



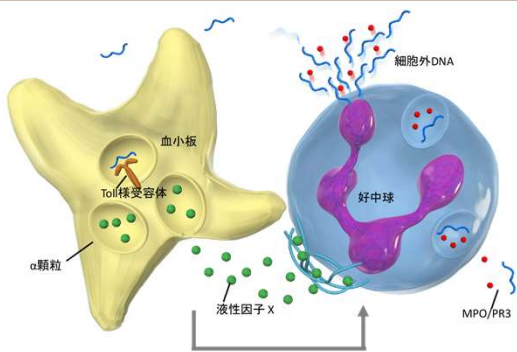
血小板一好中球細胞外トラップを標的とした 自己免疫疾患の新規治療剤の開発

松本 紘太郎、吉本 桂子、竹内 勤 慶應義塾大学医学部

本研究は、好中球細胞外トラップ(NEts)の形成過剰を示す自己免疫疾患の治療のために医薬組成物を提供することを目指す。

NEtsの形成過剰は難治性自己免疫疾患であるANCA関連血管炎(AAV)などの病態の中心をなすが、これまで、NEts形成の阻害を特徴する薬剤として承認された医薬は存在しない。我々は、好中球のNEts形成誘導には血小板の活性化が寄与するとの仮説に基づき、血小板一好中球の共培養およびNEts評価系を樹立し、当該仮説の実験的な検証を試みた。さらに、血小板から放出される液性因子XがNEts形成を誘導すること、Xの阻害性物質を投与することにより当該誘導作用を抑制できることを見いだした(特許出願済み)。Xの阻害は、好中球の過剰なNEts形成を抑制することによってAAVを代表とする自己免疫疾患の病態を改善する可能性があり、新規治療剤となり得ると考えられる。

血小板一好中球相互作用



ヒト血小板はToll様受容体(TLR)、Fc受容体、GPCRをはじめとする受容体を発現し、表面レセプターへの刺激を受容してα顆粒として含有する蛋白質を放出することで、自然免疫・獲得免疫双方へ関与する。

2007年に血小板がNEtsを誘導するという基礎的な検討が細菌感染症のモデルで報告されたが、その機序および阻害機構、自己免疫疾患への関与は明らかとされていない。

In vitro 実験系

(好中球及び血小板の単離)

好中球は、各被験者から採取したヘパリン血を材料として、Mono-Poly Resolving Medium (DS Pharma Biomedical, 大阪)を使用して単離し、DMEM培地に懸濁した。

血小板サンプルは、常法に従い、遠心分離により血小板分画を分取したPlatelet Rich Plasma (PRP)、及びPRPを遠心することで血小板を沈降させた上清をPlatelet Poor Plasma (PPP)として調製した。ここで、PRPは、 $5 \times 10^5 / \mu\text{L}$ の血小板を含むように調整された。

(血小板一好中球共培養)

96穴プレート(Coming, 米国)上に1ウェルあたり 1×10^5 個の好中球(HC又はAAV由来)を播種し、2時間培養した。その後、PRP(HC又はAAV由来)、PPP(HC又はAAV由来)を $10 \mu\text{L}$ 添加し、1時間共培養を行った。

また、血小板と好中球との接触の影響を検討するため、本共培養系において、trans-well assay kit (Coming, 米国)を用い、HC由来の好中球とAAV由来の血小板をポアサイズ0.4 μm の膜で隔てて共培養する試験も併せて行った。

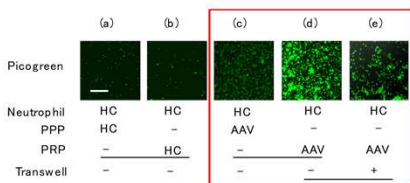
(NEts形成の解析)

NEts形成の視覚的確認は、ライブセルイメージングシステム(Okubo K et al., EBioMedicine. (2016) vol. 10, pp. 204-215)に従って行った。概略としては、スライドガラス上の好中球及び／又は血小板を500 nMのPicogreen (Thermo Fisher Scientific, 米国)とインキュベートし、細胞外に放出された二本鎖DNA(Picogreenラベルされたds-DNA)を共焦点顕微鏡によって観察することにより、NEtsを検出する方法である。

(TLR9リガンド刺激血小板を用いた検討)

共培養前に、TLR9リガンドであるCpG-DNA (CpG; Novus Biologics, Littleton, 米国)を $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 添加し、16-18時間血小板を刺激した。血小板(-)の条件であるPPPにおいても、PRPと同様の刺激を行い、好中球との共培養に供した。また、一部の系では、 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ のCpG-DNAと共に、TLR9アンタゴニストであるヘキサヌクレオチド(TTAGGG; ODN A151 (Invivogen, 米国))の添加も行った。なお、対照には、TLR9リガンドとしての作用を有しないcontrol oligodeoxynucleotides (CpG control; Novus Biologics, 米国)を $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 添加した。

AAV血小板によるNEts誘導



AAV患者由来血小板による健康人由来好中球のNEts誘導

(d)、及び(e)、すなわち、AAV由来の血小板(PRP)と共培養を行った場合に強いシグナルが確認され、AAV由来の血小板分画によってNEtsが著明に誘導されることが分かった。一方、(b)と(d)との比較等により、HC由来の血小板にはNEts形成を誘導する活性がないことが分かった。

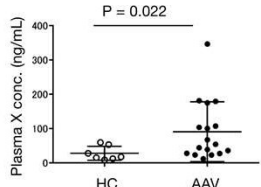
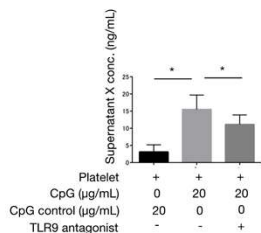
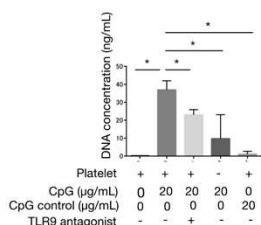
トランスウェルを用いて血小板と好中球との直接接触を阻害した条件(e)であってもNEtsが著明に誘導されたことから、AAV由来の血小板は液性因子Xを介してNEtsを誘導できることが分かった。さらに、(d)と(e)の比較では前者により強いNEts誘導が認められたことから、液性因子によるNEts誘導と好中球-血小板接触によるNEts誘導の両方が働いていることが示唆された。スケール: 100 μm

血小板上のTLR2, 4, 9発現

フローサイトメトリ解析の結果、血小板上のTLR9発現陽性率はAAV患者において健康人よりも上昇していること、及び、TLR2及びTLR4発現陽性率は健康人と差異がないことが認められた(データは示さず)。

TLR刺激によるXを介したNEts形成

TLR9刺激を受容した血小板による液性因子X放出を介したNEts形成



■ TLR9リガンド(CpG)添加時のDNA濃度(ng/mL)は対照と比較して有意に上昇を認めた。

■ CpG-DNAと共にTLR9アンタゴニストを添加した場合、CpG-DNA誘導性のDNA放出は有意に阻害された。

■ *p<0.05

■ CpG-DNA $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 添加時の上清X濃度は対象と比較して有意に上昇を認めた。

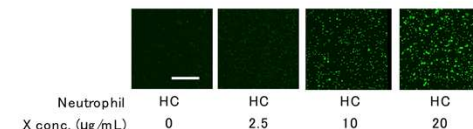
■ CpG-DNAと共にTLR9アンタゴニストを添加した場合、CpG-DNA誘導性のX分泌促進の抑制が認められた。

■ *p<0.05

■ AAV患者(n=17)及びHC(n=7)について、各被験者から血漿サンプルを調製し、血漿中X濃度(ng/mL)を、実施例4と同様に、ELISA法により定量した。

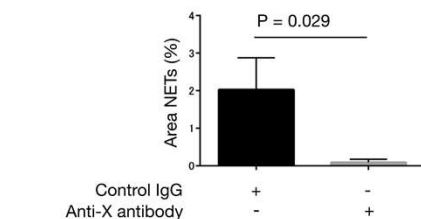
■ AAV患者における血漿中X濃度はHCにおけるX濃度と比較して有意に高かった。

液性因子Xの阻害剤による機能評価



液性因子XによるNEts形成亢進

血小板を添加することに代えて組換え体の液性因子Xを0、2.5、10又は $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 添加し、NEts誘導効果を顕微鏡観察により評価した。Xは好中球によるNEts形成を直接誘導すること、及びこの誘導効果はXの濃度依存的であることが分かった。スケール: 100 μm



抗X抗体によるTLR9-Xを介した血小板介在NEts形成抑制

NEts形成を示すPicogreenの蛍光シグナル陽性領域の割合(%)は、抗ヒトX抗体添加時が0.10であるのに対し、対照では2.0であり、AAV患者由来の血小板によるNEts形成誘導活性は抗X抗体の添加によって有意に抑制されることが示された。

結論および今後の研究計画

- 本発明のX阻害剤は、好中球によるNEts形成を抑制することを通じて自己免疫疾患の治療に使用できることから、産業上の利用可能性を有する。
- Xの阻害活性を有する抗体、Xと特異的に結合するアプタマー、及びXと特異的に結合する小分子を設計し、候補薬剤をスクリーニングするための実験系を確立する。
- Xの活性を阻害する候補薬剤を自己免疫疾患モデルマウスに投与することで、NEtsを阻害し病態を改善するか検証する。

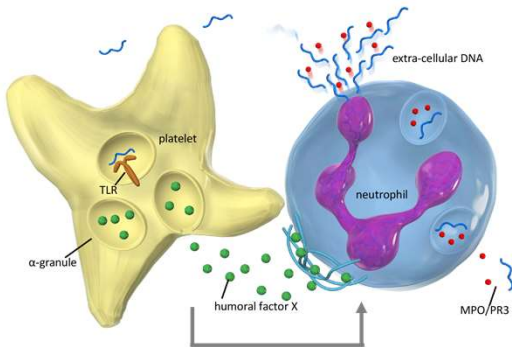


Development of novel therapeutic agents for autoimmune diseases targeting platelet–neutrophil extracellular traps interaction

Kotaro Matsumoto, Keiko Yoshimoto, Tsutomu Takeuchi, Keio University

Excessive formation of neutrophil extracellular traps (NETs) lead autoimmune diseases such as ANCA-associated vasculitis (AAV). There are no approved drugs via inhibition of NETs formation. Recent reports suggest that platelets stimulated via toll-like receptor (TLR) pathways can induce NETs formation, indicating that platelets may be an alternative key player in AAV pathogenesis. Here, we found that platelets from AAV patients significantly upregulated NETs formation via humoral factor X (Patent pending). Inhibition of humoral factor X may improve the pathology of autoimmune diseases such as AAV by suppressing NETs formation, and may be a novel therapeutic agent.

Platelet–Neutrophil interaction



Human platelets express various receptors such as toll-like receptor (TLR), and associated with innate and acquired immunity. Because platelets can store various humoral factors in granules, we hypothesized that platelets can be activated by TLR9 and release humoral factors from granules to promote NETs formation.

Methods

(Isolation of neutrophils and platelets)

Neutrophils were isolated from heparinized blood samples using Mono-Poly Resolving Medium (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) and suspended in culture medium containing DMEM at 8°C.

Platelets were prepared as platelet-rich plasma (PRP), containing a large number of platelets from the subject's blood, and platelet-poor plasma (PPP), the supernatant of PRP prepared by precipitating platelets by centrifugation at room temperature according to previously published methods.

(Platelet–neutrophil co-culture assay)

Neutrophils were seeded onto 96-well plates (Corning, NY, USA) at 1×10^5 cells per well and preincubated for 2 hours before stimulation with pre-stimulated PPP, PRP or culture supernatant. A trans-well assay kit (Corning, NY, USA) with 0.4 μ m pore size was used to evaluate the effect of platelet adhesion to neutrophils.

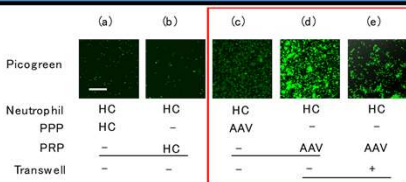
(Analysis of NETs formation)

Neutrophils and/or platelets on a 35-mm glass dish (Matsunami, Tokyo, Japan) were incubated with 500 nM Picogreen (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) to probe extracellularly-released double-stranded DNA (ds-DNA). Confocal fluorescence microscopy (FV-10; Olympus, Tokyo, Japan) was performed in a CO₂ incubator at 37°C to detect NETs formation. NETs formation from 1×10^5 neutrophils in 300 μ L culture medium was quantified by measuring the fluorescence intensity of Picogreen-labeled extracellular ds-DNA. The area of positive signal of Picogreen was also quantified using ImageJ processing software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

(Effects of TLR9-stimulated platelets on NETs formation)

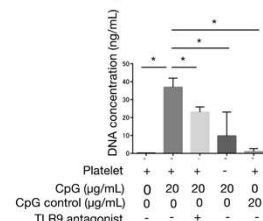
To examine the additional effect of TLR signaling, CpG oligodeoxynucleotides (Novus Biologics, Littleton, CO, USA) as a TLR ligand or control oligodeoxynucleotides (Novus Biologics, Littleton, CO, USA) were added to the culture for 16–18 hours at 37°C in some experiment.

Platelet-mediated NETs formation



TLR9-stimulated platelets induced NETs

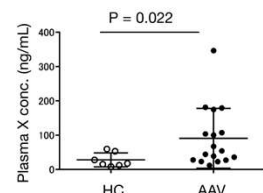
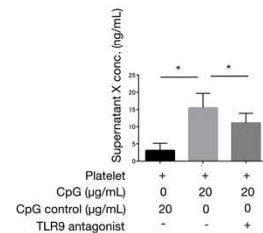
Activation of TLR9 signaling pathways in platelet-induced NETs formation by X



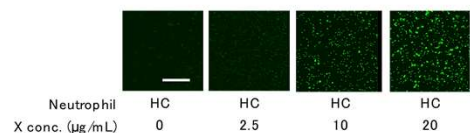
■ Stimulation of platelets with CpG oligodeoxynucleotides, a TLR9 agonist, significantly enhanced NETs formation compared to stimulation with control oligodeoxynucleotides.

■ TLR9 antagonist markedly inhibited CpG-induced DNA release. * $p < 0.05$.

■ X levels in culture supernatants were increased following stimulation of platelets with CpG compared with control nucleotides, which were partially suppressed by a TLR9 antagonist.

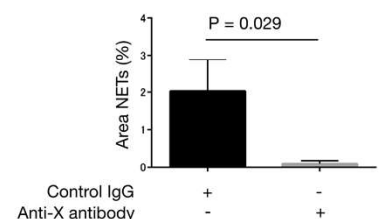


In vitro effects of X inhibitor on NETs



Humoral factor X induced NETs formation

Recombinant human X enhanced NETs formation in a concentration-dependent manner. Scale bar: 100 μ m.



Anti-X antibody inhibited NETs formation induced by AAV platelets

An anti-X antibody suppressed the release of DNA from NETs following exposure to platelets from 4 independent AAV patients.

Conclusions and Future plans

- Our findings strongly suggest that factor X is a novel therapeutic target for autoimmune diseases through suppressing NETs formation.
- Establishment of *in vitro* screening system to search inhibitors against factor X, such as antibodies, aptamers and compounds with small molecules, is required to develop the novel drugs for the diseases.
- Medicinal efficacy tests with factor X inhibitors indicating suppressive effects of NETs formation using mice models of autoimmune diseases will be conducted.