

特集：血管炎

# 血管炎の発症機序と NETs

NETs in pathogenesis of vasculitis

中沢大悟\*<sup>1</sup> 西尾妙織\*<sup>1</sup> 外丸詩野\*<sup>2</sup> 渥美達也\*<sup>1</sup>

石津明洋\*<sup>3</sup>

Daigo NAKAZAWA \*<sup>1</sup>, Saori NISHIO \*<sup>1</sup>, Utano TOMARU \*<sup>2</sup>, Tatsuya ATSUMI \*<sup>1</sup>, and Akihiro ISHIZU \*<sup>3</sup>

## 要 旨

顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis : MPA) は、ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase : MPO) を対応抗原とする抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody : ANCA) 陽性を特徴とし、腎臓、肺、神経を好発部位として全身の小型血管に炎症を起こす血管炎である。詳細な発症機序は不明であったが、近年、好中球の殺菌機構である好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs) が MPO-ANCA の産生や炎症の悪循環病態を招くことがわかってきた。NETs は好中球内の殺菌蛋白や DNA を細胞外に放出して微生物を捕捉・殺菌する強力な免疫機構であるが、NETs の制御異常は NETs 成分に対する免疫寛容破綻の原因となり、MPO-ANCA の産生を誘導する。一方 MPO-ANCA は、炎症性サイトカインによって活性化された好中球に作用し、血管炎の活動性に比例して NETs を誘導し、誘導された NETs はさまざまな原因で分解・制御されにくい状態にある。それゆえ、NETs を制御することが本疾患に対する特異的な治療になる可能性がある。本稿では、NETs と本疾患との関連についての基礎研究ならびに臨床研究の最新の報告をまとめ、血管炎の新たな病態機序について考察する。

## はじめに

顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis : MPA) は、腎臓、肺、神経を好発部位として全身の小型血管に炎症を

起こす血管炎である<sup>1)</sup>。日本を含めたアジアでは、ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase : MPO) を対応抗原とする抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody : ANCA) 陽性例が多い。この自己抗体は病勢マーカーであり<sup>2)</sup>、かつ病原性が確認されている<sup>3)</sup>。しかし、本患者においてなぜ MPO-ANCA が産生されるかは不明な点が多く、そのため、治療は非特異的な免疫抑制療法に頼らざるをえない。高齢者に好発する本疾患においては、現在の標準的治療の副作用による日和見感染が多いことも問題になっており、病態機序に即した特異的かつ安全な治療法の開発が必要とされている。その手がかりとして、最近、MPO-ANCA の産生機序に、好中球細胞死の一形態である好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs) の関与が指摘されるようになり、さらに NETs の制御異常が病態の根底にあることもわかってきた。

## NETs

NETs は 2004 年に Brinkmann らによって発見された好中球の細胞死形態の一つである<sup>4)</sup>。感染刺激を受けた好中球は、微生物の貪食に引き続き、細胞死に至る際に MPO などの細胞質内抗菌蛋白と核 DNA を細胞外に放出して微生物を捕捉し、細胞死に至った後も効率良く殺菌する。しかし、NETs は細胞外に DNA や細胞内蛋白を曝露している状態であり、NETs の過剰な産生や処理されない NETs の存続は、自己抗体の産生につながる可能性がある。とりわけ、NETs の構成成分に対する自己抗体が出現する ANCA 関連血管炎が、NETs を介した悪循環病態にあるという Kessenbrock らの報告<sup>5)</sup>を皮切りに、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) における NETs 制御

\*<sup>1</sup> 北海道大学大学院医学研究科免疫・代謝内科学分野、\*<sup>2</sup> 同 分子病理学分野、\*<sup>3</sup> 同 大学院保健科学研究所病態解析学分野

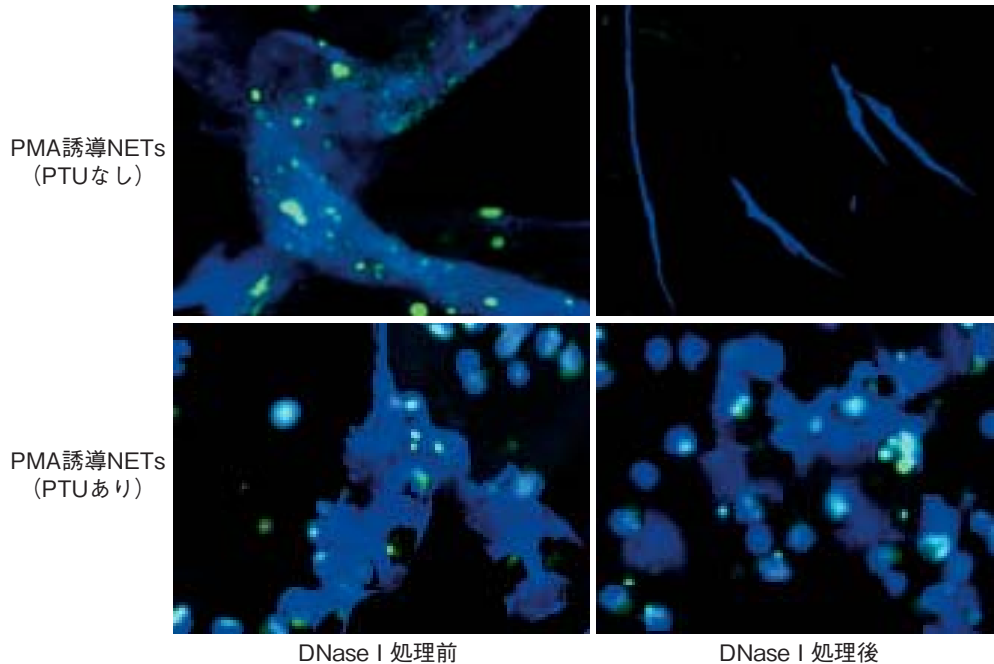


図 1 *In vitro* で PTU 処理された DNase I 抵抗性 NETs

青：DNA, 緑：MPO

(文献 12 より引用, 改変)

異常を背景とした抗 DNA 抗体産生<sup>6)</sup>や抗 C1q 抗体の関与<sup>7)</sup>, 関節リウマチの関節内炎症病態における NETs の関与<sup>8)</sup>など, NETs と自己免疫疾患の関連についての知見が蓄積されてきている。

### NETs と ANCA 関連血管炎の発症機序

NETs 制御異常が ANCA の産生に関与するという 2 つの研究報告がある。

#### 1. プロピルチオウラシル(propylthiouracil : PTU)による NETs 制御異常

バセドウ病の治療薬である PTU は, 投与された患者の約 30% で MPO-ANCA の出現が認められる<sup>9)</sup>。PTU の一部は好中球の MPO で代謝されることから<sup>10)</sup>, われわれは PTU が NETs の形成や代謝に影響を与え, MPO-ANCA の産生に関与するという仮説を立てた。*In vitro* で健常ヒト好中球に, phorbol myristate acetate (PMA) とともに PTU を添加して誘導した NETs は, 形態異常を呈し, さらに NETs の生理的な分解酵素である DNase I に抵抗性を示した<sup>11,12)</sup> (図 1)。また, この分解障害を呈する異常な NETs が MPO-ANCA 産生に関与することを確認するため, WKY ラットに PTU を経口投与し, 加えて PMA を腹腔内に投与して体内で分解されにくい NETs を誘導したところ, このラットの腹膜に多量の凝縮した NETs が観察され, それに引き続

き, MPO-ANCA の産生や腎機能障害を伴う pauci-immune 型の糸球体腎炎, 肺胞出血が誘導された<sup>11)</sup> (図 2)。生体内で速やかに分解・処理されるべき NETs が, PTU の作用により DNase I への抵抗性を獲得し, またこの過程で MPO 蛋白が構造変化を起こすことから<sup>10)</sup>, 存続しやすい NETs 内の変異 MPO 蛋白が免疫寛容を破綻させる可能性が示唆された。すなわち, PTU により誘発される MPO-ANCA 関連血管炎では, NETs の制御異常がその発症に関与している。

#### 2. NETs を抗原提示する骨髄系樹状細胞(myeloid dendritic cell : mDC)は ANCA の産生を誘導する

Sangaletti らは, 別の視点で NETs が ANCA 関連血管炎の発症にかかわることを報告した<sup>13)</sup>。*In vitro* で NETs と反応させた mDC をマウスに繰り返し移入すると, NETs 成分に対する抗体 (ANCA や抗 DNA 抗体) が産生され, 血管炎が誘導された。対照的に, アポトーシスまたは壊死させた好中球と反応させた mDC をマウスに移入しても, 産生される ANCA の抗体価は低く, 血管炎は誘導されなかった。この興味深い相違点は, 以下のように考察される。すなわち, アポトーシスはプログラムされた細胞死であり, マクロファージや mDC によって炎症を起こさずに処理され, アポトーシス細胞に含まれる抗原は通常は自己抗原とはならない。また, 壊死は向炎症型細胞死であるが, 核は収納された状態で処理される。これらの細胞死形態に対して,

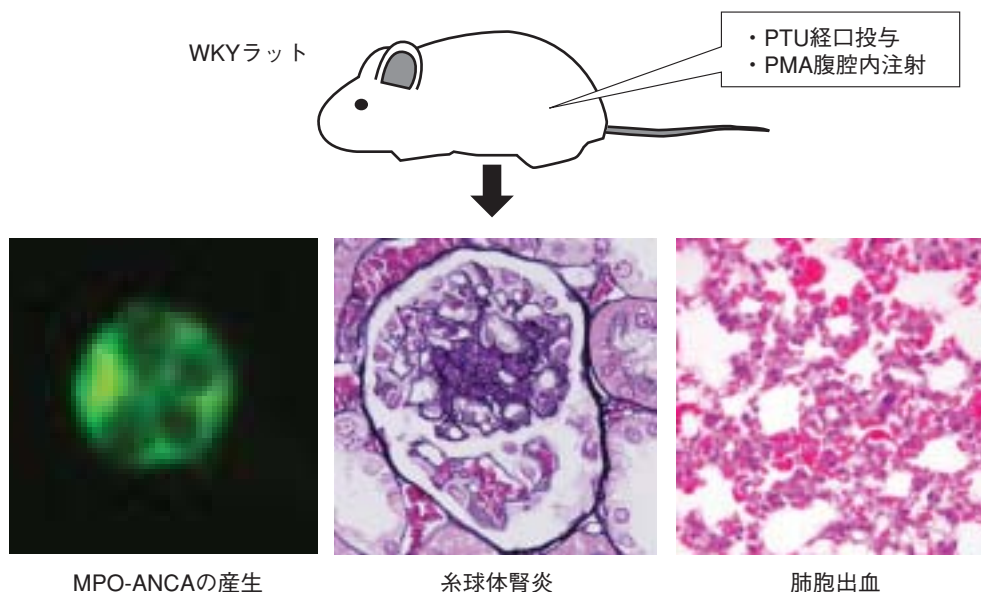


図 2 PTU 経口投与と PMA 腹腔内注射により WKY ラットに誘導された MPO-ANCA と血管炎  
(文献 11 より引用, 改変)

NETs は DNA とともに自己蛋白を細胞外に曝露しており、かつ、その主要成分である DNA には toll-like receptor 9 (TLR9) を介した抗体産生作用がある<sup>14)</sup>。加えて、NET-DNA に反応する形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC: pDC) が多量の I 型 IFN の産生を誘導すること<sup>15)</sup> などから、NETs 成分は抗原として認識されやすい状態にあると想定される。それゆえ、NETs と反応した mDC は、抗原提示を行い、ANCA の産生、ならびに血管炎を誘導する可能性が考えられている。この現象に関しては、生体内のどのような状況で mDC が NETs を抗原提示するかという点が不明であるが、いずれにしてもこの 2 つの研究により、ANCA 関連血管炎の発症には ANCA の対応抗原を有する NETs の制御異常が密接にかかわっていることが示唆される。

## NETs と ANCA による悪循環病態

### 1. ANCA による NETs の誘導

NETs は ANCA の産生にかかわるだけでなく、ANCA 関連血管炎の悪循環病態を招いている。2009 年に Kessenbrock らは、ANCA 関連血管炎患者では血管炎部位や血清中に過剰な NETs が存在し、さらに ANCA が好中球に作用して NETs を誘導するという新しい概念を報告した<sup>5)</sup>。以前より、ANCA により炎症が起こるメカニズムとして、感染などの刺激によって産生される TNF- $\alpha$  などの炎症性サ

イトカインにより活性化された好中球が、細胞表面に MPO や proteinase 3 (PR3) を表出し、ANCA がこれらの抗原と結合することで好中球がさらに活性化され、殺菌蛋白や活性酸素が放出されて微小血管に炎症が起こるとされていたが、Kessenbrock らの研究から、この現象は ANCA 刺激による NETs 形成の一部をみているものと考えられる。そこでわれわれは、ANCA による NETs 誘導活性が本疾患の活動性を反映するのではないかと仮説を立て、患者検体を用いて NETs 誘導活性ならびにその機序と疾患活動性との関連を解析した。北海道大学病院に通院している MPO-ANCA 陽性 MPA 患者の血清を用いて、血清から IgG を抽出し、TNF- $\alpha$  で前処理した健常者好中球に添加すると、健常者血清から抽出した IgG に比べて有意に強く NETs が誘導された<sup>16)</sup> (図 3a)。この NETs 誘導活性は血管炎の活動度 Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) と正の相関を示し (図 3b)、また、疾患活動性を反映する ANCA の抗原親和性<sup>17)</sup> とも関連した (図 3c)。この NETs 誘導活性は MPO の添加により吸収されることから、患者血清における NETs 誘導因子の本体が MPO-ANCA であることが確認された<sup>16)</sup>。

### 2. MPA 患者では NETs の制御障害が存在する

NETs は生体内では DNase I により適切に分解・制御されている<sup>6)</sup>。前述の PTU による DNase I 抵抗性 NETs や、NETs を抗原提示する mDC が自己抗体 (MPO-ANCA) の産生に関与するという基礎研究の結果から、われわれは

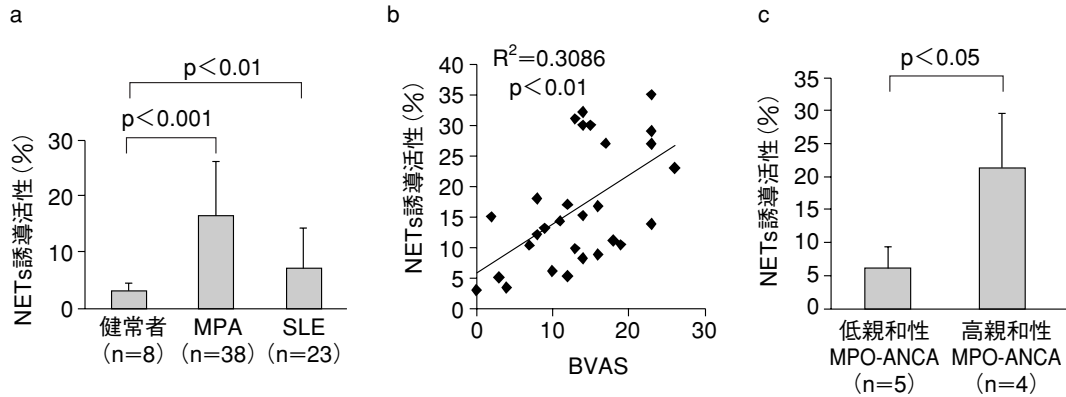


図 3 血清 IgG の NETs 誘導活性

- a : 健常者と MPA 患者, SLE 患者の比較  
 b : MPA 患者血清の NETs 誘導活性と BVAS の相関  
 c : MPA 患者血清の NETs 誘導活性と ANCA 親和性の関連

(文献 16 より引用, 改変)

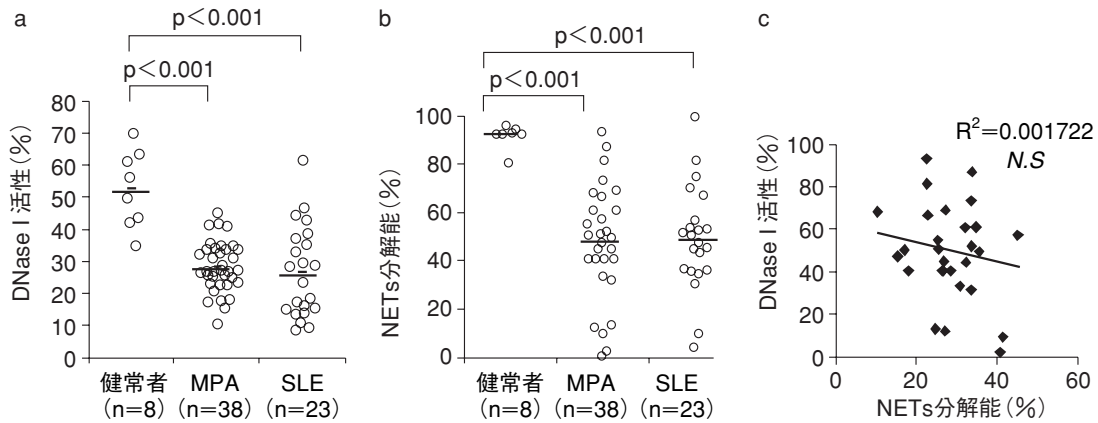


図 4 NETs 制御にかかわる DNase I 活性, NETs 分解能の関係

- a : 血清 DNase I 活性の比較 (健常者と MPA 患者, SLE 患者)  
 b : 血清 NETs 分解能の比較 (健常者と MPA 患者, SLE 患者)  
 c : MPA 患者における DNase I 活性と NETs 分解能の関係

(文献 16 より引用, 改変)

MPO-ANCA 陽性 MPA 患者でも NETs の制御障害が起こっているのではないかと仮説を立てた。MPO-ANCA 陽性 MPA 患者の DNase I 活性は、健常者に比べ有意に低く<sup>16)</sup>(図 4a), その値は血管炎の活動度には依存しなかった。そこで、実際の NETs 分解活性を調べるために、健常者好中球に誘導した NETs に患者血清を添加して NETs の分解活性を評価したところ、健常者血清と比較して、MPA 患者の血清では NETs 分解活性が有意に低かった(図 4b)。この NETs 分解障害の程度と血管炎活動度の間にも相関はみられず、NETs 分解障害は本疾患の背景として存在することが示唆された。また興味深いことに、NETs 分解障害の程度は DNase I 活性低下とも相関せず(図 4c)、NETs 制

御能に影響を与える未知の因子が存在する可能性が考えられた。

### 3. NETs 制御障害には DNase I 活性障害や NETs 関連抗体が関与する

NETs 分解障害を有する MPO-ANCA 陽性 MPA 患者のうち、前述の血清による NETs 分解実験系において血清から抗体除去処理を行う群、さらに DNase I を添加する群を解析したところ、抗体除去で分解活性が改善する群と DNase I 添加で分解活性が改善する群が存在することがわかった<sup>16)</sup>(図 5)。前者は抗 DNase I 抗体や NETs と結合して DNase I の作用を阻害する抗体を有する病態が示唆され、実際に一部の患者血清中に NETs と強い結合を示す抗



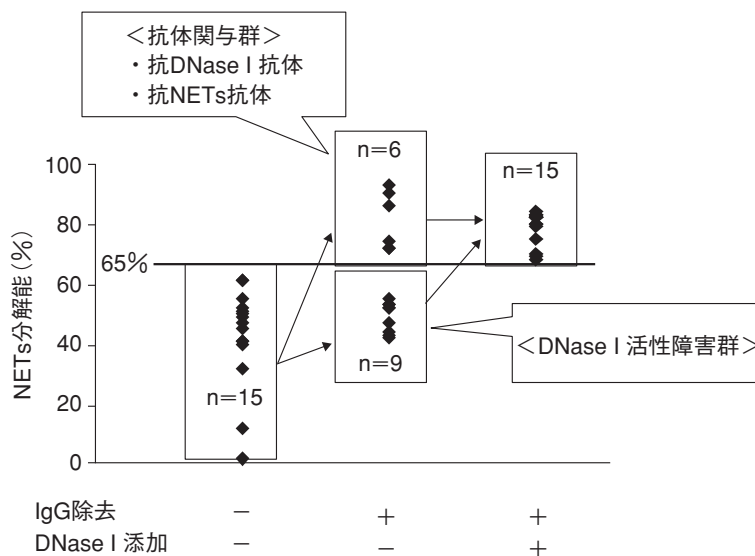


図 5 NETs 分解障害の機序(文献 16 より引用, 改変)

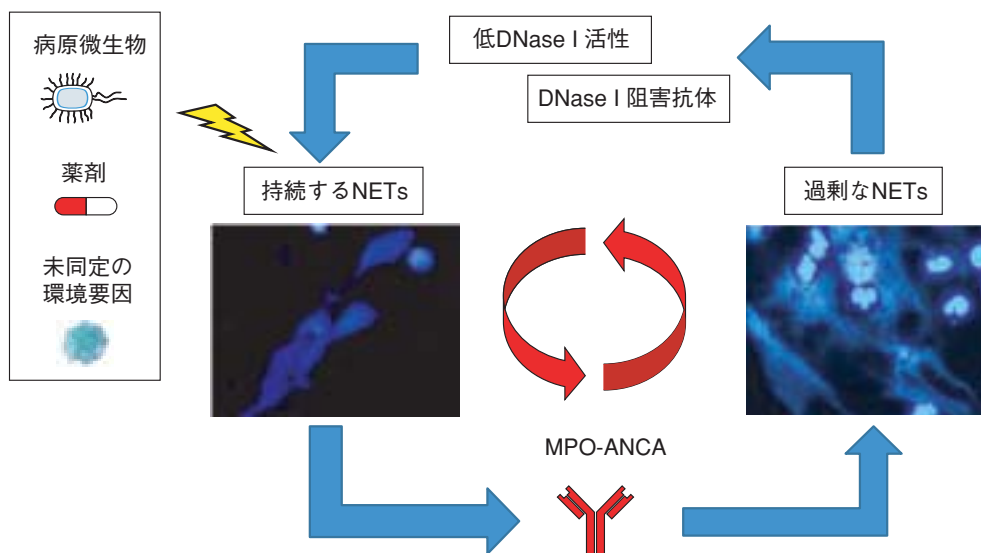


図 6 NETs-ANCA vicious cycle

NETs 抗体が同定された<sup>16)</sup>。MPO-ANCA 陽性 MPA 患者では複数の機序に基づく“NETs が分解されにくい状況”があると言える。

#### 4. NETs-ANCA vicious cycle

上述の結果より、MPA 患者では、DNase I 活性が低いことによって NETs が存続しやすい状況にある。そこに、感染症や薬剤などの環境因子により MPO の構造修飾などが起これば、自己抗原に対する免疫寛容の破綻、すなわち MPO-ANCA の産生が誘導される。産生された MPO-ANCA は活性化好中球に作用して過剰な NETs を誘導し、やがて抗 DNase I 抗体や抗 NETs 抗体などの DNase I 阻害

抗体が産生されて、NETs が分解されにくい状況が助長される。すなわち、NETs と MPO-ANCA を介した悪循環病態が形成されていると考えられる。以前より、サイトカインと ANCA を介した好中球活性化現象は ANCA-cytokine sequence theory として知られていたが、本研究の結果より、NETs が病態悪化を加速させることから、NETs-ANCA vicious cycle が起こっていると言える<sup>16)</sup>(図 6)。したがって、この悪循環を断つことが本疾患の新規治療につながる可能性がある。

### MPO-ANCA 関連血管炎の特異的治療

NETs が MPO-ANCA 関連血管炎の発症機序，ならびに悪循環病態に関与することから，NETs を制御することが本疾患の特異的治療となると期待される。NETs の誘導には，好中球内の活性酸素の経路や<sup>18)</sup>，ヒストン蛋白のシトルリン化の経路が必須とされており<sup>19)</sup>，これらの経路の阻害薬が候補薬剤となりうる。また既存の治療としては，重症 MPA 患者において，血漿交換が奏効する症例を経験することがあり，前述の結果から，血漿交換の効果は ANCA の除去だけではなく，DNase I の補充や，NETs 関連抗体の除去が関与している可能性がある。現在，EUVAS (欧州血管炎研究グループ) と VCRC (米国血管炎臨床研究コンソーシアム) が中心となって行われている PEXIVAS 試験 (血管炎に対する血漿交換の有効性評価試験) の結果が期待される。

### おわりに

NETs は感染性微生物から生体を守る重要な免疫機構である。しかし，過剰な NETs は敗血症や血栓症，自己免疫疾患などさまざまな病態に関与することがわかってきた。なかでも，ANCA 関連血管炎は，NETs が病原性自己抗体である ANCA の産生と悪循環病態を誘導することから，NETs と密接な関連がある自己免疫疾患と言える。今後，NETs 制御に関する知見がさらに集積され，本疾患に対する NETs 制御治療が臨床応用される日は近いと信じている。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

### 文 献

- Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, Hoffman GS, Jayne DR, Kallenberg CG, Lamprecht P, Langford CA, Luqmani RA, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Ozen S, Pusey CD, Rasmussen N, Rees AJ, Scott DG, Specks U, Stone JH, Takahashi K, Watts RA. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013 ; 65 : 1-11. PubMed PMID : 23045170. Epub 2012/10/10. eng.
- Kallenberg CG. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated small-vessel vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2007 ; 19 : 17-24. PubMed PMID : 17143091.
- Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil

cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4115-4119. PubMed PMID : 2161532. Pubmed Central PMCID : 54058. Epub 1990/06/01. eng.

- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004 ; 303 : 1532-1535. PubMed PMID : 15001782. Epub 2004/03/06. eng.
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009 ; 15 : 623-625. PubMed PMID : 19448636. Pubmed Central PMCID : 2760083. Epub 2009/05/19. eng.
- Hakim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 9813-9818. PubMed PMID : 20439745. Pubmed Central PMCID : 2906830. Epub 2010/05/05. eng.
- Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, Bengtsson AA, Blom AM. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 2012 ; 188 : 3522-3531. PubMed PMID : 22345666.
- Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, Thompson P, Chen P, Fox DA, Pennathur S, Kaplan MJ. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2013 ; 5 : 178ra40. PubMed PMID : 23536012. Pubmed Central PMCID : 3727661.
- Wada N, Mukai M, Kohno M, Notoya A, Ito T, Yoshioka N. Prevalence of serum anti-myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) in patients with Graves' disease treated with propylthiouracil and thiamazole. *Endocr J* 2002 ; 49 : 329-334. PubMed PMID : 12201217.
- Waldhauser L, Uetrecht J. Oxidation of propylthiouracil to reactive metabolites by activated neutrophils. Implications for agranulocytosis. *Drug Metab Dispos* 1991 ; 19 : 354-359. PubMed PMID : 1676636.
- Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A. 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 Rheum* 2012 ; 64 : 3779-3787. PubMed PMID : 22777766. Epub 2012/07/11. eng.
- Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol* 2013 ; 17 : 631-633. PubMed PMID : 23224024. Epub 2012/12/12.

- Eng.
13. Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, Piconese S, Parenza M, Guiducci C, Vitali C, Colombo MP. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012 ; 120 : 3007-3018. PubMed PMID : 22932797. Epub 2012/08/31. eng.
  14. Hurtado PR, Jeffs L, Nitschke J, Patel M, Sarvestani G, Cassidy J, Hissaria P, Gillis D, Peh CA. CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. *BMC Immunol* 2008 ; 9 : 34. PubMed PMID : 18625057. Pubmed Central PMCID : 2483256.
  15. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Riccieri V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011 ; 3 : 73 ra19. PubMed PMID : 21389263. Pubmed Central PMCID : 3399524.
  16. Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in MPO-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol* (in press)
  17. Yoshida M, Sasaki M, Nakabayashi I, Akashi M, Tomiyasu T, Yoshikawa N, Kojima T, Ohno N, Yamada M. Two types of myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with a high affinity and a low affinity in small vessel vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 2009 ; 27(1 Suppl 52) : S28-32. PubMed PMID : 19646343. Epub 2010/01/14. eng.
  18. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007 ; 176 : 231-241. PubMed PMID : 17210947. Pubmed Central PMCID : 2063942. Epub 2007/01/11. eng.
  19. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 1853-1862. PubMed PMID : 20733033. Pubmed Central PMCID : 2931169. Epub 2010/08/25. eng.