



| | |
|---------------------|---|
| 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_review.pdf, 審査の要旨 |



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 白鳥 里佳

主査 教授 清野 研一郎
審査担当者 副査 教授 安斉 俊久
副査 教授 小林 弘一

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)

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、その病態機序として好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs) の制御異常が明らかになっている。好中球は NETs 形成とともに能動的に細胞死に至る。近年、マクロファージによる死細胞の貪食 (エフェロサイトーシス) と、その制御因子で "don't eat me" signal として機能する CD47 が注目されている。今回、ヒト AAV 患者の腎生検検体において CD47 の強陽性像を認め、また *in vitro* で ANCA により誘導した NETs は CD47 を高発現していた。また NETs や壊死血管内皮細胞のエフェロサイトーシスは障害されていたが、抗 CD47 抗体投与により回復した。自然発症 AAV モデルマウスにおいては抗 CD47 抗体投与により腎保護、myeloperoxidase (MPO)-ANCA の低下を認めた一方、抗体移入型 AAV モデルマウスでは治療効果が得られなかった。これらの結果より、NETs は CD47 を高発現してエフェロサイトーシスから免れ、CD47 阻害により障害された NETs や傷害血管内皮細胞のエフェロサイトーシスが回復することが明らかになった。CD47 阻害は免疫賦活化作用も有しており、治療タイミングの重要性が示唆されたとともに、CD47 阻害が AAV の新たな治療戦略になることが期待された。

審査ではまず副査の安斉教授から、CD47 発現の制御因子と AAV での CD47 発現亢進への関与について質問があり、申請者は CD47 発現を亢進させる因子の 1 つとして TNF- α が報告されており、AAV においても好中球のプライミングに関与していることから、血管炎において TNF- α が CD47 発現亢進に関与している可能性があるかと回答した。また、マウス実験において治療タイミングの重要性を示していたが、実際の AAV 患者の治療にあたりどのように考えるか質問があった。申請者は、過去の自己免疫疾患モデルで発症後の抗 CD47 抗体投与が疾患を増悪させることが示唆されており、現状では抗 CD47 抗体を AAV 患者に単剤で投与することは想定しづらいが、ステロイドや他の免疫抑制薬と併用することで、抗 CD47 抗体が有用な治療になる可能性があるかと回答した。加えて、今回の研究では貪食に注目していたが、線維化や血管のリモデリングを介した作用はあるか、質問があった。申請者は、AAV においてそのような既報はないものの、既報では動脈硬化病変の縮小が示されており、そのような作用が得られる可能性もあるかと回答した。

副査の小林教授から、どのような好中球がプライミングされるのか、プライミングされた好中球ではどのようにして MPO が細胞表面に表出されるのか、またプライミングされた好中球や

NETs で MPO が表出する理由は何か、NETs が MPO-ANCA 産生を促進する経路は樹状細胞を介した抗原提示でよいのか、と質問があった。申請者は、好中球は炎症性サイトカインや補体系を介してプライミングされると回答した。さらに、細胞内の MPO は抗菌蛋白として機能するため、細菌感染への防御機構の 1 つであると考えられること、また ANCA 産生を促す機序は樹状細胞を介したものと回答した。続いてヒト AAV 患者の腎組織の CD47 染色における陽性像は NETs なのか、と質問があり、NETs も含まれていると思われるが、主に血管内皮細胞が染まっていると考えられると回答した。さらに、NETs の CD47 発現を検討するにあたり、補体でプライミングした好中球ではどうだったか、と質問があり、今回は検討していないと回答した。エフェロサイトーシス実験において、同時に CD47 発現も検討できるような実験系だとより良かった、と指摘があった。加えて、抗 CD47 抗体非存在下で NETs と共培養したマクロファージで一部の炎症性サイトカインの mRNA 発現が上昇している機序について質問があった。申請者は、NETs 形成とともに壊死に至った白血球の細胞内容物が放出されることが機序の 1 つとして考えられると回答した。また、SCG/Kj マウスの遺伝的背景について質問があり、BXSb と MRL/lpr を交配した系統であり、SLE のモデルマウスとして用いられていると回答した。さらに、SCG/Kj マウスのヒト病態との関連性について質問があった。申請者は、ANCA が産生され、半月体形成性糸球体腎炎や肺病変を生じる点がヒトと類似すること、一方でヒトでは pauci-immune 型の腎炎であるが SCG/Kj マウスでは免疫グロブリンや補体が沈着する点が異なる、と回答した。また、ANCA 移入モデルでは LPS の投与量が多いのでは、さらに 2 つのモデルマウスでの結果が異なる理由として、単に発症機序が違うからではないか、と指摘があった。さらに、SLE、EAE のモデルマウスで CD47 ノックアウトが病勢改善に働く具体的な機序について質問があった。申請者は、自己免疫疾患における CD47 の作用については明らかになっていない部分も多いが、引用している SLE の既報では CD47 が貪食に与える影響よりも、免疫細胞応答を減弱させることに着目していること、また EAE の既報では NO を介した IL-18 産生とそれに伴う Th17 の活性化に関わる経路が関与していることが示されていることを回答した。最後に、抗 CD47 抗体の臨床試験はどうなっているか質問があり、phase 2 まで進んでおり、スライドで提示した B 細胞性リンパ腫の臨床試験では、大きなものとして貧血などの副作用がみられているものの、抗 CD47 抗体の効果が得られていると回答した。

主査の清野教授より、NETs の CD47 発現を解析した flow cytometry の実験結果について、有意差はあるものの差が小さいことについて指摘があった。続いて、今回の研究では NETs の貪食が主な作用と考えられるが実際に NETs の多い部位で抗 CD47 抗体の治療効果が得られたのか質問があった。申請者は、どの臓器で NETs が多いのかはデータがないが、AAV における代表的な臓器病変が存在する腎と肺に NETs が存在することは染色で確認していると回答した。また、CD47 を阻害しても、Siglec-10 など他の don't eat me signal は残っているはずであり、その点についてどう考えるか質問があった。申請者は CD24-Siglec-10 系の血管炎の既報はないものの、実際には CD47-SIRPα 系以外の don't eat me signal や eat me signal も存在しており、そのバランスが重要だと考えられ、この経路の阻害だけでも一定の効果が得られると考えていると回答した。さらに抗 SIRPα 抗体も研究されているが、CD47 阻害と SIRPα 阻害の差について質問があった。申請者は CD47、SIRPα いずれの阻害でも貪食亢進が確認されているが、CD47 についてはトロンボスポンジン 1 (TSP1) のリガンドでもあり、炎症性・抗炎症性いずれの作用も有することが報告されている CD47-TSP1 系を阻害するか否か、という点で差があると想定される、と回答した。

この論文は、AAV の病態形成に関与する NETs で CD47 発現が亢進し、CD47 阻害が NETs や傷害血管内皮細胞のエフェロサイトーシスを回復させ、AAV 病態を改善させる可能性を示したことにおいて高く評価され、今後の AAV の新規治療への発展に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。