



Title	抗CD47抗体はエフェロサイトーシスを介してANCA関連血管炎を制御する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	白鳥, 里佳
Description	配架番号 : 2741
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15237号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87683
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SHIRATORI_Satoka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 白鳥 里佳

学 位 論 文 題 名

抗 CD47 抗体はエフェロサイトーシスを介して ANCA 関連血管炎を制御する
(CD47 blockade ameliorates ANCA associated vasculitis via the efferocytosis)

【背景と目的】抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) は、病原性自己抗体 ANCA の産生とともに全身の小動脈に壊死性血管炎を生じる疾患であり、壊死性半月体形成性糸球体腎炎を引き起こす。本疾患の病態として、ANCA を含む血清因子により過剰に誘導される好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs) が血管内皮細胞傷害を引き起こし、小型血管を中心に壊死が起こる。NETs は DNA 等の damage-associated molecular patterns (DAMPs) を細胞外に放出して微生物を殺菌するとともに、能動的に細胞死に至るため NETosis とも呼ばれる。プログラムされた細胞死の代表であるアポトーシス細胞は、"don't eat me" signal である CD47 の発現を低下させてマクロファージにより貪食されるが (エフェロサイトーシス)、腫瘍や動脈硬化組織のネクローシス細胞は CD47 を高発現しエフェロサイトーシスから免れ、病態の進展に寄与するとされる。本研究では ANCA で誘導される NETs や傷害血管内皮細胞が CD47 を高発現してエフェロサイトーシスを回避し、炎症・組織障害を助長すると仮説を立て、AAV における CD47 阻害の効果について検証した。

【材料と方法】 Human tissue: AAV における CD47 の関与を検証するため、ヒト AAV 患者の腎生検検体を用いて CD47 染色を行った。

In vitro 実験: 好中球と血管内皮細胞における CD47 の発現と機能を3つの実験系で検証した。

1) ヒト健常好中球を用いて AAV 患者から抽出した ANCA-immunoglobulin G (IgG) 添加により NETs を誘導し、蛍光顕微鏡および flow cytometry (FCM) で CD47 発現量を解析した。2) ANCA 誘導 NETs を抗 CD47 抗体あるいはコントロール抗体存在下でマクロファージと共培養し、エフェロサイトーシス実験を行った。蛍光顕微鏡撮影、ならびに time lapse 撮影を用いて評価した。3) 過酸化水素で壊死させた血管内皮細胞を用いて、抗 CD47 抗体あるいはコントロール抗体存在下でエフェロサイトーシス実験を行い time lapse 撮影で評価した。

In vivo 実験: 自然発症型、抗体移入型の2種類の AAV モデルマウスを用いて、抗 CD47 抗体による治療効果を生化学検査、組織学的評価、mRNA 発現、免疫細胞の FCM により評価した。

1) AAV 自然発症モデルマウスとして spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming/Kinjoh (SCG/Kj) マウスを用いた。8 週齢より 5 日毎、抗 CD47 抗体またはコントロール抗体を 200 μ g 腹腔内投与し (n=6/群)、10 週齢で解剖した。2) 抗体移入型 AAV モデルマウスは、11 週齢

の C57BL/6 マウスに抗 CD47 抗体またはコントロール抗体を 200 µg 腹腔内投与し (n=8/群), その 1 時間後に myeloperoxidase (MPO)-ANCA を含む血清を移入することで AAV を誘導し, 24 時間後に解剖した. MPO-ANCA を含む血清は, マウス骨髄細胞株 (WEHI-3) から MPO を抽出し, *MPO*⁺マウスに免疫して採取した.

【結果】 Human tissue: AAV 患者の腎生検検体において, 半月体や炎症部位を中心に CD47 強陽性像を認めた. 病理学的に minor glomerular abnormalities (MGA) と診断された対照群では CD47 陽性域が有意に少なかった.

In vitro 実験: 1) ヒト健康好中球から ANCA-IgG により誘導された NETs は, 健康人由来の control IgG と培養した好中球と比較し, CD47 を高発現していた. 2) コントロールとして用いたアポトーシス好中球はマクロファージによりエフェロサイトーシスされたが, ANCA 誘導 NETs はエフェロサイトーシスされなかった. しかし抗 CD47 抗体投与により ANCA 誘導 NETs のエフェロサイトーシスは回復した. 3) 過酸化水素により壊死を誘導した血管内皮細胞はエフェロサイトーシスされなかったが, 抗 CD47 抗体の添加により回復した.

In vivo 実験: 1) 自然発症 AAV モデルマウスにおいて, 抗 CD47 抗体投与により腎機能・腎病理所見が改善し, 血清 MPO-ANCA 値の低下, 腎臓の炎症に関与する遺伝子発現の低下を認めた. 一方, 糸球体内の好中球数は増加した. 2) 抗体移入型 AAV モデルマウスにおいて, 抗 CD47 抗体投与による腎機能・腎病理所見の改善効果は認めなかった.

【考察】ヒト AAV 患者の腎組織と in vitro での ANCA 誘導 NETs は CD47 を高発現し, 食食実験では NETs と傷害血管内皮細胞がマクロファージによるエフェロサイトーシスを回避した. さらに抗 CD47 抗体は, 同細胞に対するエフェロサイトーシスを回復させた. 以上より, 本疾患で生じる cytotoxic な NETs や傷害血管内皮細胞に対するエフェロサイトーシスの低下が血管炎病態に関与することが示唆された. AAV 自然発症モデルマウスでは抗 CD47 抗体投与により, 腎機能と腎病理所見の改善, 血清 MPO-ANCA 値の低下, 腎臓の炎症関連遺伝子の発現低下を認めた. 腎組織を用いた RNA シークエンス解析では, CD47 阻害抗体により炎症に関連するシグナル経路の関与が示された. 一方, 抗体移入型 AAV モデルマウスでは抗 CD47 抗体による治療効果を認めず, 自然発症モデルマウスと異なる反応が見られた. 抗 CD47 抗体は CD47 を高発現する細胞に対するエフェロサイトーシスを改善する作用を有するが, 食食する側のマクロファージや免疫細胞を賦活化する作用も併せ持ち, 自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスでは疾患発症前と活動期で CD47 阻害効果が異なることが知られている. 本動物実験での自然発症マウスにおいては, CD47 阻害により血管炎部位の NETs や傷害血管内皮細胞がマクロファージにより食食され, 局所の細胞障害が軽減し腎炎の改善に繋がったと考えられるが, 応答したマクロファージの免疫賦活化によりさらなる免疫細胞が遊走した可能性がある. 疾患活動性の高い抗体移入型モデルでは免疫賦活化による炎症が, 局所のエフェロサイトーシス誘導による腎保護作用を打ち消した可能性があり, 本疾患におけるエフェロサイトーシスの役割とともに治療タイミングの重要性も示された.

【結論】CD47 阻害は ANCA 誘導 NETs や傷害血管内皮細胞のエフェロサイトーシスを促進することで AAV 病態を制御する. CD47 阻害による抗炎症作用をさらに解明することで, CD47 阻害が AAV の病態改善, 臓器保護をもたらす新たな治療戦力になると期待される.