



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗原の変化が抗好中球細胞質抗体や抗糸球体基底膜抗体の検出と自己免疫病態に及ぼす影響〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	西端, 友香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	乙第7180号
Issue Date	2023-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90219
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Nishibata_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）

氏名：西 端 友 香

審査委員	主査 教授	山口 博之
	副査 教授	石津 明洋
	副査 准教授	田村 彰吾
	副査 准教授	外丸 詩野（北海道大学病院）

学位論文題名

抗原の変化が抗好中球細胞質抗体や抗糸球体基底膜抗体の検出と自己免疫病態に及ぼす影響

当審査は 2023 年 4 月 18 日実施の公開発表にて行われた。（出席者 13 名）

抗好中球細胞質抗体（anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA）は好中球細胞質抗原を認識する病原性自己抗体であり、主な抗原はミエロペルオキシダーゼとプロテイナーゼ 3 である。抗糸球体基底膜（glomerular basement membrane: GBM）抗体が認識する主要なエピトープは糸球体および肺胞の基底膜を構成する IV 型コラーゲン {type IV collagen: Col(IV)} の $\alpha 3$ サブユニット非コラーゲンドメイン、 $\alpha 3$ (IV)NC1 に存在する。NC1 ドメインの六量体形成によって立体構造的に分子内に潜在している GBM 抗原のエピトープは、同六量体が解離することにより表出し、抗体と結合する。本論文では、ANCA 抗原および GBM 抗原の変化が ANCA や抗 GBM 抗体の検出と自己免疫病態へ与える影響について、3 つの視点からの検討を行っている。

第 1 章では、間接蛍光抗体法の ANCA 検出基板における好中球固定法の違いによる抗原性の変化について検討された。ANCA の検出には間接蛍光抗体法（indirect immunofluorescence: IIF）や酵素免疫測定法（enzyme immunoassay: EIA）が用いられてきた。精度の向上により、近年は EIA が ANCA 検出のゴールドスタンダードとなっているが、EIA では固相化された抗原以外を認識する ANCA は検出できないため、IIF の必要性は失われていない。IIF ではエタノール固定もしくはホルマリン固定した好中球を基板として用いる。エタノール固定には推奨プロトコールがあるが、ホルマリン固定には推奨プロトコールがない。そこで、いくつかのホルマリン固定プロトコールについて、保存期間が基板の細胞数、抗原分布および抗原性にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とし、エタノール固定の推奨プロトコールならびに、既報およびオリジナルのホルマリン固定プロトコールに従って ANCA-IIF 用好中球基板を作製した。作製直後、2 週間後、1 か月後、2 か月後に ANCA-IIF を施行し、細胞数、抗原分布および抗原性を解析した。その結果、細胞数および抗原分布は固定法によらず 2 か月間変化がなかったが、抗原性にはプロトコール依存的な経時的減衰が認められた。

第 1 章の検討により、経時的な抗原性の減衰は ANCA-IIF の判定に影響を及ぼす恐れがあり、抗体価評価の際には注意が必要であることが喚起された。

第 2 章では、治療抵抗性抗糸 GBM 病の抗 GBM 抗体が認識するエピトープについて検討された。抗 GBM 抗体が認識する主要なエピトープは $\alpha 3$ (IV)NC1 である。抗 GBM 病は、通常は単回発症

(single attack: SA) の経過をとり、治療抵抗性を示し再燃を繰り返す (repeat relapse: RR) ことは稀である。そこで、RR 患者と SA 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープの違いを明らかにすることを目的とし、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 正常腎組織切片の免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) と、リコンビナントヒト $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ を用いたウェスタンブロッティングを実施した。RR 患者の IgG を一次抗体とした IHC は、SA 患者の IgG を一次抗体とした IHC で観察された染色像とは異なる染色像を呈した。ウェスタンブロッティングでは、RR 患者の IgG は whole の $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ に相当する 56.8 kDa の抗原以外に 18 kDa の抗原にも反応した。 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ をプロテアーゼで消化すると 56.8 kDa のバンドは消失したが、18 kDa のバンドは消失しなかった。また、市販の抗 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ モノクローナル抗体では 18 kDa のバンドは検出されなかった。

第 2 章の検討により、RR 患者の IgG は、SA 患者や抗 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ モノクローナル抗体が認識するエピトープとは異なる GBM エピトープを認識しており、それが臨床経過の違いに反映されている可能性が示唆された。

第 3 章では、ANCA に続き抗 GBM 抗体が産生されるメカニズムについて検討された。ANCA 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis: AAV) は抗 GBM 病を合併することがある。本章では、AAV における抗 GBM 抗体産生メカニズムを明らかにすることを目的とした。ANCA により活性化された好中球から放出されるエラスターゼなどのプロテアーゼが AAV の病態形成に関与することが知られている。そこで、FFPE 正常腎組織切片と Col (IV) を好中球エラスターゼなどのプロテアーゼで消化し、 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ が表出するかどうかを IHC と enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて検討した。次に、AAV 患者などの腎病変部における $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ の表出と CD11c 陽性マクロファージの浸潤を IHC および蛍光抗体法により評価した。最後に、AAV モデルラットの抗 GBM 抗体産生を ELISA で評価した。その結果、FFPE 正常腎組織切片と Col (IV) をプロテアーゼで消化することにより $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ が表出した。 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ の表出は原因疾患によらず硬化糸球体で認められたが、 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ 近傍に浸潤する CD11c 陽性マクロファージは AAV に特徴的であった。一部の AAV ラットでは、ANCA に続いて抗 GBM 抗体が産生された。IHC では、障害された腎組織中に $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ が検出され、その近傍に CD11c 陽性マクロファージが浸潤していることが確認された。

第 3 章の検討により、AAV において、ANCA によって活性化された好中球から放出されるプロテアーゼが Col (IV) を消化して糸球体の $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ を表出させ、CD11c 陽性マクロファージが GBM エピトープを提示し、最終的に免疫系が抗 GBM 抗体を産生することが示唆された。本研究は AAV における抗 GBM 抗体産生に分子間エピトープ拡散 intermolecular epitope spreading が関与すること示唆した初めての研究である。

これを要するに、著者は抗原の変化が病原性自己抗体の検出結果並びに自己免疫病態へ影響を与えることについての新知見を得たものであり、AAV や抗 GBM 病において、自己抗体が認識する抗原エピトープの違いや産生される自己抗体の種類の増加が病態の重症化や修飾に関与することを示唆した点、保健科学に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (保健科学) の学位を授与される資格あるものと認める。