



Title	ANCA関連血管炎におけるNrf2を介した抗酸化ストレス応答の役割
Author(s)	上田, 雄翔
Description	配架番号 : 2975
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16882号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16882
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99727
Type	doctoral thesis
File Information	UEDA_Yusho.pdf, 全文



学 位 論 文

ANCA 関連血管炎における Nrf2 を介した
抗酸化ストレス応答の役割

(The role of Nrf2-Mediated Antioxidant Response
in the pathogenesis of ANCA associated vasculitis)

2 0 2 6 年 3 月

北 海 道 大 学

上田 雄翔

Ueda Yusho

学 位 論 文

ANCA 関連血管炎における Nrf2 を介した
抗酸化ストレス応答の役割

(The role of Nrf2-Mediated Antioxidant Response
in the pathogenesis of ANCA associated vasculitis)

2 0 2 6 年 3 月

北 海 道 大 学

上田 雄翔

Ueda Yusho

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.....	8 頁
5. 第一章 ヒト AAV における Nrf2 を介した抗酸化応答系の関与.....	10 頁
5.1 緒言.....	11 頁
5.2 対象.....	13 頁
5.3 方法.....	14 頁
5.3.1 NQO1 染色.....	14 頁
5.3.2 統計学的解析.....	14 頁
5.4 結果.....	14 頁
5.4.1 AAV の ROS の関与.....	14 頁
5.5 考察.....	17 頁
6. 第二章 ヒト好中球における ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 活性化薬の効果 の検討.....	18 頁
6.1 緒言.....	19 頁
6.2 方法.....	20 頁
6.2.1 ヒト好中球の分離.....	20 頁
6.2.2 Immunoglobulin G (IgG)の抽出.....	20 頁
6.2.3 NETs 誘導と評価.....	20 頁
6.2.4 Sytox Green 染色.....	20 頁
6.2.5 DCFH-DA 染色.....	21 頁
6.2.6 NQO1 免疫染色.....	21 頁
6.2.7 PADI4/CitH3 免疫染色.....	21 頁
6.2.8 統計学的解析.....	21 頁
6.3 結果.....	22 頁
6.3.1 ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 活性化薬の効果.....	22 頁
6.3.2 ANCA 誘導 NETs における細胞内 ROS に対する Nrf2 の関与.....	24 頁
6.3.3 NETs 形成シグナルにおける Nrf2 活性化の影響.....	27 頁
6.4 考察.....	29 頁
7. 第三章 Nrf2 欠損好中球を用いた ANCA 誘導 NETs 形成の解析.....	30 頁
7.1 緒言.....	31 頁
7.2 方法.....	32 頁
7.2.1 マウス好中球の分離.....	32 頁
7.2.2 NETs 誘導と評価.....	32 頁
7.2.3 CitH3 免疫染色.....	32 頁

7.2.4 NQO1 免疫染色.....	33 頁
7.2.5 統計学的解析.....	33 頁
7.3 結果.....	34 頁
7.3.1 ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 遺伝子除去の影響.....	34 頁
7.3.2 <i>Nrf2</i> ^{-/-} マウス好中球の抗酸化応答.....	36 頁
7.4 考察.....	38 頁
8. 第四章 ANCA 誘導 NETs による血管内皮細胞・尿細管上皮細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の保護作用.....	39 頁
8.1 緒言.....	40 頁
8.2 方法.....	41 頁
8.2.1 HRGEC の培養.....	41 頁
8.2.2 HK-2 の培養.....	41 頁
8.2.3 Immunoglobulin G(IgG)の抽出.....	41 頁
8.2.4 NETs 誘導と調整培地の作成.....	41 頁
8.2.5 ANCA 誘導 NETs の細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果.....	42 頁
8.2.6 統計学的解析.....	42 頁
8.3 結果.....	43 頁
8.3.1 NETs による血管内皮細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果.....	43 頁
8.3.2 NETs による尿細管上皮細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果.....	45 頁
8.4 考察.....	47 頁
9. 第五章 AAV 誘導モデルマウスにおける Nrf2 活性化薬の効果の検討....	48 頁
9.1 緒言.....	49 頁
9.2 方法.....	50 頁
9.2.1 AAV 誘導モデルマウスの樹立.....	50 頁
9.2.1.1 WEHI-3 の培養	50 頁
9.2.1.2 マウス MPO の抽出	50 頁
9.2.1.3 MPO ^{-/-} マウス.....	50 頁
9.2.1.4 マウス MPO の免疫化	50 頁
9.2.1.5 マウス MPO-IgG の確認 (ELISA 法).....	50 頁
9.2.1.6 AAV 誘導モデルマウスの確立.....	51 頁
9.2.2 AAV 誘導モデルマウスに与える Nrf2 活性化薬の影響.....	51 頁
9.2.2.1 生化学検査.....	51 頁
9.2.2.2 尿検査.....	51 頁
9.2.2.3 腎病理組織学検査.....	51 頁
9.2.2.3.1 腎組織に対する PAS 染色.....	51 頁
9.2.2.3.2 NQO1 免疫染色.....	52 頁
9.2.2.3.3 DHE 染色.....	52 頁
9.2.2.3.4 Ly6B/CitH3 免疫染色.....	52 頁

9.2.3 統計学的解析.....	52 頁
9.3 結果.....	53 頁
9.3.1 生化学検査.....	53 頁
9.3.2 糸球体腎炎および尿細管間質障害の検討.....	55 頁
9.3.3 腎臓における ROS および抗酸化蛋白 NQO1 発現.....	57 頁
9.3.4 腎糸球体における NETs 浸潤.....	59 頁
9.4 考察.....	61 頁
10. 第六章 自然発症 AAV モデルマウスに対する Nrf2 活性化薬の効果	62 頁
10.1 緒言.....	63 頁
10.2 方法.....	64 頁
10.2.1 SCG/Kj マウス	64 頁
10.2.2 SCG/Kj マウスに与える Nrf2 活性化薬の影響.....	64 頁
10.2.2.1 生化学検査.....	64 頁
10.2.2.2 尿検査.....	64 頁
10.2.2.3 腎病理組織学検査.....	64 頁
10.2.2.3.1 腎組織に対する PAS 染色と Elastica-Masson 染色.....	64 頁
10.2.2.3.2 Ly6B/CitH3 染色.....	65 頁
10.2.2.3.3 CD31/TUNEL 染色.....	65 頁
10.2.2.4 抗酸化応答の評価.....	65 頁
10.2.2.4.1 NQO1 免疫染色.....	65 頁
10.2.2.4.2 DHE 染色.....	66 頁
10.2.2.4.3 Western Blotting.....	66 頁
10.2.2.5 血清 MPO-ANCA 値の測定.....	66 頁
10.2.3 統計学的解析	66 頁
10.3 結果.....	67 頁
10.3.1 生化学検査.....	67 頁
10.3.2 糸球体腎炎および尿細管間質障害の検討.....	69 頁
10.3.3 腎糸球体における NETs 浸潤.....	71 頁
10.3.4 腎糸球体における血管内皮傷害の評価.....	73 頁
10.3.5 腎臓の ROS および抗酸化蛋白 NQO1 の評価.....	75 頁
10.3.6 Western Blotting による腎臓の NQO1 発現の評価.....	77 頁
10.3.7 Nrf2 活性化による MPO-ANCA への影響.....	79 頁
10.4 考察.....	81 頁
11. 第七章 自然発症 AAV モデルマウスにおける Nrf2 欠損の意義....	82 頁
11.1 緒言	83 頁
11.2 方法	84 頁
11.2.1 SCG/Kj マウス.....	84 頁

11.2.2 SCG/Kj マウスと <i>Nrf2</i> ^{-/-} の戻し交配	84 頁
11.2.3 生化学検査.....	84 頁
11.2.4 尿検査.....	84 頁
11.2.5 腎病理組織学検査.....	85 頁
11.2.5.1 腎組織に対する PAS 染色と Elastica-Masson 染色.....	85 頁
11.2.5.2 Ly6B/CitH3 免疫染色.....	85 頁
11.2.5.3 CD31/TUNEL 染色.....	85 頁
11.2.6 抗酸化応答の評価.....	86 頁
11.2.6.1 NQO1 免疫染色.....	86 頁
11.2.6.2 DHE 染色.....	86 頁
11.2.7 Nrf2 遺伝子除去による自己抗体産生能への影響.....	86 頁
11.2.8 統計学的解析	86 頁
11.3 結果.....	87 頁
11.3.1 生化学検査.....	87 頁
11.3.2 糸球体腎炎および尿細管間質障害の検討.....	89 頁
11.3.3 腎糸球体における NETs 浸潤.....	91 頁
11.3.4 腎糸球体における血管内皮傷害の評価.....	93 頁
11.3.5 腎臓の ROS および抗酸化蛋白 NQO1 の評価.....	95 頁
11.3.6 Nrf2 遺伝子除去による MPO-ANCA 産生能への影響.....	97 頁
11.4 考察	99 頁
12. 第八章 AAV における Nrf2 の脾臓免疫制御と腎局所 Th17 応答の解析..	100 頁
12.1 緒言	101 頁
12.2 方法	102 頁
12.2.1 脾臓の重量と細胞数の評価.....	102 頁
12.2.2 Flowcytometry による表面細胞解析.....	102 頁
12.2.3 腎組織と脾臓 T 細胞の IL17 の mRNA 発現の評価.....	102 頁
12.2.4 Western Blotting による腎組織タンパク質発現の解析.....	103 頁
12.2.5 CD3/IL17 免疫染色.....	103 頁
12.2.6 統計学的解析	103 頁
12.3 結果.....	104 頁
12.3.1 脾臓重量と脾臓細胞数.....	104 頁
12.3.2 Flowcytometry.....	107 頁
12.3.3 腎組織と脾臓 T 細胞における IL17 mRNA 発現.....	111 頁
12.3.4 Western Blotting による腎臓の IL17 発現の評価.....	113 頁
12.3.5 腎糸球体における IL17/CD3 陽性 Th17 細胞浸潤の評価.....	115 頁
12.4 考察	117 頁
13. 総合考察.....	118 頁
14. 結論.....	121 頁

15. 謝辭.....	123 頁
16. 利益相反.....	124 頁
17. 引用文献.....	125 頁

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表されている

1. Yusho Ueda, *Daigo Nakazawa, Saori Nishio, Satoka Shiratori-Aso, Takashi Kudo, Atsuko Harashima-Miyoshi, Kanako Watanabe-Kusunoki, Fumihiko Hattanda, Sari Iwasaki, Takahiro Tsuji, Utano Tomaru, Yasuaki Aratani, Mamiko Yamamoto, Akihiro Ishizu, Tatsuya Atsumi, Transcription factor Nrf2 activation regulates NETosis, endothelial injury, and kidney disease in myeloperoxidase-positive antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis Kidney International, Volume 105, Issue 6, 1291 - 1305

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. Yusho Ueda, *Daigo Nakazawa, Atsuko Harashima-Miyoshi, Satoka Shiratori-Aso, Takashi Kudo, Saori Nishio, Sari Iwasaki, Takahiro Tsuji, Utano Tomaru, Yasuaki Aratani, Akihiro Ishizu, Tatsuya Atsumi,
The involvement of Nrf2-mediated antioxidant system in myeloperoxidase-positive antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis
60th European Renal Association Congress, June 15-18, 2023, Milan

2. 上田雄翔, 中沢大悟, 三好敦子, 麻生里佳, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也
ANCA 関連血管炎における Nrf2 を介した炎症抑制機構
第 66 回 日本腎臓学会学術総会, 2023 年 6 月 9-11 日, パシフィコ横浜

3. 上田雄翔, 中沢大悟, 三好敦子, 麻生里佳, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也
Activation of Nrf2 regulates neutrophil inflammation in ANCA-associated vasculitis
第 58 回 日本臨床分子医学会, 2023 年 4 月 14-15 日, 東京国際フォーラム

4. 上田雄翔, 中沢大悟, 三好敦子, 麻生里佳, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也
Nrf2 活性化を介した ANCA 関連血管炎の治療開発]
第 39 回 自己免疫研究会, 2025 年 7 月 13 日, 京王プラザホテル

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急速進行性糸球体腎炎や肺胞出血など重篤な臓器障害を引き起こされる代表的な自己免疫疾患である。本疾患の病態は、獲得免疫異常による ANCA の産生と、ANCA を含む血清因子により異常に活性化された好中球が、血管内皮細胞傷害を介して毛細血管の破綻・閉塞を引き起こし臓器障害に至る機序が想定されている。近年の研究から、AAV で生じる活性化好中球は、好中球細胞外トラップ (NETs) を血管内で形成し、自己の血管を傷害することがわかってきた。NETs は抗菌活性を持つ細胞内蛋白とクロマチン繊維からなる網目状の構造体であり、それ自体に強い殺菌作用を有することから、本来は感染症時に血管外で侵入微生物を効率よく殺菌する免疫システムである。しかし、AAV では感染症がないにもかかわらず、ANCA により過剰に活性化された好中球が血管内で NETs を形成することにより壊死性血管炎を引き起こすと想定されている。これらの NETs は、細胞内抗菌蛋白である Myeloperoxidase (MPO) や細胞傷害作用をもつ核 DNA を細胞外に放出するとともに、MPO は ANCA の対応抗原として、DNA は Toll 様受容体を介した抗体産生刺激として、さらなる ANCA の産生を促し病態の悪循環を形成する。

この NETs の形成には細胞内の活性酸素種 (ROS) の関与が指摘されているがその発生源や制御機構についての詳細は明らかになっていない。我々の先行研究において、MPO-ANCA で刺激したマウス好中球の RNA-seq による網羅的発現解析を行ったところ、パスウェイ解析により Nrf2-Keap1 抗酸化経路の関与が示された。細胞内の抗酸化応答を担う分子の一つである Nrf2 は細胞傷害に寄与する過剰な活性酸素種 (ROS) を処理することが知られている。Nrf2 は定常状態では Keap1 により活性が抑制された状態で細胞質に存在するが、Keap1 が ROS など過剰な酸化ストレスを感知すると Nrf2 が活性化し、核内に移動して転写因子として抗酸化蛋白の発現を促すことで抗酸化応答を発揮する。この Nrf2 活性化を介した ROS の制御は、慢性腎臓病モデルマウスや自己免疫疾患モデル動物において、抗酸化作用や抗炎症効果による臓器保護効果が報告されており、様々な疾患に Nrf2 系を標的とする治療が注目されている。本研究では、Nrf2 が ROS を制御することで AAV の病態形成に関与しているかどうかを検証することを目的とした。

【材料と方法】①ヒトの自己免疫疾患に対する Nrf2 系の関与を、ヒト腎生検検体を用いて NQO1 染色で評価した。②In vitro 実験: ANCA 誘導 NETs における Nrf2 活性化薬と Nrf2 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 Nrf2 活性化薬 Bardoxolone methyl (Bard) 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 *Nrf2*^{-/-}マウスから単離した好中球を control-IgG または MPO-ANCA-IgG で培養し, CitH3 染色で NETs を評価した. 3) NETs による細胞障害における *Nrf2* の役割を検証するため, ヒト由来の各細胞を Bard による前処置の有無に分けて, ヒト ANCA 誘導 NETs を含む培地で培養しそれぞれの細胞生存率を評価した. ③In vivo 実験: AAV における *Nrf2* の役割を解析するため, 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た. 1) ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスを樹立し, *Nrf2* 活性化の効果を検証した. マウス骨髓細胞株 (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 を含んだマウス血清を採取した. 10 週齢の雄の C57BL6 (WT)マウスを Bard 群(n=7)と PBS 群(n=7)に分け, 0 および 22 時間にそれぞれ Bard と PBS を腹腔内注射した. 前述の MPO-ANCA を含む血清を静脈注射し, その 1 時間後に LPS を腹腔内投与し 24 時間目に解析した. 2) AAV 自然発症モデルマウスである SCG/Kj マウスを用い, 10 週齢に Bard または PBS を 3 週間隔日で腹腔内投与し 13 週齢で解析した. 3) SCG/Kj マウスを *Nrf2*^{-/-}マウスと N3 世代まで戻し交配し, Bard または PBS を 3 週間隔日で腹腔内投与した後(各 n=6), 13 週齢時点でマウスを解析した. 対照群として, SCG バックグラウンドを持たない *Nrf2*^{-/-}マウスまたは野生型マウス(*Nrf2*^{+/+})を 13 週齢で解析した(各 n=3) 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), 病理組織学的評価, NETs 形成と壊死に関わる組織免疫染色を行った. ④SCG/Kj マウスにおいて *Nrf2* 活性化薬の有無, *Nrf2* 遺伝子欠損の有無により脾細胞数, 細胞分画をフローサイトメトリーで評価した. SCG/Kj マウスの腎臓における IL17 発現を Western blotting と RT-qPCR 法, 組織免疫染色により評価した. さらに *Nrf2* 欠損 SCG/Kj マウスの脾臓 T 細胞における IL17 発現を RT-qPCR 法で評価した.

【結果】①AAV 患者検体では, MCNS や SLE 患者に比して, 糸球体, 尿細管間質ともに NQO1 の発現が亢進していた. ②In Vitro 実験: ヒト好中球において Bard は細胞内 ROS の軽減とともに ANCA-NETs の誘導を抑えた. また WT マウス好中球は MPO-ANCA により NQO1 の発現が亢進すると共に CitH3 陽性の NETs が誘導されたが, この現象は *Nrf2*^{-/-}マウス好中球で有意に亢進した. さらに, ANCA 誘導 NETs により惹起される血管内皮細胞傷害, 尿細管上皮細胞傷害は Bard 投与により有意に抑制された. ③In vivo 実験: ANCA 移入 AAV 誘導モデルマウスにおいて, PBS 群は投与 24 時間後に糸球体腎炎を認めたが, Bard 投与群では腎組織での抗酸化蛋白発現の増加を認め, NETs の有意な減少とともに臓器障害が軽減した. SCG/Kj マウスにおいては, PBS 群で半月体形成性糸球体腎炎を認めたが, Bard 投与群では腎組織での抗酸化蛋白発現の増加を認め, NETs 浸潤と腎炎所見が有意に軽減した. SCG/Kj マウスと *Nrf2* 欠損マウスの戻し交配による解析では, *Nrf2*^{-/-}マウスは *Nrf2*^{+/+}マウスと比べて腎での抗酸化蛋白発現の減少とともに NETs 浸潤を伴って腎炎所見が有意に増悪した. ④SCG/Kj マウスに

において Nrf2 の活性化により各免疫細胞の分化増殖が抑制され, Nrf2 欠損では各免疫細胞の増殖が促進された. Nrf2 活性化はマウス糸球体での IL17 発現を有意に抑制する一方で, Nrf2 欠損では脾臓 T 細胞の IL17 発現が有意に増加した.

【考察】ヒト腎生検検体の解析により, AAV の病態には Nrf2 制御による抗酸化応答が関与していることが示唆された. ヒト好中球を用いた *in vitro* 実験では, 好中球の Nrf2 を薬理的に活性化することで NQO1 の産生が促進され ANCA 誘導 NETs が抑制された. 一方で, マウス好中球の実験において, ANCA で処理した Nrf2 欠損好中球では抗酸化応答が見られず NETs 誘導が助長された. これらの結果から Nrf2 活性を介した抗酸化応答の亢進が ANCA 刺激時に生じる ROS を中和し, NETs 形成を抑制する機序が想定された. また ANCA-誘導 NETs は血管内皮細胞や尿細管上皮細胞を傷害するが, Nrf2 の活性化は直接これらの細胞の抗酸化応答を促進し, 細胞傷害を軽減した. この結果から Nrf2 は好中球のみならず, 腎臓固有細胞への直接的な作用も併せ持つことが示唆された. これらの *in vitro* の現象を, 2 つの AAV モデル(ANCA 移入モデルと自然発症 AAV モデル)を用いて検証した. 両モデルにおいて, Bard 投与は腎組織での抗酸化蛋白の発現を亢進させ, NETs 浸潤の抑制とともに腎炎所見を有意に改善した. 一方, Nrf2 遺伝子を欠損させた AAV 自然発症モデルでは, 腎組織における抗酸化応答が認められず, NETs 浸潤の増加とともに腎炎の増悪を示した. *In vitro* で得られた結果とあわせると, Nrf2 の活性化は NETs の抑制および腎固有細胞の保護を介して, AAV における腎炎の改善に寄与する機序が想定された. さらに, AAV モデルマウスに Bard を投与したところ, 脾腫の縮小が観察された. この現象の機序を明らかにするため, 脾臓細胞の FACS 解析により免疫細胞サブセットの変化を評価したところ, Nrf2 活性化は Th17 細胞を主体とした T 細胞制御に関与していることが示され, さらに腎組織に浸潤する Th17 細胞の減少も認められた. これらの結果から, Nrf2 は好中球のみならず, Th17 を主体とする T 細胞応答を制御することにより, AAV における腎炎の改善に寄与する可能性が示唆された.

【結論】Nrf2 は NETs 形成の制御, 抗酸化応答を介した直接的な細胞保護作用, さらに T 細胞介在性自己免疫の制御といった多面的な作用を通じて, AAV の炎症病態を改善することを示した. Nrf2 標的治療は病態に即した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
ARE	Antioxidant Response Element
BSA	Bovine Serum Albumin
BUN	Blood Urea Nitrogen
CitH3	Citrullinated Histone 3
Cr	Creatinine
DAMPs	Damage-associated Molecular Patterns
DAPI	4', 6-Diamidine-2'-Phenylindole Dihydrochloride
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DHE	Dehydroethidium
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
GST	Glutathione S-Transferase
GSR	Glutathione Reductase
HE	Hematoxylin and Eosin
HGREC	Human Renal Glomerular Endothelial Cells
HK-2	Human Kidney 2 Cells
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)
LPS	Lipopolysaccharide
MCNS	Minor glomerular abnormalities
mitoROS	Mitochondrial ROS
MPO	Myeloperoxidase

NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatide hydrogenase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NQO1	NADPH quinone 1
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2–related factor 2
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
PMA	Phorbol Myristate Acetate
RNA	Ribonucleic Acid
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
SOD	Superoxide Dismutase
SSC	Side Scatter
TLR	Toll-like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase–mediated Digoxigenin Deoxyuridine Nick-End Labelin

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 の出現と全身性壊死性血管炎を病理学的特徴とし、臨床的には急速進行性糸球体腎炎や肺胞出血を主徴とする重篤な自己免疫性疾患である (Jennette et al, 2013).

現在の標準治療は免疫抑制療法に基づき、抗炎症作用に加えて自己抗体産生の抑制を介し病態の上流を制御することを目的としている. その結果、寛解導入および予後改善は一定の進展をみせているものの (Puéchal et al, 2016), 不可逆的な腎機能障害や神経学的後遺症が高頻度に残存し、さらに強力な免疫抑制に伴う重篤な感染症による死亡率が依然として主要な問題として存在している (Little et al, 2010). モデル動物を用いた解析により、炎症性サイトカインシグナルを阻害する C5a 受容体拮抗薬が奏効することが報告され、現在本邦でもヒト患者に対する寛解導入治療として承認された. しかしながら、これらはいずれも病態の上流因子を標的とするにとどまり、血管炎による組織傷害そのものを制御する根本的治療戦略が必要である. 近年、病原性 ANCA が好中球に作用することにより、核内クロマチンや Myeloperoxidase (MPO) などの顆粒蛋白を細胞外へ放出する好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) の過剰形成が誘導され (Brinkmann et al, 2004), 臓器障害と炎症が相互に増幅する病態的悪循環 (necroinflammation) の形成に寄与することが明らかとなっている (Mulay et al, 2016).

NETs は本来、感染防御機構として侵入微生物の効率的排除に寄与するが (Urban et al, 2006; Saitoh et al, 2012), 無菌性炎症においては制御された能動的壊死の一形態として過剰に形成され、自己組織損傷の病因的要因となる (Schreiber et al, 2017). AAV の免疫病態は、感染などの外的刺激を契機とする好中球活性化後の NETs 形成や、T 細胞・B 細胞応答を介する自己抗体 ANCA による増幅的 NETs 誘導により全身性血管炎が惹起されることが明らかにされてきた (Nakazawa et al, 2012). さらに、DNA を含有する NETs の分解能低下が内因性アジユバントとして機能し、自己抗体産生を促進することが報告されている (Nakazawa et al, 2014).

以上の知見から、NETs を中核とした病態悪循環の存在が強く示唆されるものの、ANCA 依存的 NETs 形成を制御するシグナル伝達経路は未解明であり、このため NETs を直接標的とする治療戦略は依然として確立されていない. 現在明らかにされている NETs 形成機構としては、炎症性サイトカインや補体系の刺激によりプライミングされた好中球が、Myeloperoxidase (MPO) や Proteinase 3 (PR3) 等の好中球特異的顆粒蛋白を細胞表面に発現することから始まる. これらの抗菌蛋

白に ANCA が結合すると, ANCA の Fc 領域と好中球表面の Fc γ 受容体との相互作用を介してシグナルが伝達され, 活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生が誘導される. さらに, この ROS を引き金として Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4) が活性化され, ヒストンのシトルリン化を介してクロマチンの脱凝集が進行し, 最終的に NETs の放出に至る. この一連の過程から, ANCA 依存性 NETs 形成において ROS が中核的役割を担うことが示唆される. 我々は, 先行研究にて MPO-ANCA で刺激したマウス好中球の RNA-sequence とそのパスイ解析により Nrf2-Keap1 抗酸化経路の関与が示しており, この本研究では ROS 制御機構を担う転写因子である Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) に注目した.

Nrf2 は, 抗酸化酵素群の転写誘導を介して酸化ストレス応答を統御する主要な抗酸化シグナル伝達系の中心因子である. 平常状態において Nrf2 は Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と結合し, プロテアソーム依存性分解により低レベルに抑制されている. しかし, 酸化ストレス下では Keap1 が酸化修飾を受けることにより Nrf2 が解放され, 核内へ移行する. 核内に移動した Nrf2 は antioxidant response element (ARE) に結合し, 抗酸化遺伝子群の転写を誘導することで細胞保護作用を発揮する. 遺伝的または薬理的に Nrf2 を活性化することで酸化ストレスが抑制され, 虚血再灌流障害 (Nezu M et al, 2017), アルツハイマー病 (Urano A et al, 2020), 糖尿病 (Lazaro I et al, 2018) において臓器保護効果が報告されている. 加えて, 近年の研究では, Nrf2 の活性化が NF- κ B 経路 (Ma Q et al, 2003) の抑制や炎症性サイトカイン産生の抑制に関与すること (Li W et al, 2008), さらに老齢 Nrf2 欠損マウスがループス様腎炎を自然発症すること (Yoh K et al, 2001) が示されている. これらの知見は, Nrf2 が酸化ストレス応答の調節因子として機能するのみならず, 炎症性疾患に対する抗炎症的作用や自己免疫疾患に対する感受性制御にも寄与している可能性を示唆している.

本研究では NETs を標的とした AAV の炎症病態への新規治療薬の候補として Nrf2 に着目し, 第一章で AAV 患者の腎生検検体を用いて Nrf2 の関与について, 第二章でヒト ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 活性化薬の効果について, 第三章ではマウス ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 の効果を, 第四章では ANCA 誘導 NETs による細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果について述べる. さらに第五章と第六章では AAV モデルマウスにおける Nrf2 活性化薬の効果について検証し, 第七章では AAV モデルマウスにおける Nrf2 遺伝子除去の効果について述べる. 最後に第八章では Nrf2 の獲得系免疫細胞に対する作用について述べ, AAV の多様な病態に対する Nrf2 の効果を検証した.

5. 第一章

ヒト AAV における Nrf2 を介した
抗酸化応答系の関与

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、ANCA による好中球の過剰活性化により NETs が過剰に形成され血管内皮細胞傷害を来すが、NETs 成分に対する自己抗体として ANCA が産生され、さらなる好中球の過剰活性化を招く悪循環が病態の背景にある。NETs 形成の詳細な機序は解明されていないが、好中球細胞内で発生した ROS が NETs を誘導することが知られており、ROS は NETs とともに細胞外へ放出され細胞傷害に関与すると考えられている。

先行研究(Kudo T., et al)で MPO-ANCA で刺激したマウス好中球の RNA-sequence とそのパスウェイ解析により Nrf2-Keap1 抗酸化経路の関与が示していることが示唆され(図 1-1)、本研究では ROS 制御機構を担う転写因子である Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) に注目した。本研究では AAV による糸球体腎炎の病態に Nrf2 による ROS 制御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。Nrf2 は定常状態でも全身の組織に発現が認められるが、ROS 産生に応答して活性化されると、下流の抗酸化蛋白の発現を誘導する。その代表的な分子である Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen quinone oxidoreductase 1 (NQO1) は、Nrf2 活性化の指標として広く用いられている。そこで本研究では、NQO1 の発現を免疫染色により評価し、AAV 腎炎組織における Nrf2 依存的抗酸化応答の関与を検討した。さらに比較対象として、NETs が病態に関与する全身性エリテマトーデス (SLE) /ループス腎炎、ならびに炎症や組織傷害を伴わない Minimal change nephrotic syndrome (MCNS) の腎生検検体を用いて、同様に NQO1 発現を検討した。

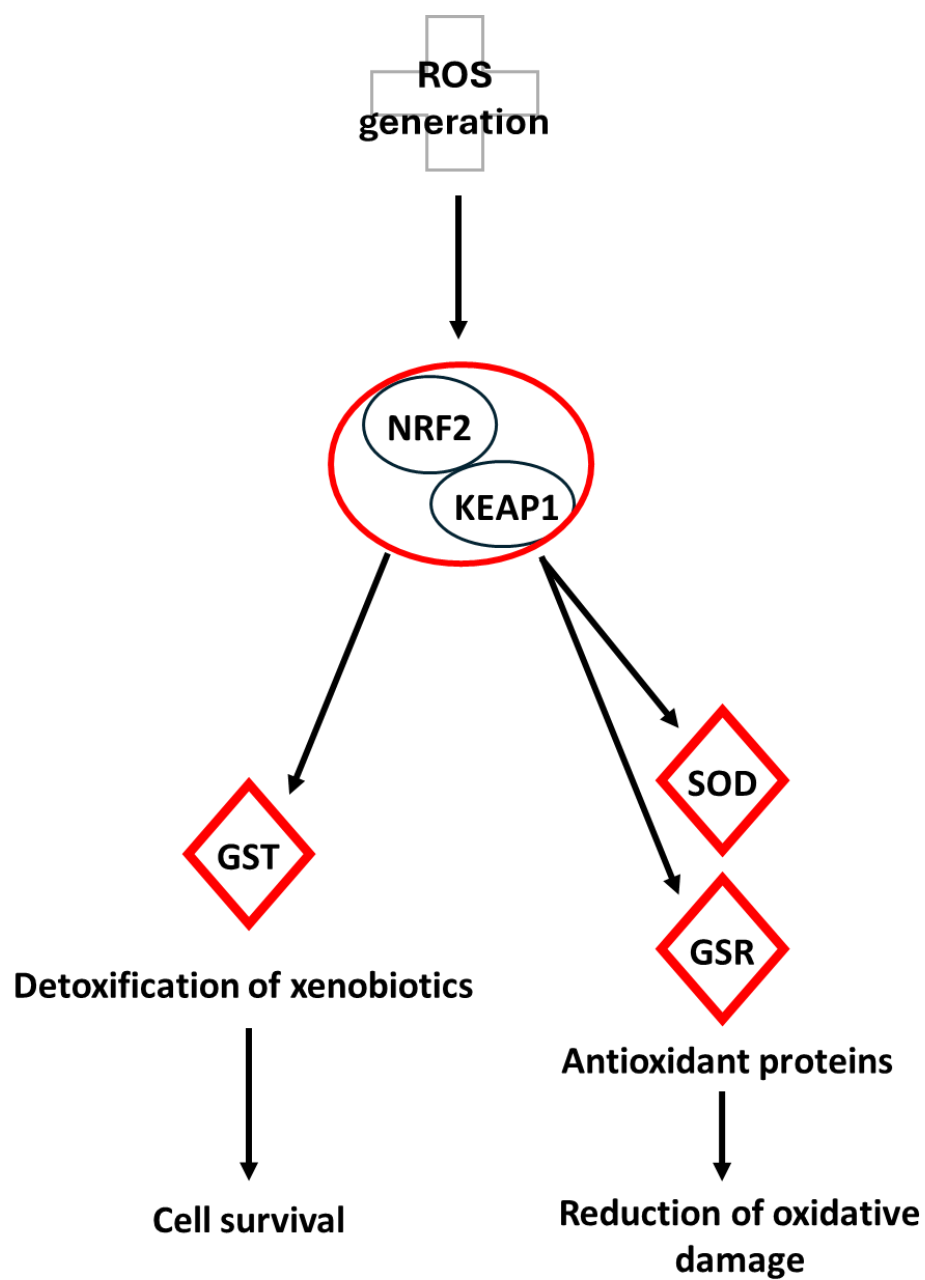


図 1-1 ANCA 刺激好中球の Pathway (著者作図)

ROS の制御に関わるシグナル因子について Nrf2-Keap1 の活性化 (赤) を認めた. さらにその下流の抗酸化蛋白 SOD や GSR, 異物に対する解毒に働く GST などの活性化 (赤) も認めた.

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プ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

5.3.1 NQO1 染色

パラフィンプロックで包埋された腎組織切片を用いた。NQO1 染色は anti-NQO1 antibody (Abcam) を用いて、avidin-biotin complex (ABC) 法で実施した。NQO1 陽性細胞は 1 スライドあたり 10 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、糸球体面積で除した。尿細管間質部位については、ランダムに 5 区域撮像し、NQO1 陽性面積の割合を測定した。

5.3.2 統計学的解析

Kruskal-Wallis test (Steel's post hoc test)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 Graphpad prism®を用いて行った。

5.4 結果

5.4.1 AAV の ROS の関与

AAV 患者検体では, MCNS や SLE 患者に比して, 糸球体, 尿細管間質ともに NQO1 の発現の亢進を認めた (図 2).

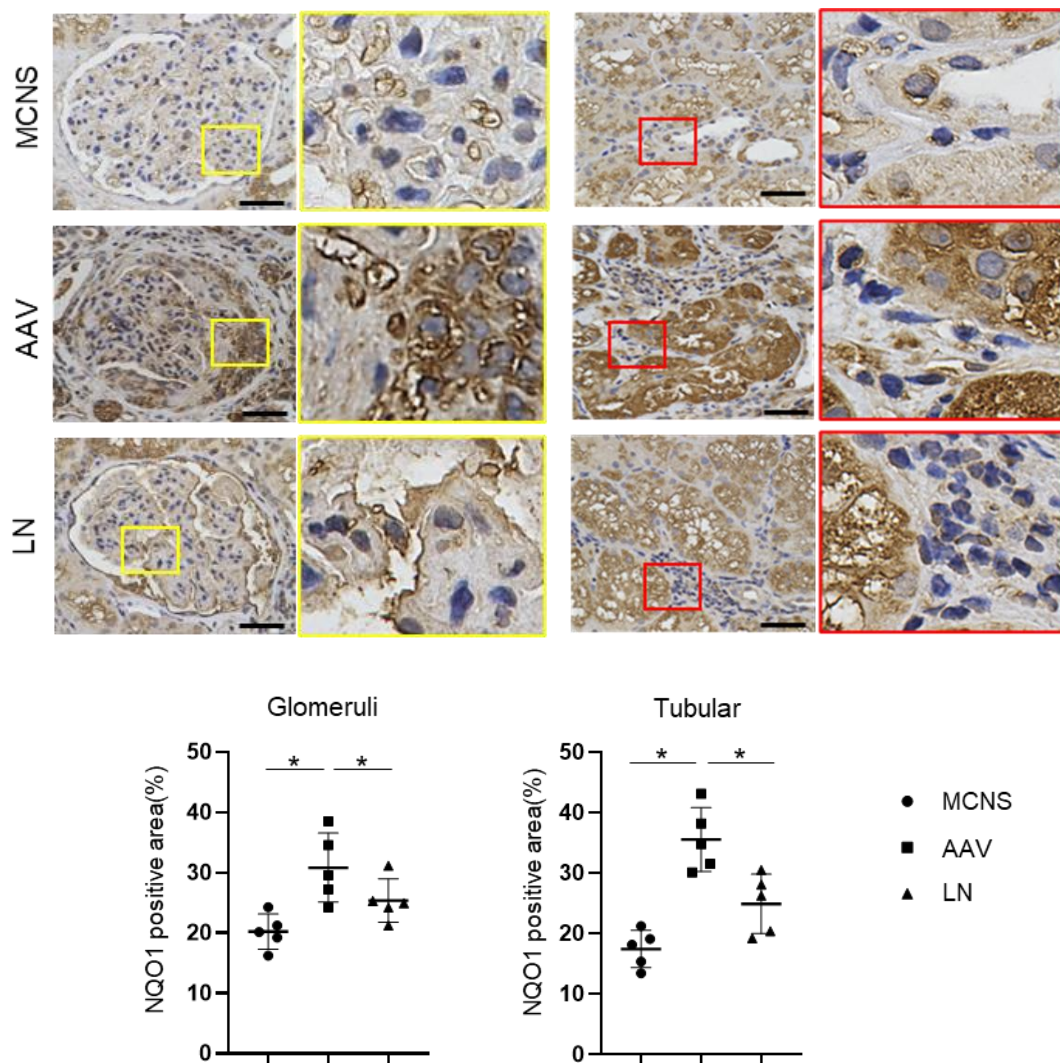


図2 ヒト腎生検検体におけるNQO1発現

MCNS, AAV, LNのヒト腎生検検体を用いてNQO1の免疫組織化学染色を施行した。糸球体(黄色枠)と尿細管間質(赤色枠)を示す。Scale bar: 50 μ m.

グラフは、MCNS患者(n=5)、AAV患者(n=5)、LN患者(n=5)の腎生検切片における糸球体および尿細管間質におけるNQO1陽性領域の割合を示す。データは平均値 $\pm$ 標準誤差を表す。*P<0.05

5.5 考察

ヒト腎生検検体を用いて, AAV 患者における Nrf2 依存的抗酸化応答の関与を検証した. その結果, AAV 患者では MCNS や SLE と比較して, 糸球体および尿細管間質において NQO1 の高発現が認められ, Nrf2 による ROS 制御の関与が示唆された. この結果は, AAV による腎炎では, 組織内での ROS 産生に応答して Nrf2 が反応性に活性化していることを示すものであり, 病態の背景に酸化ストレスが深く関与している可能性を示している.

6. 第二章

ヒト好中球における ANCA 誘導 NETs に対する
Nrf2 活性化薬の効果の検討

6.1 緒言

本章では, Nrf2 活性化薬の 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 の誘導は, Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)等の刺激により好中球細胞質内の MPO が細胞表面に表出されるプライミングから始まる. この MPO が MPO-ANCA の Fab 領域と結合し, さらに MPO-ANCA-Fc 部が Fc γ 受容体と架橋結合し細胞内で Spleen Tyrosine Kinase (Syk) のリン酸化が起こると, 細胞内 ROS が増加し, Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4) 活性を介してヒストンのシトルリン化を来す. これにより核クロマチンが脱凝縮し NETs 放出へ至ると考えられている. NETs 形成において ROS が重要な役割を担っているが, 細胞内 ROS を制御する Nrf2 の影響は不明である. 本章では ANCA 誘導 NETs のシグナル経路における Nrf2 の役割を解析するために, AAV 患者血清から抽出した ANCA-IgG を健常者由来好中球と反応させて NETs を誘導し, Nrf2 活性化薬投与による NETs 形成率と細胞内シグナルへの変化を免疫染色で評価した.

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

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нка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 5×10^5 cells/ml となるように調整し、96 ウェルプレートあるいは 8 チャンバースライドに播種した後、Bardoxolone methyl (Bard) (CEM) 50nM または Phosphate Buffered Saline (PBS) を 30 分間 pretreatment し、5%二酸化炭素インキュベータ内に 37°C下で培養した。ヒト 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) (250 μ g/ml) とともに 4 時間培養した。形成された NETs を Sytox green (SG) 染色, DCFH-DA 染色, NQO1 免疫染色, PAD4 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を評価した。

6.2.4 Sytox Green 染色

96 ウェルプレートで 4 時間培養した好中球に 2000 倍希釈の Sytox Green (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 3 視野 (倍率 100 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 DCFH-DA 染色

ROS の評価には、細胞内 ROS により発色する 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Cell Biolabs) を使用した。健康人末梢血から分離した好中球 5×10^5 cells/ml 培養液に DCF $10 \mu\text{M}$ を加え遮光下の 37°C で 30 分間培養した後、96 ウェルプレートに播種し 6.2.3 と同様に NETs を誘導した。4 時間培養後に 1 ウェルあたり 2 視野(倍率 100 倍) でランダム撮像し, ImageJ software で mean luminance value を測定し ROS を定量評価した。

6.2.6 NQO1 免疫染色

ANCA 誘導 NETs における Nrf2 による ROS 制御の関与を調べるために抗酸化蛋白 NQO1 を免疫染色で評価した。8 チャンバースライドで 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-NQO1 antibody (Abcam) を添加して、 4°C 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 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。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。NQO1 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。

6.2.7 PAD4/CitH3 免疫染色

ANCA 誘導 NETs を PAD4/CitH3 免疫染色で評価した。8 チャンバースライドで 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 rat anti-PAD4 antibody (Abcam), rabbit anti-CitH3 antibody (Abcam) を添加して、 4°C 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 alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG (Thermo Fisher Scientific), 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。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。PAD4 陽性細胞, CitH3 陽性細胞, はそれぞれ 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 統計学的解析

Turkey 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 Graphpad Prism[®]を用いて行った。

6.3 結果

6.3.1 ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 活性化薬の効果

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, Bard 群において PBS 群と比較し有意に減少した (図 3).

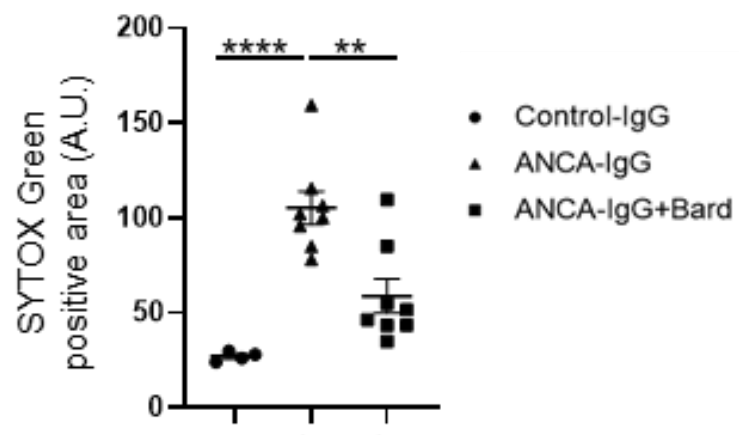
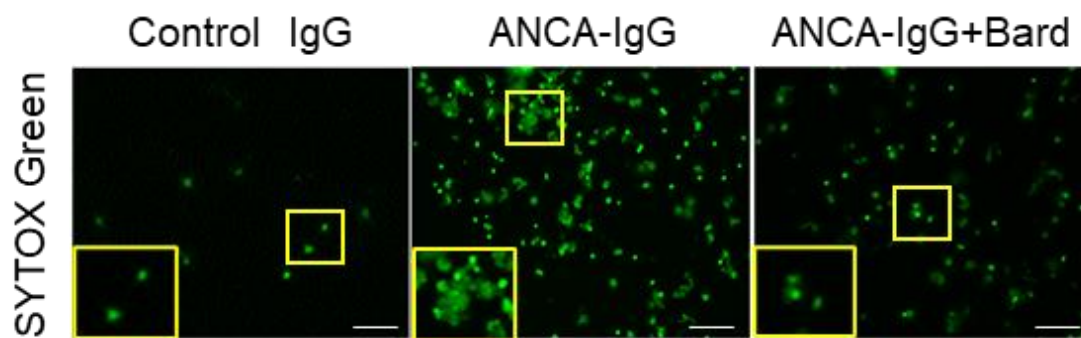


図 3 ANCA 誘導 NETs に対する Bard の効果

SG 陽性（緑）を示す好中球を NETs として、その平均輝度を ImageJ software で統計解析した。Scale bar: 50 μ m. データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した。Control IgG 群 n=4, ANCA-IgG 群 n=8/群. *p<0.05. **P< 0.01, ***P< 0.001, ****P< 0.0001.

6.3.2 ANCA 誘導 NETs における細胞内 ROS に対する Nrf2 の関与

NETs 形成における細胞内 ROS と Nrf2 が制御する抗酸化蛋白 NQO1 の発現を評価した. DCFH-DA による細胞内 ROS の評価では, 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, Bard 群では有意に低下した (図 4). NQO1 染色では, 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, NQO1 の発現が有意に上昇したが, Bard 治療によりさらに増強された(図 5).

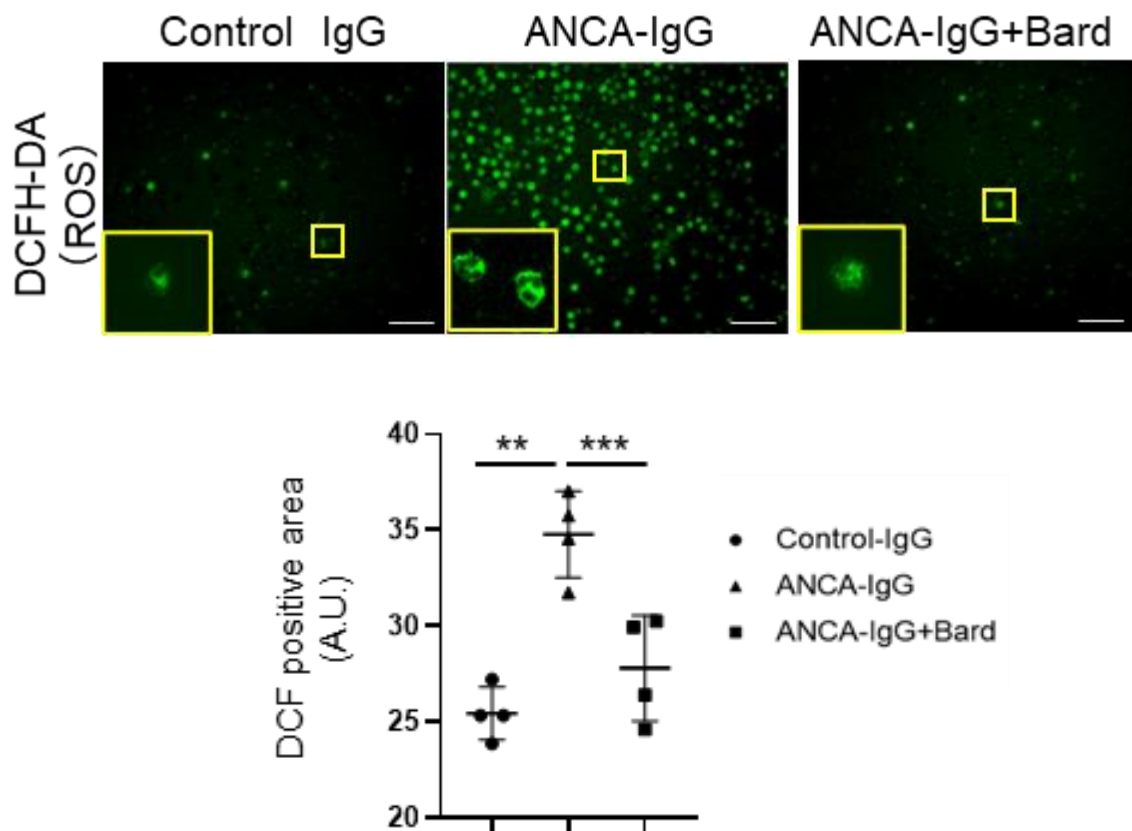


図 4 ANCA 刺激好中球における細胞内 ROS に対する Bard の効果
細胞内活性化 ROS は DCFH-DA 染色陽性（緑）を示す. Scale bar: 50 μ m.
Scale bar: 50 μ m. データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した. n=4/群. *p<0.05. **P< 0.01,
***P< 0.001,

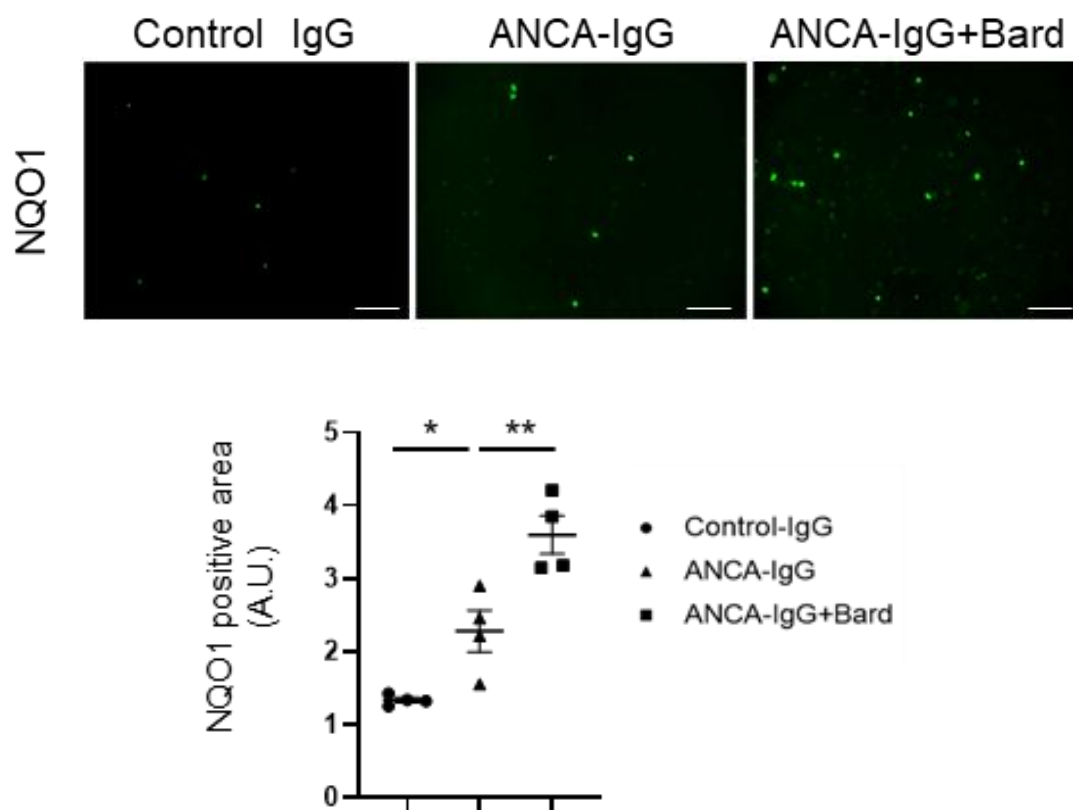


図 5 ANCA 刺激好中球における抗酸化蛋白の発現に対する Bard の効果
好中球内の抗酸化蛋白 NQO1 の発現は緑色を示す. Scale bar: 50 μ m.

Scale bar: 50 μ m. データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した. n=4/群. *p<0.05. **P<0.01.

6.3.3 NETs 形成シグナルにおける Nrf2 活性化の影響

NETs 形成に関わる PAD4, CitH3 の免疫染色を行い,その発現を評価した. 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, PAD4, CitH3 ともに発現が有意に上昇したが, Bard 治療により有意に抑制された(図 6).

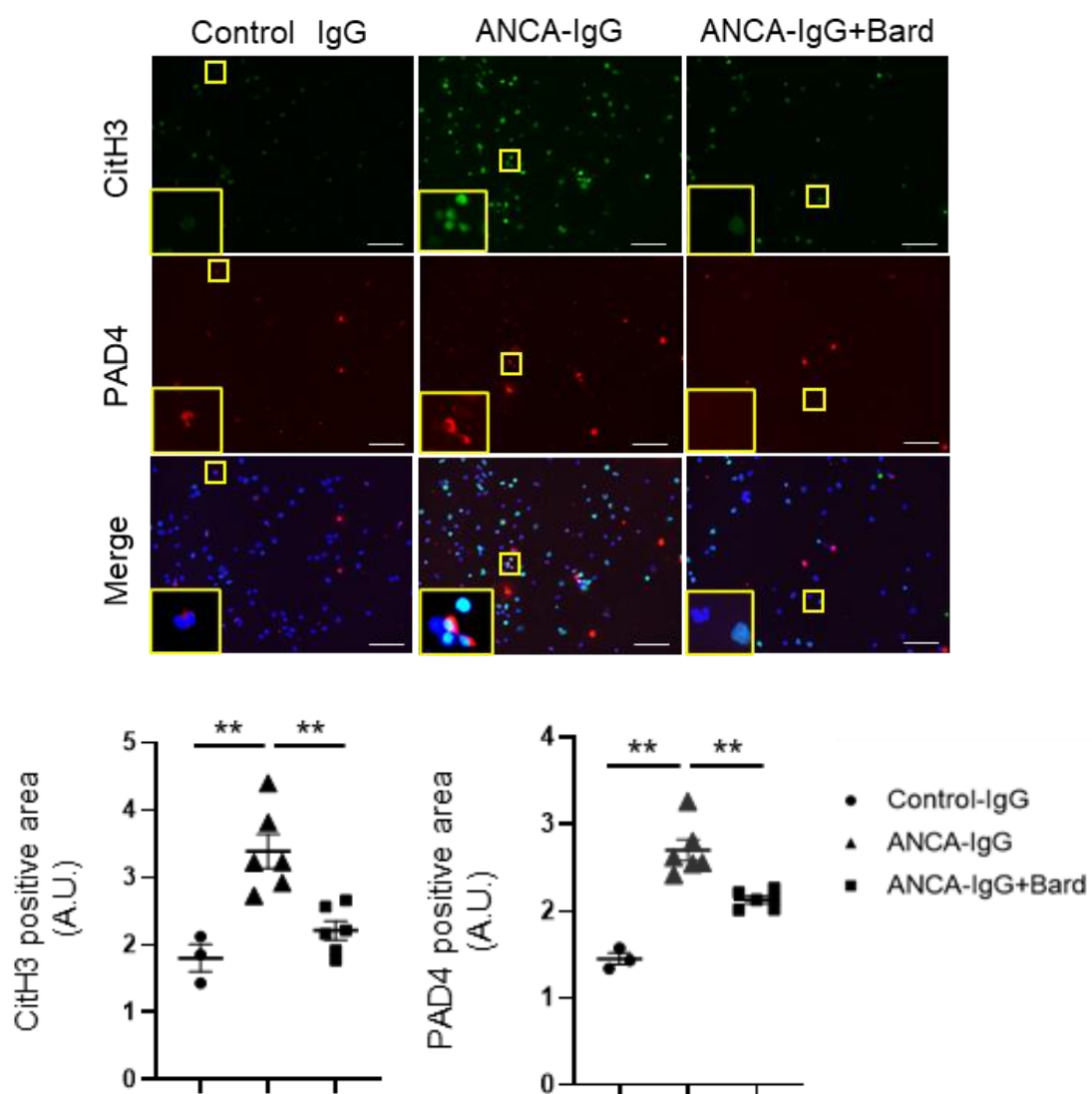


図6 ANCA 刺激好中球の細胞内シグナルに対する Bard の影響
CitH3 は緑色, PAD4 は赤色を示す. Scale bar: 50 μ m. データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した. Control IgG 群 n=3, ANCA-IgG 群 n=6/群. *p<0.05. **P< 0.01.

6.4 考察

本実験の免疫染色解析から、ヒト ANCA 誘導 NETs は細胞内 ROS の産生とともに形成され、この過程で Nrf2 が活性化され抗酸化蛋白 NQO1 の発現が代償的に誘導されることが示された。しかし内因性の Nrf2 活性化による NQO1 産生では過剰な ROS に十分に対応できず、結果として NETs 形成が進行すると考えられる。一方で、Nrf2 活性化薬 Bard を投与すると、NQO1 の発現が強制的に亢進し、細胞内 ROS が有意に抑制され、NETs 形成に必須とされる PAD4 活性化およびヒストンのシトルリン化 (CitH3) が抑制された。これらの結果から、ANCA 誘導 NETs においては ROS 産生が病態の駆動力となり、Nrf2 を介した抗酸化応答はその代償的制御機構として働くが、薬理学的な Nrf2 活性化によりこの応答を強化することで、ROS 過剰状態を是正し NETs 形成を抑制する機序が示された。

7. 第三章

Nrf2 欠損好中球を用いた
ANCA 誘導 NETs 形成の解析

7.1 緒言

第二章では、ヒト好中球において Nrf2 活性化薬を用いた解析から、ANCA 誘導 NETs が Nrf2 による抗酸化応答系によって制御されていることが示された。しかし薬理的活性化ではオフターゲット作用の可能性を否定できない。本章では Nrf2 の ANCA 誘導 NETs に対する抑制効果を検証するために、Nrf2 遺伝子欠損マウス (*Nrf2*^{-/-}マウス) 好中球を用いて ANCA 誘導 NETs 実験を行った。野生型マウスと *Nrf2*^{-/-}マウスから好中球を分離し、マウス抗 MPO-IgG で刺激を与えて NETs を誘導し、Nrf2 による細胞内シグナルと抗酸化応答への影響に関して免疫染色により評価した。

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 *Nrf2*^{-/-} 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. *Nrf2*^{-/-} マウスは東北大学(Ito, et al., 1997)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°C 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 5×10^5 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°C 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 μ g/ml)(R&D Systems) もしくは MPO mouse monoclonal antibody (Anti-MPO ab) (20 μ g/ml)(OriGene) とともに 4 時間培養した. NETs は免疫蛍光染色により CitH3 陽性細胞として評価した.

7.2.3 CitH3 免疫染色

4 時間培養した好中球を 4% Paraformaldehyde (PFA) で固定した後, 500 倍に希釈した rabbit anti-CitH3 antibody (Abcam) を添加して, 4°C 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 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. 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 陽性細胞はそれぞれ 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.

7.2.4 NQO1 免疫染色

4 時間培養した好中球を 4% PFA で固定した後, 50 倍に希釈した rabbit anti-NQO1 antibody (Abcam) を添加して, 4°C 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 alexa Fluor 594 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. NQO1 陽性細胞は 1 サンプルあたり 2 視野(倍率 20 倍)をランダム撮像し, ImageJ software で mean luminance value を評価した.

7.2.5 統計学的解析

Kruskal-Wallis test (Steel's post hoc tests)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 Graphpad prism[®]を用いて行った.

7.3 結果

7.3.1 ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 遺伝子除去の影響

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.

一方 *Nrf2*^{-/-} マウスの好中球において, 抗 MPO-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, 抗 MPO-ANCA-IgG 刺激下においては, WT マウス好中球の抗 MPO-ANCA-IgG 刺激群よりも NETs 形成は有意に多かった (図 7a)

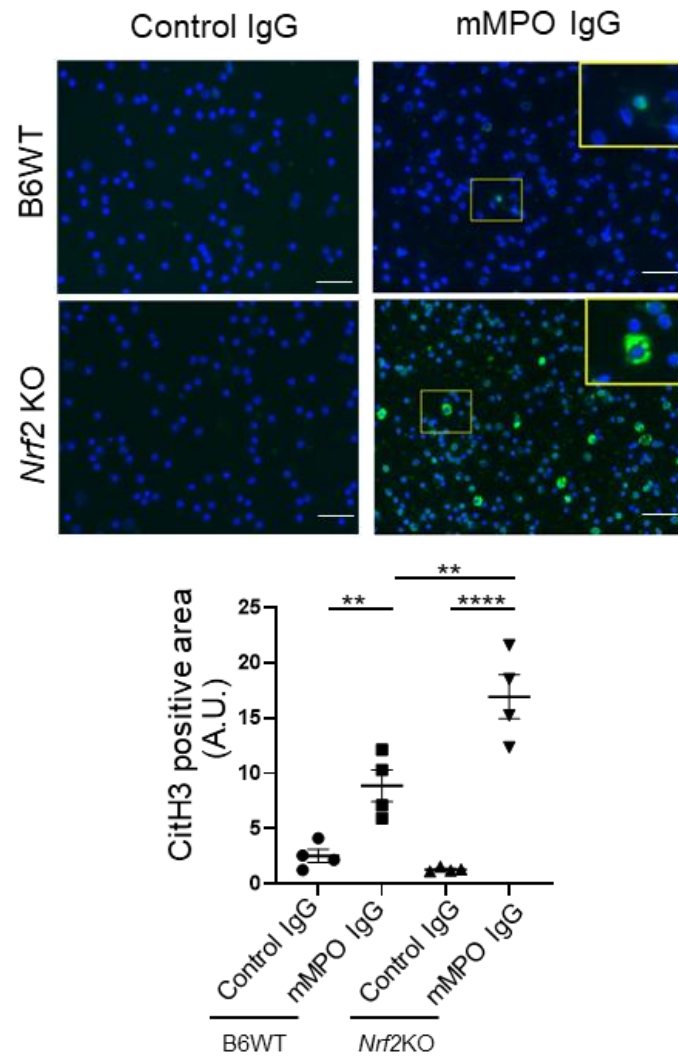


図 7a ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 遺伝的欠損の NETs 形成に与える影響
 マウス好中球の CitH3 は緑色を示す. Scale bar: 50 μ m. データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した. n=4/群. *p<0.05. **p<0.01, ****p<0.0001.

7.3.2 *Nrf2*^{-/-}マウス好中球の抗酸化応答

WT マウスの好中球において、抗 MPO-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、抗酸化蛋白 NQO1 の発現が有意に亢進していた。一方 *Nrf2*^{-/-}マウスの好中球において、抗 MPO-ANCA-IgG, control-IgG いずれの刺激においても NQO1 の発現を認められなかった(図 7b)。

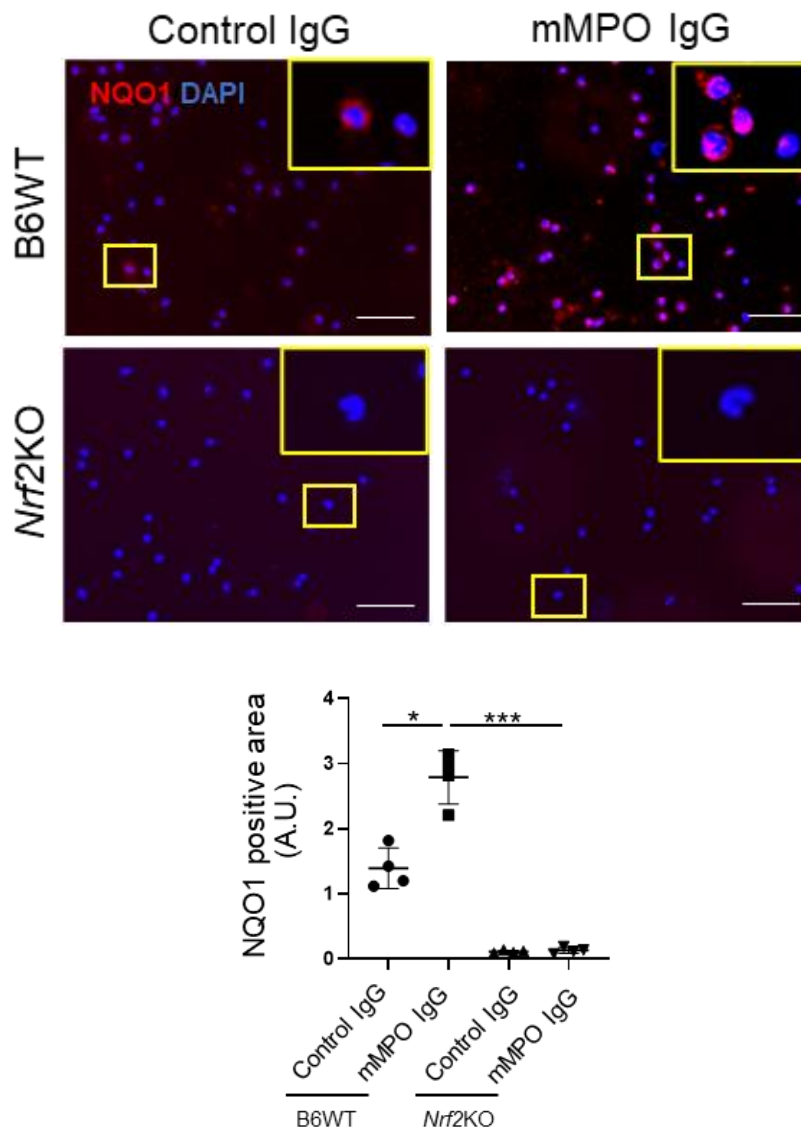


図 7b ANCA 誘導 NETs に対する Nrf2 遺伝的欠損による抗酸化応答の評価
 マウス好中球の NQO1 は赤色, 核は青色を示す. Scale bar: 50μm.
 データは平均±標準誤差で示した. n=4/群. *p<0.05. ***P<0.001.

7.4 考察

本実験から, Nrf2 欠損マウス好中球では ANCA 誘導 NETs 形成が有意に亢進することが示された.

第二章のヒトの好中球を用いた実験結果と併せて, Nrf2 は薬理的活性化だけではなく, 遺伝子的欠損によっても ANCA 誘導 NETs 形成に影響することが示された. 特に Nrf2 欠損によって抗酸化蛋白の発現が低下し, その結果として NQO1 の減少に伴う細胞内 ROS の増加が認められ, これが NETs 形成シグナルを促進し, ヒストンのシトルリン化を経て NETs 形成が亢進したと考えられる.

8. 第四章

ANCA 誘導 NETs による
血管内皮細胞・尿細管上皮細胞傷害に対する
Nrf2 活性化薬の保護作用

8.1 緒言

第二章では、ヒト好中球を用いて Nrf2 活性化薬による NETs の形成抑制効果を示し、第三章では *Nrf2*^{-/-}マウス好中球を用い ANCA 誘導 NETs の形成に Nrf2 が関与することを示した。本章では、ANCA-NETs により誘導される血管内皮細胞傷害、腎尿細管上皮細胞傷害も Nrf2 系による抗酸化応答に影響を受けると仮説を立て、それぞれの細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果を検証した。

AAV では、小型血管の内皮細胞や尿細管上皮細胞が 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 をヒト腎糸球体血管内皮細胞 (HRGEC) とヒト腎尿細管上皮細胞 (HK-2) と共培養し、Nrf2 活性化薬の有無で細胞傷害度を評価した。

8.2 方法

8.2.1 HRGEC の培養

ヒト腎糸球体血管内皮細胞(HRGEC)は, HuMedia-EG2 培地 (Kurabo) を用いて 96 ウェルプレートに播種し, 37°C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 HK-2 の培養

ヒト腎尿細管上皮細胞 (HK-2) は, keratinocyte 無血清培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 96 ウェルプレートに播種し, 37°C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.

8.2.3 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.

8.2.4 NETs 誘導と調整培地の作成

6.2.1 と同様に分離したヒト好中球を RPMI1640 培地(Merck)で 5×10^5 cells/ml となるように調整し, 4cm ディッシュに播種した. ヒト TNF- α (5 ng/ml) (Merck)で 15 分間プライミングを行った後, 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) (各 250 μ g/ml)とともに 5%二酸化炭素インキュベータ内に 37°C下で 4 時間培養した. その後培養液を除き PBS で洗浄後, 培地を新しい培地 (RPMI 1640) に交換し, ディッシュ底部に附着している NETs を含む好中球成分を機械的に剥離した後, 遠心分離 (1200 rpm, 5 分) して上清を回収し NETs 調整培地とした.

8.2.5 ANCA 誘導 NETs の細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果

8.2.1, 8.2.2 で培養した HRGEC または HK-2 細胞を Bard 50nM で pretreat し, 24 時間インキュベートした後, 8.2.4 で作成した 100 μ L の NET 調整培地に置換してさらに 24 時間インキュベートした. 各細胞の細胞生存率は Calcein/ヨウ化プロピジウム (PI) または Cell Counting Kit (Dojindo, 熊本, 日本) を用いて評価した. Calcein と PI の陽性率は ImageJ を用いて全細胞数に対する陽性細胞の割合として解析した. Cell Counting Kit はメーカーのプロトコールに従って使用した. 実験の模式図を下記に示す (図 8).

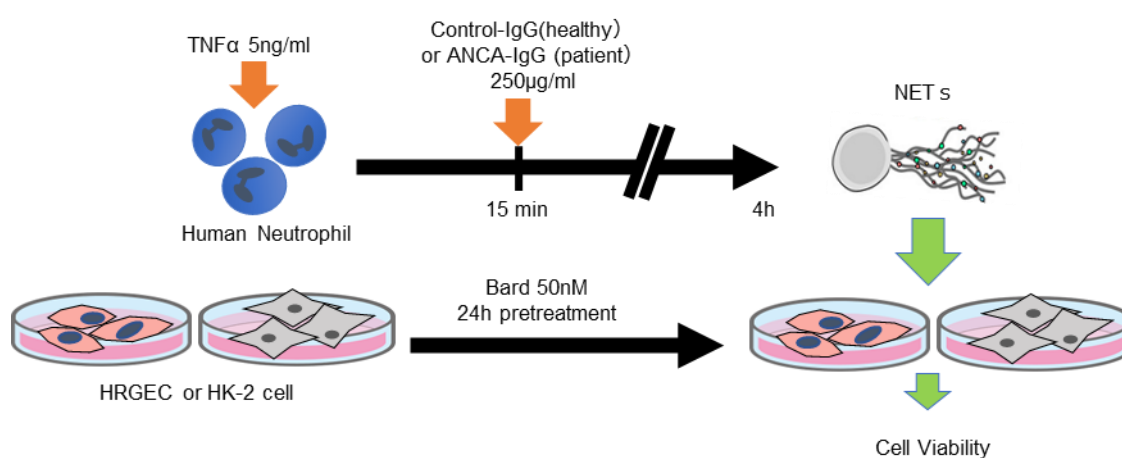


図 8 NETs による細胞傷害と Bard の細胞保護効果

8.2.6 統計学的解析

Turkey 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 Graphpad Prism[®]を用いて行った.

8.3 結果

8.3.1 NETs による血管内皮細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果

ANCA 誘導 NETs の HRGEC に対する細胞傷害性を Calcein/PI 染色による細胞生存率で評価し, Bard 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が (図 9), ANCA 誘導 NETs による細胞傷害性は, Bard で pretreat することにより有意に低下した.

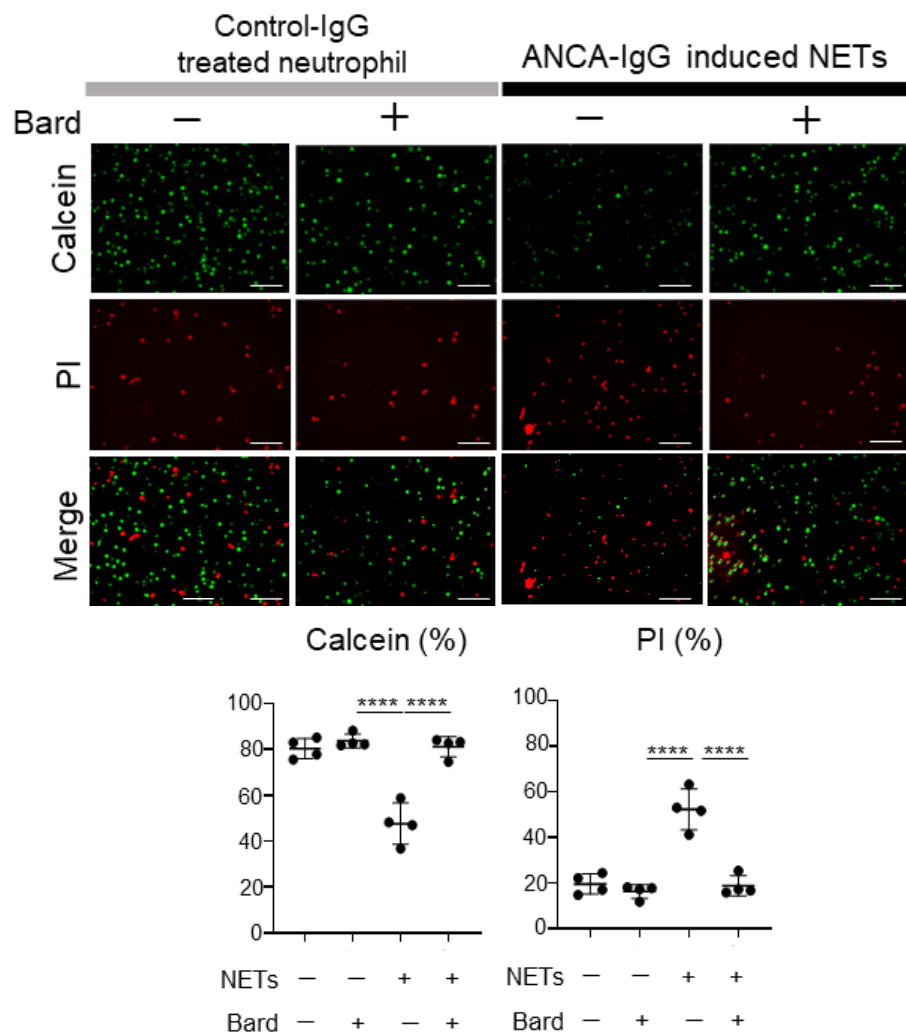


図9 ANCA 誘導 NETs の HRGEC に対する細胞傷害性および Bard の効果
Calcein PI 染色により細胞生存率を統計解析した.データは平均±標準誤差で示した. n=4/群. ****p<0.0001.

8.3.2 NETs による尿細管上皮細胞傷害に対する Nrf2 活性化薬の効果
ANCA 誘導 NETs の HK-2 に対する細胞傷害性を Cell Counting Kit による細胞生存率で評価し, Bard の尿細管上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が (図 10), ANCA 誘導 NETs による細胞傷害性は, Bard で前処置することにより有意に低下した.

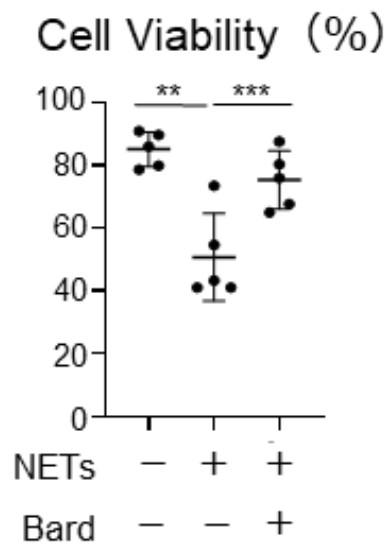
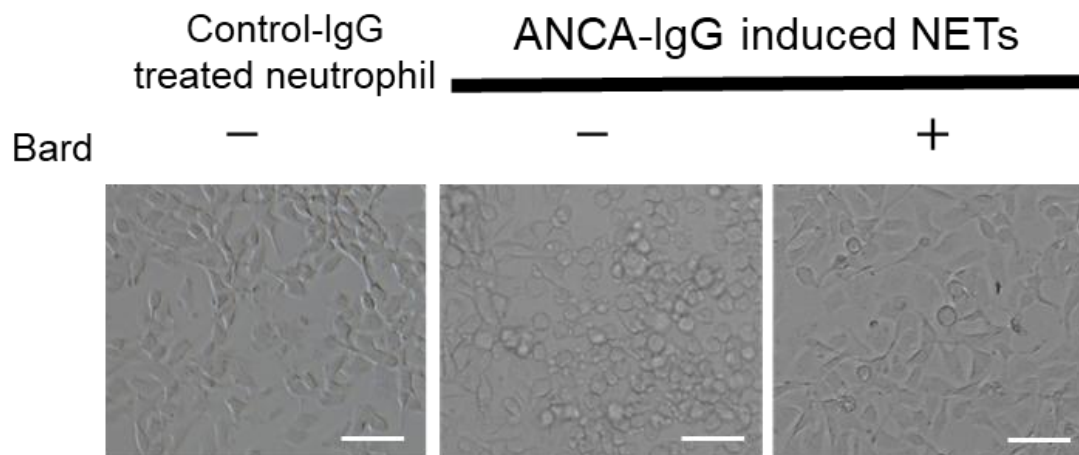


図 10 ANCA 誘導 NETs の HK-2 に対する細胞傷害性および Bard の効果
Cell Counting Kit により細胞生存率を解析した,データは平均±標準誤差で示した.
n=5/群. **p<0.01 ***p<0.001

8.4 考察

本実験から, ANCA 誘導 NETs は血管内皮細胞, 尿細管上皮細胞を直接傷害し, さらに Nrf2 活性化薬は血管内皮細胞傷害, 尿細管上皮細胞に作用し NETs による細胞傷害に対して保護的に働くことが示された.

第二章, 第三章では, Nrf2 活性化薬が ANCA で誘導される NETs の形成を抑制する効果があることが示唆されたが, 本章では Nrf2 活性化薬は糸球体血管内皮細胞や尿細管上皮細胞において NETs による細胞傷害を直接軽減することが示された. 以上より, Nrf2 活性化薬は AAV において, NETs 形成の抑制のみならず, NETs に起因する臓器傷害に対しても直接的な細胞保護作用を有することが示された.

9. 第五章

AAV 誘導モデルマウスにおける Nrf2 活性化薬の効果の検討

9.1 緒言

第二章, 第三章では Nrf2 が ROS の制御を介して NETs 形成に関与していることが示され, 第四章では Nrf2 活性化薬による血管内皮細胞, 尿細管上皮細胞へ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 Nrf2 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 の動物モデルには, 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, WEHI-3 細胞から MPO を抽出し, MPO 欠損マウスに投与することで抗 MPO 抗体(ANCA)を産生させ, その抗 MPO 抗体を野生型マウスに投与することで AAV 様の腎炎を呈するモデルマウスである. このモデルを用いて Nrf2 活性化薬による薬理的活性化により血管炎の疾患活動性を検証した.

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°C 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

培養した WEHI-3 細胞を遠心分離し, リン酸ベースの緩衝液でホモジナイズした後, 上清を酢酸ナトリウムベースの緩衝液で限外濾過し, MPO を含む細胞内蛋白を回収した. Concanavalin 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 蛋白は, SDS-PAGE 後に銀染色で確認した.

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 で得られたマウス由来 MPO 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 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 (ELISA 法)

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 週齢の雄の C57BL6 (WT)マウスを Bard 群(n=7)と PBS 群(n=7)に分け, 0 および 22 時間にそれぞれ Bard(5-10mg/kg)と PBS を腹腔内注射した. 抗 MPO 抗体を含む血清 100 μ l を静脈注射し, その 1 時間後に LPS (Merck) 50 μ g を腹腔内投与した. コントロールとして B6WT マウス (n=5) に刺激していない *MPO*^{-/-}マウスから採取したコントロール血清を 100 μ l 静脈注射し, その 1 時間後に LPS 50 μ g を腹腔内投与した.

9.2.2 AAV 誘導モデルマウスに与える Nrf2 活性化薬の影響

9.2.2.1 生化学検査

AAV モデルマウス屠殺時に末梢血を採取し, 血清中のクレアチニン (Cr) , Blood urea nitrogen (BUN)を Cr kit (serotec), 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, 尿中アルブミンを 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.

9.2.2.3 腎病理組織学検査

解剖時に両側の腎臓を採取した. 10%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋切片を作成し, Periodic acid Schiff (PAS) 染色, Elastica-Masson 染色を行った. また腎臓を 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 5 μ m の凍結超薄切片を作成し蛍光免疫染色に用いた.

9.2.2.3.1 腎組織に対する PAS 染色

腎臓の PAS 染色では, 切片上の全ての糸球体のうち糸球体腎炎 (半月体, 管内細胞増殖) の所見を認める糸球体の割合を定量化して評価した. 尿細管間質は 1 切片あたり 10 視野 (倍率 200 倍) をランダムに観察し尿細管間質障害の所見 (尿細管萎縮, 炎症細胞浸潤, 尿細管円柱) の割合に応じてスコアリング (0 点: <5%; 1 点: 5-25%; 2 点: 25-50%; 3 点: 50-75%; 4 点: 75-100%) し, 10 視野平均のスコアで評価した.

9.2.2.3.2 NQO1 免疫染色

Nrf2 の関与を腎組織の NQO1 染色で評価した。パラフィン切片を脱パラフィンし、10mM クエン酸ナトリウム緩衝液で抗原賦活化したのち、1% BSA でブロッキングして 100 倍に希釈した rabbit anti NQO1 抗体 (Abcam) を滴下し、4°C 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 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。NQO1 陽性細胞は、腎皮質 10 視野 (倍率 200 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。

9.2.2.3.3 DHE 染色

マウス腎組織の ROS を Dehydroethidium (DHE) 染色で評価した。DHE は ROS を反応し赤色に蛍光する性質をもつ。マウス腎凍結切片(5μm)を PBS で 3 回洗浄した後、1mM の DHE を 100ul 滴下し遮光して 30 分室温放置した。PBS で 3 回洗浄した後封入剤で封入して蛍光顕微鏡で観察した。

9.2.2.3.4 Ly6B/CitH3 免疫染色

マウス好中球マーカーである Ly6B と NETs 形成シグナルである CitH3 を腎組織の蛍光免疫染色で評価した。パラフィン切片を脱パラフィンし、10mM クエン酸ナトリウム緩衝液で抗原賦活化したのち、10% goat 血清でブロッキングして 100 倍に希釈した rat anti Ly6B 抗体 (Bio-Rad) , rabbit anti CitH3 antibody (Abcam) を滴下し、4°C 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 alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG と alexa Fluor 488 goat anti-rat 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。Ly6B, CitH3 陽性細胞は切片中の糸球体における mean luminance value を ImageJ で測定し定量評価した。

9.2.3 統計学的解析

2 群間比較は Mann-Whitney の U 検定を、多群間比較は Kruskal-Wallis 検定 post hoc Steel 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 Graphpad prism®を用いて行った。

9.3 結果

9.3.1 生化学検査

腎機能の指標である血清 Cr, BUN 値は Mock(PBS)群で高値であったが, Bard 群で有意に低下しており腎機能障害が抑制されていた. 糸球体上皮傷害を反映する尿中アルブミンは有意差を認め無かった(図 11)

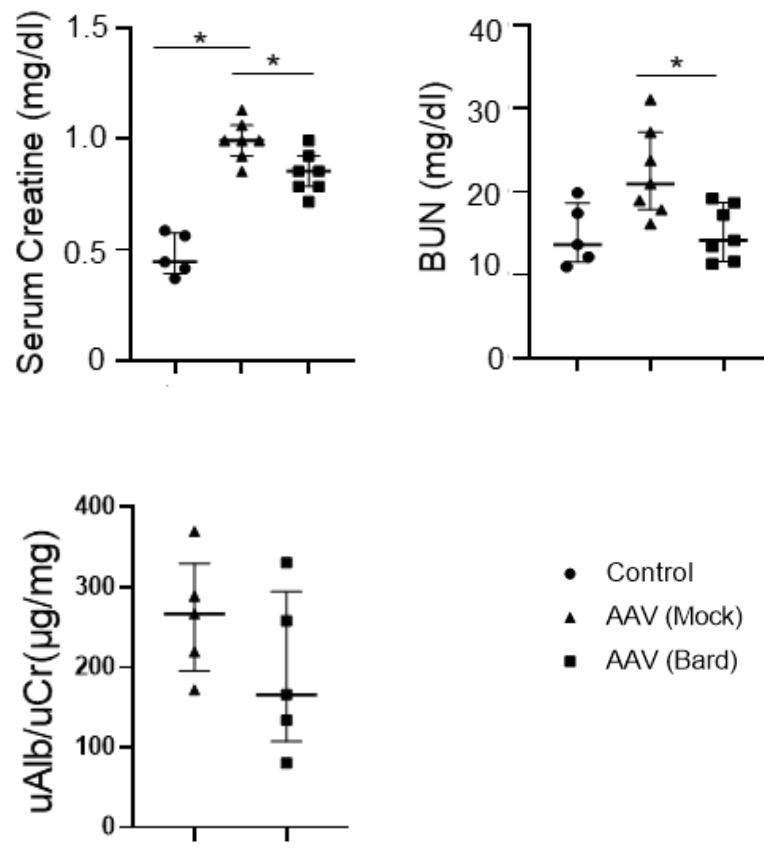


図 11 AAV モデルマウスにおける腎機能の評価
血清クレアチニンと BUN 値による腎機能および尿中アルブミン量を解析した。
データは平均値±標準偏差で示した. *P<0.05

9.3.2 糸球体腎炎および尿細管間質障害の検討

腎臓の糸球体病変を PAS 染色で評価した。MPO-IgG を投与した Bard 群マウスでは組織学的変化が乏しかったが、PBS 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、Bard 群が PBS 群と比較して糸球体腎炎の割合が有意に少なかった。また、腎臓の尿細管間質病変を Elastica-Masson 染色で評価した。MPO-IgG を投与した PBS 群では尿細管萎縮や間質のリンパ球浸潤、円柱所見を多く認め尿細管スコアが高かったが、Bard 群では PBS 群と比較して尿細管障害スコアが有意に低かった (図 12)。

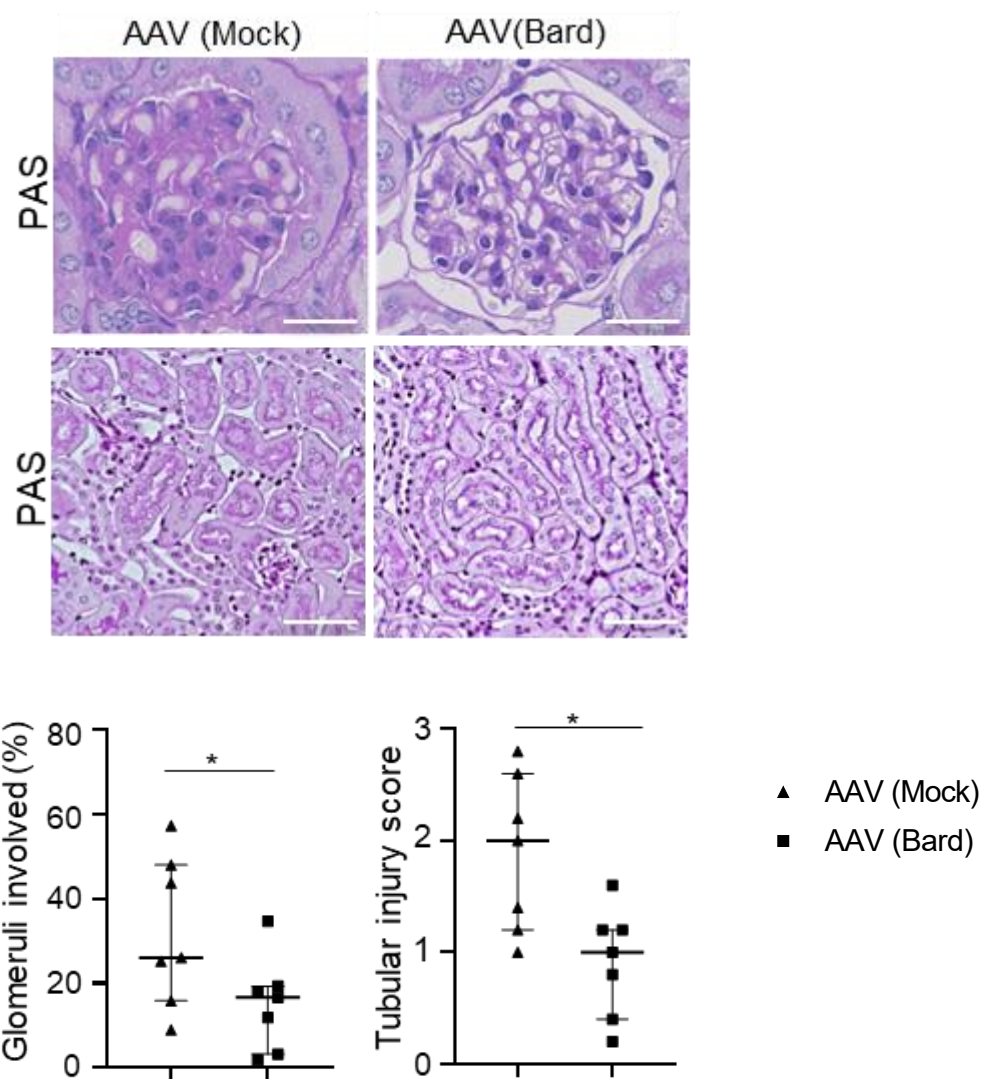


図 12 AAV モデルマウスの腎炎の組織学的評価
腎臓組織の PAS 染色. Scale bar : 50 μ m 糸球体病変の割合と尿細管損傷スコアを解析した. データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. *P<0.05

9.3.3 腎臓における ROS および抗酸化蛋白 NQO1 発現

腎臓における ROS を DHE 染色で評価した。ROS を反映する DHE 陽性細胞は Mock 群で多く, Bard 投与群では有意に少なかった。また, ROS に対する抗酸化応答として抗酸化蛋白の NQO1 染色で評価したところ, Bard 投与群では Mock 群と比較して NQO 1 陽性細胞が有意に増加していた (図 13)

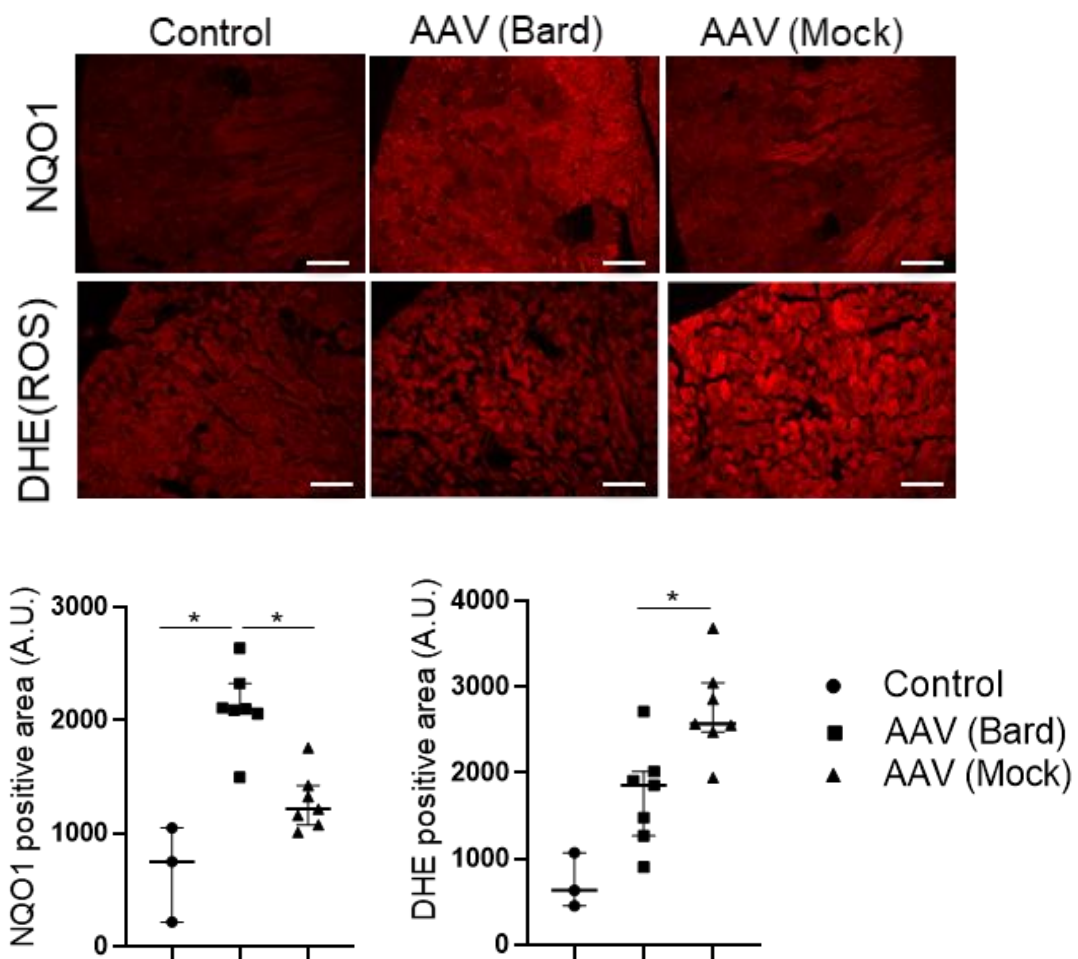


図 13 AAV モデルマウスの抗酸化応答
腎組織の NQO1-および DHE-染色, scale bar : 50 μ m.
ImageJ software にて定量評価し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. *P<0.05

9.3.4 腎糸球体における NETs 浸潤

AAV での腎臓への NETs の影響を調べるために好中球マーカーの Ly6B 染色と NETs の指標である CitH3 染色を用いて評価した. Mock 群と Bard 群で Ly6B 陽性細胞の数は差が無かったが, CitH3 陽性 Ly6B 陽性の細胞は, Bard 群では Mock 群と比較して有意に少なかった (図 14).

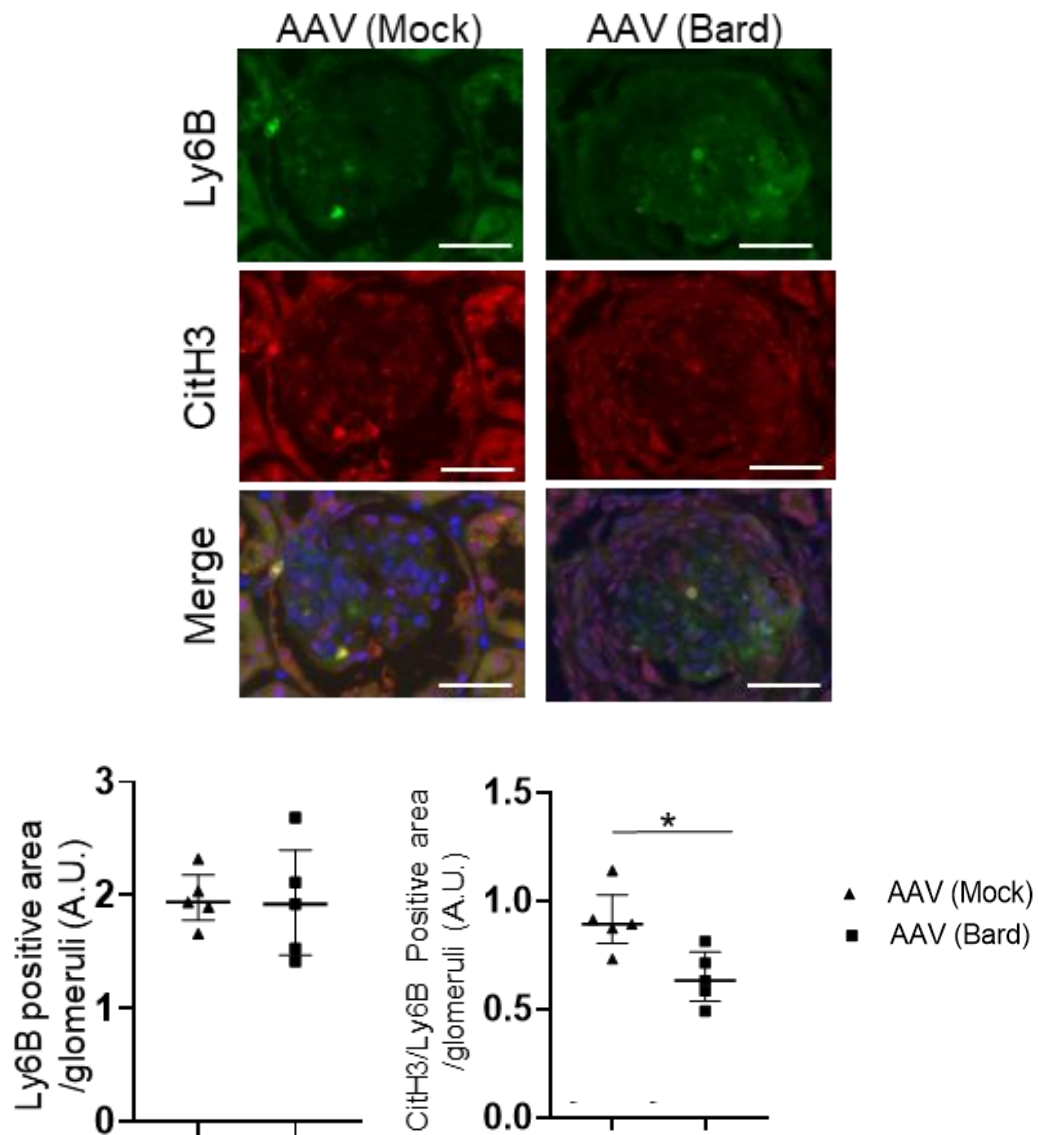


図 14 AAV モデルマウスの NETs 形成

腎糸球体における CitH3 と Ly6B の免疫蛍光染色. 緑 : Ly6B, 赤 : CitH3, 青 : DAPI, Scale bar : 50 μm グラフは糸球体における Ly6B 陽性領域と CitH3/Ly6B 二重陽性領域を ImageJ software にて定量評価し, 平均値±標準偏差で示した. Bard; n = 5, Mock; n = 5, *P< 0.05

9.4 考察

本章では, AAV 誘導モデルマウスを用いて, Nrf2 の薬理的活性化の効果を検証した. 本実験で Nrf2 活性化薬は腎組織の抗酸化蛋白 NQO1 の発現を増強することで AAV における組織への酸化ストレスを軽減し, 血管内皮細胞と尿細管上皮細胞に対して細胞保護的に働くことが示された. また, 腎局所での NETs が Nrf2 活性化薬により軽減されたことは, Nrf2 が *in Vivo* においても NETs 形成に影響をあたえることを示唆している. これらの結果は第二章から第四章で示してきた *in vitro* での Nrf2 活性化の効果を支持する結果であり, Nrf2 活性化薬は AAV において, NETs 形成の抑制と組織での抗酸化応答の強化による二つの経路により腎炎の改善に寄与する可能性がある.

10. 第六章

自然発症 AAV モデルマウスに対する Nrf2 活性化薬の効果

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, Nrf2 の薬理的活性化により NETs 形成が抑制され組織での抗酸化応答が増強することで腎炎が改善する事を示した. しかし, 同モデルでは ANCA 産生能を含む免疫学的異常を評価できず, さらに観察された効果が抗体移入型 AAV モデルに特有の現象である可能性も否定できない. . そこで本章では, ANCA を産生し血管炎を自然発症する SCG/Kj マウス(Kinjoh et al, 1993)に対して, Bard を投与することで Nrf2 活性化が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) とコントロールとして C57BL6(WT)マウスを用いた.

10.2.2 SCG/Kj マウスに与える Nrf2 活性化薬の影響

10.2.2.1 生化学検査

マウス屠殺時に末梢血を採取し, 血清中のクレアチニン (Cr) , Blood urea nitrogen (BUN)を Cr kit (serotec), BUN kit (serotec) を用いて測定した.

10.2.2.2 尿検査

屠殺前に代謝ケージを用いて蓄尿を行い, 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.

10.2.2.3 腎病理組織学検査

解剖時に両側の腎臓を採取した. 10%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋切片を作成し, Periodic acid Schiff (PAS) 染色を行った. また腎臓を 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 5 μ m の凍結超薄切片を作成し蛍光免疫染色に用いた.

10.2.2.3.1 腎組織に対する PAS 染色と Elastica-Masson 染色

腎臓の PAS 染色では, 切片上の全ての糸球体のうち糸球体腎炎 (半月体, 管内細胞増殖) の所見を認める糸球体の割合を定量化して評価した. 腎臓の Elastica-Masson 染色では 1 切片あたり 10 視野 (倍率 200 倍) をランダムに観察し尿細管間質障害の所見 (線維化, 尿細管萎縮, 空胞変性) の割合に応じてスコアリング (0 点: < 5%; 1 点: 5-25%; 2 点: 25-50%; 3 点: 50-75%; 4 点: 75-100%) し, 10 視野平均のスコアで評価した.

10.2.2.3.2 Ly6B/CitH3 免疫染色

腎臓のパラフィン切片を脱パラフィンし, 10mM クエン酸ナトリウム緩衝液で抗原賦活化したのち, 5% goat 血清でブロッキングして 100 倍に希釈した rat anti Ly6B 抗体 (Bio-Rad), rabbit anti CitH3 antibody (Abcam) を滴下し, 4°C 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 alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG と alexa Fluor 488 goat anti-rat 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.

Ly6B, CitH3 陽性細胞は, 切片中の糸球体における mean luminance value を ImageJ で測定し定量評価した.

10.2.2.3.3 CD31/TUNEL 染色

血管内皮細胞マーカーである CD31 を腎組織の蛍光免疫染色で評価し, 壊死病変を TUNEL 染色とともに評価した. 10.2.2.3.5 と同様にして切片を抗原賦活化した後 5% goat 血清でブロッキングし, 20 倍に希釈した rabbit anti CD31 抗体 (BD Biosciences) を滴下し, 4°C 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 alexa Fluor 594 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 TUNEL 染色を行い, DAPI を含む封入剤で封入し, 蛍光顕微鏡で観察した. CD31・TUNEL 陽性細胞は, 切片中の糸球体における mean luminance value を Image J で測定し定量評価した.

10.2.2.4 抗酸化応答の評価

10.2.2.4.1 NQO1 免疫染色

腎組織のパラフィン切片を脱パラフィンし, 10mM クエン酸ナトリウム緩衝液で抗原賦活化したのち, 1% BSA でブロッキングして 100 倍に希釈した rabbit anti NQO1 抗体 (Abcam) を滴下し, 4°C 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 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. NQO1 陽性細胞は, 腎皮質 10 視野 (倍率 200 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.

10.2.2.4.2 DHE 染色

マウス腎凍結切片(5 μ m)を PBS で 3 回洗浄した後, 1mM の DHE を 100ul 滴下し遮光して 30 分室温放置した. PBS で 3 回洗浄した後封入剤で封入して蛍光顕微鏡で観察した.

10.2.2.4.3 Western Blotting

凍結した腎組織をホモジナイズし, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl 溶液, 1% Triton, 1 mM EDTA, 1X protein inhibitor cocktail (Roche Life Science), phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, #P5726, #P0044) を含むバッファーで溶解した. タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離し, ポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜に転写した. この膜を 5%脱脂乳でブロッキングし, rabbit anti-NQO1 抗体 (Abcam) を 4°Cで一晩プローブした後, 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 (Thermo Scientific) とインキュベートした. タンパク質シグナルは Super Signal (Thermo Scientific) を用いて検出した.

10.2.2.5 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 値の測定を A-CLIP 研究所に依頼した.

10.2.3 統計学的解析

2 群間比較は Mann-Whitney の U 検定を, 多群間比較は Kruskal-Wallis 検定 post hoc Steel 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 Graphpad prism®を用いて行った.

10.3 結果

10.3.1 生化学検査

血清 Cr, BUN 値は Mock(PBS)群で高値であったが, Bard 群で有意に低下しており腎機能障害が抑制されていた. 尿蛋白は有意差を認めなかった(図 15)

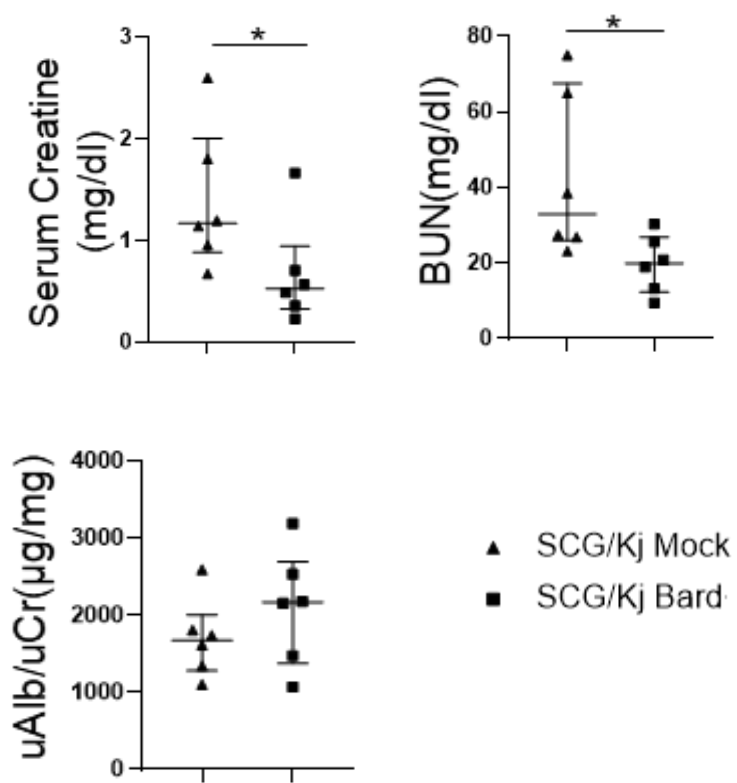


図 15 血管炎自然発症モデルマウスにおける腎機能の評価
血清クレアチニンと BUN および尿中アルブミンを ELISA 法で定量解析しデータは平均値±標準偏差で示した。 *P<0.05

10.3.2 糸球体腎炎および尿細管間質障害の検討

腎臓の糸球体病変を PAS 染色で評価した. Mock 群では半月体形成性腎炎やメサングウム増殖性腎炎の所見を認め, Bard 群は Mock 群と比較して糸球体腎炎の割合が有意に少なかった. また, 腎臓の尿細管間質病変を Elastica-Masson 染色で評価した. Mock 群では尿細管萎縮や間質の繊維化, 円柱が多く, Bard 群では Mock 群と比較して尿細管障害スコアが有意に低かった (図 16).

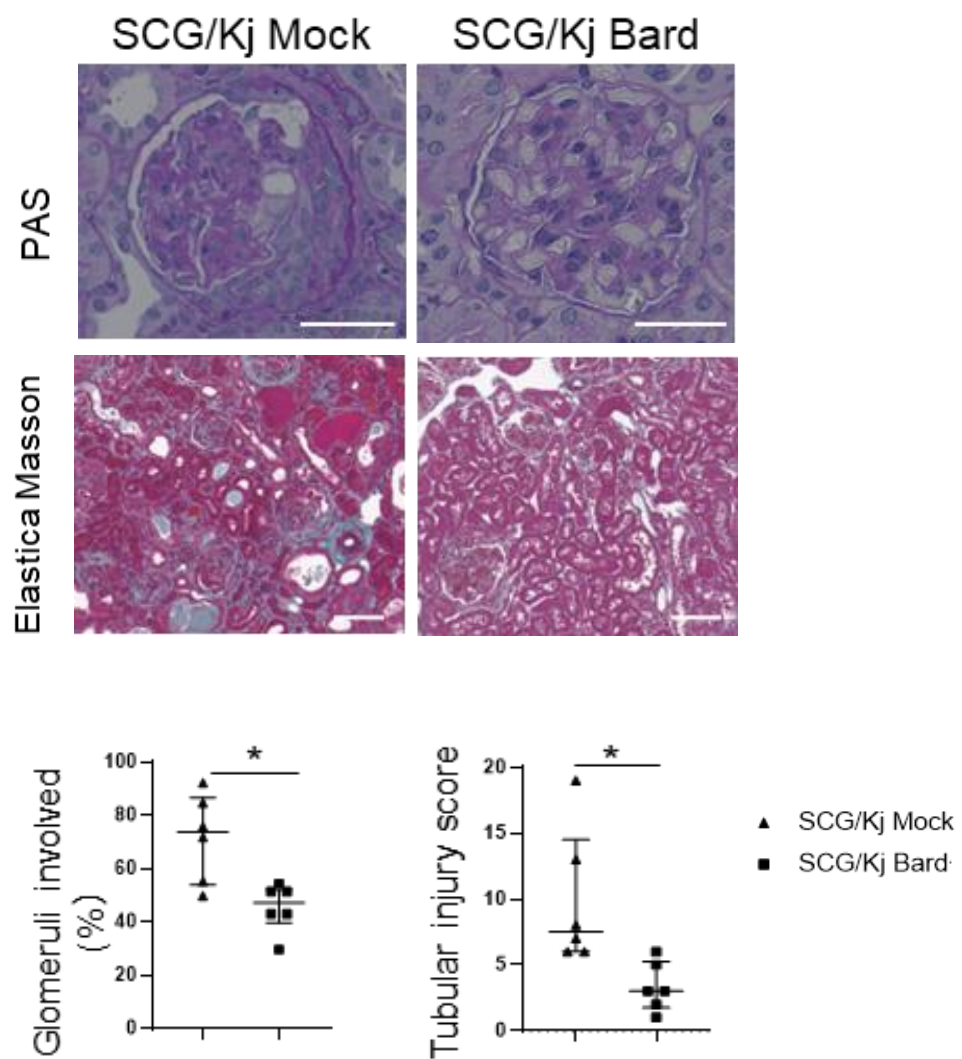


図 16 腎組織の PAS 染色

Scale bar : 50 μ m. 糸球体病変の割合と尿細管損傷スコアを解析した. データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した.*P<0.05

10.3.3 腎糸球体における NETs 浸潤

AAV での腎臓への NETs の影響を調べるために好中球マーカーの Ly6B 染色と NETs の指標である CitH3 染色を用いて評価した. Mock 群と Bard 群で Ly6B 陽性細胞の数は差が無かったが, CitH3 陽性 Ly6B 陽性の細胞は, Bard 群では Mock 群と比較して 有意に少なかった (図 17).

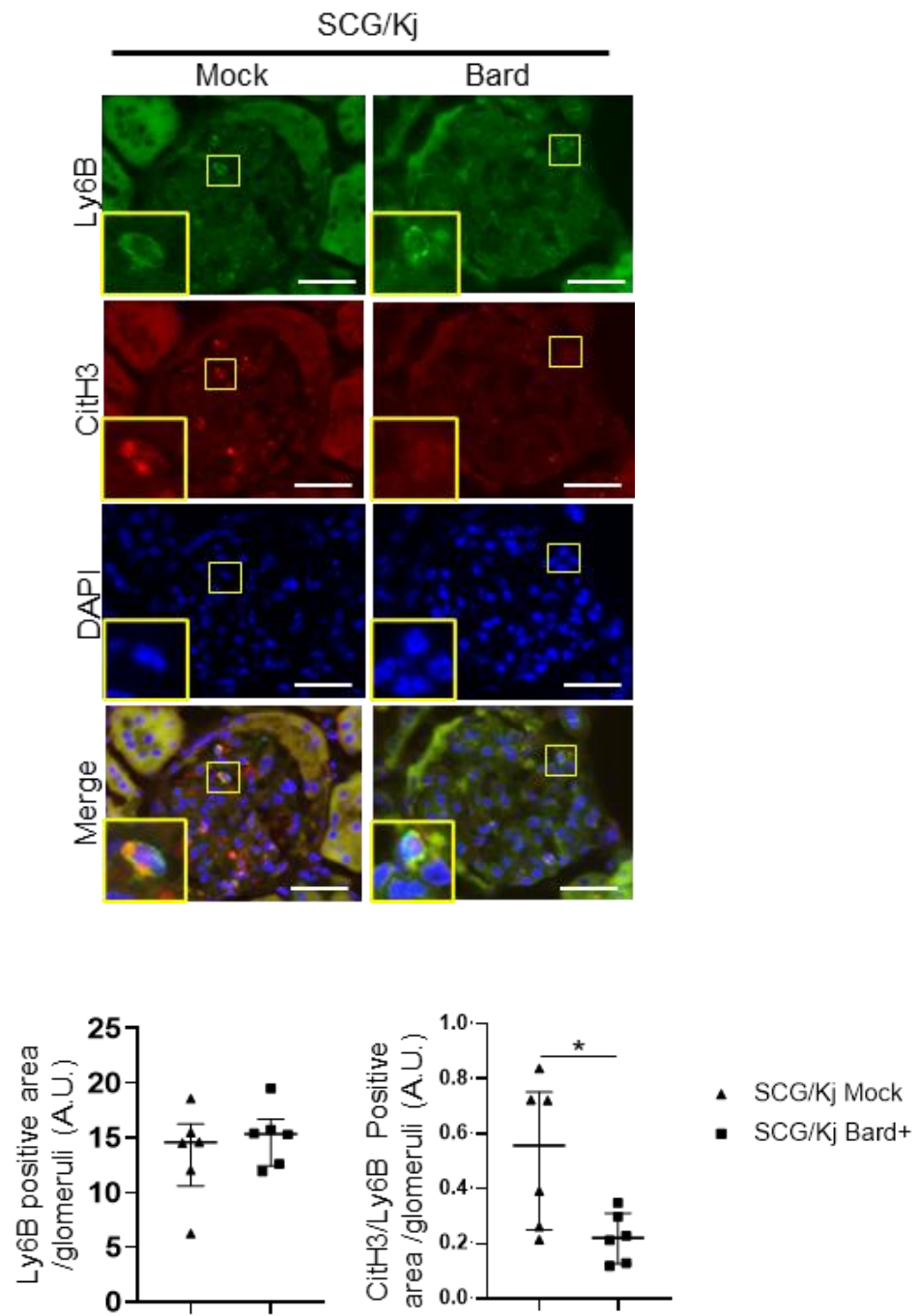


図 17 腎糸球体における CitH3 と Ly6B の免疫蛍光染色

緑:Ly6B, 赤:CitH3, 青:DAPI, Scale bar: 50 μ m. Ly6B 陽性領域と CitH3/Ly6B 二重陽性領域を ImageJ software にて解析し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. Bard; n = 5, Mock; n = 5, *P< 0.05

10.3.4 腎糸球体における血管内皮傷害の評価

AAV における血管内皮障害と壊死の関係を、血管内皮細胞のマーカーである CD31 染色と、TUNEL 染色を用いて評価した。糸球体では Bard 群は Mock 群と比較して CD31 陽性細胞が有意に多く、TUNEL 陽性細胞が有意に減少していた (図 18)。

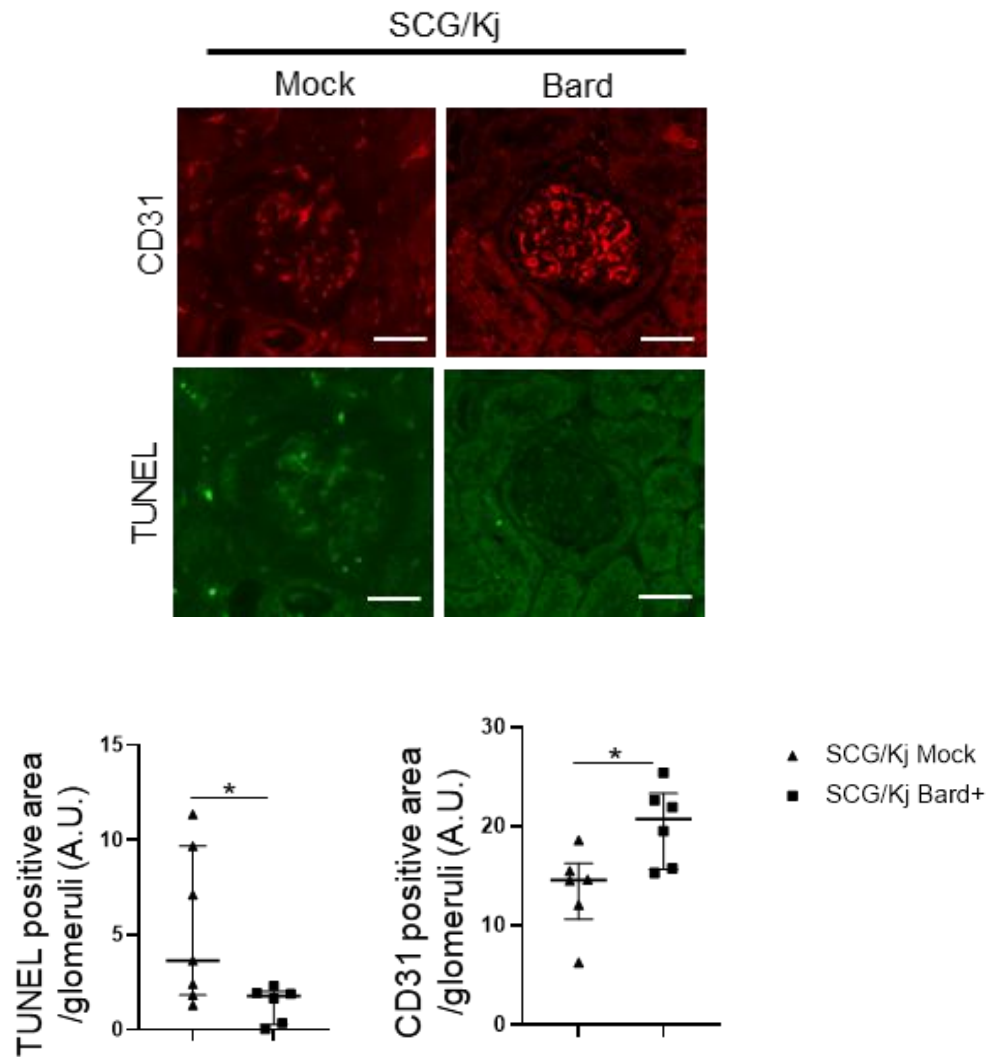


図 18 腎糸球体における CD31 蛍光染色と TUNEL 染色
 赤：CD31, 緑：TUNEL 染色. Scale bar：50 μ m. CD31 陽性領域と TUNEL 陽性領域を ImageJ software にて解析し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した.
 Bard; n = 6, Mock; n = 6, *P< 0.05

10.3.5 腎臓の ROS および抗酸化蛋白 NQO1 の評価

腎組織で抗酸化蛋白の NQO1 の発現を免疫染色で, ROS は DHE 染色を評価した. Bard 群では Control 群, Mock 群と比較し NQO1 の発現が有意に上昇した. また Mock 群では Bard 投与群と比較し NQO1 の発現が有意に低下し, ROS が有意に増加した(図 19).

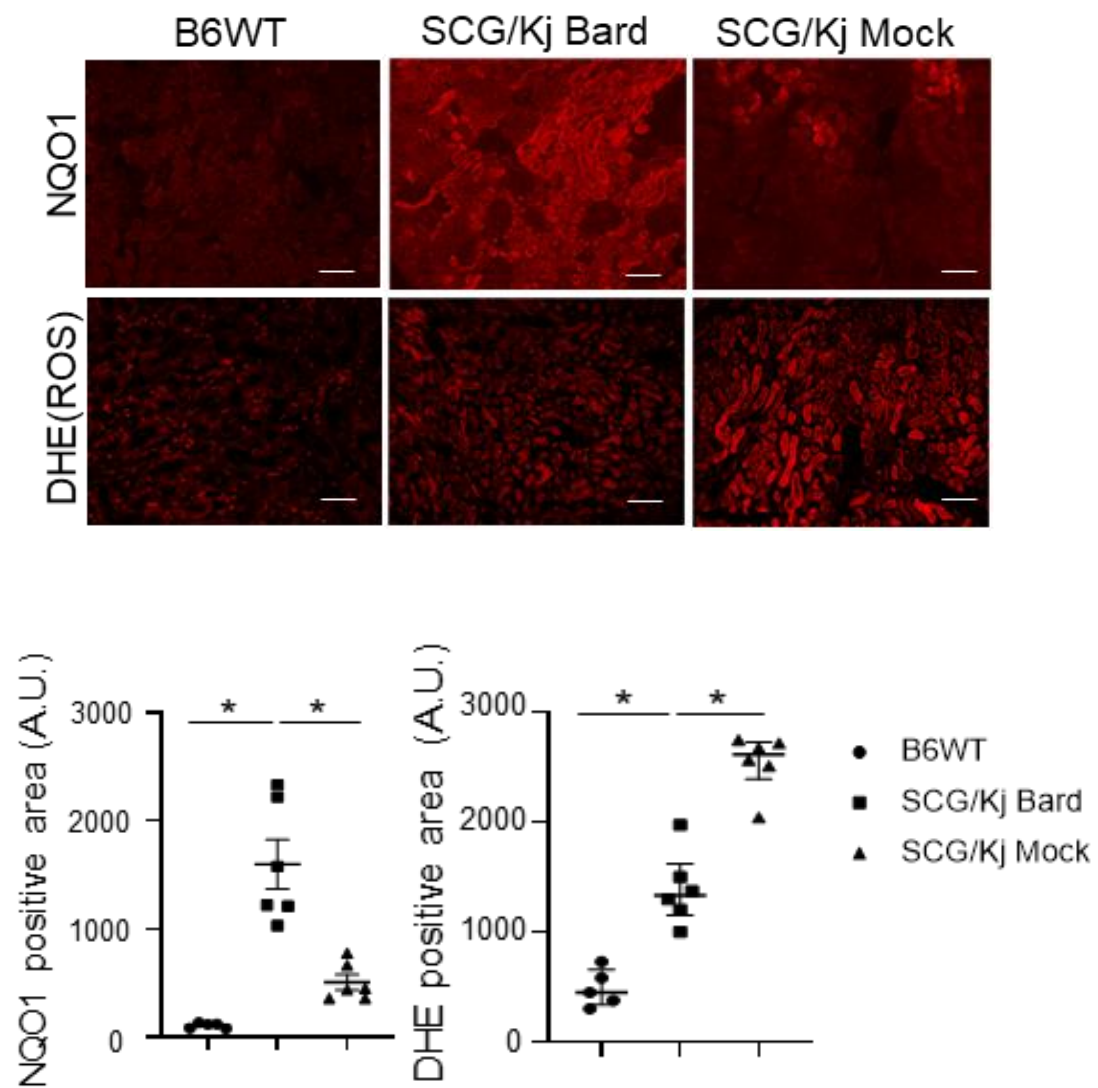


図 19 腎組織の NQO1-および DHE-染色

Scale bar : 50 μ m. ImageJ software にて定量評価し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した.

*P<0.05

10.3.6 Western Blotting による腎臓の NQO1 発現の評価

腎組織で抗酸化蛋白の NQO1 の発現を Western Blotting で評価した. Bard 群では Control 群, Mock 群と比較し NQO1 の発現が有意に上昇していた(図 20).

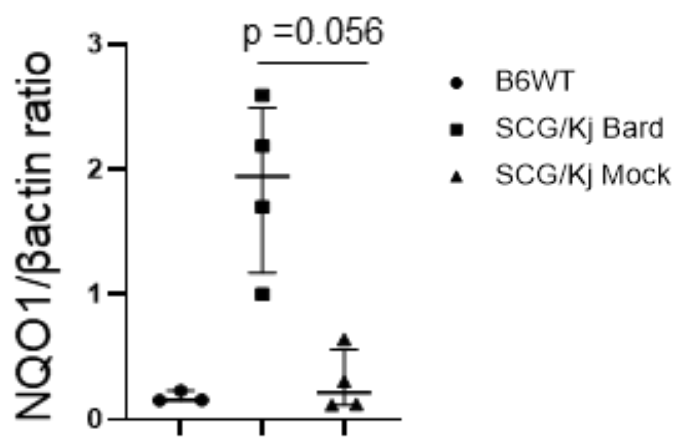
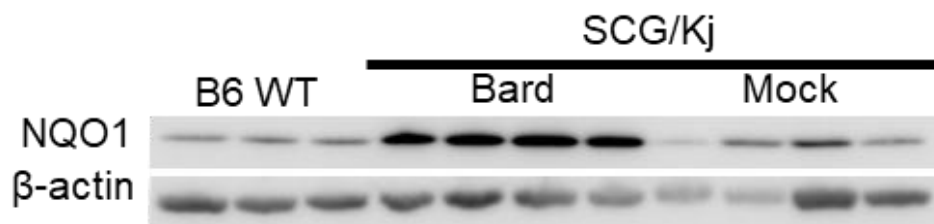


図 20 腎臓の NQO1 のタンパク質発現

Western Blotting により検出. NQO1/ β -アクチン比を示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した. Bard $^{+}$; n = 4, Mock; n = 4. *P<0.05.

10.3.7 Nrf2 活性化による MPO-ANCA への影響

Nrf2 の薬理的活性化が自己抗体産生に与える影響を評価するために, MPO-ANCA を測定した. Mock 群と Bard 群において, MPO-ANCA は有意な差を認めなかった (図 21).

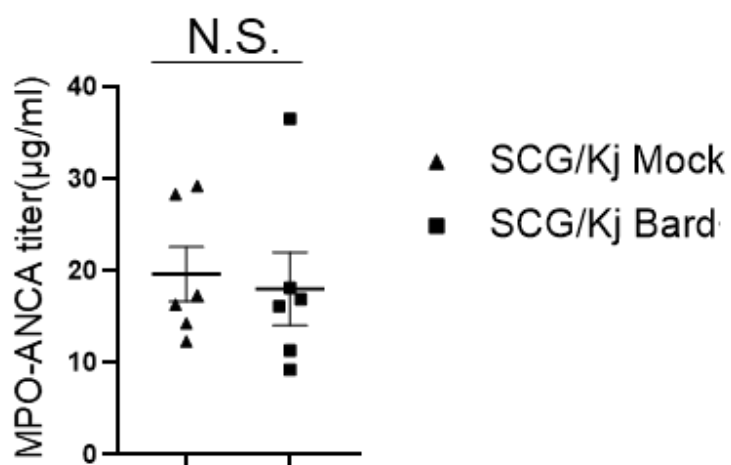


図 21 血清 MPO-ANCA 値

末梢血中の MPO-ANCA-IgG 値を定量評価し解析し平均値±標準偏差で示した.
Bard; n = 6, Mock; n = 6.

10.4 考察

本章では血管炎自然発症モデルマウスを用いて, Nrf2 活性化薬の効果を検証した. 本実験では Nrf2 活性化薬の投与によって, 糸球体腎炎, 尿細管上皮傷害のいずれも組織学的に改善しており, 第五章の ANCA 移入モデルと同様の結果を認めた. 血管炎自然発症モデルの腎組織では ROS が多く生じていることが分かったが, Bard 投与により抗酸化蛋白の NQO1 の発現が亢進するとともに ROS 自体の活性も低下していた. また, 腎糸球体での NETs 浸潤が Nrf2 活性化薬により抑制され, 同じく糸球体の血管内皮細胞障害も改善していたことから, Nrf2 が NETs 形成と NET s による血管内皮障害を制御している可能性が考えられる. 第五章の結果と併せて, Nrf2 は NETs 形成の抑制と組織での抗酸化応答の強化による二つの経路による細胞保護効果が想定されるが, 一方で ANCA-IgG の titer には影響せず, 自己抗体産生の病態には寄与しないことが示唆された. このことは Nrf2 活性化は ANCA-IgG の産生抑制を介さずに腎組織局所での NETs 誘導の抑制, ならびに腎固有細胞の保護を担う役割があることが示唆された.

11. 第七章

自然発症 AAV モデルマウスにおける Nrf2 欠損の意義

11.1 緒言

第五章では ANCA 移入型 AAV 誘導モデルマウスにおいて、第六章では血管炎自然発症マウスにおいて、Nrf2 の薬理的活性化により NETs が抑制され、腎炎が改善することを示した。本章では、Nrf2 遺伝子そのものが病態に及ぼす直接的な影響を検証するために、SCG/Kj マウスと Nrf2 遺伝子欠損マウスとの戻し交配により作成したモデルを用いて、Nrf2 欠損が血管炎病態に与える影響を検討した。

11.2 方法

11.2.1 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.

11.2.2 SCG/Kj マウスと *Nrf2*^{-/-}の戻し交配

SCG/Kj マウス (雄) と *Nrf2*^{-/-}マウス (雌) を N3 世代まで戻し交配を行った. N3 世代の *Nrf2*^{+/-}同士を交配させ, *Nrf2*^{+/+} (14 週齢の雌) (n=7/群) と *Nrf2*^{-/-} (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表 1 に記載した.

表 1 PCR に用いたプライマー配列

Gene (Forward / Reverses)	Primer Swquences (5' to 3')
Nrf2 Wild type Forward	GCC GCC TTT TCA GTA GAT GGA GG
Nrf2 Wild type Reverse	TGG GGA CTA TTG AAG GCT G
Nrf2 Mutant Forward	GCG GAT TGA CCG TAA TGG GAT AGG

11.2.3 生化学検査

AAV モデルマウス屠殺時に末梢血を採取し, 血清中のクレアチニン (Cr) , Blood urea nitrogen (BUN)を Cr kit (serotec), BUN kit (serotec) を用いて測定した.

11.2.4 尿検査

屠殺前に代謝ケージを用いて蓄尿を行い, 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.

11.2.5 腎病理組織学検査

解剖時に両側の腎臓を採取した。10%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋切片を作成し、Periodic acid Schiff (PAS) 染色を行った。また腎臓を 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 5 μ m の凍結超薄切片を作成し蛍光免疫染色に用いた。

11.2.5.1 腎組織に対する PAS 染色と Elastica-Masson 染色

腎臓の PAS 染色では、切片上の全ての糸球体のうち糸球体腎炎（半月体，管内細胞増殖）の所見を認める糸球体の割合を定量化して評価した。腎臓の Elastica-Masson 染色では 1 切片あたり 10 視野（倍率 200 倍）をランダムに観察し尿細管間質障害の所見（線維化，尿細管萎縮，空胞変性）の割合に応じてスコアリング（0 点: < 5%; 1 点: 5-25%; 2 点: 25-50%; 3 点: 50-75%; 4 点: 75-100%）し，10 視野平均のスコアで評価した。

11.2.5.2 Ly6B/CitH3 免疫染色

腎臓のパラフィン切片を脱パラフィンし，10mM クエン酸ナトリウム緩衝液で抗原賦活化したのち，5% goat 血清でブロッキングして 100 倍に希釈した rat anti Ly6B 抗体（Bio-Rad），rabbit anti CitH3 antibody (Abcam) を滴下し，4°C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 alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG と alexa Fluor 488 goat anti-rat 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。Ly6B, CitH3 陽性細胞は，切片中の糸球体における mean luminance value を ImageJ で測定し定量評価した。

11.2.5.3 CD31/TUNEL 染色

血管内皮細胞マーカーである CD31 を腎組織の蛍光免疫染色で評価し，壊死病変を TUNEL 染色とともに評価した。7.2.2.3.4 と同様にして切片を抗原賦活化した後 5% goat 血清でブロッキングし，20 倍に希釈した rabbit anti CD31 抗体（BD Biosciences）を滴下し，4°C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 alexa Fluor 594 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 TUNEL 染色を行い，DAPI を含む封入剤で封入し，蛍光顕微鏡で観察した。CD31・TUNEL 陽性細胞は，切片中の糸球体における mean luminance value を Image J で測定し定量評価した。

11.2.6 抗酸化応答の評価

11.2.6.1 NQO1 免疫染色

Nrf2 の関与を腎組織は NQO 1 の蛍光免疫染色で評価した. マウス腎のパラフィン切片を脱パラフィンし, 10mM クエン酸ナトリウム緩衝液で抗原賦活化したのち, 1% BSA でブロッキングして 100 倍に希釈した anti-NQO1 antibody (Abcam) を滴下し, 4°C 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 alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG 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. 陽性細胞は, 腎皮質 10 視野 (倍率 200 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.

11.2.6.2 DHE 染色

マウス腎凍結切片(5 μ m)を PBS で 3 回洗浄した後, 1mM の DHE を 100ul 滴下し遮光して 30 分室温放置した. PBS で 3 回洗浄した後封入剤で封入して蛍光顕微鏡で観察した.

11.2.7 Nrf2 遺伝子除去による自己抗体産生能への影響

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

11.2.8 統計学的解析

2 群間比較は Mann-Whitney の U 検定を, 多群間比較は Kruskal-Wallis 検定 post hoc Steel 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 Graphpad prism®を用いて行った.

11.3 結果

11.3.1 生化学検査

血清 Cr, BUN 値は SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}群と比較し, SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}群で有意に高値であり, *Nrf2* 遺伝的欠失によって SCG/Kj マウスの腎機能障害が増悪していた. 一方, 血管炎の形質を持たない *Nrf2*^{+/+} マウスと *Nrf2*^{-/-}マウスでは血清 Cr, BUN に差を認めなかった(図 22)

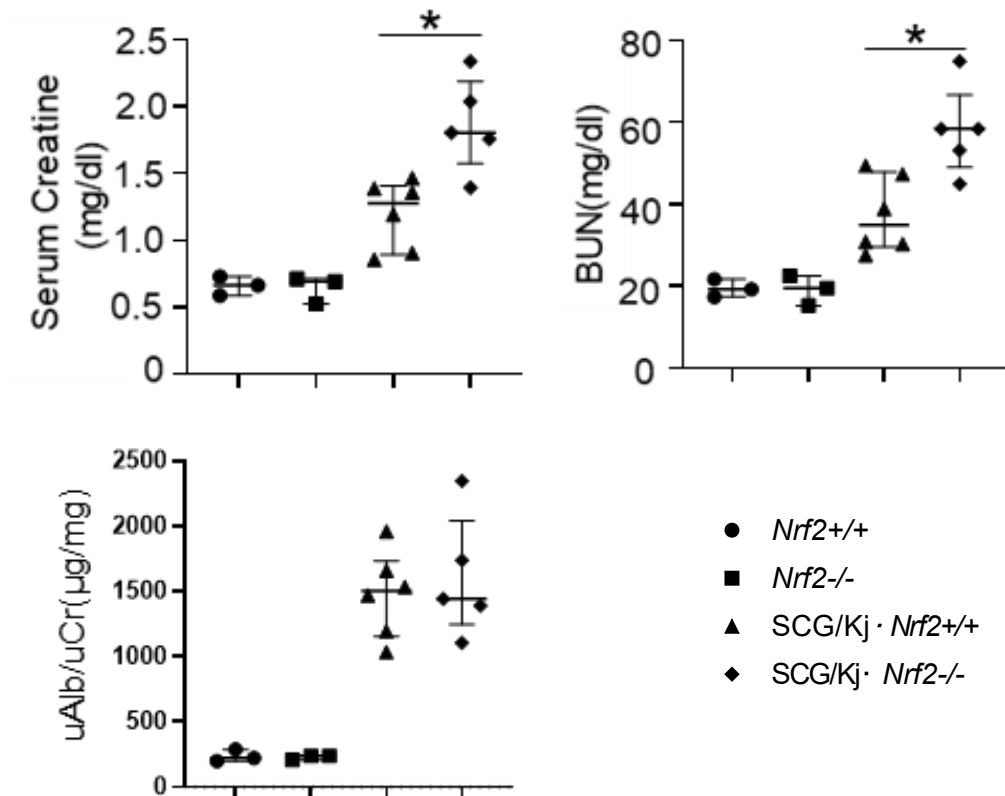


図 22 血清クレアチニンと BUN および尿中アルブミン
ELISA 法で定量解析しデータは平均値±標準偏差で示した. *P<0.05

11.3.2 糸球体腎炎および尿細管間質障害の検討

腎臓の糸球体病変を PAS 染色で、尿細管間質病変を Elastica-Masson 染色でそれぞれ評価した. SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}群と比較し SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}群では糸球体腎炎の割合が有意に増加し、尿細管障害スコアが有意に高かった(図 23).

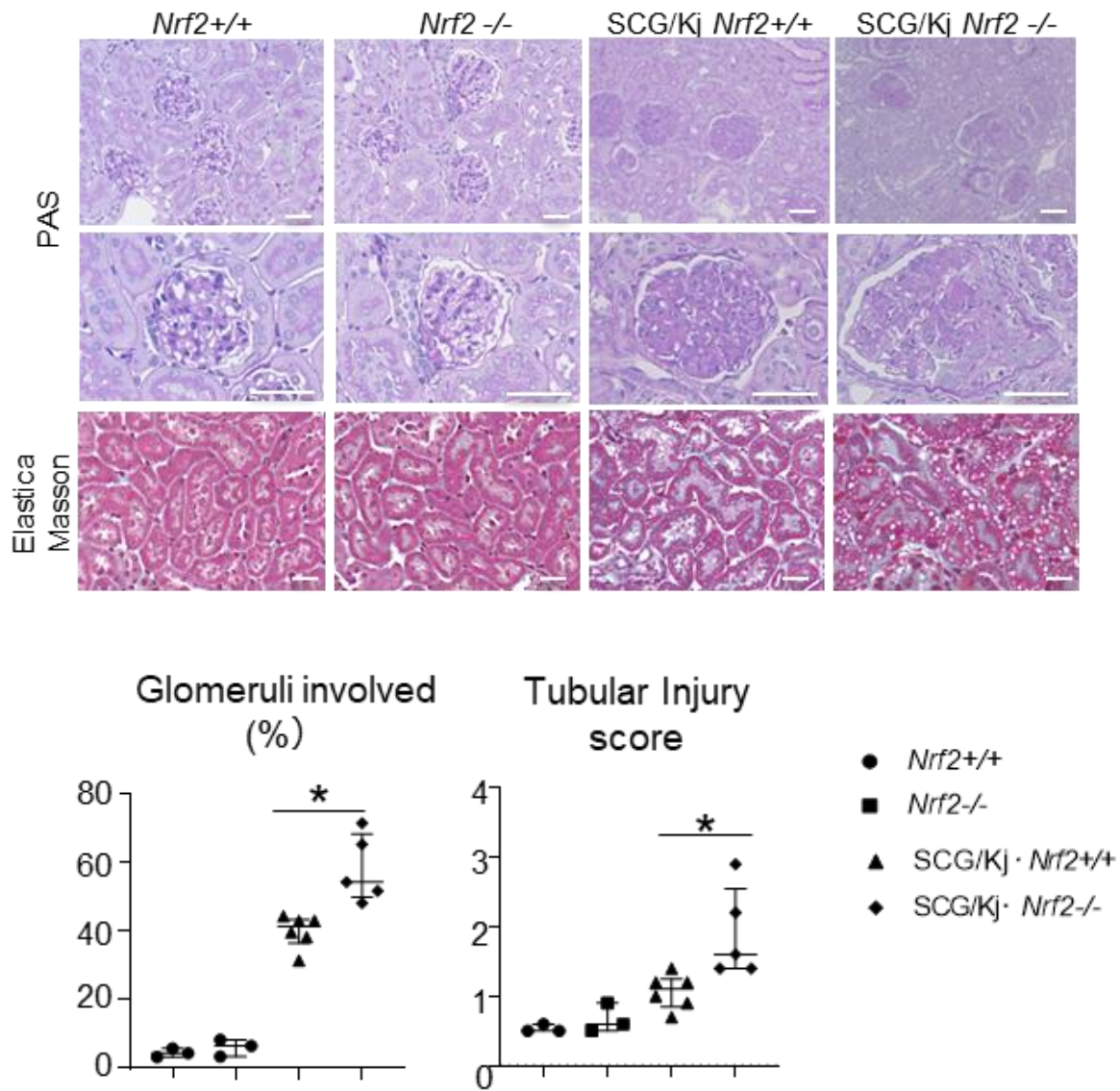


図 23 腎組織の PAS 染色

Scale bar : 50 μ m 糸球体病変の割合と尿細管損傷スコアを解析した. データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. *P<0.05

11.3.3 腎糸球体における NETs 浸潤

AAV での腎臓への NETs の影響を調べるために好中球マーカーの Ly6B 染色と NETs の指標である CitH3 染色を用いて評価した. SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}群と SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}群で糸球体に浸潤する Ly6B 陽性好中球の数に差が無かったが, CitH3 陽性 Ly6B 陽性の細胞は, SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}群では SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}群と比較して 有意に増加 した(図 24).

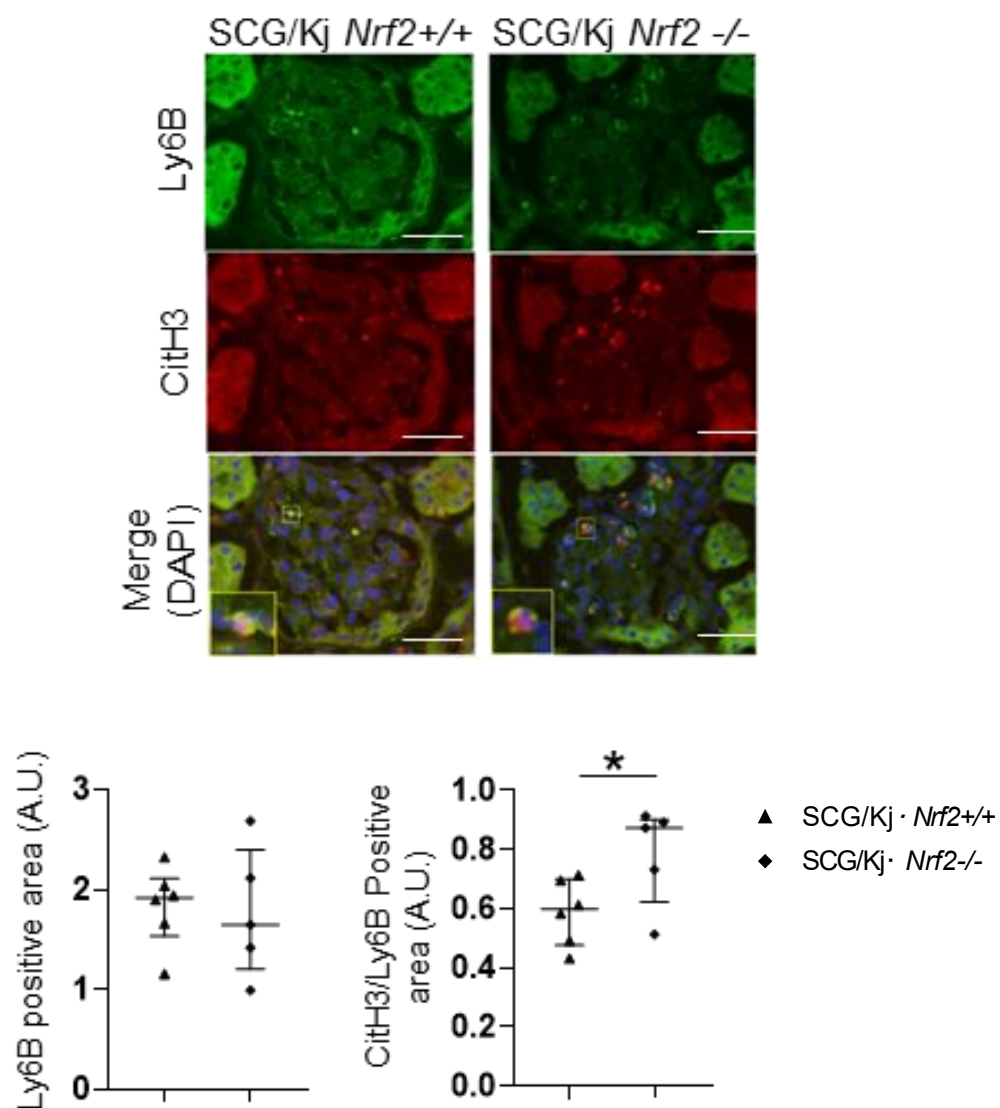


図 24 腎糸球体における CitH3 と Ly6B の免疫蛍光染色
 緑 : Ly6B, 赤 : CitH3, 青 : DAPI, Scale bar : 50 μ m. Ly6B 陽性領域と
 CitH3/Ly6B 二重陽性領域を ImageJ software にて解析し、平均値 $\pm$ 標準偏差で示
 した. *P<0.05

11.3.4 腎糸球体における血管内皮傷害の評価

AAV における血管内皮障害と壊死の関係を, 血管内皮細胞のマーカーである CD31 染色と, TUNEL 染色を用いて評価した. SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}群では SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}群と比較して糸球体内の CD31 陽性細胞が減少し, TUNEL 陽性細胞が有意に増加していた(図 25).

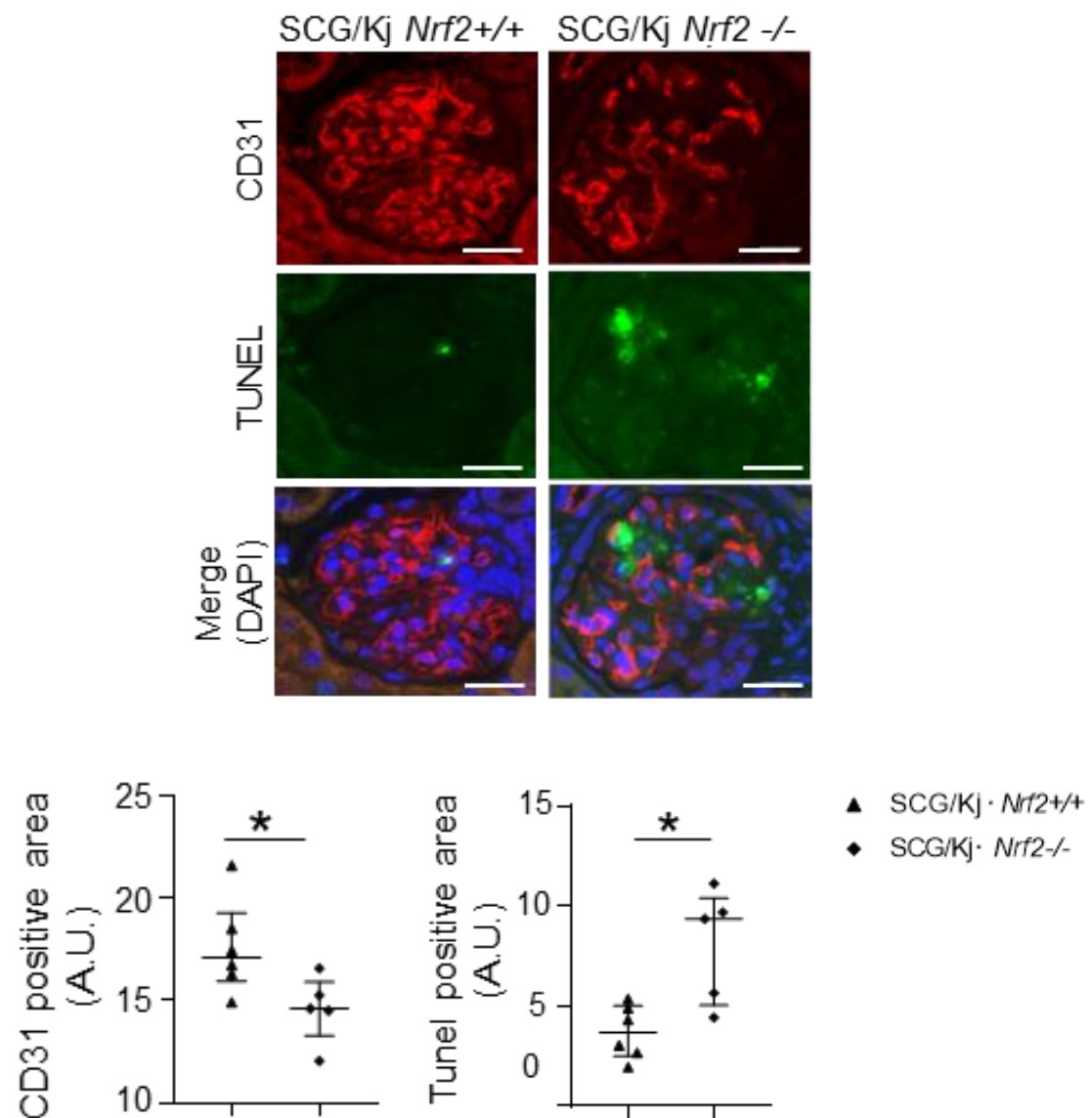


図 25 腎糸球体における CD31 蛍光染色と TUNEL 染色
赤:CD31, 緑:TUNEL 染色, 青:DAPI, Scale bar: 50 μ m. CD31 陽性領域と TUNEL 陽性領域を ImageJ software にて解析し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. * $P < 0.05$

11.3.5 腎臓の ROS および抗酸化蛋白 NQO1 の評価

腎組織で抗酸化蛋白の NQO1 の発現を免疫染色で, ROS は DHE 染色を評価した. SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}群では SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}群と比較し NQO1 の発現が上昇し, ROS は抑制されていたが, SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}群では NQO1 の発現を認めず, ROS が増加していた(図 26).

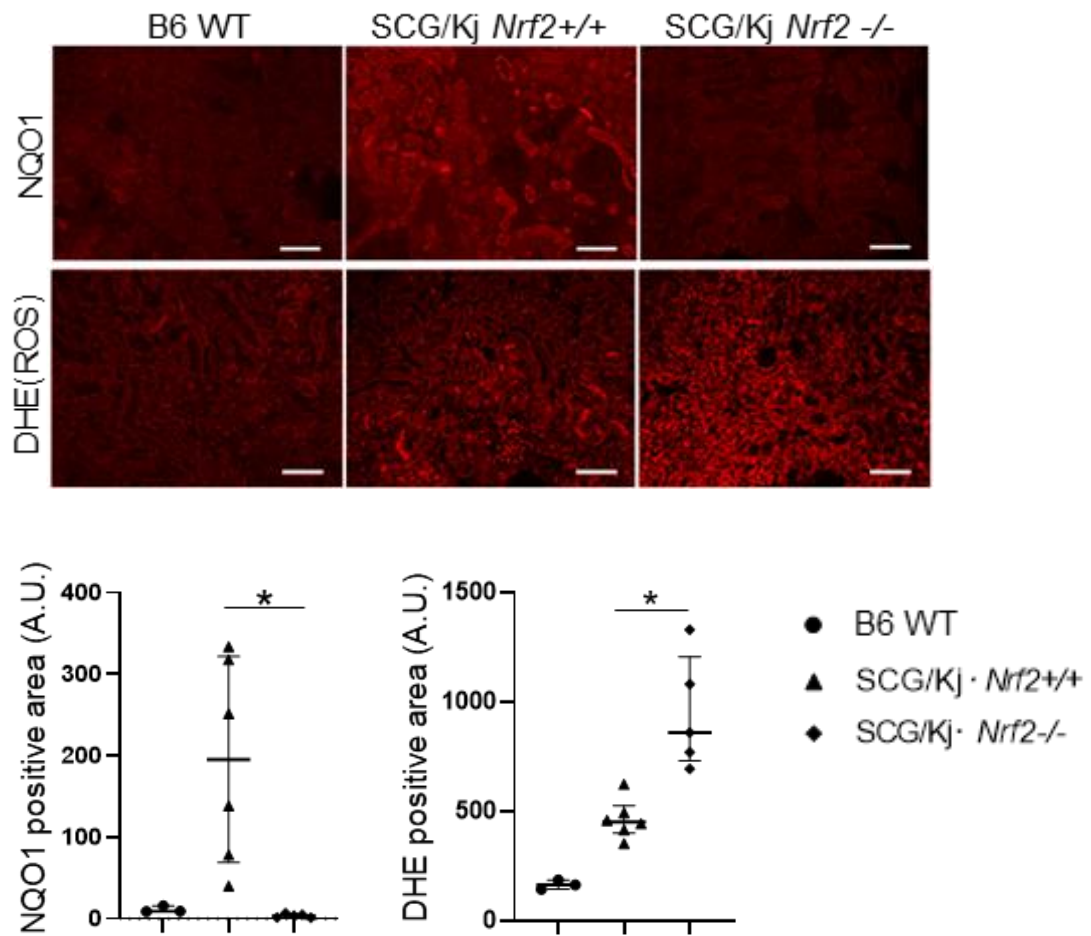


図 26 腎組織の NQO1-および DHE-染色

Scale bar : 50 μ m. ImageJ software にて定量評価し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した.

*P<0.05

11.3.6 Nrf2 遺伝子除去による MPO-ANCA 産生能への影響

Nrf2 の遺伝的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 を測定した. *Nrf2*^{+/+}群と *Nrf2*^{-/-}群において, MPO-ANCA は有意な差を認めなかった (図 27).

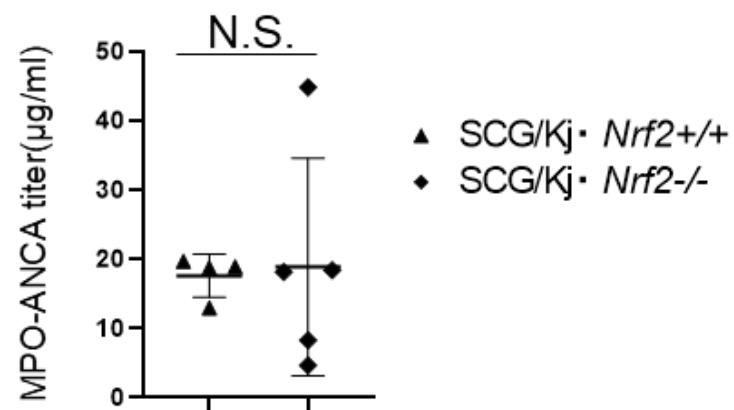


図 27 血清 MPO-ANCA 値

末梢血中の MPO-ANCA-IgG 値を定量評価し解析し平均値±標準偏差で示した.

11.4 考察

本章では、血管炎自然発症モデルマウスを用いて、Nrf2 遺伝子欠損の影響を検証した。血管炎自然発症マウスにおいて、Nrf2 の遺伝的欠損により腎組織で抗酸化蛋白の発現が著明に低下し、糸球体腎炎や尿細管間質障害が増悪した。また糸球体において NETs 浸潤ならびに壊死を伴う血管内皮細胞傷害が増悪することを免疫染色で確認した。

さらに、Nrf2 欠損は ANCA 値に影響を与えなかったことは、Nrf2 が病原性自己抗体である ANCA の産生とは無関係に NETs やその他の炎症細胞に影響を及ぼし、腎局所での壊死性血管炎を引き起こしていると考えられる。この結果は、第六章の血管炎自然発症モデルに対する Bard 投与実験において、Nrf2 活性化が ANCA 産生に寄与しなかったという結果と一致している。

そこで第六、七章で行ったマウス実験において、解剖時に脾腫を来すマウスが観察されていたことを踏まえ、次章では脾臓免疫細胞に着目し、血管炎自然発症モデルマウスにおける Nrf2 の炎症制御機構について検証することとした。

12. 第八章

AAV における Nrf2 の脾臓免疫細胞制御と 腎局所 Th17 応答の解析

12.1 緒言

第六章では SCG/Kj マウスにおいて, Nrf2 の薬理的活性化により NETs 形成が抑制され組織での抗酸化応答が増強することで腎炎が改善する事を示した. 第七章では SCG/Kj マウスが Nrf2 遺伝的欠損により腎炎が増悪する事を示した. 一方でいずれのマウスにおいても Nrf2 が ANCA 産生に影響しておらず, 獲得免疫応答としての自己抗体産生には関与しないと考えられた. しかしながら, 移入型 AAV モデルでは脾腫が観察され, Nrf2 活性化薬の投与により縮小がみられたのに対し, 自然発症モデルでは脾腫が Nrf2 欠損により増大しており, Nrf2 が脾臓における獲得免疫細胞の制御を通じて炎症病態に影響する可能性が示された. 本章では Nrf2 が AAV において脾臓免疫細胞に影響を与え炎症病態に関与していると仮説し, Bard を投与した SCG/Kj マウスと, Nrf2 を遺伝的に欠失した SCG/Kj マウスの脾臓細胞と腎組織を用いて免疫細胞への影響について評価した.

12.2 方法

12.2.1 脾臓の重量と細胞数の評価

第六章で用いた SCG/Kj の Bard 投与群と Mock 群, 第七章で用いた SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}と SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}を解剖直前に体重測定し, 解剖時に脾臓を採取し重量を測定した.

12.2.2 Flowcytometry による表面細胞解析

マウスから採取した脾臓を 100µm のセルストレーナーを用いて機械的に濾過し, PBS で洗浄後 70µm のセルストレーナーで再度濾過し単一細胞化した. RBC Lysis buffer (Thermo Fisher Scientific) を用いて赤血球を溶解し, 細胞計数板で脾臓細胞の総数を測定した. 得られた脾細胞を 5×10⁵ cells/ml に調整し以下の A)~C)の抗体の組み合わせで染色した: A) Ly6C peridinin chlorophyll protein (PerCP), Ly6G fluorescein isothiocyanate (FITC), CD11b allophycocyanin (APC), B) CD11c (FITC), MHC-II (APC), F4/80 phycoerythrin (PE), C) CD4 (PE), CD8(FITC), B220(APC). 脾臓細胞は SSC-H/FSC-H を用いてゲーティングし, 続いて SSC-H/FSC-A を用いてダブレットを除外し, 前述のゲーティングした細胞中の免疫細胞の割合で集団を決定した. FACS から得られた特定の免疫細胞の割合に脾臓細胞総数を乗じて, 各免疫細胞数を算出した.

12.2.3 腎組織と脾臓 T 細胞の IL17 の mRNA 発現の評価

SCG/Kj マウスの Bard 投与群と Mock 群の腎臓を RNA later で処理し, ホモジナイズして溶解液を作成した. また SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}と SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}マウスの脾細胞から MACS Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて T 細胞を抽出した. これらの細胞溶解液から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてそれぞれ total RNA を抽出し, Super Script III (Invitrogen) を用い cDNA に逆転写し, Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を蛍光シグナルとしてリアルタイム PCR 法(qRT-PCR)を用いて IL17 の mRNA 発現を定量評価した. 発現量は 18S リボソーム RNA の発現量で正規化した.

12.2.4 Western Blotting による腎臓組織タンパク質発現の解析

SCG/Kj マウスの凍結した腎臓組織をホモジナイズし, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl 溶液, 1% Triton, 1 mM EDTA, 1X protein inhibitor cocktail (Roche Life Science), phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) を含むバッファーで溶解した. タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離し, ポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜に転写した. この膜を 5%脱脂乳でブロッキングし, rabbit anti-IL17 抗体 (Abcam) を 4°Cで一晩プローブした後, 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 (Thermo Scientific) とインキュベートした. タンパク質シグナルは Super Signal (Thermo Scientific) を用いて検出した.

12.2.5 CD3/IL17 免疫染色

SCG/Kj マウスの腎臓のパラフィン切片を脱パラフィンし, 10mM クエン酸ナトリウム緩衝液で抗原賦活化したのち, 5% goat 血清でブロッキングして 100 倍に希釈した rat anti CD3 antibody (BD Biosciences), rabbit anti IL17 antibody (Abcam) を滴下し, 4°C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 alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG と alexa Fluor 488 goat anti-rat 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. CD3/IL17 共陽性細胞は切片中の糸球体における蛍光色素の共局在領域の面積として ImageJ で測定し定量評価した.

12.2.6 統計学的解析

2 群間比較は Mann-Whitney の U 検定を, 多群間比較は Kruskal-Wallis 検定 post hoc Steel 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 Graphpad prism®を用いて行った.

12.3 結果

12.3.1 脾臓重量と脾臓細胞数

SCG/Kj マウスの脾臓は腫大し脾細胞の増殖を認めたが Nrf2 活性化(Bard 投与)によって脾腫は改善し, 体重あたりの脾重量と細胞数は低下した(図 28). 一方 Nrf2 の遺伝子欠損によって SCG/Kj マウスの脾腫が増大し脾細胞数も有意に増加した(図 29).

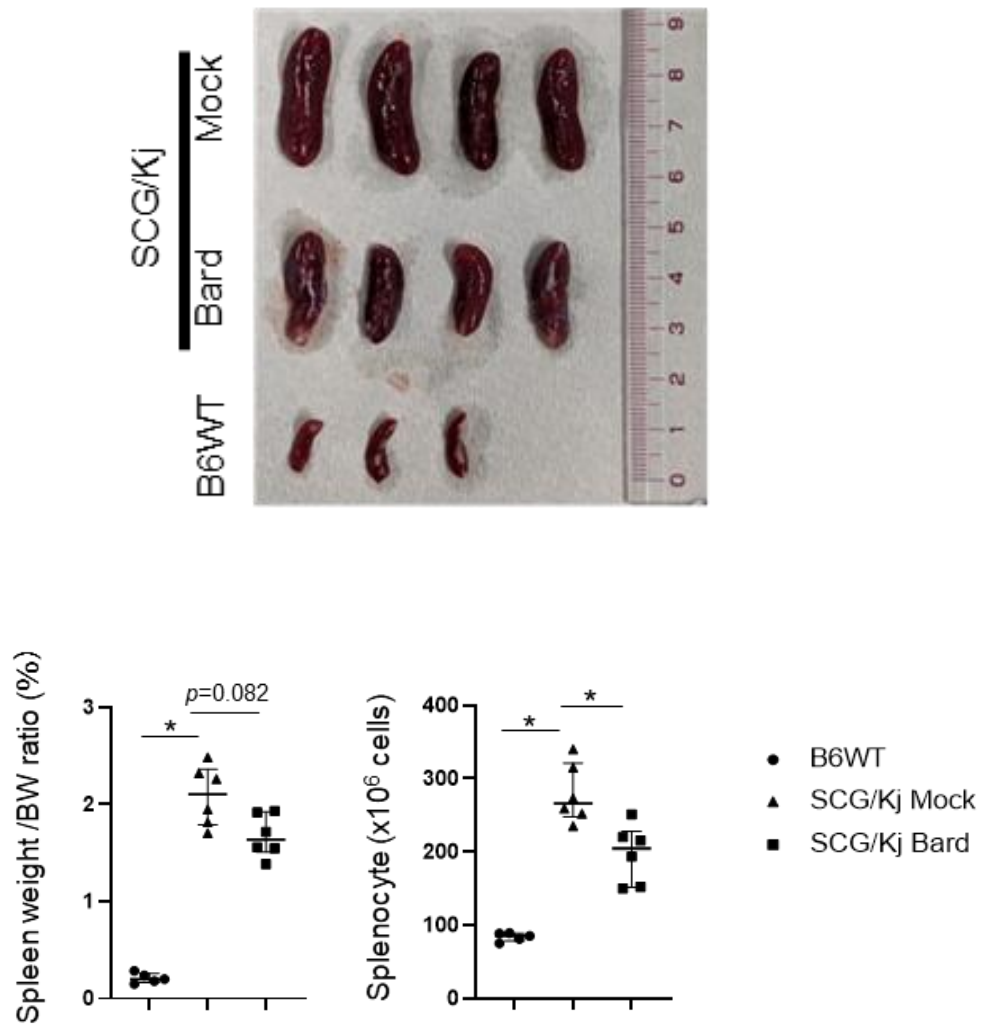


図 28 SCG/Kj マウスの脾腫と脾細胞数

B6WT マウス (n=5) および SCG/Kj マウスに Bard (n=6) または Mock (n=6) を投与した脾臓.脾臓対体重比と脾臓細胞総数を示す.データは平均値±標準偏差で示した.*P<0.05.

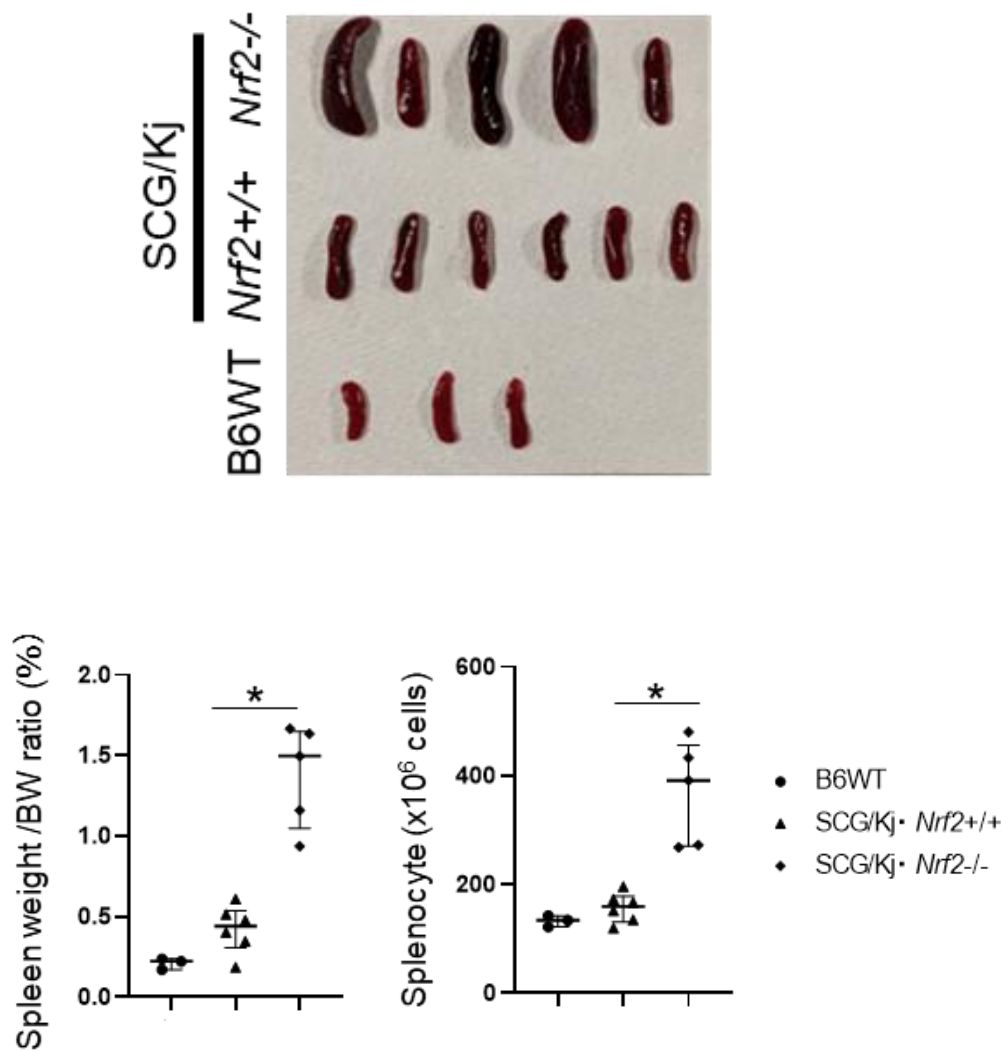


図 29 Nrf2 遺伝的欠損 SCG/Kj マウスの脾腫と脾細胞数
B6 WT マウス (n=5) および SCG/Kj *Nrf2*^{+/+} マウス (n=5) と SCG/Kj *Nrf2*^{-/-} マウスの脾臓. 脾臓対体重比と脾臓細胞総数を示す. データは平均値±標準偏差で示した. *P<0.05.

12.3.2 Flowcytometry

脾臓細胞をフローサイトメトリー法により解析し，図 30 に示すゲーティングストラテジーに従って免疫細胞分画を評価した．

SCG/Kj マウスは Bard 投与により CD4+T 細胞および CD220+B 細胞，その他の免疫細胞数が有意に減少した（図 31）．一方で Nrf2 遺伝的欠損 SCG/Kj マウスでは脾臓の CD4+T 細胞および CD220+B 細胞，その他の免疫細胞数の増加を認めた（図 32）．

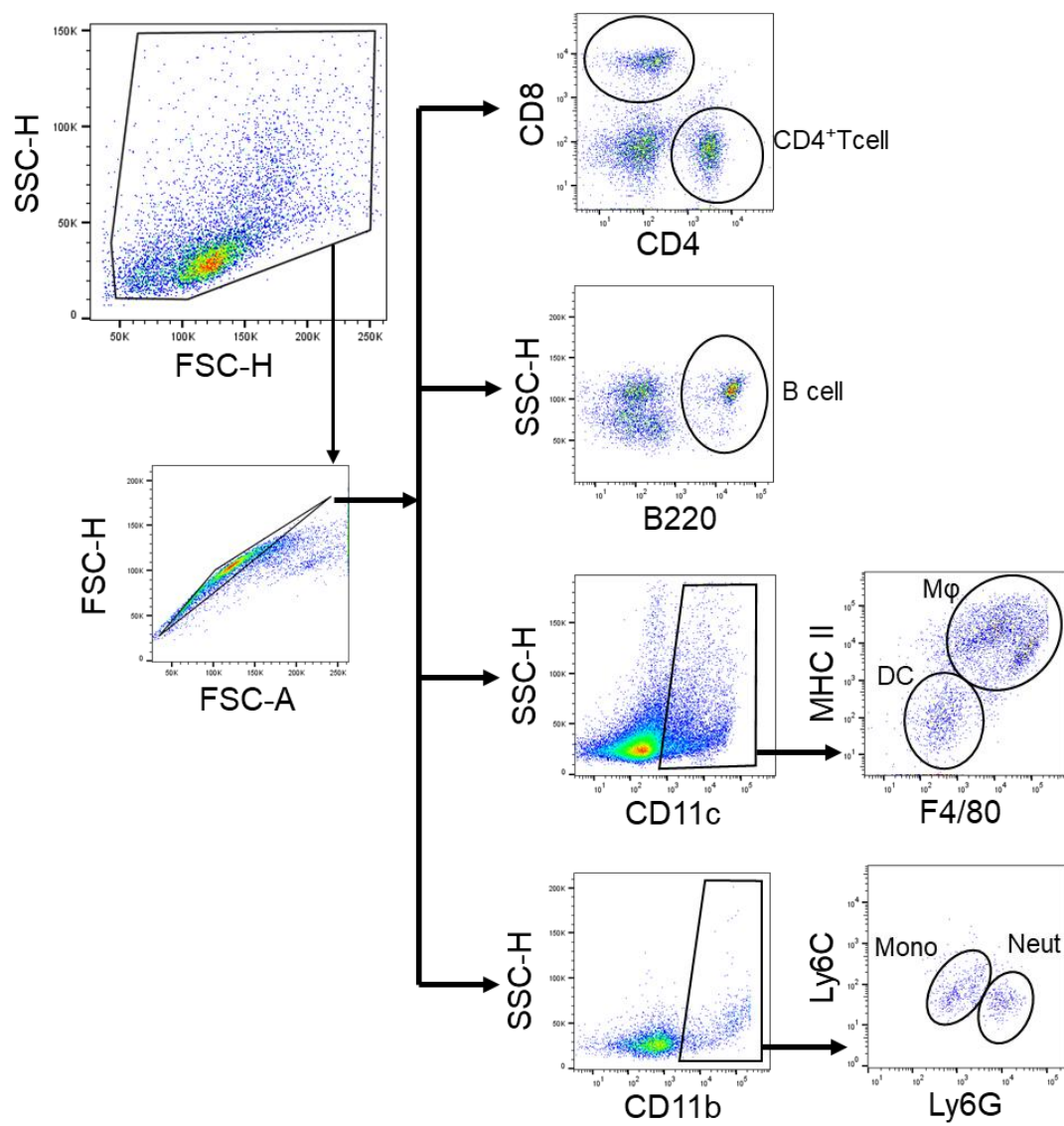


図 30 フローサイトメトリーのゲーティング

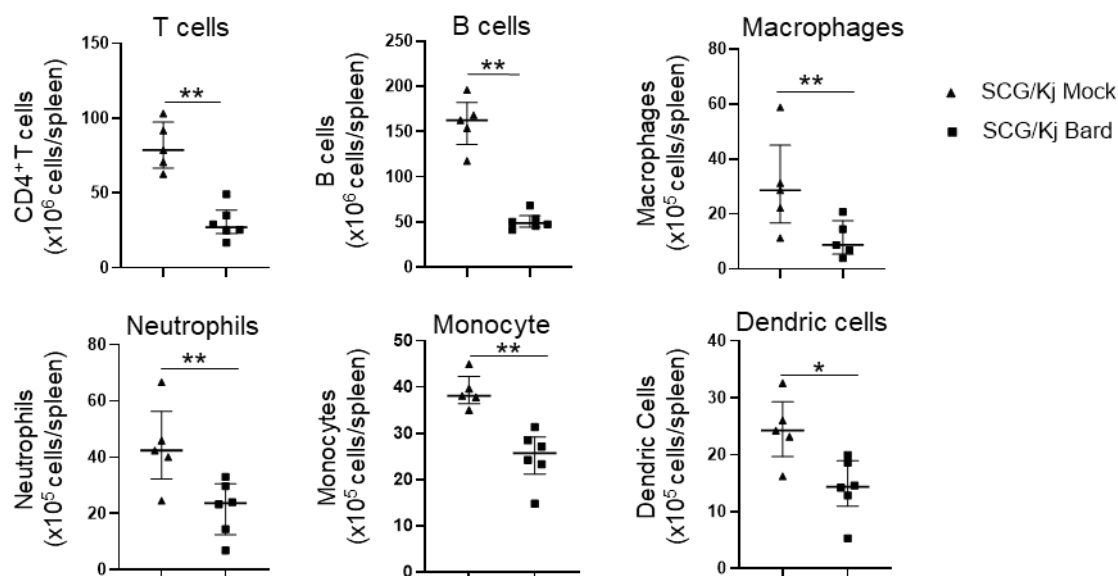


図 31 SCG/Kj マウスの脾臓細胞の分画と細胞数

SCG/Kj マウスに Mock (n=5) または Bard (n=6) を投与した群の脾臓細胞分画と細胞数を示す. 各群の T 細胞 (CD4+, CD8-), B 細胞 (B220+), マクロファージ (CD11c+ MCHII+ F4/80+細胞), 好中球 (CD11b+ Ly6C^{int} Ly6G^{high}), 単球 (CD11b+ Ly6C^{int} Ly6G^{int}), 樹状細胞 (CD11c+ MCHII^{low} F4/80^{low}細胞) の細胞数を平均値±標準偏差で示した. *P<0.05, **P<0.01.

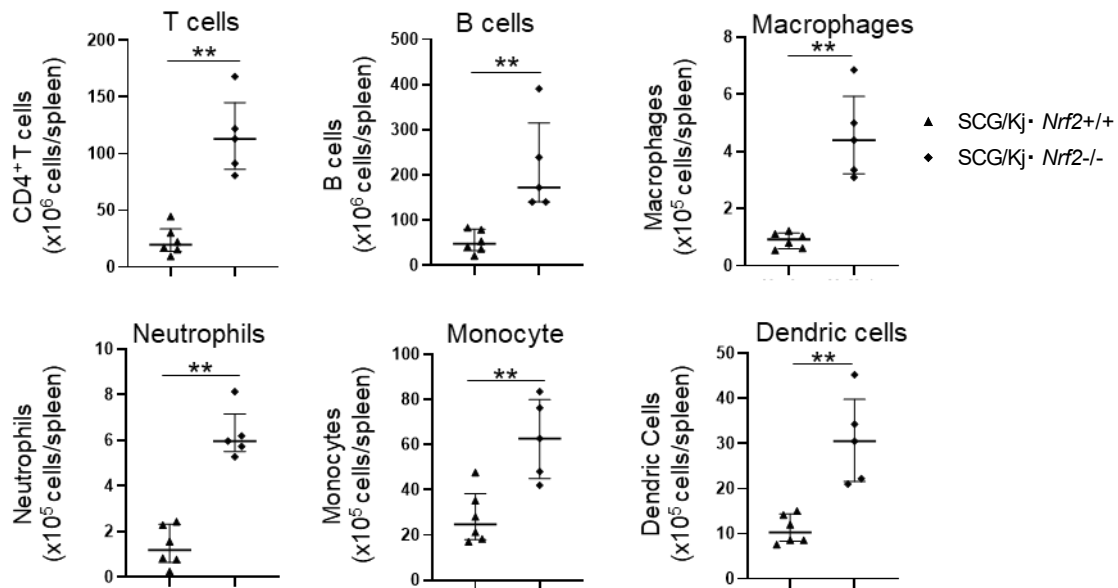


図 32 Nrf2 遺伝的欠損 SCG/Kj マウスの脾臓細胞の分画と細胞数
 SCG/Kj・Nrf2^{+/+}マウス (n=6) と SCG/Kj・Nrf2^{-/-}マウス (n=5) の脾臓細胞分画と細胞数を示す. 各群の T 細胞 (CD4⁺, CD8⁻), B 細胞 (B220⁺), マクロファージ (CD11c⁺ MCHII⁺ F4/80⁺細胞), 好中球 (CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G^{high}), 単球 (CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G^{int}), 樹状細胞 (CD11c⁺ MCHII^{low} F4/80^{low}細胞) の細胞数を平均値±標準偏差で示した. *P<0.05, **P<0.01.

12.3.3 腎組織と脾臓 T 細胞における IL17 mRNA 発現

SCG/Kj マウスにおいて Bard 投与群では Mock 群に比較して、腎臓における IL17 mRNA 発現が有意に低下していた。また SCG/Kj・*Nrf2*^{-/-}マウスの脾臓から単離した汎 T 細胞における IL17 mRNA 発現は、SCG/Kj・*Nrf2*^{+/+}マウスよりも有意に高かった。(図 33)

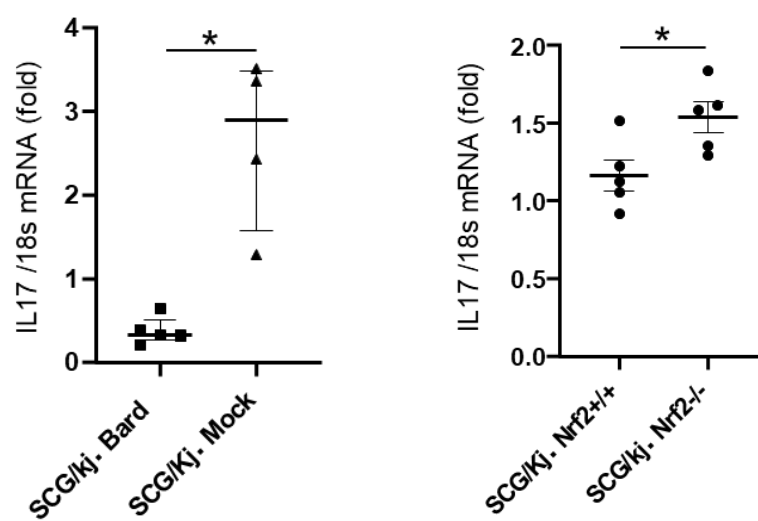


図 33 SCG/Kj マウスの腎臓の IL17 の mRNA 発現
リアルタイム PCR 法により定量し IL17/18s 比を解析した. データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した. Bard+; n = 4, Mock; n = 4. *P<0.05.

12.3.4 Western Blotting による腎臓の IL17 発現の評価

SCG/Kj マウスの腎臓における IL17A の発現を Western Blotting で評価した. Bard 群では Mock 群と比較し IL17A の発現が有意に低下していた (図 34).

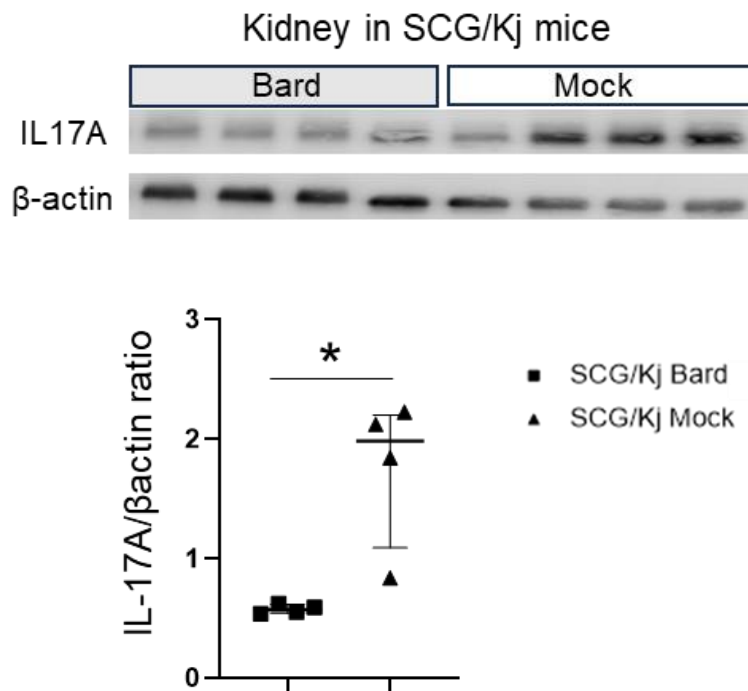


図 34 SCG/Kj マウスの腎臓の IL17A のタンパク質発現
Western Blotting により検出. IL17A/ β-アクチン比を示す.
データは平均値±標準誤差で示した. Bard+; n = 4, Mock; n = 4. *P<0.05.

12.3.5 腎糸球体における IL17/CD3 陽性 Th17 細胞浸潤の評価

腎臓での Th17 細胞の影響を調べるために汎 T 細胞マーカーの CD3 と Th17 細胞のマーカーとして IL17A を蛍光免疫染色で評価した. Mock 群と Bard 群で CD3/IL17A 共陽性の細胞浸潤は, Bard 群では Mock 群と比較して有意に少なかった (図 35).

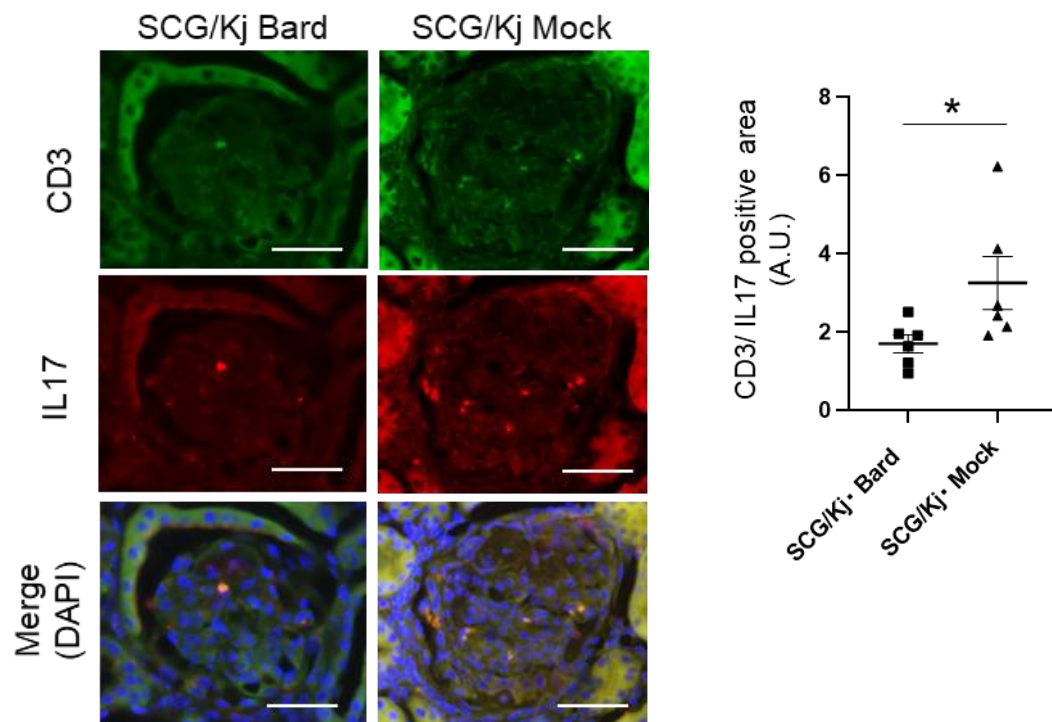


図 35 腎糸球体における CD3 と IL17 の免疫蛍光染色.

緑 : CD3, 赤 : IL17, 青 : DAPI, Scale bar : 50 μ m

CD3/IL17 二重陽性領域を ImageJ software にて解析し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した.

Bard; n = 6, Mock; n = 6, *P < 0.05

12.4 考察

本章では Nrf2 による脾臓免疫細胞への影響を検証した. SCG/Kj マウスでは自然経過で脾腫と脾細胞増殖を認めたが, Nrf2 活性化薬の投与によってそれらが有意に抑制されていた. 一方で SCG/Kj マウスにおいて Nrf2 を遺伝的に欠失したモデルマウスでは, 脾腫が増大し脾臓細胞のさらなる増殖を認めた. このことは Nrf2 が脾臓免疫細胞の分化増殖に関与していることを示唆する所見であった. そこでフローサイトメトリー法で各脾臓細胞の分画を評価したが, Nrf2 の活性化により各免疫細胞(リンパ球, 好中球, 単球, マクロファージ)の分化増殖が抑制され, Nrf2 欠損では対照的に各免疫細胞の増殖が促進されていた.

既報では CD3 陽性 T 細胞のうち Th17 細胞が AAV の病態に関与していることが示唆されていることから, 我々は Th17 細胞における Nrf2 の役割に着目した. Western blotting と RT-qPCR 解析の結果, Nrf2 活性化薬は腎組織における IL17 発現を有意に抑制していた. 興味深いことに, Nrf2 欠損 SCG/Kj マウスでは脾臓 T 細胞において IL17 の mRNA 発現が増加していた.

また, SCG/Kj マウスの糸球体における IL17+CD3+Th17 細胞の浸潤を免疫染色で評価したが Nrf2 の活性化によって Th17 細胞の浸潤が抑制されていたことから, Nrf2 はリンパ球, 特に Th17 を介した自己免疫に関与し, ANCA 抑制とは独立した機序により AAV の炎症病態に寄与している可能性が示された.

13. 総合考察

本研究では, Nrf2 を介した抗酸化システムが, MPO-ANCA 関連血管炎の病態形成に重要な役割を果たしていることを示した. AAV 患者の腎臓で主に Nrf2 が発現を調節する抗酸化物質 NQO1 の産生が増加していたことから Nrf2 の関与が確認された. *In vitro* の実験において, ANCA 刺激により好中球で NQO1 産生が誘導されるものの, この反応だけでは ROS 制御や NETs 形成抑制には不十分であった. 一方, Bard によって薬理的に Nrf2 を活性化すると, NQO1 産生がさらに促進され, ROS 生成が強く抑制されることで, ANCA 刺激による NETs 形成が有意に抑制された. 一方, 好中球における Nrf2 の遺伝的欠損により, ANCA 刺激による抗酸化蛋白 NQO1 の産生は促進されず, NETs の形成は亢進した. これらの結果から, Nrf2 活性が好中球の抗酸化応答を制御し, ANCA 刺激により生じる ROS に対応することで NETs の形成を抑制することを示している.

さらに *in vitro* 実験において, 血管内皮細胞および尿細管上皮細胞が, Nrf2 の活性化によって NETs による傷害から保護されることも示された. AAV の腎臓病変は, 糸球体血管内皮傷害と尿細管上皮傷害によって特徴づけられる(Hauer HA, et al. 2002). 糸球体血管内皮傷害はヒストン蛋白など NETs 成分の特定の因子が糸球体血管内皮細胞を直接傷害するとされ, 尿細管間質部位では傍尿細管毛細血管炎によって尿細管上皮細胞傷害が起こると理解されている. いずれも ANCA-NETs の暴露による小型血管炎の結果として生じるが, これまで *in vitro* や虚血再灌流腎障害モデルの既報において, Nrf2 の薬理的活性化はこれらの腎固有細胞を酸化傷害から保護することが報告されている(Yang JL, et al. 2020), (Han P, et al. 2017). 本研究においても, 血管内皮細胞および尿細管上皮細胞における Nrf2 の薬理的活性化により抗酸化蛋白の発現が増強し, ANCA-NETs による細胞傷害に対しても保護的に作用していることを示した.

また, *in vitro* 実験で得られた知見から想定される病態を確認するため, 我々は 2 つの AAV モデルマウスである ANCA 移入マウスと血管炎自然発症マウスを用いて, Nrf2 活性化薬と Nrf2 欠損の両方の効果を調べた. Nrf2 活性化薬は内在性の抗酸化応答を増強し, 糸球体腎炎と尿細管傷害を改善し, 疾患の改善と発症予防につながったが, 対照的に血管炎におけるこの抗酸化応答は Nrf2 遺伝的欠損によって抑制され, ROS と NETs の生成が増加して糸球体腎炎が悪化する結果となった. これらの一連の *in vivo* 実験は *in vitro* 実験で確認された事象を裏付ける結果となったが, Nrf2 活性の ANCA 産生への影響は確認できなかったため, この事象は生体内で自己抗体の抑制とは独立して起きていることが想定された. 一方, AAV モデルマウスに伴う脾腫は, Nrf2 活性化により軽減し, Nrf2 遺

伝子欠損によって増悪する現象が見られた。既報によると、Nrf2 の活性化は、NFκB などの炎症性サイトカイン遺伝子の転写を抑制する(Kobayashi EH, et al. 2016)ことで炎症病態を制御していることが知られており。特に、ループスモデルマウスでは自己免疫応答に主要な役割を果たす Th17 細胞が、Nrf2 欠損により増加することが報告され(Zhao M, et al. 2016), これは Th17 細胞への分化に必要な STAT3 のリン酸化を Nrf2 が ROS 抑制を介して制御し、Th17 細胞への分化を抑制しているためと考えられている。また、活動性 AAV 患者では Th17 細胞の増加が見られたことから(Neumann I, et al. 2003)(Nogueira E, et al.,2010), 我々は AAV モデルマウスの Th17 細胞における Nrf2 の役割を調べた。本研究の SCG/Kj マウス実験において、Nrf2 活性化により脾臓細胞の T 細胞が減少し、IL17 の mRNA 発現が減少することが示された。さらに、糸球体への Th17 細胞の浸潤数は Nrf2 活性化によって減少していたことから、Nrf2 活性化が全身および局所の Th17 自己免疫を制御していることが示された。しかし ANCA については薬理的 Nrf2 活性化、または Nrf2 遺伝的欠損によって影響を受けなかった。これらの知見は、AAV における Nrf2 活性化が ANCA への直接作用ではなく Th17 細胞を主体とする T 細胞介在性自己免疫の制御に関与していることを示唆しており、自己抗体の産生を抑制することなく腎疾患の改善に寄与する可能性がある。ただし同じく自己免疫疾患である SLE モデルマウスでは、Nrf2 遺伝的欠損により腎炎の増悪とともに自己抗体が増加しており (Jiang T, et al. 2014) , 自己抗体に対する Nrf2 の意義を解明するためには、さらなる研究が必要である。

近年、慢性腎臓病 (CKD) と 2 型糖尿病患者を対象とした薬理的 Nrf2 活性化剤の第 2 相臨床試験で、腎保護作用が示された(Nangaku M, et al. 2020)。実臨床では、Nrf2 活性化剤は、活性酸素系を介した炎症や免疫学的異常と密接に関連する多発性硬化症 (Gopal S, et al. 2017) の治療に使用されている。Nrf2 は AAV の有望な治療標的となりうるが、腎機能に対する Nrf2 の効果については議論の余地がある。

先行研究では、Nrf2 活性化因子は近位尿細管におけるメガリンの発現を抑制することによってアルブミン尿を上昇させる事が分かっており、長期的な腎機能低下につながる恐れがある。実際、糖尿病性腎症における Bard の効果を検証した第 3 相臨床試験である AYAME 試験では末期腎不全への移行を抑制する効果は認められなかった。これは糖尿病性腎症が慢性炎症を特徴とする病態のため、Bard の長期間投与によって尿細管でのアルブミン再吸収に影響を与えた可能性が考えられる。ただしこの Bard によるアルブミン尿の増加は可逆的であると考えられており (Avula UMR, et al. 2022) , AAV の急性期から亜急性期の炎症をターゲットとした我々の研究において、Bard 治療の有効性が示されたことは、Bard による短期的な治療がメガリン発現の抑制を最小限にとどめ、可逆的なアルブミン尿の低下が腎保護効果につながった可能性がある。

本研究の限界は, AAV モデルマウスにおける Nrf2 の好中球または血管内皮細胞特異的な役割が解明されていないことである. そのため *in Vitro* では細胞モデルにおける Nrf2 の意義を代替的に示した. さらにいくつかの AAV モデルマウスが, 病因の解明や新規治療法の探索のための研究に利用されているが, それぞれのモデルには明確な特徴, 利点, 欠点がある. 本研究では, ANCA 移入モデルと SCG/Kj マウスの両方を用いて, AAV の発症や予防における Nrf2 の役割を明らかにすることを目的としたが, ANCA 移入モデルでは, 導入後 1-2 日で糸球体腎炎を発症するため, Bard は血管炎発症前に投与せざるを得なかった. 対照的に, AAV を自然発症する SCG/Kj マウスでは, 活動期の治療介入として発症後に Bard を投与した. これらの治療介入の違いが結果に影響を及ぼしている可能性は否定できない. また, SLE を系統の背景とする SCG/Kj マウスは, AAV では非典型的な症状であるリンパ節の腫大を示すため (Huang F, et al. 2023), 純粋な AAV モデルとして扱うことは議論の余地がある. したがって, これらの限界を考慮し, 疾患を総合的に評価するために, 2 つの異なる AAV モデルを用いて動物実験を行った.

以上から Nrf2 の活性化は NETs 形成を抑制するとともに, NETs そのものによる細胞傷害も軽減し, 加えて IL17 産生抑制を介した免疫調節作用により多面的に糸球体腎炎を制御していると考えられ, AAV の新たな治療標的として期待される.

14. 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, 抗酸化酵素 NQO1 の発現が上昇していた.
- ・Nrf2 活性化薬はヒト好中球の ANCA 誘導 NETs の形成を阻害した.
- ・マウス好中球の ANCA 誘導 NETs は Nrf2 活性化による抗酸化応答を介して抑制され, Nrf2 遺伝的欠損により亢進した.
- ・Nrf2 活性化薬は, ANCA 誘導 NETs による血管内皮細胞傷害, 尿細管上皮傷害から細胞を保護した.
- ・Nrf2 活性化薬は, ANCA 移入マウスにおいて, 腎局所での抗酸化蛋白の発現を亢進し, ROS の抑制を介して ANCA の産生とは無関係に腎障害を軽減した.
- ・Nrf2 活性化薬は SCG/Kj マウスにおいて腎局所での ROS を抑制し, ANCA の産生と無関係に腎傷害を抑制するとともに, 腎局所への NETs 浸潤を抑制した.
- ・Nrf2 遺伝的欠損により SCG/Kj マウスにおける腎局所での ROS が亢進し, 腎障害が増悪するとともに, 腎局所への NETs 浸潤が増加した.
- ・Nrf2 活性化により SCG/Kj マウスの脾臓免疫細胞の増殖が抑制され, 腎組織での IL17 発現と Th17 細胞の浸潤が抑制された.
- ・Nrf2 遺伝的欠損により SCG/Kj マウスの脾臓免疫細胞の増殖が亢進し, 腎組織での IL17 発現が亢進した.

第一章ではヒト AAV 患者の腎組織において Nrf2 によって制御される抗酸化蛋白の発現が亢進している事を示した.第二章ではヒト好中球において Nrf2 活性化薬により ROS の抑制を介して ANCA 誘導 NETs が抑制する事を示した.そして第三章でマウス好中球において ANCA 誘導 NETs の形成が Nrf2 の遺伝子除去により亢進することを形態学的にもシグナル伝達経路の両面から示した.また Nrf2 活性化薬が, ANCA 誘導 NETs による血管内皮細胞傷害, 尿細管上皮傷害に対して細胞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 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 Nrf2 活性化が臓器保護に繋がったことを示し, 第七章では Nrf2 遺伝的欠損が AAV 自然発症モデルマウスにおいて腎炎を増悪させたことを示した.最後に第八章では SCG/Kj マウスにおいて Nrf2 活性化が脾臓免疫細胞の増殖抑制に, Nrf2 遺伝的欠損が増殖亢進へと働くことを, 特に Th17 細胞の腎組織への浸潤に影響を与えることを示した.

以上から,本研究は Nrf2 の活性化を介した抗酸化応答が AAV の炎症病態に深

く関与しており,Nrf2の制御がNETsの抑制を介してAAVの急性期炎症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 AAV の臓器で起きている NETs による組織障害を直接的に抑えることはできないため, 長期的には腎不全や神経障害などの臓器障害が残存してしまう点や強力な免疫抑制剤の使用により重篤な感染症の発症に関連した死亡が多いことが問題となっている.そのため AAV の病態の中心となる NETs の制御が可能となれば血管炎の進展を抑制し,病態の改善や臓器保護に繋がる可能性がある. 一方で腎保護作用を評価するための適切なバイオマーカーや安全性, 既存免疫抑制療法との併用の位置づけは未確立である. 総じて Nrf2 活性化薬は AAV に対する有望な治療候補であるが, 臨床応用には慎重な検証と患者層別化が課題と考える。

15. 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所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、同教室講師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。血液浄化部教授西尾妙織先生には、恵まれた実験環境を提供していただき、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。また本分野講師 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。

同教室助教・八反田文彦先生、楠加奈子先生、同教室の先輩である工藤孝司先生、麻生里佳先生には、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。本学院生三好敦子先生には、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島田和子さん、実験助手の長谷川舞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。最後に日々の研究や論文執筆に理解を示し支え続けてくれた妻と、在学中に生まれた娘に心から感謝いたします。

16. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない

17. 参考文献

- Al-Hussain T, Hussein MH, 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.
- Avula UMR, Harris L, Hassanein M(2022) Bardoxolone for CKD: The Paradox of Confusion and Dogma. *Kidney360* 3, 1955-1960.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch, Y and Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.
- Gopal S, Mikulskis A, Gold R, Fox RJ, Dawson KT and Amaravadi L(2017) Evidence of activation of the Nrf2 pathway in multiple sclerosis patients treated with delayed-release dimethyl fumarate in the Phase 3 DEFINE and CONFIRM studies. *Mult Scler* 23(14):1875-83.
- Grayson PC, and Kaplan MJ (2016) At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 99(2):253-64.
- Han P, Qin Z, Tang J, Xu Z, Li R, Jiang X, Yang C, Xing Q, Qi X, Tang M, et al(2017) RTA-408 Protects Kidney from Ischemia-Reperfusion Injury in Mice via Activating Nrf2 and Downstream GSH Biosynthesis Gene. *Oxid Med Cell Longev* 7612182.
- Hauer HA, Bajema IM, van Houwelingen HC, Ferrario F, Noël LH, Waldherr R, Jayne DR, Rasmussen N, Bruijn JA and Hagen EC (2002) Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int* 61(1):80-9
- Huang F, Lv Y, Liu S, Wu H and Liu Q (2023) Animal models for anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: Are current models good enough? *Animal Model Exp Med* 6(5):452-463.
- Hope HR, Remsen EE, Lewis C Jr, Heuvelman DM, Walker MC, Jennings M and Connolly DT (2000) Large-scale purification of myeloperoxidase from HL60 promyelocytic cells: characterization and comparison to human neutrophil myeloperoxidase. *Protein expression and purification* 18, 269-276.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K and Hatayama I (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase

II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 18;236(2):313-22.

Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L and Hagen EC (2013) 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 65(1):1-11.

Jennette JC, and Falk RJ (2014) Pathogenesis of ANCA-mediated disease. *Nat Rev Rheumatol* 10, 463-473.

Jiang T, Tian F, Zheng H, Whitman SA, Lin Y, Zhang Z, Zhang N and Zhang DD (2014) Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF- κ B-mediated inflammatory response. *Kidney Int* 85(2):333-343.

Kallenberg CG (2011). Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Ann Rheum Dis* 70 Suppl 1, i59-63.

Kinjoh K, Kyogoku M and Good RA (1993) Genetic selection for crescent formation yields mouse strain with rapidly progressive glomerulonephritis and small vessel vasculitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15;90(8):3413-7.

Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H and Nakayama K et al (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 23;7:11624.

Lazaro I, Lopez-Sanz L, Bernal S, Oguiza A, Recio C, Melgar A, Jimenez-Castilla L, Egido J, Madrigal-Matute J and Gomez-Guerrero C (2018) Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms. *Front Pharmacol* 31;9:819.

Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, Kong AN (2008) Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 1;76(11):1485-9.

Little MA, Nightingale P, Verburgh CA, Hauser T, De Groot K, Savage C, Jayne D and Harper L (2010) European Vasculitis Study (EUVAS) Group. Early mortality in systemic vasculitis: relative contribution of adverse events and active vasculitis. *Ann Rheum Dis* 69(6):1036-43.

Ma Q, Kinneer K, Ye J, Chen BJ (2003) Inhibition of nuclear factor κ B by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. *Mol Pharmacol* 64(2):211-9.

Mulay SR, Linkermann A and Anders HJ (2016) Necroinflammation in Kidney Disease. *JASN* 27, 27-39.

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. *J Am Soc Nephrol* 25(5):990-7.

Nangaku M, Kanda H, Takama H, Ichikawa T, Hase H and Akizawa T (2020) Randomized Clinical Trial on the Effect of Bardoxolone Methyl on GFR in Diabetic Kidney Disease Patients (TSUBAKI Study). *Kidney Int Rep* 14;5(6):879-890.

Neumann I, Birck R, Newman M, Schnülle P, Kriz W, Nemoto K, Yard B, Waldherr R and Van Der Woude FJ (2003) SCG/Kinjoh mice: a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis with immune deposits. *Kidney Int* 64(1):140-8.

Nezu M, Souma T, Yu L, Suzuki T, Saigusa D, Ito S, Suzuki N and Yamamoto M. (2017) Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. *Kidney Int* 91(2):387-401.

Nogueira E, Hamour S, Sawant D, Henderson S, Mansfield N, Chavele KM, Pusey CD and Salama AD (2010) Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2209-17.

Puéchal X, Pagnoux C, Perrodeau É, Hamidou M, Boffa JJ, Kyndt X, Lifermann F, Papo T, Merrien D, Smail A, et al (2016) French Vasculitis Study Group. Long-Term Outcomes Among Participants in the WEGENT Trial of Remission-Maintenance Therapy for Granulomatosis With Polyangiitis (Wegener's) or Microscopic Polyangiitis. *Arthritis Rheumatol* 68(3):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) NETs mediate defense against HIV-1. *Cell Host & Microbe* 12, 109-116.

Schreiber A, Rousselle A, Becker JU, von Mässenhausen A, Linkermann A and Kettritz R (2017) Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7;114(45):E9618-E9625.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V and Zychlinsky A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8(4):668-76.

Uruno A, Matsumaru D, Ryoke R, Saito R, Kadoguchi S, Saigusa D, Saito T, Saido TC, Kawashima R and Yamamoto M (2020) Nrf2 Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in App Knock-In Alzheimer's Disease Model Mice. *Mol Cell Biol* 27;40(6):e00467-19.

Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ and Jennette JC (2002) Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest*. 110(7):955-63.

Yang JL, Sun MY, Yuan Q, Tang S, Dong MJ, Zhang RD, Liu YY and Mao L (2020)

Keap1-Nrf2 signaling activation by Bardoxolone-methyl ameliorates high glucose-induced oxidative injury in human umbilical vein endothelial cells. *Aging (Albany NY)* 2;12(11):10370-10380.

Yoh K, Itoh K, Enomoto A, Hirayama A, Yamaguchi N, Kobayashi M, Morito N, Koyama A, Yamamoto M and Takahashi S (2001) Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney Int* 60(4):1343-53.

Zhao M, Chen H, Ding Q, Xu X, Yu B and Huang Z (2016) Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 Deficiency Exacerbates Lupus Nephritis in B6/lpr mice by Regulating Th17 Cell Function. *Sci Rep* 12;6:38619.