

氏名	たしろ まなぶ 田代 学		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1649 号		
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	IL-1 β promotes tubulointerstitial injury in MPO-ANCA-associated glomerulonephritis (MPO-ANCA 関連腎炎において IL-1 β が尿細管間質障害に関与する)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	中島 衡
	(副査) 福岡大学	教授	田中 正利
	福岡大学	教授	坂田 則行
	福岡大学	教授	兼岡 秀俊

内 容 の 要 旨

【背景】

腎障害全般において糸球体障害のみならず尿細管間質障害が腎予後に影響を及ぼすことは知られている。そのために、腎生検にて糸球体障害と尿細管間質障害における病態を把握することが重要である。

ANCA 関連血管炎における腎組織では糸球体に半月体を形成することが特徴的であり、血管炎の活動性が高い症例において小血管もしくは糸球体にフィブリノイド壊死像がみられる。尿細管間質障害においては糸球体障害からの炎症の波及が大部分であると考えられており欧州血管炎研究グループにおいては糸球体病変のみでの組織分類と腎予後を提唱している。しかしながら、尿細管間質病変の評価も必要であると考えられており ANCA 関連血管炎における腎病理組織分類の国際基準がないのが現状である。治療のアルゴリズムについても臨床重症度(血清 Cr、CRP、年齢、肺病変の有無)に基づいて治療するのがスタンダードとなっている。そのために、尿細管間質障害の評価については糸球体障害に準ずるという考え方が一般的となっているのが現状である。概ね大部分の症例においては糸球体障害と尿細管間質障害は同程度である場合が多いため問題ないが、一部の症例において尿細管間質障害がメインの病態となっている。そのために、尿細管間質障害の評価を治療に結びつけることが重要であると思われる。また、近年 MPO-ANCA 関連血管炎の保険適応にリツキシマブが承認され生物学的製剤による治療も取り入れられている。MPO-ANCA 陽性化の機序を含めて ANCA 関連血管炎においてはまだまだ不明な点が多い。そのため、ステロイド投与のみでは疾患活動性のコントロールが困難な症例も多く予後の悪い疾患である。そのために ANCA 関連血管炎における腎障害の機序を解明するこ

とが新たな治療、予後改善に繋がると考えられている。

【目的】

MPO-ANCA 関連腎炎において糸球体障害に関与しない尿細管間質障害をもたらす独自の機序について追及した。

【対象と方法】

2002年～2016年において当科にて腎生検施行した MPO-ANCA 陽性患者 44 症例の中で腎生検時にステロイド、免疫抑制剤投与していない 28 症例を対象にした。28 症例における腎生検組織における real-time PCR (TLR2, 3, 4, 6, 7, 9, IL-1 β , 4, 5, 6, 10, 12, 17, IFN- γ , IFN- α , TNF- α)、臨床データ (WBC, RBC, Hb, Ht, TP, Alb, UA, BUN, Cr, eGFR, CRP, LDH, T-Cho, TG, HDL-C, LDL-C, Fe, UIBC, ferritin, MPO-ANCA 値, C3, C4, CH50, IgA, IgG, IgM, IgE, 尿蛋白, 尿沈渣, 尿中 β 2MG, 尿中 NAG)、腎組織所見 (糸球体の半月体形成率、細胞性半月体率、線維細胞性半月体率、線維性半月体率、尿細管間質の細胞浸潤範囲、線維化範囲、フィブリノイド壊死の有無)、予後 (腎予後、生命予後) を後ろ向きに比較検討した。

【結果】

まずは、糸球体障害と尿細管間質障害においてスコア分けした。

尿細管間質障害スコアは障害範囲面積にて 4 群に分けた (0:線維化なし、1+:0-25%、2+:25-50%、3+:50%以上)。尿細管間質障害の細胞浸潤と線維化において各々評価した。また、糸球体障害においては糸球体を正常糸球体、メサンギウム増加、細胞性半月体、線維細胞性半月、線維性半月体、全硬化糸球体に分けて評価した。ANCA 関連血管炎は急性期の病態であり病勢を反映しているのは細胞性半月率と尿細管間質障害の細胞浸潤であるために、糸球体障害の評価としては細胞性半月体形成率を尿細管間質障害の評価としては細胞浸潤面積スコアに重点を置いて評価した。

Real-time PCR にて糸球体障害と関連する TLR やサイトカインはみられなかった。しかし、尿細管間質障害においては IL-1 β 、TLR4 において正の相関がみられた。TLR4 と IL-1 β が関与する機序としてインフラマソーム経路を介した機序の関与を推測した。そのために、追加実験としてインフラマソームの key となる NLRP3、Caspase1 に加えて TLR4 を組織染色した。染色の結果、尿細管間質障害の進行した症例において間質の炎症細胞に NLRP3、Caspase1、TLR4 が染まっている細胞が多かった。次に染まっている細胞を CD68 陽性細胞と比較したところ、CD68 陽性細胞の一部が染まっていた。

【考察】

腎組織の real-time PCR の結果より MPO-ANCA 関連腎炎における尿細管間質障害の機序にインフラマソームを介した経路の関与が考慮された。インフラマソーム経路としては① TLR4 を介した IL-1 β の前駆体である Pro-IL1 β を誘導する経路と②インフラマソーム複

合体 (NLRP3, Caspase1, Asc) が Caspase1 を活性化する経路がある。この 2 つの経路が活性化することにより活性型 Caspase1 が Pro-IL β \rightarrow IL-1 β に変換して炎症をもたらす。①の経路においては TLR-4 が刺激を受けてその下流にある NF- κ B を活性化することで TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインを放出するとともに Pro-IL1 β を誘導していると考えられている。

②の経路においては細胞内に別々に存在する NLRP3、Asc、Caspase1 が刺激を受けることでインフラマソーム複合体を形成し、Caspase1 を活性型に変換する。

これらのインフラマソームが関与する細胞としてはマクロファージや樹状細胞の由来であると報告されており我々の実験においても一部の CD68 陽性細胞に一致して NLRP3、Caspase1 が染まっており矛盾しない結果となった。

TLR4 のリガンドとしては LPS が代表的であり NLRP3 のリガンドとして尿酸結晶、脂肪細胞、アスベスト、シリカ、インフルエンザウイルス、アミロイド蛋白、黄色ブドウ球菌など多岐にわたって報告されている。尿細管結紮モデルマウスにて尿細管間質障害と TLR4、IL-1 β 発現が多数報告されており感染性物質ではなく虚血由来の尿細管間質障害も考慮される。また、環境汚染物質などの劣悪な環境下では ANCA 関連血管炎患者が増加している報告もある。これらを考慮すると外因性因子の PAMPs (病原体関連分子パターン) と内因性因子の DAMPs (障害関連分子パターン) を中心とした因子の関与が考察される。しかし、ANCA 関連血管炎において感染物質が直接的に関与してはいないと考えられている。そのため我々は特に DAMPs との関連性について注目した。死細胞より放出された DAMPs 由来の NETs 抗体や Histones などの物質が ANCA 患者の疾患活動性に影響を及ぼしていると思われる。それと同時に DAMPs が TLR、NLRP3 の活性化にも影響を及ぼしインフラマソーム経路を活性化されていると思われる。近年、細胞死において①パイロトーシス②ネクロプトトーシス③パータナトス④フェロトーシス⑤オートトーシスの機構が報告されている。インフラマソームに関与するパイロトーシスに加えて、DAMPs 放出に関わるネクロプトトーシス、ミトコンドリアのアポトーシス誘導因子に関わるパータナトス、酸化ストレスに関与するフェロトーシス、細胞内ストレスと関与するオートファジーの機序がある。ミトコンドリア異常、酸化ストレスによる刺激がインフラマソーム複合体形成に関与している報告もあり、DAMPs を含めて様々な細胞死による関与が考えられた。

また、今回我々の実験で腎組織の特に尿細管間質障害との関与がみられていた。

マクロファージや樹状細胞が豊富に存在しておりそれらの細胞由来であるインフラマソームが活性化して尿細管間質に有意な障害をもたらしたと考えた。

また、腎組織において尿細管間質が大部分を占めており死細胞が豊富にあることも原因の一つでと思われる。

急性腎不全時にも細胞死の関与が強く関わっており、マクロファージ由来である

AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) が近位尿細管に付着して腎機能改善をもたらす報告もある。

また、急性尿細管壊死においても細胞死を介した機序が働き尿細管間質障害をもたらす

と報告がある。

このように死細胞と尿細管間質障害との関連性は密接にあると思われる。

ANCA 関連血管炎においては血管炎、糸球体障害からの炎症の波及にて炎症性サイトカインの影響を受けて尿細管間質障害をもたらす。それと同時に虚血などの要因にて急性尿細管壊死や急性腎不全の時にみられるのと同様な機序にて死細胞を介した尿細管間質障害の影響もみられると思われた。

今回、自然免疫を介した腎障害のメカニズムについて追及した。

審査の結果の要旨

本論文は、ANCA 関連腎炎患者の腎予後に大きく関与する尿細管間質障害の機序を明らかにした論文である。好中球細胞質抗原である Myeloperoxidase (MPO) に対する自己抗体は、好中球に作用することで好中球を活性化して、毛細血管内皮障害を惹起し、全身性の血管炎を発症させる。腎臓には半月体形成性糸球体腎炎を呈し、それに伴う尿細管間質障害は、半月体形成からの炎症の波及と捉えられている。筆者は尿細管間質障害におけるインフラマソームの関与を明らかにし、この機序を標的とする治療戦略を提案している。

1. 斬新さ

我々の診療科で経験した 44 症例の中に、糸球体障害の波及による尿細管間質障害とは考えにくい症例が存在するところに着目し、糸球体障害の重症度ではなく、尿細管間質障害の重症度と相関する炎症性サイトカインを選別した。その結果、活性化されたインフラマソームにより産生される IL-1 \cdot が大きく関与することが明らかになった。ANCA 関連腎炎病態でのインフラマソームの関与をヒト腎生検組織において明らかにした点は、非常に斬新な点である。

2. 重要性

同じ ANCA 関連腎炎でありながら、糸球体障害と尿細管間質障害の発症機序が異なることが明らかとなった。これまでのステロイドによる抗炎症治療に加えて、尿細管間質障害に対して、インフラマソームを標的とした治療を行うことで、腎予後の改善が期待できることを示したことは非常に重要な点である。

3. 実験方法の正確性

ANCA 関連腎炎症例の腎臓の生検組織を糸球体病変の尿細管間質病変とで、それぞれスコア化することで、組織像を評価した。一方、腎組織から抽出された mRNA を用いて、サイトカイン発現量を評価した。加えて対象蛋白である TLR4、NLRP3 などの免疫染色を行い、蛋白レベルでの発現も検討した。いずれも合致する結果であり、正確な研究方法により導き出された実験結果であると判断した。

4. 表現の明瞭性

目的、方法、結果に関しては明確かつ詳細に表現されている。論理構成には破綻はなく、結果に基づいた考察については、過去の論文を十分に検討し、本研究で示されたインフラマソームの意義を明確に示す内容である。

5. 主な質疑応答

Q1: 糸球体障害と間質障害とは、同一疾患でも機序が異なるという理解でよいのか？

A1: ANCA 関連腎炎の間質障害は、一般の糸球体疾患で認められるような糸球体の半月体形成から波及してくる間質障害の病態の他に、間質に特異的なインフラマソームによる障害の病態も加わっているという理解をしています。

Q2: 他の腎疾患、例えばサルコイドーシスやシェーグレン症候群、IgG4 関連腎臓病などの疾患における尿細管間質障害でも、やはりインフラマソームによる間質障害が起こっているのか？やはり disease control を設けるべきではなかったのか？

A2: アルツハイマー病や糖尿病などの他疾患でも同様にインフラマソームが関与していると報告があります。他の間質性腎炎でも同様の機序が働いているかどうかの検討は、非常に興味をもたれるところではありますが、現時点では検討していません。ANCA による好中球の活性化という自己免疫機序が、インフラマソームを活性化しやすい環境を作り出すのではないかと考えていますので、好中球があまり働いていないシェーグレン症候群や IgG4 関連腎臓病では、インフラマソームの関与は少ないのではないかと考えています。

Q3: 解析に用いた統計学的方法が、Pearson's rank correlation coefficient であるが、対象とした間質障害が連続変数では表されていないので、別の検定を行うべきだったのではないか

A3: ご指摘の点は、気付いていませんでした。今後の研究をする上での注意点とさせていただきます。ありがとうございます。

Q4: 筆者は、間質障害への IL-1 \cdot の関与を明らかにしたわけなので、その特異的な阻害剤である生物学的製剤アナキンラを臨床の場へ持ち込む姿勢を表現して欲しかった。実際の臨床現場での生物学的製剤は予後の改善に繋がっているのですか？

A4: 現在の保険医療では、生物学的製剤リツキシマブを用いることが可能であり、効果も確認されておりますが、具体的な生命予後、腎予後に関する報告は未だ出ていないと思われます。

Q5: ANCA 関連腎炎は、腎移植の対象となっているのでしょうか？

A5: この疾患は高齢発症疾患であり、腎機能の不可逆的な悪化症例は、血液透析導入となります。当科の症例でも移植例はありません。

以上、本論文は、尿細管間質障害におけるインフラマソームの関与を実際の ANCA 関連腎炎症例の生検組織を用いて明らかにした内容であり、斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭性および質疑応答の結果を踏まえ、学位論文に値すると評価された。