
ANCA関連腎炎の臨床病理学的重症度と 好中球細胞外トラップ

齋藤雅也、齋藤綾乃、阿部史人、今泉ちひろ、加賀 一、奈良瑞穂、高橋直人
秋田大学医学部附属病院 血液・腎臓・膠原病内科

Associations between clinicopathological severity and neutrophil extracellular traps in patients with ANCA-associated nephritis.

Masaya Saito, Ayano Saito, Fumito Abe, Chihiro Imaizumi, Hajime Kaga,
Mizuho Nara, Naoto Takahashi
Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology,
Akita University Graduate School of Medicine.

<緒言>

抗好中球細胞質抗体 (anti neutrophil cytoplasmic antibody : ANCA) 関連腎炎とは、ANCA 関連血管炎にみられる腎炎のことである。ANCAの代表的対応抗原としてmyeloperoxidase (MPO) とproteinase-3が知られているが、我が国ではMPO-ANCA陽性が90%以上を占める¹⁾。ANCA関連腎炎の典型的な病理所見はpauci-immune型の壊死性半月体形成性糸球体腎炎であり、尿細管間質では多彩な炎症細胞浸潤を伴う²⁾。臨床経過は、数週から数か月の単位で腎機能が増悪する急速進行性糸球体腎炎症候群としての経過を辿り、5年以内に約20%が末期腎不全に至り腎予後は不良である³⁾。

好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs) は2004年にBrinkmannらによって報告された好中球の新たな細胞死形態であり、能動的に自らのDNAや細胞内抗菌蛋白を細胞外へ網目状に放出し、物理的に病原体をトラップし殺菌する防御機構である⁴⁾。Necrosisやapoptosisとは本質的に異なるこの能動的細胞死は、第3の細胞死として「NETosis」と命名された⁵⁾。NETs形成の過程では、好中球核内におけるクロマチンの脱凝集が生じるが、その際peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) によるヒストンH3のシトルリン化が必須であることが知られており⁶⁾、血清中のシトルリン化ヒストンH3 (citrullinated histone H3 : Cit-H3) 濃度や組織でのCit-H3免疫染色は、様々な研究でNETs定量マーカーとして用いられている⁷⁻⁹⁾。

NETsは生体防御において重要な免疫システムであるが、一方で細胞外に放出された殺菌酵素は自身を傷害する恐れがあるため、生体内では厳密に制御されている。MPO-ANCA関連血管炎患者では、NETs分解因子であるDNase I 活性が低下しており、過剰なNETsによる組織傷害が病態に大きく関与していることが示唆されている¹⁰⁾。ANCA関連血管炎の腎組織にNETsが存在すること

は、2009年にKessenbrockらによって初めて証明されたが¹¹⁾、ANCA関連腎炎患者の腎組織におけるNETs発現と臨床病理学的重症度の関連については未だ検討されていない。今回、我々はNETs発現を腎組織Cit-H3免疫染色で半定量化し、臨床病理学的パラメータとの関連について検討した。

<対象と方法>

2016年8月から2018年12月までに当院及び関連施設において腎生検で診断したMPO-ANCA関連腎炎33例を対象とした。MPO-ANCA関連腎炎は、①血清学的にMPO-ANCA陽性、かつ腎組織所見としてpauci-immune型で1つ以上の半月体系球体を含むものと定義¹²⁾した。光学顕微鏡で観察可能な糸球体数7個未満の2例は組織検体量不十分として除外¹³⁾、MPO-ANCA関連腎炎31例で検討を行った。

腎病理診断として腎間質線維化、尿細管萎縮及び間質細胞浸潤の程度はmild(<25%)、moderate to severe (≥25%)で半定量化、半月体系球体は3層以上の管外細胞増殖でBowman嚢25%以上を覆うものと定義した。腎組織免疫染色は市販の抗Cit-H3抗体(abcam, Cambridge, UK)を使用し、光学顕微鏡でのランダムな400倍10視野で腎間質の陽性細胞浸潤を0(none)、1(weak)、2(moderate)、3(strong)で半定量化、10視野の平均値をNETs-scoreとした。NETs-scoreの中央値をカットオフとして、NETs-score高値群と低値群の2群に分類し臨床・病理データについて統計学的検討を行った。さらに、NETs-scoreと臨床病理学的パラメータとの相関係数を、Pearson積率相関係数を用いて検討した。

本研究は入院時の包括同意により患者同意を得て行っており、秋田大学倫理委員会で審査・承認を得ている(No.1830)。

<結果>

表1に示す如く、MPO-ANCA関連腎炎31例の平均年齢は71±11歳、男女比は1:2.1であった。尿蛋白定量の中央値は1.7g/day or g/gCr(interquartile range: IQR 0.6-1.0)、尿潜血は29例(93.5%)で陽性、沈査赤血球数でスコア化するUrinary RBC score¹⁴⁾の中央値は4(IQR 3-4)であった。平均血清アルブミン値は2.7±0.7g/dl、eGFRの中央値は25.2ml/min/1.73m²(IQR 13.4-44.9)で、腎生検時eGFR≤15ml/min/1.73m²の症例は11例(35.5%)であった。CRPの中央値は6.1(IQR 0.5-10.2)、全例でMPO-ANCAが陽性であった。31例の血管炎臨床分類では、顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis: MPA)が17例(54.8%)、多発血管炎性肉芽腫症(granulomatosis with polyangiitis: GPA)が3例(9.7%)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: EGPA)が2例(6.5%)、腎限局型血管炎(renal limited vasculitis: RLV)が9例(29.0%)であった。全身症状を含めた9つの臓器特異性に基づく56症状を点数化する、血管炎活動性の指標であるBirmingham vasculitis activity score (BVAS)¹⁵⁾の平均スコアは16±5であった。

表 1 MPO-ANCA関連腎炎31例の臨床データ

	Total (n = 31)
Age	71 ± 11
Sex (M/F)	10/21
Proteinuria (g/day or g/gCr)	1.7 (0.6-1.0)
Urinary RBC ≥5 cells/HPF n, (%)	29 (93.5)
Urinary RBC score	4 (3-4)
Serum Albumin (g/dL)	2.7 ± 0.7
eGFR (mL/min/1.73m ²)	25.2 (13.4-44.9)
>15mL/min/1.73m ² n, (%)	20 (64.5)
≤15mL/min/1.73m ² n, (%)	11 (35.5)
CRP (mg/dL)	6.1 (0.5-10.2)
MPO-ANCA positive n, (%)	31 (100)
Disease category n, (%)	
MPA	17 (54.8)
GPA	3 (9.7)
EGPA	2 (6.5)
RLV	9 (29.0)
BVAS at renal biopsy	16 ± 5

BVAS birmingham vasculitis activity score, *CRP* C-reactive protein, *eGFR* estimated glomerular filtration, *EGPA* eosinophilic granulomatosis with polyangitis, *GPA* granulomatosis with polyangitis, *HPF* high power field, *MPA* microscopic polyangitis, *RBC* red blood cell, *RLV* renal-limited vasculitis

表 2 MPO-ANCA関連腎炎31例の腎組織所見

	Total (n = 31)
Total no. of glomeruli	23 ± 11
Percentage of normal glomeruli (%)	33.7 ± 23.2
≥10% n, (%)	24 (77.5)
<10% n, (%)	7 (22.5)
Sclerotic glomeruli (%)	28.1 ± 17.8
Crescent (%)	32.2 ± 18.3
Tubular atrophy + interstitial fibrosis (%)	
<25%	14 (45.2)
≥25%	17 (54.8)
Interstitial SRC infiltration	
<25% n, (%)	5 (16.1)
≥25% n, (%)	26 (83.9)
NETs score	0.9 (0.5-1.3)

SRC small round cell

31例の腎病理所見については、表2に示すように、総観察糸球体数は 23 ± 11 個、正常糸球体数の割合は $33.7 \pm 23.2\%$ 、全硬化糸球体数の割合は $28.1 \pm 17.8\%$ 、半月体糸球体数の割合は $32.2 \pm 18.3\%$ であった。尿細管萎縮及び間質線維化はmildが14例(45.2%)、moderate to severeが17例(54.8%)であり、尿細管間質細胞浸潤はmildが5例(16.1%)、moderate to severeが26例(83.9%)であった。31例のNETs-score中央値は0.9 (IQR 0.5-1.3) であり、NETs-scoreが0.9以下の低値群17例とNETs-scoreが1.0以上の高値群14例を抽出した(図1)。

NETs-scoreの2群間における臨床データの比較(表3)では、血清アルブミン値とeGFRはNETs-score高値群で有意に低値であった($P = 0.035$ 、 $P = 0.007$)。また、BVASスコアはNETs-score高値群で有意に高値であった($P = 0.004$)。年齢・男女比・尿蛋白定量・血尿陽性率・CRP値・血管炎臨床分類の割合は、2群間に統計学的有意差を認めなかった。

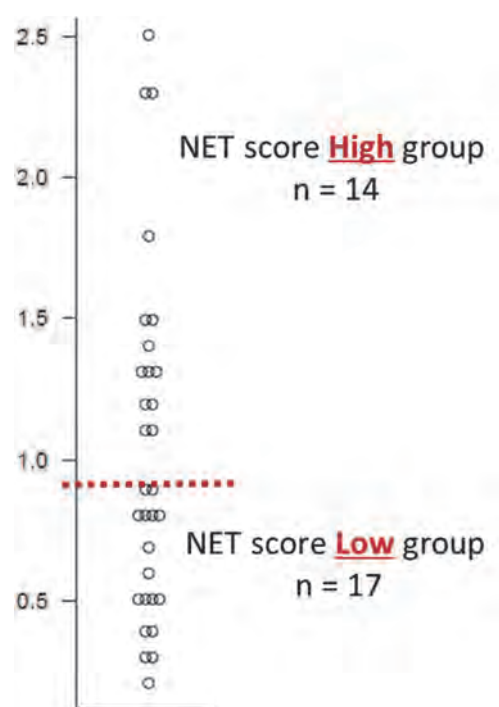


図1 MPO-ANCA関連腎炎31例のNETs-scoreの分布

表3 NETs score 2群間における臨床データの比較

	NETs score Low group (n = 17)	NETs score High group (n = 14)	P-value
Age	71 ± 7	71 ± 15	0.981 ^a
Sex (M/F)	5/12	5/9	1.000 ^b
Proteinuria (g/day or g/gCr)	1.0 (0.6-1.8)	1.5 (0.6-2.6)	0.233 ^c
Urinary RBC ≥5 cells/HPF n, (%)	15 (88.2)	14 (100)	0.488 ^b
Urinary RBC score	3 (3-4)	4 (4-4)	0.101 ^c
Serum Albumin (g/dL)	3.0 ± 0.7	2.5 ± 0.7	0.035 ^d
eGFR (mL/min/1.73m ²)	37.0 (24.5-54.5)	13.9 (8.2-24.7)	0.007 ^c
>15mL/min/1.73m ² n, (%)	14 (82.4)	6 (42.9)	0.031 ^b
≤15mL/min/1.73m ² n, (%)	3 (17.6)	8 (57.1)	
CRP (mg/dL)	6.1 (0.5-9.4)	4.7 (0.7-15.8)	0.283 ^c
Disease category n, (%)			
MPA	7 (54.8)	10 (71.4)	0.149 ^b
GPA	1 (9.7)	2 (14.3)	0.576 ^b
EGPA	2 (6.5)	0 (0)	0.488 ^b
RLV	7 (29.0)	2 (14.3)	0.132 ^b
BVAS at renal biopsy	14 ± 4	18 ± 4	0.004 ^d

^a Welch's *t* test, ^b Fisher's exact test, ^c Mann-Whitney's *U* test, ^d student *t* test.

表 4 NETs score 2 群間における腎組織所見の比較

	NETs score Low group (n = 17)	NETs score High group (n = 14)	P-value
Total no. of glomeruli	21 (14-25)	25 (16-31)	0.572 ^a
Percentage of normal glomeruli (%)	39.6 ± 23.5	26.5 ± 21.5	0.118 ^b
≥10% n,(%)	15 (88.2)	9 (64.3)	0.288 ^c
<10% n,(%)	2 (11.8)	5 (35.7)	
Sclerotic glomeruli (%)	24.6 ± 18.3	32.1 ± 17.1	0.262 ^b
Crescent (%)	31.6 ± 19.1	33.0 ± 17.9	0.838 ^b
Tubular atrophy + interstitial fibrosis			
<25% n, (%)	13 (76.5)	4 (28.6)	0.012 ^c
≥25% n, (%)	4 (23.5)	10 (71.4)	
Interstitial SRC infiltration			
<25% n, (%)	4 (23.5)	1 (7.1)	0.344 ^c
≥25%	13 (76.5)	13 (92.9)	
Histopathological classifications			
Sclerotic n, (%)	3 (17.6)	3 (21.4)	1.000 ^c
Focal n, (%)	7 (41.3)	3 (21.4)	0.280 ^c
Crescentic n, (%)	3 (17.6)	2 (14.3)	1.000 ^c
Mixed n, (%)	4 (23.5)	6 (42.9)	0.441 ^c

^a Mann-Whitney's U test, ^b student *t* test, ^c Fisher's exact test.

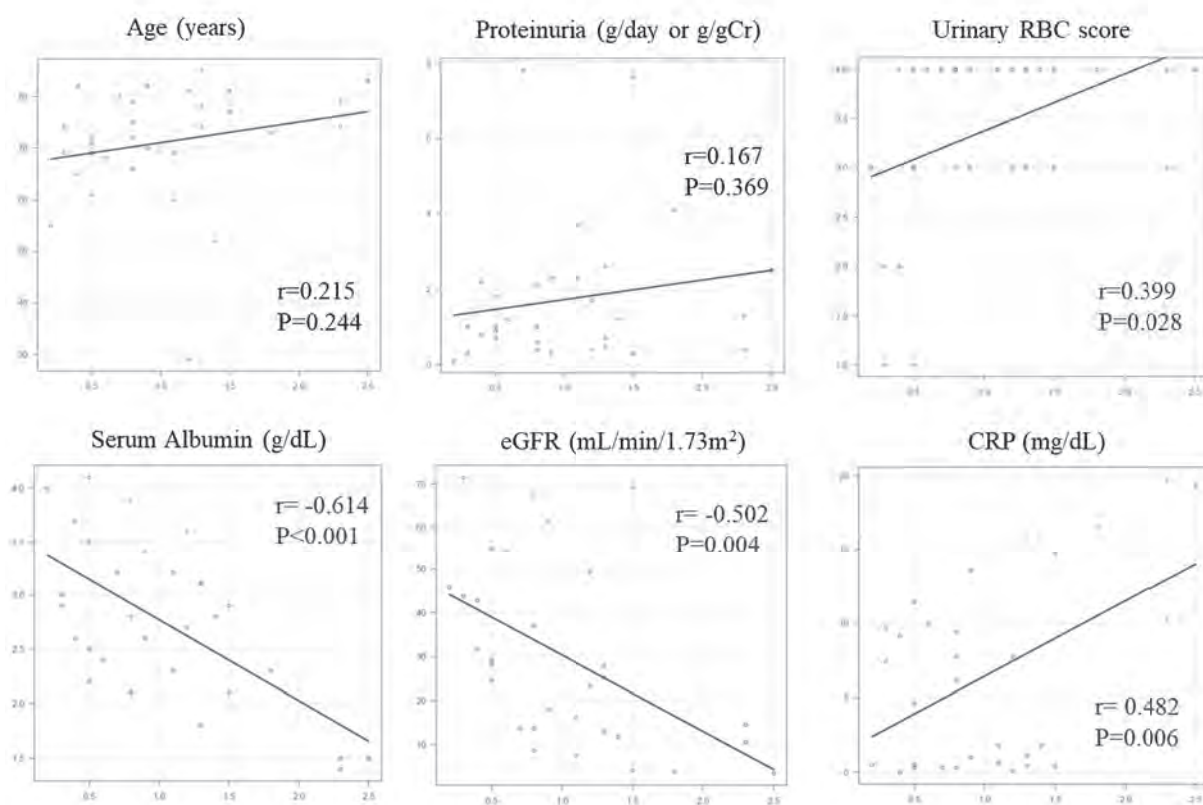


図 2 NETs scoreと臨床組織学的パラメータとの相関（縦軸：各パラメータ、横軸：NETs score）

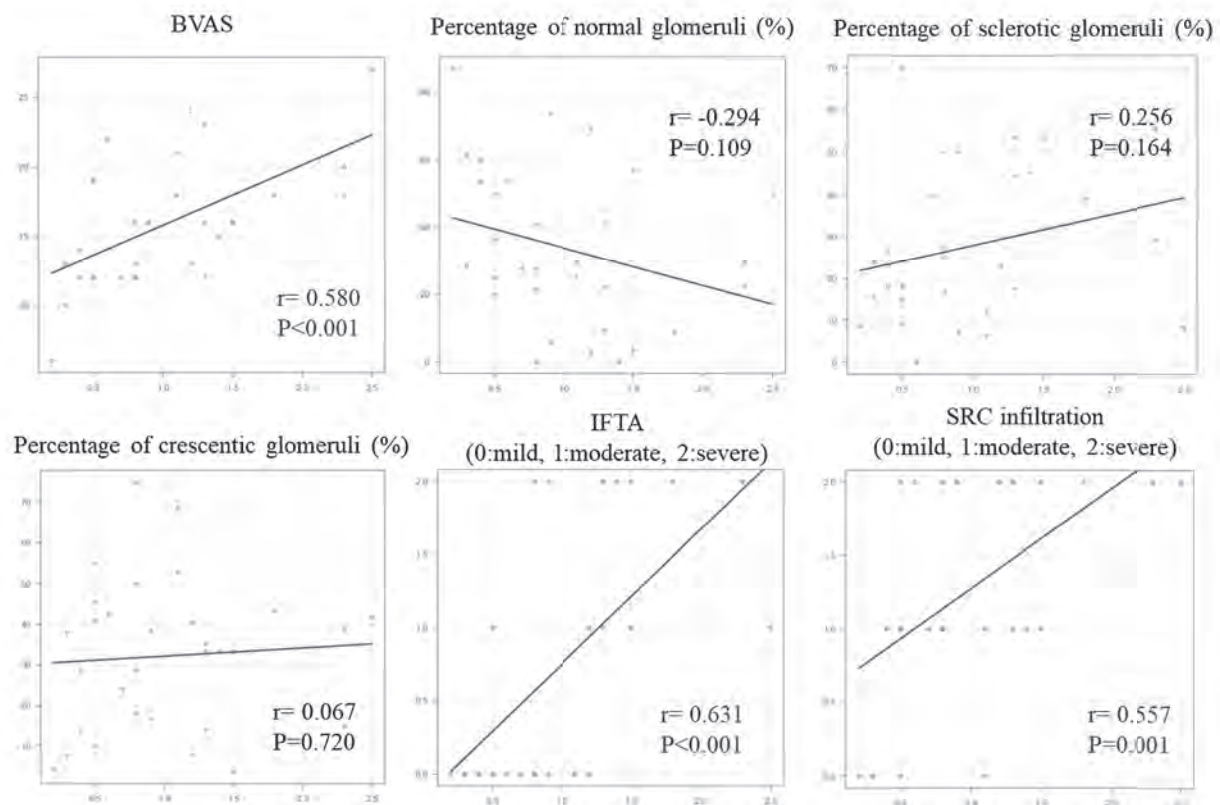


図2 NETs scoreと臨床組織学的パラメータとの相関（縦軸：各パラメータ、横軸：NETs score）

2群間における腎病理所見の比較（表4）では、総観察糸球体数・正常糸球体数の割合・全硬化糸球体数の割合・半月体系球体数の割合・間質細胞浸潤の程度は両群に有意差を認めなかったが、尿管萎縮及び間質線維化の程度はNETs-score高値群で有意に増悪していた（ $P=0.012$ ）。

NETs-scoreと臨床パラメータの相関についての検討（図2）では、NETs-scoreは血清アルブミン値及びeGFRと有意な負の相関、CRP及びBVASとは有意な正の相関を認め、Urinary RBC scoreとは弱い正の相関を認めた。また、病理学的パラメータとの検討では、尿管間質病変との有意な正の相関を認めた。

<考察>

本研究では、腎間質でのNETs発現が、尿管間質病変の程度および腎生検時のeGFR低下と関連していることが明らかとなった。

NETsと尿管障害の関連について、Nakazawaらはヒト腎近位尿管培養細胞株（HK-2細胞）にNETsを放出する活性化好中球をインキュベートし、HK-2細胞から放出されるLDHが増加、ヨウ化プロピジウム陽性となる死細胞が増加することを示した。この研究ではさらに、NETs形成を抑制するPAD4阻害剤を共培養することで、HK-2細胞からのLDH放出、HK-2死細胞数が減少することも示し、NETsの尿管細胞傷害性を明らかにした¹⁶⁾。

NETs関連腎障害に対する新たな治療戦略として、PAD阻害剤や抗ヒストンIgG投与が、ヒストン動注により誘導される半月体形成性腎炎マウスのアルブミン尿や血漿クレアチニン値を改善させ

た、という報告がある¹⁷⁾。また、最近、好中球のプライミングに関与する補体成分であるC5aの受容体阻害薬であるAvacopanの有用性が、ANCA関連血管炎患者での二重盲検プラセボ対照ランダム化比較試験で証明された¹⁸⁾。このように、ANCA関連血管炎ではNETsを標的とした新たな治療戦略が注目されている。

また、ANCA関連腎炎の予後予測として、2010年に糸球体病変のみで4群に分類する国際分類法が提唱され、当科を含め多くのグループで追試検討が行われてきたが、巣状型は予後良好で硬化型は予後不良との結果は同様であるものの、半月体型と混合型の腎予後について必ずしも一致した結果は得られていない¹⁹⁻²¹⁾。一方で、Leeらは糸球体病変のみならず尿細管間質病変も重要な予後因子であることを報告²²⁾、2018年にBrixらによって新たに提唱されたANCA関連腎炎の予後予測「renal risk score」¹³⁾においても、尿細管間質病変が予測因子として組み込まれており、ANCA関連腎炎における尿細管間質病変の重要性が明らかになってきている。本研究では腎間質でのNETs発現は尿細管間質病変増悪と関連することを明らかにしたが、今後「腎間質NETs発現と腎予後の関連」についても検討し、NETsがANCA関連腎炎の治療標的として妥当かどうか検証する予定である。

<結語>

今回、我々はANCA関連腎炎腎組織でのCit-H3免疫染色を行い、腎間質でのNETs発現がBVAS・CRPといった血管炎活動性マーカー、腎尿細管間質病変や腎生検時eGFR低下と関連することを見出した。

<利益相反>

本研究の筆頭著者は、発表内容に関係する企業・組織または団体との利益相反はない。

<文献>

- 1) Sada K, Harigai M, Amano K, et al. : Comparison of severity classification in Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in a nationwide, prospective, inception cohort study. *Mod Rheumatol* 26 : 730-737, 2016.
- 2) Jennette JC, Olson JL, Silva FG, D'Agati VD : *Heptinstall's Pathology of the Kidney* 7th edition. P685-709. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, United States, 2014.
- 3) Kitagawa K, Furuichi K, Shinozaki Y, et al. : Long-term observations of clinicopathological characteristics and outcome of Japanese patients with pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol* 17 : 858-865, 2013.
- 4) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. : Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532-1535, 2004.
- 5) Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. : Novel cell death program leads to

-
- neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176 : 231–241, 2007.
- 6) Neeli I, Khan SN, Radic M. : Histone deamination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 180 : 1895–1902, 2008.
 - 7) Tian Y, Russo RM, Li Y, et al. : Serum citrullinated histone H3 concentrations differentiate patients with septic versus non-septic shock and correlate with disease severity. *Infection* 30 : 1–11, 2020.
 - 8) Middleton EA, He XY, Denorme F, et al. : Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* 136 : 1169–1179, 2020.
 - 9) Matsuda Y, Itabashi M, Tachibana Y, et al. : Citrullinated histone H3 expression in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in older Japanese autopsy patients. *Geriatr Gerontol Int* 19 : 259–264, 2019.
 - 10) Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, et al. : Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol* 25 : 990–997, 2014.
 - 11) Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, et al. : Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15 : 623–625, 2009.
 - 12) Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, et al. : Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 21 : 1628–1636, 2010.
 - 13) Brix SR, Noriega M, Tennstedt P, et al. : Development and validation of a renal risk score in ANCA-associated glomerulonephritis. *Kidney Int* 94 : 1177–1188, 2018.
 - 14) Hiromura K, Ikeuchi H, Kayakabe K, et al. : Clinical and histological features of lupus nephritis in Japan: A cross-sectional analysis of the Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR). *Nephrology* 22 : 885–891, 2017.
 - 15) Robson J, Doll H, Suppiah R, et al. : Glucocorticoid treatment and damage in the anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitides: long-term data from the European Vasculitis Study Group trials. *Rheumatology* 54 : 471–481, 2015.
 - 16) Nakazawa D, Kumar SV, Marschner J, et al. : Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol* 28 : 1753–1768, 2017.
 - 17) Kumar SV, Kulkarni OP, Mulay SR, et al. : Neutrophil extracellular trap-related extracellular histones cause vascular necrosis in severe GN. *J Am Soc Nephrol* 26 : 2399–2413, 2015.
 - 18) Jayne DR, Bruchfeld AN, Harper L, et al. : Randomized Trial of C5a Receptor Inhibitor Avacopan in ANCA-Associated Vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 28 : 2756–2767, 2017.

-
- 19) Togashi M, Komatsuda A, Nara M, et al. : Validation of the 2010 histopathological classification of ANCA-associated glomerulonephritis in a Japanese single-center cohort. *Mod Rheumatol* 24 : 300-303, 2014.
 - 20) Moroni G, Binda V, Leoni A, et al. : Predictors of renal survival in ANCA-associated vasculitis. Validation of a histopatological classification schema and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol* 33 : 56-63, 2015.
 - 21) Chen YX, Xu J, Pan XX, et al. : Histopathological Classification and Renal Outcome in Patients with Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies-associated Renal Vasculitis: A Study of 186 Patients and Metaanalysis. *J Rheumatol* 44 : 304-313, 2017.
 - 22) Lee T, Gasim A, Derebail VK, et al. : Predictors of treatment outcomes in ANCA-associated vasculitis with severe kidney failure. *Clin J Am Soc Nephrol* 9 : 905-913, 2014.