名より EDTA-2K 採血管で静脈血を採取した。採取した血液は PBS を用いて 2 倍希釈した後、直ちに Polymorphprep（Axis Shield, Dundee, Scotland）に重層し、室温で 30 分間 500G にて遠心した。遠心後、分離した多核白血球層を回収した。好中球は多核白血球分画において最も高い比率で含まれていることから、本研究では多核白血球を好中球とみなした。なお、溶血操作は非特異的な好中球の活性化を引き起こす恐れがあるため、実施していない。

2-3-2　*in vitro* における NETs 誘導

ヒト末梢血由来好中球は、5%ウシ胎児血清（FBS）添加 RPMI-1640 培地を用いて 1×10^6/mL の濃度で再浮遊させた。NETs を誘導するため、再浮遊させた好中球は 100 nM の PMA（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を添加し、37℃、5%CO_2 条件化で 3 時間静置した。

2-3-3　γ グロブリン製剤による前処置

PMA による刺激に先立ち、ヒト末梢血由来好中球を 5 mg/mL の IVIG-S（Teijin, Tokyo, Japan）で 30 分間、37℃、5%CO_2 条件化に静置した（IVIG 群）。コントロール群については、同量のヒト血清アルブミン（HAS）を添加し、IVIG 群と同様に処置した。IVIG-S の濃度は、臨床的に IVIG を行う際の有効血中濃度である 400 mg/Kg と終濃度が一致するよう調整した。

2-3-4　NETs の検出

NETs 形成は細胞膜非透過性 DNA 結合色素である SYTOX Green（Life Technologies, Carlsbad, CA）を用いたフローサイトメトリー（FCM）、および、DAPI を用いた蛍光染色法により検出した。FCM には Attune flow cytometer（Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いた[1]。それと同時に、NETs の形成を蛍光顕微鏡下でも確認した。

2-3-5　MPO-AAV モデルラットへの IVIG-S 投与

本研究では、中沢らが確立した PTU と PMA を用いた MPO-AAV ラットモデルを使用した[2]。4 週齢のオスの WKY ラット（n=12）に 10 mg/Kg/day の容量で PTU（Sankyo Laboratories, Sapporo, Japan）を 28 日間経口投与し、投与 0 日目および 7 日目に 1 μg の PMA を腹腔内注射した。これらのラットは、血漿中の ANCA 陽性を確認した 8 日目から 12 日目まで、連続 5 日間 400 mg/Kg で IVIG-S を腹腔内注射する群（n=6）と、同量の PBS を腹腔内注射する対照群（n=6）に分けた。0 日目、14 日目、21 日目に尾部末端より血液を採取した。28 日目にすべてのラットについて、麻酔下にて大動脈より全血を採取し、続いて全身臓器を採取した。ラットを用いた実験は、北海道大学の動物実験指針に基づき実施した（承認番号：15-0034）。

2-3-6　腹膜における NETs の定量

28 日目に採取した腹膜組織を、10%ホルマリンを用いて固定し、パラフィンに包埋した。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織は 4 μm の厚さで薄切し、キシレンを用いて脱パラフィン処理を実施した。脱パラフィン処理した標本は、Tris-EDTA バッファー（pH9.0）中にて 20 分間オートクレーブを用いて

121℃に加熱することで抗原を賦活化し、続いて非特異的な抗体の結合を防ぐ目的で Protein Block Serum-free（Dako, Glostrup, Denmark）に室温で 10 分間浸漬した。一次抗体には、NETs のマーカーであるシトルリン化ヒストン 3（Cit H3）に対する抗体（rabbit polyclonal, 1:100 dilution; Abcam, Eugene, OR）を用いた。室温で 1 時間反応させた後、PBS を用いて洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG H&L（1:500 dilution: Abcam）を添加した。室温で 1 時間反応させた後、PBS で再び洗浄し、DAPI を含む封入剤（Vector Laboratories）を用いて封入して蛍光顕微鏡下に観察した。シトルリン化ヒストン 3 陽性かつ DAPI 陽性の領域を NETs と判定し、その領域面積を、画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化した。

2-3-7　ANCA 抗体価

4 週齢のオスの WKY ラットに 3% チオグリコレート（Becton Dickinson, Tokyo, Japan）を腹腔内注射した。3 日後に腹腔内を洗浄して好中球を回収した。回収した好中球は 5% FBS 添加 RPMI 1640 培地を用いて 1×10^6/mL に再浮遊させ、4-well チャンバースライド（Thermo Fisher Scientific）にて 37ºC で 30 分間静置した。スライドに付着した細胞は、風乾させた後に 100%エタノールにて室温で 10 分間固定した。PBS にて洗浄後、10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、160 倍、320 倍に段階希釈したラットの血漿を添加し、室温で 60 分間静置した。PBS による洗浄に続いて 200 倍に希釈した Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG（Thermo Fisher Scientific）を添加し、室温で 30 分間静置した。PBS で再び洗浄し、DAPI を含む封入剤を用いて封入して、蛍光顕微鏡下に観察した。ANCA の染色が認められた血漿のうち、最も高い希釈倍率を ANCA 抗体価とした。

2-3-8　ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色

28 日目に採取した全身の臓器組織を、10%ホルマリンを用いて固定し、パラフィンに包埋した。FFPE 組織は 4 μm の厚さで薄切し、常法に従って HE 染色を施して光学顕微鏡下に観察した。

2-3-9　IVIG-S 添加好中球におけるラクトフェリン放出

健常ヒト末梢血由来好中球（1×10^6/mL）を、5 mg/mL の IVIG-S 添加群と非添加群の 2 群に分けた。FBS 中に含まれるラクトフェリンの混入を防ぐため、培地は FBS 未添加の RPMI-1640 を用いた。37℃に 30 分間静置した後、遠心して得られた上清をサンプルとした。上清中のラクトフェリン濃度を、日本老化制御研究所（Shizuoka, Japan）において ELISA にて測定した。

2-3-10　統計学的解析

in vitro 試験は 3 回以上の独立試験を実施し、Wilcoxon の符号付順位和検定によって 2 群間で p 値が 0.05 未満のものについて有意差ありとした。*in vivo* 試験では Mann-Whitney U 検定において 2 群間で p 値が 0.05 未満のものについて有意な差とした。

2-4　結果

2-4-1　IVIG-S は *in vitro* において PMA により誘導される NETs 形成を阻害する

初めに、臨床的な有効血中濃度である 400 mg/Kg の IVIG-S が *in vitro* において PMA による NETs 誘導にどのような影響を及ぼすか調べた。NETs 形成を SYTOX Green を用いた FCM により解析した結果、SYTOX Green 陽性細胞数は PBS を添加した対照群と比較して、100 nM の PMA で 3 時間刺激した群において有意に増加していた。これは PMA による NETs 誘導を反映している（図 3a）。PMA による好中球の刺激に先立ち、有効血中濃度である 400 mg/Kg に相当する 5 mg/mL の IVIG-S で前処置した群においては、対照として同量の HSA で前処置した群と比較して、PMA により誘導される NETs 形成が有意に減少していた。PMA による NETs 誘導の程度が大きいほど、IVIG-S による NETs 誘導抑制幅が大きい。このことは、IVIG が PMA による NETs 誘導を抑制している可能性を示唆している。この傾向については、蛍光顕微鏡を用いた NETs の検出においても同様の結果が得られており、IVIG-S 非添加 PMA 添加群では図 3b に示すように彗星状に尾を引いて染色された DNA が確認されている。これに対し、PMA の添加に先立って 5 mg/mL の IVIG-S で 30 分間前処理した群においては、NETs の放出が抑制されていた。

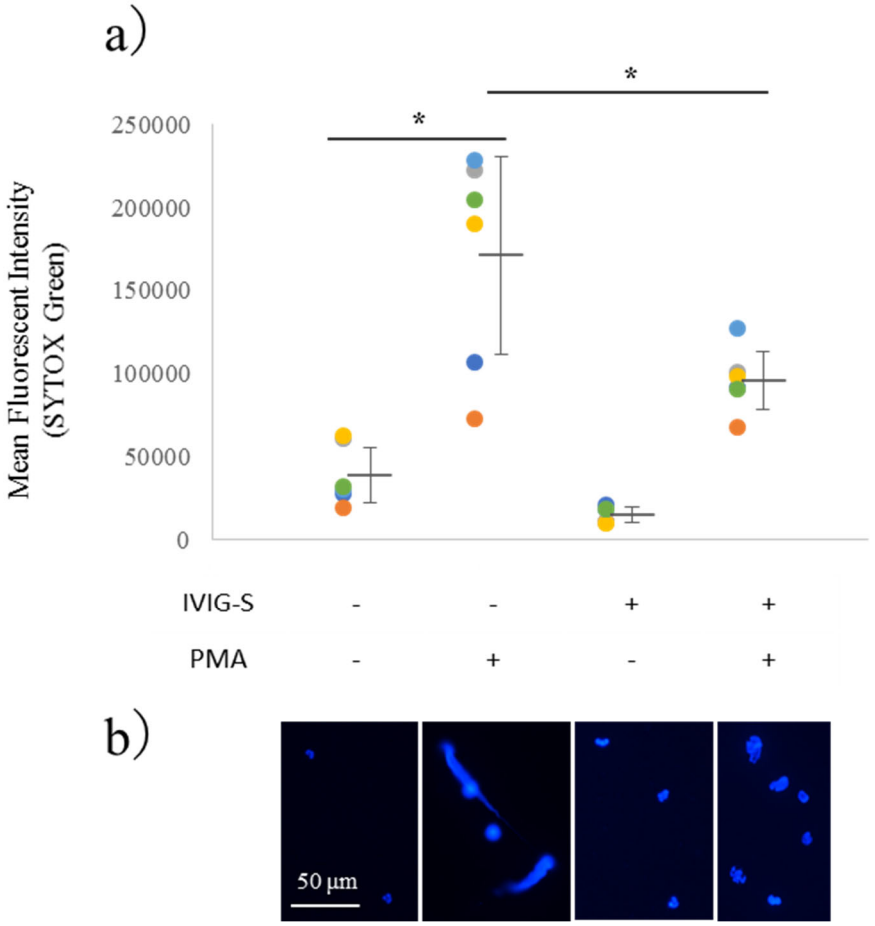


図 3. IVIG-S による PMA 誘導 NETs 形成の阻害

（a）健常ボランティア（n=5）の末梢血より好中球を分離し、5 mg/mL の IVIG-S を添加して 37℃で 30 分間静置した後、100 nM の PMA を 37℃にて 3 時間反応させた。その後、好中球を SYTOX Green で染色し、FCM を行った（*p<0.05）。

（b）健常者末梢血由来好中球を 4-well チャンバースライド内で FCM と同様に処理した。PBS にて洗浄後、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 PBS による洗浄を行い、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。

2-4-2　IVIG-S は *in vivo* において PMA により誘導される NETs 形成を阻害する

臨床的な有効血中濃度である 400 mg/Kg の IVIG-S が MPO-AAV ラットモデルにおいて NETs 形成や MPO-ANCA の産生、AAV の発症にどのような影響を及ぼすか調べた。実験では、MPO-AAV ラットモデルを 2 群に分け、一方には PTU 経口投与開始後、ANCA 陽性が確認された 8 日目から連続 5 日間 400 mg/Kg の IVIG-S を腹腔内注射し、もう一方には同量の PBS を腹腔内注射した。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、PBS を注射した対照群と比べ、IVIG-S 群において有意に少なかった（図 4）。

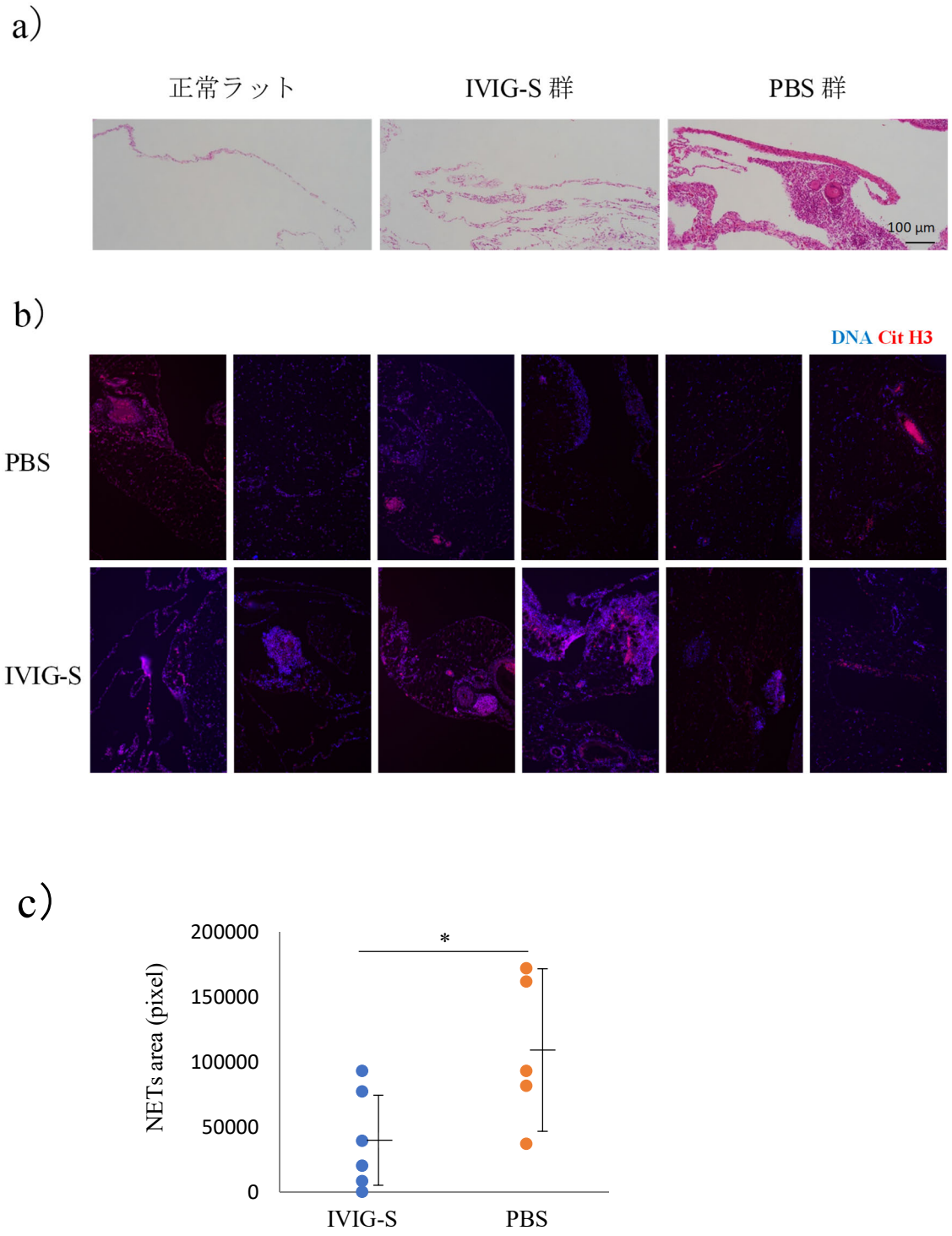


図 4. IVIG-S による MPO-AAV ラットモデル腹膜組織における NETs 形成の阻害

（a）正常ラットの腹膜、ならびに IVIG-S 投与群、PBS 投与群のラットの腹膜について、代表的な HE 染色画像を示す。

（b）ラット腹膜組織における NETs 形成（蛍光免疫染色）。赤色は NETs マーカーであるシトルリン化ヒストンを、青色は DNA を示す。各ラットの腹膜組織において、最も多く NETs が形成されていた個所の顕微鏡画像を提示した。

（c）顕微鏡画像上、紫色として認識される NETs 領域面積を画像解析ソフトにより数値化した結果を示す（$p<0.05$）。

2-4-3　IVIG-S は MPO-ANCA の産生を抑制する

血漿中の ANCA 抗体価についても IVIG-S 群と対照群を比較したところ、PTU の経口投与開始後 21 日目および 28 日目において、IVIG-S 群で ANCA 抗体価が有意に低かった（図 5)。

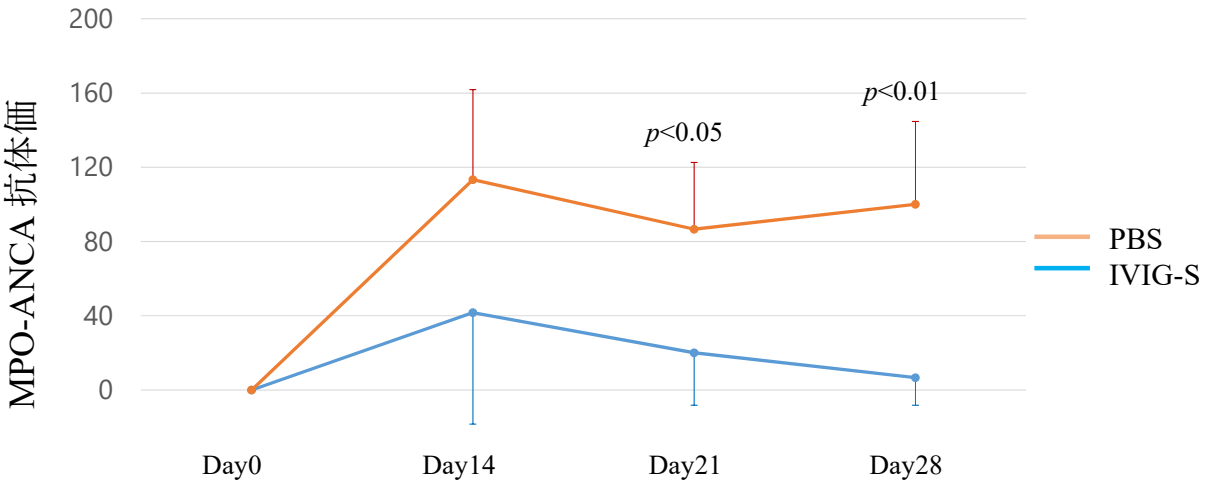


図 5. IVIG-S による MPO-ANCA 産生の抑制

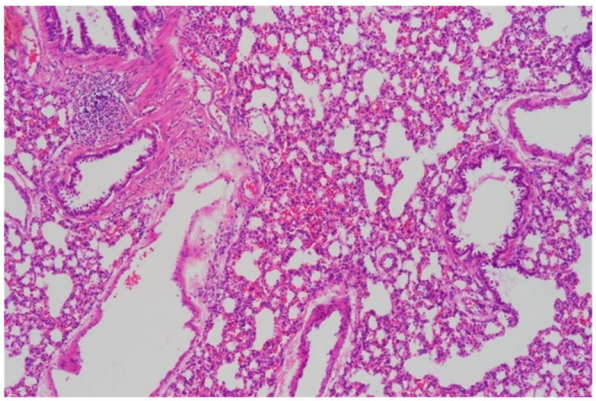
段階希釈した血漿中の ANCA を間接免疫抗体法によって検出した。ANCA が検出された、最も高い希釈倍率を ANCA 抗体価とした。

2-4-4　IVIG-S による MPO-AAV 発症の抑制

本モデルにおける血管炎病変の指標とされる肺胞出血について、肺最大割面中の病巣数をカウントし、IVIG-S 群と対照群で比較した。その結果、IVIG-S 投与群で肺胞出血病巣数が有意に少なかった（図 6）。

以上の結果は、臨床的有効血中濃度の IVIG-S が *in vivo* においても *in vitro* と同様に NETs 形成を抑制し、MPO-ANCA の産生と MPO-AAV の発症を抑制していることを示している。

a)



b)

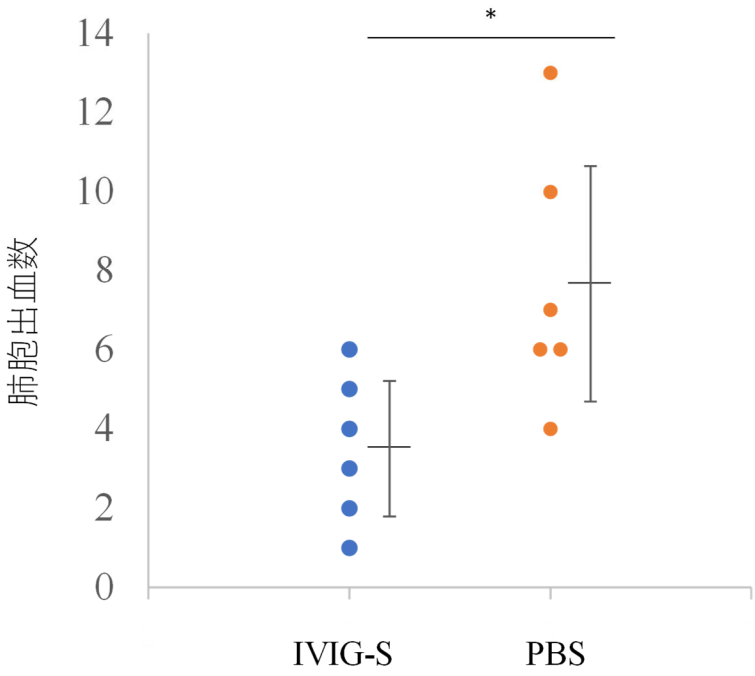


図 6. IVIG-S による MPO-AAV 発症の抑制

（a）対照群に認めた肺胞出血病巣（HE 染色）。

（b）肺最大割面の HE 染色標本を顕微鏡下に観察し、肺胞出血の病巣数をカウントした（*p<0.05）。

2-4-5　IVIG-S は好中球のラクトフェリン放出を誘導する

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[3][4]。そこで、臨床的な有効血中濃度に相当する 5 mg/mL の IVIG-S を添加した時に好中球から放出されるラクトフェリンの量について調べた。その結果、好中球を 1 × 10^6/mL 浮遊させた培養液中のラクトフェリン濃度は、臨床的有効血中濃度の IVIG-S 添加群において有意に増加していた（図 7）。

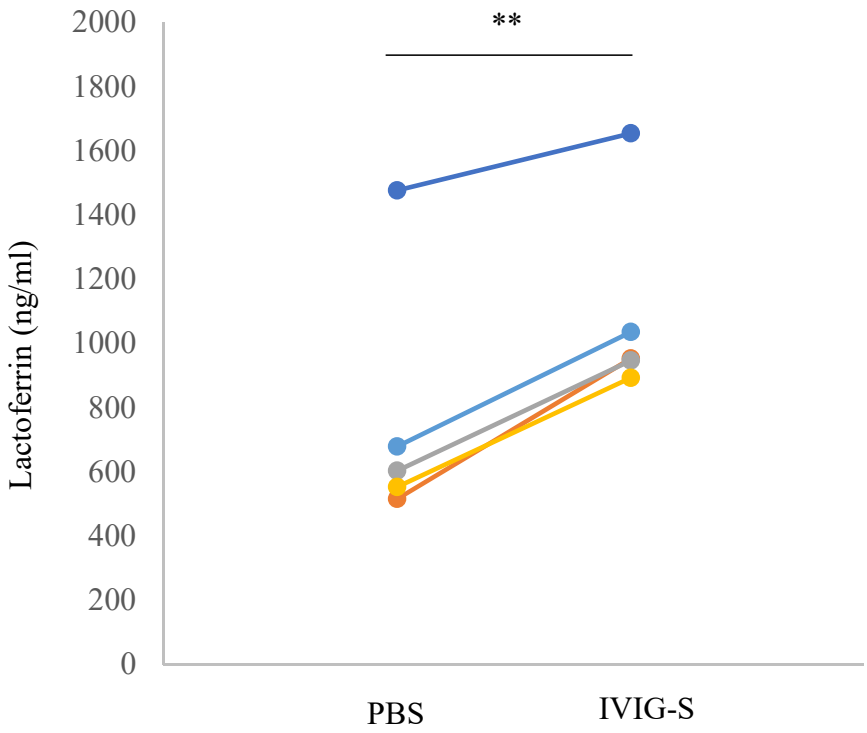


図 7. IVIG-S は好中球のラクトフェリン放出を誘導する

健常ヒト末梢血より分離し、1 × 10^6/mL に調整した好中球を IVIG-S 群と対照群に分けた。IVIG-S 群には 5 mg/mL の IVIG-S を、対照群には同量の PBS を添加した。37℃で 30 分間静置した後、遠心分離を行い、上清をサンプルとした。上清中のラクトフェリン濃度を ELISA により測定した（**p<0.01）。

2-5　考察

無および低γグロブリン血症[5] [6]や重症感染症[7]、ならびに ITP などの自己免疫疾患を含むいくつかの疾患に対する IVIG の有効性が既に確立されている[8] [9] [10] [11]。IVIG の薬理作用として、γグロブリンの補充の他、マクロファージの Fc 依存性不活性化や活性化補体タンパクの希釈、抗イデオタイプ抗体による病原性自己抗体の中和、異常なサイトカインの補正等のメカニズムが議論されてきた[12][13]。本研究によって得られた結果から、新たに IVIG が NETs 形成を抑制する可能性が示唆された。

NETs は活性化好中球が細胞外に放出する網状 DNA である。この網状 DNA は MPO や PR3 といった抗菌タンパクによって装飾されている[14]。体内に侵入した病原微生物と遭遇した好中球は、活性化し、NETs を形成して病原微生物をトラップし、殺菌する。NETs を形成するとともに好中球は細胞死を迎えるが、NETs による殺菌作用は好中球が細胞死に至った後も持続する。NETs は自然免疫において必要不可欠であるが、過剰な NETs 形成は、NETs に含まれる DNA[15]や MPO[2]を抗原とした自己抗体の産生を引き起こすことが、近年報告されている。MPO-AAV ラットモデルを使用した本研究で得られた、IVIG-S の投与による腹膜 NETs 形成の抑制、ならびに MPO-ANCA 抗体価や肺胞出血の抑制という実験結果は、IVIG が EGPA の末梢神経障害の改善のみならず、NETs が病態形成機序に関与する AAV 一般に有効である可能性を示唆している。しかし、PMA は化学物質であり、生物由来の物質ではない。AAV 患者の NETs 形成においては ANCA やその他の血清因子が関与していることが報告されている[16] [17] [18] 。それら生物由来の血清因子によって引き起こされる NETs 誘導に対する IVIG の抑制効果については、さらなる検討が必要である。

現在、AAV に対する IVIG の保険適用については、EGPA の末梢神経障害のみ承認されているが、AAV そのものへの保険適用についても検討の余地がある。実際に後ろ向き研究において、治療抵抗性あるいは再燃した AAV 患者に対して補助的に使用した IVIG の有用性が示されている[19]。さらに、予備的な前向き研究においても、IVIG は AAV の疾患活動性を低下させ、安全に完全寛解へ導くことが示されている[20]。

IVIG による NETs 抑制は、NETs が重要な自然免疫システムであることに照らすと、副作用としての免疫抑制を招くリスクも懸念される。しかしながら、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、腎病変は軽度にしか起こらない。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-S が NETs 形成を抑制する詳細なメカニズムは不明である。大久保らは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報告している[3]。このことは、ラクトフェリンが NETs 形成における内因性制御因子として働いていることを示している。それに加え、志田らは ANCA のひとつである抗ラクトフェリン抗体が一部の EGPA 患者で産生され、ラクトフェリンの効果を阻害し、結果として NETs 形成を促進して病勢を悪化させていると報告している[4]。

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いる[21]。本研究においても、IVIG-S 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、IVIG-S は

好中球からのラクトフェリン放出を介して PMA により誘導される NETs 形成を抑制している可能性が考えられる。

2-6 参考文献

1） Masuda, S., Shimizu, S., Matsuo, J., Nishibata, Y., Kusunoki, Y., Hattanda, F., et al. (2017). Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A*, *91*(8), 822–829.

2） Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., et al. (2012). 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*(11), 3779–3787.

3） Okubo, K., Kamiya, M., Urano, Y., Nishi, H., Herter, J. M., Mayadas, T., et al. (2016). Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation. *EBioMedicine*, *10*, 204–215.

4） Shida, H., Nakazawa, D., Tateyama, Y., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Hattanda, F., et al. (2016). 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. *Front Immunol.*, *7*, 1–7.

5） Makatsori, M., Kiani-Alikhan, S., Manson, A., Verma, N., Leandro, M., Gurugama N., et al. (2014). Hypogammagloblinaemia after rituximab treatment-incidence and outcomes. *QJM*, *107*(10), 821-828.

6） Shillitoe, B., Bangs, C., Guzman, D., Gennery, A. R., Longhurst, H. J., Slatter, M., et al. (2018). The United Kingdom Primary Immune Deficiency (UKPID) registry 2012 to 2017. *Clin Exp Immunol, 192*(3), 284-291.

7） Punit J., Niyati V. & Anna K. (2015). Role of intravenous immune globulin in streptococcal toxic shock syndrome and *Clostridium difficile* infection. *Am J Health Syst Pharm.*, *72*(12), 1013-1019.

8） Imbach P., Barandun S., Baumgartner C., Hirt A., Hofer F. & Wagner H. (1981). High-dose intravenous gammaglobulin therapy of refractory, in particular idiopathic thrombocytopenia in childhood. *Helv Paediatr Acta*, *36*(1), 81-86.

9） Salama A. (2017). Emerging drugs for immune thrombocytopenia (ITP). *Expert Opin Emerg Drugs, 22*(1), 27-38.

10） Restrepo J., Rodrigues Y., Gonzalez P., Chang C., Gershwin E. &Manuel A. (2018). The immunotherapy of Guillain-Barre syndrome. *Expert Opin Biol Ther.*, *18*(6), 619-631.

11） Koike, H., Akiyama, K., Saito, T. & Sobue, G. (2015). Intravenous immunoglobulin for chronic residual peripheral neuropathy in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg–Strauss syndrome): a multicenter, double-blind trial. *J Neurol.*, *262*(3), 752–759.

12） Tha-In, T., Bayry, J., Metselaar, H. J., Kaveri, S. V. & Kwekkeboom, J. (2008). Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol.*, *29*(12), 608–615.

13） Ballow, M. (2011). The IgG molecule as a biological immune response modifier: Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol.*, *127*(2), 315–323.

14） Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science, 303*(5663), 1532-1535.

15） Hakkim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., et al. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, *107*(21), 9813–9818.

16） Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T. & Ishizu A. (2014). Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol., 25*(5), 990-997.

17） Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schonermarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., et al. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med., 15(6), 623-625*.

18） Kraaij, T., Kamerling, S. W. A., van Dam, L. S., Bakker, J. A., Bajema, I. M., Page, T., et al. (2018). Excessive neutrophil extracellular trap formation in ANCA-associated vasculitis is independent of ANCA. *Kidney Int., 94(1), 139-149*.

19） Crickx, E., Machelart, I., Lazaro, E., Kahn, J. E., Cohen-Aubart, F., Martin, T.,

et al. (2016). Intravenous immunoglobulin as an immunomodulating agent in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: a French nationwide study of ninety-two patients. *Arthritis Rheumatol., 68(3), 702-712*.

20） Jayne, D. R., Chapel, H., Adu, D., Misbah, S., O'Donoghue, D., Scott, D., et al. (2000). Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity. *QJM*, 93(7), 433-439.

21） Teeling, J. L., De Groot, E. R., Eerenberg, A. J. M., Bleeker, W. K., Van Mierlo, G., Aarden, L. A. & Hack, C. E. (1998). Human intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations degranulate human neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol.*, *114*(2), 264–270.

第 3 章

総括

3-1　免疫グロブリン製剤が NETs 形成および AAV 発症に及ぼす影響

本研究により、以下のことが明らかとなった。

（1）健常ヒト末梢血由来好中球において、IVIG-S が PMA による NETs 形成を抑制する。

（2）MPO-AAV ラットモデルにおいて、IVIG-S が腹腔内での NETs を抑制する。

（3）MPO-AAV ラットモデルにおいて、IVIG-S が MPO-ANCA の産生を抑制する。

（4）MPO-AAV ラットモデルにおいて、IVIG-S が MPO-AAV の発症を抑制する。

（5）健常ヒト末梢血由来好中球において、IVIG-S がラクトフェリンの放出を誘導する。

本研究で得られた成果は、人口の高齢化に伴い患者数が増加している AAV に対して、強力な免疫抑制を伴う標準的な寛解導入療法の他に、今後新たな治療法となりうる IVIG の可能性を示唆したことである。

3-2　今後の課題と展望

第 2 章の考察にも記載したとおり、IVIG が AAV の主要病変である急速進行性腎障害に対して抑制効果を発揮するか、今後検討する必要がある。そのためには、ヒト AAV の病態をより良く反映する新たな疾患モデルの開発が望まれる。

また、IVIG が NETs 形成を抑制するメカニズムについても詳細な解析が必要である。例えば、ラクトフェリンをノックダウンした好中球では IVIG による NETs の形成抑制効果がキャンセルされるかどうか、確認することが必要である。

それらを明らかにした後、最終的にはランダマイズされた前向き比較臨床試験により、AAV に対する IVIG の効果を明らかにする必要がある。

謝辞

本博士論文作成に際し、直接ご指導を賜りました北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野の石津明洋教授、益田紗季子助教に厚く御礼申し上げます。また、研究を進めるにあたり、ご指導、適切なご助言、ご協力をいただきました北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野の外丸詩野准教授に深く感謝申し上げます。そして研究を進めるにあたって多大なご協力を頂きました北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野の皆様、社会人として職場に籍を置きながら大学院博士後期課程への進学を許可し、業務に配慮いただいた北海道大学病院検査・輸血部の皆様に、改めて感謝の意を表します。