



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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 上田 雄翔

学 位 論 文 題 名

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)

【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。