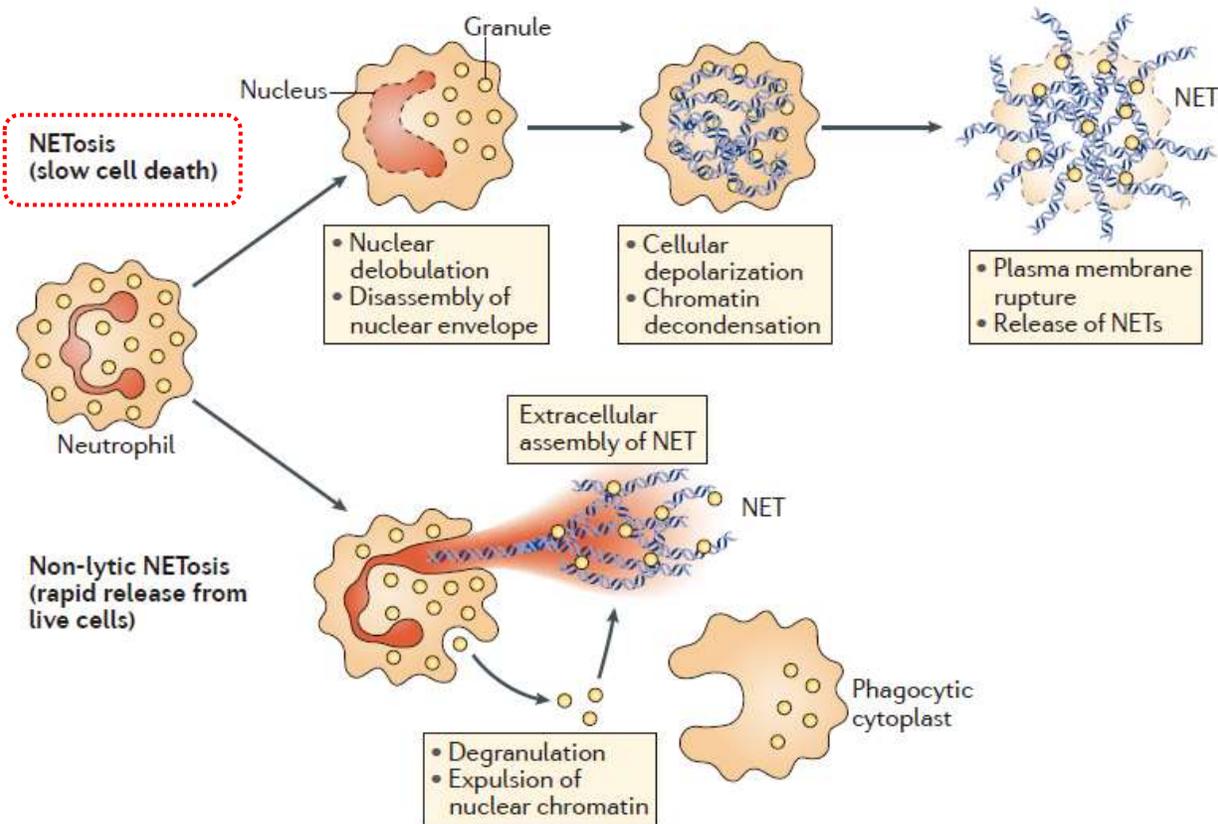


基礎 2. AAVとNETs

- AAVにおけるNETs形成亢進：2009 Nat Med
- PTUによるDNase I 阻害：2012 AR
- AAVとSLEのNETs形成の違い：2019 AR

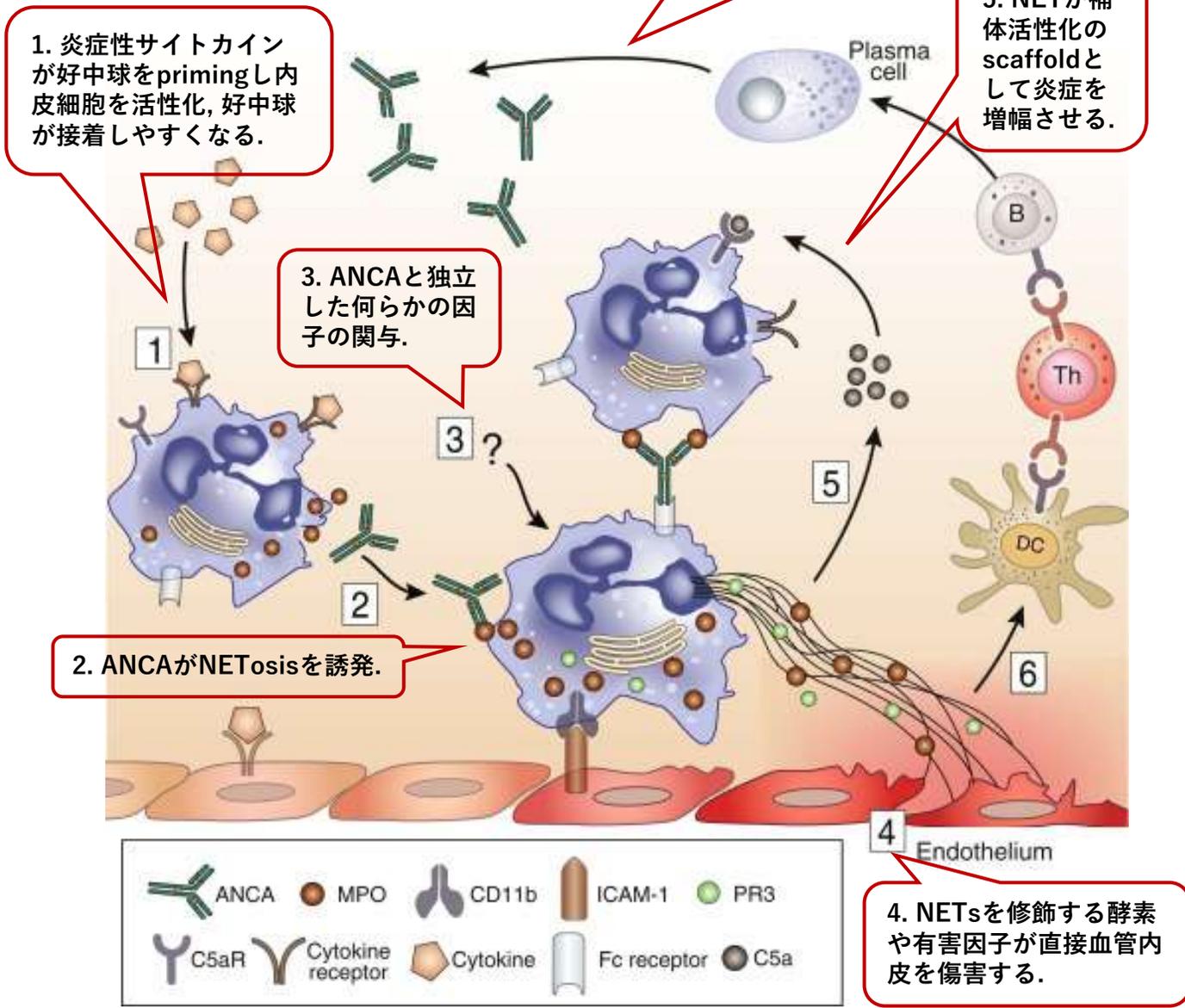
NETosis



[Nat Rev Immunol. 2018;18:134–147.]

- Apoptosis (自然死: programmed death), Necrosis (壊死: 炎症をおこす)とは別の第三の死とされる.
- 好中球がPMAやIL-8で刺激されると細胞内Ca²⁺が上昇し, NADPH oxidaseがROSを産生する.
- PAD4がヒストンをシトルリン化し, 好中球エラスターゼとMPOも協働してヒストンを分断し, DNA線維が巻きほどかれる.
- 核が膨張し核膜が破れてDNA線維が細胞内に流出, 細胞膜が壊れ, クロマチンが網状に放出される.
- NETsは細菌などの外敵に絡み, MΦに貪食されやすくなる.
- 自己抗原(MPOやDNA/RNA)が放出され, 自己免疫疾患の原因にもなる.
- **Lytic NETosis:** 数時間かかるslow cell deathで, NADPH oxidase依存性, PMA/微生物/結晶などで誘発される.
- **Non-lytic NETosis:** 数分で起きる, NADPH oxidase非依存性, LPS/血小板TLR4/補体+TLR2 ligand/ICで誘発される.

AAVとNETs



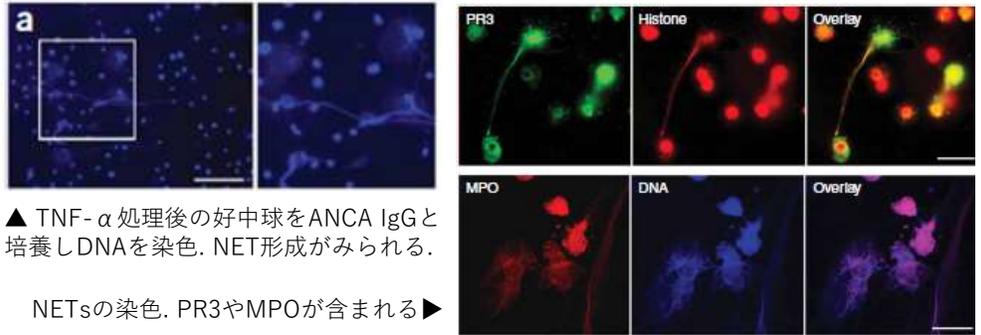
- AAVでは好中球からのNETs放出が亢進しており, 血管内皮障害を惹起すると考えられる.
- 炎症性サイトカインでPrimeされた好中球がMPOを表面に発現→MPOとFcγRをANCAがbridge→好中球活性化されNET形成→MPOさらに放出
- AAVでNETs蓄積 [Nat Med. 2009;15:623-5.]
- AAVでNETs分解するDNase I活性低下 [JASN 2014;25:990-7.]
- AAVで好中球上のSema4Dのshedding (ADAM17による)が亢進しNETsの抑制が低下 [ARD 2017;76:1440-8.]

[Kidney Int. 2018; 94(1): 14-16.]

Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis

[Nat Med. 2009; 15(6): 623-5.]

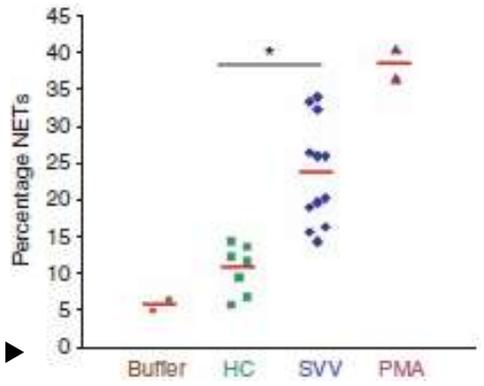
- AAVのANCA IgでNETs誘発亢進+MPO/PR3並存(*in vitro*)
- AAV腎標本でNET形成+ MPO/PR3並存(*in situ*)を示す。



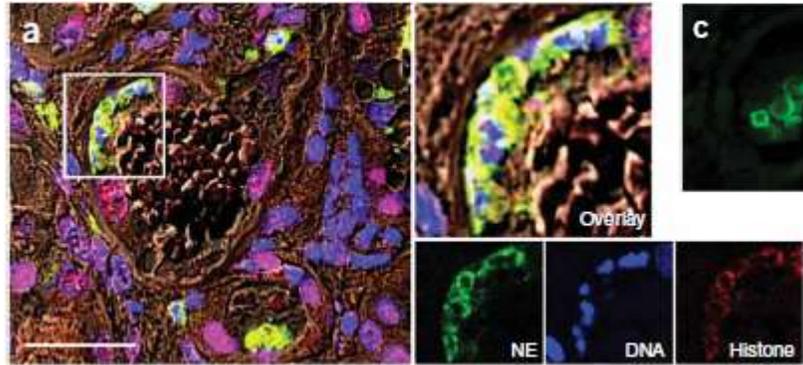
▲ TNF- α 処理後の好中球をANCA IgGと培養しDNAを染色. NET形成がみられる.

NETsの染色. PR3やMPOが含まれる▶

Buffer(陰性ctrl), PMA(陽性ctrl)と健常人(HC), AAV(SVV)患者血清のNET形成率▶

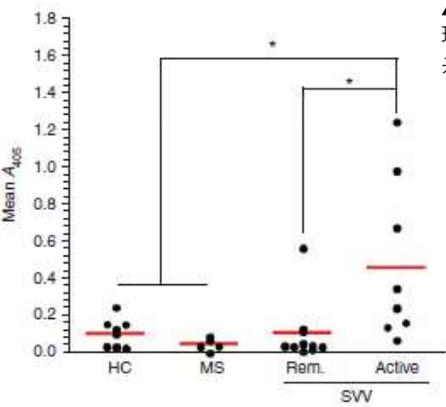


- NETs (neutrophil extracellular traps): 好中球が死ぬとき, 細胞外にchromatin fiberを放出
- NETsにはANCA対応抗原のPR3とMPOが含まれる.
- AAV血清はNET形成率が高い.
- AAV患者糸球体にNET形成とPR3/MPO認める. MxAの発現を認めており, pDCの活性化とIFN- α の産生が示唆される.
- MPO-DNA複合体を活動性のあるAAV患者血清に認める.
- NET形成が血管炎を惹起し, 自己免疫反応を亢進させることが示唆される.



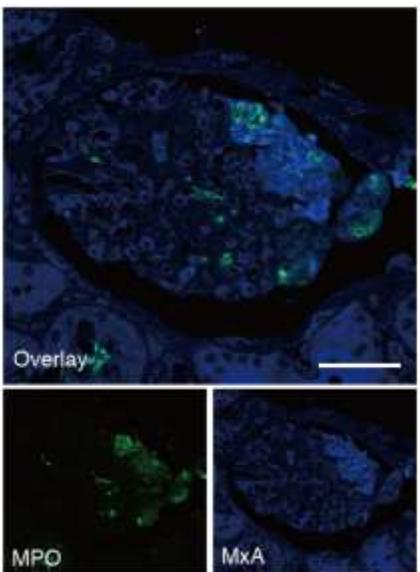
▲ AAV腎生検組織. PR3, MPO, DNAのNET形成部への共局在を認める

▲ AAV腎生検組織in situ免疫. 好中球エラスターゼ(緑), DNA(青), ヒストン(赤). 糸球体内にNET形成を認める



◀ 血清のMPO-DNA複合体定量

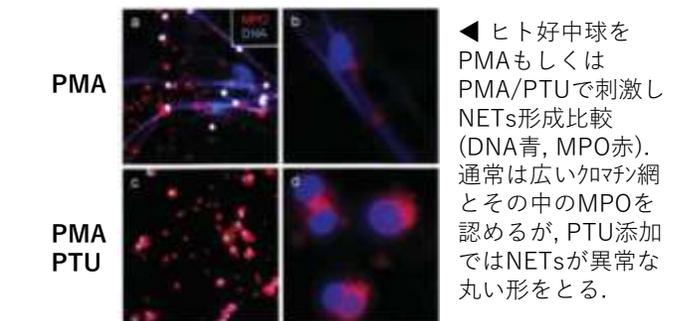
糸球体内好中球浸潤に近接したMxA発現. MPO陽性好中球(緑)を糸球体の壊死部分に認める. MxA(青)はMPO陽性細胞の近傍とresident glomerular cellsに発現する. MxAは遠位尿細管の上皮細胞に強発現している(右下area).



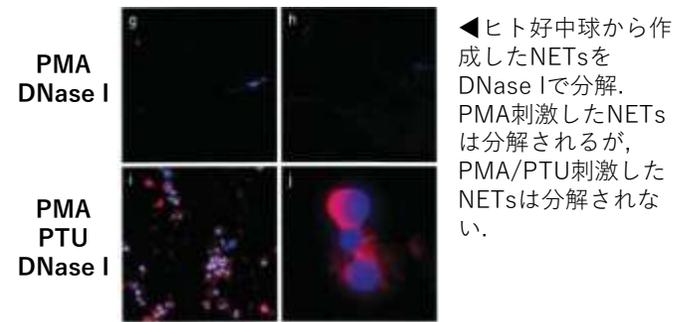
Abnormal Conformation and Impaired Degradation of Propylthiouracil-Induced Neutrophil Extracellular Traps

[Arthritis Rheum. 2012; 64(11): 3779-87.]

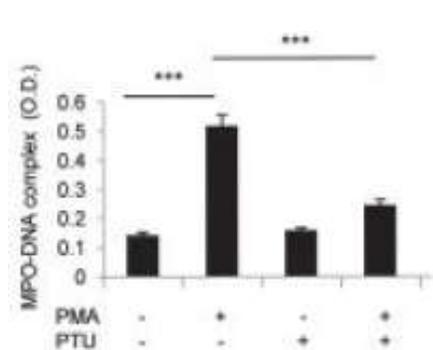
PTUはNETsのDNase I分解を阻害しPO-ANCA AAVを惹起する



◀ ヒト好中球をPMAもしくはPMA/PTUで刺激しNETs形成比較 (DNA青, MPO赤). 通常は広いコマギシ網とその中のMPOを認めるが, PTU添加ではNETsが異常な丸い形をとる.



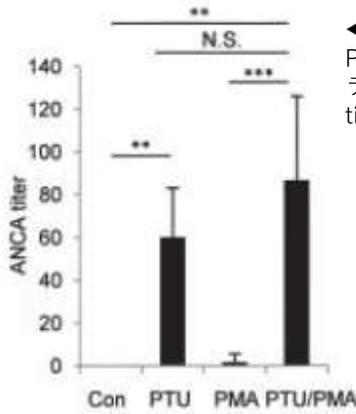
◀ ヒト好中球から作成したNETsをDNase Iで分解. PMA刺激したNETsは分解されるが, PMA/PTU刺激したNETsは分解されない.



◀ 上清のMPO-DNA複合体の濃度. PMA+PTUでのNETsは複合体の放出が低下している.

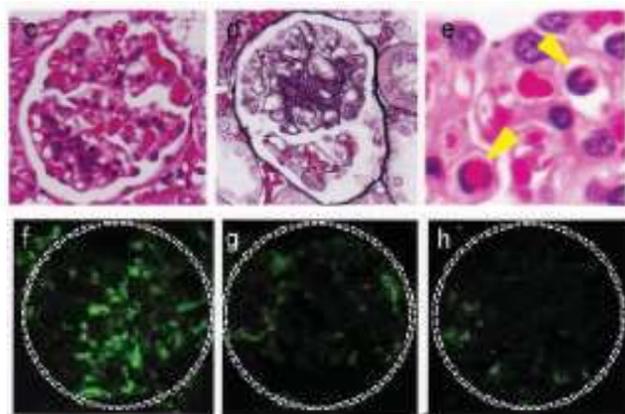


◀ PMAとPTUで誘導されたNETsで免疫されたラットでMPO-ANCA陽性の肺胞出血を認める..



◀ PTU, PMA, PTU/PMAを投与したラットでのMPO-ANCA titer比較.

▼ PTU/PMA投与したラットでpauci-immune糸球体腎炎の所見を認める.



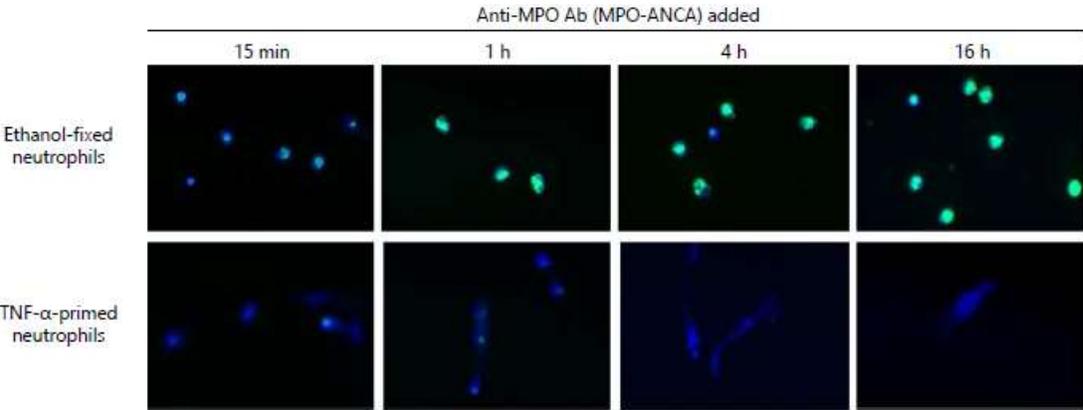
- Propylthiouracil (PTU)はMPO-ANCA産生のリスクがある.
- PTUのNET分解への影響とMPO-ANCA産生との関連を調べた論文.
- ヒト好中球をPMAで刺激するとNET形成し, DNase Iが分解する.
- PTUを加えるとNET形成が異常になり, DNase I分解が障害される.
- ラット好中球+PMA+PTUのNETsを免疫したラットは, 肺胞出血を呈しMPO-ANCA高値になる.
- ラットにPTU経口投与+PMA ipでMPO-ANCA陽性のpauci-immune糸球体腎炎と肺胞出血を認めた.

Vanishing Immunoglobulins: The Formation of Pauci-Immune Lesions in Myeloperoxidase-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis

[Nephron. 2018;138(4):328-330.]

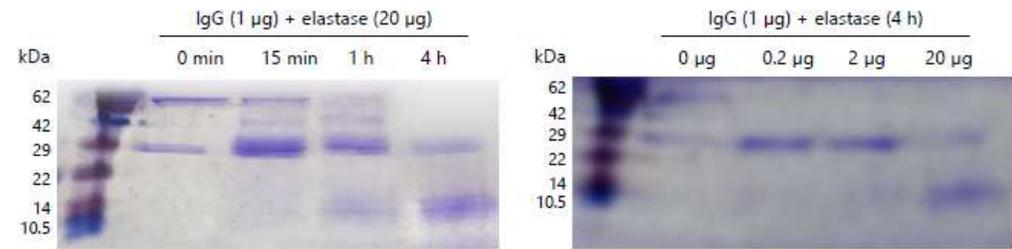
MPO-ANCAが好中球elastaseで分解されることが腎病理で pauci-immuneである理由かもしれないというletter.

- 好中球elastase：NET形成する好中球から放出される
- TNF- α でprimingした好中球はNET形成しているがMPO-ANCAで染色されない。
- 好中球elastaseはtime/dose dependentにIgGをdigestする。
- 好中球elastaseで分解されたMPO-ANCAは好中球に結合しなかった。
- MPO-ANCAで活性化したNET形成好中球由来elastaseがANCAを消化 → pauci-immuneの病理像を取るのかもしれないと推測



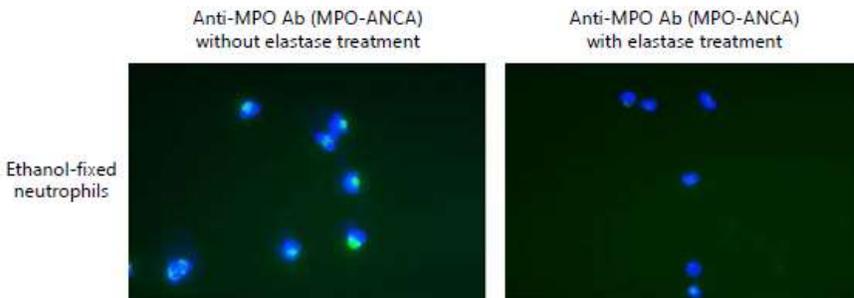
健常人好中球をEtOHで15分RTで固定(上段) or TNF- α で15分37°Cで刺激(下段), MPO-ANCA (FITC)添加, DAPIでDNA染色.

TNF- α でprimingした好中球はNET形成するが, MPO-ANCAで染色されない.



好中球elastaseによるmouse IgGのdigestion.

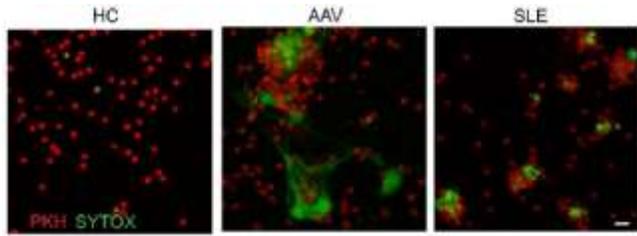
Time/Dose dependencyがみられる.



健常人好中球をEtOH固定後MPO-ANCA (FITC)と反応させ, DAPIでDNA染色. 好中球 elastase 有り無しで比較すると, 好中球elastaseで分解されたMPO-ANCAは好中球に結合しないことがわかる.

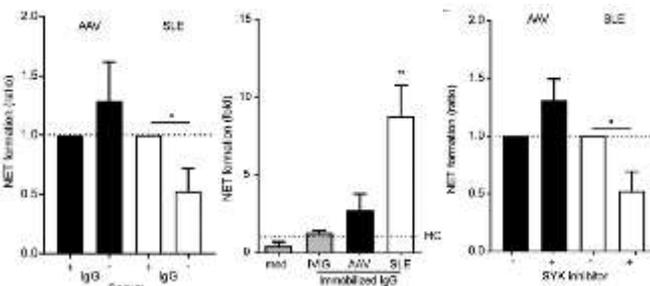
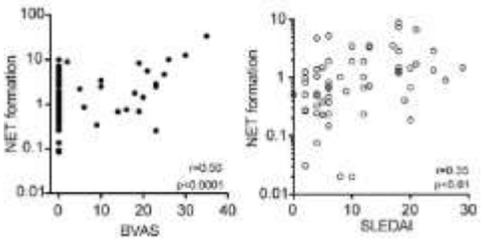
Intrinsically Distinct Role of Neutrophil Extracellular Trap Formation in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Compared to Systemic Lupus Erythematosus

[Arthritis Rheumatol. 2019;71(12):2047-58.]

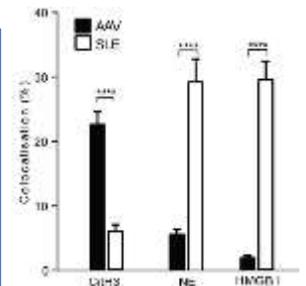


◀ 患者血清で健康人好中球にNET誘発。AAVはDNAが広く伸展し、SLEは細胞外DNA周囲に好中球cluster認める。

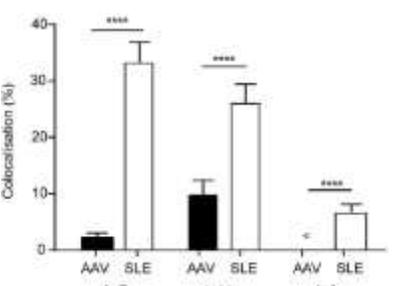
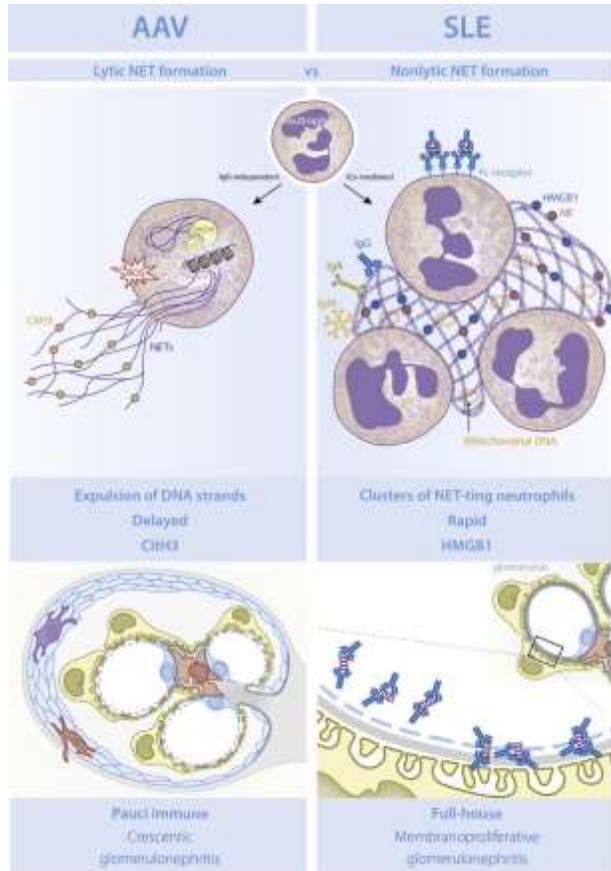
▶ AAVの活動性(BVAS), SLE活動性(SLEDAI)とNET形成は相関する、



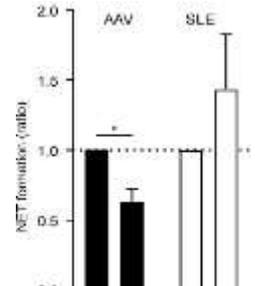
▲ AAV血清からIgG除去 (G-agarose beads) してもNET形成不変だがSLE血清では低下。
 ▲ ICxを模した付着IgG(SLE由来)がNET形成する。(外からIgG添加はNET形成なし)
 ▲ Syk阻害剤(R406)でFcγRシグナル阻害でSLE血清NET形成が低下。



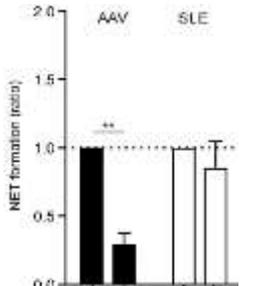
▲ AAV血清由来NETはCitH3, SEL由来NETは好中球 elastase, HMGB-1が高い。



▲ SLE血清由来NETにはIgG/A/Mがco-localizationする。免疫複合体がSLE-NETに付着することを示す (AAV-NETには認めない)。



▲ PAD阻害剤 (Cl-amidine)でAAV由来NET形成は低下するがSLE-NETは影響を受けない。



▲ NADPH oxidase阻害剤 (DPI)でAAV-NET形成低下するがSLE-NETは影響がない。

AAVとSLEの血清由来NETsの比較

- AAV (n = 80)とSLE (n = 59) 血清のNET形成比較。
- AAV/SLE血清はNET形成能高く、疾患活動性と相関 (AAV r=0.5, p<0.0001; SLE r=0.35, p<0.01)。
- AAV-NETは数時間で融解し、NADPH oxidase 依存性(Lytic NET)だが、SLE-NETは数分で形成され融解はせず、好中球集簇を伴う(Non-lytic NET)。
- AAV-induced NET形成はIgG ANCAと独立。
- SLE-induced NETは免疫複合体 (ICx) がFcγRシグナルを介して形成する。
- AAV-induced NET形成はROSとPADに依存し、シトルリン化ヒストンがenrichしている。
- SLE-induced NETはHMGB1と結合し、酸化ミトコンドリアDNAがenrichしておりICx形成に関与する。
- AAVとSLEのNETでは形態学的特徴, 動態, 惹起される過程, 形成機序がすべて異なる。

	AAV	SLE
形態	Lytic NET (suicidal)	Non-lytic NET (vital)
Kinetics	数時間	数分
Co-localization	MPO, CitH3	MPO, PR3, NE, HMGB-1, ICx, IgG・A・M, 酸化ミトコンドリアDNA
形成機序	IgG/ICx 非依存性, NADPH oxidase/PAD依存性	ICx/FcγR依存性, NADPH oxidase/PAD非依存性

[Kidney Int Rep. 2019;4:196-211.]

基礎 3. ANCAが血管炎をおこす機序

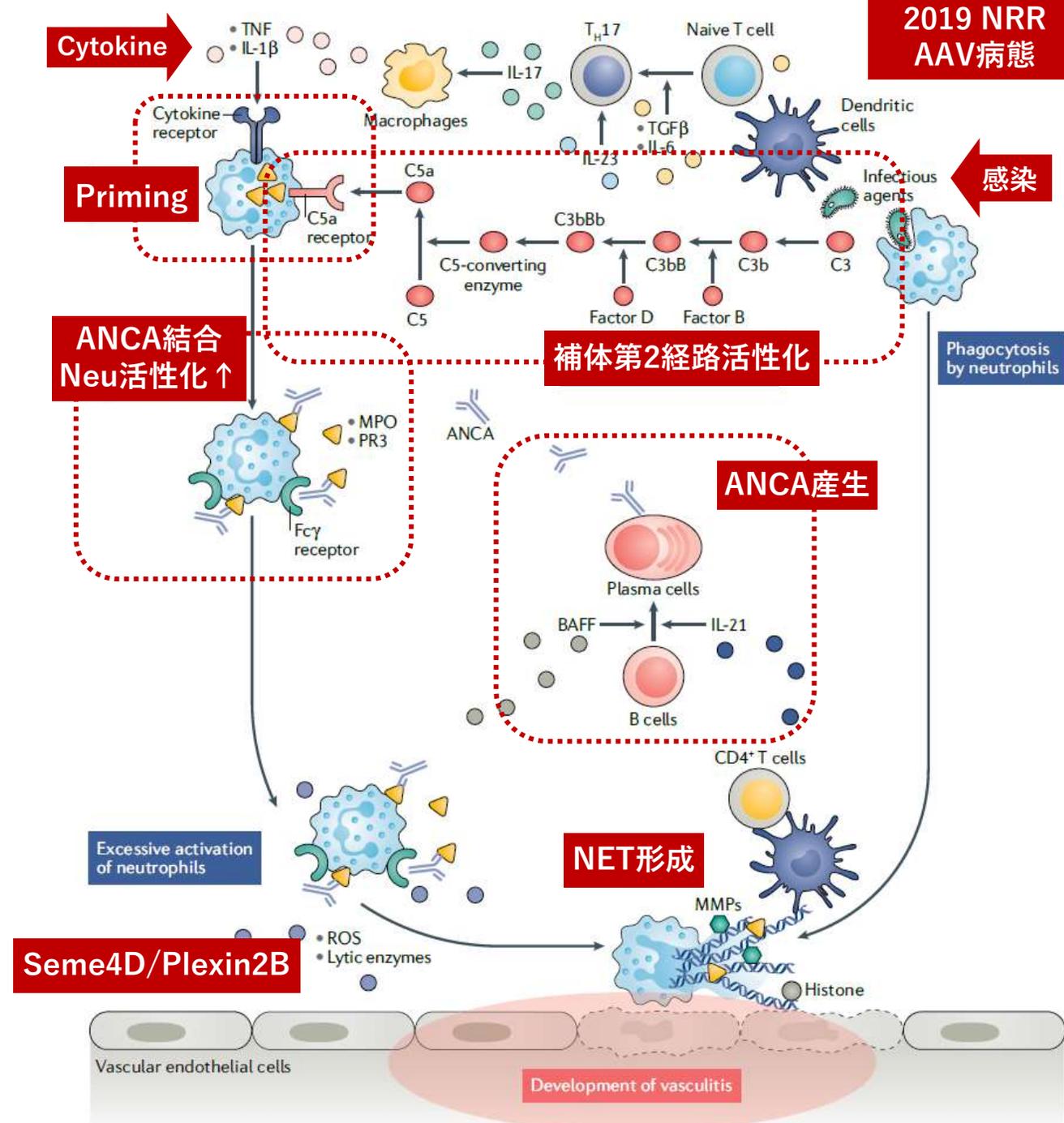
- ANCAの病態：1) Priming, 2) 補体第2経路, 3) Sema4Dと血管内皮：
2019 NRR, 2017 ARD, 2018 NRR

Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis

[Nat Rev Rheumatol. 2019;15(2):91-101.]

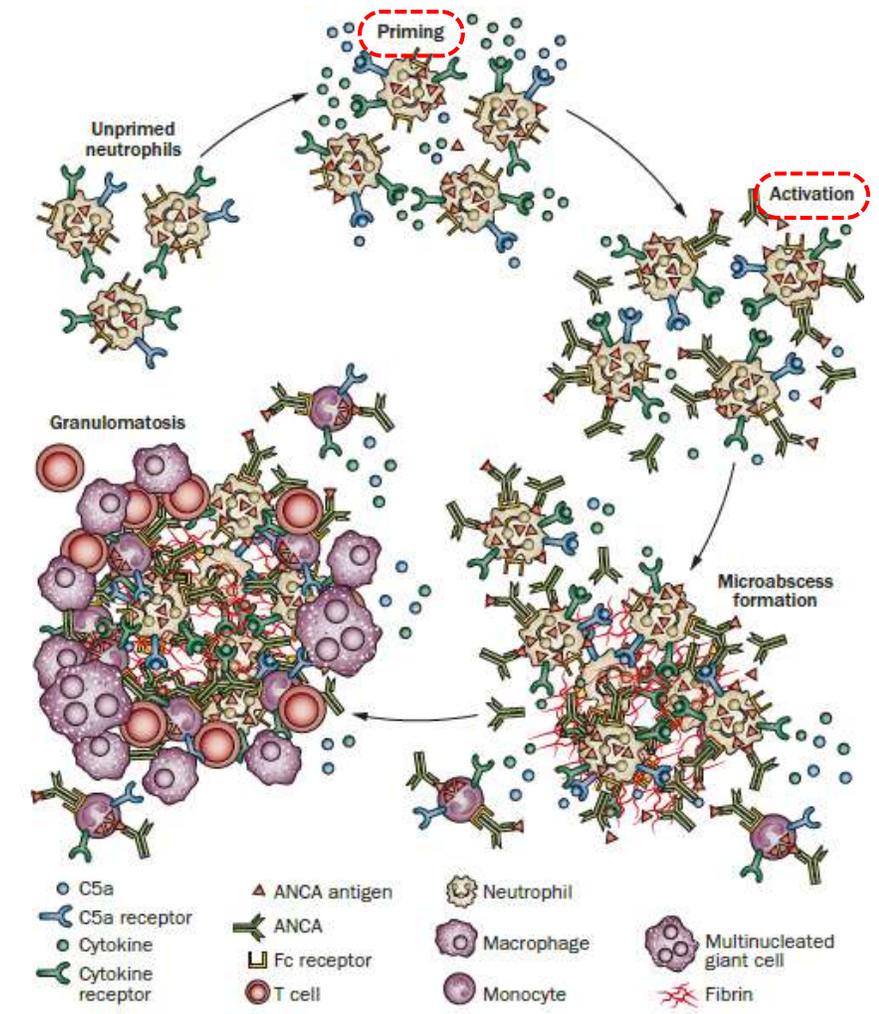
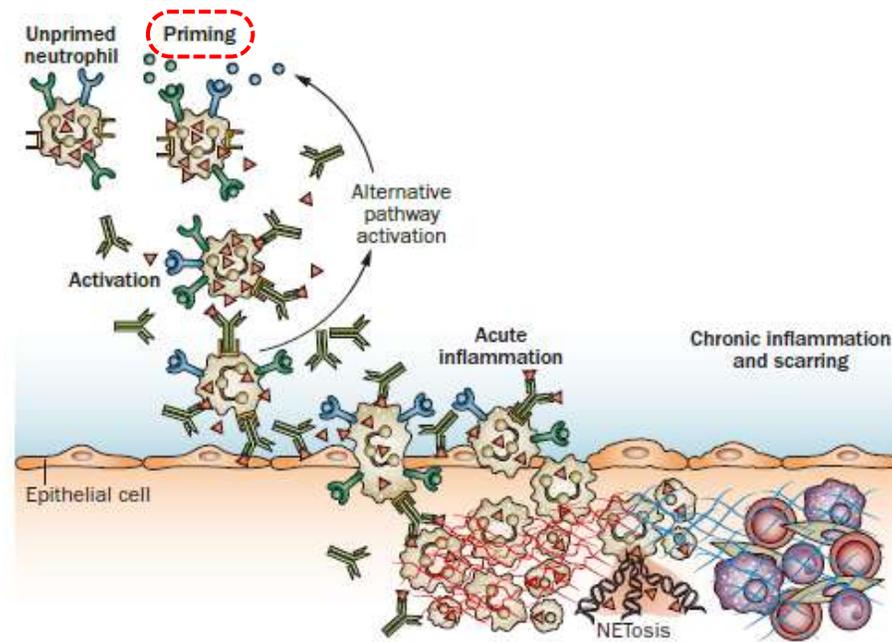
• ANCAによる好中球活性化がprimaryな病態だが, 複数の機序が関与する.

- 1) 感染等を契機にMΦがCytokine産生
- 2) 補体第2経路活性化
- 3) Priming (Cytokine, C5a等による)
→ ANCA対応抗原が細胞表面に出
- 4) ANCA結合によってNeu活性化
- 5) 血管内皮との相互抑制作用の破綻 (Sema4D/ADAM17/Plexin2B)
- 6) NET形成
- 7) Plasma cellがANCA産生



Priming

- 好中球が活性化し、ROS産生/脱顆粒する前に、機能亢進した準備状態になることをPrimingという。
- AAVでは、primingでANCAの対応抗原が(細胞内から)細胞上に表出されることで、ANCAが好中球と結合してFcγRを介した活性化(Activation)が達成される。
- Primingを誘発する物質
 1. 炎症性サイトカイン (TNF-α, IL-1β, IL-8)
 2. 補体 (C5aが最も重要)
 3. 細菌のLPS

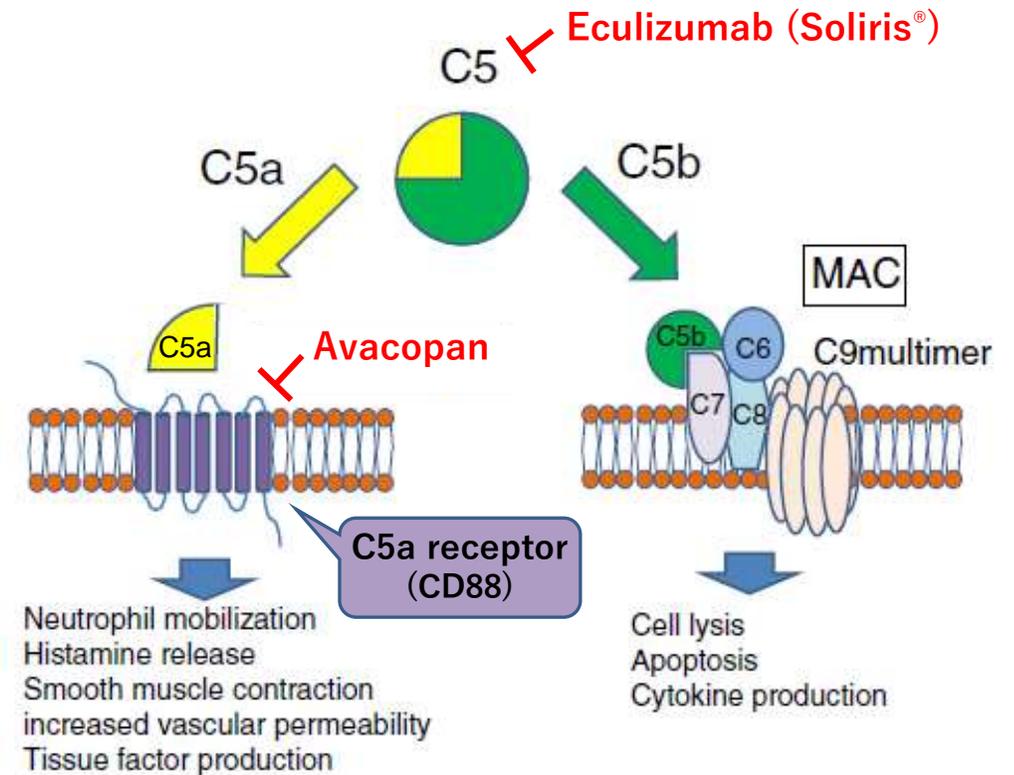
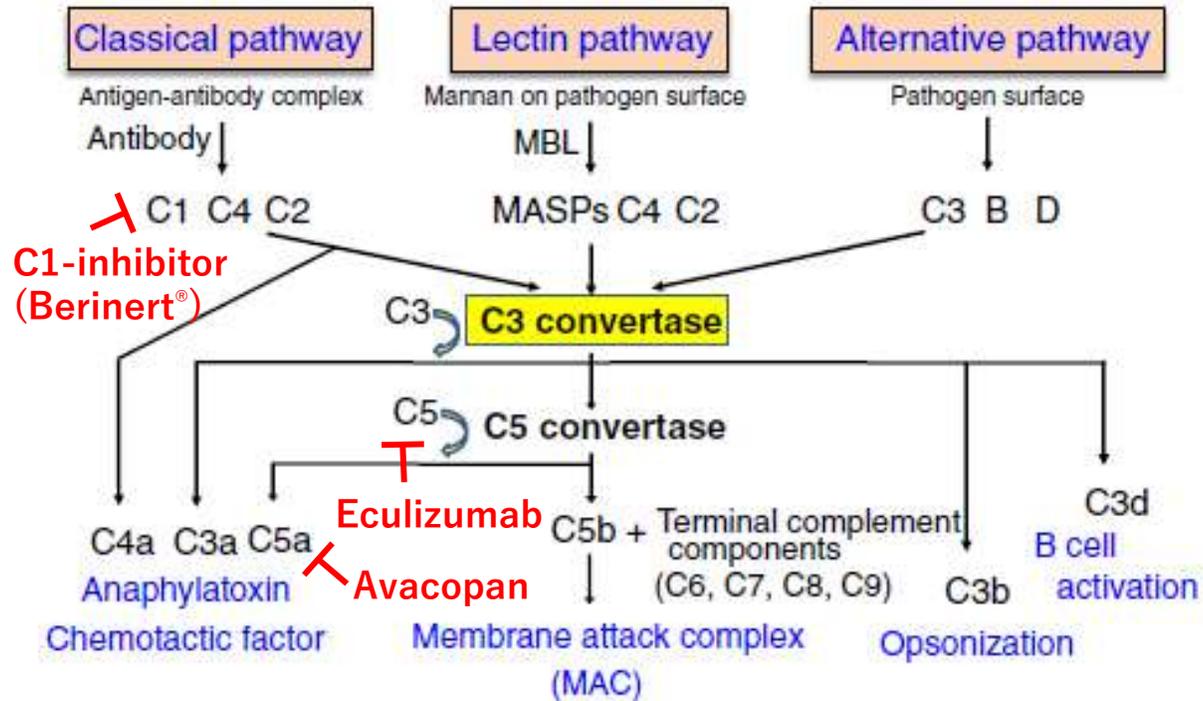


[Nat Rev Rheumatol. 2014;10(8):463-73.]

補体第2経路活性化

Complement-targeted therapy: development of C5- and C5a-targeted inhibition

[Inflamm Regen. 2016;36:11.]



- C5a receptorアンタゴニスト (Avacopan) : CCX168
- 抗C5 抗体 (Eculizumab [Soliris®]) : C5がC5a/C5bに分かれるのを阻害する (PNH, MG, NMOSD, atypical HUSに適応)
- C1 esterase inhibitor (Berinert®) : HANEで投与 (発作時C1-inhibitor著減, C4aC3aC5a増加)

MPO-ANCA AAVモデルマウス腎炎にAlternative pathwayが関与

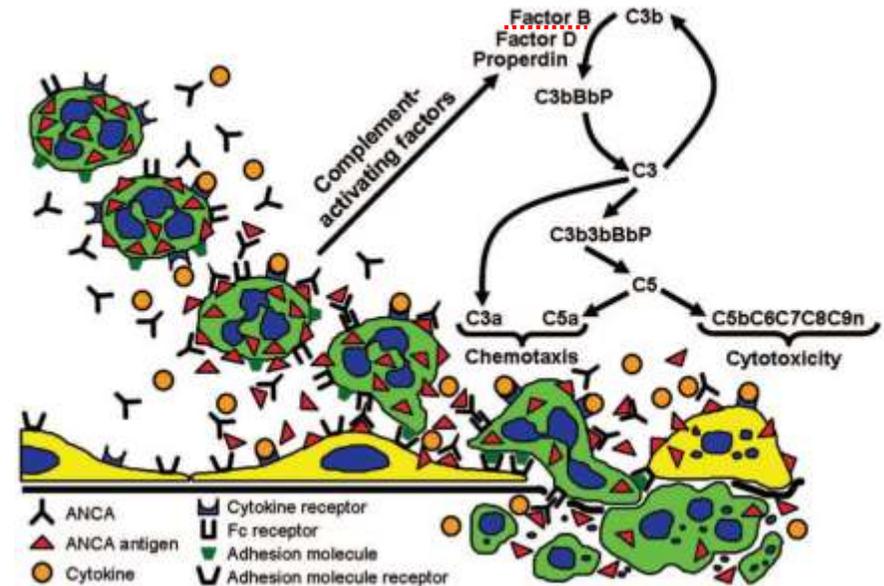
• 抗MPO-IgG抗体 (mouse MPOをMPO^{-/-}マウスに免疫し作成) 投与で壊死性半月体系球体腎炎を惹起するAAVモデルを用いて、補体の関与を検証した。

• C5^{-/-}マウスでは腎炎の発症が抑制された→ Common pathwayの関与が確認された。

• **Classical & Lectin pathway**に関する**C4**と、**Alternative pathway**に関する**Factor B**をKOして検証。→ **C4^{-/-}では腎炎抑制できず、fB^{-/-}で腎炎抑制された。**

• 本モデルのAAVでは、Classical & Lectin pathwayではなく、**Alternative pathwayの関与が示された。**

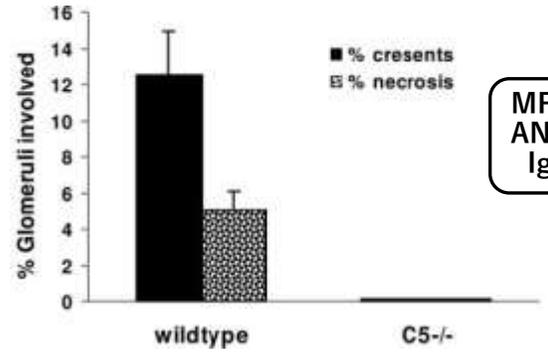
▶ 推測されるAAVの模式図。ANCAで活性化した好中球は、何らかの補体活性化因子を放出してalternative pathwayを活性化し、炎症増幅loopを形成して重篤な壊死性炎症性病変に至る。



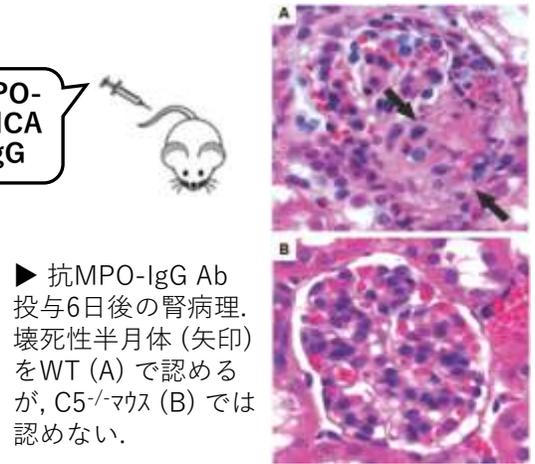
Alternative Complement Pathway in the Pathogenesis of Disease Mediated by Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies

Hong Xiao,* Adrian Schreiber,* Peter Heeringa,† Ronald J. Falk,* and J. Charles Jennette*

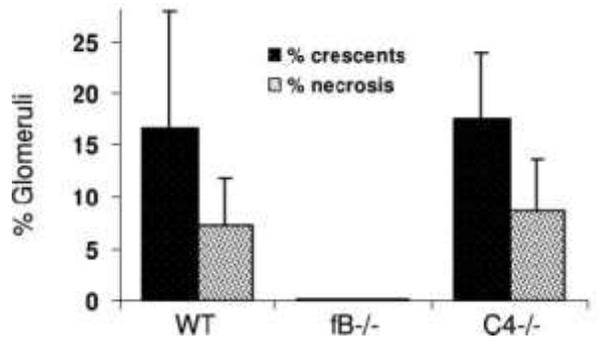
[Am J Pathol. 2007; 170: 52-64.]



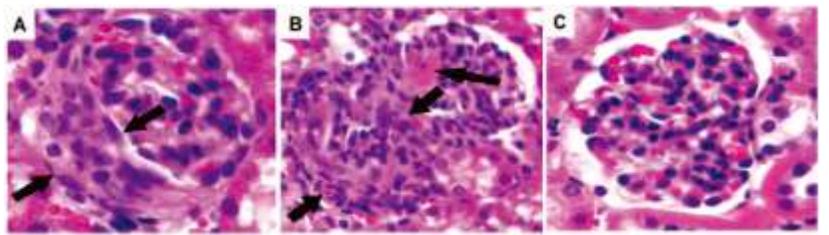
▲ C5^{-/-}マウス (n7) とWT (n8) に抗MPO-IgG Ab 投与6日後の壊死性半月体系球体腎炎解析。C5欠損で腎炎発症が完全に抑制された。



▶ 抗MPO-IgG Ab 投与6日後の腎病理。壊死性半月体 (矢印) をWT (A) で認めるが、C5^{-/-}マウス (B) では認めない。



◀ 抗MPO-IgG Ab 投与のAAVモデルで、C4 KOマウス (C4^{-/-}) ではWTと同様に壊死性半月体系球体腎炎が誘導されるが、Factor B KOマウス (fB^{-/-}) では腎炎発症が完全に抑制された。WT (n8), fB^{-/-} (n8), C4^{-/-} (n4),

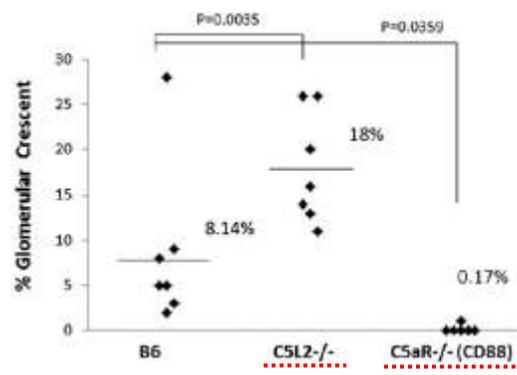


◀ 壊死性半月体 (矢印) をWT (A), C4 KOマウス (B) で認めるが、Factor B KOマウス (C) では認めない。

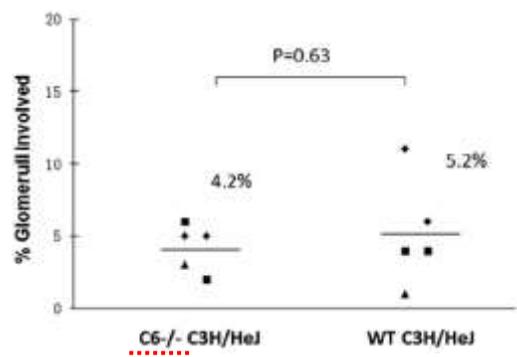
C5a Receptor (CD88) Blockade Protects against MPO-ANCA GN

[J Am Soc Nephrol. 2014;25:225–31.]

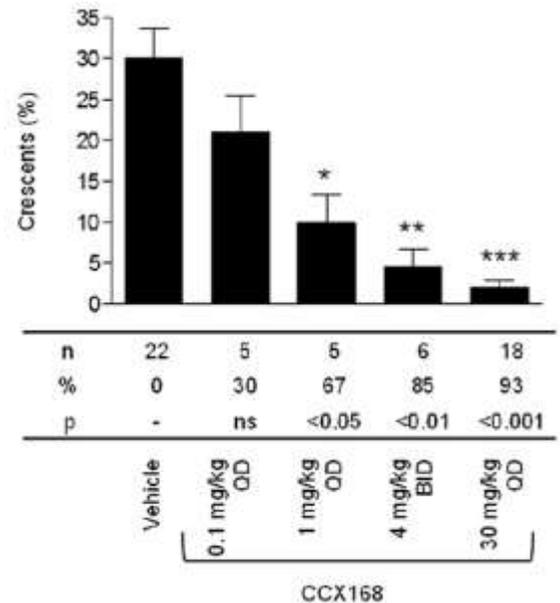
- C5aR (CD88) KOマウスはMPO-ANCA腎炎抵抗性
- C5aR antagonist CCX168はMPO-ANCA腎炎改善



◀ 抗MPO-IgG Ab 投与6日後の壊死性半月体系球体腎炎の解析。
C5aR (CD88)^{-/-}では、腎炎がみられなくなる、C5L2^{-/-}では、WT (B6)と比べて腎炎は増悪する。



◀ 抗MPO-IgG Ab 投与6日後の壊死性半月体系球体腎炎の解析。
WT (C3H/HeJ)と比べて、C6^{-/-}とC6 KOしても腎炎の程度に差はみられない。

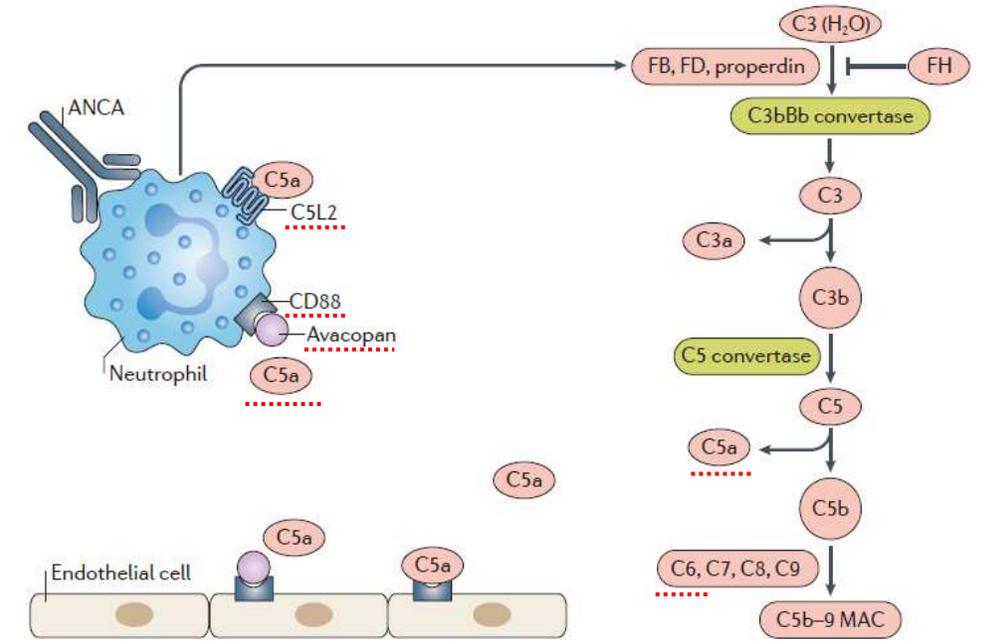


▲ human C5aR knock-inマウスに抗MPO-IgG Abを投与し壊死性半月体系球体腎炎を誘導し、C5aR antagonist (CCX168)を経口投与すると、用量依存性に腎炎が改善する。

- マウスAAVにおいて、CD88 (活性化C5aレプター) KOは腎炎誘導抵抗性で、C5L2 (抗炎症性C5aレプター) KOは腎炎が増悪するため、C5aRがcriticalと考えられる。
- C6 KOは腎炎に影響はなく、C5b-9 MACの過程は不要。
- C5aR antagonist (CCX168)は腎炎を用量依存性に改善させる。

A CLEAR argument for targeting complement in ANCA vasculitis

Ralph Kettritz [Nat Rev Nephrol. 2017;13:448-50.]

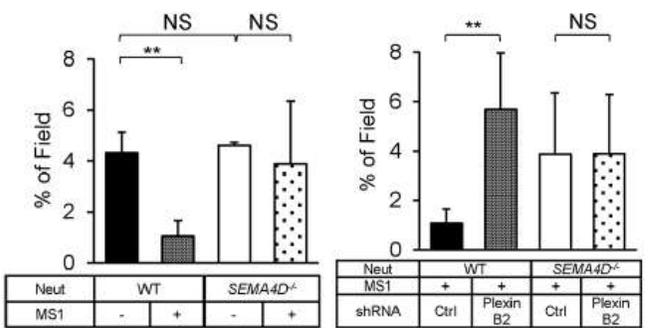
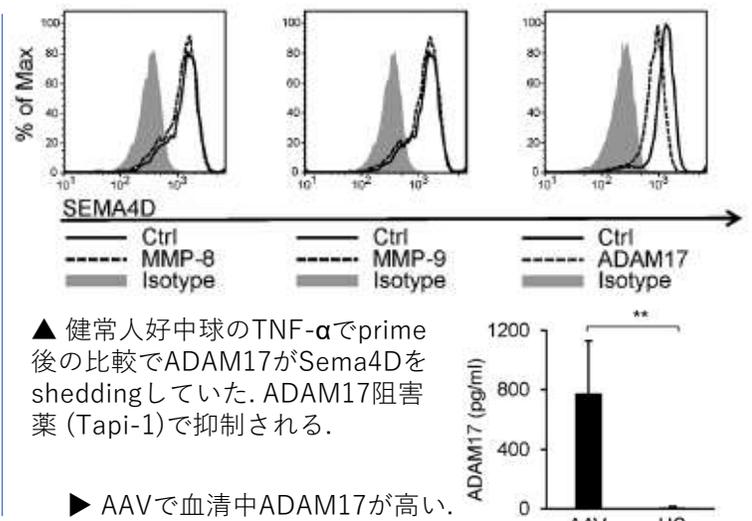
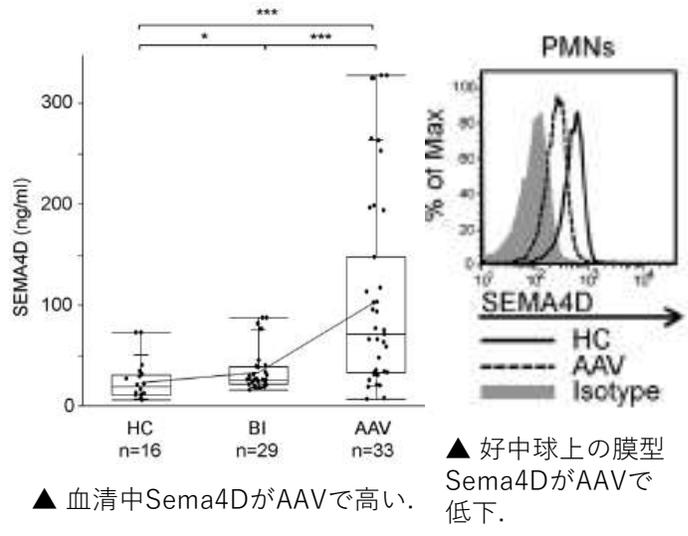


- ANCAで刺激された好中球は、ProperdinなどC3bBbへの変換を促す因子を産生する。抑制性Factor H (FH)の減少も関連する。
- C5aが産生されると、CD88 (活性化C5aレプター), C5L2 (抗炎症性C5aレプター)に結合する。C5aは好中球をprimingする強力な因子で、好中球活性化のloopを形成する。
- CCX168 (avacopan)はCD88を阻害する。

血管内皮との相互抑制作用 (Sema4D/ ADAM17/ Plexin2B)

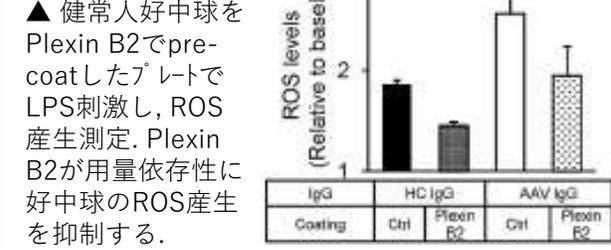
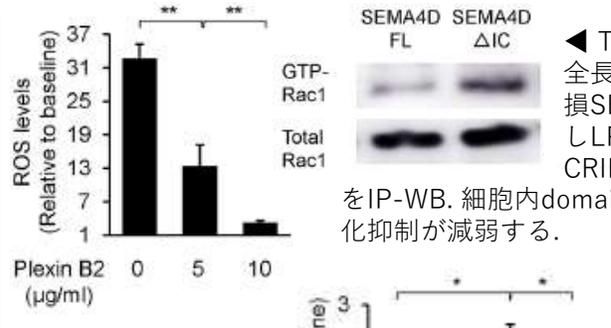
Semaphorin 4D inhibits neutrophil activation and is involved in the pathogenesis of neutrophil-mediated autoimmune vasculitis [Ann Rheum Dis. 2017;76(8):1440-48.]

- 好中球に **Sema4D** (通常は膜型)が発現. 血管内皮側の **Plexin B2** がレセプター
- AAVで好中球上Sema4Dが**ADAM17(TACE)**で分解され血清Sema4D ↑ (AAV活動性と相関), 膜型Sema4D ↓.
- 可溶性Sema4Dは血管内皮細胞に向炎症作用があると既報あったがSEMA4D^{-/-}マウスはin vivo血管炎モデルが悪化した (予想と逆).
- SEMA4D^{-/-}好中球はNETosisが亢進している
- 膜型Sema4Dは血管内皮Plexin B2と結合し Sema4D細胞内domainがNET形成/ROS産生を抑制し好中球の暴走を抑制することが分かった.**
- AAVではADAM17が高く膜型Sema4Dが減少し, ANCA-induced 好中球活性化(Oxidative burstとNETs)のブレーキが破綻している.
- Sema4D切断抑制/ADAM17制御が治療標的候補.



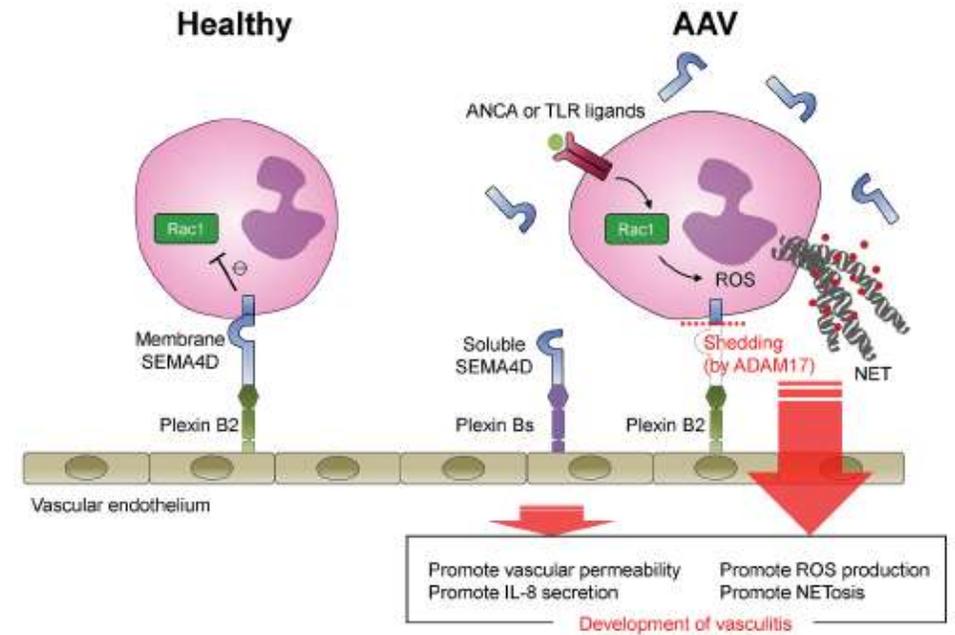
▲ マウス好中球を血管内皮細胞 (MS1 cell)と共培養しLPS刺激4h後NET形成比較. MS1と共培養でみられるNETs抑制がSEMA4D^{-/-}マウス好中球では認めない.

▲ 左の系のMS1 cellのPlexin B2をshRNAで発現抑制するとWTマウス好中球のNET産生抑制は解除される. SEMA4D^{-/-}マウス好中球は影響を受けない.



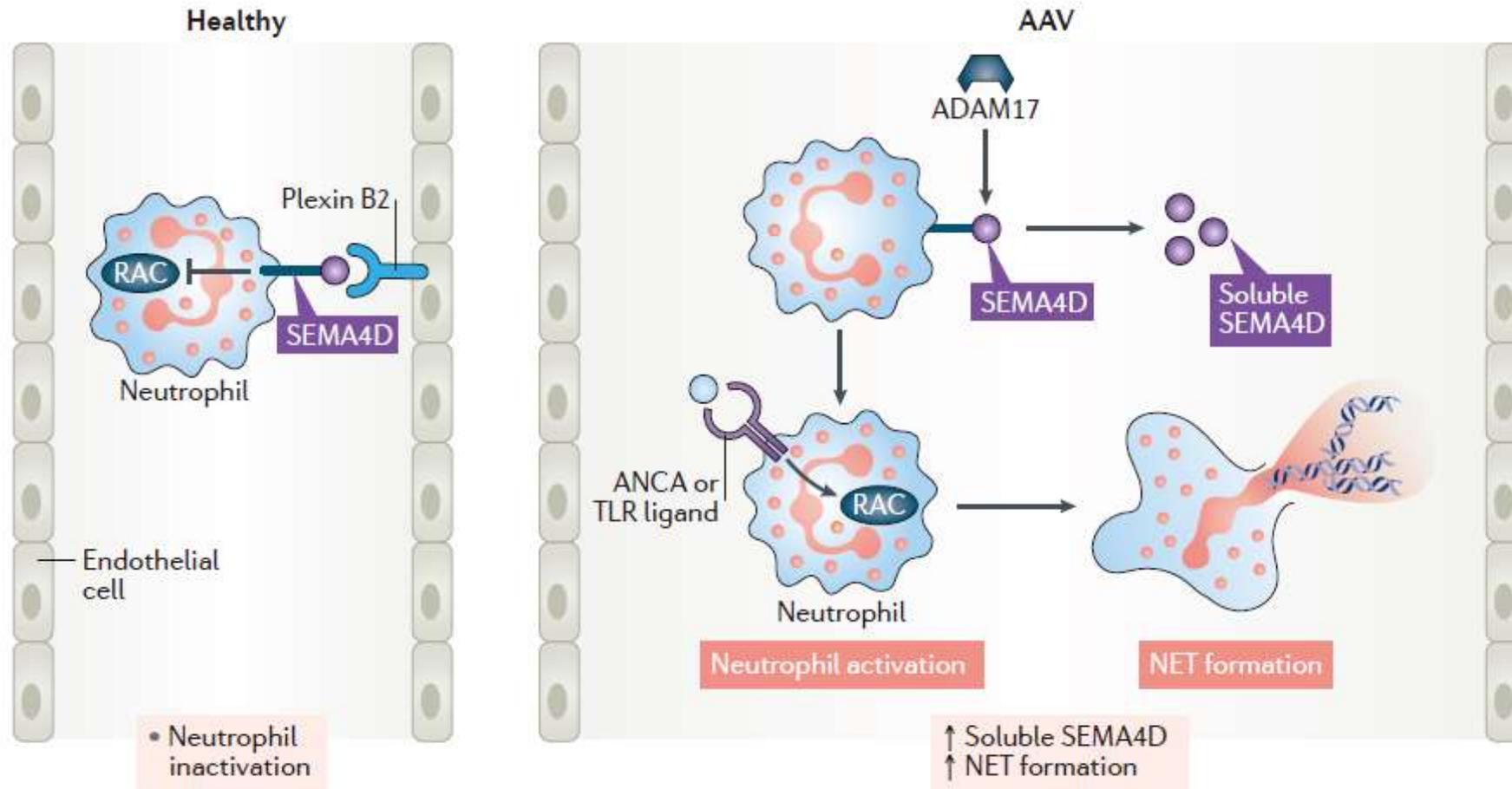
▲ TNF-αでprimingした好中球をPlexin B2 precoatしたプレートに播種し健康人とAAV患者血清IgGを添加して比較. AAV患者血清はROS産生誘導するがPlexin B2が抑制する (NETsも抑制)

◀ TLR4発現293 cellに全長か細胞内domain欠損SEMA4DをtransfectしLPS刺激後GST-PAK-CRIBで免洗しGTP-Rac1をIP-WB. 細胞内domainがないとRac1活性化抑制が減弱する.



The role of semaphorins in immune responses and autoimmune rheumatic diseases

[Nat Rev Rheumatol. 2018;14(1):19-31.]



- 健常人では、血管内皮細胞上のPlexin B2と好中球上のSEMA4DがRAC1の活性化を抑制している。
- AAV患者では、好中球上のSEMA4DがADAM17によって分解され、SEMA4DとPlexin B2の相互作用が低下し好中球が異常に活性化し、TLR ligandやANCAに誘発されてNETs形成に至る。