

## 論文の内容の要旨

論文題目 全身性自己免疫マウスモデルの病態における **neutrophil extracellular traps** の役割と治療

氏名 坂内穎

### 序文

全身性エリテマトーデス (SLE) をはじめとした多くの自己免疫疾患において、自己抗体は疾患の発症や病態形成に密接に関連している。自己抗体産生は病態に深く根ざしており、その産生機序を解明することは自己免疫病態の理解につながり、新規治療法を探るヒントになると考えられる。

自己免疫疾患の病態形成に、腸内細菌が重要な役割を果たしていることが知られてきた。その機序として、細菌感染による粘膜組織障害に起因した隔絶抗原の露出や、細菌の定着に伴う炎症性サイトカインによる自己反応性 T 細胞の活性化、細菌が有する酵素による蛋白修飾に伴い新たな自己抗原が産生され免疫系に認識されるなど多くの可能性が報告されている。

近年、細菌と自己免疫を結びつくものとして注目されているものとして、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs)がある。NETs は、感染微生物を捕捉し除去するために好中球が核内クロマチンや顆粒蛋白を細胞外に放出して形成される網状構造物を指すが、自己抗原を露出することにより免疫応答を惹起することが知られている。SLE では、low density granulocyte (LDG) と呼ばれる白血球分画が存在し、NETs 形成能が亢進しているとともに、DNase 異常による NETs 分解不全も見られ、過剰な NETs の存在が病態に密接に関与していることが指摘されている。しかし、生体内で NETs がどのように自己免疫応答に影響し、自己抗体産生に至るのかについてはまだ殆ど検討されていない。

ところで、リンパ球減少時に、末梢の T 細胞が homeostatic proliferation を経て、生理的に分裂増殖し恒常性を保とうとする現象が生じる。胸腺を欠いた、すなわち胸腺由来 T 細胞の存在しない BALB/c スードマウスに野生型の BALB/c マウス由来の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞 (conventional T 細胞: Tc) を移入すると2ヶ月程度で胃炎、腸炎、唾液腺炎、甲状腺炎、卵巣炎を発症する。リンパ球減少下の homeostatic proliferation (Lymphopenia induced proliferation: LIP) に基づいたこの自己免疫マウスモデルは高抗体価の抗核抗体を誘導する生理的な系として確立されている。これまでに我々は、移入した Tc が5日以内に LIP-Tfh (follicular helper T) に分化し、脾臓などの二次リンパ組織で germinal center (GC) 形成を促進するとともに、4週以内に IgG 型の高抗体価の自己抗体を産生することを報告してきた。ここで誘導される LIP-Tfh は、ICOS、PD-1、CD200 などの特徴的な表面分子を有し、Bcl-6 を転写因子として発現し、IL-21 産生を介して B 細胞の抗体産生を促進するが、CXCR5 を殆ど発現していない点で、従来の Tfh とは異なったサブタイプであると考えられている。

また、LIP-Tfh の出現に腸内細菌の存在が必須であることから、本系は LIP を介した自己免疫応答に対する腸内細菌の影響を解析するのに適している系であると考えられる。

本研究では、LIP モデルを用いて、LIP-Tfh の誘導を介した自己抗体産生の過程で、NETs がどのように関与しているか、短期的及び長期的な視点で解明した。また、NETs 阻害剤を用いた治療応用について検討した。

## 方法と結果

### ヌードマウスへの CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞の移入

BALB/c 野生型マウス由来脾臓 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T (Tc: conventional T) を分離し、6-8 週齢の BALB/c ヌードマウスへ移入した。

### Cl-amidine による NETs 形成の抑制 (*in vitro*)

ヌードマウス、Tc を移入したヌードマウス、Tc 移入 2 日前より Cl-amidine を投与したヌードマウスの骨髄からそれぞれ好中球を分離し、PMA による刺激を行い NETs を誘導した。Hoechst と抗 Histone H3 抗体で DNA とシトルリン化 Histone を染色した。Cl-amidine 投与群では、他の 2 群と比較して NETs 形成率が低下し、Cl-amidine による NETs 形成抑制効果を認めた。

### 腸管粘膜、腸間膜リンパ節、脾臓における NETs の同定

ヌードマウスの結腸、腸間膜リンパ節、脾臓に対して、抗 myeloperoxidase, 抗 neutrophil elastase, 抗 Histone H3 抗体や Hoechst を用いて免疫染色を行った。いずれの臓器においても、NETs と推測される構造を認めた。

### 腸管滅菌による NETs の抑制 (*in vivo*)

ヌードマウスに対して、4 種の広域抗菌薬 (Ciprofloxacin, Imipenem, Metronidazole, Vancomycin) を経口投与し、腸管滅菌を行った。滅菌 10 日後のマウス結腸と脾臓に対し免疫染色を行い NETs を同定した。抗菌薬非投与群と比較すると、いずれの組織においても単位面積あたりの NETs の数は減少しており、NETs 自体の大きさも縮小している傾向を認めた。

### CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 細胞移入ヌードマウスに対する Cl-amidine や DNase I の投与による LIP-Tfh, GC の変化

Tc 移入の 2 日前から、NETs 阻害剤である Cl-amidine 及び DNase I を投与した。フローサイトメトリーを用いた解析により、Cl-amidine 投与群、DNase I 投与群のいずれにおいても、移入 5 日後に PD-1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CXCR5<sup>low/-</sup>の特徴を持った CD4<sup>+</sup> T 細胞、すなわち我々が今まで報告してきた LIP-Tfh 細胞の誘導が抑制された。また、GC-B の特徴を持つ Fas<sup>+</sup>GL-7<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B 細胞も、NETs 阻害群では抑制された。

移入 5 日目の脾臓について組織学的検討を行った。Tc 移入群は、IgD 陽性濾胞 B 細胞に囲まれて、peanut agglutinin (PNA) で染まる GC の形成が見られ、PD-1 陽性 T 細胞の侵入を伴うことから、移入した Tc がレシピーエントにおける GC 形成を誘導する LIP-Tfh 細胞に分化したと考えられた。Cl-amidine 投与により、GC と推測される PNA 陽性部位は縮小し、周囲の IgD 陽性濾胞 B 細胞や PD-1 陽性細胞も減少した。DNase I に関しても同様の傾向が観察された。

### DNase I 投与による抗核抗体や特異抗体の産生への影響

DNase I 投与 4 週間後における抗核抗体を蛍光抗体法で評価した。Tc の移入 2 週間後より、多様な IgG 型抗核抗体産生が見られるが、DNase I 投与群では、非投与群と比較して、抗核抗体の平均値が低下した。種々の核内抗原 (RNP-70, RNP/Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Centromere B, Jo-1) に対する抗体を ELISA 法で検出したところ、DNase I 投与群では、各種抗核抗体が抑制される傾向を示した。

ELISA で抗 dsDNA 抗体と抗胃壁抗体を評価した。DNase I 投与群では、抗 dsDNA 抗体は移入 4 週間後に抑制される傾向を示したが、抗胃壁抗体の抑制は見られなかった。

## Rag2 欠損マウス胃を用いた自己抗体の検索

Rag2 欠損 BALB/c マウスから胃を採取し、Tc 移入ヌードマウス及び DNase I 投与 Tc 移入ヌードマウスの血清を反応させたところ、DNase I 投与群では、胃細胞蛍光強度は低下した。ELISA では検索不可能であった何らかの IgG 型自己抗体が存在している可能性が考えられた。

## DNase I 投与による臓器障害への影響

ヌードマウスへ Tc を移入する本系では移入後 2 ヶ月程度で胃炎や腸炎等の臓器特異的自己免疫が生じることが知られている。Tc 移入群では胃粘膜の炎症細胞浸潤、胃底腺の萎縮、上皮の過形成などの萎縮性胃炎の像を呈しているのに対し、DNase I 投与群では胃底腺や粘膜構造の変化は軽度であり、胃炎スコアが低下した。腸管では Tc 移入群は腸管粘膜の肥厚、杯細胞の減少、陰窩の過形成、粘膜上皮の剥離等の典型的な腸炎の所見が見られたが、DNase I 投与群では、腸管粘膜の肥厚や粘膜上皮の剥離などの所見で軽減し、腸炎スコアが低下した。

Tc を移入した時点を 0 週とし、DNase I 投与群及び非投与群の 8 週までの体重推移を示した。Tc 移入により体重減少或いは体重増加不良が見られることはこれまで確認していたが、DNase I 投与により体重増加不良が改善した。

その他の臓器に関しては、Tc 移入群では、顎下腺では導管周囲の出血や漿液細胞への炎症細胞浸潤、甲状腺では濾胞細胞の大小不動や周囲の炎症細胞浸潤、卵巣では全体的な萎縮や液胞の消失、各種成熟段階の卵胞構造の不明瞭化、膵臓ではランゲルハンス島の萎縮や膵管周囲の出血が見られた。DNase I 投与によるそれらの病変に変化は認めなかった。

## 考察

本研究では、LIP-Tfh 産生を介した全身性及び臓器特異的自己抗体の誘導において、NETs が促進的に作用していることを明らかにした。また、NETs は胃や腸における消化管炎症病態の形成に寄与していることを見出した。

これまでの我々の研究結果から、LIP の系では、Tc は LIP-Tfh (ICOS<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>low</sup>T) に分化することにより、全身性自己抗体及び臓器特異的自己抗体の産生を促進し、様々な臓器障害を発症すること、LIP-Tfh の誘導には腸内細菌の存在は必須であることが明らかになっている。NETs の阻害により、LIP-Tfh の分化が抑制されたことから、NETs そのものが LIP-Tfh を誘導していることが今回新たに分かった。LIP-Tfh の出現に対する NETs の役割として、直接的に T 細胞に作用する機序と、抗原提示細胞である B 細胞等を介する機序とが考えられた。

NETs の阻害により、抗核抗体や抗 dsDNA 抗体の産生は抑制された。また、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase を抗原とする抗胃壁抗体の産生は抑制されなかったが、Rag2 欠損 BalB/c マウス胃に反応する何らかの抗胃抗体の産生は抑制された。NETs による全身性自己抗体と臓器特異的自己抗体の誘導機序は異なるものと考えられ、NETs 上に露出した核酸が自己抗原として免疫系に認識され、トレランスの破綻を来し抗核抗体産生が誘導されたのに対して、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 以外の胃細胞の抗原提示には NETs は間接的に関与していたと考えられた。

臓器病変における NETs の関与は、細菌の存在の有無により異なる結果が得られている。胃や腸などの消

化管では常に細菌に曝露されており、NETsを形成することで bacterial translocation による体内への侵入を防御している。NETs は本来炎症性の機構であるため、活性化好中球や他の免疫担当細胞より産生される炎症性サイトカインが直接組織障害を引き起こす。NETs の阻害によりこれらの炎症は鎮静化するために、炎症病態は軽減する。一方で、唾液腺や卵巣、膵臓、甲状腺など細菌と隔離されている臓器では、病態形成に対する NETs の寄与はそれほど強くない可能性が考えられた。

以上の結果から、NETs 阻害による治療応用の機序として、LIP-Tfh を介するものと、介さないものが考えられた。前者として抗核抗体や抗胃抗体などの自己抗体の抑制、後者として NETs 形成の場である消化管における炎症病態の改善が考えられた。

本研究では、元来獲得免疫が主体であると考えられてきた SLE などの自己免疫疾患に、好中球を主体とした自然免疫の果たす役割を明らかにした。NETs による自己抗原の提示や炎症の惹起を抑制することは、全身性自己免疫の制御や消化管における炎症性病変の抑制という観点から、より病態に即した選択的治療であると言える。