

## 論文の内容の要旨

論文題目

Imiquimod 誘発ループモデルマウスにおける Peptidylarginine deiminase の役割の検討

氏名 花田 徳大

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) は、抗核抗体、抗 DNA 抗体に代表される自己抗体の出現と、免疫複合体沈着による腎、神経障害など多彩な臓器障害を特徴とする自己免疫疾患である。遺伝的要因、環境的要因として様々なものが想定されているが、発症要因は完全には明らかではない。想定される発症機序としては、死細胞由来の danger signal としての核酸と自己抗体が免疫複合体を形成し、Fc 受容体を介した形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells : pDCs) 刺激が起こり、pDCs 内に発現する TLR 7、TLR 9 が活性化された結果、大量の I 型インターフェロン (interferon : IFN) が産生される。その後、抗原提示細胞が活性化され、さらに抗体が産生される正のループを形成することが、SLE における免疫系の過剰活性化に関与していると考えられている。

好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs) は、好中球の活性化に伴い、顆粒蛋白とクロマチンが網状の複合体を形成した状態で細胞外に放出され、殺菌作用を呈する好中球の細胞死の一形態である。NETs に含まれる DNA、ヒストン、LL37 などの蛋白は、SLE における自己抗体の対応抗原であることより、過剰な NETosis は自己抗原の負荷を増強し、SLE における自己免疫寛容の破綻に関与していると考えられるようになった。しかし、その詳細な機序は未だ明らかではない。

Peptidylarginine deiminase (PAD) は多くのタンパク質を基質としてアルギニン残基をシトルリンに変換する酵素である。PAD4 をコードする遺伝子である *Peptidylarginine deiminase 4* (*Padi4*) は関節リウマチにおける非主要組織適合遺伝子複合体領域の疾患感受性遺伝子として初めて同定された。*Padi4* は主に好中球、単球などのミエロイド系細胞で発現することが知られている。更に、*Padi4* によるヒストンのシトルリン化は NETs 産生に必須であるクロマチンの脱凝集のプロセスに不可欠な役割を果たし、*Padi4* ノックアウト (KO) マウスでは NETs の産生が完全に阻害されることが報告されている。SLE モデルマウスにおける PAD 阻害薬 Cl-amidine の有効性に関する論文が複数報告されているものの、Cl-amidine は PAD4 以外にも PAD1、3 阻害作用をもつこと、Cl-amidine 治療で NETs 産生を完全に抑制することは困難であることから、SLE における NETs の重要性の検討を行うためには、NETs 産生が完全に抑制される *Padi4* KO マウスを用いて検討することが必要である。

SLE の治療としては、ステロイドを中心に、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル、シクロホスファミドなどの免疫抑制薬の併用が現在の標準である。また、ヒドロキシクロロキンが昨年日本でも承認された。さらに、ベリムマブや、リツキシマブなどの B 細胞を標的とした生物学的製剤も登場している。しかし、現在広く使われているステロイドでは長期使用に伴う感染症などの副作用の問題をはらんでおり、他の免疫抑制薬、生物学的製剤併用においても同様の

副作用の問題、治療効果不十分例が存在するため、新薬の開発が望まれている。

本研究では、自然免疫シグナルにより惹起される SLE モデルマウスである Imiquimod (IMQ) 誘発ループスマウスを用い、NETs 形成に必須である *Padi4* の欠損マウスによる SLE モデルの検討を行うとともに、SLE の新規治療標的としての *Padi4* の免疫系における役割に関して考察を行った。

はじめに、BALB/c マウスに対して IMQ 耳朶塗布を行い、同時に Cl-amidine を腹腔内投与してループス様病態に対する影響を評価したところ、IMQ 耳朶塗布により誘発される蛋白尿、脾細胞における pDCs 割合の低下は、Cl-amidine 治療により改善することが示された。Wild-type (WT) IMQ 耳朶塗布群では、Cl-amidine 治療の有無に関わらず IMQ 無処置群と比較し、有意に血清抗 double-stranded DNA (抗 ds-DNA) 抗体価の上昇を認めたが、Cl-amidine 治療による血清抗 ds-DNA 抗体価の有意な変化は見られなかった。

次に、NETs を完全に欠損した系での検討を目的として、B6 *Padi4* KO マウスにおいて IMQ 耳朶塗布によるループス様病態を評価した。*Padi4* KO マウスでは WT と比較して、IMQ 耳朶塗布による脾腫、蛋白尿、耳朶皮膚表皮肥厚、炎症細胞浸潤の改善を認め、NETs 欠損による SLE 様病態の改善作用が示された。また、蛋白尿の減少は Cl-amidine 治療時と比較し、より顕著であった。一方で、抗 ds-DNA 抗体価の低下は明らかではなく、Cl-amidine 治療による結果と同様であった。

さらに、IMQ 耳朶塗布 *Padi4* KO マウスにおける腎臓、脾臓の免疫細胞サブセットの解析をフローサイトメーターにより行った。脾臓では CD11b 陽性細胞の *Padi4* 欠損による変化が明らかでなかった一方で、障害臓器である腎臓においては *Padi4* 欠損による CD11b 陽性細胞の浸潤が減少していた。また、腎臓においては pDCs の浸潤はフローサイトメーターでは検出できなかった。脾臓におけるその他の免疫細胞に関しては、WT IMQ 耳朶塗布群では無処置群と比較し、有意な pDCs 割合の減少を認めたが、*Padi4* KO マウスでは無処置群と比較し pDCs 割合の減少は認められなかった。

最後に、SLE における NETs の役割についてヒト検体を用いて検討した。既に pDCs に対する NETs を含む免疫複合体による刺激作用は報告があるが、今回の IMQ 耳朶塗布マウスにおけるフローサイトメーターによる検討では障害臓器である腎臓において pDCs の浸潤は検出できなかった。そこで、腎臓における NETs 刺激の標的細胞の候補として単球を想定し、NETs のヒト単球に対する作用について検討を行った。ヒト単球においては、NETs 単独刺激による単球の活性化は明らかではなかった。一方で、SLE 患者由来 NETs (SLE-NETs) + SLE-IgG の免疫複合体による有意な活性化を認め、IFN- $\alpha$  による事前培養下で SLE-NETs + SLE-IgG の免疫複合体による刺激を行うと、更なる活性化を認めた。以上より、NETs を含む免疫複合体による単球刺激作用が明らかとなった。一方で、同様の検討をヒト B 細胞で行ったところ、NETs および NETs 免疫複合体による活性化作用は明らかでなかった。

以上から、IMQ 耳朶塗布を行った B6 *Padi4* KO マウスにおいて、皮膚病変、脾腫、蛋白尿などの SLE 様病態の改善を認め、免疫系における NETs、*Padi4* の重要な役割が示唆された。特記すべき点として、IMQ 耳朶塗布マウスにおける腎臓 CD11b 陽性ミエロイド系細胞の浸潤が、

*Padi4* 欠損マウスでは抑制されていた。よって、IMQ 耳塗布による腎臓へのミエロイド系細胞の浸潤が生じていることが腎炎悪化に関与していることが想定され、*Padi4* 欠損により、これらが改善することより、ミエロイド系細胞の腎臓への浸潤、活性化の機序については、NETs の関与が示唆された。また、今回の検討では、NETs を含む免疫複合体によるヒト単球活性化促進が明らかとなった。*Padi4* 欠損マウスにおける腎炎改善機序のひとつとして、NETs および NETs を含む免疫複合体を欠くことによる、腎臓へのミエロイド系細胞の浸潤、活性化の抑制が想定され、NETs の抑制はループス腎炎治療の新規標的となる可能性がある。

結語として、今回の SLE モデルマウスにおける *Padi4* KO マウスを用いた NETs 欠損系による検討および過去の報告により、SLE 病態における NETs の役割に関して、以下のモデルが提唱される。1) 腎局所においては、NETs ないしは NETs を含む免疫複合体は、ミエロイド系細胞の浸潤、活性化を誘導し、腎障害に関与する、2) NETs ないしは NETs を含む免疫複合体は皮膚における pDCs の遊走、活性化を誘導している。1、2 の機序は互いに関連があり、特に NETs を含む免疫複合体による単球の活性化に関しては pDCs により産生されるとされる IFN- $\alpha$  添加により顕著となる。この、ヒト単球において証明された NETs を含む免疫複合体による刺激作用は SLE の病態における新たに判明した機序であると考えられる。一方で、in vivo における *Padi4* 欠損による B 細胞、自己抗体への影響は乏しく、実際のヒト SLE 治療への応用の観点からは、重症例については例えばリツキシマブやベリムマブといった B 細胞抑制剤との併用といった戦略を考慮する必要があるかもしれない。また抗体産生に大きな影響を与えない点は、副作用の観点からは望ましい可能性もある。以上のように、NETs 抑制による特徴的な機序による SLE への治療効果が想定され、*Padi4* 阻害薬は SLE の新規治療戦略として期待できる。