HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ANCA関連血管炎の病態形成におけるシクロフィリンD依存性プログラム細胞死の役割
Author(s)	工藤, 孝司
Description	配架番号：2605
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14487号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14487
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87692
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Kudo.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

ANCA 関連血管炎の病態形成における
シクロフィリン D 依存性プログラム細胞死の役割

(The role of Cyclophilin D dependent necrosis
in the pathogenesis of ANCA associated vasculitis)

2021 年 3 月

北　海　道　大　学
工藤　孝司
Takashi Kudo

学 位 論 文

ANCA 関連血管炎の病態形成における
シクロフィリン D 依存性プログラム細胞死の役割

(The role of Cyclophilin D dependent necrosis
in the pathogenesis of ANCA associated vasculitis)

2021 年 3 月

北　海　道　大　学
工藤　孝司
Takashi Kudo

目次

1. 発表論文目録及び学会発表目録 ..... 1 頁
2. 要旨 ..... 3 頁
3. 略語表 ..... 6 頁
4. 緒言 ..... 9 頁
5. 第一章 ヒト AAV, SLE における CypD 依存性ネクローシスの関与の検討 13 頁
5.1 緒言 ..... 14 頁
5.2 対象 ..... 15 頁
5.3 方法 ..... 16 頁
5.2.1 TUNEL 染色 ..... 16 頁
5.2.2 Cyt c 染色 ..... 16 頁
5.2.3 統計学的解析 ..... 16 頁
5.3 結果 ..... 17 頁
5.3.1 AAV の CypD 依存性ネクローシスの関与の検討 ..... 17 頁
5.3.2 他の免疫疾患と CypD 依存性ネクローシスの関与の検討 ..... 19 頁
5.4 考察 ..... 21 頁
6. 第二章 ヒト好中球における ANCA 誘導 NETs に対する CypD 阻害薬の効果の検討 ..... 22 頁
6.1 緒言 ..... 23 頁
6.2 方法 ..... 24 頁
6.2.1 ヒト好中球の分離 ..... 24 頁
6.2.2 Immunoglobulin G (IgG)の抽出 ..... 24 頁
6.2.3 NETs 誘導と評価 ..... 24 頁
6.2.4 SG 染色 ..... 24 頁
6.2.5 FCM ..... 25 頁
6.2.6 mito-SOX 免疫染色 ..... 25 頁
6.2.7 Cyt c 免疫染色 ..... 25 頁
6.2.8 CitH3 免疫染色 ..... 26 頁
6.2.9 透過型電子顕微鏡での観察 ..... 26 頁
6.2.10 統計学的解析 ..... 26 頁
6.3 結果 ..... 27 頁
6.3.1 ANCA 誘導 NETs に対する CypD 阻害薬の効果 ..... 27 頁
6.3.2 ANCA 誘導 NETs における CypD 依存性ネクローシスの関与 ..... 30 頁
6.3.3 ANCA 誘導 NETs の形態学的変化の検討 ..... 38 頁
6.4 考察 ..... 40 頁

7. 第三章 マウス好中球における ANCA 誘導 NETs に対する CypD の遺伝子除去の効果の検討 ..... 41 頁
7.1 緒言 ..... 42 頁
7.2 方法 ..... 43 頁
7.2.1 マウス好中球の分離 ..... 43 頁
7.2.2 NETs 誘導と評価 ..... 43 頁
7.2.3 SG 免疫染色 ..... 44 頁
7.2.5 RNA-seq ..... 45 頁
7.2.5 統計学的解析 ..... 45 頁
7.3 結果 ..... 46 頁
7.3.1 ANCA 誘導 NETs に対する CypD の遺伝子除去の効果 ..... 46 頁
7.3.2 ANCA 誘導 NETs に対する CypD の遺伝子除去の形態学的変化の検討 ..... 49 頁
7.3.3 ANCA 誘導 NETs のシグナル経路 ..... 51 頁
7.4 考察 ..... 53 頁
8. 第四章 ANCA 誘導 NETs の血管内皮細胞傷害に対する CypD 阻害薬の効果の検討 ..... 54 頁
8.1 緒言 ..... 55 頁
8.2 方法 ..... 56 頁
8.2.1 HuEht の培養 ..... 56 頁
8.2.2 Immunoglobulin G (IgG)の抽出 ..... 56 頁
8.2.3 ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞傷害の評価および CypD 阻害薬の効果 ..... 57 頁
8.2.4 統計学的解析 ..... 58 頁
8.3 結果 ..... 59 頁
8.3.1 ANCA 誘導 NETs による HuEht の細胞傷害に対する CypD 阻害薬の効果 ..... 59 頁
8.4 考察 ..... 61 頁
9. 第五章 AAV 誘導モデルマウスに対する CypD の遺伝子除去効果の検討 62 頁
9.1 緒言 ..... 63 頁
9.2 方法 ..... 64 頁
9.2.1 AAV 誘導モデルマウスの樹立 ..... 64 頁
9.2.1.1 WEHI-3 の培養 ..... 64 頁
9.2.1.2 マウス MPO の抽出 ..... 64 頁
9.2.1.3 *MPO*$^{-/-}$マウス ..... 65 頁
9.2.1.4 マウス MPO の免疫化 ..... 65 頁

9.2.1.5　マウス MPO-IgG の確認 (間接蛍光抗体法と ELISA 法)..... 65 頁
9.2.2　AAV 誘導モデルマウスに与える *CypD* 遺伝子除去の影響..... 66 頁
9.2.2.1　生化学検査..... 66 頁
9.2.2.2　尿検査..... 66 頁
9.2.2.3　腎組織に対する PAS 染色と TUNEL 染色..... 66 頁
9.2.2.4　肺組織に対する HE 染色と TUNEL 染色..... 66 頁
9.2.2.5　FCM..... 67 頁
9.2.2.6　Cyt c 免疫染色..... 67 頁
9.2.2.7　CitH3 免疫染色..... 67 頁
9.2.3　統計学的解析..... 67 頁
9.3　結果..... 68 頁
9.3.1　単離されたマウス MPO の確認..... 68 頁
9.3.2　マウス MPO-IgG の確認..... 69 頁
9.3.3　血尿および腎機能の検討..... 70 頁
9.3.4　糸球体腎炎の検討..... 73 頁
9.3.5　腎臓における壊死細胞の検討..... 75 頁
9.3.6　肺出血の検討..... 77 頁
9.3.7　肺における壊死細胞の検討..... 79 頁
9.3.8　FCM による循環血液中の NETs とその関連因子の評価..... 81 頁
9.3.9　腎臓の壊死性病変と CypD 依存性ネクローシスの関与の検討..... 83 頁
9.4　考察..... 88 頁
10. 第六章　自然発症 AAV モデルマウスに対する CypD の遺伝子除去の影響
..... 89 頁
10.1　緒言..... 90 頁
10.2　方法..... 91 頁
10.2.1　SCG/Kj マウス..... 91 頁
10.2.2　SCG/Kj マウスと *CypD*$^{-/-}$の戻し交配..... 91 頁
10.2.3　生化学検査..... 92 頁
10.2.4　尿検査..... 92 頁
10.2.5　腎組織に対する PAS 染色と TUNEL 染色..... 92 頁
10.2.6　肺組織に対する HE 染色と TUNEL 染色..... 92 頁
10.2.7　腎組織における TUNEL 陽性細胞の同定..... 93 頁
10.2.8　血清 MPO-ANCA 値の測定..... 93 頁
10.2.9　血清抗 dsDNA 抗体値の測定..... 93 頁
10.2.10　生存率の解析..... 93 頁
10.2.11　統計学的解析..... 93 頁

10.3　結果 ..... 94 頁
10.3.1　血尿および腎機能の検討 ..... 94 頁
10.3.2　糸球体腎炎の検討 ..... 96 頁
10.3.3　腎臓における壊死細胞の検討 ..... 98 頁
10.3.4　肺出血の検討 ..... 101 頁
10.3.5　肺における壊死細胞の検討 ..... 103 頁
10.3.6　CypD の遺伝子除去による自己抗体産生能への影響の検討 ..... 105 頁
10.3.7　生存率の検討 ..... 106 頁
10.4　考察 ..... 107 頁
11. 第七章 TLR7 アゴニスト誘導 SLE モデルマウスに対する CypD の遺伝子除去効果の検討 ..... 108 頁
11.1　緒言 ..... 109 頁
11.2　方法 ..... 110 頁
11.2.1　SLE の誘導 ..... 110 頁
11.2.2　脾臓の評価 ..... 110 頁
11.2.2　生化学検査 ..... 110 頁
11.2.3　尿検査 ..... 110 頁
11.2.4　血清 DNA の測定 ..... 110 頁
11.2.5　血清抗 dsDNA 抗体値の測定 ..... 111 頁
11.2.6　腎組織に対する PAS 染色と TUNEL 染色 ..... 111 頁
11.2.7　IgG 免疫染色 ..... 111 頁
11.2.8　統計学的解析 ..... 111 頁
11.3　結果 ..... 112 頁
11.3.1　脾臓の大きさと重量の検討 ..... 112 頁
11.3.2　腎機能および尿所見の検討 ..... 114 頁
11.3.3　循環血液中の NETs の検討 ..... 116 頁
11.3.4　CypD の遺伝子除去による自己抗体産生能への影響の検討 ..... 117 頁
11.3.3　糸球体腎炎の検討 ..... 118 頁
11.3.4　腎臓における壊死細胞の検討 ..... 123 頁
11.4　考察 ..... 125 頁
12.　総合考察 ..... 126 頁
13.　結論 ..... 128 頁
14.　謝辞 ..... 130 頁
15.　利益相反 ..... 131 頁
16.　引用文献 ..... 132 頁

1. 発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

1. Takashi Kudo, Daigo Nakazawa, Kanako Watanabe-Kusunoki, Masatoshi Kanda, Satoka Shiratori-Aso, Nobuya Abe, Saori Nishio, Jun-ichiro Koga, Sari Iwasaki, Takahiro Tsuji, Yuichiro Fukasawa, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Sakiko Masuda, Utano Tomaru, Masaaki Murakami, Yasuaki Aratani, Akihiro Ishizu, Tatsuya Atsumi. Cyclophilin D-dependent necrosis mediates autoimmune necrotizing vasculitis, but not lupus autoimmunity. *Nature Medicine.*

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 工藤　孝司，中沢　大悟，白鳥　里佳，楠　加奈子，西尾　妙織，
益田　紗季子，外丸　詩野，石津　明洋，渥美　達也
シクロフィリン D をターゲットとした ANCA 関連壊死性血管炎に対する
新規治療薬の開発
第 28 回日本 Cell Death 学会学術集会，
2019 年 7 月 12 日−13 日，東京大学本郷キャンパス

2. 工藤　孝司，中沢　大悟，白鳥　里佳，楠　加奈子，西尾　妙織，
益田　紗季子，外丸　詩野，石津　明洋，渥美　達也
シクロフィリン D をターゲットとした ANCA 関連壊死性血管炎に対する
新規治療薬の開発
第 47 回日本臨床免疫学会総会，
2019 年 10 月 17 日−19 日，ロイトン札幌

3. Kudo T, Nakazawa D, Watanabe-Kusunoki K, Shiratori S, Nishio S, Tomaru U,
Ishizu A, Atsumi T. CypD deficiency ameliorates autoimmune vasculitis
in mouse model via the inhibition of programmed necrosis
The 57th European Renal Association – European Dialysis
and Transplant Association Congress,
June 6-9, 2020, virtual congress

2. 要旨

【背景と目的】抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) は, 病原性自己抗体の産生とともに臓器障害が引き起こされる代表的な自己免疫疾患である. 全身性エリテマトーデス (SLE) は臨床的に糸球体腎炎や肺病変等の AAV と類似する症状を有することがあり, 両疾患は病態機序的にも自然免疫機構である好中球細胞外トラップ (NETs) の制御が関与するが, 病理組織学的には AAV は壊死性血管炎を呈し, SLE は慢性炎症による臓器障害を特徴とする違いがある. AAV ではミエロペルオキシダーゼ (MPO) などを抗原とした病原性自己抗体 ANCA が好中球に作用して過剰な NETs と血管内皮傷害を誘導し壊死性血管炎を引き起こす. 一方 SLE では, 免疫複合体成分が好中球に作用して IFN signature 等の向炎症シグナルを誘導する NETs が生じることが近年解明されつつあり, これらの違いが病理組織学的特徴を反映している可能性がある. NETs は感染症時には侵入微生物を効率よく殺菌する免疫システムであると同時に, 特定の分子によって制御される能動的な壊死 (ネクローシス) の一形態であるが, ANCA を介した NETs 形成のシグナル伝達経路は不明である. 制御された壊死を司る分子の一つであるシクロフィリン D (CypD) は, 活性酸素種 (ROS) などの刺激によりミトコンドリアの膜透過性遷移孔 (mPTP) を開口させ, ミトコンドリア内から過剰な ROS やシトクロム c (Cyt c) を細胞質へ流出させることでネクローシスを引き起こす. 脳や腎臓の虚血再灌流傷害モデル動物において, CypD の阻害薬や遺伝子除去が壊死抑制を介して臓器を保護することが示され, 様々な疾患にプログラムネクローシスを標的とする治療が注目されている.

本研究では, ANCA 刺激により誘発される NETs 形成, ならびに ANCA-NETs による血管内皮細胞傷害が, CypD 依存性にネクローシスが起こり, AAV の壊死性血管炎の病態形成に関与していると仮説を立てた.

【材料と方法】①ヒトの自己免疫疾患における CypD 依存性ネクローシスの関与を検証するために, AAV, SLE と診断された患者の腎生検検体を用いて TUNEL 染色, Cyt c 染色を行った. ②In vitro 実験: ANCA 誘導 NETs における CypD 阻害薬と *CypD* 遺伝子除去の効果をそれぞれ検証した. 1) ヒト健常好中球を CypD 阻害薬 (CsA) の前処置の有無に分けてヒト control-IgG と MPO-ANCA-IgG で培養し, NETs 形成を評価した. 2) C57BL/6 野生型 (WT) マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスから単離した好中球をマウス control-IgG または MPO-ANCA-IgG で培養し, Live imaging ならびに透過型電子顕微鏡で NETs 形態を評価した. NETs 形成に関わる

シグナル分子を RNA シークエンスによる網羅的解析とプログラム細胞死関連分子に着目した免疫染色で評価した. 3) 血管内皮細胞傷害における CypD の役割を検証するため, ANCA-NETs により傷害された血管内皮細胞に CypD 阻害薬を投与し, 細胞透過性試験により内皮傷害を評価した. ③In vivo 実験: AAV, SLE における *CypD* 遺伝子の役割を解析するため, AAV においては ANCA 移入モデルと AAV 自然発症の 2 種類のモデルマウスを用い, SLE のモデルとして TLR7 刺激誘導 SLE 様マウスを用いた. 1) ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスを樹立し, CypD の遺伝子除去の効果を検証した. まず, マウス骨髄細胞株 (WEHI-3) からイオン交換クロマトグラフィーにより抽出したマウス MPO を $MPO^{-/-}$マウスに免疫し, MPO-ANCA を産生するマウスを作成した. 産生された抗体を含んだマウス血清を雌性 10 週齢の $CypD^{+/+}$マウス (n=6/群) と $CypD^{-/-}$マウス (n=5/群) にそれぞれ移入し, AAV を誘導した. 2) AAV 自然発症モデルマウスである SCG/Kj マウスを $CypD^{-/-}$マウスと N3 世代まで戻し交配し, 雌性 15-16 週齢の $CypD^{+/+}$マウス (n=7/群) と $CypD^{-/-}$マウス (n=8/群) を評価した. 3) 雌性 7 週齢 WT マウス (n=8/群) と $CypD^{-/-}$マウス (n=9/群) に TLR7 アゴニストであるイミキモド (IMQ) を週 3 回, 8 週間塗布することにより SLE を誘導し, 15 週齢で解剖した. それぞれのモデルマウスにおいて, 生化学的検査 (腎機能, アルブミン尿, 血尿), 自己抗体測定 (MPO-ANCA, 抗 ds-DNA 抗体), 循環好中球 NETs (FACS, 蛍光顕微鏡), 病理組織学的評価 (肺と腎の組織評価), プログラムネクローシスに関わる組織免疫染色を行った.

【結果】①AAV のヒト腎生検検体において, 血管壊死部位に TUNEL 陽性細胞ならびに Cyt c 陽性細胞が同定された. 一方, コントロールの SLE や微小変化型ネフローゼではこれらの陽性所見は見られなかった. ②ヒト好中球において CsA はミトコンドリアからの mitoROS および Cyt c の放出抑制とともに ANCA-NETs の誘導を抑えた. また WT マウス好中球は MPO-ANCA により Sytox 陽性の NETs が誘導され, 電子顕微鏡による観察では, 核膜, 細胞膜の破綻を示したが, この現象は $CypD^{-/-}$マウス好中球で有意に抑制された. RNA シークエンス解析では, ANCA 誘導 NETs に特異的な炎症シグナルの発現亢進が見られた. さらに, ANCA 誘導 NETs により惹起される血管内皮細胞傷害は CsA 投与により有意に抑制された. ③ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスにおいて, ANCA 移入 $CypD^{+/+}$マウスは投与 24 時間後に半月体形成性糸球体腎炎と肺傷害を認めたが, $CypD^{-/-}$マウスでは循環 NETs が減少し, 腎や肺組織の TUNEL 陽性細胞の有意な減少とともに臓器障害が軽減した. SCG/Kj マウスと *CypD* 欠損マウスの戻し交配による解析では, $CypD^{-/-}$マウスは $CypD^{+/+}$マウスと比べて腎や肺組織の TUNEL 陽性細胞の有意な減少とともに臓器障害が軽減し, 生存解析では生存率が上昇する傾向が見られた. しかし MPO-ANCA の産生レベルには差は見られなかった.

SLE 誘導モデルマウスでは, 壊死病変が見られず, *CypD* 遺伝子欠損の有無によって腎炎 (腎機能, アルブミン尿, 組織), 自己抗体の産生, 脾臓の重量に差は見られなかった.

【考察】ヒト腎生検検体の解析により,AAV の壊死性血管炎は CypD 依存性ネクローシスが関与し, この現象は in vitro の実験により, 自己抗体 ANCA により誘導される CypD を介した NETs 形成, 血管内皮細胞傷害に起因することが示唆された. CypD の役割をモデル動物で検証したところ, ANCA 移入モデルでは, *CypD* 欠損マウスで NETs 形成, 壊死病変, ならびに臓器障害が軽減し, ANCA 産生 AAV 自然発症モデルにおいても *CypD* 遺伝子除去により臓器病変が改善した. しかし, MPO-ANCA の産生低下は見らず, CypD の獲得免疫系へ影響は少ないことが示唆された. さらに SLE では, ヒト腎生検検体ならびにモデルマウスにおいて壊死病変は乏しく, *CypD* 遺伝子欠損が SLE 誘導マウスに与える影響も見られなかったことから, CypD は自己免疫病態の中でも, NETs がエフェクターとして作用する壊死病態に関与することが示唆された. 現在の AAV の治療の主体は強力な免疫抑制治療であり, 病態の上流を制御することは可能であるが, 免疫抑制による感染症死が多いこと, 壊死病態を制御できないために臓器障害が残ることが課題である. 本研究では, CypD を標的とした治療が, 免疫抑制を起こさずに, 血管局所で誘導される壊死を分子メカニズム的に制御することで血管炎病態を改善する可能性を示した.

【結論】AAV の壊死病態に CypD 依存性ネクローシスが関与し, CypD を標的とした治療が本疾患の新たな治療戦略となる可能性がある.

3. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AAV	ANCA-associated Vasculitis
ABC	Avidin-biotin complex
ANCA	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody
BSA	Bovine Serum Albumin
BUN	Blood Urea Nitrogen
Ca^{2+}	Calcium ion
CitH3	Citrullinated Histone 3
Cr	Creatinine
CsA	Cyclosporine A
CypD	Cyclophilin D
Cyt c	Cytochrome c
DAMPs	Damage-associated Molecular Patterns
DAPI	4’, 6-Diamidine-2’-Phenylindole Dihydrochloride
DEG	Differentially Expressed Gene
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dsDNA	Double stranded DNA
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCM	Flow Cytometry
FCS	Foetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
GO	Gene Ontology
HE	Hematoxylin and Eosin
HuEht	Immortalized Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line Established by the Electroporation of pIRES-hTERT-hygr
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IMQ	Imiquimod

LPS	Lipopolysaccharide
MCNS	Minor glomerular abnormalities
mitoROS	Mitochondrial ROS
MLKL	Mixed lineage linase domain-like
MPO	Myeloperoxidase
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
N.S.	Not Significant
OCT	Optimal cutting temperature
PAD4	Peptidylarginine Deiminase 4
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	PBS with 0.1% Tween® 20 detergent
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyde
RLE	Relative log expression
PMA	Phorbol Myristate Acetate
RIPK	Receptor interacting protein 1 kinase
RNA	Ribonucleic Acid
RNA-seq	RNA-sequence
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS	Reactive Oxygen Species
SCG/Kj	Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-forming/Kinjoh
SD	Standard Deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
SG	Sytox Green
SLE	Systemic lupus erythematosus
SPF	Specific pathogen-free
SSC	Side Scatter
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TPM	Transcripts Per Million
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase–mediated Digoxigenin-Deoxyuridine Nick-End Labeling

WT	Wild type

4. 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，病原性自己抗体である ANCA の出現と全身性の壊死性血管炎を特徴とし，臨床的に急速進行性糸球体腎炎や肺出血等を呈する重篤な自己免疫疾患である (Jennette and Falk, 1997) (Jennette et al., 2013). 現在用いられている標準治療法は免疫抑制治療であり (Yates et al., 2016), 治療薬の抗炎症作用に加えて自己抗体の産生を抑制し病態の上流を制御することが主体で, 病勢を落ち着かせることで予後が改善してきている一方で (Puéchal et al., 2016), 腎不全や神経障害など重度の臓器障害が残ることや, 薬剤の副作用による感染症死率の割合が非常に高いことが問題となっている (Little et al., 2010). また，AAV を対象とした基礎研究はモデルマウスに対して，抗体産生を抑制するボルテゾミブや高サイトカインを抑制する C5a 受容体拮抗薬など治療法が報告されているが, いずれの治療法も病態の上流を抑えるものであるため, 壊死性血管炎自体を制御する根本的治療は無い．近年，病原性自己抗体 ANCA が好中球に作用して核内のクロマチンやミエロペルオキシダーゼ (MPO) などの抗菌蛋白を細胞外に放出する好中球細胞外トラップ (NETs) を過剰に形成させ (Brinkmann et al., 2004) (Figure 1), 臓器障害と炎症の悪循環 (necroinflammation) 病態を引き起こすことがわかってきた (Mulay et al., 2016). NETs は感染症時には侵入微生物を効率よく殺菌する免疫システムであると同時に (Urban et al., 2006) (Saitoh et al., 2012), 自己免疫疾患などの無菌性炎症時には特定の分子によって制御された能動的な壊死（ネクローシス）の一形態であり, 過剰な NETs は自己組織を損傷しうる (Schreiber et al., 2017). AAV の病態機序は様々な基礎研究から解明されつつあり，まず感染症などの刺激を契機として好中球活性後 NETs 形成や，T 細胞/B 細胞による自己抗体 ANCA の刺激を介した NETs により全身に血管炎が生じ (Nakazawa et al., 2012)，さらにアジュバンドとなる DNA 成分を含む NETs の分解能低下がさらなる自己抗体の産生につながる (Nakazawa et al., 2014) (Figure 2)．これらの知見から NETs を中心に AAV の悪循環病態が形成されていることが示唆されているが，ANCA を介した NETs 形成のシグナル伝達経路は不明であるために，NETs を標的とした治療法は開発されていない.

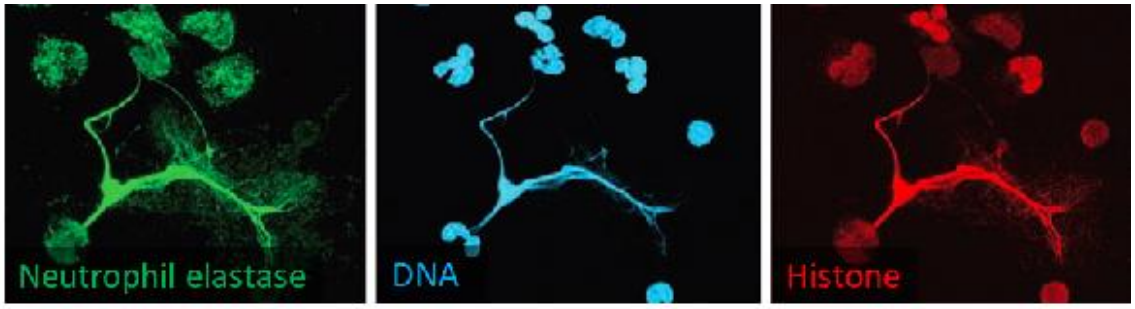


Figure 1. neutrophil extracellular traps (NETs)
(Brinkmann et al., 2004)より引用改変．細胞核から細胞内蛋白が放出されている．

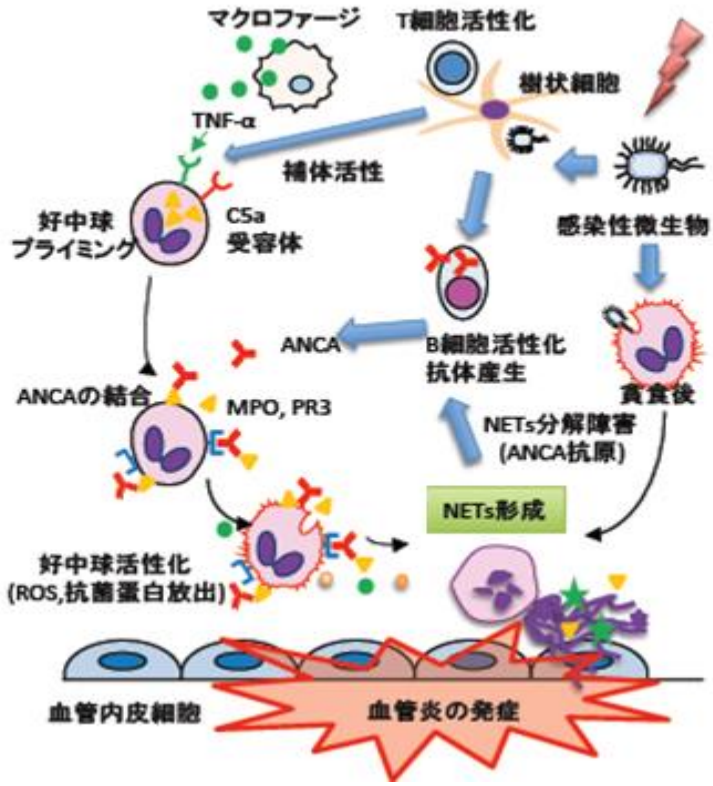


Figure 2. ANCA 関連血管炎の病態
(Nakazawa et al., 2019)より引用改変.

ミトコンドリアはエネルギー変換，細胞代謝，および制御された細胞死など様々な機能を有するオルガネラである (Vanden Berghe et al., 2014). ミトコンドリアマトリックス内に存在するシクロフィリン D (CypD) は，タンパク質の折りたたみに重要なタンパク質であるとともに (Davis et al., 2010)，制御された壊死を司る分子である (Baines et al., 2005). Calcium ion (Ca^{2+}) や活性酸素種 (ROS) などの刺激によりミトコンドリアの膜透過性遷移孔 (mPTP) を開口させ，ミトコンドリア内から過剰な ROS やシトクロム c (Cyt c) が細胞質へ放出されることによりネクローシスを引き起こす (Vaseva et al., 2012) (Figure 3). 近年，CypD 阻害薬が mPTP の開口を防ぐことを利用して，自己免疫疾患と同様に無菌性炎症病態を有する，脳や腎臓の虚血再灌流傷害モデルマウスにおいて，CypD の阻害薬や遺伝子除去が壊死性損傷から組織を保護することや (Schinzel et al., 2005) (Nakazawa et al., 2017)，心筋梗塞や薬剤性肝傷害などの疾患でも CypD の制御が臓器保護に働くことが報告されていることから (Nakagawa et al., 2005), CypD 依存性ネクローシスが ANCA 刺激により誘発される NETs 形成のシグナル経路，および AAV の壊死病態に関与していると仮説を立て，CypD の遺伝子的，薬理学的な制御により AAV における NETs 形成に与える影響を検証した.

一方，全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE) は，自己抗体の産生と全身の炎症を特徴とし，糸球体腎炎や肺出血等を呈する自己免疫疾患である (Justiz Vaillant et al., 2020). AAV と同様に SLE においても NETs の関与が示唆されているが (Hakkim et al., 2010), AAV の NETs と違い，自己抗体単独では NETs を誘導できず，抗原と結合した免疫複合体が NETs を誘導する．さらにこの SLE-NETs は ANCA 誘導の DAMPs を放出する細胞溶解型 NETs とは異なり，細胞の形態が保たれ周囲への cytotoxic な影響よりも IFN signature を介した向炎症性シグナルを誘導することから，形態的・機能的にも異なる特徴を有するため (Papayannopoulos, 2018)，それぞれの疾患で NETs 誘導機序が異なる可能性がある.

本研究では NETs を標的とした AAV の壊死病態への新規治療薬の候補として CypD に着目し，同様に自己免疫疾患である SLE おいても CypD の関与を検討して比較した．第一章で AAV 患者の腎生検検体を用いて CypD 依存性ネクローシスの関与について，第二章でヒト ANCA 誘導 NETs に対する CypD 阻害薬の効果について，第三章ではマウス ANCA 誘導 NETs に対する CypD の遺伝子除去の効果と，NETs ならびに CypD 依存性ネクローシスのシグナル経路について述べる．さらに，第四章では ANCA 誘導 NETs の血管内皮細胞傷害に対する CypD 阻害薬の効果について，第五章と第六章では AAV モデルマウスにおける *CypD* 遺伝子除去の効果について検証し，第七章では SLE 誘導モデルマウスにおける

CypD 遺伝子除去の効果について述べる.

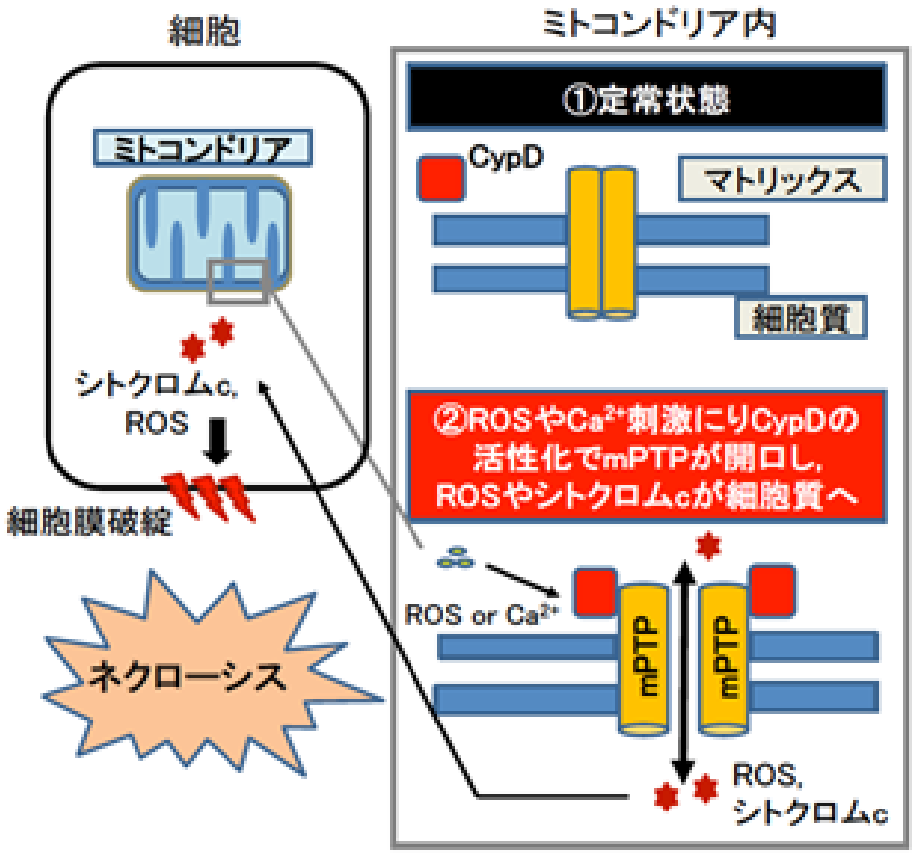


Figure 3. CypD 依存性ネクローシスの経路
(Nakagawa et al., 2005) より引用改変.

5. 第一章

ヒト AAV, SLE における
CypD 依存性ネクローシスの関与の検討

5.1　緒言

AAV は, 病原性自己抗体 ANCA の産生を特徴とし, 小型血管を主な標的とする全身性の壊死性血管炎である. その病態には ANCA により誘導される NETs が関与し, 腎臓や肺を中心に臓器障害を引き起こす重篤な疾患である. AAV では壊死の一形態である NET が過剰に形成され, 血管内皮細胞の壊死を引き起こす. AAV に特徴的な糸球体病変である半月体病変の一部は NETs 成分であり, この壊死病変が時間経過とともに線維化し, 不可逆的な腎機能障害を引き起こすと考えられている.

本研究では壊死性糸球体腎炎の病態に CypD 依存性ネクローシスが関与していると仮説を立て, ヒト腎生検検体を用いてその関与を検証した. CypD 依存性ネクローシスの評価として, Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) 開口時に放出される Cyt c を用いて評価した (Scorrano et al., 2002) (Jackson and Schoenwaelder, 2010). またコントロールとして, NETs が関与する SLE/ループス腎炎や, 炎症や組織傷害を伴わない Minor glomerular abnormalities (MCNS) のヒト腎生検検体を用いて, 同様に CypD 依存性ネクローシスの関与を調べた.

5.2　対象

2000 年 1 月 1 日から 2023 年 12 月 31 日の間に市立札幌病院で腎病理診断を受け, AAV, MCNS, SLE (classV) と診断された AAV 患者 2 名, MCNS 患者 1 名, SLE 患者 1 名を対象とした.

本研究はヘルシンキ宣言及びヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守して実施された. 診断目的に採取された腎生検検体はパラフィンブロックで包埋された組織切片を使用し, 申請件名「壊死性血管炎におけるプログラム細胞死の役割」として市立札幌病院倫理委員会で承認された (承認番号: R02-059-726) .

5.3　方法

5.2.1　TUNEL 染色

各疾患の壊死による腎組織障害を, terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling (TUNEL) 染色で評価した. 切片は 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. TUNEL 陽性域は 1 スライドあたり 8 視野 (倍率 100 倍) をランダムに撮像し, ImageJ software で mean luminance value を測定し, 壊死細胞を定量評価した.

5.2.2　Cyt c 染色

CypD 依存性ネクローシスのシグナル経路が活性化している場合にはミトコンドリア内の Cytochrome c (Cyt c) が付随して放出されるため, CypD 依存性ネクローシスのシグナル経路の関与を腎組織の Cyt c 染色で評価した.
Cyt c 染色は anti-Cytochrome c antibody (Abcam) を用いて, avidin-biotin complex (ABC) 法で染色した. Cyt c 陽性細胞は 1 スライドあたり 3 個の糸球体を倍率 400 倍でランダムに撮像し, ImageJ software で mean luminance value を測定した.

5.2.3　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 JMP®を用いて行った.

5.3　結果

5.3.1　AAV の CypD 依存性ネクローシスの関与の検討

腎臓の壊死細胞を TUNEL 染色で評価した. AAV 患者検体では, いずれの case においても糸球体や尿細管間質で壊死細胞がびまん性に検出されたが, MCNS や SLE では壊死細胞が少なかった (Figure 4, 5).

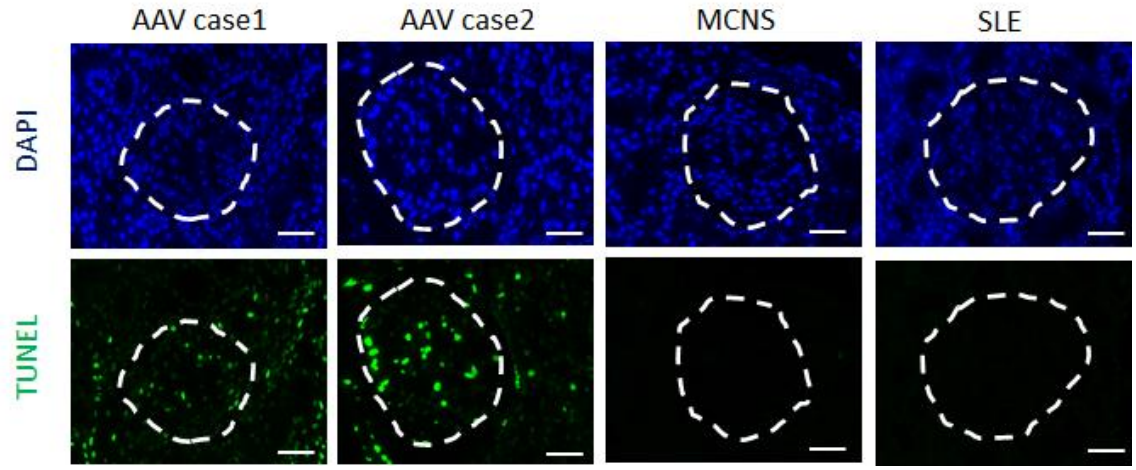


Figure 4. ヒト腎生検検体における壊死細胞の検討
ヒト腎生検検体を用いて DAPI と TUNEL の 2 重染色を施行した. 白点線は糸球体を示す. 緑は TUNEL, 青は DAPI を示す. Scale bar: 50μm. AAV では MCNS や SLE と比較して, 腎臓における TUNEL 陽性細胞が多かった.

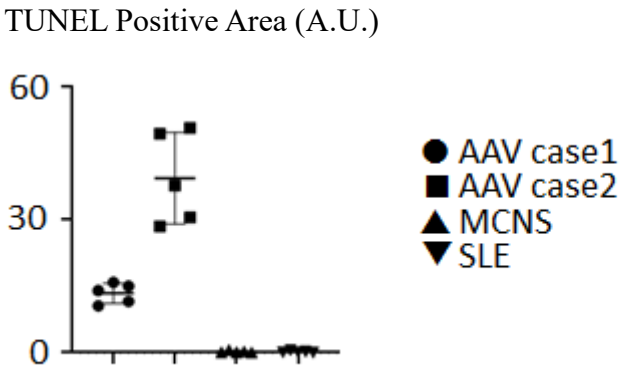


Figure 5. ヒト腎生検検体における壊死細胞の評価
TUNEL 染色の平均輝度を ImageJ software を用いてプロットした. データは平均±標準偏差で示した. AAV では MCNS や SLE と比較して, 腎臓における TUNEL 陽性細胞が多かった.

5.3.2　他の免疫疾患と CypD 依存性ネクローシスの関与の検討

CypD 依存性ネクローシスでは CypD の活性化により mPTP が開口しネクローシスを引き起こすが, mPTP の開口時には同時にミトコンドリア内から Cyt c が放出されるため, CypD 依存性ネクローシスの関与を Cyt c 染色で評価した.
AAV 患者検体では, いずれの case においても CypD 依存性ネクローシスの関与が認められたが, MCNS や SLE では関与が少なかった (Figure 6, 7).

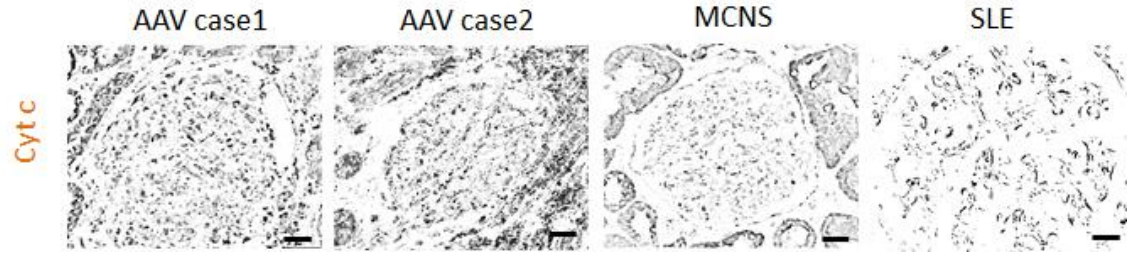


Figure 6. ヒト腎生検検体における CypD 依存性ネクローシスの関与の検討
Cyt c 染色を示す (ImageJ software 解析のため画像を変色). Scale bar: 50μm. AAV では MCNS や SLE と比較して, 腎臓における Cyt c 陽性細胞が多かった.

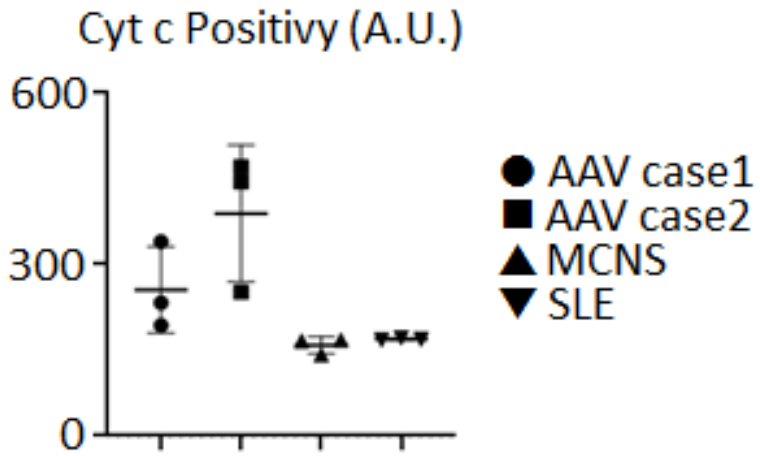


Figure 7. ヒト腎生検検体における CypD 依存性ネクローシスの関与の評価
Cyt c 染色の陽性の平均輝度を ImageJ software を用いてプロットした. データは平均±標準偏差で示した. AAV では MCNS や SLE と比較して, 腎臓における Cyt c 陽性度が高かった.

5.4　考察

ヒト腎生検検体を用いて, AAV 患者における壊死の評価と, CypD 依存性ネクローシスの関与を検証した. AAV 患者では MCNS や SLE と比較し, 壊死細胞とシトクロム c の高発現がみられ, CypD 依存性ネクローシスの関与が示唆された. この結果は, AAV の腎炎は壊死性血管炎を呈し, SLE は免疫複合体を伴う細胞増殖性腎炎を呈するという, それぞれの腎炎の病理学的特徴を反映している. AAV では CypD 依存性ネクローシスのメカニズムを背景に壊死性血管炎が引き起こされる可能性がある.

本章で得られた現象を解明するために, ANCA 刺激により誘発される NETs 形成, ならびに ANCA-NETs による血管内皮細胞傷害における CypD 依存性ネクローシス経路の関与, さらに AAV の壊死性血管炎の病態との関与を検証する. 第六章ではヒト好中球を用いて, ANCA 誘導 NETs における CypD 阻害薬の効果を検証し, 第七章ではマウス好中球を用いて ANCA 誘導 NETs における *CypD* 遺伝子除去の効果を検証する. 第八章では血管内皮細胞傷害に対する CypD 阻害薬の効果を検証する. 第九章では ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスを, さらに第十章では ANCA 産生 AAV 自然発症モデルマウスをそれぞれ用いて, *CypD* 遺伝子除去が臓器障害に与える効果について検証する.

6. 第二章

ヒト好中球における ANCA 誘導 NETs に対する CypD 阻害薬の効果の検討

6.1　緒言

第一章では，ヒト AAV において CypD 依存性ネクローシスが関与している可能性を示した. AAV で誘導される好中球 NETs 自体がネクローシスの一形態であり，この NETs 形成に CypD 依存性ネクローシスのシグナル経路が関与している可能性が想定される．本章では, CypD 阻害薬の ANCA 誘導 NETs に対する効果, 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 誘導の機序は，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プライミングが起こる．次に表出された MPO が 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細胞内で Spleen Tyrosine Kinase (Syk) のリン酸化が起こり, ROS が増加し, Peptidylarginine Deiminase 4 (PADI4) 活性を介したヒストンのシトルリン化により，核クロマチンが脱凝縮し NETs 成分放出の前段階に至る機序が想定されている．Phorbol12-myristate13-acetate (PMA) により誘導される NETs の電子顕微鏡下の形態学的特徴は，刺激後に核クロマチンの脱凝縮⇒核膜の破綻⇒核成分と細胞質内成分の混合⇒細胞膜の破綻がおこる一連の流れが確認されているが (Fuchs et al., 2007), ANCA-NETs では核クロマチンの脱凝縮後にどのように核膜や細胞膜が破綻して NETs 成分が放出されるかは不明であり，本章では ANCA-NETs シグナル経路の解析とこの経路における CypD の役割を解析した.

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, CypD 阻害薬投与による NETs 形態の変化を光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡で評価し，分子メカニズムの変化を免疫染色で観察した.

6.2　方法

6.2.1　ヒト好中球の分離

健常人末梢血を Polymorph Prep (Axis-Shield) を用いた比重遠心分離によりヒト好中球を分離した.

6.2.2　Immunoglobulin G (IgG)の抽出

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

6.2.3　NETs 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 となるように調整し, 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内に 37℃下で培養した. Cyclosporine A (CsA) (200 ng/ml) (Merck) または Phosphate Buffered Saline (PBS) を 30 分間 pretreatment した後, ヒト Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) (5 ng/ml) (Merck)で 15 分間プライミングを行った. 続けて, 健常人から抽出した IgG (Control-IgG) または MPO-AAV 患者血清から抽出した IgG (ANCA-IgG) (240 μg/ml) とともに 4 時間培養した. 形成された NETs を Sytox green (SG) 染色, Mitochondrial Reactive Oxygen Species (mitoROS) 免疫染色, Cyt c 免疫染色, Citrullinated Histone 3 (CitH3) 免疫染色で Live Imaging により各染色の陽性域, および FCM による SG 陽性顆粒球率により評価した.

6.2.4　SG 染色

4 時間培養した好中球に 2000 倍希釈の SG (Thermo Fisher Scientific) を添加し, 蛍光顕微鏡で観察した. SG 陽性細胞は 1 ウェルあたり倍率 40 倍でランダムに撮像し, ImageJ software で mean luminance value を測定し, SG 陽性好中球を定量評価した.

6.2.5　FCM

4 時間培養した好中球に 2000 倍希釈の SG (Thermo Fisher Scientific) を添加し, Flow Cytometry (FCM) を行った. SG 陽性顆粒球は BD FACS Calibur™ (BD Biosciences) を用いて forward scatter (FCS) と side scatter (SSC) により顆粒球をゲートし, SG 陽性顆粒球率を定量した.

6.2.6　mito-SOX 免疫染色

mitoROS の評価には, mitoROS を選択的に染色する Mito-SOX (Thermo Fisher Scientific) を使用した. 4 時間培養した好中球に 6μM の Mito-SOX を滴下し, 遮光下の室温で 10 分間静置し, 蛍光顕微鏡で観察した. Mito-SOX 陽性細胞は 1 サンプルあたり 2 視野 (倍率 100 倍) をランダム撮像し, ImageJ software で mean luminance value を測定し, mitoROS を定量評価した.

6.2.7　Cyt c 免疫染色

ANCA 誘導 NETs と CypD 依存性ネクローシスのシグナル経路の関与を調べるために Cyt c 免疫染色で評価した. 4 時間培養した好中球を 4% Paraformaldehyde (PFA) で固定した後, 50 倍に希釈した rabbit anti-cytochrome c antibody (Abcam) を添加して, 4℃で 24 時間インキュベートした. PBS with 0.1% Tween® 20 detergent (PBST) で 3 回洗浄後に, 500 倍希釈の 488alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) を遮光下の室温で 60 分間反応させた. PBST 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. Cyt c 陽性細胞は 1 サンプルあたり 2 視野 (倍率 100 倍) をランダム撮像し, ImageJ software で mean luminance value を評価した.

6.2.8　CitH3 免疫染色

ANCA 誘導 NETs の形成にはヒストン蛋白のシトルリン化 (Citrullinated histone: CitH3) とそれに続く核の脱凝縮が重要であり, ANCA 誘導 NETs を CitH3 免疫染色で評価した. 4 時間培養した好中球を 4% PFA で固定した後, 200 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. PBST で 3 回洗浄後に, 500 倍希釈の 488alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) を遮光下の室温で 60 分間反応させた. PBST 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 陽性細胞は 1 サンプルあたり 2 視野 (倍率 100 倍) をランダム撮像し, ImageJ software で mean luminance value を評価した.

6.2.9　透過型電子顕微鏡での観察

6.2.3 と同様の手順で control-IgG と ANCA-IgG により刺激された好中球を 4 時間, ポジティブコントロールとして Phorbol Myristate Acetate (PMA) により刺激された好中球を 2 時間培養し, 2%グルタルアルデヒドで前固定した. 続いて 1%四酸化オスミウムで後固定し, エタノールで脱水し, エポキシ樹脂に包埋した. 包埋した試料を薄切し, 透過型電子顕微鏡で好中球の形態を観察した. 無刺激の好中球をネガティブコントロールとして, PMA, control-IgG, ANCA-IgG で刺激された好中球の形態を比較した.

6.2.10　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 JMP®を用いて行った.

6.3　結果

6.3.1　ANCA 誘導 NETs に対する CypD 阻害薬の効果

ANCA-IgG により刺激された好中球では, control-IgG で刺激された好中球と比較して, NETs 形成が有意に多く認められた. これらの ANCA 誘導 NETs は, CsA 群において PBS 群と比較し有意に減少した (Figure 8, 9). また, FCM による SG 陽性顆粒球率の評価においても, ANCA-IgG 刺激好中球は control-IgG 刺激好中球と比較して有意に高値であったが, その割合は CsA 群では有意に低下した (Figure 10).

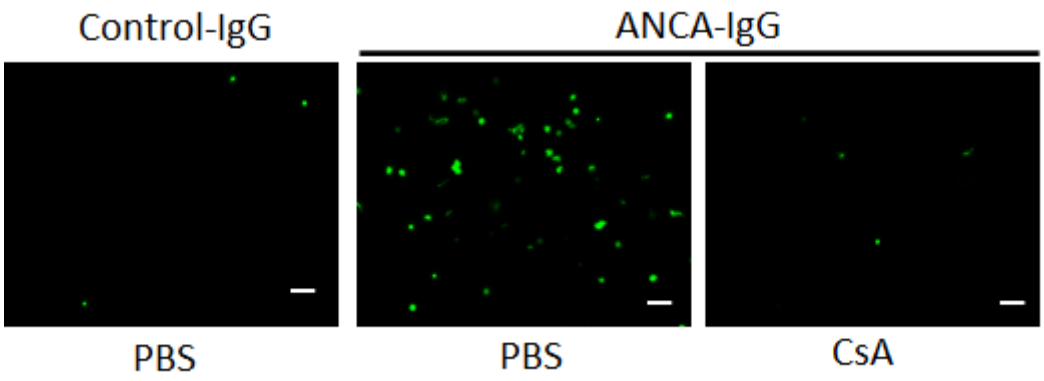


Figure 8. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の効果 (SG 染色)
SG 染色を行った. 緑は SG を示す. Scale bar: 50μm.　ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, SG 陽性細胞が多く, CsA により SG 陽性細胞が少なくなった.

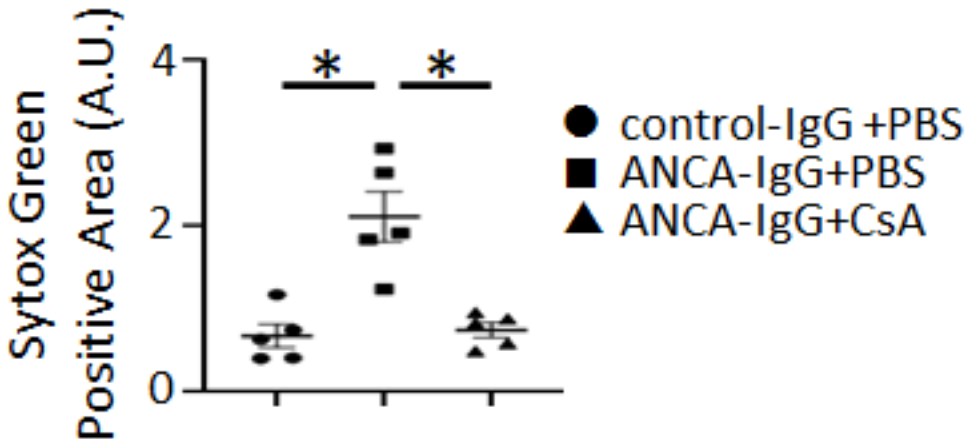
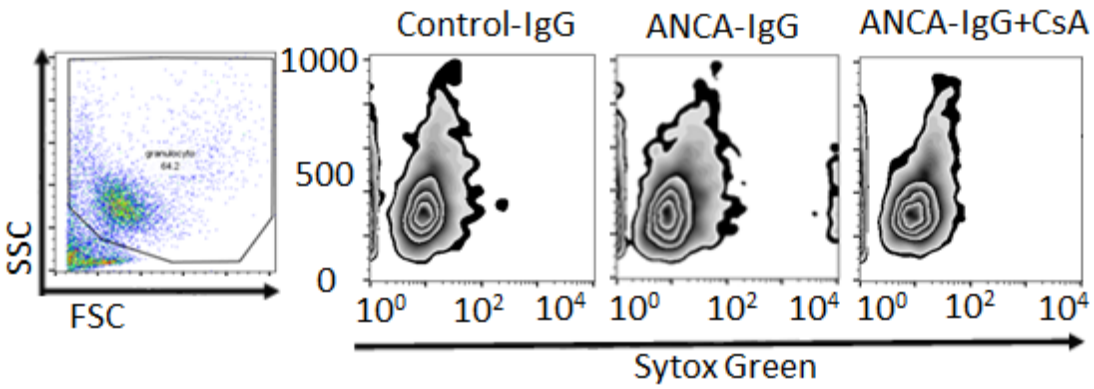


Figure 9. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の評価 (SG 染色)
SG 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. *p<0.05. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, 有意に NETs を誘導し, CsA により ANCA-IgG 刺激による NETs 誘導は有意に抑制された.

a)



b)

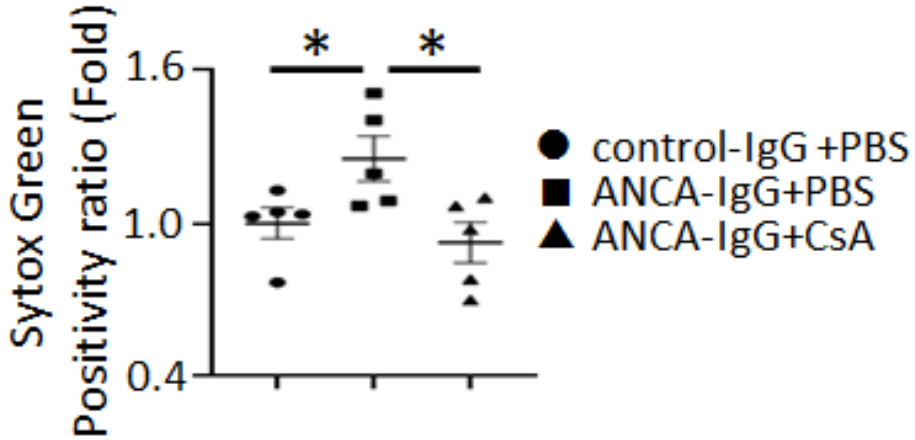


Figure 10. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の効果 (FCM)
(a) forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) による顆粒球分画の抽出, および SG 陽性顆粒球のヒストグラムを示す. (b) SG 陽性顆粒球率を示す. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. *p<0.05. ANCA-IgG 刺激群は control-IgG 刺激群と比較し, 有意に NETs を誘導し, CsA により ANCA-IgG 刺激による NETs 誘導は有意に抑制された.

6.3.2　ANCA 誘導 NETs における CypD 依存性ネクローシスの関与

CypD 依存性ネクローシスのシグナル経路に関わる mitoROS, Cyt c と, NETs 放出前段階の核クロマチン脱凝縮に関わるヒストンシトルリン化 (CitH3) の染色を行い, それら発現を評価した.

ANCA-IgG により刺激された好中球では, control-IgG で刺激された好中球と比較して, mitoROS や Cyt c の発現が有意に上昇したが, CsA 治療により抑制された (Figure 11, 12, 13, 14). 一方, ANCA-IgG により刺激された好中球では, CitH3 が誘導されるが, CsA 治療では抑制されなかった (Figure 15, 16).

さらに, 強拡大像では, Control-IgG で処理された好中球は, mitoROS や Cyt c は核周囲に共局在し, 弱い発現を呈していたが, ANCA-IgG により処理された好中球は, 核が膨張し, 高発現した mitoROS や Cyt c が細胞質内へ進展している像が確認された. これらの変化は CsA 投与群では認めず, 核や細胞質の形態が維持され, mitoROS や Cyt c の発現部位も核周囲に限局していた (Figure 17).

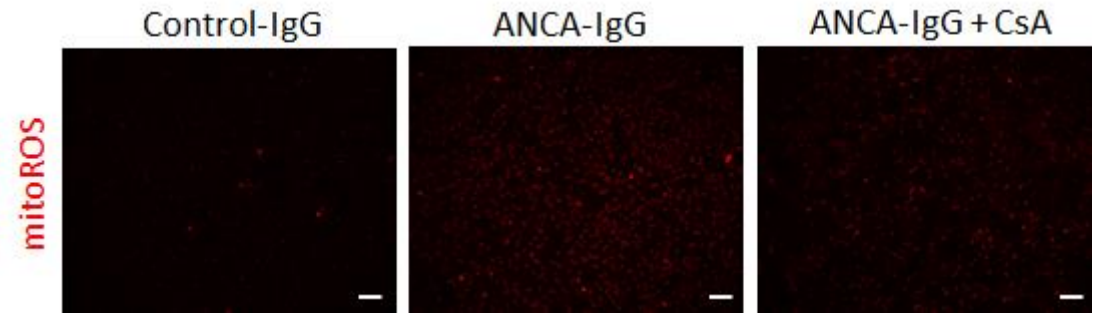


Figure 11. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の効果 (mitoROS 染色)
mitoSOX 染色を行った. Scale bar: 50μm. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, mitoROS 陽性細胞が多く, CsA により mitoROS 陽性細胞が少なくなった. 赤は mitoROS を示す.

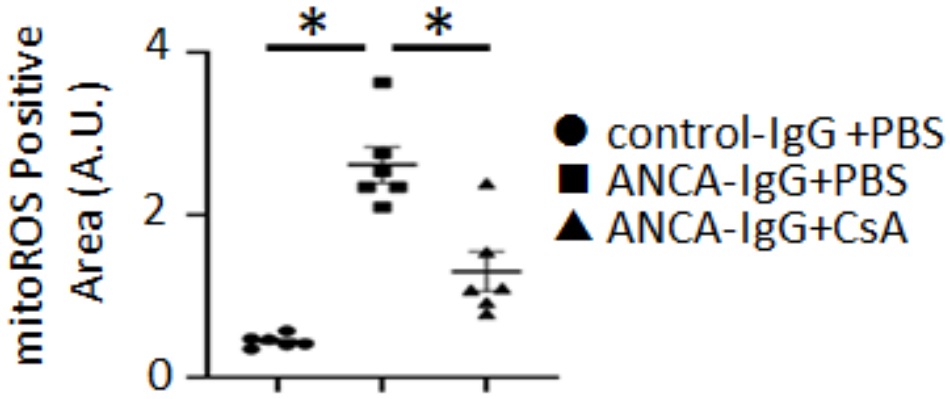


Figure 12. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の評価 (mitoROS 染色)
mitoSOX 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. *p<0.05. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, 有意に mitoROS の上昇を認め, CsA により ANCA-IgG 刺激による mitoROS の上昇は有意に抑制された.

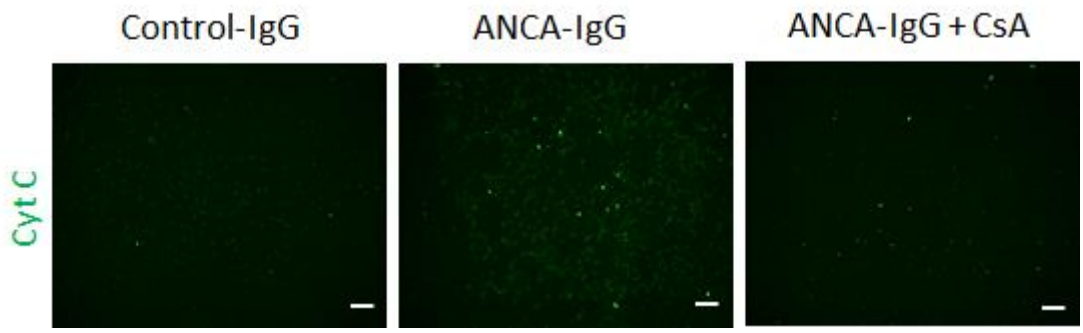


Figure 13. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の効果 (Cyt c 染色)
Cyt c 染色を行った. 緑は Cyt c を示す. Scale bar: 50μm. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, Cyt c 陽性細胞が多く, CsA により Cyt c 陽性細胞が少なくなった.

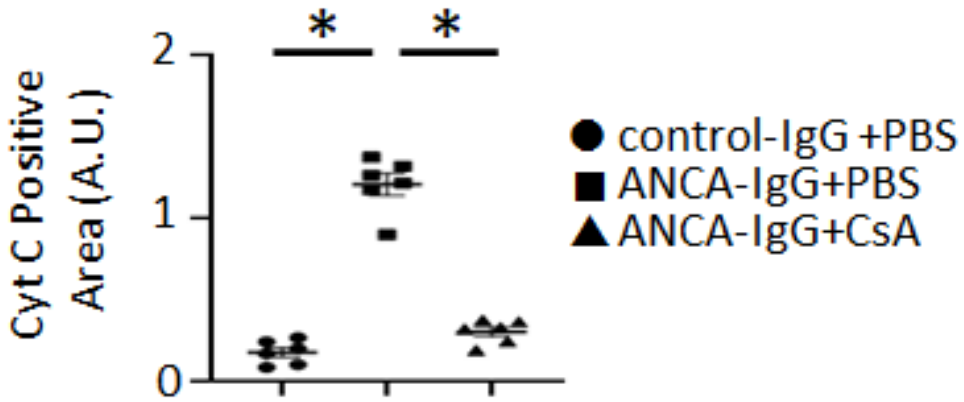


Figure 14. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の評価 (Cyt c 染色)
Cyt c 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. *p<0.05. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, 有意に Cyt c の上昇を認め, CsA により ANCA-IgG 刺激による Cyt c の上昇は有意に抑制された.

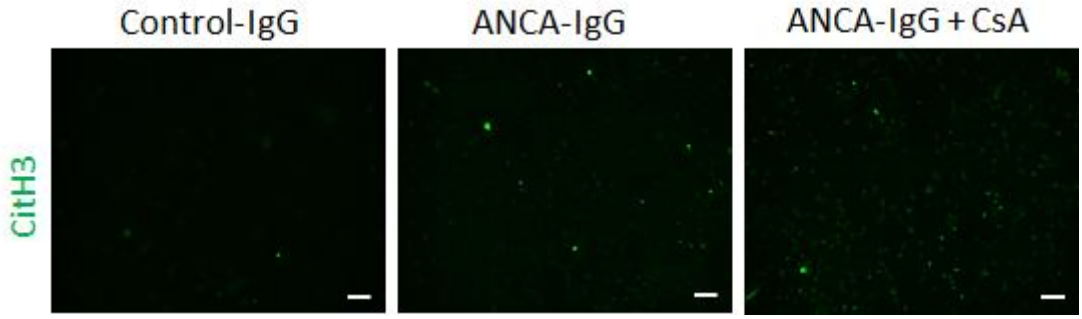


Figure 15. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の効果 (CitH3 染色)
CitH3 染色を行った. 緑は CitH3 を示す. Scale bar: 50μm. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, CitH3 陽性細胞が多かった. CsA 投与群では CitH3 陽性細胞は多かった.

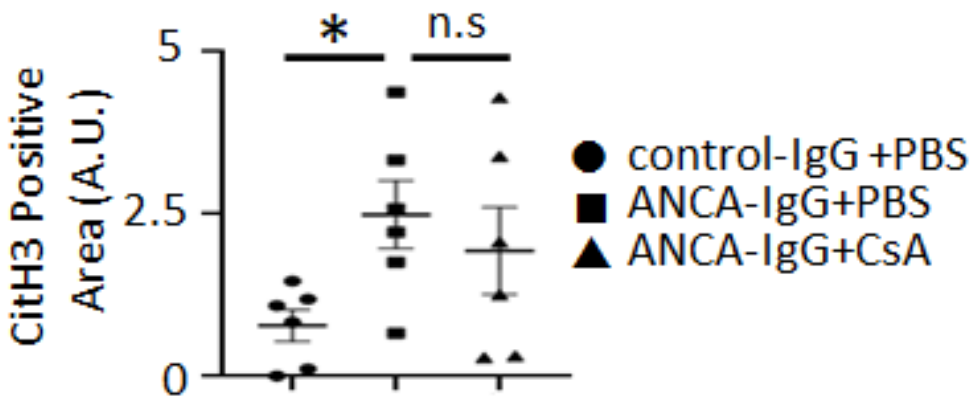


Figure 16. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の評価 (CitH3 染色)
CitH3 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. *p<0.05. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, 有意に CitH3 の上昇を認めた. ANCA-IgG 刺激による CitH3 の上昇は CsA 投与の有無で差は認めなかった.

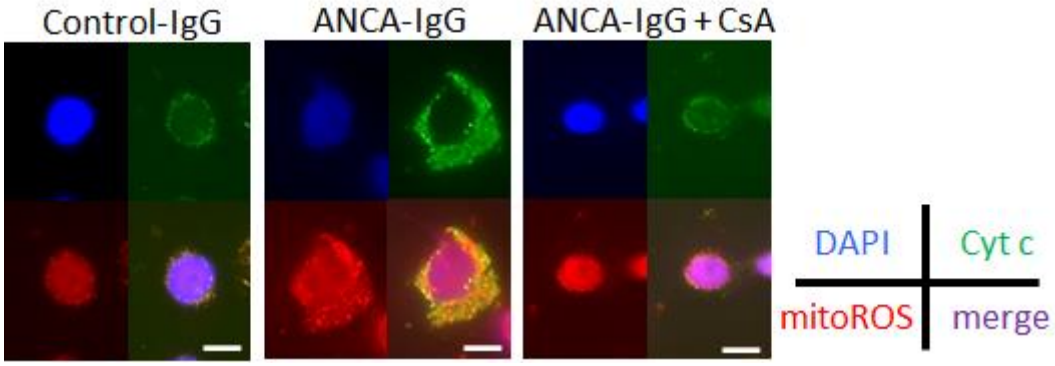


Figure 17. ANCA 誘導 NETs に対する CsA の効果 (mitoROS/Cyt c 二重染色)
mitoROS/Cyt c 二重染色を行った. 赤は mitoROS, 緑は Cyt c, 青は DAPI , 紫は merge を示す. Scale bar: 10μm. control-IgG で刺激された好中球は核周囲に mitoROS 陽性域と Cyt c 陽性域が限局し, 陽性部は一致していた. ANCA-IgG で刺激された好中球は control-IgG で刺激された好中球と比較し, 核が腫大し mitoROS 陽性域と Cyt c 陽性域が細胞質に拡大し, さらに陽性部は一致していなかったが, CsA 投与すると核や細胞質の変化は乏しかった.

6.3.3　ANCA 誘導 NETs の形態学的変化の検討

ANCA 刺激による好中球の形態学的変化を検証するために, 透過型電子顕微鏡を用いて好中球の変化を観察した (Figure 18). プロテインキナーゼ C を活性化することで NETs 形成を強力に誘導する PMA をポジティブコントロールとした. 無刺激好中球や TNFα でプライミングした control-IgG 刺激好中球は核が保たれており, 細胞質は突起状の形態であった. PMA で刺激された好中球は, 既報 (Fuchs et al., 2007) (Soria González and Orea Solano, 2002) と同様に, クロマチンが脱凝縮し, 核膜の大部分が崩壊し, 細胞膜は突起が消失し, 細胞質顆粒やミトコンドリアの構造が不明瞭であった. ANCA-IgG 刺激好中球では PMA と同様にクロマチンが脱凝縮し, 細胞質の突起が消失し, 細胞質顆粒やミトコンドリアの構造が不明瞭であったが, 核膜の破綻は一部のみにとどまり, 破綻した部分から細胞質が流入している像が観察された.

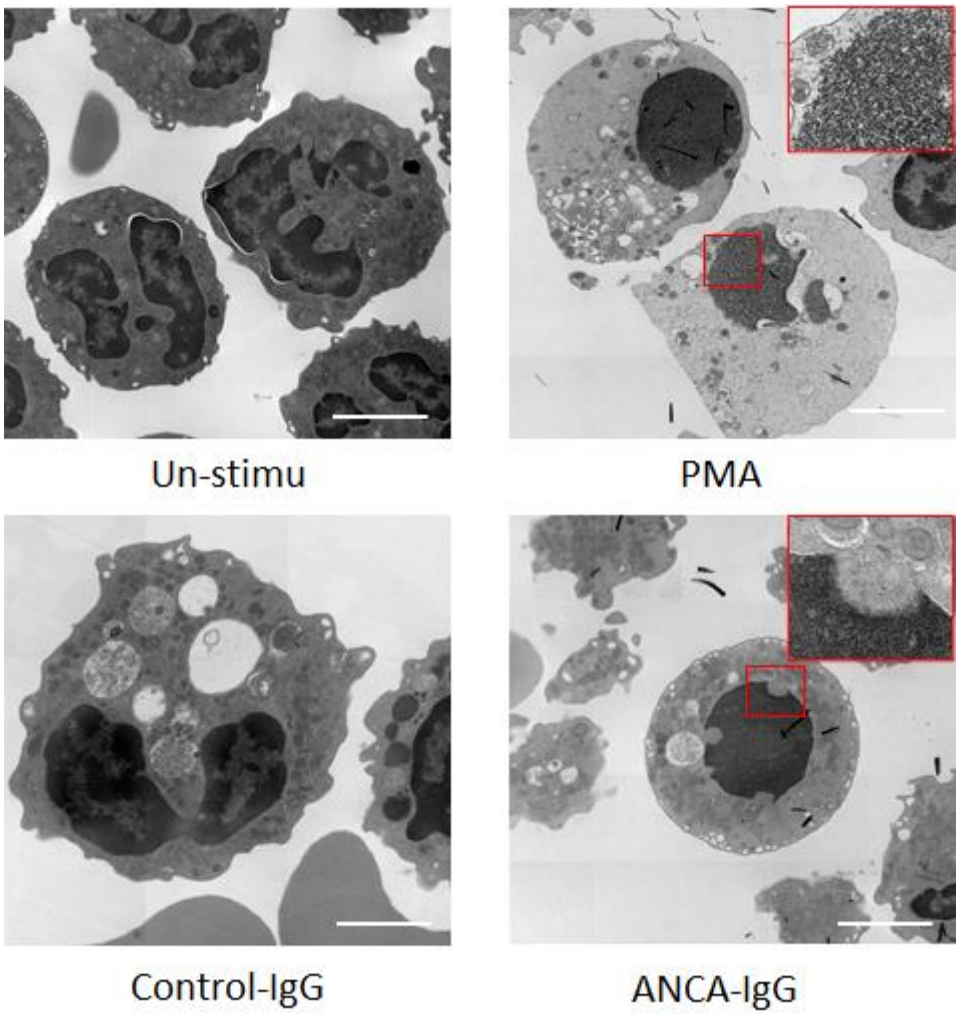


Figure 18. ANCA 誘導 NETs の形態学的変化 (透過型電子顕微鏡)
好中球の形態を透過型電子顕微鏡で観察した. Scale bar: 2μm. 赤枠の拡大図を右上に示す. 無刺激好中球や control-IgG 刺激好中球は好中球の形態が保たれていた. PMA 刺激好中球はクロマチンが脱凝縮し, 核膜が広範囲に崩壊していた. ANCA-IgG 刺激好中球はクロマチンが脱凝縮し, 核膜の一部が破綻していた.

6.4　考察

本実験の免疫染色と電子顕微鏡の解析から，ヒト ANCA 誘導 NETs は，ミトコンドリア由来の ROS やシトクロム c の高発現とともに形成され, CypD 阻害薬によりこれらの分子の発現低下とともに NETs 形成が抑制されることが示された. しかし, NETs 誘導に必要と考えられているヒストンのシトルリン化は CypD 阻害薬では抑制されなかった.

CypD は, ROS などの刺激によりミトコンドリアの膜透過性遷移孔 (mPTP) を開口させ，ミトコンドリア内から過剰な ROS やシトクロム c を細胞質へ放出してネクローシスを引き起こす. 一方, NETs 誘導時の核クロマチンの脱凝縮は細胞内 ROS により活性化された PADI4 により引き起こされるため (Kallenberg, 2011), 本実験の結果から, ANCA 誘導 NETs には 2 つのシグナル経路の可能性が考えられる. 1 つ目は, PADI4 によるクロマチン脱凝縮の下流に CypD がありネクローシスを引き起こす, 2 つ目は, PADI4 と CypD の経路はそれぞれ独立して行われる，という経路が想定されるが, いずれのシグナル経路だとしても核膜・細胞膜の破綻 (ネクローシス) の最終的な実行には CypD による mPTP の開口が必要であると考えられる.

AAV の壊死病態に深く関係している NETs は, CypD 依存性ネクローシス経路により制御されており, CypD を阻害することが AAV における壊死病変を抑制する可能性があると考えられる.

7. 第三章

マウス好中球における

ANCA 誘導 NETs に対する

CypD の遺伝子除去の効果の検討

7.1　緒言

第二章では, ヒトにおいて ANCA 誘導 NETs が CypD 依存性ネクローシスにより制御されており, さらに CypD 阻害薬により抑制されることが示された. 本章では CypD 阻害薬によるオフターゲット効果を除外するため, *CypD* 遺伝子欠損マウスの好中球を用いて同様の ANCA 誘導 NETs 実験を行った. また, この ANCA-IgG 処理したマウス好中球の RNA を抽出し, シグナル経路の解析と治療標的の探索を目的として RNA-sequence　(RNA-seq) 解析を行った.

本章ではまず CypD の遺伝子除去による ANCA 誘導 NETs 形成の抑制効果を検証するために, WT マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスの好中球を分離し, ANCA-IgG で刺激を与えて NETs 誘導能を検証し, 形態学的な変化を透過型電子顕微鏡で観察した. さらにその機序を解明するために RNA-seq 解析を用いて検証した.

7.2　方法

7.2.1　マウス好中球の分離

10-14 週齢の C57BL/6 野生型 (WT) (CLEA Japan) マウスもしくは *CypD*$^{-/-}$マウスから末梢血を採取し, 1.25 %デキストランを用いた Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) による比重遠心分離によりマウス好中球を分離した.
CypD$^{-/-}$マウスは九州大学(Ishikita et al., 2016)よりご提供いただいた.
なお, 以降に記載するすべての動物実験において, 下記の条件で行った.
１ケージあたり 5 匹以内のマウスで飼育した. マウスの飼育環境は, 室温 25℃の空調のもと 7 時～19 時までを明期とした明暗サイクルで自由運動および水道水・餌の自由摂取のもとで飼育した. 実験動物の取り扱いについては、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に従って行った. 普通食（MF: Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan）で摂餌し飼育した.
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, 北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従い行った (承認番号: 2018-018).

7.2.2　NETs 誘導と評価

分離したマウス好中球を, RPMI 1640 培地 (Merck)で 1×10^6 cells/ml となるように調整し, ウェルプレートに播種した後, 5%二酸化炭素インキュベータ内に 37℃下で培養した. それぞれの好中球を mouse TNF-α (5ng/ml) (Merck) で 15 分間プライミングを行った後, mouse IgG isotype control (Control-IgG) (20 μg/ml) (R&D Systems) もしくは MPO mouse monoclonal antibody (Anti-MPO ab) (20 μg/ml) (OriGene) とともに 4 時間培養した. 形成された NETs を Live Cell Imaging により SG 陽性細胞として評価した.

7.2.3　SG 免疫染色

4 時間培養した好中球に 2000 倍希釈の SG (Thermo Fisher Scientific) を添加し, 蛍光顕微鏡で観察した. SG 陽性細胞は 1 サンプルあたり 2 視野 (倍率 100 倍) をランダムに撮像した. ImageJ software で mean luminance value を測定し, 形成された NETs を SG 陽性好中球として定量評価した.

7.2.4　透過型電子顕微鏡での観察

7.2.2 と同様の手順で anti-MPO ab に刺激された好中球を 2 時間培養し, 2% グルタルアルデヒドで前固定した. 続いて 1% 四酸化オスミウムで後固定し, エタノールで脱水し, エポキシ樹脂に包埋した. 包埋した試料を薄切し, 透過型電子顕微鏡で好中球の形態を観察した. 無刺激の好中球をコントロールとして, anti-MPO ab で刺激された好中球の形態を比較した.

7.2.5　RNA-seq

7.2.2 と同様の手順で anti-MPO ab に刺激された好中球と無刺激の好中球を 2 時間培養し, -80℃に保存した. サンプルから total RNA 抽出し, nanodrop1000 (Thermo Fisher Scientific) , および 2100BioAnalyzer (Agilent) を用いてクオリティチェックを行った. NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて cDNA ライブラリーを作製し (New England Biolabs; E7490, E7530), 次世代シークエンサーNovaseq 6000 システム (Illumina) を用いて塩基配列を取得した. FastQC 0.11.7 (Illumina) を用いてリードの品質を確認し, Trimmomatic 0.38 (THE USADEL LAB) を用いてトリミングした. トリミングされたリードを HISAT2 2.1.0 を用いてマウスリファレンスゲノム mm10 へマッピングした. Feature Counts を用いてマッピングされたフラグメントをカウントし, Transcripts Per Million (TPM) 値を計算し, 描出データを作成した. また, DESeq2 1.24.0 を用いてリードカウントの値をもとに relative log expression (RLE) 正規化を行い, サンプル間の発現量差を算出し, 発現変動遺伝子 Differentially Expressed Gene (DEG) の抽出を行った. DEG の機能を把握するため, DAVIDWebservice を用いて Gene Ontology (GO) 解析を行った.

7.2.5　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 JMP® を用いて行った. また, RNA-seq における p 値は Benjamini and Hochberg 法による多重検定補正を行った.

7.3　結果

7.3.1　ANCA 誘導 NETs に対する CypD の遺伝子除去の効果

WT マウスの好中球において, ANCA-IgG により刺激された好中球は, control-IgG で刺激された好中球と比較して, NETs 形成が有意に多く認められた. *CypD*$^{-/-}$マウスの好中球において, ANCA-IgG により刺激された好中球は, control-IgG で刺激された好中球と比較して, NETs 形成に差は認められなかった (Figure 18, 19).

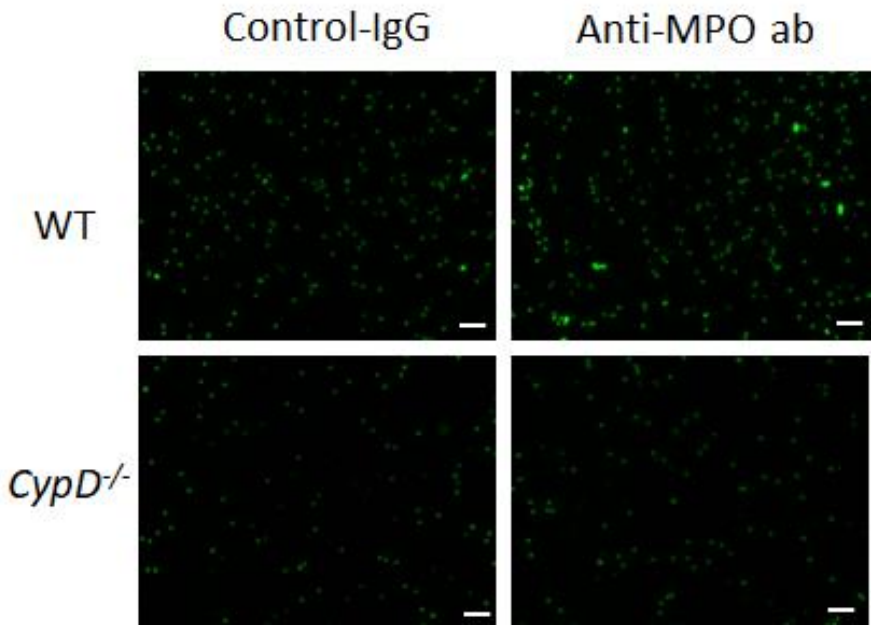


Figure 18. ANCA 誘導 NETs に対する *CypD* 遺伝子除去の効果 (SG 染色)
SG 染色を行った. 緑は SG を示す. Scale bar: 100μm. WT マウス好中球群において, Anti-MPO ab により刺激された好中球は, control-IgG により刺激された好中球と比較して, SG 陽性細胞が有意に多く認められた. *CypD*$^{-/-}$マウス好中球群において, Anti-MPO ab により刺激された好中球は SG 陽性細胞の上昇は認めなかった.

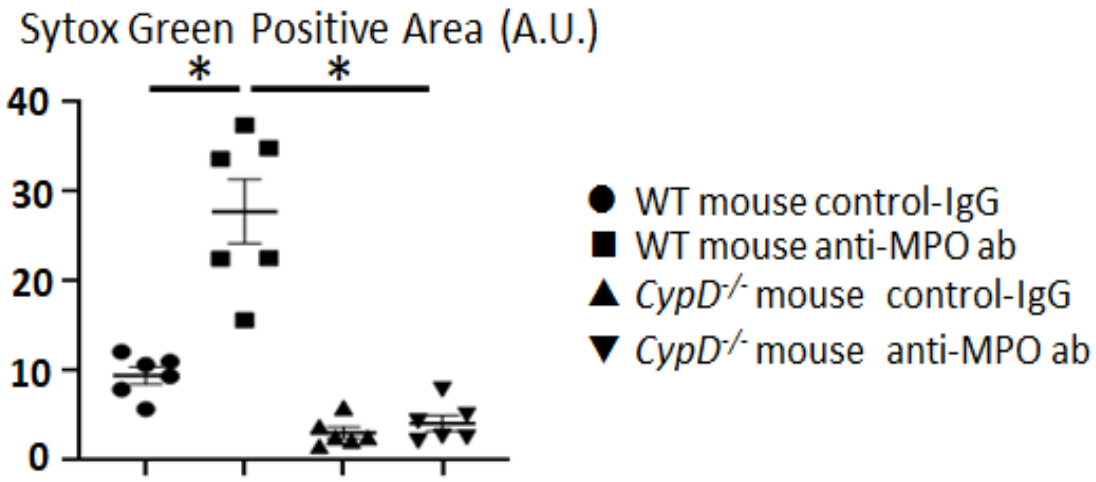


Figure 19. SG 染色による ANCA 誘導 NETs の評価
SG 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準誤差で示した. n=6/群. *p<0.05.

7.3.2　ANCA 誘導 NETs に対する CypD の遺伝子除去の形態学的変化の検討

MPO-ANCA 刺激によるマウス好中球の形態学的変化を検証するために, 透過型電子顕微鏡を用いて好中球の変化を観察した (Figure 20). 無刺激好中球では, *CypD*$^{+/+}$マウス好中球と *CypD*$^{-/-}$マウス好中球で形態学的な変化を認めなかった. *CypD*$^{+/+}$マウス好中球に MPO-ANCA で刺激すると, クロマチンの脱凝縮, 核の膨張, 核膜の破綻, 細胞質成分の密度低下, 細胞膜の突起の消失と細胞膜の不明瞭化を認めた. *CypD*$^{-/-}$マウス好中球に, 同じく MPO-ANCA で刺激すると, 核, 細胞質, オルガネラは形態学的な変化を認めず, 細胞成分は保たれていた.

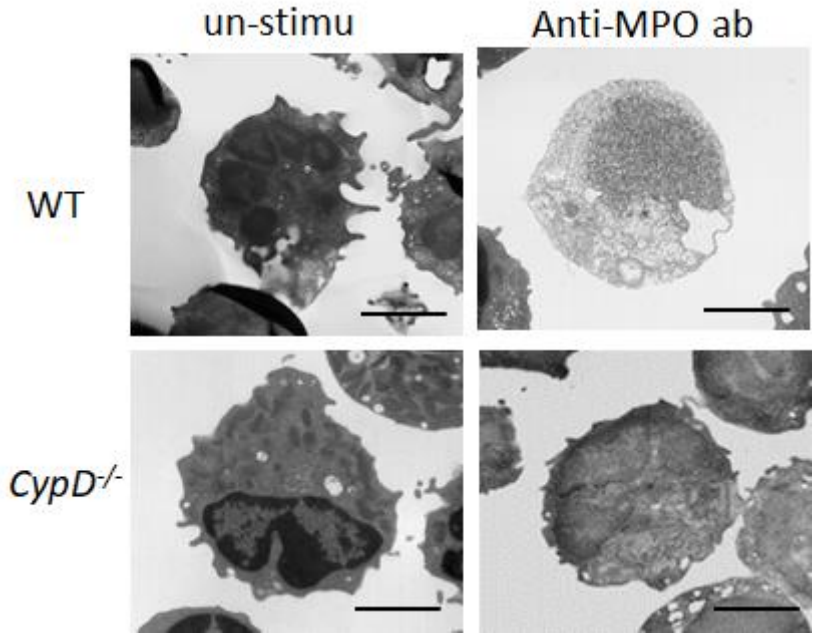


Figure 20. ANCA 誘導 NETs による形態学的変化の *CypD* 遺伝子除去効果 (透過型電子顕微鏡)

好中球の形態を透過型電子顕微鏡で観察した. Scale bar: 2μm. 無刺激群において, *CypD*$^{+/+}$マウス好中球と *CypD*$^{-/-}$マウス好中球で形態学的な違いを認めなかった. Anti-MPO ab 刺激群において, *CypD*$^{+/+}$マウス好中球は, クロマチンの脱凝縮, 核の膨張, 核膜の破綻, 細胞質成分の密度低下, 細胞膜の突起の消失と細胞膜の不明瞭化を認めた. *CypD*$^{-/-}$マウス好中球では, 核, 細胞質およびオルガネラが形態学的に保たれていた.

7.3.3　ANCA 誘導 NETs のシグナル経路

ANCA 誘発 NETs のシグナル経路を検証するために、無刺激の好中球と MPO-ANCA-IgG で刺激した好中球のトランスクリプトーム解析を行った.
遺伝子の発現量を MA plot で可視化した (Figure 21). ANCA 刺激好中球は無刺激好中球と比較して, 814 の遺伝子の発現が変動しており, その中で 278 の遺伝子が発現亢進し, 536 の遺伝子が発現低下していた.
抽出された発現変動遺伝子の生物学的機能を調べるために, GO 解析を行った. 発現が亢進していた変動遺伝子群は, 免疫応答, 炎症応答, Interferon (IFN) -β に対する細胞応答, および好中球走化性を含む免疫系に関係するシグナルの亢進を認めた (Figure 22).

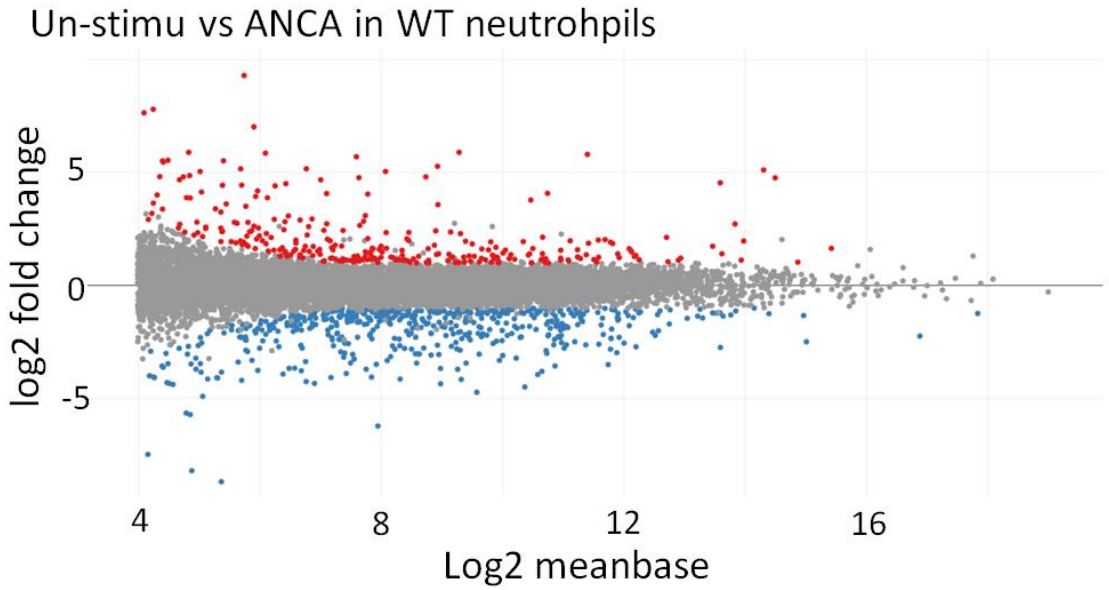


Figure 21. MA plot
遺伝子の発現量を MA plot で示した. 赤が発現亢進, 青が発現低下, 灰が非発現変動遺伝子を示す.

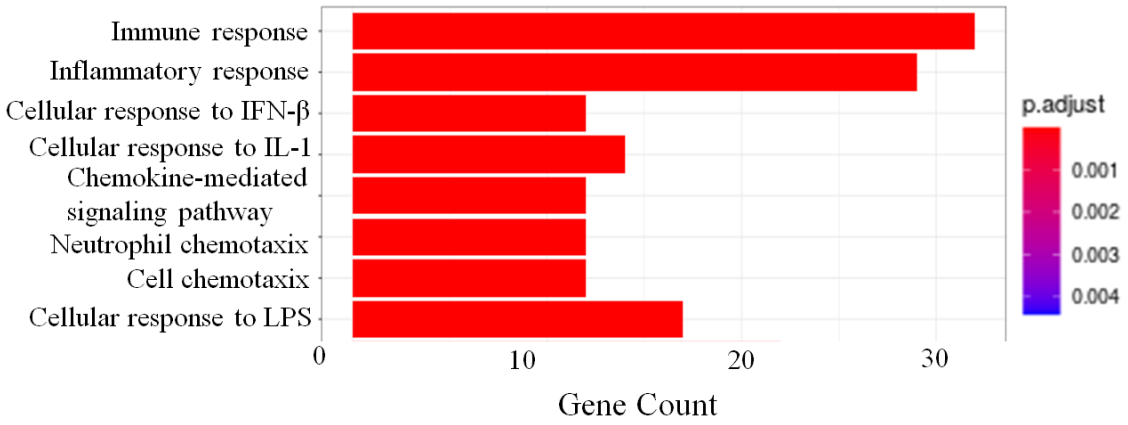


Figure 22. GO 解析

発現変動遺伝子の GO 解析を行った. 発現が亢進されていた変動遺伝子の機能の内, 上位 8 項目を抽出した. 免疫応答, 炎症応答, IFN-β や Interleukin (IL-1) に対する細胞応答, および好中球走化性を含む免疫系の活性化に関連していた.

7.4　考察

本実験により, *CypD* 遺伝子除去がマウス ANCA 誘導 NETs の形成を有意に抑制することが示された. 透過型電子顕微鏡による観察では, ANCA 刺激好中球でみられたクロマチンの脱凝縮, 核の膨張, 核膜の破綻, 細胞膜の不明瞭化などの形態学的変化が, *CypD* 欠損好中球では見られなかった. 第二章のヒトの好中球を用いた実験結果と併せて, 薬理学的作用だけではなく, 遺伝子的にも CypD が ANCA 誘導 NETs 形成に関与することが示された. また, ANCA 誘導好中球 NETs の RNA-seq において, 特異的な炎症関連シグナルの発現亢進を認め, 壊死性血管炎の病態に関与することが示唆された.

以上より, CypD の制御が AAV における壊死病変を抑制する可能性があると考えられる.

8. 第四章

ANCA 誘導 NETs の血管内皮細胞傷害に対する CypD 阻害薬の効果の検討

8.1　緒言

第二章では, ヒト好中球を用いて CypD 阻害薬による ANCA 誘導 NETs の形成抑制効果を示し, 第三章ではマウス好中球を用いて CypD の遺伝子除去による ANCA 誘導 NETs の形成抑制効果を示した.

本章では, ANCA-NETs により誘導される血管内皮傷害も CypD 依存性ネクローシスに関与していると仮説を立て, 血管内皮傷害に対する CypD 阻害薬の影響を検証した. 壊死性血管炎では, 内皮細胞が血管壁のフィブリノイド壊死の構成要素であり, 内皮細胞は ANCA 誘導 NETs により傷害されることが報告されている (Schreiber et al., 2017) (Grayson and Kaplan, 2016) (Jennette and Falk, 2014) (Al-Hussain et al., 2017). そこで, in vitro で誘導したヒト ANCA 誘導 NETs をヒト臍帯静脈血管内皮細胞である Immortalized human umbilical vein endothelial cell line established by the electroporation of pIRES-hTERT-hygr (HuEht) と共培養し, CypD 阻害薬の有無で血管内皮傷害の違いを評価した.

8.2　方法

8.2.1　HuEht 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 37℃下の 5%二酸化炭素インキュベータ内で継代培養を行った.

8.2.2　Immunoglobulin G (IgG)の抽出

6.2.2 と同様に健常人血清と MPO-AAV 患者の血清から IgG を抽出した.

8.2.3　ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞傷害の評価および CypD 阻害薬の効果

HuEht (1.6×10^5 cells/ml) を Collagen type I (Corning) をコーティングした 1.0-μm 24-well culture inserts (Corning) に 500 μl/well 添加し, 37℃下の 5%二酸化炭素インキュベータ内で 48 時間培養した. 6.2.1 と同様に分離した健常人の好中球 (2×10^6 cells/ml) を, TNF-α (5 ng/ml) で 30 分間プライミングした後, ANCA-IgG (250 μg/ml) または健常者 IgG (250 μg/ml) とともに 3 時間共培養して NETs を誘導した. HuEht と CsA (200 ng/ml) または PBS を 30 分間共培養した後, 培地を取り除いて, 誘導した NETs 培養液 (100 μl/well) を添加した. 37℃で 3 時間培養後, FITC-conjugated Bovine Serum Albumin (BSA-FITC) (Merck) を用いた細胞透過性試験 (Jerke et al., 2015) (Watanabe-Kusunoki et al., 2020)により HuEht の細胞傷害度を評価した. BSA-FITC を用いた細胞透過性試験は, BSA が傷害された血管内皮細胞の間隙を透過する特徴を利用しており, 実験の模式図を下記に示す (Figure 23) .

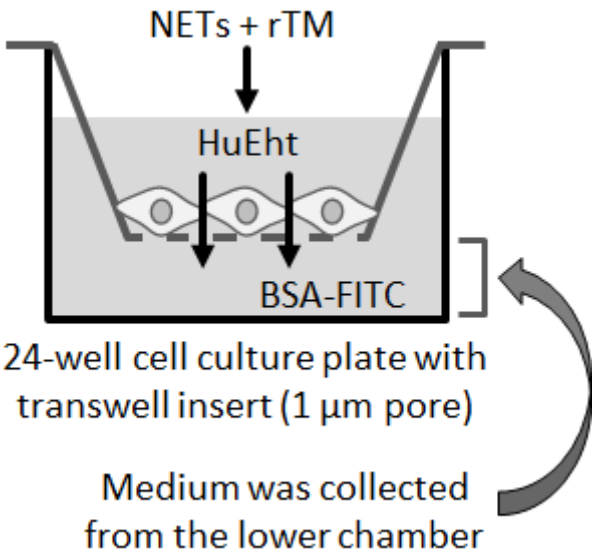


Figure 23. BSA-FITC を用いた細胞透過性試験の模式図. (Watanabe-Kusunoki et al., 2020)より引用.

8.2.4　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 JMP®を用いて行った.

8.3　結果

8.3.1　ANCA 誘導 NETs による HuEht の細胞傷害に対する CypD 阻害薬の効果

ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞傷害性を, BSA-FITC を用いた細胞透過性試験により評価し, CsA の血管内皮細胞保護効果を検証した. ANCA-IgG で刺激された NETs は control-IgG で刺激された好中球と比較し, 有意に高い細胞傷害性を示した (Figure 24). また ANCA 誘導 NETs による細胞傷害性は, CsA を内皮細胞に滴下することにより有意に低下した.

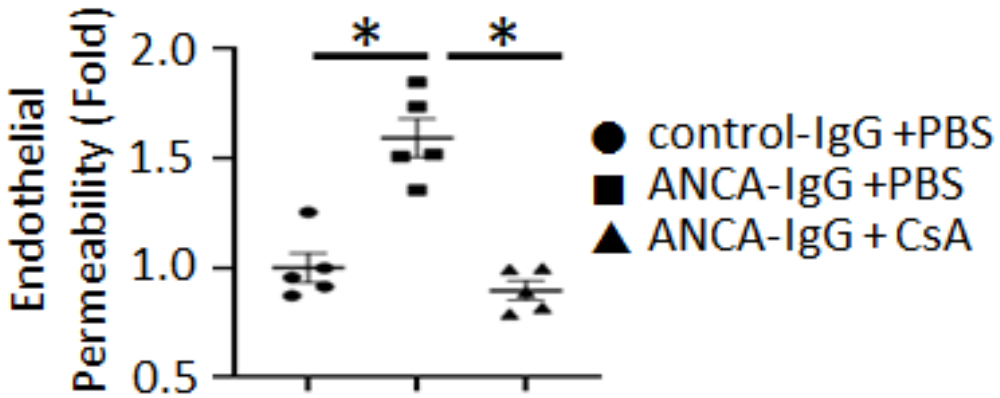


Figure 24. ANCA 誘導 NETs の HuEht に対する細胞傷害性および CsA の効果
細胞透過性試験を統計解析した. データは平均±標準誤差で示した. n=5/群. *p<0.05. BSA-FITC を用いた細胞透過性試験により細胞傷害度を評価した. ANCA 誘導 NETs により細胞傷害度が有意に上昇し, CsA 投与によりその細胞傷害度が有意に改善した.

8.4　考察

本実験から, ANCA 誘導 NETs は血管内皮細胞を直接傷害し, さらに CypD 阻害薬は血管内皮細胞傷害に対して保護的に働くことが示された. 第五章, 第六章, 第七章では, ANCA で誘導された NETs と CypD 依存性ネクローシスの関与が示されたが, CypD 阻害薬は ANCA 誘導 NETs の形成を抑制する効果に加えて, 血管炎の局所で起こっている内皮細胞傷害を軽減して壊死性血管炎を制御する可能性が示唆された. 以上から, CypD 阻害薬が血管炎の臓器保護効果をもたらす可能性があると考えられた.

9. 第五章

AAV 誘導モデルマウスに対する CypD の遺伝子除去効果の検討

9.1　緒言

AAV 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 (Jennette and Falk, 1997) (Jennette et al., 2013). NETs は細菌などの刺激により好中球が細胞死に至ると同時に細胞外に抗菌蛋白を放出して外来微生物を効率よく殺菌する免疫機構であるが (Brinkmann et al., 2004), AAV では感染がないにもかかわらず NETs が形成される. 好中球の細胞質抗原である MPO に対する自己抗体 ANCA は, 好中球表面に表出された MPO と結合すると細胞内 ROS を活性化させて NETs を誘導し, 血管内皮を傷害して腎糸球体毛細血管や肺毛細血管の損傷から半月体形成腎炎や肺出血を引き起こす (Nakazawa et al., 2019). さらに, NETs を分解できないことがさらなる自己抗体の産生につながり (Nakazawa et al., 2014), 炎症と壊死の悪循環病態が生じる (Mulay et al., 2016). そのため, NETs を制御することが AAV の病態改善につながる可能性があるが, NETs を標的とした治療法は開発されていない.

第二章, 第三章では in vitro において, ANCA 誘導 NETs は CypD 依存性ネクローシスが関与し, CypD の制御が NETs 形成を抑制することが示された. また第四章では CypD 阻害薬による血管内皮細胞の保護効果が示された. 本章ではこれまでの結果に着目し, in vivo において CypD の制御による NETs 形成の抑制が AAV の臓器障害を改善すると仮説を立て, AAV モデルマウスを用いて検証した.

AAV に動物モデルには, 抗体移入型と自然発症型の 2 つの代表的なモデルマウスがある. 抗体移入型は, マウス MPO を抽出し, *MPO* 欠損マウスに免疫化することで MPO 抗体 (ANCA) を産生させ, その MPO 抗体を野生型マウスに投与するものであるが, 表現系が弱いため, 今回 Lipopolysaccharide (LPS) を追加する方法で肺出血や腎炎を呈するモデルマウスを樹立した. この MPO 抗体を $CypD^{+/+}$マウスと $CypD^{-/-}$マウスに移入し AAV を誘導し, 血管炎の疾患活動性を検証した. なお, 使用した $CypD^{-/-}$マウスは正常に発育し, 検出可能な表現型の異常はないと報告されている (Nakagawa et al., 2005).

9.2　方法

9.2.1　AAV 誘導モデルマウスの樹立

9.2.1.1　WEHI-3 の培養

マウス骨髄性白血病細胞株である WEHI-3 細胞 (JCRB Cell Bank) は, 10% fetal bovine serum (FBS) を転化した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Merck) を用いて 37℃下の 5%二酸化炭素インキュベータ内で継代培養を行った.

9.2.1.2　マウス MPO の抽出

WEHI-3 細胞を遠心分離し，リン酸ベース Buffer でホモジナイズ後，上清を酢酸ナトリウムベース buffer で限外濾過し, MPO を含む細胞内蛋白を回収した．コンカナバリン A カラム (General Electric Company) と陽イオン交換を経て MPO を回収した (Hope et al., 2000) (Xiao et al., 2002). 回収した溶液は PBS で置換し，単離された MPO 蛋白の純度は, SDS-PAGE 後に銀染色および, 5% milk でブロッキングし，一次抗体に 300 倍で希釈した rabbit anti-MPO antibody (Abcam)，二次抗体に 1000 倍に希釈した goat anti rabbit IgG (Abcam) を用いた Western Blot 法で確認した.

9.2.1.3　*MPO*$^{-/-}$マウス

MPO$^{-/-}$マウスは横浜市立大学(Aratani et al., 1999)よりご提供いただいた.

9.2.1.4　マウス MPO の免疫化

10 週齢の *MPO*$^{-/-}$マウスに, 9.2.1.2 で得られたマウス MPO もしくはコントロールとして BSA を完全フロイントアジュバントと混合し, 混合液を第 0 日目に皮下注射し免疫化した. 第 21 日目と第 35 日目に MPO もしくは BSA と不完全フロイントアジュバントの混合液を腹腔内投与し, 追加免疫した. 第 44-45 日目に抗 MPO 抗体もしくは抗 BSA 抗体を含む血清を回収した (Xiao et al., 2002).

9.2.1.5　マウス MPO-IgG の確認 (間接蛍光抗体法と ELISA 法)

WEHI-3 細胞を 1×10^5 cells/ml となるようにウェルプレートに播種し, 5% 二酸化炭素インキュベータ内に 37℃下で 24 時間培養し, 細胞をウェル底に接着させた. 4%PFA で固定し, PBS で 3 回洗浄後, 9.2.1.4 で得られた抗 MPO 抗体もしくは抗 BSA 抗体を含む血清を滴下し, 室温で 1 時間培養した. 続いて 500 倍希釈した goat anti-mouse IgG Alexa 594 (Abcam) を滴下し, 室温で 45 分培養後, PBS で洗浄し, 蛍光顕微鏡で血清中にマウス MPO に対する抗体が含まれていることを確認した. ELISA 法によるマウス血清中 MPO-ANCA 値の測定は, A-CLIP 研究所に依頼した.

9.2.1.6　AAV 誘導モデルマウスの確立

10-14 週齢の雌の *CypD*$^{+/+}$マウス (n=6/群) もしくは *CypD*$^{-/-}$マウス (n=5/群) に抗 MPO 抗体を含む血清 100μl を静脈注射し, その 1 時間後に LPS (Merck) 50μg を腹腔内投与した. コントロールとして, *CypD*$^{+/+}$マウスに抗 BSA 抗体を含む血清を 100μl 静脈注射し, その 1 時間後に LPS 50μg を腹腔内投与した.

9.2.2　AAV 誘導モデルマウスに与える *CypD* 遺伝子除去の影響

9.2.2.1　生化学検査

屠殺前に AAV モデルマウスの末梢血を採取し, 腎機能の指標である血清中の Blood urea nitrogen (BUN) は BUN kit (serotec) を用いて測定した.

9.2.2.2　尿検査

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. 尿中アルブミンは LBIS Mouse Albumin ELISA Kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いて測定し, 尿中クレアチニンは Creatinine kit (serotec) を用いて測定した. なお, $CypD^{+/+}$マウス 1 匹は無尿であったため, 尿検査は $CypD^{+/+}$マウス (n=5/群) と $CypD^{-/-}$マウス (n=5/群) で解析を行った.

9.2.2.3　腎組織に対する PAS 染色と TUNEL 染色

解剖時に腎臓を採取した. 10%ホルマリン固定後に作成したパラフィン包埋切片で, Periodic acid Schiff (PAS) 染色を行った. また蛍光免疫染色のため, 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 5μm の凍結超薄切片を作成した. 腎臓の PAS 染色では, 切片上の全ての糸球体を観察し, 糸球体腎炎 (半月体, 管内細胞増殖) を認める糸球体の割合を評価した. 腎臓の組織障害は TUNEL 染色で評価した. TUNEL 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, 死細胞を定量評価した.

9.2.2.4　肺組織に対する HE 染色と TUNEL 染色

解剖時に肺を採取した. 9.2.2.3 と同様に固定した肺のパラフィン切片で, Hematoxylin and Eosin (HE) 染色を行った. 肺出血の有無は HE 染色で評価した. 肺の組織障害は TUNEL 染色で評価した. TUNEL 陽性細胞は, 1 スライドあたり 5 視野 (倍率 40 倍) をランダムに撮像し, ImageJ software にて mean luminance value を測定して, 死細胞を定量評価した.

9.2.2.5　FCM

屠殺前に AAV モデルマウスの末梢血を採取し, 溶血処理後, BD FACS Calibur™ (BD Biosciences) を用いて FSC と SSC から顆粒粒分画を抽出した. 循環 NETs の指標として Sytox 陽性顆粒球を測定し, CypD 依存性ネクローシスを評価するため顆粒球のミトコンドリア ROS の産生を Mito-SOX 試薬により測定し, FlowJo software (BD Biosciences)を用いて定量評価した.

9.2.2.6　Cyt c 免疫染色

CypD 依存性ネクローシスのシグナル経路の関与を腎組織の Cyt c 染色で評価した. Cyt c 染色は anti-Cytochrome c antibody (Abcam) を用いて, ABC 法で染色し, 蛍光顕微鏡で観察した. Cyt c 陽性細胞は, 1 つの糸球体あたり 10 視野 (倍率 400 倍) をランダムに撮像し, ImageJ software にて mean luminance value を測定して定量評価した.

9.2.2.7　CitH3 免疫染色

ANCA 誘導 NETs の形成に重要な蛋白である CitH3 は, 腎組織の CitH3 免疫染色で評価した. 切片を 1% BSA でブロッキングし, 100 倍に希釈した rabbit anti-CitH3 antibody (Abcam) を滴下し, 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 594 alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) を遮光下の室温で 60 分間反応させた. 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 を測定して定量評価した.

9.2.3　統計学的解析

血尿と肺出血の解析は Pearson のカイ二乗検定を用いて, その他の解析は 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 JMP®を用いて行った.

9.3　結果

9.3.1　単離されたマウス MPO の確認

回収された溶液を Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離させたポリアクリルアミドゲルを用いて銀染色を行い, タンパク質が抽出されていることを確認した. さらにゲルをメンブレンに転写させ, anti-MPO antibody を用いた Western blot 法で単一のバンドを確認した (Figure 25).

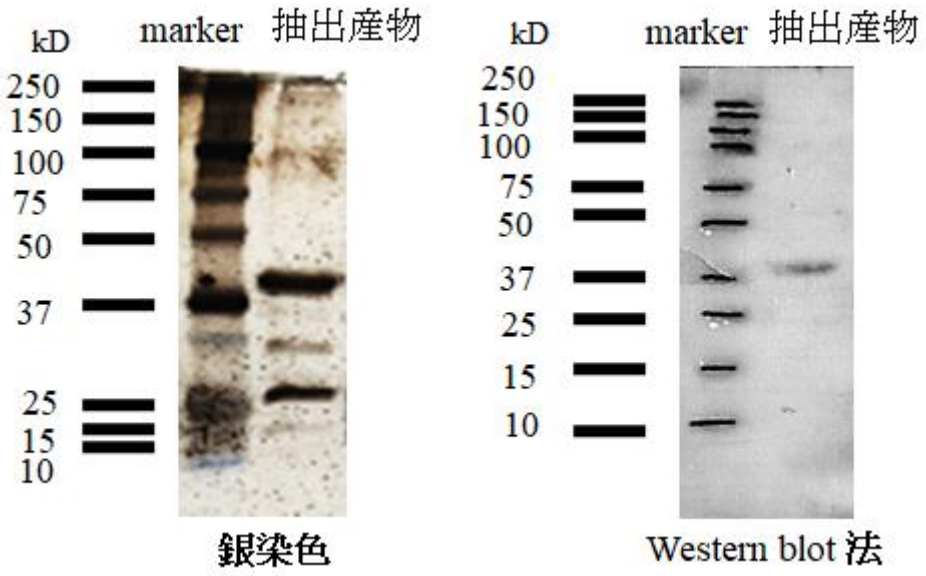


Figure 25. マウス MPO の確認
回収された溶液の SDS-PAGE 後の銀染色 (左図), anti-MPO antibody を用いて Western blot 法を行った. 単一のバンドが検出された(右図) .

9.3.2　マウス MPO-IgG の確認

BSA 免疫マウス血清成分は固相化した WEHI-3 細胞には結合しないが, mouse MPO 免疫マウス血清は WEHI-3 細胞に対する抗体が核周囲に同定された (Figure 26). この抗体が MPO に対する特異的抗体であることを ELISA 法で確認した.

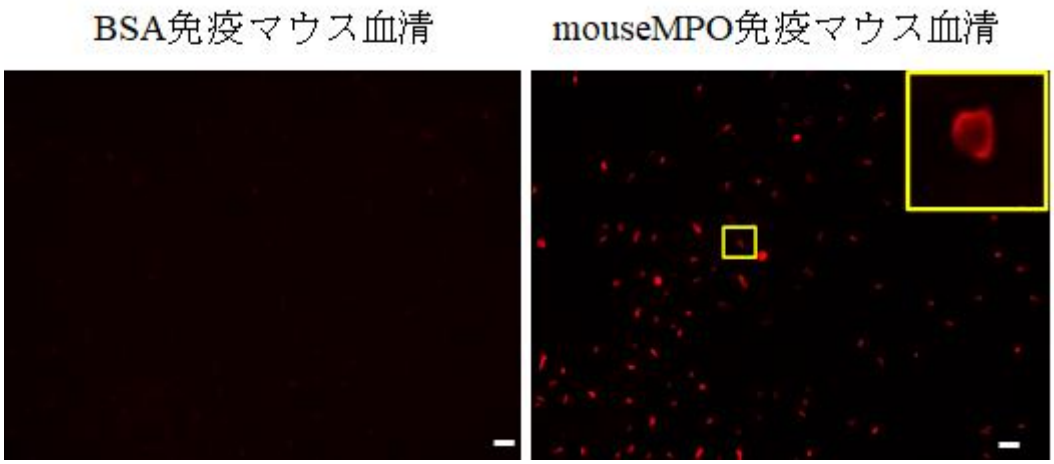


Figure 26. マウス MPO-IgG の確認
間接蛍光抗体法を行った. 黄枠の拡大図を右上に示す. Scale bar: 50μm. 抗 BSA 抗体を投与したマウス血清では好中球で陽性細胞を認めなかったが, 抗 MPO 抗体を投与したマウス血清では, 細胞質に染まる抗細胞質抗体であるマウス MPO-IgG を認めた.

9.3.3　血尿および腎機能の検討

MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは血尿を発症する割合が有意に多かった. *CypD*$^{-/-}$マウスでは血尿は発症するマウスを認めなかった (Figure 27). 腎機能の指標である血清 BUN 値は *CypD*$^{+/+}$群では高値で有り, 腎機能低下を認めた. *CypD*$^{-/-}$群では血清 BUN 値は正常域であり, *CypD*$^{+/+}$群と比較して腎機能低下が有意に抑制されていた (Figure 28).

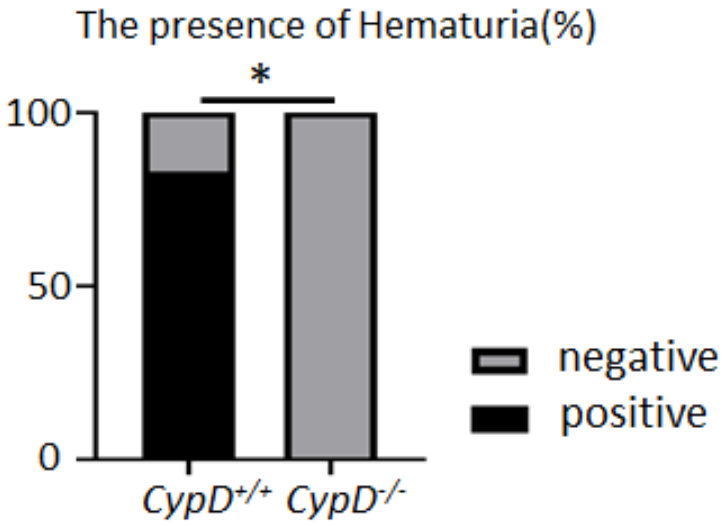


Figure 27. AAV モデルマウスにおける血尿の存在
血尿の有無を解析した. *CypD*$^{+/+}$: n=6/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. *p<0.05. AAV モデルマウスの *CypD*$^{+/+}$群では血尿陽性の割合が有意に多く, *CypD*$^{-/-}$群では全てのマウスで血尿は陰性であった.

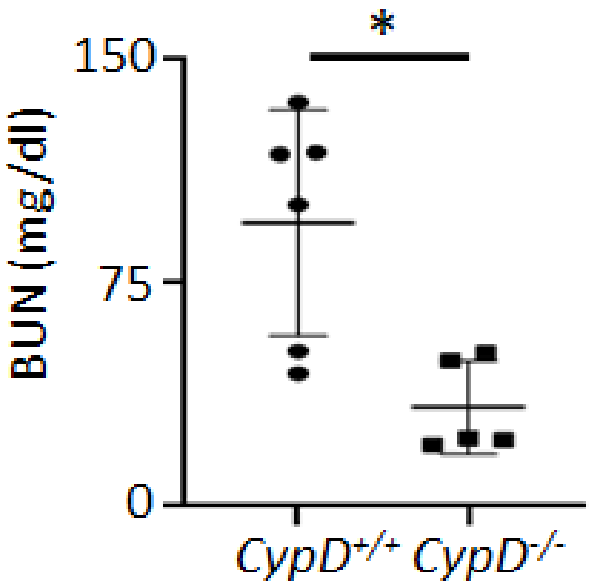


Figure 28. AAV モデルマウスにおける腎機能の検討
BUN 値を統計解析した．データは平均±標準偏差で示した．*CypD*$^{+/+}$: n=6/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. *p<0.05. *CypD*$^{+/+}$群では血清 BUN が有意に高値であった. *CypD*$^{-/-}$群では血清 BUN 値は正常域であった.

9.3.4　糸球体腎炎の検討

腎臓の糸球体病変を PAS 染色で評価した. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは組織学的変化が乏しかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では半月体形成性腎炎やメサンギウム増殖性腎炎の所見を認め, *CypD*$^{-/-}$群では *CypD*$^{+/+}$群と比較して糸球体腎炎の割合が有意に少なかった (Figure 29, 30).

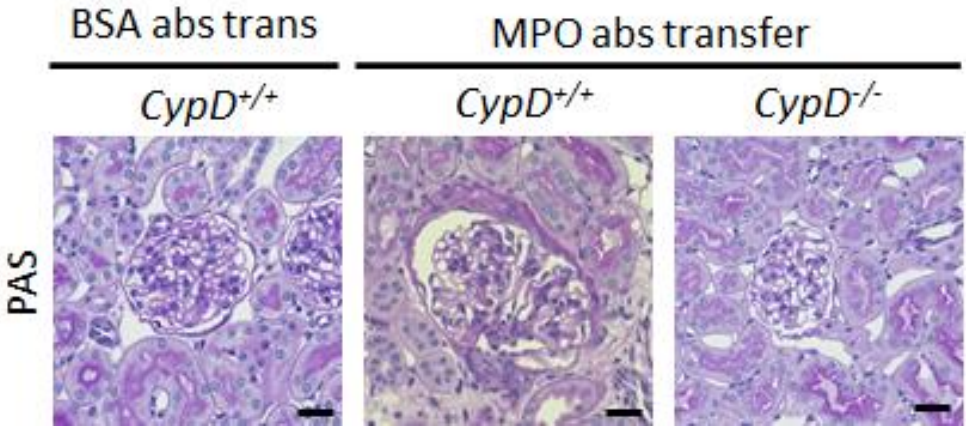


Figure 29. 腎組織の組織学的評価 (PAS 染色)
腎組織の PAS 染色を行った. Scale bar: 20μm. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは組織学的変化が乏しかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では半月体やメサンギウム増殖の所見を認めたが, *CypD*$^{-/-}$群では組織学的変化は乏しかった.

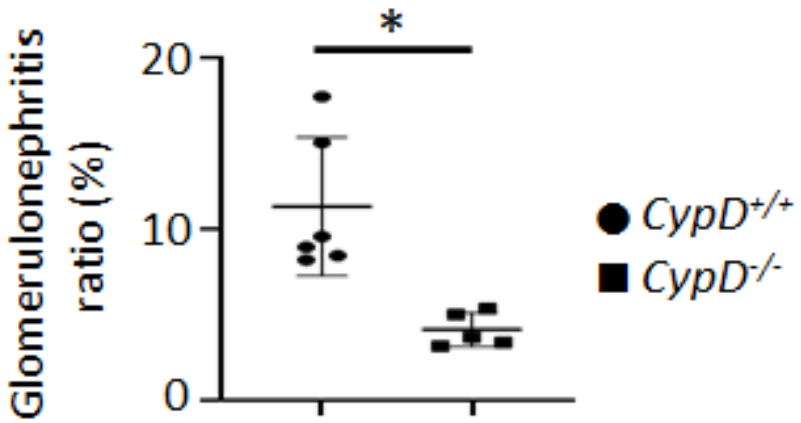


Figure 30. PAS 染色による腎糸球体病変の評価
糸球体病変を有する糸球体の割合を統計解析した. データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=6/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. *p<0.05. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では腎炎の所見を有する糸球体の割合が有意に高く, *CypD*$^{-/-}$群では糸球体腎炎の所見が有意に抑制されていた.

9.3.5　腎臓における壊死細胞の検討

腎臓における壊死細胞を TUNEL 染色で評価した. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは壊死細胞が乏しかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では壊死細胞を多く認め, *CypD*$^{-/-}$群では *CypD*$^{+/+}$群と比較して壊死細胞が有意に少なかった (Figure 31, 32).

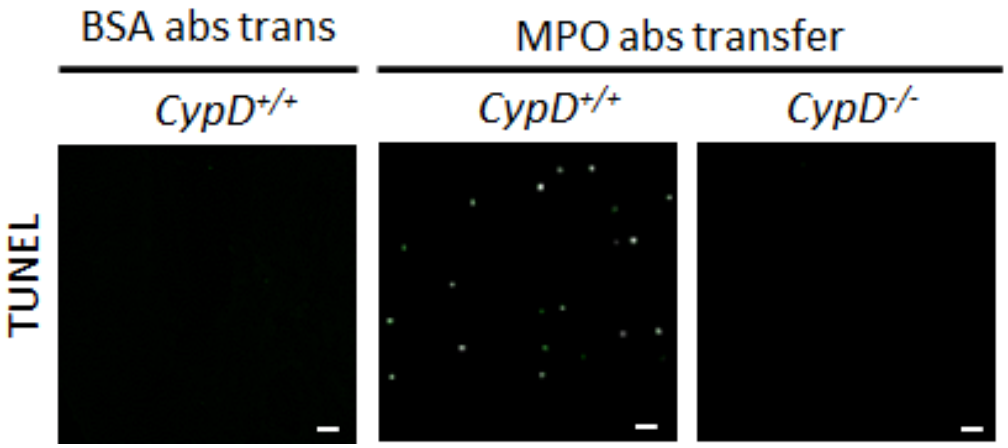


Figure 31. 腎臓における壊死細胞の検討 (TUNEL 染色)
腎組織の TUNEL 染色を施行した. 緑は TUNEL 陽性細胞を示す. Scale bar: 50μm. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは TUNEL 陽性細胞が乏しかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では TUNEL 陽性細胞が多く, *CypD*$^{-/-}$群では TUNEL 陽性細胞が少なかった.

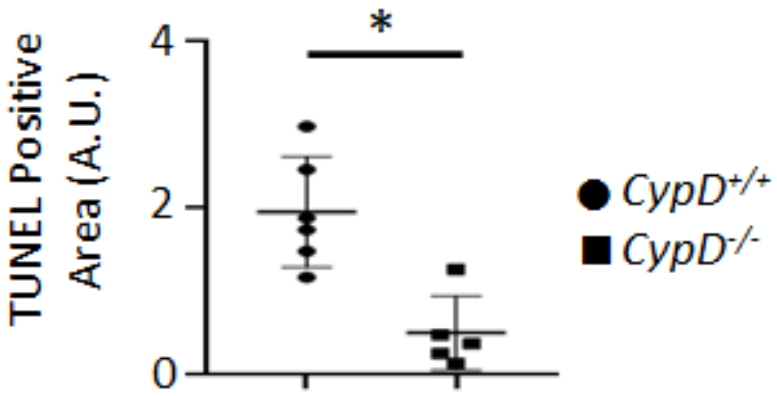


Figure 32. TUNEL 染色による腎臓の壊死細胞の評価
TUNEL 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. *CypD*$^{+/+}$: n=6/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. *p<0.05. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{-/-}$群では, *CypD*$^{+/+}$群と比較し, TUNEL 陽性細胞が有意に少なかった. データは平均±標準偏差で示した.

9.3.6　肺出血の検討

肺出血を HE 染色で評価した. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは肺出血を認めず, 組織学的変化が乏しかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では肺出血を認め, *CypD*$^{-/-}$群では全てのマウスにおいて肺出血を認めなかった. *CypD*$^{-/-}$群は *CypD*$^{+/+}$群と比較して肺出血が少ない傾向にあった (Figure 33, 34).

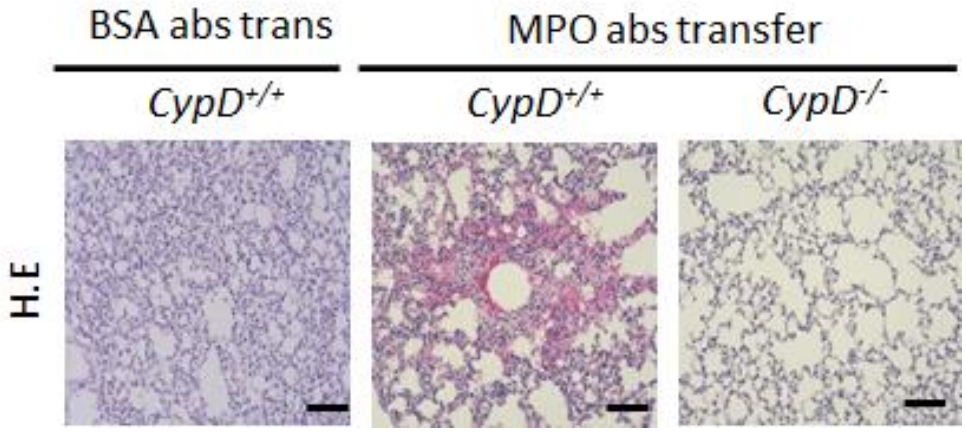


Figure 33. 肺出血の検討 (HE 染色)
肺組織の HE 染色を施行した. Scale bar: 200μm. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは肺出血を認めなかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では肺出血を認め, *CypD*$^{-/-}$群では肺出血を認めなかった.

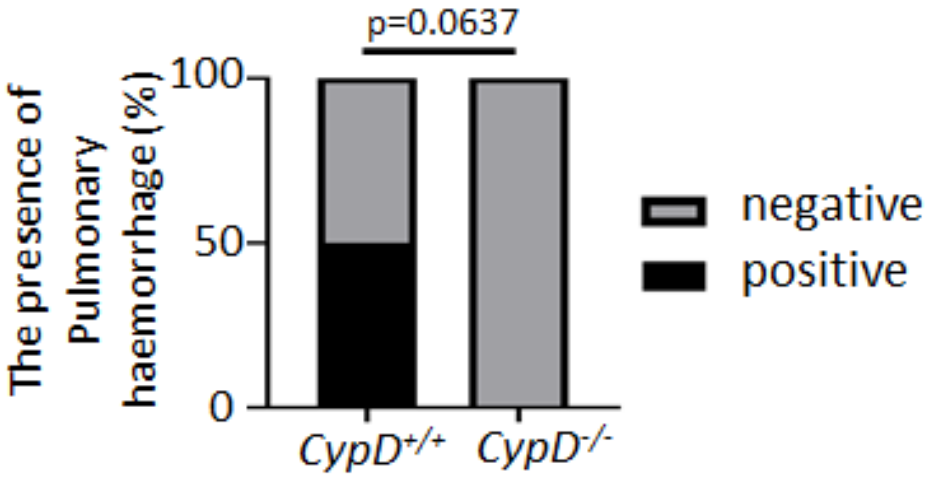


Figure 34. HE 染色による肺出血の評価
肺出血の有無を統計解析した. *CypD*$^{+/+}$: n=6/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では肺出血を認めたマウスの割合が多い傾向にあり， *CypD*$^{-/-}$群では全てのマウスにおいて肺出血を認めなかった.

9.3.7　肺における壊死細胞の検討

肺における壊死細胞を TUNEL 染色で評価した. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$ マウスでは壊死細胞が乏しかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では壊死細胞を多く認め, *CypD*$^{-/-}$群では *CypD*$^{+/+}$群と比較して壊死細胞が有意に少なかった (Figure 35, 36).

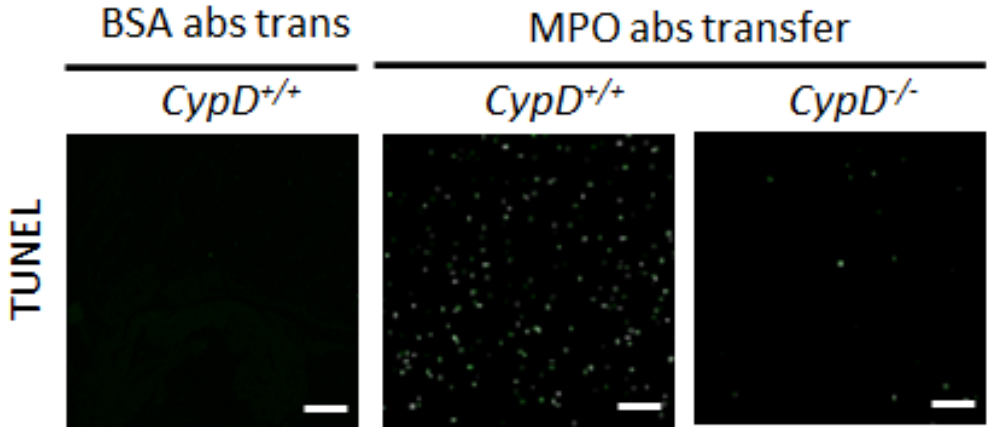


Figure 35. 肺における壊死細胞の検討 (TUNEL 染色)
肺組織の TUNEL 染色を施行した. 緑は TUNEL を示す. Scale bar: 200μm. 抗 BSA 抗体を投与した *CypD*$^{+/+}$マウスでは TUNEL 陽性細胞が乏しかった. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では TUNEL 陽性細胞が多く, *CypD*$^{-/-}$群では TUNEL 陽性細胞が少なかった.

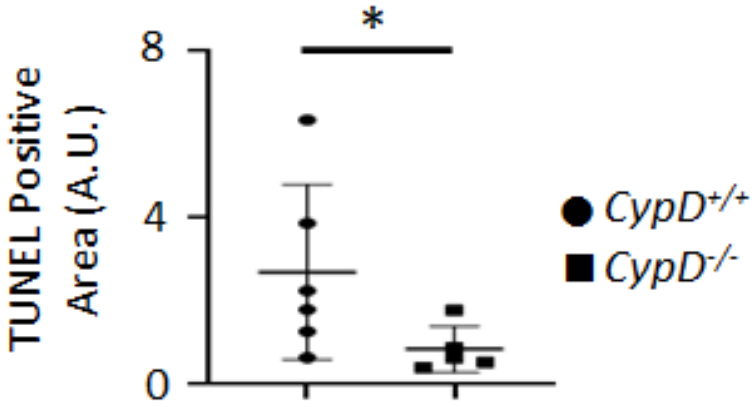
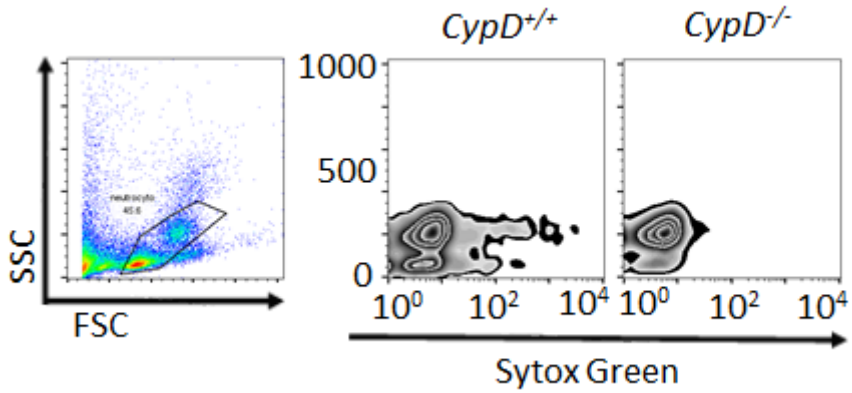


Figure 36. TUNEL 染色による肺の壊死細胞の評価
TUNEL 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=6/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. *p<0.05. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{-/-}$群では, *CypD*$^{+/+}$群と比較し, TUNEL 陽性細胞が有意に少なかった.

9.3.8　FCM による循環血液中の NETs とその関連因子の評価

AAV 誘導マウスの末梢血を採取し, FCM により FSC と SSC から顆粒球分画を抽出して, SG 陽性顆粒球を循環血液中の NETs として評価し (Masuda et al., 2017), mitoSOX 陽性顆粒球を CypD 関連ネクローシスの指標である mitoROS として評価した. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では循環 NETs を多く認め, *CypD*$^{-/-}$群では *CypD*$^{+/+}$群と比較して循環 NETs が有意に少なかった (Figure 37). また, MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では mitoROS が増加しており, *CypD*$^{-/-}$群では *CypD*$^{+/+}$群と比較して mitoROS が有意に少なかった.

a)



b)

c)

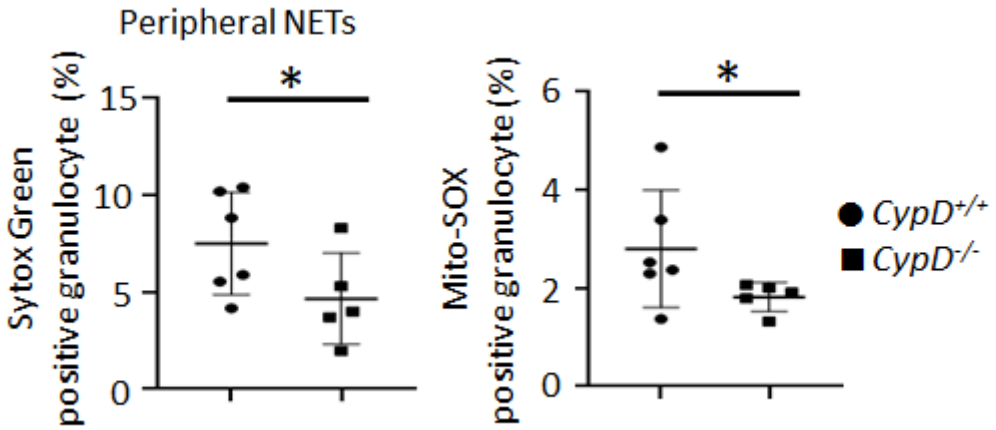


Figure 37. FCM による循環 NETs とその関連因子の評価
(a) forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) による顆粒球分画の抽出, および SG 陽性顆粒球のヒストグラムを示した. (b) SG 陽性顆粒球率を示した. (c) MitoSOX 陽性顆粒球率を示した. データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=6/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. *p<0.05. *CypD*$^{-/-}$マウスでは, *CypD*$^{+/+}$マウスと比較し, 循環 NETs が有意に低下していた. また, 循環 NETs の関連因子である mitoROS が, *CypD*$^{-/-}$マウスでは *CypD*$^{+/+}$マウスと比較し有意に低下していた.

9.3.9　腎臓の壊死性病変と CypD 依存性ネクローシスの関与の検討

AAV における壊死と CypD 依存性ネクローシスの関与を, CypD 依存性ネクローシスの指標である Cyt c 染色と, NETs の指標である CitH3 染色を用いて評価した. MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群では Cyt c 陽性細胞を多数認め, *CypD*$^{-/-}$群では *CypD*$^{+/+}$群と比較して Cyt c 陽性細胞が有意に少なかった (Figure 38, 39). また, MPO-IgG を投与した *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群で共に CitH3 陽性細胞を多く認め, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群では有意な差を認めなかった (Figure 40, 41).

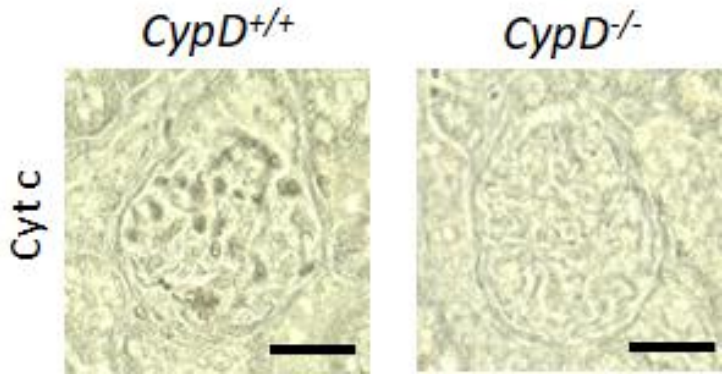


Figure 38. 腎組織における CypD 依存性ネクローシスの関与の検討 (Cyt c 染色)
腎組織の Cyt c 染色を施行した. 暗灰色は Cyt c を示す. Scale bar: 20μm. *CypD*$^{+/+}$ マウスでは CypD 依存性ネクローシスの指標である Cyt c 陽性細胞を認めたが, *CypD*$^{-/-}$マウスでは Cyt c 陽性細胞が乏しかった.

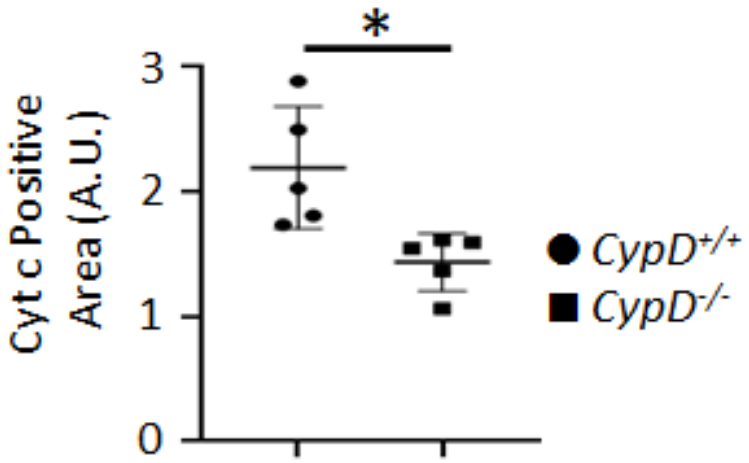


Figure 39. 腎組織における CypD 依存性ネクローシスの関与の評価 (Cyt c 染色)
Cyt c 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=5/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. *p<0.05. *CypD*$^{-/-}$マウスでは, *CypD*$^{+/+}$マウスと比較し, Cyt c 陽性域が有意に低下していた.

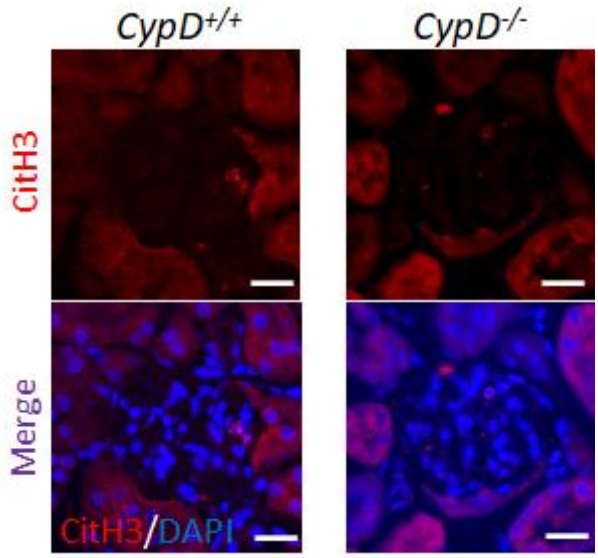


Figure 40. 腎組織における NETs の検討 (CitH3 染色)
腎組織の CitH3 染色を施行した. 赤は CitH3, 青は DAPI を示す. Scale bar: 20μm.
CypD$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスで共に NETs の指標である CitH3 陽性細胞を認めた.

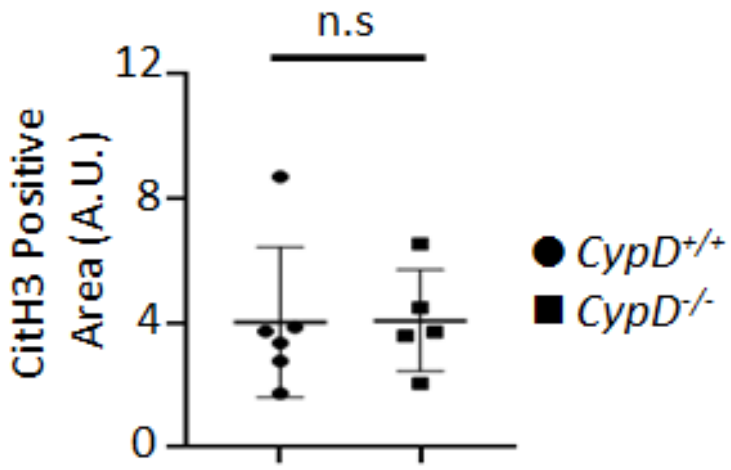


Figure 41. 腎組織における NETs の評価 (CitH3 染色)
CitH3 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した.データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=5/群, *CypD*$^{-/-}$: n=5/群. n.s= not significant. *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスで CitH3 陽性細胞に差はなかった.

9.4　考察

本章では, AAV 誘導モデルマウスを用いて, *CypD* 遺伝子除去効果を検証した. AAV 誘導マウスにおいて, *CypD* の欠損により CypD 依存性ネクローシスの抑制を介して, 循環 NETs の低下ならびに組織での壊死を抑制し, 臓器障害が軽減した. また, PAD4 により制御されクロマチンの脱凝縮を引き起こす CitH3 の上昇は *CypD* の欠損によって抑えることができなかった. この結果は第二章の in vitro の結果と一致しており, CypD 依存性ネクローシスが, 現在知られている PAD4 依存性 CitH3 の経路の下流に存在するのか, もしくは PAD4 依存性経路とは独立した経路である可能性が in vivo においても示唆されが, いずれの場合にも CypD がネクローシスの最終的な実行に関与することが想定される.

これまでの章では, in vitro において CypD 依存性ネクローシスが ANCA 誘導 NETs に関与し, CypD の制御が ANCA 誘導 NETs 抑制につながったことを示したが, 本章では in vivo において, CypD の遺伝子除去は, CypD 依存性ネクローシスの抑制を介して, NETs 形成および血管内皮細胞傷害が引き起こす臓器障害を改善したことが示された.

今回用いたマウスは全身の *CypD* 欠損マウスであり, 壊死性血管炎の病態には好中球以外にも血管内皮細胞や免疫系の細胞が関与した可能性がある. しかし, 第四章において, 本疾患で起こる血管内皮傷害も CypD に関連することを示しており, 血管炎を取り巻く各細胞のネクローシスに CypD が影響していることが考えられる. また, 抗体 ANCA 移入モデルは人為的な操作の加わった疾患モデルであるため, 自己免疫疾患としての ANCA の産生に関わる病態や, 治療による免疫異常の評価を行うことが難しいモデルである.

そこで第六章では, ANCA を産生する自然発症型 AAV モデルマウスを用いて *CypD* の欠損が免疫異常を含めた血管炎病態に与える影響を調べた.

10. 第六章

自然発症 AAV モデルマウスに対する CypD の遺伝子除去の影響

10.1　緒言

第五章では, ANCA 移入型 AAV 誘導モデルマウスにおいて, CypD の遺伝子除去により循環 NETs ならびに組織の壊死が減少し, 臓器障害の軽減効果をもたらしたことを示したが, ANCA 産生などの免疫異常を含めた血管炎病態への影響は評価できず, また前述の効果は ANCA 移入型 AAV 誘導モデルマウスでのみ観察される現象である可能性もある. そこで本章では, 生後 6 週頃から ANCA を含めた自己抗体が産生され, 8 週頃から腎炎や肺出血などの血管炎症状を発症する AAV 自然発症マウスである Spontaneous crescentic glomerulonephritis-forming/Kinjoh (SCG/Kj) マウスを用いて (Kinjoh et al., 1993), *CypD* 遺伝子欠損マウスとの戻し交配を行い, CypD の血管炎に与える影響を調べた.

10.2　方法

10.2.1　SCG/Kj マウス

AAV を自然発症する SCG/Kj (Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-forming/Kinjoh) マウス (National Institutes of Biomedical Innovation, Health, and Nutrition) を用いた.

10.2.2　SCG/Kj マウスと *CypD*$^{-/-}$の戻し交配

SCG/Kj マウス (雄) と *CypD*$^{-/-}$マウス (雌) を N3 世代まで戻し交配を行った. N3 世代の *CypD*$^{+/-}$同士を交配させ, *CypD*$^{+/+}$ (14 週齢の雌) (n=7/群) と *CypD*$^{-/-}$ (14 週齢の雌) (n=8/群) を比較検討した. 遺伝子型判定は尾生検サンプルを用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) を行い確認した. 使用したプライマー配列は Table 1 に記載した.

Table 1. PCR に用いたプライマー配列

Gene (Forward/Reverse)	Primer Sequences (5’ to 3’)
CypD Wild type Forward	CTCTTCTGGGCAAGAATTGC
CypD Wild type Reverse	ATTGTGGTTGGTGAAGTCGCC
CypD Mutant Forward	GGCTGCTAAAGCGCATGCTCC

10.2.3　生化学検査

屠殺前に末梢血を採取し，血清中の Blood urea nitrogen (BUN) を BUN kit を用いて測定した.

10.2.4　尿検査

屠殺前に代謝ケージを用いて蓄尿を行い，血尿は dipstick を用いて評価した．尿中アルブミンは LBIS Mouse Albumin ELISA Kit を用いて測定し，尿中クレアチニンは Creatinine kit を用いて測定した.

10.2.5　腎組織に対する PAS 染色と TUNEL 染色

解剖時に腎臓を採取した. 9.2.2.3 と同様に固定後，パラフィン包埋切片と凍結切片を作成した．パラフィン包埋切片で, PAS 染色を行った. PAS 染色では，切片上の全ての糸球体を観察し，糸球体腎炎 (半月体，管内細胞増殖) を認める糸球体の割合を評価した．腎臓の組織障害は TUNEL 染色で評価した. TUNEL 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，死細胞を定量評価した.

10.2.6　肺組織に対する HE 染色と TUNEL 染色

解剖時に肺を採取した. 9.2.2.3 と同様に固定した肺のパラフィン切片で, HE 染色を行った．肺出血の有無は HE 染色で評価した．肺の組織障害は TUNEL 染色で評価した. TUNEL 陽性細胞は, 1 スライドあたり 5 視野 (倍率 40 倍) をランダムに撮像し, ImageJ software にて mean luminance value を測定して，死細胞を定量評価した.

10.2.7　腎組織における TUNEL 陽性細胞の同定

腎組織を TUNEL 染色と MPO 染色の二重染色を行い, TUNEL 陽性細胞を同定した. 切片を 5% BSA でブロッキングし, 50 倍に希釈した Anti-Myeloperoxidase 抗体 (Abcam) を滴下し, 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 594 alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) を遮光下の室温で 60 分間反応させた. 続いて TUNEL 染色を行い, 最後に DAPI を含む封入剤で封入し, 蛍光顕微鏡で観察した.

10.2.8　血清 MPO-ANCA 値の測定

屠殺前に末梢血を採取し, 自己抗体である血清 MPO-ANCA 値の測定は, A-CLIP 研究所に依頼した.

10.2.9　血清抗 dsDNA 抗体値の測定

屠殺前に末梢血を採取し, 自己抗体である血清抗 dsDNA 抗体値の測定は, LBIS Mouse Anti-dsDNA ELISA Kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いて測定した.

10.2.10　生存率の解析

屠殺していないマウスの生後 25 日目時点の全生存率をカプランマイヤー曲線で評価した.

10.2.11　統計学的解析

血尿と肺出血の解析は Pearson のカイ二乗検定を用いて, その他の解析は 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 JMP®を用いて行った. また, 生存率は Gehan-Breslow-Wilcoxon 検定を用いて統計学的評価を行い, 統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad) を用いて行った.

10.3　結果

10.3.1　血尿および腎機能の検討

CypD$^{+/+}$マウスでは血尿を認めるマウスが多かった. *CypD*$^{-/-}$マウスでは全てのマウスで血尿を認めず, *CypD*$^{+/+}$マウスと比較して有意に血尿の発症が抑制された (Figure 42). 腎機能の指標である血清 BUN 値は *CypD*$^{+/+}$群では高値で有り, 腎機能低下を認めた.　*CypD*$^{-/-}$群では, *CypD*$^{+/+}$群と比較して腎機能低下が有意に抑制されていた (Figure 43).

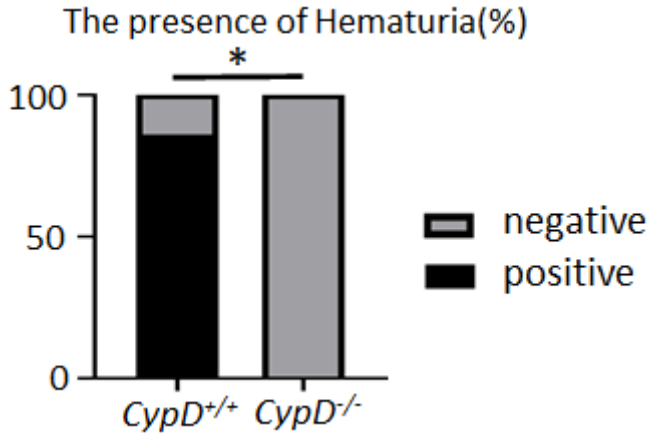


Figure 42. SCG/Kj マウスにおける血尿の検討
血尿の有無を解析した. *CypD*$^{+/+}$: n=7/群, *CypD*$^{-/-}$: n=8/群. *p<0.05. SCG/Kj マウスの *CypD*$^{+/+}$群では血尿陽性の割合が有意に多く, *CypD*$^{-/-}$群では全てのマウスで血尿は陰性であった.

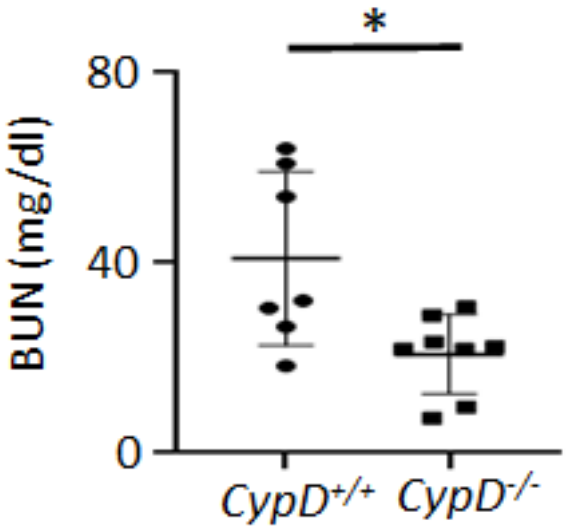


Figure 43. SCG/Kj マウスにおける腎機能の検討
BUN 値を統計解析した．データは平均±標準偏差で示した．*CypD*$^{+/+}$: n=7/群, *CypD*$^{-/-}$: n=/8/群. *p<0.05. *CypD*$^{+/+}$群では有意に腎機能が低下していた. *CypD*$^{-/-}$群では血清 BUN 値は正常域であり，腎機能低下を抑制していた.

10.3.2　糸球体腎炎の検討

腎臓の糸球体病変を PAS 染色で評価した. *CypD*$^{+/+}$群では半月体形成性腎炎やメサンギウム増殖性腎炎の所見を認め, *CypD*$^{-/-}$群では腎炎の所見は乏しく, *CypD*$^{+/+}$群と比較して糸球体腎炎の割合が有意に少なかった (Figure 44, 45).

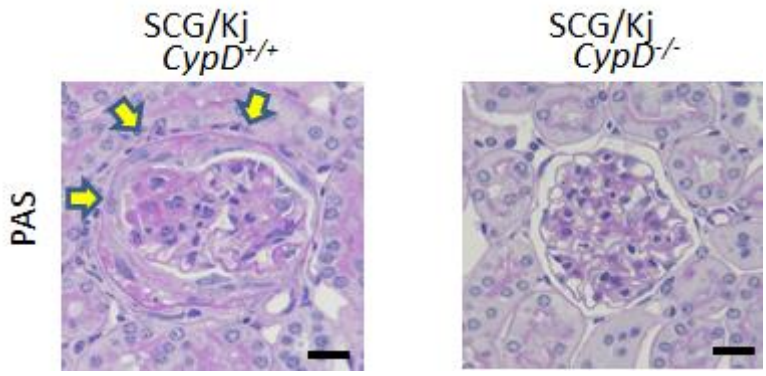


Figure 44. 腎組織の組織学的評価 (PAS 染色)
腎組織の PAS 染色を施行した. 黄矢印は半月体を示す. Scale bar: 20μm. *CypD*$^{+/+}$群では半月体形成や増殖性腎炎の所見を認めたが, *CypD*$^{-/-}$群では組織学的変化は乏しかった.

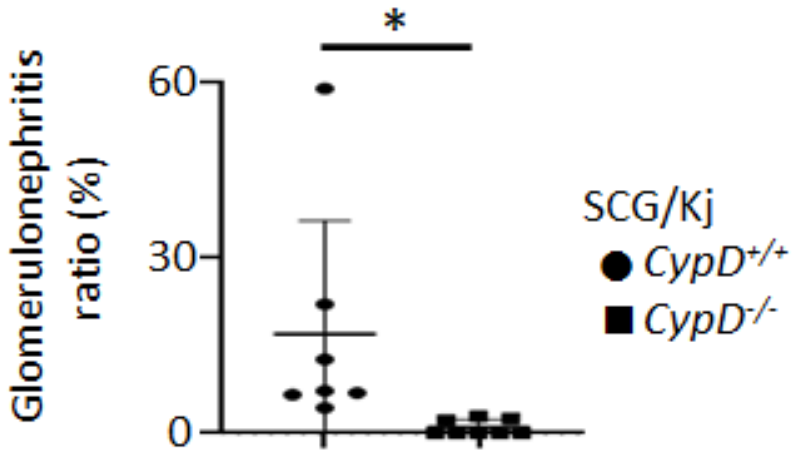


Figure 45. PAS 染色による腎糸球体病変の評価
糸球体病変を有する糸球体の割合を統計解析した．データは平均±標準偏差で示した．*CypD*$^{+/+}$: n=7/群, *CypD*$^{-/-}$: n=8/群. *p<0.05. *CypD*$^{+/+}$群では腎炎の所見を有する糸球体の割合が有意に高く, *CypD*$^{-/-}$群では糸球体腎炎の所見が有意に抑制されていた.

10.3.3　腎臓における壊死細胞の検討

腎臓における壊死細胞を TUNEL 染色で評価した. *CypD*$^{+/+}$群では壊死細胞を多く認め, *CypD*$^{-/-}$群では*CypD*$^{+/+}$群と比較して壊死細胞が有意に少なかった (Figure 46, 47). 好中球マーカーである MPO 染色と TUNEL 染色の二重染色により, TUNEL 陽性細胞の一部が好中球であると同定した (Figure 48).

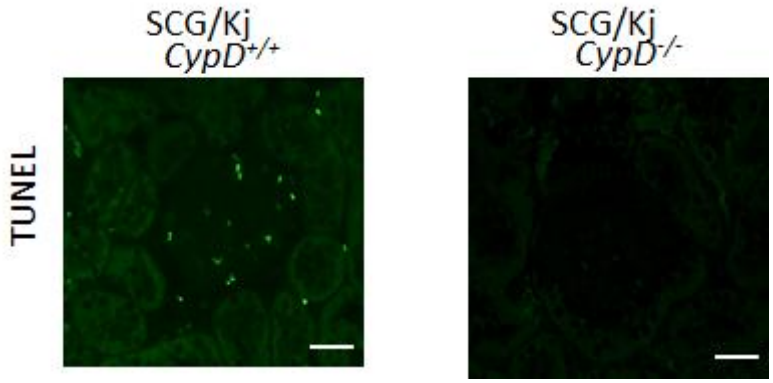


Figure 46. 腎臓における壊死細胞の検討 (TUNEL 染色)
腎組織の TUNEL 染色を施行した. 緑は TUNEL を示す. Scale bar: 20μm. *CypD*$^{+/+}$群では TUNEL 陽性細胞が多く, *CypD*$^{-/-}$群では TUNEL 陽性細胞が少なかった.

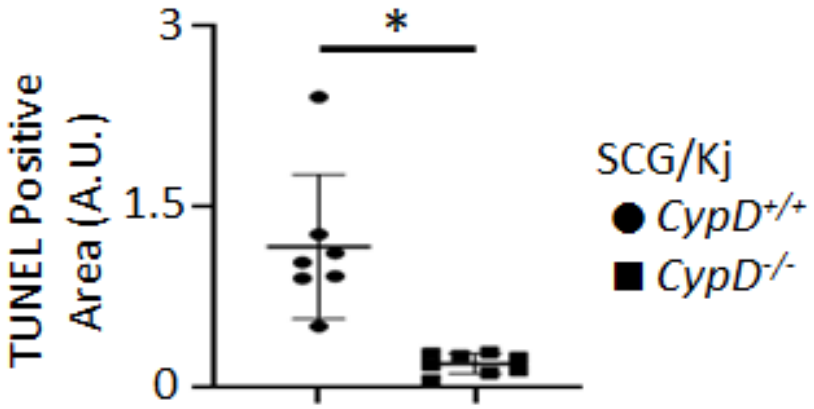


Figure 47. TUNEL 染色による腎臓の壊死細胞の評価
TUNEL 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=7/群, *CypD*$^{-/-}$: n=8/群. *p<0.05. *CypD*$^{-/-}$群では, *CypD*$^{+/+}$群と比較し, TUNEL 陽性細胞が有意に少なかった.

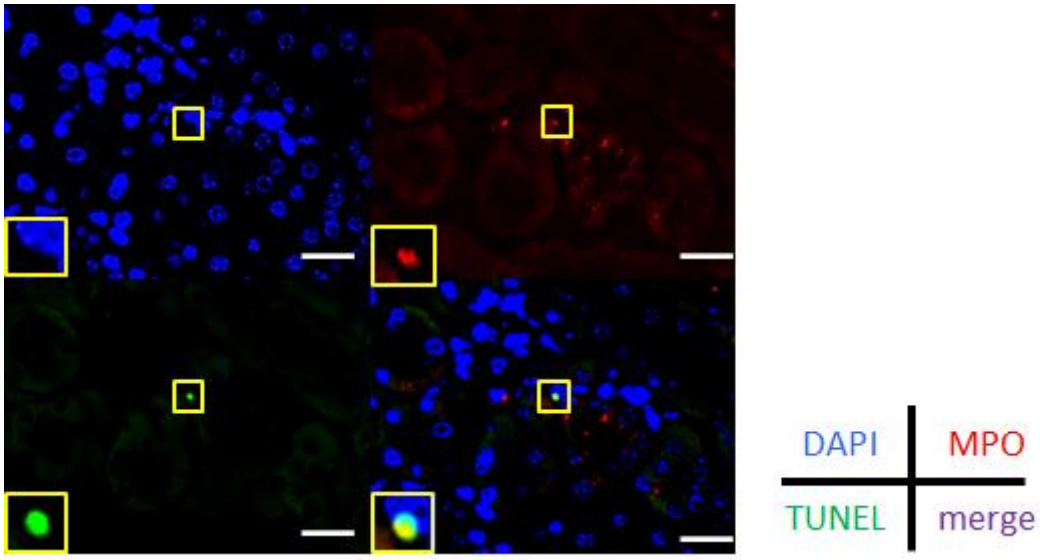


Figure 48. 尿細管間質における壊死細胞の同定
TUNEL/MPO の二重染色を施行した. 赤は MPO, 緑は TUNEL, 青は DAPI を示す. Scale bar: 20μm. 左下に黄枠の拡大図を示す. TUNEL 陽性細胞と MPO 陽性細胞が共に染色されている細胞を認める.

10.3.4　肺出血の検討

肺出血を HE 染色で評価した. *CypD*$^{+/+}$群では肺出血を認め, *CypD*$^{-/-}$群では全てのマウスにおいて肺出血を認めなかった. *CypD*$^{-/-}$群は *CypD*$^{+/+}$群と比較して肺出血を有意に抑制していた (Figure 49, 50).

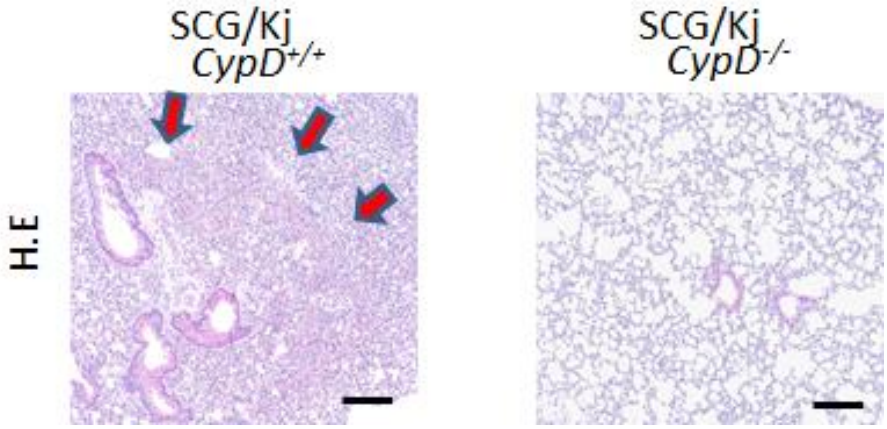


Figure 49. 肺出血の検討 (HE 染色)
肺組織の HE 染色を施行した. 赤矢印は肺出血を示す. Scale bar: 200μm. *CypD*$^{+/+}$群では全てのマウスで肺出血を認め, *CypD*$^{-/-}$群では肺出血を認めなかった.

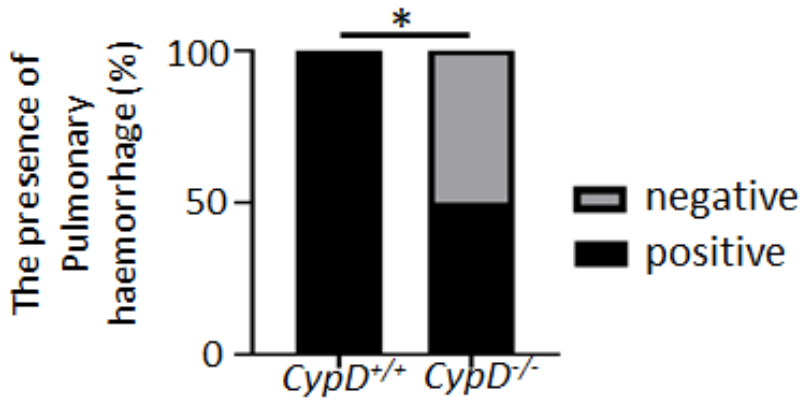


Figure 50. HE 染色による肺出血の評価
肺出血の有無を統計解析した. *CypD*$^{+/+}$: n=7/群, *CypD*$^{-/-}$: n=8/群. *CypD*$^{+/+}$群では *CypD*$^{-/-}$群と比較して, 肺出血を認めたマウスの割合が有意に多かった.

10.3.5　肺における壊死細胞の検討

肺における壊死細胞を TUNEL 染色で評価した. *CypD*$^{+/+}$群では壊死細胞を多く認め, *CypD*$^{-/-}$群では *CypD*$^{+/+}$群と比較して壊死細胞が有意に少なかった (Figure 51, 52).

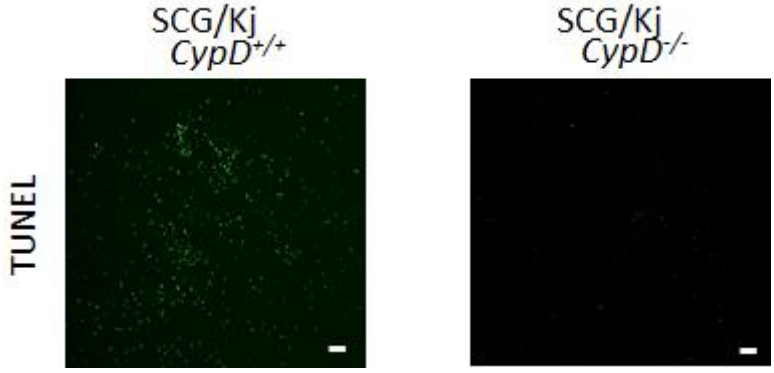


Figure 51. 肺における壊死細胞の検討 (TUNEL 染色)
肺組織の TUNEL 染色を施行した. 緑は TUNEL を示す. Scale bar: 200μm. *CypD*$^{+/+}$群では TUNEL 陽性細胞が多く, *CypD*$^{-/-}$群では TUNEL 陽性細胞が少なかった.

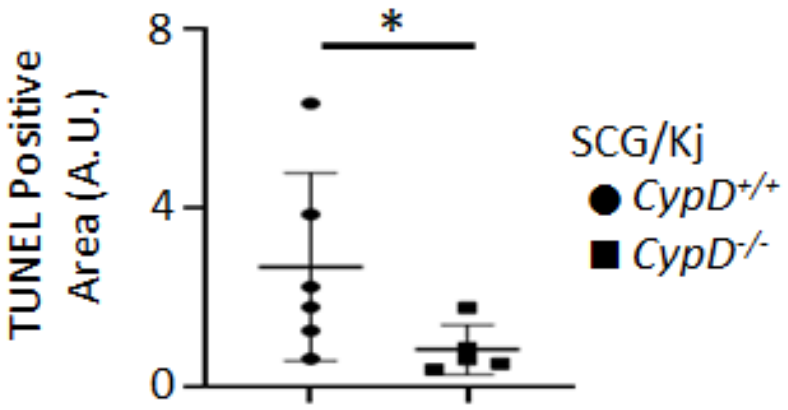


Figure 52. TUNEL 染色による肺の壊死細胞の評価
TUNEL 陽性細胞の平均輝度を ImageJ software で統計解析した. データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=7/群, *CypD*$^{-/-}$: n=8/群. *p<0.05. *CypD*$^{-/-}$群では, *CypD*$^{+/+}$群と比較し, TUNEL 陽性細胞が有意に少なかった.

10.3.6　CypD の遺伝子除去による自己抗体産生能への影響の検討

CypD の欠損が自己抗体産生に与える影響を評価するために, MPO-ANCA と抗 dsDNA 抗体を測定した. *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群において, MPO-ANCA と抗 dsDNA 抗体いずれの自己抗体も有意な差を認めなかった (Figure 53).

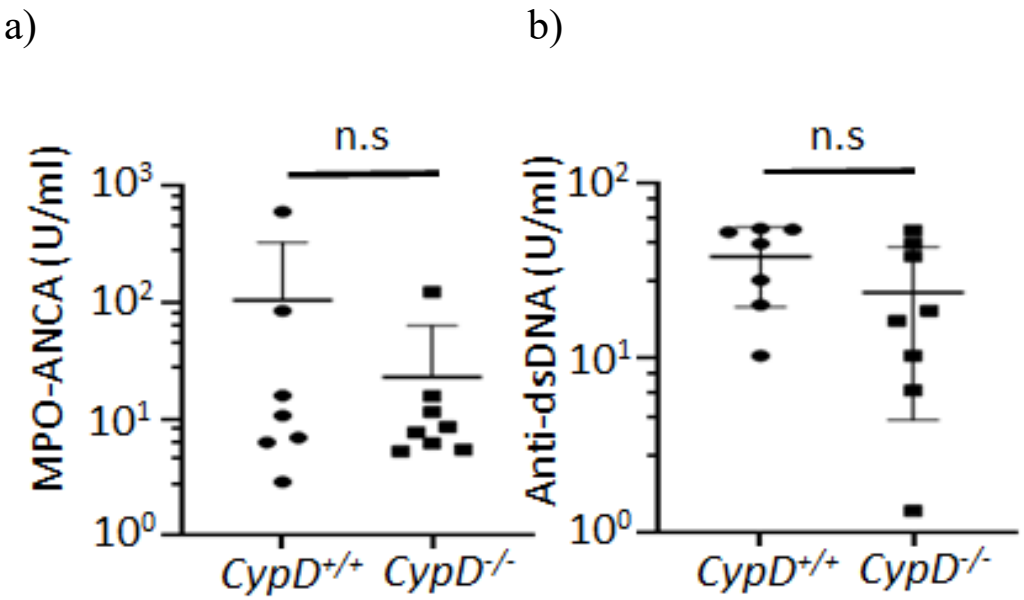


Figure 53. MPO-ANCA 抗体価と抗 dsDNA 抗体価の評価
(a) MPO-ANCA の抗体価を示した. (b) 抗 dsDNA 抗体価を対数変換した. データは平均±標準偏差で示した. *CypD*$^{+/+}$: n=7/群, *CypD*$^{-/-}$: n=8/群. n.s. = not significant. いずれの抗体価においても, *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは差がなかった.

10.3.7　生存率の検討

生後 25 日目時点の生存率を測定すると, *CypD*$^{+/+}$マウス (n=25/群) のうち n=9 が経過中に死亡した. *CypD*$^{-/-}$マウス (n=11/群) は経過中に死亡したマウスが認められず, *CypD*$^{+/+}$マウスと比較して高い生存率を示す傾向があった (Figure 54).

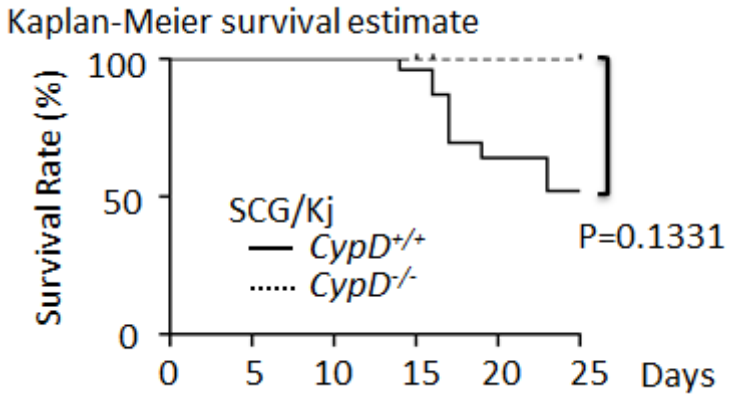


Figure 54. SCG/Kj マウスの生存率の検討 (Kaplan-Meier 曲線)
生存率を Kaplan-Meier 曲線で比較した. *CypD*$^{+/+}$: n=25/群, *CypD*$^{-/-}$: n=11/群. *CypD*$^{-/-}$マウスでは *CypD*$^{+/+}$マウスと比較し, 生存率が高い傾向にあった.

10.4　考察

本章では, AAV 自然発症モデルマウスを用いて, *CypD* 遺伝子除去効果を検証した. AAV 自然発症モデルマウスにおいて, *CypD* 欠損により腎臓, 肺の組織での壊死を抑制し, 臓器障害が軽減し, 生存率が改善する傾向がみられた. また, 組織の壊死細胞の一部が好中球であることを免疫染色により確認した. さらに, *CypD* 欠損は ANCA 値に影響を与えなかったため, 病原性自己抗体である ANCA の産生抑制を介さずに, 直接好中球内の細胞死シグナルを抑制することで局所の壊死性血管炎に対して保護的に作用したと考えられた. 第五章の ANCA 移入 AAV 誘導モデルと本章の AAV 自然発症モデルの 2 つの異なるモデルマウスにおいて, *CypD* の欠損が CypD 依存性ネクローシスの制御を介して臓器保護効果を有することが示された.

次章では, AAV の病態 (NETs 制御異常) ならびに臨床症状と共通の特徴を有する SLE に着目し, SLE 誘導モデルマウスにおける CypD の役割を検証する.

11. 第七章

TLR7 アゴニスト誘導 SLE モデルマウスに対する CypD の遺伝子除去効果の検討

11.1　緒言

SLE は自己抗体との免疫複合体が全身性に炎症を引き起こし, 臨床的には急速進行性糸球体腎炎や肺出血等の AAV と共通の特徴を有する重篤な自己免疫疾患である (Fava and Petri, 2019). また, その病態に NETs が深く関与し, NETs を分解するデオキシリボヌクレアーゼの遺伝子欠損や質的異常, ならびに自己抗体による抑制作用により, NETs-DNA を分解できないことが抗核抗体や抗 DNA 抗体の出現, ループス腎炎に関与することが報告された (Hakkim et al., 2010). 一方, ANCA とは異なり, SLE に特徴的な抗 ds-DNA 抗体などの自己抗体は, 好中球 NETs 誘導への影響は少ないと考えられていた (Nakazawa et al., 2014). しかしその後, 自己抗体単独では NETs を誘導できないが, 抗原と結合した免疫複合体が NETs を誘導することがわかり, さらにこの SLE-NETs は ANCA 誘導の DAMPs を放出する細胞溶解型 NETs とは異なり, 細胞の形態が保たれ周囲への cytotoxic な影響よりも IFN signature を介した向炎症性シグナルを誘導する特徴を有していることがわかった (Lood et al., 2016). これらの知見から, 類似した自己免疫疾患でも NETs 誘導のメカニズムが異なり, 作用や病態に与える影響も異なる可能性がある.

これまでの章では, AAV モデルマウスにおいて *CypD* 欠損が好中球 NETs や壊死を抑制して血管炎症状を改善することを示したが, 本章では, ANCA-NETs とは異なる特徴の NETs を有する SLE に着目し, CypD の SLE に与える影響を検証した. SLE モデルマウスには, Toll-like Receptor (TRL) 7 のアゴニストである Imiquimod (IMQ) を塗布することで SLE を発症させる SLE 誘導モデルマウスを用いた.

11.2　方法

11.2.1　SLE の誘導

5%イミキモドクリーム (IQM) (Mochida Pharmaceutical) 1.25mg もしくはコントロールとしてワセリンクリーム (Kenei Pharmaceutical) を 7 週齢の雌の *CypD*$^{+/+}$ マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスの右耳に週 3 回 8 週間塗布し, SLE を発症させ(Yokogawa et al., 2014), 解剖した (コントロール群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=8/群, IQM 群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=9/群) .

11.2.2　脾臓の評価

解剖時に脾臓を採取し, 長径と重量を測定した.

11.2.2　生化学検査

屠殺前に末梢血を採取し,血清中の Blood urea nitrogen (BUN) は BUN kit を用いて測定した.

11.2.3　尿検査

屠殺前に代謝ケージを用いて蓄尿を行い, 血尿は dipstick を用いて評価した. 尿中アルブミンは LBIS Mouse Albumin ELISA Kit を用いて測定し, 尿中クレアチニンは Creatinine kit を用いて測定した.

11.2.4　血清 DNA の測定

血清中の NETs を含む死細胞由来の可溶性 DNA は QuantiDluor dsDNA System (Promega) を用いて評価した.

11.2.5　血清抗 dsDNA 抗体値の測定

屠殺前に末梢血を採取し, 自己抗体である血清抗 dsDNA 抗体値の測定は, LBIS Mouse Anti-dsDNA ELISA Kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いて測定した.

11.2.6　腎組織に対する PAS 染色と TUNEL 染色

解剖時に腎臓を採取した. 9.2.2.3 と同様に固定後, パラフィン包埋切片と凍結切片を作成した. 各群から無作為に選んだ 4 つサンプルの腎組織切片で各染色を行った. パラフィン包埋切片で PAS 染色を行い, 切片上の全ての糸球体を観察し, 糸球体腎炎 (基底膜の肥厚・毛羽立ち, 管内細胞増殖) を認める糸球体の割合を評価した. 腎臓の組織障害は TUNEL 染色で評価した. TUNEL 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, 死細胞を定量評価した.

11.2.7　IgG 免疫染色

Lupus 腎炎発症を腎組織の IgG 免疫染色で評価した. IgG 染色は凍結切片を 3% BSA でブロッキングし, 200 倍に希釈した goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488 (Abcam) を滴下し, 遮光下の室温で 1 時間インキュベートした. 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. IgG 陽性域は, 1 つの糸球体あたり 3 視野 (倍率 400 倍) をランダムに撮像し, ImageJ software にて mean luminance value を測定して定量評価した.

11.2.8　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 JMP®を用いて行った.

11.3　結果

11.3.1　脾臓の大きさと重量の検討

IMQ クリーム群では脾腫を認め, IMQ クリーム群では control クリーム群と比較し, 脾臓重量が有意に増加していた (Figure 55, 56). また, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群を比較し, 脾臓重量は有意な差を認めなかった.

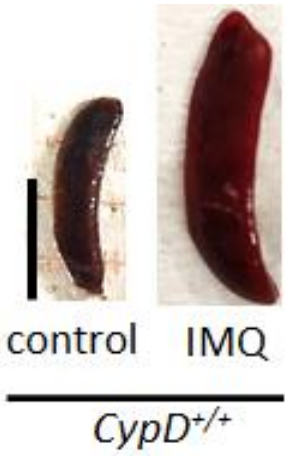


Figure 55. 脾臓の大きさの検討
脾臓の肉眼的所見を示した. Scale bar: 5mm. control クリームを塗布したものと IMQ クリームを塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスの脾臓の肉眼的所見を示す. IMQ クリームを塗布したマウスでは脾臓が大きかった.

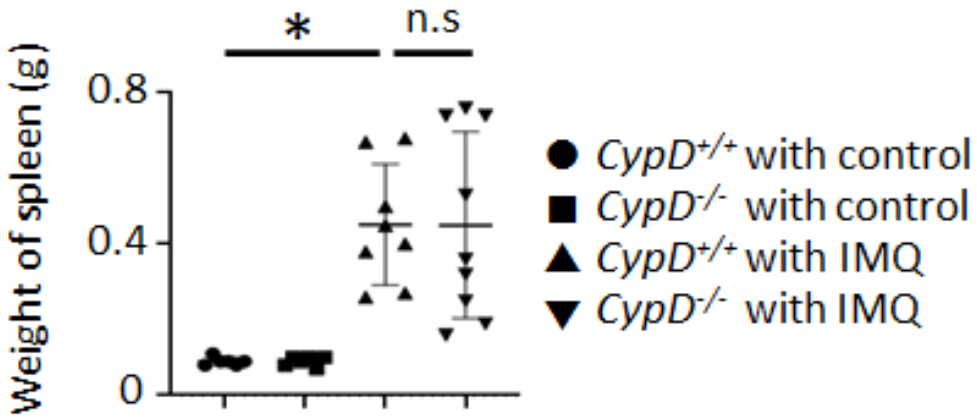


Figure 56. 脾臓の重量の評価

各群の脾臓の重量を示した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=8/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=9/群. *p<0.05. n.s. = not significant. *CypD*$^{+/+}$マウスにおいて, control クリームを塗布したものと比較し, IMQ クリームを塗布したマウスは有意に重量が重かった. IMQ クリーム塗布群で比較すると, *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは差がなかった.

11.3.2　腎機能および尿所見の検討

腎機能の指標である血清 BUN 値は, IMQ クリーム群と control クリーム群を比較し, 有意な差を認めなかった. また, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群を比較し, 腎機能は有意な差を認めなかった (Figure 57). また, 血尿は全てのマウスにおいて認めなかった.

IMQ クリーム群では control クリーム群と比較し, 尿中アルブミンは有意に増加していた (Figure 58). また, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群を比較し, 尿中アルブミンは有意な差を認めなかった.

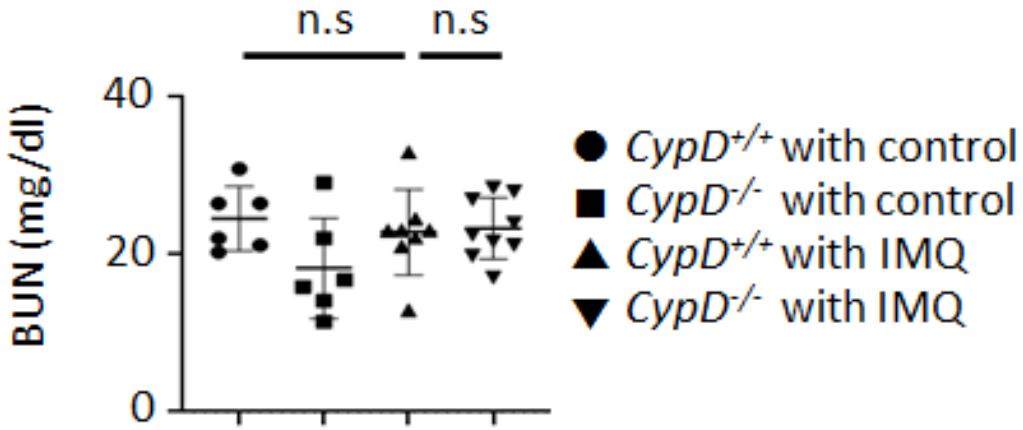


Figure 57. 腎機能の評価

各群の BUN を示した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=8/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=9/群. n.s. = not significant. *CypD*$^{+/+}$マウスにおいて, control クリームを塗布したものと比較し, IMQ クリームを塗布したマウスは BUN に差はなかった. IMQ クリーム塗布群で比較すると, *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは差がなかった.

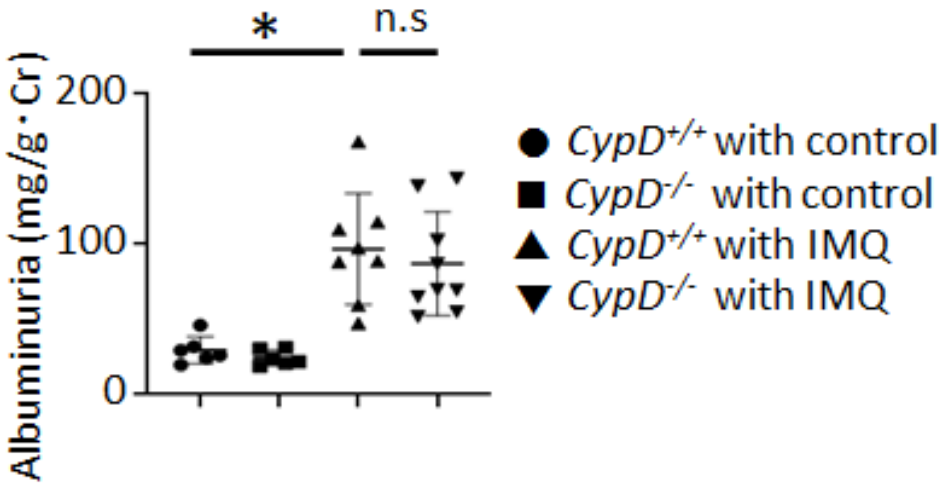


Figure 58. 尿中アルブミンの評価
各群の尿中アルブミンを示した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=8/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=9/群. *p<0.05. n.s. = not significant. *CypD*$^{+/+}$マウスにおいて, control クリームを塗布したものと比較し, IMQ クリームを塗布したマウスは尿中アルブミンが有意に増加していた. IMQ クリーム塗布群で比較すると, *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは差がなかった.

11.3.3　循環血液中の NETs の検討

血清中の NETs を含む死細胞由来の可溶性 DNA は, IMQ クリーム群では control クリーム群と比較し，有意に高値であった (Figure 59). また, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群で比較すると，可溶性 DNA は有意な差を認めなかった.

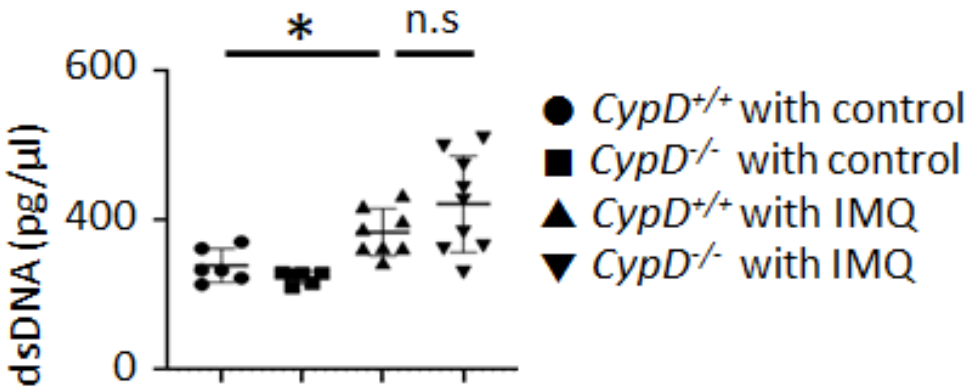


Figure 59. 血清 DNA による循環 NETs の評価
各群の血清 DNA 値を示した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=8/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=9/群. *p<0.05. n.s. = not significant. *CypD*$^{+/+}$マウスにおいて, control クリームを塗布したものと比較し, IMQ クリームを塗布したマウスは血清 DNA が有意に増加していた. IMQ クリーム塗布群で比較すると, *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは差がなかった.

11.3.4　CypD の遺伝子除去による自己抗体産生能への影響の検討

CypD の欠損が自己抗体産生に与える影響を評価するために, 抗 dsDNA 抗体を測定した. IMQ クリーム群では control クリーム群と比較し, 抗 dsDNA 抗体価が有意に高値であった (Figure 60). また, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群で比較すると, 抗 dsDNA 抗体価は有意な差を認めなかった.

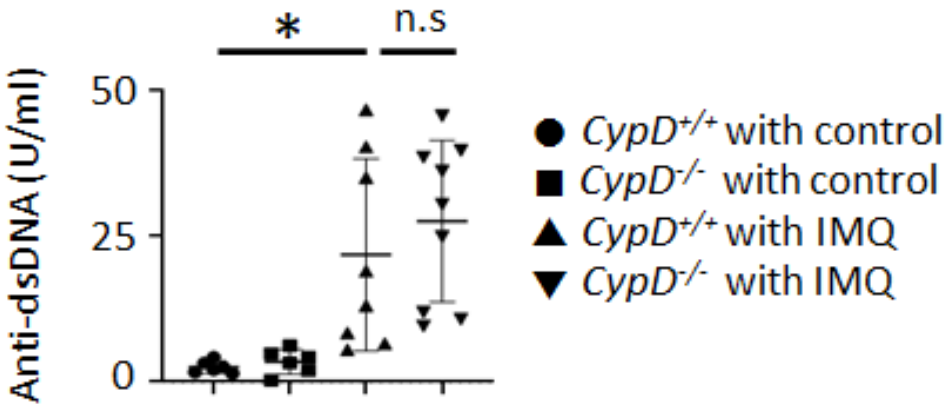


Figure 60. 抗 dsDNA 抗体の評価
各群の抗 dsDNA 抗体価を示した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=8/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=6/群, *CypD*$^{-/-}$ n=9/群. *p<0.05. n.s. = not significant. *CypD*$^{+/+}$マウスにおいて, control クリームを塗布したものと比較し, IMQ クリームを塗布したマウスの抗 dsDNA 抗体価が有意に増加していた. IMQ クリーム塗布群で比較すると, *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは差がなかった.

11.3.3　糸球体腎炎の検討

腎臓の糸球体病変を PAS 染色で評価した. control クリーム群は組織学的変化が乏しかった. IMQ クリーム群では *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群でともに基底膜の肥厚や毛羽立ちの所見を認めた (Figure 61). IMQ クリーム群において, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群を比較して腎炎に有意な差を認めなかった (Figure 62).
腎臓の IgG 免疫蛍光染色では, control クリーム群は IgG の沈着を認めなかった (Figure 63). IMQ クリーム群では *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群でともに IgG の沈着を認めた. IMQ クリーム群において, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群を比較して IgG 沈着に有意な差を認めなかった (Figure 64).

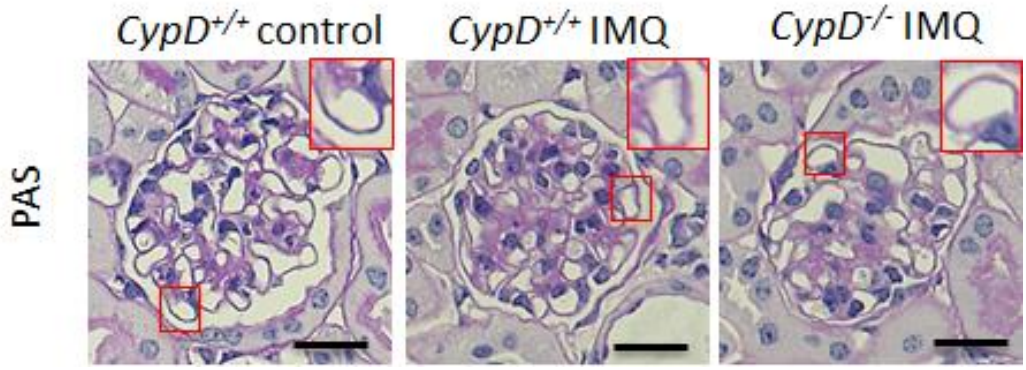


Figure 61. 腎臓の組織学的検討 (PAS 染色)

各群の組織学的変化を PAS 染色で比較した. Scale bar: 20μm. 赤枠の拡大図を右上に示す. Control クリームを塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスでは組織の変化が乏しかった. IMQ クリーム塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは, 共に糸球体基底膜の肥厚, 毛羽立ちを多数認めた.

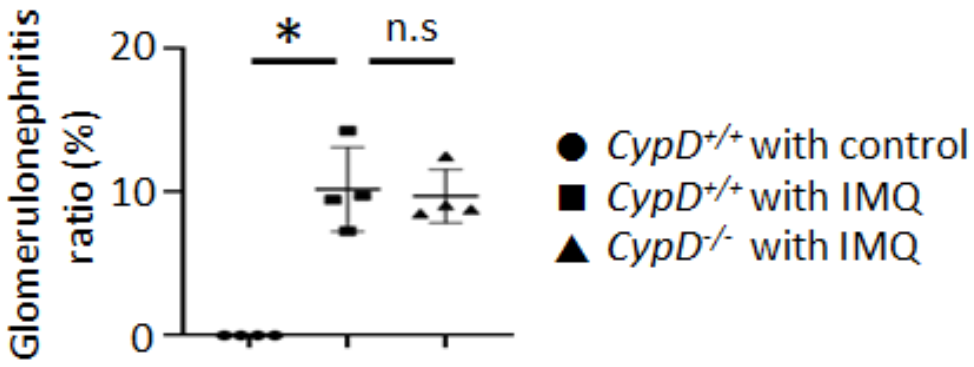


Figure 62. 腎臓の組織学的評価
各群の組織学的変化を PAS 染色で比較した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=4/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=4/群, *CypD*$^{-/-}$ n=4/群. *p<0.05. n.s. = not significant. IMQ クリーム塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスでは Control クリームを塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスと比較して有意に糸球体腎炎の割合が多かった. IMQ クリーム塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは有意な差を認めなかった.

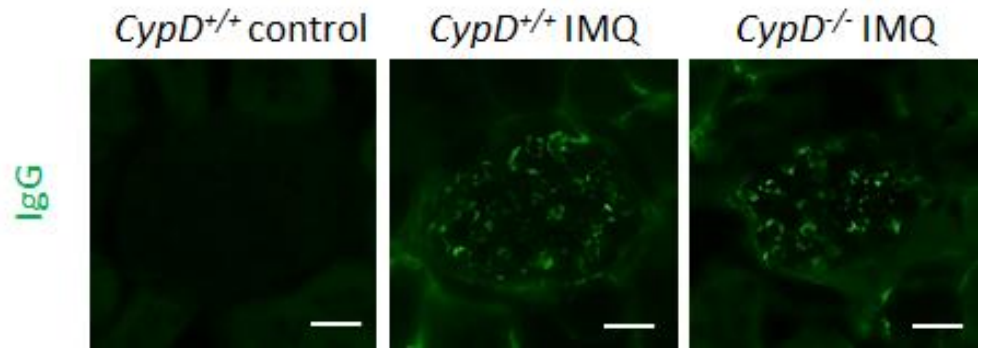


Figure 63. 腎臓の免疫蛍光染色の検討 (IgG 染色)
各群の IgG 免疫蛍光染色を比較した. 緑は IgG を示す. Scale bar: 20μm. Control クリームを塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスでは IgG の沈着が乏しかった. IMQ クリーム塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは, 基底膜に沿った IgG の沈着を多数認めた.

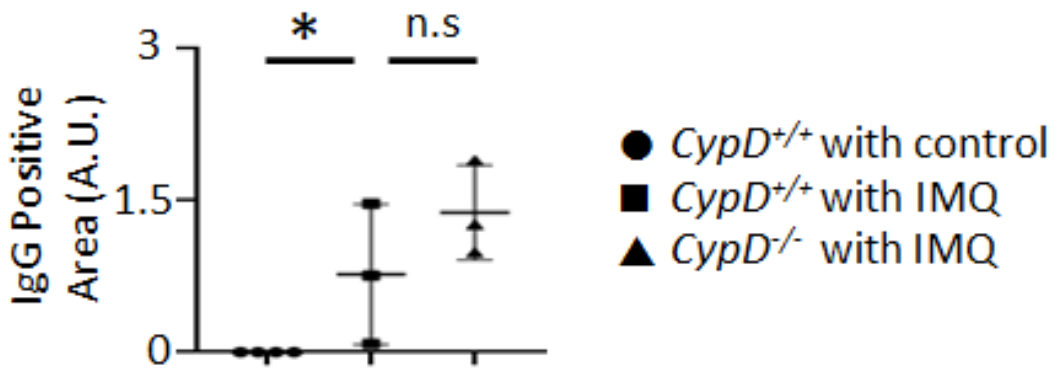


Figure 64. 腎臓の免疫蛍光染色の評価 (IgG 染色)
各群の IgG 免疫蛍光染色陽性域を比較した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=4/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=3/群, *CypD*$^{-/-}$ n=4/群. *p<0.05. n.s. = not significant. IMQ クリーム塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスでは Control クリームを塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスと比較して有意に IgG 陽性域が高かった. IMQ クリーム塗布した *CypD*$^{+/+}$マウスと *CypD*$^{-/-}$マウスでは有意な差を認めなかった.

11.3.4　腎臓における壊死細胞の検討

腎臓における壊死細胞を TUNEL 染色で評価した. いずれの群においても壊死細胞は乏しく (Figure 65), IMQ クリーム群と control クリーム群を比較し, 壊死細胞に有意な差を認めなかった (Figure 66). また, *CypD*$^{+/+}$群と *CypD*$^{-/-}$群を比較し, 壊死細胞に有意な差を認めなかった.

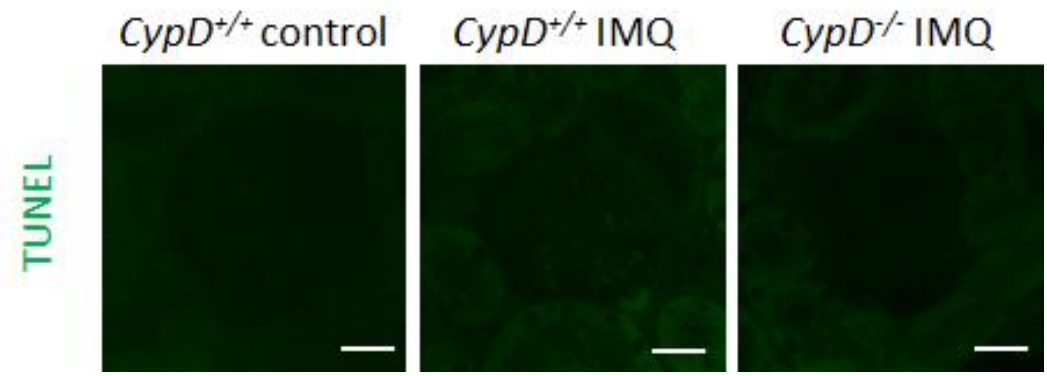


Figure 65. 腎臓の壊死細胞の検討 (TUNEL 染色)
各群の壊死細胞を TUNEL 染色で比較した. 緑は TUNEL を示す. Scale bar: 20μm.
いずれの群においても, TUNEL 陽性細胞は乏しかった.

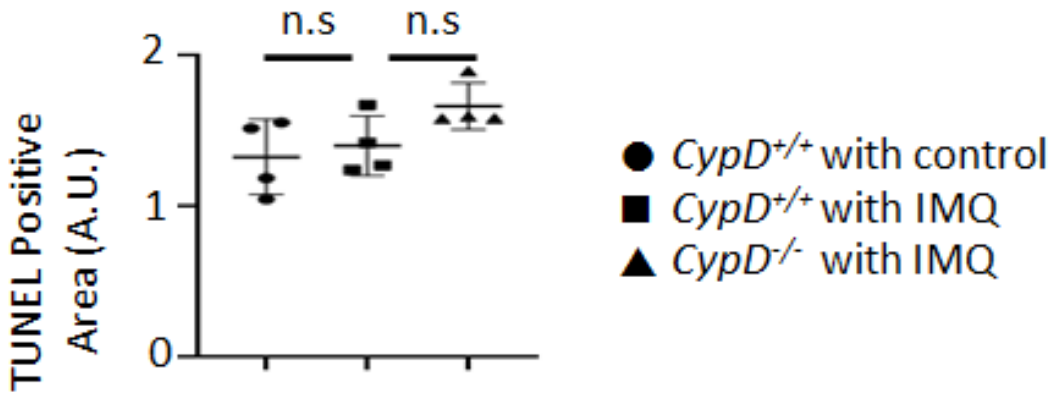


Figure 66. 腎臓の壊死細胞の評価 (TUNEL 染色)
各群の壊死細胞を TUNEL 染色で比較した. データは平均±標準偏差で示した. Control クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=4/群, IQM クリーム群; *CypD*$^{+/+}$ n=4/群, *CypD*$^{-/-}$ n=4/群. n.s. = not significant. TUNEL 陽性細胞はいずれの群においても有意な差を認めなかった.

11.4　考察

本章では, SLE 誘導モデルマウスを用いて, *CypD* 遺伝子除去の効果を検証した. IMQ クリーム群では, 脾臓の大きさや重量の増加, 尿蛋白の増加, 自己抗体の産生亢進, 循環 NETs の上昇, 糸球体腎炎の発症を認め, 既報と同様に Lupus 腎炎を伴う SLE の発症を確認した. さらに, 既報では Lupus 腎炎の病型は検討されていなかったが, 本研究では IgG 免疫蛍光染色において基底膜に沿った沈着を認めた点と, 血尿を認めず尿蛋白主体の尿所見異常を認めたことから, IMQ による SLE 誘導モデルマウスでは Lupus 腎炎V型に類似した腎炎を呈すると考えられた. *CypD* 欠損マウスにおいても SLE の発症を認めたが, $CypD^{+/+}$群と比較し, 臓器障害, 循環 NETs, 抗体産生能は有意な差を認めなかった. 抗体産生能に影響を与えなかった点は, 第六章で示した AAV 自然発症モデルマウスの結果と一致していたが, *CypD* の欠損により臓器障害, 循環 NETs に影響を与えなかった点が異なっていた. 臓器障害に関しては, SLE 誘導モデルマウスにおいて組織の壊死細胞が乏しかったように, SLE の病態は壊死ではなく免疫複合体による炎症が主体であるため, 壊死が病態の主体である AAV とは異なる結果になったと考える. また, AAV 誘導モデルマウスでは *CypD* の欠損が循環 NETs を抑制していたのに対し, SLE 誘導モデルマウスでは *CypD* の欠損が循環 NETs に影響を与えていなかった. 近年, NETs には異なる 2 つの形態が存在し, AAV-NETs は核膜・細胞膜が破綻し細胞内容物を放出する細胞溶解型 NETs で cytotoxic な特徴を有するのに対し, SLE-NETs は細胞の形態を保ったままミトコンドリア DNA を放出する非溶解型 NETs で IFN signature を介した向炎症性シグナルを誘導する特徴を有しており, それぞれで誘導されている NETs では異なるシグナル伝達経路によって制御されていることが報告された (Papayannopoulos, 2018). そのため, SLE では CypD 依存性ネクローシス経路とは別の経路により NETs が制御されているために, SLE 誘導モデルマウスにおいて *CypD* 欠損が循環 NETs を抑制しなかった可能性がある.

これらの知見から, 類似した自己免疫疾患でも NETs 誘導のメカニズムが異なり, 作用や病態に与える影響も異なる可能性がある.

12. 総合考察

本研究では, ヒト AAV の壊死性血管炎組織に CypD 依存性ネクローシス細胞を認め, この現象が in vitro の実験により, 自己抗体 ANCA により誘導される CypD を介した NETs 形成や, 血管内皮細胞傷害に起因することが示唆された. さらに in vivo の実験で CypD の役割を検証したところ, ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスでは *CypD* の欠損により NETs 形成, 組織の壊死病変ならびに臓器障害が軽減し, ANCA 産生 AAV 自然発症モデルマウスにおいても *CypD* の欠損により臓器病変が改善した. しかし, 病原性自己抗体 ANCA の産生低下は見られず, CypD の獲得免疫系への影響は少ないことが示唆された. 一方, 他の全身性自己免疫疾患である SLE では, ヒト腎生検検体において壊死病変が乏しく, TRL7 アゴニスト誘導 SLE モデルマウスにおいても, NETs 形成や壊死病変が乏しく, *CypD* の欠損が SLE モデルマウスに与える影響も見られなかった. 以上より, CypD は自己免疫病態の中でも, NETs がエフェクターとして作用する壊死病態が特徴である AAV に関与し, さらに CypD を制御することは, 自己抗体の産生抑制を介さずに直接好中球内の細胞死シグナルを抑制することで, 局所の壊死性血管炎に対して保護的に働く可能性が示唆された.

NETs を引き起こすシグナル経路としては, RIPK3, MLKL, PADI4 の関与が知られており (D'Cruz et al., 2018), 中でも PAD4 は細胞内の ROS の増加により活性化され, ヒストンのシトルリン化を引き起こすことでクロマチンが脱凝縮し, NETs 成分を放出する機序が想定されている (Li et al., 2010). 本研究では CypD 阻害は PAD4 依存性 CitH3 に影響せずに NETs 形成を抑制したことから, ANCA 誘導 NETs のシグナル経路は, PAD4 によるクロマチン脱凝縮の下流に CypD 依存性ネクローシスの経路が存在する, もしくは PAD4 と CypD の経路はそれぞれ独立しているということが示唆されるが、いずれの場合も核膜・細胞膜の破綻の最終的な実行には CypD による mPTP の開口が必要であると考えられた. また, 好中球 RNA-seq により, ANCA 誘導好中球内のシグナルには特異的な免疫活性経路が関与していた一方で, NETs 関連分子である RIPK3, MLKL, PAD4 や本研究で着目した CypD そのものの遺伝子の発現変動は見られなかったことから, これらのシグナルはリン酸化やシトルリン化などの翻訳後修飾の影響を大きく受けることが示唆された.

現在 AAV に用いられている免疫抑制治療は, 自己抗体の産生抑制など病態の上流を制御することはできるが, AAV の臓器で起きている壊死性血管炎による組織障害を抑えることはできないため, 腎不全や神経障害などの臓器障害が残

存してしまうことに加えて, 強力な免疫抑制による感染症などの副作用関連死が多いことが問題となっている. そのため, AAV の病態の下流である血管の壊死の進行を抑制することができれば, さらなる免疫抑制を起こさずに, 既存の免疫抑制治療とは異なるアプローチで病態の改善や臓器保護に繋がる可能性がある. 現在 CypD 阻害作用を有する薬剤として CsA が存在するが, カルシニューリンの活性化を阻害することで T 細胞を抑制する効果を主目的として自己免疫疾患に対してすでに臨床使用されている. 血管炎においても有効であった報告はあるが (Haubitz et al., 1998) (Ghez et al., 2002), AAV は自己抗体産生 (B 細胞) と関連が強いとされている点や, CsA の腎機能障害を引き起こす有害作用のために, 発症時にはすでに重度の腎機能障害を認めることが多い AAV では使用しにくいという点から, 臨床の現場では AAV に対して使用される機会は少なく, 臨床でのエビデンスは乏しい. そのため, 選択的に CypD を阻害することで免疫抑制効果を伴わず, 有害作用の少ない CypD 阻害薬が望まれる.

本研究で用いたマウスは全身の *CypD* 欠損マウスであり, 好中球特異的に *CypD* を欠損していないため, 壊死性血管炎の病態に好中球以外にも免疫系の細胞などが関与した可能性がある. しかし, AAV で起こる血管内皮傷害に CypD 依存性ネクローシスが関与していたことから, 血管炎に関連する各細胞のネクローシスに CypD が影響していることが考えられた. また, CypD 阻害薬が CypD の遺伝子除去と同様の臓器保護効果をもたらすかどうかは今後の検討課題である.

以上より, CypD を標的とした治療は, 壊死の影響の少ない自己免疫疾患には効果が乏しい可能性があるが, 壊死病態が中心である AAV では過剰な免疫抑制を起こさずに, 病態改善, さらには臓器保護効果をもたらす新たな治療標的として期待される.

13. 結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである.

・ヒト AAV の腎病変において, CypD 依存性壊死細胞を認めた.
・ヒト ANCA 誘導 NETs は CypD 依存性ネクローシス経路に制御され, CypD 阻害薬は ANCA 誘導 NETs の形成を阻害した.
・マウス ANCA 誘導 NETs は CypD 依存性ネクローシス経路に制御され, *CypD* 遺伝子除去は ANCA 誘導 NETs の形成を阻害した.
・CypD 阻害薬は, ANCA 誘導 NETs による血管内皮細胞傷害を抑制した.
・CypD の遺伝子除去は AAV 誘導モデルマウスの循環 NETs ならびに組織の壊死を減少させ, 臓器障害を軽減した.
・CypD の遺伝子除去は AAV 自然発症モデルマウスにおいて, ANCA 産生の抑制を介さずに, 壊死性血管炎の臓器障害を軽減した.
・CypD の遺伝子除去は SLE 誘導発症モデルマウスにおいて, 循環 NETs ならび自己抗体産生に影響せず, 臓器障害を軽減しなかった.

第一章では, ヒト AAV の壊死病変において CypD 依存性ネクローシスの関与を示し, さらにヒト好中球において ANCA 誘導 NETs が CypD 依存性ネクローシス経路に関係し, CypD 阻害薬は ANCA 誘導 NETs の形成を抑制することが第二章で実証された. そしてマウス好中球において ANCA 誘導 NETs の形成が CypD の遺伝子除去により抑制されることを形態学的, シグナル伝達経路の両面から示した. また CypD 阻害薬は, ANCA 誘導 NETs による血管内皮細胞傷害に対して保護効果を発揮することを第四章で示し, 第五章では ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスにおいて, 第六章では ANCA 産生 AAV 自然発症モデルマウスにおいて, CypD の遺伝子除去が臓器保護に繋がったことが示された. 最後に SLE 誘導モデルマウスにおいて, CypD の遺伝子除去が臓器保護に繋がらなかったことから, CypD の制御は自己免疫疾患の中でも壊死病態が特徴である AAV において有用である可能性が示唆された. 以上から, 本研究は CypD 依存性ネクローシスが AAV の病態に深く関与しており, CypD の制御は AAV の壊死病態を改善する新たな治療薬の候補となりうることを示した.

現在 AAV に用いられている免疫抑制治療は, 病態の上流を制御することが中心であるために, AAV の臓器で起きている壊死性血管炎による組織障害を抑えることはできず, 腎不全や神経障害などの臓器障害が残存してしまうことに加え

て, 強力な免疫抑制による感染症などの副作用関連死が多いことが問題となっている. そのため, AAV の病態の下流を標的にした治療であれば血管の壊死の進行を抑制することで, 既存の免疫抑制治療とは異なるアプローチで病態の改善や臓器保護に繋がる可能性がある. 現在臨床で使用されている CypD 阻害作用を有する薬剤はカルシニューリンの活性化を阻害する作用もあるため, 有害作用の懸念がある. 選択的に CypD を阻害することで免疫抑制効果を伴わず, 有害作用の少ない CypD 阻害薬の研究が望まれる. また, CypD 阻害薬が CypD の遺伝子除去と同様の臓器保護効果をもたらすかどうかは今後の検討課題である.

14. 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, 本研究の機会を与えていただき, その遂行にあたって終始, 御指導をいただきました. ここに深謝の意を表します. また, 同教室助教 中沢大悟先生には本研究の立ち上げから, 実験計画, 方法, 考察の組み立てに至るまで終始, 丁寧かつ熱心に御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, 御指導ならびに御助言をいただきました. 深く感謝いたします.

本教室診療准教授 西尾妙織先生には, 恵まれた実験環境を提供してしていただき, さらに研究カンファレンスで有益な御助言をいただきました. ここに深く感謝の意を表します.

また本分野助教 Olga Amengual 先生には, 海外学会を想定した英語でのプレゼンテーション, 討論に関して多くの御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

楠加奈子先生, 保健科学研究院病態解析学分野講師 益田紗季子先生, 札幌医科大学大学院医学研究科臨床免疫学講師 神田真聡先生には, 研究を遂行するにあたり多くの御助言, 御指導をいただきました. ここに深謝いたします.

本学院生 麻生里佳先生, 上田雄翔先生には, 同じ大学院生の仲間として, 研究遂行にあたり日頃より有益な御助言をいただきました. 心より感謝申し上げます.

また, 当時腎グループ実験助手として勤務されていた福士なつ美さん, 石塚えりさん, 現実験助手の島田和子さんは日々円滑に実験ができるよう御協力いただき, 深謝いたします.

この他にもこの論文作成にあたり, ここに書き切れないほど多くの御協力, 御支援をいただきました. 重ねまして心より感謝申し上げます.

最後に, いつも温かく成長を見守ってくれた両親, そしてどんなときも理解を示し支え続けてくれた妻に心から感謝致します.

15.　利益相反

開示すべき利益相反状態はない.

16. 引用文献

Al-Hussain, T., Hussein, M.H., Conca, W., Al Mana, H., and Akhtar, M. (2017). Pathophysiology of ANCA-associated Vasculitis. Advances in anatomic pathology *24*, 226-234.

Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Suzuki, K., Kura, F., and Maeda, N. (1999). Severe impairment in early host defense against Candida albicans in mice deficient in myeloperoxidase. Infection and immunity *67*, 1828-1836.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W.*, et al.* (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature *434*, 658-662.

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 (New York, NY) *303*, 1532-1535.

D'Cruz, A.A., Speir, M., Bliss-Moreau, M., Dietrich, S., Wang, S., Chen, A.A., Gavillet, M., Al-Obeidi, A., Lawlor, K.E., Vince, J.E.*, et al.* (2018). The pseudokinase MLKL activates PAD4-dependent NET formation in necroptotic neutrophils. Science signaling *11*.

Davis, T.L., Walker, J.R., Campagna-Slater, V., Finerty, P.J., Paramanathan, R., Bernstein, G., MacKenzie, F., Tempel, W., Ouyang, H., Lee, W.H.*, et al.* (2010). Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. PLoS biology *8*, e1000439.

Fava, A., and Petri, M. (2019). Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. Journal of autoimmunity *96*, 1-13.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. The Journal of cell biology *176*, 231-241.

Ghez, D., Westeel, P.F., Henry, I., Pruna, A., Fournier, A., and Lassoued, K. (2002). Control of a relapse and induction of long-term remission of Wegener's granulomatosis by cyclosporine. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation *40*, E6.

Grayson, P.C., and Kaplan, M.J. (2016). At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune

diseases. Journal of leukocyte biology *99*, 253-264.
Hakkim, A., Fürnrohr, 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 9813-9818.
Haubitz, M., Koch, K.M., and Brunkhorst, R. (1998). Cyclosporin for the prevention of disease reactivation in relapsing ANCA-associated vasculitis. Nephrol Dial Transplant *13*, 2074-2076.
Hope, H.R., Remsen, E.E., Lewis, C., Jr., Heuvelman, D.M., Walker, M.C., Jennings, M., and Connolly, D.T. (2000). Large-scale purification of myeloperoxidase from HL60 promyelocytic cells: characterization and comparison to human neutrophil myeloperoxidase. Protein expression and purification *18*, 269-276.
Ishikita, A., Matoba, T., Ikeda, G., Koga, J., Mao, Y., Nakano, K., Takeuchi, O., Sadoshima, J., and Egashira, K. (2016). Nanoparticle-Mediated Delivery of Mitochondrial Division Inhibitor 1 to the Myocardium Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondria Outer Membrane Permeabilization: A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction. Journal of the American Heart Association *5*.
Jackson, S.P., and Schoenwaelder, S.M. (2010). Procoagulant platelets: are they necrotic? Blood *116*, 2011-2018.
Jennette, J.C., and Falk, R.J. (1997). Small-vessel vasculitis. The New England journal of medicine *337*, 1512-1523.
Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2014). Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. Nat Rev Rheumatol *10*, 463-473.
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 and rheumatism *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 international *88*, 764-775.
Justiz Vaillant, A.A., Goyal, A., Bansal, P., and Varacallo, M. (2020). Systemic Lupus Erythematosus (SLE). In StatPearls (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.).
Kallenberg, C.G. (2011). Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. Annals of the rheumatic diseases *70 Suppl 1*, i59-63.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 3413-3417.
Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. The Journal of experimental medicine *207*, 1853-1862.
Little, M.A., Nightingale, P., Verburgh, C.A., Hauser, T., De Groot, K., Savage, C., Jayne, D., and Harper, L. (2010). Early mortality in systemic vasculitis: relative contribution of adverse events and active vasculitis. Annals of the rheumatic diseases *69*, 1036-1043.
Lood, C., Blanco, L.P., Purmalek, M.M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S.S., Smith, C.K., Malech, H.L., Ledbetter, J.A., Elkon, K.B., and Kaplan, M.J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. Nature medicine *22*, 146-153.
Masuda, S., Shimizu, S., Matsuo, J., Nishibata, Y., Kusunoki, Y., Hattanda, F., Shida, H., Nakazawa, D., Tomaru, U., Atsumi, T.*, et al.* (2017). Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology *91*, 822-829.
Mulay, S.R., Linkermann, A., and Anders, H.J. (2016). Necroinflammation in Kidney Disease. Journal of the American Society of Nephrology : JASN *27*, 27-39.
Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature *434*, 652-658.
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. Journal of the American Society of Nephrology : JASN *28*, 1753-1768.
Nakazawa, D., Masuda, S., Tomaru, U., and Ishizu, A. (2019). Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. Nat Rev Rheumatol *15*, 91-101.
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. Journal of the American Society of Nephrology : JASN *25*, 990-997.
Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M., and Ishizu, A. (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 and rheumatism *64*, 3779-3787.

Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nature reviews Immunology *18*, 134-147.

Puéchal, X., Pagnoux, C., Perrodeau, É., Hamidou, M., Boffa, J.J., Kyndt, X., Lifermann, F., Papo, T., Merrien, D., Smail, A.*, et al.* (2016). Long-Term Outcomes Among Participants in the WEGENT Trial of Remission-Maintenance Therapy for Granulomatosis With Polyangiitis (Wegener's) or Microscopic Polyangiitis. Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ) *68*, 690-701.

Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S.*, et al.* (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. Cell host & microbe *12*, 109-116.

Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., and Korsmeyer, S.J. (2005). Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 12005-12010.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *114*, E9618-e9625.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. Developmental cell *2*, 55-67.

Soria González, J.E., and Orea Solano, M. (2002). [Apoptosis]. Revista alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993) *49*, 121-128.

Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. Cellular microbiology *8*, 668-676.

Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nature reviews Molecular cell biology *15*, 135-147.

Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsirka, S.E., Holzmann, S., and Moll, U.M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. Cell *149*,

1536-1548.
Watanabe-Kusunoki, K., Nakazawa, D., Kusunoki, Y., Kudo, T., Hattanda, F., Nishio, S., Masuda, S., Tomaru, U., Kondo, T., Atsumi, T.*, et al.* (2020). Recombinant thrombomodulin ameliorates autoimmune vasculitis via immune response regulation and tissue injury protection. Journal of autoimmunity *108*, 102390.
Xiao, H., Heeringa, P., Hu, P., Liu, Z., Zhao, M., Aratani, Y., Maeda, N., Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2002). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. The Journal of clinical investigation *110*, 955-963.
Yates, M., Watts, R.A., Bajema, I.M., Cid, M.C., Crestani, B., Hauser, T., Hellmich, B., Holle, J.U., Laudien, M., Little, M.A.*, et al.* (2016). EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. Annals of the rheumatic diseases *75*, 1583-1594.
Yokogawa, M., Takaishi, M., Nakajima, K., Kamijima, R., Fujimoto, C., Kataoka, S., Terada, Y., and Sano, S. (2014). Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ) *66*, 694-706.