



# HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	白鳥, 里佳
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2741 他
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	<a href="https://hdl.handle.net/2115/87684">https://hdl.handle.net/2115/87684</a>
Type	doctoral thesis
File Information	SHIRATORI_Satoka_summary.pdf



# 学位論文（要約）

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)

2022 年 12 月

北 海 道 大 学

白鳥 里佳

Satoka Shiratori



# 学位論文（要約）

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)

2022 年 12 月

北海道大学

白鳥 里佳

Satoka Shiratori

【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, 全身の小動脈に壊死性血管炎を生じる疾患である. 血清中の ANCA が陽性となり, 急速進行性糸球体腎炎や肺出血など重篤な病態を引き起こす. AAV の病態形成において, 好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) が重要な役割を担うことが明らかになっている. AAV において tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などによりプライミングされた好中球は myeloperoxidase (MPO) や proteinase 3 (PR3) を細胞表面に表出し, ANCA がこれらの抗原と結合することで NETs が形成される. 加えて AAV 患者は NETs の分解障害を有している. 制御されない過剰な NETs は, その構成成分であるヒストンなどを細胞外に放出し, 血管内皮障害を引き起こす. また NETs に含まれる MPO や PR3 は自己抗原となり ANCA 産生を促進し, 悪循環病態を形成している. 好中球は NETs 形成とともに能動的に細胞死に至る. NETs は主に血清中の DNase I で分解されるが, マクロファージによる貪食によっても除去されることが報告されている.

近年, プログラムされたマクロファージによる死細胞の貪食であるエフェロサイトーシスと, その制御因子である CD47 が注目されている. 全身のほぼ全ての細胞に表出される CD47 はマクロファージの細胞膜上にある signal-regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) と結合し, "don't eat me" signal として機能する. 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, 速やかにエフェロサイトーシスされている. 一方で, 悪性腫瘍や壊死組織塊を含有する動脈硬化組織は CD47 を高発現し, エフェロサイトーシスから免れて病態の進展に寄与するとされ, CD47-SIRP $\alpha$  シグナルの阻害による治療効果が報告されている.

以上より, 本研究では AAV で誘導される NETs が CD47 を高発現することで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.

## 【方法】

① 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.

② In vitro 実験: AAV で鍵となる好中球と血管内皮細胞における CD47 の発現と機能を検証するため, 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. 一定時間経過後の蛍光顕微鏡撮影, 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。

③In 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  $\mu$ 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  $\mu$ g 腹腔内投与し (n=8/群), その 1 時間後に 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*<sup>-/-</sup>マウスに免疫して採取した.

### 【結果】

- ①Human 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.
- ②In vitro 実験: 1) ヒト健常好中球から ANCA-IgG により誘導された NETs は, 健常人由来の 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.
- ③In 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, 糸球体に浸潤するマクロファージ数に変化は見られず, 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, ならびに in vitro での ANCA 誘導 NETs は CD47 を高発現し, 貪食実験では NETs と壊死した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

に關与することが示唆された. そこで2種類の AAV モデルマウスを用いて CD47 阻害治療の効果を検証したところ, 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. 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回復する作用を有するが, 貪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つことが知られている. また, 抗 CD47 抗体は単独では炎症を誘発しないものの, lipopolysaccharide (LPS) が存在すると炎症誘発性の作用を示すと報告されている. さらに CD47 はトロンボスポンジン 1 (TSP1) のリガンドでもあり, TSP1 には炎症誘発性・抗炎症性の両方の作用が認められている. 自己免疫性疾患のモデルマウスを用いた検討では, CD47 阻害の方法や時期により治療効果が大きく異なっており, 全身性エリテマトーデス (SLE) のモデルマウスでは CD47 ノックアウトマウスとの交配で寿命の延長, 腎炎の改善, 自己抗体の減少を認めた一方で, ループス症状を示す週齢の SLE モデルマウスに抗 CD47 抗体を投与すると腎炎症状が増悪したと報告されている. 自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスにおいても, 疾患の発症前と活動期で CD47 阻害効果が異なることが知られている. これらの結果から, 自己免疫における CD47 のシグナルは複雑で, 細胞, 組織, 病勢, 周囲の炎症などにより異なる機能を持っている可能性が論じられている.

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適切に貪食され, 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】** ヒト AAV 患者の壊死性血管炎部位に CD47 が高発現し, *ex vivo* の実験系から CD47 を高発現する ANCA-NETs とそれに傷害される血管内皮細胞がエフェロサイトーシスを回避し, 炎症の増幅に關与することが示した. AAV モデル動物実験により, 抗 CD47 抗体による CD47 阻害が, ANCA 誘導 NETs や壊死血管内皮細胞のエフェロサイトーシスを促進し, 本疾患の壊死性血管炎の改善に繋がった. CD47 阻害による抗炎症作用をさらに解明することで, CD47 が AAV の病態改善, 臓器保護効果をもたらす新規治療標的になることが期待される.