



Title	生体試料を用いた好中球細胞外トラップの検出とその応用
Author(s)	益田, 紗季子
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13697号
Issue Date	2019-06-28
DOI	10.14943/doctoral.k13697
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/76652
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2488
File Information	Sakiko_Masuda.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

生体試料を用いた

好中球細胞外トラップの検出とその応用

(Detection of neutrophil extracellular traps in
biological samples and its application)

2019年6月

北海道大学

益田紗季子

学位論文

生体試料を用いた

好中球細胞外トラップの検出とその応用

(Detection of neutrophil extracellular traps in
biological samples and its application)

2019年6月

北海道大学

益田紗季子

目 次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 頁
要旨.....	2 頁
略語表.....	5 頁
1. 緒言.....	7 頁
2. 第一章 フローサイトメトリーを用いた好中球細胞外トラップの検出と応用..	12 頁
2.1 背景.....	13 頁
2.2 方法.....	16 頁
2.3 結果.....	20 頁
2.4 考察.....	36 頁
2.5 結論.....	39 頁
3. 第二章 免疫蛍光染色を用いた好中球細胞外トラップの検出と応用.....	40 頁
3.1 背景.....	41 頁
3.2 方法.....	43 頁
3.3 結果.....	47 頁
3.4 考察.....	57 頁
3.5 結論.....	60 頁
4. 総括および結論.....	61 頁
5. 謝辞.....	62 頁
6. 利益相反.....	63 頁
7. 引用文献.....	64 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. **Masuda S**, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A*. 2017; 91(8):822-829.
2. **Masuda S**, Nonokawa M, Futamata E, Nishibata Y, Iwasaki S, Tsuji T, Hatanaka Y, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Kawakami T, Atsumi T, Ishizu A. Formation and disordered degradation of neutrophil extracellular traps in necrotizing lesions of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Am J Pathol*. 2019. S0002-9440(18)30771-5.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. **益田紗季子**、西端友香、松尾淳司、外丸詩野、石津明洋. フローサイトメトリーによる好中球細胞外トラップ検出法. 第 106 回日本病理学会総会, 東京, 2017 年 4 月.
2. **益田紗季子**、野々川茉佑、西端友香、岩崎沙理、辻 隆裕、田中 敏、外丸詩野、川上民裕、石津明洋. ANCA 関連血管炎 (AAV) の壊死性病変部における好中球細胞外トラップ (NETs) の存在と病的意義. 第 107 回日本病理学会総会, 札幌, 2018 年 6 月.

要旨

【背景と目的】

好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) は細菌等の刺激を受けた好中球が放出する網状構造物で、DNA線維とミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase: MPO) などの抗菌タンパクで構成される。自然免疫において重要な役割を担っている一方で、細胞内に存在するタンパクが細胞外へ放出されることにより、自己抗体産生、血管内皮細胞障害、血栓症など生体にとって様々な負の影響を与えることも報告されている。疾患の病因病態へのNETsの影響を明らかにするためには、適切なNETs評価法が不可欠である。これまでに様々なNETs測定法が開発され、応用されてきたが、未だにゴールドスタンダードと呼べる方法はない。そこで、本研究では新たなNETs測定法を確立し、生体内で形成されるNETsを検出することを目的とした。第一章ではフローサイトメトリーを用い、第二章では免疫蛍光染色を用いてNETsを評価した。

第一章：フローサイトメトリーを用いたNETsの検出と応用

【背景と目的】血液や体腔液などの液状検体中のNETs測定は、cell-free DNAやMPO-DNA複合体などの可溶性NETs断片を対象として行われてきた。フローサイトメトリーにおけるNETs測定は、液状検体中のNETs形成好中球そのものを測定できるものの、報告数が少なく、定量性の検証や他のNETs測定法との比較が十分にはなされていない。本研究では、フローサイトメトリーを用いた簡便かつ定量的、客観的なNETs測定法の確立を目的とした。

【材料と方法】In vitroにおいて、ヒト末梢血好中球にNETs誘導物質であるphorbol myristate acetate (PMA) を100 nM添加し、NETsを誘導した。細胞膜非透過性核酸染色剤であるSYTOX Greenにより細胞外DNAを染色し、フローサイトメーターで解析した。NETs形成に不可欠な活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生を抑制するdiphenylene iodonium (DPI) による前処理を行い、SYTOX Green陽性細胞数に影響を与えるかを検討した。また、SYTOX GreenとMPOやシトルリン化ヒストンとの共局在を確認した。アポトーシス細胞との鑑別を目的として、アポトーシス誘導細胞とSYTOX Greenを反応させ、測定を行った。次に、in vivoで誘導したNETsを検出するために、ラット尾静脈から*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) を注入し、1~48時間後に採取した血液中のSYTOX Green陽性細胞を測定した。また、3%チオグリコレートの腹腔内投与によりラットに腹膜炎を誘導し、72時間後に回収した腹腔洗浄液中のSYTOX Green陽性細胞を測定した。

【結果】 In vitroにおいて、SYTOX Green陽性細胞は培養時間およびPMA濃度依存的に検出された。DPIによる前処理によりその数が減少したこと、SYTOX Green陽性細胞の多くがMPO陽性であったことから、NETs形成好中球を検出できていると考えられた。また、アポトーシス細胞はSYTOX Green陰性であることから、本検出法ではアポトーシスとの鑑別が可能であった。In vivoにおいて、*S. aureus*を静注したラット血液中からはSYTOX Green陽性細胞はほとんど検出することはできなかったが、腹膜炎誘導ラットの腹腔洗浄液中にSYTOX Green陽性細胞が検出された。

【考察】 In vitro及びin vivoで形成されたNETs形成好中球をフローサイトメトリーで検出できた。本法は簡便かつ客観的、定量的な測定法と言える。In vivoにおいて、腹膜炎ラットの腹腔洗浄液からNETs形成好中球を検出することができたが、*S. aureus*を静注したラットの血液中には、NETs形成好中球はごくわずかししか認められなかった。血液中で形成されたNETsは、血漿中のDNase Iの作用により、速やかに分解されている可能性が考えられた。

第二章：免疫蛍光染色を用いたNETsの検出と応用

【背景と目的】抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA) 関連血管炎はANCA産生と壊死性血管炎が特徴であり、ANCAの産生にNETsが関与していると報告されている。ANCA関連血管炎では、NETsはANCA産生の原因となり、ANCAの持つNETs誘導能により過剰なNETsが形成されるというNETsとANCAを介した悪循環が形成されている。本研究では、免疫蛍光染色を用いANCA関連血管炎の壊死性病変部へのNETs沈着とその病的意義を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】 ANCA関連血管炎であるMPA（顕微鏡的多発血管炎）、GPA（多発血管炎性肉芽腫症）、EGPA（好酸球性多発血管炎性肉芽腫症）及びANCA非関連対照疾患（結節性多発動脈炎、皮膚動脈炎、巨細胞性動脈炎、結核、サルコイドーシス）の組織標本を用いて、シトルリン化ヒストンとCD15、DNAに対する免疫蛍光染色及びヘマトキシリン単染色を行った。画像解析にて、病変部に占めるNETs陽性面積の割合を求め、各疾患で比較した。次に、結核とGPAの組織標本に10 U/mlのDNase Iを1時間反応させ、DAPI染色とヘマトキシリン単染色を行った。

【結果】 ANCA関連血管炎の血管炎病変部に見られるフィブリノイド壊死の周囲にNETs陽性所見が得られた。ANCA関連血管炎におけるNETs陽性面積の割合は、ANCA非関連血管炎に比べ有意に高かった。肺の肉芽腫についての検討では、GPAや結核の壊死性肉芽腫において、壊死部にNETs陽性所見が得られ、病変部に占めるNETs陽性面積の割合はサルコイドーシスの非壊死性肉芽腫に比べ有意に高かった。また、GPAの壊死性肉芽腫に認められたNETsは結核における壊死性肉芽腫のNETsと比較して有意にDNase I処理に抵抗性を示した。

【考察】 ANCA関連血管炎における壊死性病変にDNase I抵抗性のNETsの沈着を認め、ヒトの生体内でDNase I抵抗性NETsが沈着していることを初めて示した。ANCAがNETs誘導活性を有することやNETsが細胞障害活性を有することから、ANCA関連血管炎ではANCAにより誘導されたNETsが壊死性病変の形成に関与すると考えられる。また、DNase I抵抗性のNETsはANCAの産生を誘導することも報告されており、組織に沈着したNETsはANCA抗原の供給源となり、ANCAの産生に関与すると考えられる。DNase I抵抗性NETsは治療標的となる可能性があり、今後は形成機序を明らかにする必要がある。

【結論】

本研究により、フローサイトメトリーと免疫蛍光染色を用いた NETs 測定法を確立した。フローサイトメトリーによる NETs 測定法は NETs 形成好中球を検出するものであり、定量性、客観性の高い簡便な方法である。免疫蛍光染色による NETs 染色において、ANCA 関連血管炎の壊死性病変部における DNase I 抵抗性 NETs の沈着を確認した。DNase I 抵抗性 NETs は壊死性病変の形成や ANCA 産生に関与していると考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AAV	ANCA-associated vasculitis
ANCA	Anti-neutrophil cytoplasmic antibody
CA	Cutaneous arteritis
Cit H3	Citrullinated histone H3
CR3	Complement receptor 3
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4', 6-diamidino-2 -phenylindole
DPI	Diphenyleneiodonium chloride
EGPA	Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FSC	Forward scatter
GCA	Giant cell arteritis
GPA	Granulomatosis with polyangiitis
HMGB1	High mobility group protein B1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
MPA	Microscopic polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	Neutrophil elastase
NETs	Neutrophil extracellular traps
PAD4	Peptidylarginine deiminase 4
PAN	Polyarteritis nodosa
PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium iodide
PKC	Protein kinase C
PMA	Phorbol myristate acetate
PS	Phosphatidylserine

PTU	Propylthiouracil
PR3	Proteinase 3
ROS	Reactive oxygen species
SLE	Systemic lupus erythematosus
SSC	Side scatter
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor

1. 緒言

1.1 好中球の新たな機能の発見

ヒトは細菌や真菌などの病原微生物の感染や異物の侵入に対し、様々な防御機構を有している。生体防御機構は自然免疫と獲得免疫に分類される。自然免疫は受容体を介して微生物や異常な自己細胞を認識し、排除する役割を担っており、最前線で生体防御を行う機構である。好中球やマクロファージ、樹状細胞などの食細胞やNK細胞が関与している。一方、獲得免疫は一度感染した病原体を認識・記憶することで、再度同じ病原体が侵入した時に素早く効率的に病原体を排除する機構である。T細胞やB細胞などのリンパ球が関与している。

好中球は自然免疫において感染のごく初期に働く細胞である。組織に病原微生物が侵入すると、マクロファージや肥満細胞が素早く反応し、サイトカインを放出する。種々のサイトカインの作用により、好中球は感染部位に遊走し、集積する。好中球は病原微生物を貪食し、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生して病原微生物を殺菌する。このように、好中球は遊走、貪食、殺菌を行う細胞として認識されていた。

2004年 Brinkmann らは、活性化した好中球が抗菌タンパクとクロマチンが絡み合ったファイバー状構造物を細胞外に放出することを報告した (Brinkmann et al. 2004)。彼らは、細胞外に放出された DNA 線維を好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) と呼んだ。NETs はグラム陽性または陰性細菌に結合し、病原性因子を分解し、殺菌する。NETs はファイバー状の DNA 線維により細菌を絡め取り、細菌の拡散を防ぐバリア作用と高濃度の抗菌タンパクによって殺菌する作用を持っており、好中球の新たに発見された機能である。NETs の放出は細胞膜の破裂を伴うため、NETs を形成した好中球は細胞死に至る。この NETs 形成を伴う細胞死はアポトーシスやネクローシスとは異なることから、NETosis と呼ばれた (Steinberg and Grinstein 2007; Fuchs et al. 2007)。その後、好酸球 (Yousei et al. 2008; Ueki et al. 2013) や単球 (Webster et al. 2010)、マクロファージ (Mohan et al. 2013)、肥満細胞 (von Köckritz-Blickwede et al. 2008) など様々な細胞が細胞外トラップを放出することも報告されている。NETs の発見から約 15 年が経過し、NETs を誘導する刺激や形成経路、NETs が関与する疾患などが、少しずつ明らかとなってきた。

1.2 NETs 形成と誘導因子

Brinkmann らは phorbol myristate acetate (PMA) や interleukin (IL) -8 を作用させた好中球が、脱凝縮したクロマチンと抗菌タンパクで構成された大きな網状構造物を放出することを示した (Brinkmann et al. 2004)。まず初めに、クロマチンが脱凝縮し、核の分葉構造が消失する。やがて、核膜が破れてクロマチンは細胞質に流入し、クロマチンと顆粒中の抗菌タンパクが混ざり合う。その後、細胞膜が破綻し、抗菌タンパクによって装飾されたクロマチンが細胞外へと放出される。好中球に刺激が入ってから 2~4 時間で NETs が放出される。NETs は DNA とヒストンを含むクロマチン線維で構成され、DNA 線維は好中球エラスターゼ (neutrophil elastase: NE) やミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase: MPO)、カテプシン G、プロテインナーゼ 3 (proteinase 3: PR3)、high mobility group protein B1 (HMGB1)、LL-37 などの 30 種類以上のタンパクによって装飾されている。NETs を誘導する刺激として、PMA や IL-8 のほか、細菌、真菌、寄生虫 (Vorobjeva and Pinegin 2014)、抗原抗体複合体 (Garcia-Romo et al. 2011)、自己抗体 (Kessenbrock et al. 2009)、tumor necrosis factor (TNF)、interferon (IFN) (Martinelli et al. 2004)、尿酸ナトリウム結晶 (Mitroulis et al. 2004) などが報告されている。

1.3 NETs 形成経路

好中球の toll-like receptor (TLR) をはじめとする受容体にリガンドや免疫グロブリン、補体、サイトカインなどが結合し、これらの受容体が活性化すると、小胞体に貯蔵されていたカルシウムイオンが細胞質内に放出される。細胞質内のカルシウム濃度の上昇により、プロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) の活性化が誘導される。PKC の作用により nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼの活性化と ROS の産生が誘導される (Kaplan and Radic 2012)。実験的な NETs 誘導剤として頻用される PMA は PKC の活性化を介して NADPH オキシダーゼを活性化する。先天的に NADPH オキシダーゼのサブユニットが欠損している慢性肉芽腫症患者は ROS を産生することが出来ないため、NETs を形成することが出来ない (Fuchs et al. 2007; Bianchi et al. 2009)。慢性肉芽腫症における NETs 形成不全は、乳幼児期からの易感染性の一因になっている。ROS の一種である過酸化水素による治療は慢性肉芽腫症患者の好中球において NETs 形成を回復させる (Fuchs et al. 2007)。In vitro においては、NADPH オキシダーゼ阻害剤である diphenyleneiodonium chloride (DPI) によって NETs 形成が抑制される (Fuchs et al. 2007)。これらの事実より、NETs 形成において、ROS 産生は不可欠であると考えられる。また、好中球のアズール顆粒に含まれる NE や MPO は核に移行し (Metzler et al.

2014)、NEはヒストンを切断してクロマチンの脱凝縮を促進し、MPOもクロマチンの脱凝縮を促進する (Papayannopoulos et al. 2010)。NE阻害剤はNETsの形成を抑制し (Papayannopoulos et al. 2010)、MPOを完全に欠損した患者由来の好中球はNETsを形成することが出来ないことが報告されている (Metzler et al. 2011)。ROSはpeptidylarginine deiminase 4 (PAD4) を核に移行させる。PAD4の作用によりヒストン尾部のアルギニンがシトルリンに変化し、立体構造が変化することでDNAとの結合性が弱まり、DNAの脱凝縮が起こる (Wang et al. 2009)。PAD4欠損マウスの好中球はNETsを形成することができず、重度の皮膚感染症を引き起こす (Li et al. 2010)。よって、NEやMPO、PAD4はNETs形成に必要な分子であると言える。一方で、刺激の種類によってはROSやMPO、NE、PAD4非依存的にNETsが形成されるとの報告もあるため (Parker and Winterbourn 2012; Kenny et al. 2017)、NETsを誘導する因子ごとに様々な経路が存在する可能性がある。

一方で、NETs放出後も細胞膜は破綻せず、運動や食食を行うことができるとの報告も存在する。このような細胞死を伴わないNETs形成をvital NETosisと呼び、これまでに述べた細胞死に至るNETs形成はsuicidal NETosisと呼ばれる (Figure 1)。Vital NETosisは30分程度で誘導される (Clark et al. 2007)。*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) から刺激を受けた好中球では、核膜の一部が出芽し、小胞が形成される (Pilszczek et al. 2010)。核成分を含んだ小胞は細胞内を移動し、顆粒タンパクと混ざり合い、細胞外へNETsとして放出される。この時、細胞膜構造は維持されており、NETsを放出した好中球はその後*S. aureus*を追って移動し、食食することができる (Yipp et al. 2012)。形成経路についてはほとんど明らかになっていないが、グラム陽性菌はcomplement receptor 3 (CR3) やTLR2が関与し、グラム陰性菌に対しては、活性化血小板のTLR4と好中球のCD11aが関与すると考えられている (Yipp and Kubes 2013)。また、Vital NETosisはROS非依存的に誘導される (Pilszczek et al. 2010)。

現段階では、suicidal NETosisとvital NETosisいずれの現象も生体内で起こりうると考えられているが、NETosisの全容解明にはさらなる研究の発展が必要である。

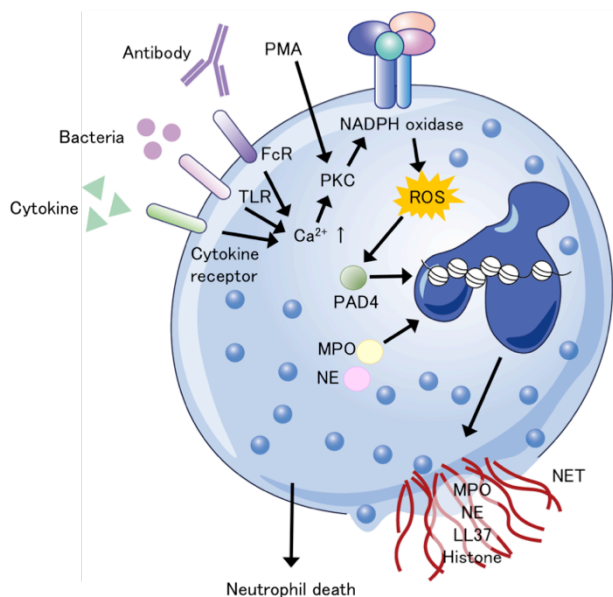
1.4 NETs の負の側面

NETsは細菌や真菌、寄生虫やウイルスなどの感染に対する自然免疫応答において重要な役割を担っている。一方で、もともと細胞内に存在しているタンパクが細胞外へ放出されることで、身体へ負の影響を与える。宿主の免疫機構へ自己抗原を提示することにより、自己抗体の産生が誘導される可能性がある (Sørensen and Borregaard 2016)。また、HMGB1などのdamage-associated molecular patterns (DAMPs) の放出は免疫応答を過剰にさせたり、ヒストンやNE、MPOなどの細胞障害因子は血

管内皮細胞を障害する (Xu et al. 2009)。近年、様々な疾患の病因病態にNETsが関与することが明らかとなっている。NETsと関連が示されている疾患は、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE)、関節リウマチ、抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA) 関連血管炎、糖尿病、動脈硬化症、血栓症、がん、創傷治癒、外傷などが挙げられる (Jorch and Kubes 2017)。

NETsが疾患に与える影響を検討するためには、適切なNETsマーカーの発見とNETs評価方法の開発が重要な課題となる。これまでに、様々なNETs測定法が開発・応用されてきたが、特異性、客観性、定量性などに問題があり、いまだゴールドスタンダードと呼べる方法はない (Masuda et al. 2016)。本研究では、新たなNETs測定法を確立し、生体内で形成されるNETsを検出することを目的とした。第一章では、フローサイトメトリーを用いたNETs測定法を確立し、血液や体腔液に含まれるNETs形成好中球を検出できるかを検討した。第二章では、組織標本を用いた免疫蛍光染色を用い、NETsとの関連が明らかとなっているANCA関連血管炎の病変部におけるNETsを検出し、さらにその特性を明らかにした。

A. Suicidal NETosis



B. Vital NETosis

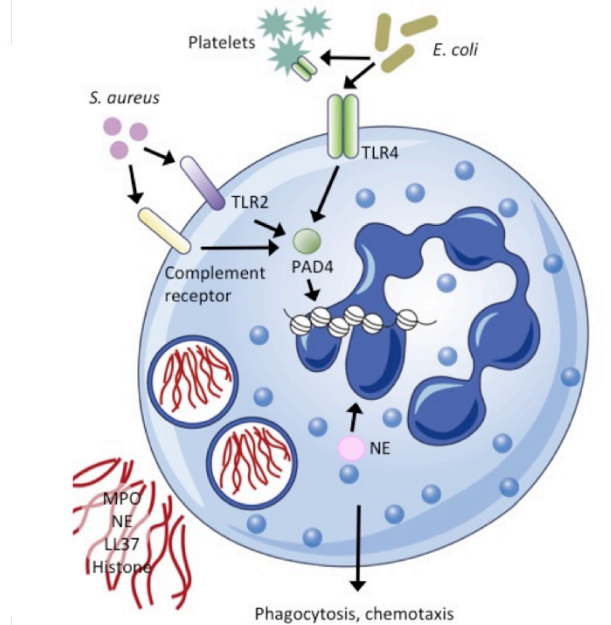


Figure 1. NETs形成機序 (Jorchらの論文を元に作成)

(A) Suicidal NETosis。様々な刺激によりNADPHオキシダーゼが活性化されROSが産生される。ROSの作用により、PAD4が活性化し、核へ移動してヒストンをシトルリン化することでさらなるクロマチンの脱凝縮が誘導される。MPOやNEも核へ移動し、クロマチンの脱凝縮を促進する。核膜の破綻によりクロマチンが細胞質に放出され、顆粒タンパクにより装飾される。細胞膜の破綻によりNETsが放出され、好中球は細胞死に至る。刺激からNETs放出までは数時間かかる。(B) Vital NETosis。*S. aureus*は補体レセプターやTLR2を介して、*Escherichia coli* (*E. coli*)はTLR4を介して、または活性化された血小板上のTLR4を介して間接的にNETsを誘導する。ROS非依存的にPAD4が活性化され、クロマチンの脱凝縮が誘導される。NEは核へ移動しさらなる脱凝縮を誘導する。核膜の一部から出芽が起こり、小胞を介してNETsが細胞外へ放出される。好中球は細胞死に至ることなく、その後も貪食などの活動を行うことができる。刺激からNETs放出までは30分程度と早い。

2. 第一章

フローサイトメトリーを用いた
好中球細胞外トラップの検出と応用

2.1 背景

NETsは病原微生物の侵入に対する自然免疫応答において重要な役割を担う一方、血管内皮障害や血栓症を誘導する。さらに近年の研究で、自己免疫疾患や糖尿病、動脈硬化症、がんなどとの関連も指摘されている。よって、NETosisマーカーの発見と評価方法の開発は重要な課題である (Masuda et al. 2016)。In vitroまたはin vivoで形成されたsuicidal NETosisを評価・測定する研究は多く行われているが、vital NETosisの評価については進んでいない。表1にsuicidal NETosisの主な測定方法とその特徴をまとめた。

最も一般的なNETsの評価方法は、免疫染色を用いた顕微鏡による観察であり、特に免疫蛍光染色が頻用されている。In vitroやin vivoで形成されたNETsを評価できる。MPOやNEなどの好中球由来タンパクとDNAやシトルリン化ヒストンなどの細胞外核成分の共局在を観察することでNETsを同定する方法である。In vitroで形成されたNETsの評価は、カルチャースライド上の好中球にNETsを誘導し、固定後免疫染色を行うもので、様々な実験に用いられている (Nakazawa et al. 2012a)。In vivoで形成されたNETsの評価は、ホルマリン固定組織などを用いてNETsの免疫染色を行い、ANCA関連血管炎の腎糸球体などにNETsの沈着が証明されている (Kessenbrock et al. 2009)。NETsの定量化には画像解析が用いられるが、撮影部位の選択や画像の選択において研究者の主観が入る可能性があるため、注意が必要である。免疫染色はNETsの視覚化において信頼性のある優れた方法であるが、客観性に乏しいことが問題である。

血清や体腔液、細胞培養液などの液体成分を用いたNETs測定では、可溶性のNETs断片が測定される。この方法は、in vitroおよびin vivoで形成されたNETsを測定することが可能である。NETs断片の一つの形態としてcell-free DNAがあり、その測定にはPicoGreenなどが用いられている。ANCA関連血管炎やSLEなどでは血清中のNETs断片であるcell-free DNA量が上昇していることが報告されている (Zhang et al. 2014; Ma et al. 2016)。しかし、がんにおいては、免疫細胞によるがん細胞の破壊やアポトーシスに由来するcell-free DNAが血液中に漏れだすことや、妊娠や糖尿病、激しい運動または外傷による組織損傷の際にもcell-free DNA量が上昇することが報告されている (Kohler et al. 2011; Butt and Swaminathan 2008)。したがって、患者検体を測定する場合は、ネクローシスやアポトーシスなど他の細胞死由来のものが含まれている可能性に注意する必要がある。Cell-free DNAの測定は客観性や定量性に優れているが、特異性に乏しいと言える。

もう一つのNETs断片として、MPOやNEなどの好中球由来タンパクとDNAの複合体があり、cell-free DNAよりもNETsを特異的に検出することが可能である。MPO-DNA複合体やNE-DNA複合体はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で測定される。ANCA関連血管炎や2型糖尿病患者の血清ではMPO-DNA複合体濃度が上昇している (Nakazawa et al. 2012a; Soderberg et al. 2015; Miyoshi et al. 2016)。現段階ではELISAキットは市販されていないため自作する必要がある、標準化に関する問題は残っているが、特異的かつ客観的、定量的な優れた方法であると言える。

NETsを形成している好中球の検出にはフローサイトメトリーが用いられる。In vitroおよびin vivoで形成されたNETsを測定することが可能である。Zhaoらは multispectral imaging flow cytometryを用いてNETs形成好中球を検出した (Zhao et al. 2015)。NETsを形成している好中球に特徴的な核の膨化に着目し、核面積の増加と細胞の側方散乱強度の軽度減少、そして脱凝縮した核領域におけるMPOの共局在によりNETs形成好中球を同定した。顕微鏡画像とフローサイトメトリーを組み合わせたこの方法は、特異的かつ客観的、定量的な優れた方法であるが、multispectral imaging flow cytometryの普及には時間がかかると考えられる。また、通常のフローサイトメトリーを用いて、NETs形成好中球を検出する方法の開発も試みられている。GavilletらはMPOとシトルリン化ヒストンの共局在によりNETs形成好中球を同定した (Gavillet et al. 2015)。フローサイトメトリーは特異的かつ客観的、定量的な方法である。さらに、フローサイトメトリーにより測定するNETsは細胞レベルであるため、今まさにNETsを形成している好中球を測定していることになる。ELISAでは血清や上清中のNETs断片を測定しており、NETsがDNase Iなどの作用により断片化したものと考えられる。よって、ELISAに比べフローサイトメトリーではリアルタイムのNETs形成状態を反映すると考えられるため、信頼性の高いNETs評価法として期待できる。しかしながら、フローサイトメトリーにおけるNETs測定は現段階では報告数が少なく、定量的にNETsが検出されているのか、その他のNETs検出法との比較などについて十分な検討がなされておらず、今後の研究が必要である。

本研究では、簡便かつ定量的、客観的なNETs測定法の確立を目指し、細胞膜非透過性核酸染色剤 SYTOX Greenを用いたフローサイトメトリーによってNETsを測定した。また、血液や体腔液中に含まれるNETs形成好中球を検出できるか検討を行った。

表 1. Suicidal NETosis の主な測定法と特徴

マーカー/方法	特異性	客観性/ 定量性	長所	短所	評価対象
好中球由来タンパクと細胞外 DNA の共局在	注意が必要	低い	簡単	客観性、定量性に難	培養細胞 組織標本
Cell-free DNA	注意が必要	高い	キットが 入手可能	他の細胞死由来 DNA が検出されうる	血漿・血清 体腔液 培養上清
MPO/NE- DNA 複合体	高い	高い	左記の通り	キットが市販されて いない 標準化が必要	血漿・血清 体腔液 培養上清
画像を元にした フローサイトメ トリーによる検 出	高い	高い	左記の通り	普及してない	血液 培養細胞
フローサイトメ トリーによる細 胞に付着した NETs の検出	潜在的に 高い	高い	左記の通り	さらなる研究が必要	血液 培養細胞

Masuda らの論文より引用改変

2.2 方法

2.2.1 In vitro での NETs の誘導と検出

2.2.1.1 対象

インフォームドコンセントを得た健常人ボランティアから採血し、ヘパリン入り採血管に静脈血を採取した。本研究は北海道大学大学院保健科学研究院における研究倫理審査委員会の承認 (No.15-90) を受けて実施した。

2.2.1.2 好中球の分離と NETs 誘導

15 ml チューブに Polymorphprep (Axis-Shield, Dundee, Scotland) を 5 ml 入れた後、ヘパリン加血を 5 ml 重層した。室温にて 500×g で 30 分遠心後、上層部分 (末梢血単核球) を取り除き、好中球層である下層部分を採取した。PBS で 2 回洗浄後、5 % fetal bovine serum (FBS) 添加 RPMI 1640 を用いて 1×10^6 /ml に調整した。37 °C で 30 分プレインキュベーションした後、NETs 誘導試薬である PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を 0~100 nM の濃度になるように加え、0~4 時間インキュベートした。

2.2.1.3 細胞外 DNA の染色とフローサイトメトリー測定

PMA 処理にて NETosis を誘導した好中球 (1×10^6 個) に細胞膜非透過性核酸染色剤である SYTOX Green (Life Technologies, Carlsbad, CA) を 1000 倍希釈となるように加えた。SYTOX Green は細胞膜非透過性であるため、生細胞は染色されず、死細胞のみを染める。NETs 形成時に細胞膜構造は破綻し DNA は細胞外に放出されるため、NETs 形成好中球の DNA は染色されると考えられる。また、SYTOX Green は水性溶媒で非蛍光性であり、double-stranded DNA と結合すると蛍光シグナルが 100 倍以上に増強するため、洗浄操作が不要という特徴がある。そのため、4 °C で 20 分反応させた後、洗浄せず直ちに Attune flow cytometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて測定を行った。

2.2.1.4 NETs の免疫蛍光染色と画像解析

好中球は5 % FBS添加RPMI 1640を用い 1×10^5 /mlに調整し、4 well-chamber slide に播種した。37 °Cで30分間プレインキュベーションした後、100 nMのPMAを加え37 °Cで4時間培養した。PBSで洗浄後、4 % paraformaldehyde (PFA) を用いて室温で15分間固定した。PBSで洗浄後、抗体の非特異反応を防ぐために、3 % BSA添加PBSを加え、室温で30分間反応させた。5 μ g/mlの抗ヒトMPO抗体 (Bio-Rad, Hercules, CA) またはアイソタイプコントロールとしてマウスIgG2b (BioLegend, San Diego, CA) を加え、室温で60分間反応させた。PBSで洗浄後、5 μ g/mlのAlexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウスIgG (H+L) 抗体を加え、室温で60分間反応させた。PBSで洗浄後、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 入り封入剤で封入し、蛍光顕微鏡下に観察を行った。

画像解析用のサンプルは、0~100 nM のPMA でNETs を誘導し、4 % PFA で固定後、DAPI 入り封入剤により封入した。蛍光顕微鏡を用い、対物 40 倍レンズでランダムに5枚撮影した。蛍光画像は Image J software を用い、DAPI 陽性面積を求め、細胞数で補正を行った。

2.2.1.5 細胞外 DNA と NETs 関連タンパクとの共局在

PMA 処理した好中球を PBS で洗浄後、3 % BSA 添加 PBS で室温 30 分反応させた。一次抗体として 5 μ g/ml の抗ヒト MPO 抗体または抗 citrullinated histone H3 抗体 (Cit H3; abcam, Cambridg, UK)、アイソタイプコントロールとしてマウス IgG2b またはウサギ IgG (abcam) を加え、室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として 4 μ g/ml の PE 標識抗マウス IgG 抗体 (BioLegend) または Alexa Fluor 647 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies) を加え、室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、SYTOX Green を加え 4 °C で 20 分間反応後、フローサイトメトリーで測定した。

2.2.1.6 NADPH オキシダーゼ阻害による影響

好中球は5 % FBS 添加 RPMI 1640 を用い 1×10^6 /ml に調整し、ROS 産生に関わる NADPH オキシダーゼの阻害剤 DPI (Sigma-Aldrich) を 0 または 10 μ M 加えた。37 °C で 30 分反応後、0 または 100 nM の PMA を加え 37 °C で 4 時間反応させた。SYTOX Green を加え、4 °C で 20 分間反応後、フローサイトメトリーで測定した。

2.2.1.7 アポトーシスとの比較

アポトーシスは etoposide (Bio Vision, Milpitas, CA) を用いて誘導した。好中球は 5 % FBS 添加 RPMI 1640 を用いて 1×10^6 /ml に調整し、37 °C で 30 分間プレインキュベーションした。100 nM の PMA または 100 μ M の etoposide を加え、37 °C で 1~4 時間反応させた。PBS で洗浄後、Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes, Eugene, OR) の添付文書に従い、Alexa Fluor 488 標識 annexin V 及び propidium iodide (PI) と反応させた。もしくは SYTOX Green を加え、4 °C で 20 分反応させた。それぞれの細胞をフローサイトメトリーで測定した。

2.2.1.8 統計解析

2 群間の平均値の比較には、Student's *t* 検定を用いた。P 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。

2.2.2 In vivo での NETs の誘導と検出

2.2.2.1 対象

6-8 週齢のメスの Wistar ラットを用いた。なお、本研究の動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認 (承認番号 15-0034) のもと、「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した。

2.2.2.2 細菌による NETs 誘導とラット血液中の NETs 測定

細菌の静注により in vivo で形成された NETs を SYTOX Green を用いたフローサイトメーターで測定するために、まず初めに、細菌によりラットの好中球に NETs が誘導されることを in vitro で確認した。NETs の誘導には、NETs を誘導することが報告されている *S. aureus* と *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) を用いた (Vorobjeva and Pinegin 2014; Young et al. 2011)。麻酔下のもと、大動脈から採血を行い、ヘパリンによる抗凝固処理を行った。ラット血液 500 μ l に対し、*S. aureus* と *P. aeruginosa* を 5×10^6 個加え、37 °C で 1 時間反応させた。Polymorphprep を用いて好中球を分離し、SYTOX Green を加え 4 °C で 20 分間反応させた。4 % PFA で固定後、フローサイトメトリーで測定した。

1×10^9 /ml に調整した *S. aureus* をラットの尾静脈に注射し、1、4、24、48 時間後

に、麻酔下のもと大動脈からの全採血により失血死させた。Polymorphprepにより好中球を分離し、PBSで $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整後、SYTOX Greenを加え、4 °Cで20分間反応させた。4% PFAで固定後、フローサイトメトリーで測定した。

2.2.2.3 腹膜炎ラットの腹腔洗浄液中のNETs測定

ラットの腹腔内に3%チオグリコレートを5 ml注射し、腹膜炎を誘導した。72時間後、PBSまたはEDTA-PBSで腹腔内を洗浄し、好中球を含む炎症細胞を回収した。PBSで $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整後、SYTOX Greenを加え、4 °Cで20分間反応させた後、フローサイトメトリーで測定した。

2.3 結果

2.3.1 フローサイトメトリーによる NETs 検出

100 nMのPMAで4時間処理した好中球に対し、細胞膜非透過性核酸染色剤 SYTOX Greenを添加し、フローサイトメトリーで解析した。約5000個の細胞を測定し、代表的なデータをFigure 2に示した。好中球分離時に完全には取り除けなかった赤血球や末梢血単核球を解析から除外するために、forward scatter (FSC) / side scatter (SSC) dot plotを用いて好中球にR1ゲートをかかけた。未処理の好中球と比較して、PMA処理した好中球では、FSC/SSCともに上昇していることから、細胞の大きさや構造の複雑さが増していることが推測できる (Figure 2A、左、中)。PMA処理によって好中球にNETosisが誘導されることにより、多様な形態学的変化が生じていると考えられる。

R1内の細胞におけるSYTOX Greenのヒストグラムでは、未処理の好中球の蛍光輝度と比較しPMA処理した好中球の蛍光輝度は右にシフトしており、SYTOX Greenに染まっていた (Figure 2A、右)。SYTOX Green陽性細胞の割合 ($[\text{R2内の細胞数}/\text{R1内の細胞数}] \times 100$) は、未処理の好中球と比較しPMA処理した好中球で有意に高かった (Figure 2B)。SYTOX Green陽性細胞の割合は、PMAの処理時間及び濃度に依存して増加した (Figure 2C, D)。

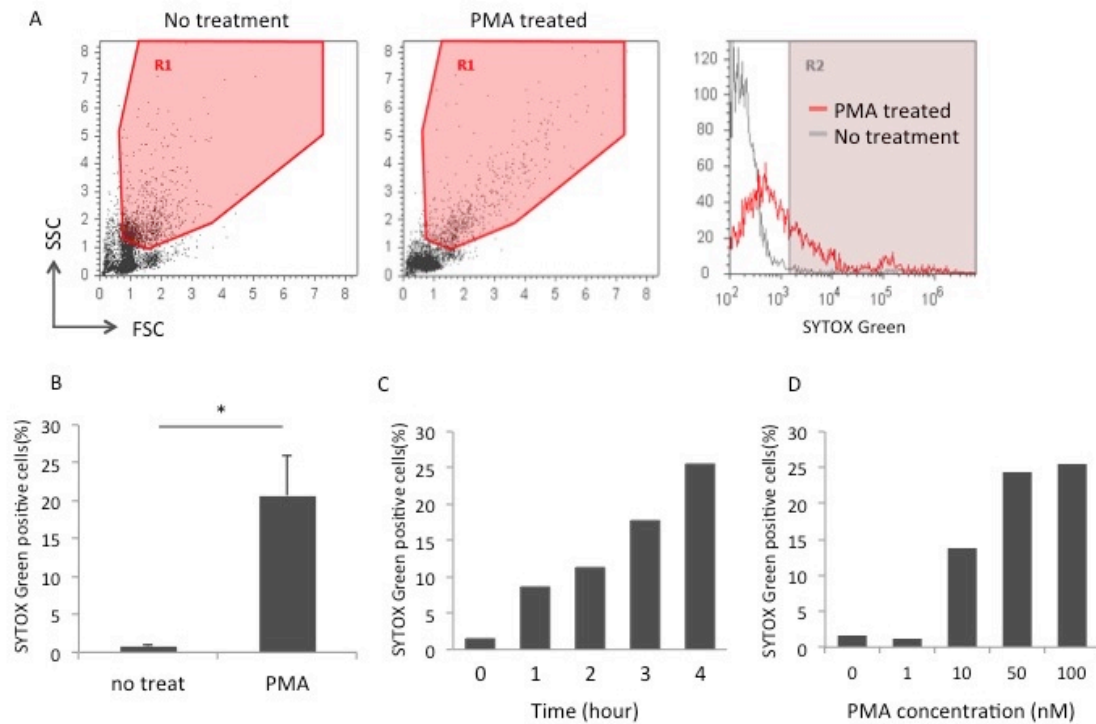


Figure 2. フローサイトメトリーによるNETsの検出

(A) 左：未処理好中球の FSC/SSC dot plot、中：PMA 処理した好中球の FSC/SSC dot plot、右：R1 内の好中球における SYTOX Green のヒストグラム。計 4 名の健常人の血液で同様の実験を行い、代表的なデータを示した。(B) PMA 未処理群と処理群における SYTOX Green 陽性細胞の割合。 $*p < 0.05$, $n = 4$ 。(C) 100 nM の PMA を 0～4 時間反応させた好中球における SYTOX Green 陽性細胞の割合。同様の実験を計 4 回を行い、代表的なデータを示した。(D) 0～100 nM の PMA を 4 時間反応させた好中球における SYTOX Green 陽性細胞の割合。同様の実験を 2 回を行い、代表的なデータを示した。

2.3.2 細胞外 DNA と NETs 関連タンパクの局在

NETs は好中球から放出された DNA が MPO などの抗菌タンパクにより装飾された構造をしている。SYTOX Green 陽性細胞が NETs を形成した好中球であるか確認するために、PMA 処理した好中球における DNA と MPO の共局在を確認した。免疫蛍光染色では、PMA 処理した好中球から放出された DNA (青) と MPO (緑) が共局在する NETs が確認できた (Figure 3A)。フローサイトメトリーでは、SYTOX Green 陽性細胞のうちの 76.1 %が MPO 陽性であった (Figure 3B)。一方で、NETs に特徴的な分子であるシトルリン化ヒストンは SYTOX Green 陽性細胞の約 13 %が陽性であった (Figure 3C)。

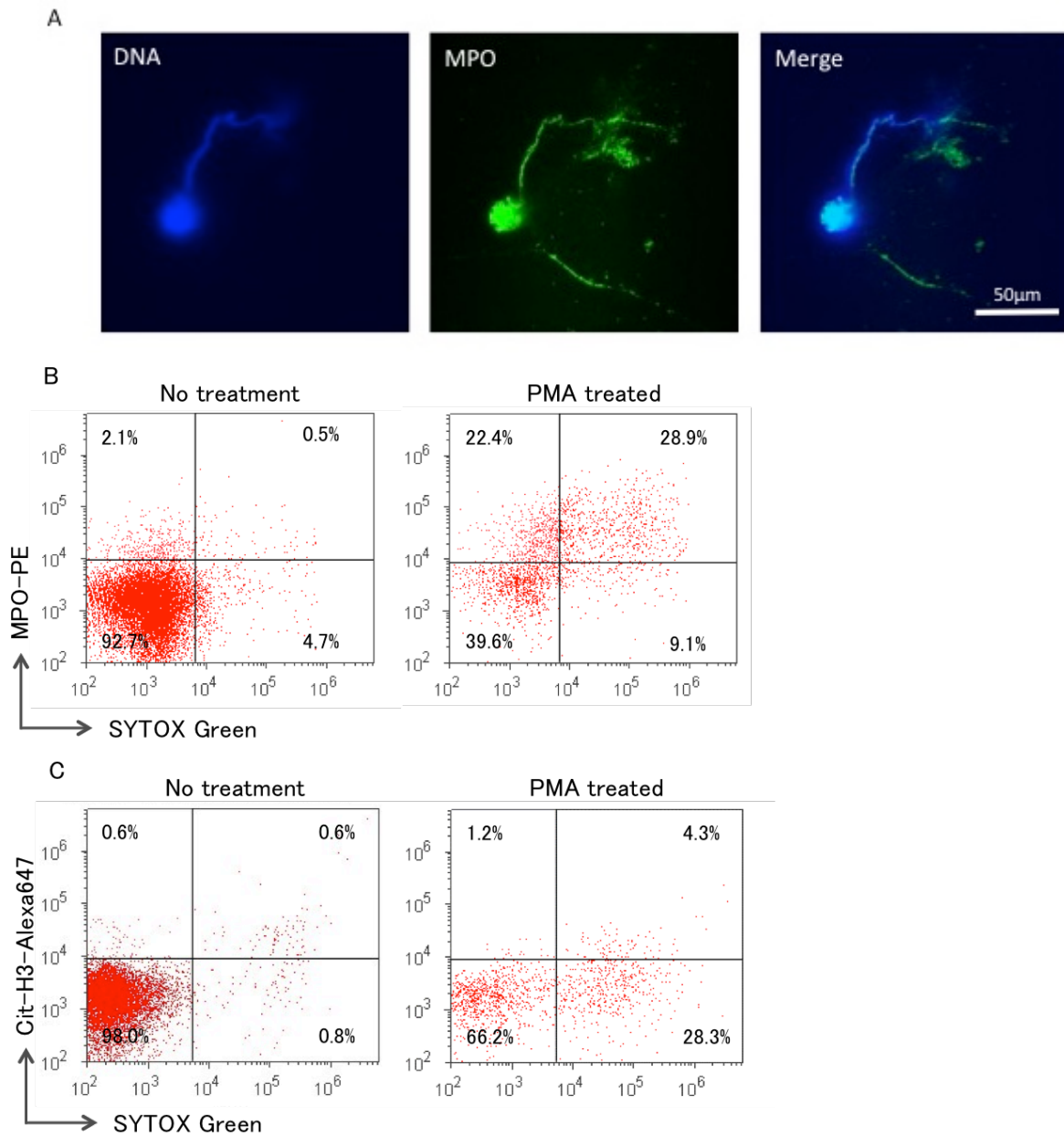


Figure 3. 細胞外 DNA と NETs 関連タンパクの局在

(A) PMA 処理 (100 nM、4 時間) した好中球の細胞外 DNA (青) と MPO (緑) の局在。同様の実験を 2 回行い、代表的な結果を示した。(B) フローサイトメトリーにおける SYTOX Green と MPO の染色。左: 未処理の好中球、右: PMA 処理 (100 nM、4 時間) した好中球。同様の実験を 3 回行い、代表的な結果を示した。(C) SYTOX Green とシトルリン化ヒストンの染色。左: 未処理の好中球、右: PMA 処理 (100 nM、4 時間) した好中球。同様の実験を 2 回行い、代表的な結果を示した。

2.3.3 NADPH オキシダーゼ阻害剤の影響

NADPH オキシダーゼは膜結合酵素複合体であり、ROS 産生に重要な役割を担っている。PMA で誘導される NETosis は ROS 依存的経路で産生される (Fuchs et al. 2007; Kaplan and Radic 2012)。また、NADPH オキシダーゼの阻害剤である DPI は NETs 産生を阻害する (Fuchs et al. 2007)。DPI による前処理を行った好中球では、DPI 処理を行っていない好中球と比較して SYTOX Green 陽性細胞は有意に減少していた (Figure 4)。

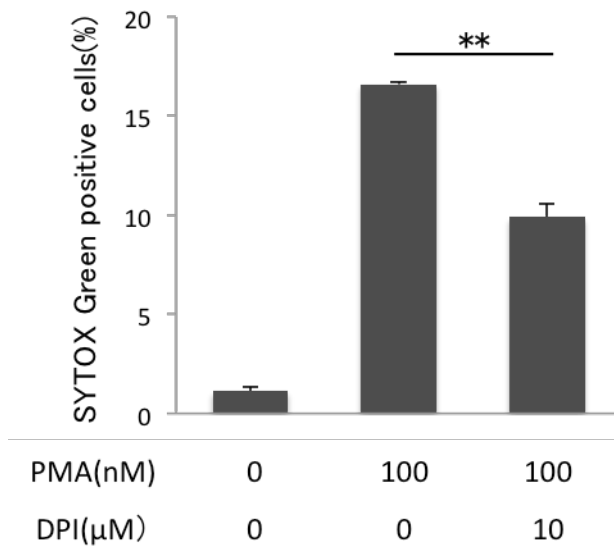


Figure 4. DPI による NETosis 抑制

NADPH オキシダーゼ阻害剤 DPI 10 μM を反応後、100 nM の PMA 処理を行った好中球における SYTOX Green 陽性細胞の割合。** $p < 0.01$ 、 $n = 3$ 。

2.3.4 NETosis とアポトーシスの鑑別

NETosisはアポトーシスやネクロシスなどの他の細胞死と異なると考えられている。Etoposideにより誘導したアポトーシス細胞でSYTOX Greenが陽性となるかを検討し、NETosisとアポトーシスが鑑別可能か調べた。

まず初めに、PMA処理した好中球とetoposide処理した好中球の特性の違いをannexin VとPIにより検討した。正常の細胞膜は脂質二重層で細胞膜の内側にphosphatidylserine (PS) が存在する。アポトーシスが誘導されるとPSは細胞の外側に表出し、PSに対して強い親和性をもつannexin VがCa²⁺依存的にPSに結合する。PIは細胞膜非透過性の核酸染色剤であり、アポトーシス初期細胞においては、PSの表出化が見られるものの細胞膜構造が保たれているため、PIは細胞内に侵入できずDNAに結合できない。一方、アポトーシス後期細胞やネクロシス細胞では、細胞膜構造が破綻しており、annexin VとPIともに、それぞれPSとDNAに結合する。このように、annexin VとPIを用いることで、アポトーシス初期細胞を判別出来る。

PMA処理した好中球では、annexin V陽性細胞とPI陽性細胞が経時的に増加していた (Figure 5A、上段)。一方、etoposide処理した好中球では、4時間の刺激においてannexin V陽性細胞のみが増加しており、PI陽性細胞はほとんど認められなかった (Figure 5A、下段)。これらの結果から、etoposide処理した好中球に早期アポトーシスが誘導されていることがわかった。

次に、NETs 形成好中球と早期アポトーシス細胞にそれぞれ SYTOX Green を加え、フローサイトメトリーで測定を行った (Figure 5B)。NETs 形成好中球の場合、時間依存的に SYTOX Green 陽性細胞の割合は増加していた。しかし、etoposide 処理した好中球では、SYTOX Green 陽性細胞はほとんど認められなかった。これらの結果から、SYTOX Green を用いたフローサイトメトリー測定において、NETs 形成好中球と早期アポトーシス細胞は鑑別できることがわかった。

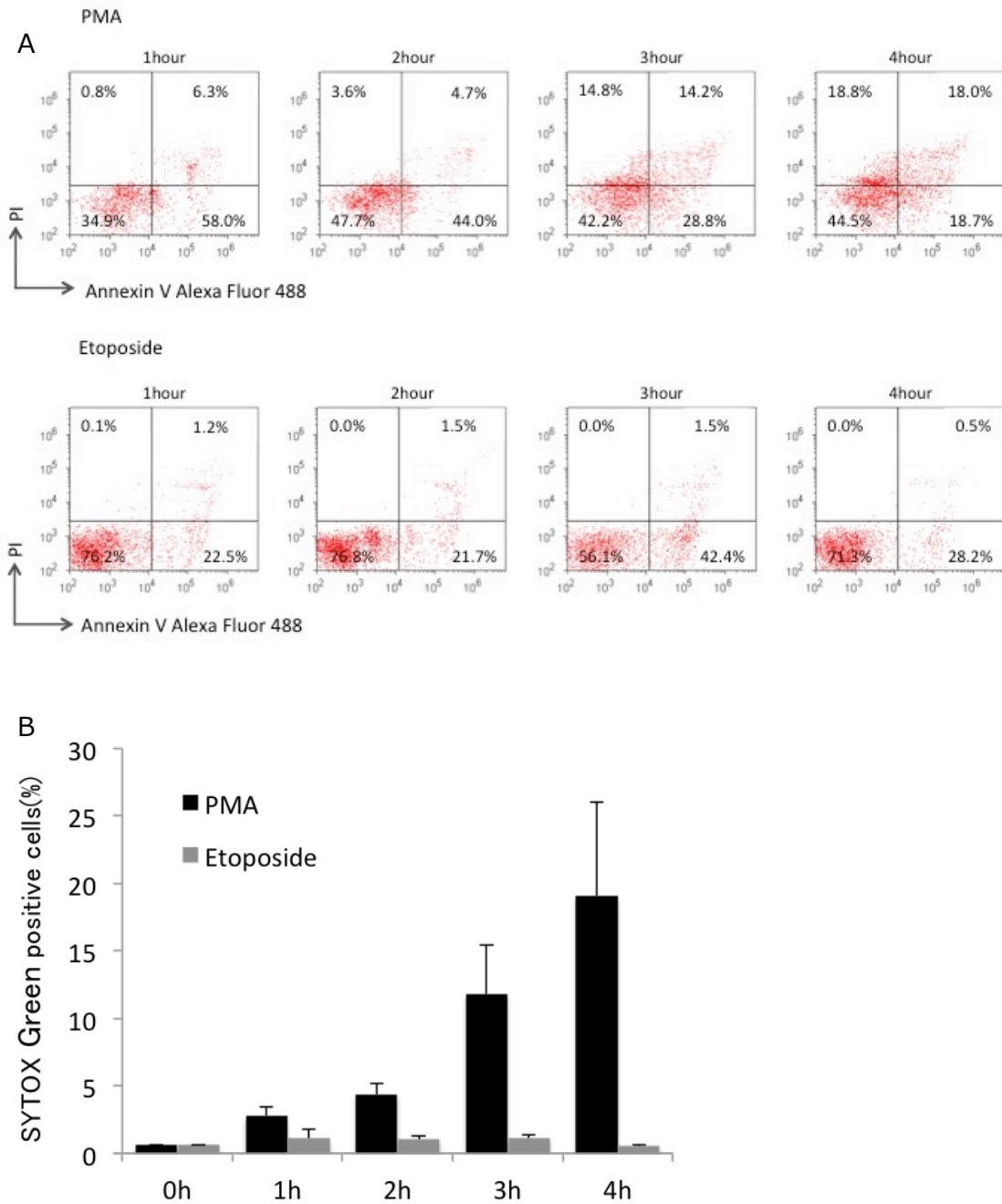


Figure 5. アポトーシス細胞との鑑別

(A) NETs 形成好中球と早期アポトーシス細胞の annexin V/PI に対する反応性の違い。上段：PMA で1～4時間処理した好中球。下段：Etoposide で1～4時間処理した好中球。同様の実験を3回行い、代表的なデータを示した。(B) PMA または etoposide と0～4時間反応させた好中球の SYTOX Green 陽性細胞の割合。n=3。

2.3.5 画像解析との比較

免疫蛍光染色は最も頻用されている方法の一つであり、NETs を定量化するために画像解析が行われている。SYTOX Green を用いた NETs 形成好中球のフローサイトメトリーによる検出と画像解析による定量化の二つの方法を比較し、同等性を検討した。SYTOX Green 陽性細胞の割合は画像解析によって得られた NETs 面積と正の相関を示していた (Figure 6、 $R^2=0.7314$)。このことから、SYTOX Green を用いた NETs のフローサイトメトリーによる測定は画像解析と同等の定量性を有すると言える。

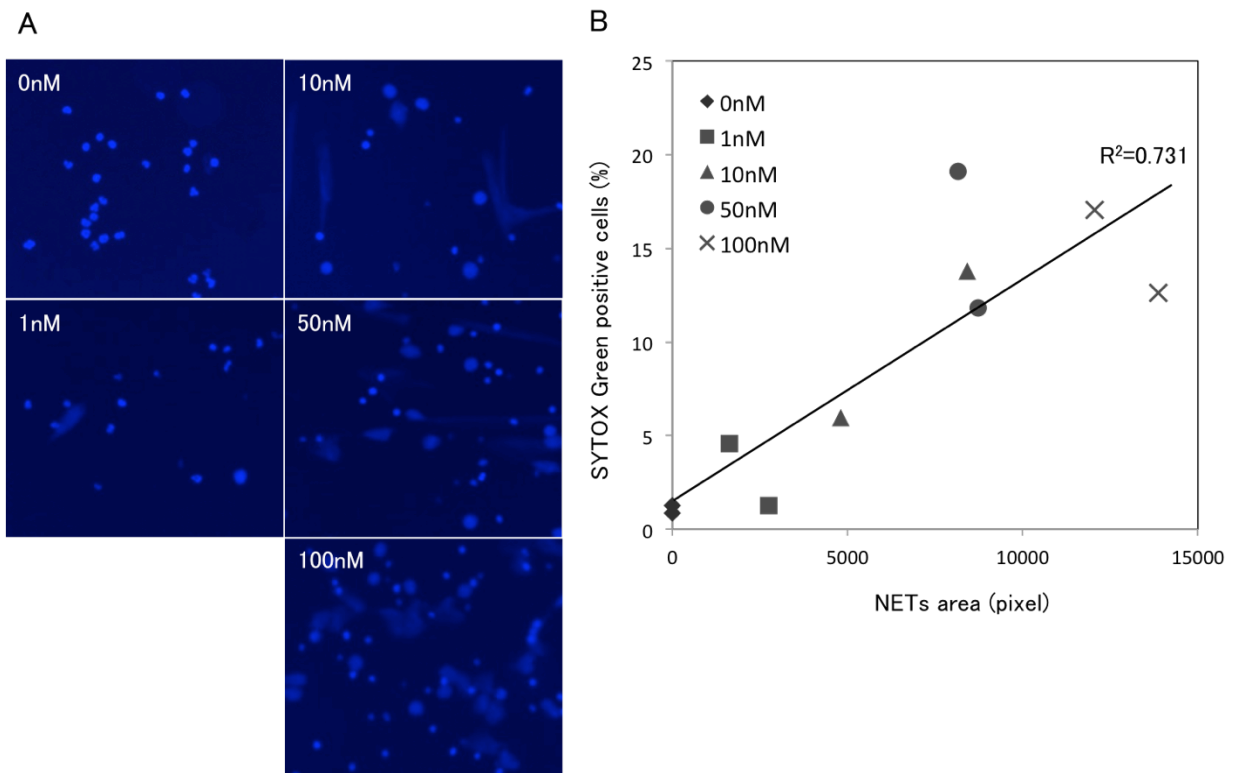


Figure 6. 画像解析との比較

(A) 0~100 nM の PMA で処理した好中球の DAPI 染色画像。(B) フローサイトメトリーと画像解析の比較。横軸：0~100 nM の PMA で処理した好中球を DAPI 染色し、強拡大（対物 40 倍）で 5 枚ランダムに撮影した。Image J を用いて NETs 面積を算出し、細胞数で補正した。縦軸：0~100 nM の PMA で処理した好中球における SYTOX Green 陽性細胞の割合。

2.3.6 In vitro での細菌による NETs 誘導

In vivo で形成された NETs をフローサイトメトリーで測定できるかどうかを検討するために、ラットに細菌を静注し血液中で NETosis を誘導する実験を計画した。その予備検討として、細菌によりラット好中球に NETosis が誘導されることを in vitro で確認した。NETosis の誘導には *S. aureus* と *P. aeruginosa* を用いた。ラット全血に *S. aureus* または *P. aeruginosa* を加えて、1 時間反応させた。好中球を分離後、SYTOX Green を加え、フローサイトメトリーで測定した。未刺激の好中球に比べ、*S. aureus* または *P. aeruginosa* を加えることで、SYTOX Green 陽性細胞の割合は有意に上昇していた (Figure 7)。

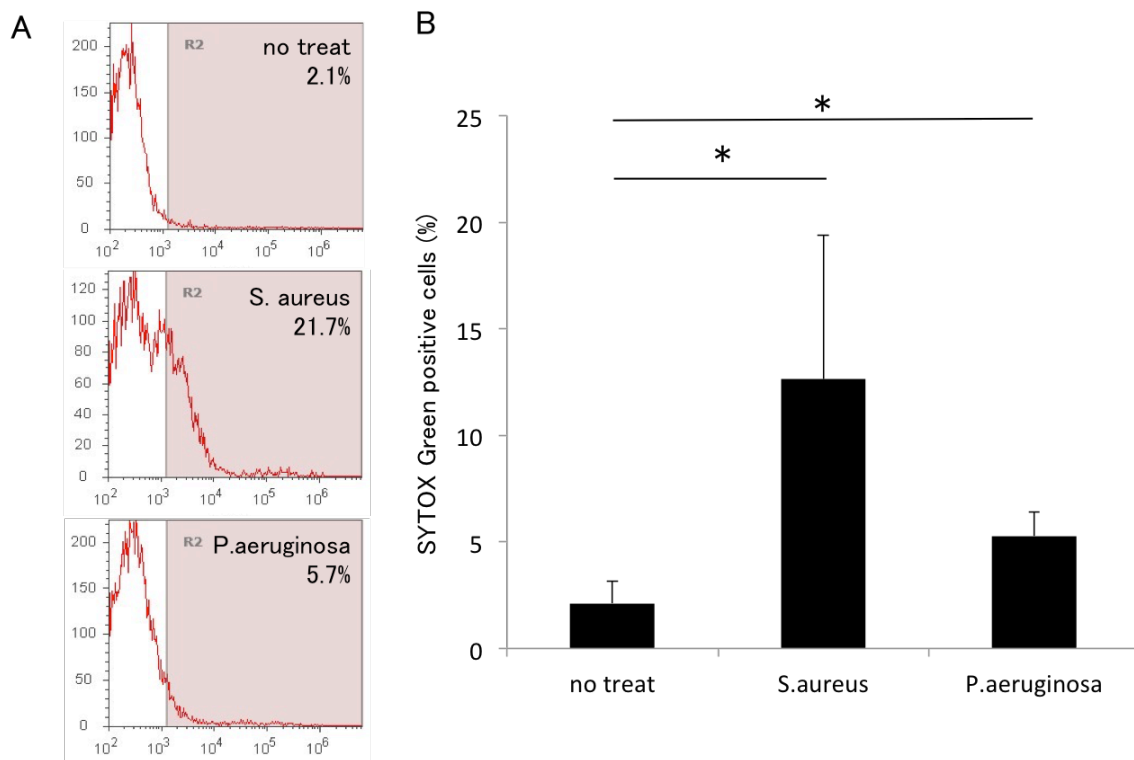


Figure 7. In vitroでの細菌によるNETosis誘導

(A) 全血に *S. aureus* または *P. aeruginosa* を加え NETs を誘導した。(B) ラット血液中の SYTOX Green 陽性細胞の割合。* $p < 0.05$, $n = 4$ 。

2.3.7 In vivoでの細菌によるNETs誘導と検出

NETs 誘導率が高かった *S. aureus* をラットの尾静脈から注射し、in vivo で NETosis を誘導した。0、1、4、24、48 時間後、採血と解剖を行いフローサイトメトリーによる SYTOX Green 陽性細胞の検出と組織学的検討を行った。対照として、未処置のラットを用いた。*S. aureus* を静注しても、SYTOX Green 陽性細胞の割合はごくわずかにしか上昇しなかった (Figure 8A)。脾臓に多数の多核巨細胞が浸潤していたことから、細菌が脾臓にトラップされ、貪食されたと推測される (Figure 8B)。脾臓以外の臓器に明らかな異常は認められなかった。

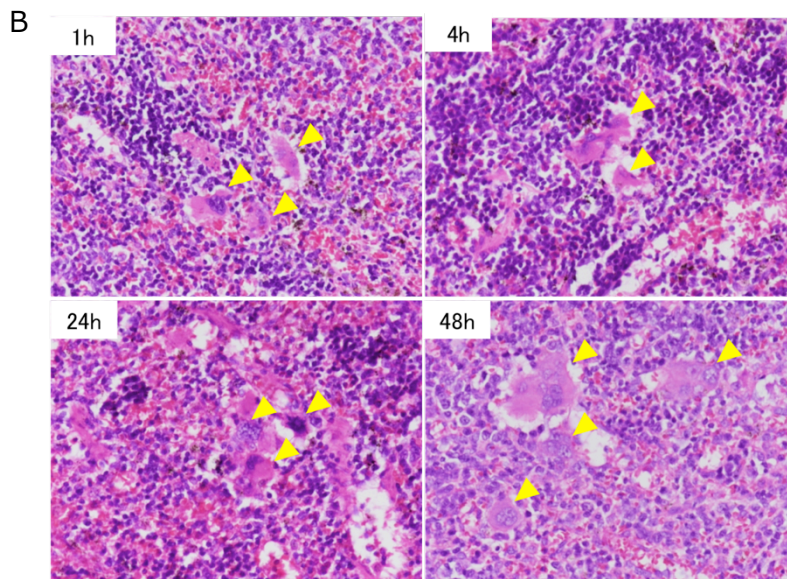
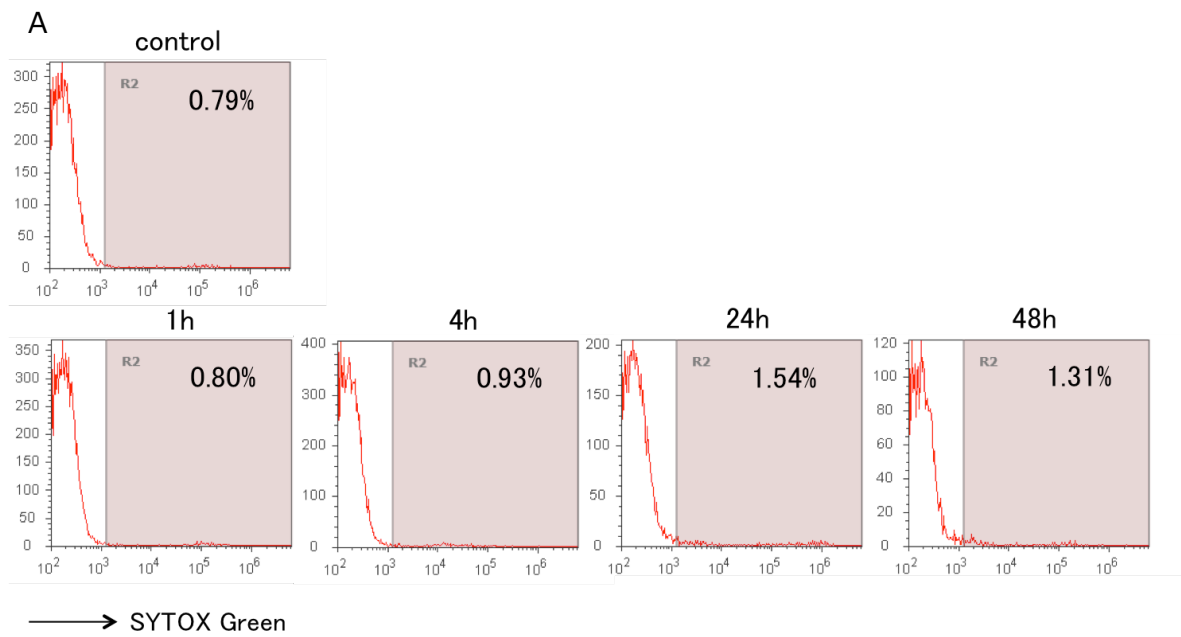


Figure 8. In vivo で *S. aureus* により誘導された NETs の検出

(A) *S. aureus* を尾静脈から注射後、採取した血液中の SYTOX Green 陽性細胞の割合。(B) *S. aureus* 静注後の脾臓の HE 染色。矢頭は多核巨細胞。

2.3.8 腹膜炎ラットの腹腔洗浄液中の NETs 測定

3 %チオグリコレートの腹腔内注射によって腹膜炎を誘導し、浸潤細胞中に NETs が検出できるかを検討した。3 %チオグリコレートを腹腔内に注射し、72 時間後に腹腔内の浸潤細胞を回収した。腹腔洗浄液の回収及び収集した細胞の懸濁には EDTA-PBS または PBS を用いた。EDTA は、腹膜炎によって好中球とともに浸潤したマクロファージ由来の DNase I による NETs の分解を防ぐことを目的に使用した。EDTA-PBS を用いることで、腹腔洗浄液中に SYTOX Green 陽性細胞を検出することが出来た (Figure 9)。

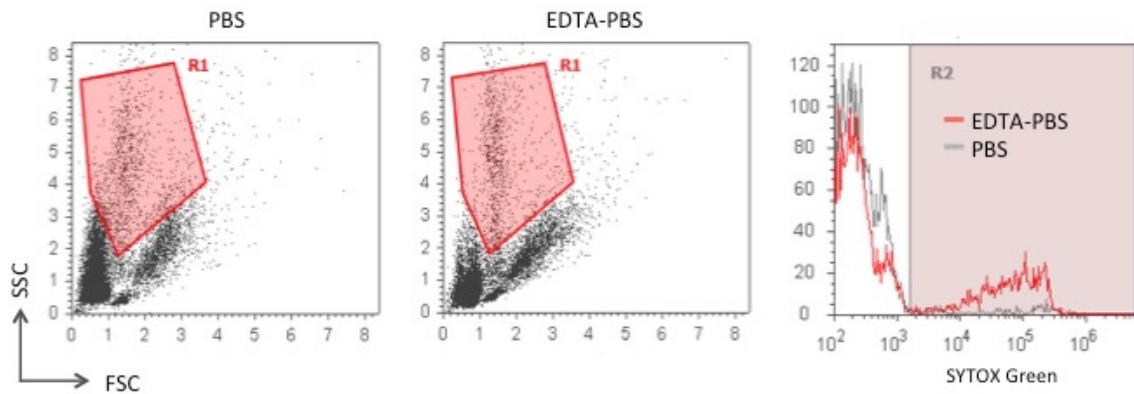


Figure 9. 腹膜炎誘導ラットからの NETs 検出

3% チオグリコレートの腹腔内投与から 72 時間後に、PBS または EDTA-PBS で回収した腹腔洗浄液中の SYTOX Green 陽性細胞。左：PBS 使用時の腹腔洗浄液の FSC/SSC dot plot、中：EDTA-PBS 使用時の腹腔洗浄液の FSC/SSC dot plot、右：腹腔洗浄液中の SYTOX Green 陽性細胞。同様の実験を 2 回行い、代表的な結果を示した。

2.4 考察

本研究では、細胞膜非透過性核酸染色剤SYTOX Greenを用いたフローサイトメトリーにより、*in vitro*及び*in vivo*で形成されたNETsを測定できることを示した。本検出法は客観的かつ定量的、簡便なNETs測定法であり、様々な研究に応用することが可能である。

PMA処理した好中球中にSYTOX Green陽性細胞が検出され、その割合はPMAの反応時間や濃度に依存して増加していた。また、SYTOX Green陽性細胞の多くはMPO陽性であることから、SYTOX Green陽性細胞はNETsを形成した好中球であると言える。しかし、SYTOX Green陽性/MPO陰性細胞も少なからず存在しており、好酸球由来の細胞外トラップである可能性がある。一方、SYTOX Green陰性/MPO陽性細胞は約20%存在しており、これは活性化好中球であると考えられる。NETsに特徴的な分子であるシトルリン化ヒストンの陽性率は低かった。その理由としては、ヒストンはシトルリン化によりDNAとの結合性が弱まり、DNAからシトルリン化ヒストンが外れてしまった可能性がある。しかし、Gavilletらはフローサイトメトリーにおいて、NETsをMPOとシトルリン化ヒストンによって同定していた (Gavillet et al. 2015)。Gavilletらとの違いについては明らかではないが、GavilletらはNETosis誘導後に2% PFAで固定していたのに対し、本研究では未固定だったため、固定の有無がシトルリン化ヒストンの染色結果に影響を与えた可能性がある。また、本研究の予備検討において、PFAで固定後にSYTOX Greenと反応させた場合、未刺激の好中球においてもSYTOX Green陽性所見が得られた。PFAの作用により、細胞膜に変化が生じることが報告されており (Fox et al. 1985)、SYTOX Greenが細胞内に浸透した可能性が考えられる。本検出法において、固定操作が必要な場合、SYTOX Greenと反応後に固定操作をすることが推奨される。

NADPHオキシダーゼ阻害剤であるDPIはROS産生の阻害を介して、部分的ではあるがSYTOX Green陽性細胞数を有意に減少させた。これは、SYTOX Green陽性細胞の全てがNETsを形成した好中球なのではなく、一部にNETosis以外の原因で細胞膜が破綻した細胞が含まれている可能性を示唆している。ネクロシスなどの何らかの原因で細胞膜に障害を受けた場合にはSYTOX Green陽性になる可能性があるからである。他の細胞死との鑑別を目的に、アポトーシスに陥った細胞がSYTOX Green陽性になるかどうかを検討したところ、早期アポトーシス細胞はSYTOX Green陰性であった。後期アポトーシスとネクロトーシスに関しては、今後さらなる検討が必要である。しかし、Desaiらは、NETosisはプログラムされたネクロシスであるネクロトーシスの一種であると述べている (Desai et al. 2016)。形態学的には、両者とも

に細胞膜の破綻と細胞内容物の漏出が認められるが、シグナル伝達経路が異なるため、両者を鑑別することが可能であるかもしれない。しかし、フローサイトメトリーにおいては、現段階ではネクローシスとの鑑別は困難であると考えられる。

In vitroにおいて、*S. aureus*や*P. aeruginosa*はNETosisを誘導したが、*S. aureus*をラット静注した場合、血液中のSYTOX Green陽性細胞の割合の上昇はごくわずかであった。脾臓において多核巨細胞が多数浸潤していたことから、*S. aureus*に対する免疫応答が働いていたことが推察できる。敗血症患者の血液中のcell-free DNAやMPO-DNA複合体は上昇していることが報告されている (Dwivedi et al. 2012; Maruchi et al. 2018)。ラット血液中にNETs形成好中球がごくわずかにしか見られなかった理由として、血漿中のDNase Iにより分解された可能性が考えられる。細胞外DNAが好中球に付着した状態では血液中に長くは存在できず、NETsは可溶性になった状態で血液中に存在しているのかもしれない。敗血症患者の血液中からごくわずかではあるがNETs形成好中球が検出されたことが報告されている (Gavillet et al. 2015)。本研究においては、検討したラット数が少なく、SYTOX Green陽性細胞の割合がわずかに上昇していたが有意とは言えないので、今後のさらなる検討が必要である。

3%チオグリコレートにより腹膜炎を誘導したラットの腹腔洗浄液からは、SYTOX Green陽性細胞が検出された。腹腔洗浄液の回収時にPBSを用いるとSYTOX Green陽性細胞数が減少することから、マクロファージ由来のDNase Iなどによって、NETs形成後に速やかに分解されていることが示唆される。

本研究では、細胞膜非透過性核酸染色剤であるSYTOX Greenを用いたフローサイトメトリーにおいて、in vitroまたはin vivoで形成されたNETsを測定することができた。本検出法はフローサイトメトリーを用いており、客観的かつ定量的に数千~数万個の細胞を評価することが可能である。また、NETs形成好中球を含む細胞浮遊液にSYTOX Greenを添加しそのままフローサイトメーターで測定できるため、非常に簡単に短時間の操作で測定することができる。一度に多数の検体を測定することができるため、in vitroのNETs評価だけではなく、臨床検体を用いたNETs量のスクリーニングなどにも応用可能であると考えられる。血液や体腔液、細胞培養液などの液状検体に対するNETs測定はこれまでcell-free DNAの測定やELISAによるMPO-DNA複合体などの可溶性NETs断片が主に測定されてきた。これらはDNase Iなどの作用による分解産物であり、NETs形成からしばらく時間が経過したものであると考えられる。今回フローサイトメトリーにおいて測定しているのは、好中球の形態を保った状態の細胞であり、今まさにNETsを形成している好中球であると考えられる。Cell-free DNAやMPO-DNA複合体などの測定に代わり、新たな視点の測定法として、今後普及していく可能性がある。

本研究の限界として、以下の項目が挙げられる。一つ目はネクローシスなどの細胞膜の破綻を伴う細胞死を除外できず測定してしまう点である。早期アポトーシス細胞はSYTOX Green陰性だったことから鑑別可能であった。しかし、ネクローシスはNETosisと同様に細胞膜の破綻を伴うのでSYTOX Green陽性になると考えられる。上述したように、NETosisはネクローシスの一種であると報告されていることから（Desai et al. 2016）、ネクローシスと鑑別することは難しいと考えられる。よって、血液や体腔液などの検体を用いてin vivoで形成されたNETsを測定する時は、他の細胞死由来の細胞も含まれている可能性を考慮する必要がある。二つ目は血液中のNETs形成好中球の測定は難しい可能性がある。細菌静注後のラット血液から、NETs形成好中球はごくわずかにしか認められなかった。NETs形成後は、血漿中のDNase Iの作用により速やかに可溶性のNETs断片となっていることが推察される。しかし、SLEやANCA関連血管炎などでは血清中DNase I活性の低下やNETs分解能の低下が示されており、NETs形成好中球が存在する可能性も考えられたため、今後検討する必要がある。

本研究では、SYTOX Greenを用いたフローサイトメトリーにおいて、in vitroまたはin vivoで形成されたNETsを簡便かつ客観的、定量的に測定する方法を確立することができた。NETs形成好中球を測定できる本検出法は、NETs関連疾患の病因病態の解明や薬剤によるNETs抑制効果の検討など様々なNETs研究への応用が期待される。

2.5 結論

本研究の結論を以下に示す。

・ **SYTOX Green** を用いたフローサイトメトリーにおいて、*in vitro* または *in vivo* で形成される NETs を簡便かつ客観的・定量的に測定する方法を確立した。

この方法は NETs を形成している好中球を測定するため、**ELISA** などによって測定される NETs 断片に比較して、リアルタイムの NETs 形成状況を把握することができる。また、**SYTOX Green** と好中球を反応させてフローサイトメトリーで測定するだけなので、非常に短時間かつ簡単に測定することが可能である。よって、一度に多数の検体を測定することが可能であり、NETs が関与する疾患のスクリーニングに用いたり、NETs 形成を抑制する薬剤の効果判定など様々な NETs 研究に応用できると考えられる。しかしながら、現行法ではネクロシス細胞も検出されうるため、今後は NETs 形成好中球とネクロシス細胞を鑑別するための方法やマーカーを探索する必要がある。

3. 第二章

蛍光免疫染色を用いた好中球細胞外トラップの 検出と応用

3.1 背景

抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA) は 1982 年に Davies らによって発見された自己抗体である (Davies et al. 1982)。ANCA の主な対応抗原はミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase: MPO) とプロテイナーゼ 3 (proteinase 3: PR3) であり、それぞれに対する抗体は MPO-ANCA、PR3-ANCA と呼ばれる。ANCA 関連血管炎は血管炎の分類として用いられている Chapel Hill Consensus Conference 分類 (CHCC2012) において、小型血管炎に分類される。血清中の ANCA の存在を特徴とし、病理学的には、炎症による毛細血管や細動静脈の血管壁破壊に伴うフィブリノイド壊死を認め、壊死性血管炎を呈する。ANCA 関連血管炎は顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis: MPA)、多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis: GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: EGPA) に分類される。また、バセドウ病の治療薬として使用される抗甲状腺薬プロピルチオウラシル (propylthiouracil: PTU) や降圧剤のヒドララジンなどの薬剤服用後に発症する薬剤関連 ANCA 関連血管炎もある。

本邦の ANCA 関連血管炎の患者数は MPA が半数以上を占め、次いで GPA、EGPA の順に多い。MPA、GPA、EGPA いずれの疾患においても、全身の中小型血管における壊死性血管炎が特徴であるが、疾患によって多少の違いが認められる。MPA では、90% 以上が MPO-ANCA 陽性を示し、腎臓や肺に好発する。腎糸球体には半月体形成性壊死性糸球体腎炎がみられ、肺では肺出血や間質性肺炎が認められる。GPA は MPO-ANCA 陽性例と PR3-ANCA 陽性例があり、上気道や肺における壊死性肉芽腫の形成が特徴である。腎臓には半月体形成性壊死性糸球体腎炎を認める。EGPA は 50% が MPO-ANCA 陽性を示し、気管支喘息が先行し、好酸球浸潤を伴う壊死性血管炎と血管外肉芽腫が特徴である。

MPO 欠損マウスに MPO を免疫し、産生された MPO-ANCA または脾細胞を免疫不全マウスや野生型マウスに移入すると血管炎や半月体形成性壊死性糸球体腎炎が誘導されることから、ANCA 自体に病原性があると考えられている (Xiao et al. 2002)。ANCA により血管炎が誘導される機序は、以下のように考えられてきた。感染などの刺激により産生された TNF- α などの炎症性サイトカインは好中球を活性化させる。その結果、ANCA の対応抗原である MPO や PR3 が細胞膜に表出し、そこへ ANCA が結合する。それと同時に ANCA の Fc 部分が近傍の Fc γ 受容体に結合する。すると、好中球は過剰に活性化し、サイトカインや ROS を産生することで血管内皮細胞を障害し、

血管炎が生じる (Csernok 2003)。ANCAの産生機序については長い間不明であったが、近年の研究によりNETsが関与することが明らかとなってきた。

ANCAはNETs誘導能を有することや、ANCA関連血管炎患者の疾患活動期の血清中のMPO-DNA複合体量は、寛解期や健常者に比べ有意に高いことが報告されている (Nakazawa et al. 2012a; Nakazawa et al. 2014)。また、ANCA関連血管炎患者は健常者と比較して、血清中DNase I活性が低下し、NETs分解活性も低下している (Nakazawa et al. 2014)。抗甲状腺薬であるPTUを投与された患者の30%にANCAが産生され (Wada et al. 2002)、その一部にANCA関連血管炎が誘導される (Yang et al. 2017)。PMAを用いて好中球にNETsを誘導する際にPTUと一緒に作用させると、異常な形態のDNase I抵抗性NETsが誘導される (Nakazawa et al. 2012a)。PMAとPTUで誘導された異常なNETsをWKYラットに免疫すると、MPO-ANCAの産生と肺胞の毛細血管炎が誘導される (Nakazawa et al. 2012a)。これらの結果から、ANCA関連血管炎では、一度産生されたNETsは分解されにくく生体内に長期間存在すると考えられる。NETs成分は免疫細胞に長期間暴露されることとなり、やがてトレランスが破綻し、ANCA産生に至る。また、ANCAの持つNETs誘導活性により、さらに過剰なNETsが誘導される。このようにANCA関連血管炎では、ANCAとNETsを介した悪循環が形成されると考えられる (中沢ら2012)。NETsはANCAの産生原因として、また、血管内皮細胞を障害する因子としてANCA関連血管炎の病因病態形成に深く関与すると考えられる。

ANCA関連血管炎の患者組織においては、MPAの腎糸球体の半月体や深部静脈血栓、壊死性血管炎のフィブリノイド壊死周囲にNETsの沈着が報告されている (Kessenbrock et al. 2009; Nakazawa et al. 2012b; Yoshida et al. 2013)。しかしながら、GPAやEGPA、ANCAの関連しない血管炎ではNETsの存在は明らかとなっておらず、ANCA関連血管炎に特異的な現象かどうか明らかではない。

本研究では、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 組織標本を用いて、ANCA 関連血管炎とその鑑別疾患に対し NETs を検出する免疫蛍光染色を施行し、NETs に対する免疫蛍光染色が鑑別診断に有用であるか、そして組織への NETs 沈着が ANCA 関連血管炎の病因病態に影響を与えているかどうかを検討した。

3.2 対象と方法

本研究は北海道大学大学院保健科学研究院における研究倫理審査委員会の承認 (No.17-85、18-61) を受けて実施した。

3.2.1 NETs のセルブロック作成

ヒト末梢血を採取し、Polymorphprep で好中球を分離した。好中球は 5 % FBS 添加 RPMI 1640 で 1×10^6 /ml に調整し、100 nM の PMA を加え 37 °C で 4 時間反応させた。遠心により上清を取り除き、10 % ホルマリンで 24 時間固定した。セルブロックはアルギン酸ナトリウム法により作成した。固定した細胞を遠心後、上清を除去し、ペレットに 1 % アルギン酸ナトリウムを加えた後、1 M 塩化カルシウムを加えてゲル化させた。ゲルはパラフィン包埋し、4 μ m に薄切後、シランコートのスライドガラスに載せた。

3.2.2 FFPE 組織標本

ANCA 関連血管炎患者 8 例 (MPA 3 例、GPA 4 例、EGPA 1 例) の組織標本を用いた。血管炎病変の対照として、ANCA の関連しない壊死性血管炎であり、病変が全身性に現れる結節性多発動脈炎 (polyarteritis nodosa: PAN) 3 例と病変が皮膚に限局する皮膚動脈炎 (cutaneous arteritis: CA) 2 例、及び、壊死を伴わず肉芽腫性血管炎を呈する巨細胞性動脈炎 (giant cell arteritis: GCA) 5 例を用いた。GPA で認められる肺の壊死性肉芽腫病変の対照として、壊死性肉芽腫を形成する結核 5 例、壊死を伴わない肉芽腫を形成するサルコイドーシス 5 例を用いた。FFPE 組織標本の詳細は表 2 に示した。これらの標本は生検や手術、剖検により採取され、10 % ホルマリンで固定後パラフィン包埋を行った。4 μ m に薄切し、切片はシランコートのスライドガラスに載せた。

3.2.3 免疫蛍光染色

FFPE 切片はキシレンにより脱パラフィン後、Tris-EDTA 緩衝液 (pH 9.0) を用いオートクレーブ (121 °C) で 20 分間抗原の賦活化を行った。抗体の非特異的結合を防ぐために Protein Block Serum-free (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて室温で 10 分間ブロッキングを行った。一次抗体は抗 citrullinated histone H3 抗体 (Cit H3; ウサギポリクローナル、1:100 希釈) と抗 CD15 抗体 (マウス IgM、ready-to-use、

Dako) を使用し、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG H&L 抗体 (1:500 希釈、abcam) と Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体 (1:500 希釈、Invitrogen) を使用し、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、DAPI 入り封入剤を用いて封入した。スライドは蛍光顕微鏡で観察した。

3.2.4 ヘマトキシリン染色

FFPE 切片はキシレンにより脱パラフィン後、ヘマトキシリン溶液に浸漬させた。流水洗で軽く洗浄後、1% 塩酸アルコールで分別した。その後、エオジンを必要に応じて反応させた。エオジン染色したものは従来法であるヘマトキシリン・エオジン染色であり、エオジンを反応させなかったものはヘマトキシリン単染色とした。

3.2.5 DNase I 処理

FFPE 切片はキシレンにより脱パラフィン後、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いてオートクレーブ (121 °C) で 20 分間 抗原の賦活化を行った。その後、10 U/ml の DNase I (Invitrogen) を 37 °C で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、DAPI 染色や Cit H3 や CD15 に対する蛍光免疫染色、およびヘマトキシリン単染色を行った。

3.2.6 画像解析

画像解析は Image J software で行った。病変部に占める NETs 面積の割合 (%) は下記の通り計算した。

$$\left[\frac{\text{病変部内の Cit H3 陽性面積}}{\text{HE 染色に基づく病変部面積}} \right] \times 100$$

DNase I 処理後の NETs 残存率は DAPI 染色画像またはヘマトキシリン単染色画像の平均輝度を用いて下記の通り計算した。

$$\left[\frac{\text{DNase I 処理後の平均輝度}}{\text{DNase I 処理前の平均輝度}} \right] \times 100$$

標本内に複数の病変が存在していた場合は、”病変部に占める NETs 陽性面積 (%) ” または ”NETs 残存率 (%) ” の平均値を使用した。

3.2.7 統計解析

二つのノンパラメトリックな群の比較に、マンホイットニーの U 検定を使用した。
P 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。

表 2. FFPE 組織標本の詳細

患者 No.	年齢	性別	診断	採取組織	病変数	図 11・12 におけるグループ
1	71	女	MPA	筋生検	1	Necrotizing vasculitis in AAV
2	56	男	MPA	筋生検	4	
3	82	女	MPA	腎生検	1	
4	61	女	EGPA	小腸 (剖検)	2	
5	66	男	GPA	肺 (剖検)	3	Necrotizing granulomas in AAV
6	58	男	GPA	肺切除	1	
7	37	女	GPA	肺切除	1	
8	49	男	GPA	肺生検	1	
9	78	女	PAN	筋生検	2	Necrotizing vasculitis in non-ANCA-associated vasculitis
10	39	男	PAN	皮膚生検	1	
11	45	女	PAN	皮膚生検	2	
12	27	女	CA	皮膚生検	1	
13	49	女	CA	皮膚生検	2	Granulomatous angiitis
14	72	女	GCA	側頭動脈生検	1	
15	72	女	GCA	側頭動脈生検	1	
16	83	女	GCA	側頭動脈生検	1	
17	72	男	GCA	側頭動脈生検	1	
18	71	女	GCA	側頭動脈生検	1	Necrotizing granulomas in non-ANCA-associated disease
19	57	男	結核	肺切除	1	
20	75	男	結核	肺切除	2	
21	73	女	結核	肺切除	1	
22	63	男	結核	肺切除	1	
23	66	男	結核	肺切除	1	Granulomas without necrosis in non-ANCA-associated disease
24	46	女	サルコイドーシス	肺生検	1	
25	44	男	サルコイドーシス	肺生検	2	
26	63	女	サルコイドーシス	肺切除	1	
27	45	女	サルコイドーシス	肺切除	1	
28	36	女	サルコイドーシス	肺切除	1	

3.3 結果

3.3.1 FFPE 切片における NETs 染色と DNase I 処理

本研究では、一般的にNETsを染色するために用いられているCit H3の免疫蛍光染色に加え、ヘマトキシリン単染色を施行した。PMA処理した好中球のFFPE切片において、Cit H3陽性かつDAPI陽性の構造物が認められ、NETsであると考えられた (Figure 10A)。Cit H3陽性部の多くはDAPI陽性であることから、本研究ではCit H3陽性部位をNETs陽性とした。ヘマトキシリン単染色においては、ヘマトキシリンに染まる綿状構造物が好中球核の周囲に認められ、NETsであると考えられた (Figure 10B)。

PMAにより誘導されたNETsは*in vitro*での細胞培養条件下において、DNase Iの添加によって分解されることが示されているが (Hakkim et al. 2010)、FFPE標本ではNETsがDNase Iにより分解されることは確認されていない。上記と同様のPMA処理後の好中球のFFPE切片を使用して、DNase IによりNETsが分解されるか検討した。10 U/ml DNase Iを37 °Cで1時間反応させることにより、NETsは分解されていた (Figure 10C, D)。DAPIやヘマトキシリンに染まる細胞外DNAはDNase Iにより大部分が分解されているのに対し、Cit H3はDNase I処理後も一部残っていた。

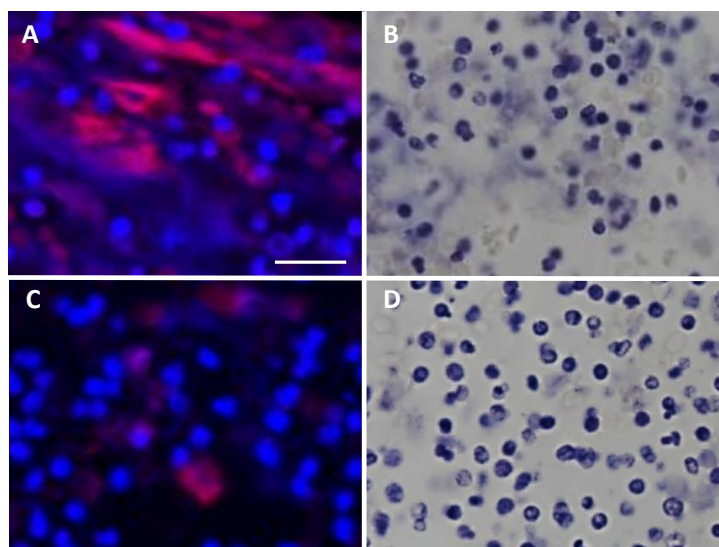


Figure 10. セルブロック標本におけるNETsの染色とDNase I処理
PMA処理した好中球のセルブロック標本におけるCit H3の免疫蛍光染色 (A, C; 赤 : Cit H3、青 : DNA) とヘマトキシリン単染色 (B, D) を施行した。(A, B) DNase I 処理前。(C, D) DNase I処理後。Scale bar : 20 μ m。

3.3.2 血管炎病変局所におけるNETsの沈着

ANCAとフィブリノイド壊死の有無に基づき、血管炎を、ANCA関連壊死性血管炎、ANCA非関連壊死性血管炎、肉芽腫性血管炎の3つのグループに分類し、それぞれのグループにおける病変局所のNETs沈着量を比較した。

ANCA関連血管炎であるMPAとEGPAにおいて、フィブリノイド壊死の周囲にCit H3陽性のNETsが確認された (Figure 11A, B, E, F)。また、MPAにおけるNETsはフィブリノイド壊死を伴う血管炎部位のみではなく、壊死のない血管炎部位にも認められた (Figure 11I)。好中球マーカーとして使用したCD15は、MPAではCit H3の分布と一致していたが、EGPAではCit H3の陽性部位にCD15陽性所見はほとんど認められなかった。EGPAは血管炎病変部のフィブリノイド壊死周囲における好酸球の浸潤が特徴であり、好酸球も細胞外トラップを放出することが報告されているため (Yousefi et al. 2008; Ueki et al. 2013)、EGPAにおけるCit H3陽性物質は好酸球由来の細胞外トラップであると考えられる。PANやCAなどのANCA非関連壊死性血管炎や肉芽腫性血管炎であるGCAでは、NETsはほとんど認められなかった (Figure 11C, D, G, H)。

病変部に占める NETs 面積の割合は、ANCA 非関連壊死性血管炎や肉芽腫性血管炎と比較し、ANCA 関連血管炎で有意に高かった (Figure 11J)。

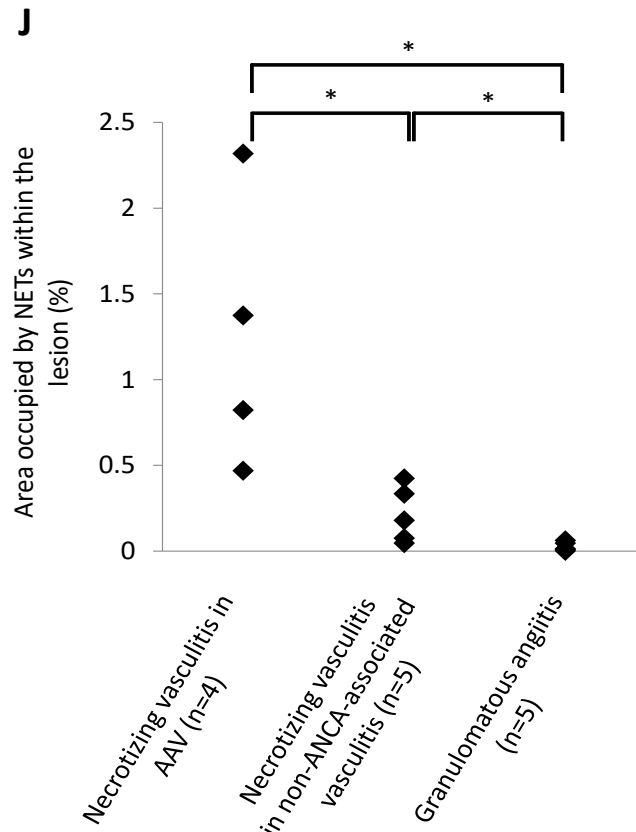
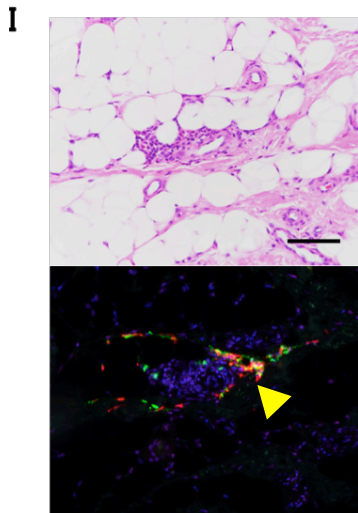
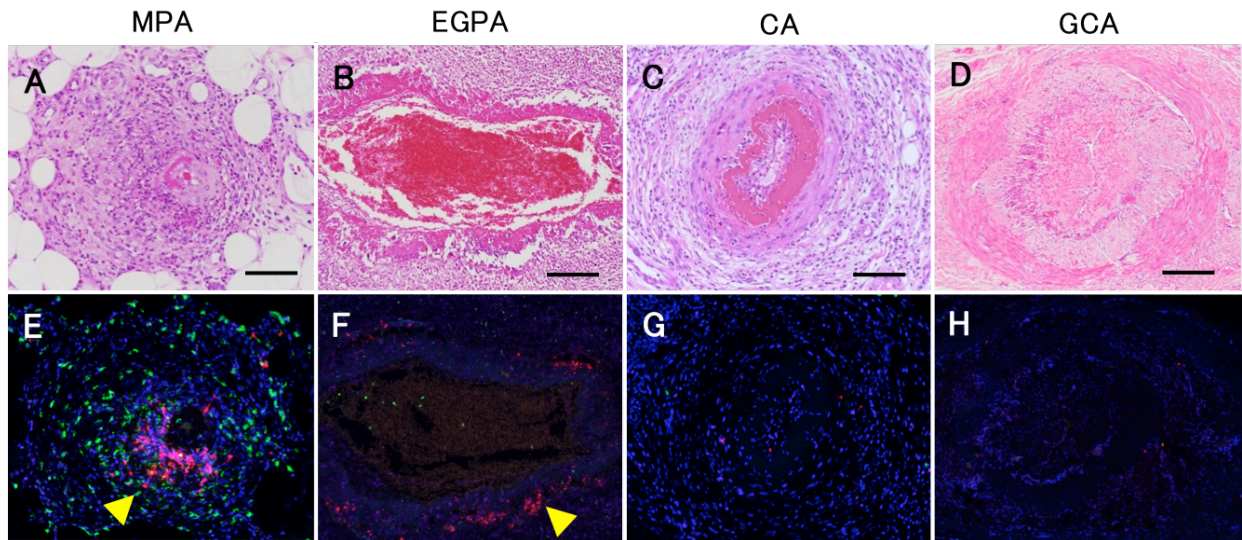


Figure 11. 血管炎病変部におけるNETsの沈着

(A-D) 各種疾患の HE 染色。(E-H) Cit H3 と CD15 に対する免疫蛍光染色。赤 : Cit H3、緑 : CD15、青 : DNA。Scale bars : 100 μ m (A, C, E, G) , 200 μ m (B, D, F, H) 。矢頭は NETs を示す。(I) MPA 症例の壊死を伴わない血管炎に認められた NETs。Scale bar : 100 μ m。(J) 病変部に占める NETs 陽性面積の割合。* p <0.05。

3.3.3 肺の肉芽腫におけるNETsの沈着

ANCAと壊死の有無に基づき、肺の肉芽腫を、ANCA関連血管炎における壊死性肉芽腫、ANCA非関連壊死性肉芽腫、壊死を伴わない肉芽腫の3つのグループに分類し、それぞれのグループにおける病変内のNETs沈着量を比較した。

GPAと結核の肺の壊死性肉芽腫において、壊死部に多量のNETsが認められた (Figure 12A, B, D, E)。CD15陽性好中球の分布は、GPAと結核におけるNETsの局在と一致していた。壊死を取り囲む肉芽腫性病変にはNETsは認められなかった。また、GPAの病変部周囲の正常組織において、肺胞内や血管内にNETs形成が認められた (Figure 12G)。しかし、壊死を形成しないサルコイドーシスの肺の肉芽腫にはNETsは全く認められなかった (Figure 12C, F)。

病変部に占めるNETs陽性面積の割合は、非壊死性肉芽腫であるサルコイドーシスと比較して、壊死性肉芽腫を形成するGPAと結核で有意に高かった (Figure 12H)。

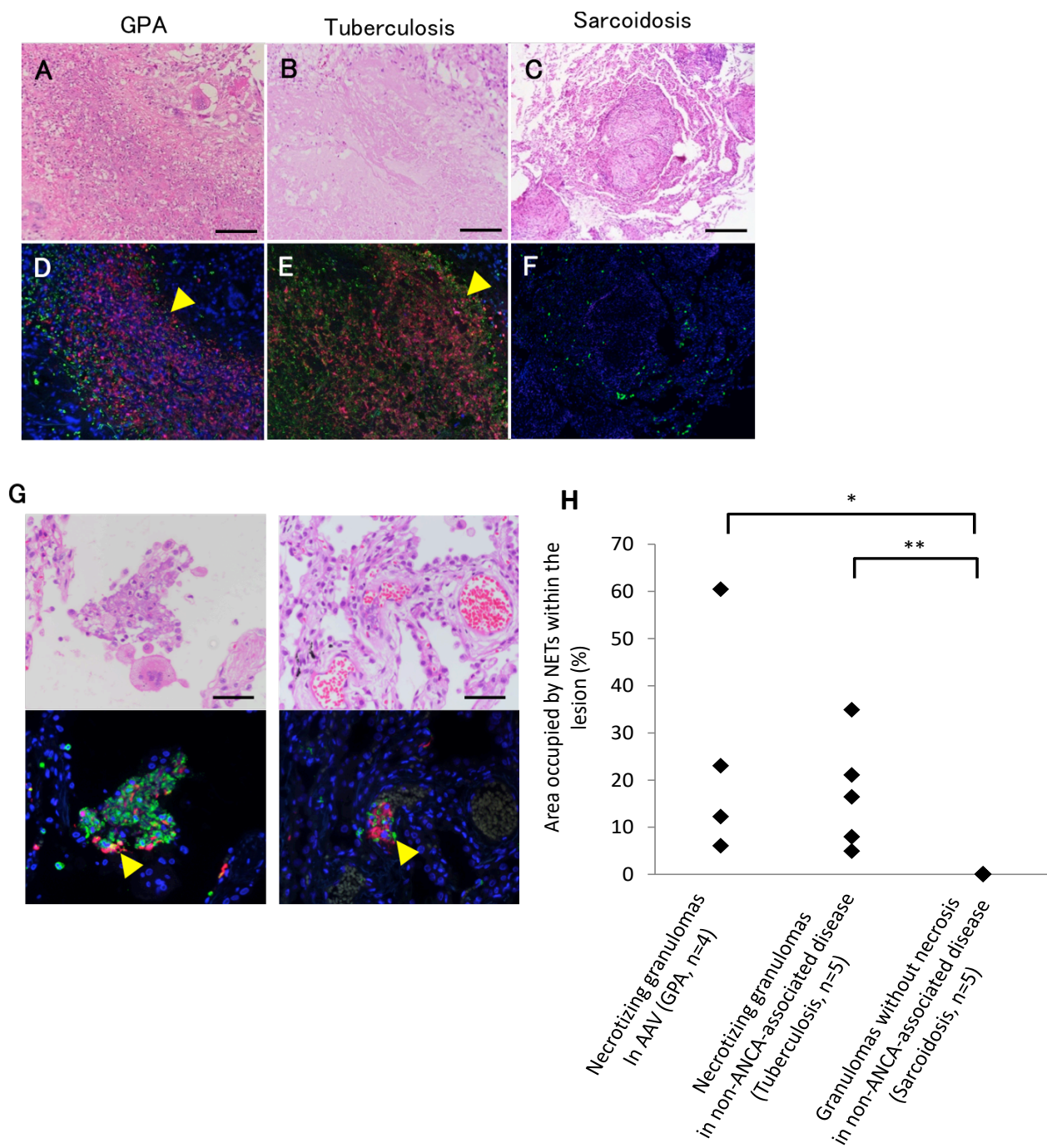


Figure 12. 肺肉芽腫におけるNETsの沈着

(A-C) 各種疾患のHE染色。(D-F) Cit-H3とCD15に対する免疫蛍光染色。赤: Cit-H3、緑: CD15、青: DNA。Scale bars: 100 μ m (A, B, D, E), 200 μ m (C, F)。矢印はNETsを示す。(G) GPA症例の正常組織における肺胞や血管内に認められたNETs。Scale bar: 50 μ m。(H) 病変部に占めるNETs陽性面積の割合。* p <0.05, ** p <0.01。

3.3.4 NETs に対する DNase I 処理

NETsはGPAと結核患者の肺の壊死性肉芽腫内に多量に認められた。これはANCAと結核菌がそれぞれ NETs を誘導するためと考えられる (Nakazawa et al. 2014; Ramos-Kichik et al. 2010)。DNase I 抵抗性の NETs が ANCA 産生に関与することが報告されているため (Nakazawa et al. 2012a)、ANCA 関連血管炎と結核で形成される NETs について、DNase I 感受性の違いを検討した。GPA と結核の肺の FFPE 切片を DNase I (10 U/ml、37 °C、1 時間) で処理後、DAPI 染色またはヘマトキシリン単染色を行った。結核の壊死性肉芽腫に認めた NETs は DNase I 処理によって大部分が分解されたのに対し、GPA の壊死性肉芽腫で見られた NETs は DNase I 処理後も残存していた (Figure 13A-H)。NETs 残存率は結核と比較して、GPA で有意に高かった (Figure 13I, J) また、結核の壊死性肉芽腫における Cit H3 は DNase I 処理後も残存していた (Figure 14)。MPA の壊死性血管炎においても、同様に DNase I 処理を行った。画像解析により DAPI 陽性面積のピクセル数を算出したところ、DNase I 処理前後で値はほぼ変わらず、ANCA 関連血管炎では血管炎局所の NETs も DNase I 抵抗性であることが示唆された (Figure 15)。

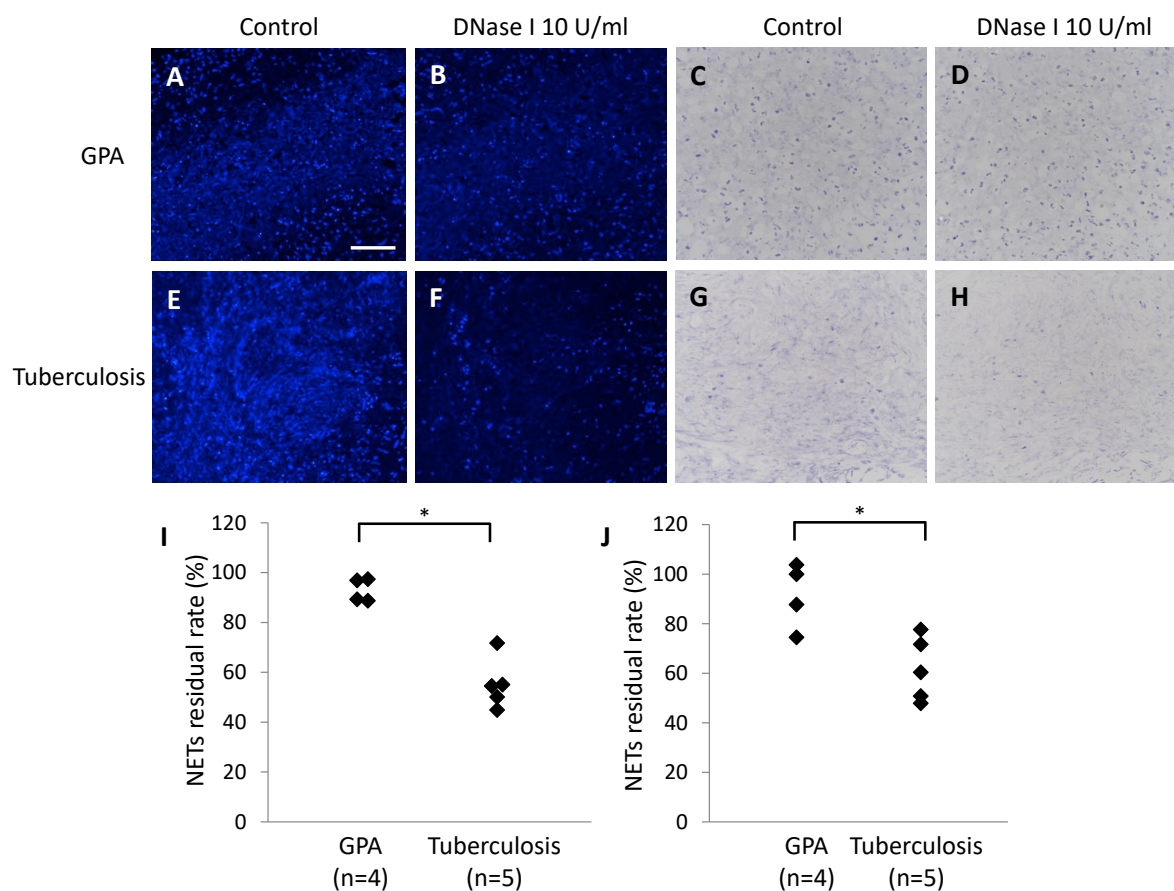


Figure 13. 肺の壊死性肉芽腫病変に対する DNase I 処理

GPA と結核の肺の FFPE 切片に 10 U/ml の DNase I 処理を施行後、DAPI 染色 (A, B, E, F) とヘマトキシリン単染色 (C, D, G, H) を行った。(A, C, E, G) DNase I 処理前。(B, D, F, H) DNase I 処理後。Scale bar : 50 μ m。(I) DAPI 染色に基づく DNase I 処理後の NETs 残存率。* $p < 0.05$ 。(J) ヘマトキシリン単染色に基づく DNase I 処理後の NETs 残存率。* $p < 0.05$ 。

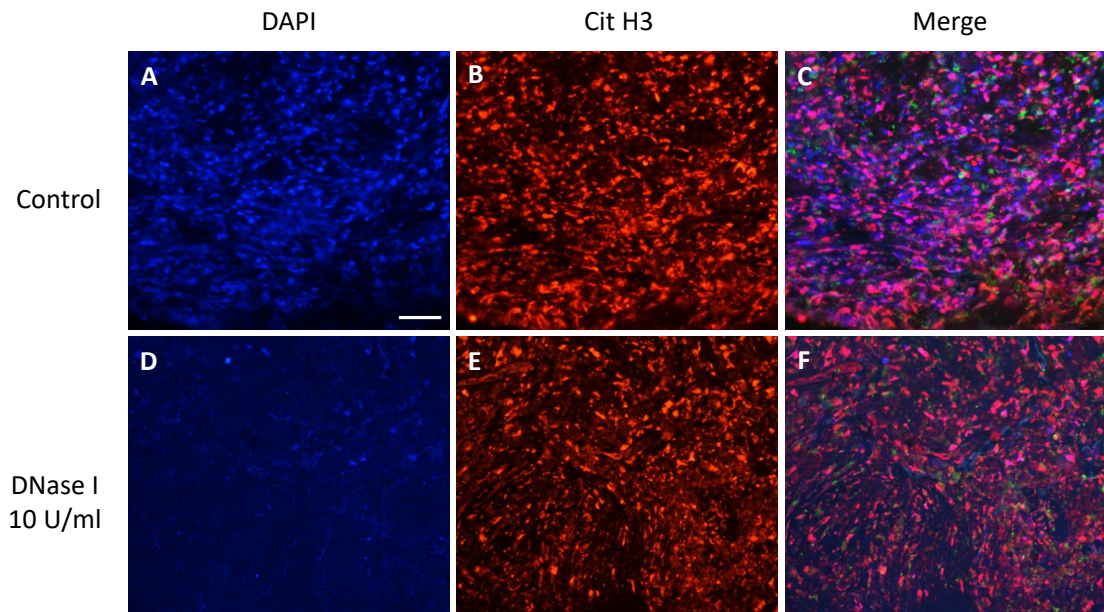


Figure 14. 結核の壊死性肉芽腫における DNase I 処理

結核の肺の FFPE 切片に 10 U/ml の DNase I 処理を施行し、Cit H3 と CD15 に対する免疫蛍光染色を行った。(A, B, C) DNase I 処理前。(D, E, F) DNase I 処理後。赤 : Cit H3、緑 : CD15、青 : DNA。Scale bar : 50 μ m。

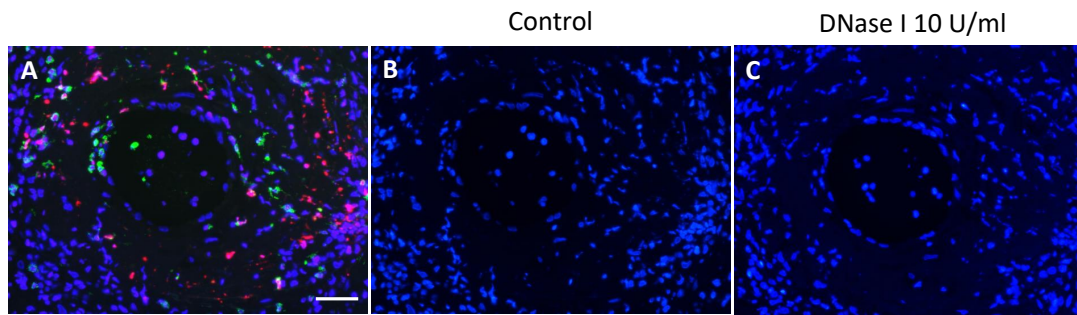


Figure 15. MPA の壊死性血管炎における DNase I 処理

(A) MPA の壊死性血管炎における NETs の沈着。赤 : Cit H3、緑 : CD15、青 : DNA。 Scale bar : 50 μm 。(B) DNase I 処理前における DAPI 染色。(C) DNase I 処理後の DAPI 染色。

3.4 考察

本研究では、FFPE標本のNETsに対する免疫蛍光染色法を確立し、ANCA関連血管炎及びその鑑別疾患の病変部におけるNETsの沈着を検討した。さらに、沈着するNETsの特性として、DNase I感受性を検討した。

FFPE組織標本において蛍光免疫染色を施行し、NETsはCit H3、CD15、DAPIに染まる構造物として同定された。また、ヘマトキシリン単染色においても、ヘマトキシリン好性の綿状物質としてNETsを認識できることを初めて示した。また、FFPE切片に認められるNETsが、DNase IIにより分解されることを初めて証明した。切片中にはNETsの他に多数の核DNAが存在するが、核DNAはDNase I処理後も分解されずに残っていた。核DNAは二重らせん構造で、DNAはヒストンに巻き付きヌクレオソームを構成し、さらに高次構造をとることでクロマチンを形成している。このクロマチンにはヘテロクロマチンとユークロマチンの2種類があり、ヘテロクロマチンはクロマチンが凝集した状態にあるのに対し、ユークロマチンはクロマチンの構造が緩み、転写が活発に行われている状態にある。このクロマチンの状態はDNase IIに対する感受性にも反映され、凝集した状態のヘテロクロマチンはDNase Iで消化されにくいのに対し、緩んだ状態のユークロマチンは容易にDNase Iで分解される。NETs形成時には、ヒストンがシトルリン化され、ヒストンとDNAの結合が弱まり、クロマチンは糸状になるため、NETsはDNase IIに対して感受性であると考えられる。よって、DNase I処理により、NETsは分解され、核DNAは分解されずに残っていたと考えられる。NETsのマーカーとして頻用されるCit H3は、DNase I処理後も残存するため、DNase I処理の判定には向いていないと考えられ、DAPI染色やヘマトキシリン単染色が有効である。

ANCA関連血管炎病変局所におけるNETs沈着は、MPAの腎糸球体の半月体や壊死性血管炎のフィブリノイド壊死周囲、血栓内で認められることが報告されてきた (Kessenbrock et al. 2009; Nakazawa et al. 2014; Yoshida et al. 2013)。本研究では、MPAやEGPAの壊死性血管炎部位及びGPAの壊死性肉芽腫部位にNETsの沈着が認められた。EGPAやGPAにおける組織へのNETs沈着は本研究により初めて明らかとなった。ANCA関連血管炎 (MPA、EGPA) における壊死性血管炎病変部にNETsが認められた一方で、ANCA関連血管炎と同様に壊死性血管炎を呈するCAやPAN、肉芽腫性血管炎であるGCAでは、NETsはほとんど認められなかった。MPAやEGPAに存在するNETsは血管炎病変部のフィブリノイド壊死の周囲に存在しており、吉田らによるANCA関連血管炎の腎小葉間動脈における壊死性血管炎のフィブリノイド壊死周囲にCit H3陽性所見が認められたという報告と一致していた (Yoshida et al. 2013)。また、MPAの壊死のない小型血管炎部位においても、血管周囲にNETsが認

められた。活性化された好中球にANCAが作用するとNETsが誘導されること (Nakazawa et al. 2012a; Nakazawa et al. 2014)、NETsに含まれるヒストンやMPO、NEなどの抗菌タンパクは細胞障害活性を有することが報告されている (Xu et al. 2009)。本研究の結果及びこれまでの知見により、ANCA関連血管炎のフィブリノイド壊死形成に、NETsが深く関与していると考えられる。

GPAの肺の壊死性肉芽腫内に多量のNETsが認められた。NETsは壊死部に分布しており、壊死を取り囲む肉芽腫病変には認められなかった。また、病変部周囲の正常肺組織においても、血管内や肺胞中にNETsが認められた。GPAの発症に細菌感染が先行する 경우가多く、それが原因となってNETsが誘導され、またANCAによってもNETsが誘導されると考えられる。壊死性血管炎と同様にGPAの肺の壊死性病変の形成にNETsが関与していると考えられる。しかし、肉芽腫性病変と血管炎病変の間で、NETsの詳細な分布（壊死の内部か周囲か）が異なる理由はわかっていない。

GPAと同様に壊死性肉芽腫を形成する結核においても、肺の壊死性病変に多量のNETs沈着が認められ、その分布はGPAと同様に壊死の内部であり、壊死を取り囲む肉芽腫病変には認められなかった。結核菌が感染すると、好中球やマクロファージによって貪食される。また、結核菌はNETsを誘導することから、貪食に加えNETsの放出も同時に起きていると考えられる。感染巣では、やがて感染の拡大を防ぐためにマクロファージが類上皮細胞やラングハンス型巨細胞に分化し、病変部を取り囲む。そのため、NETsは壊死部に見られ、肉芽腫病変に認められないと考えられる。結核による壊死の原因は、結核菌や結核菌に感染した宿主細胞への免疫応答の結果として考えられてきたが、NETsによる細胞障害活性も関与している可能性がある。一方、壊死のない肉芽腫を形成するサルコイドーシスの肺病変においては、NETsは認められなかった。これらの結果から、壊死性病変の形成にNETsが関与していることが示唆される。

GPAと結核の壊死性肉芽腫病変のいずれにもNETsの沈着が認められたが、DNase Iに対する感受性は異なっていた。結核で形成されたNETsはDNase Iによって大部分が分解されたのに対し、GPAのNETsはDNase I処理後も残存しておりDNase I抵抗性であった。抗甲状腺薬であるPTUとPMAによって誘導されたNETsもDNase I抵抗性であること、そしてPTUとPMAにより誘導されたNETsをラットに免疫すると、MPO-ANCAの産生と ANCA関連血管炎の発症が誘導されることが報告されている (Nakazawa et al. 2012a)。また、結核に感染した患者の約40%がANCA陽性であると報告されているが (Flores-Suárez et al. 2003)、結核感染後にANCA関連血管炎に進展する例は多くない (Chaiamnuay and Heck 2005)。これらの知見から、NETsはANCA抗原の供給源となりANCA産生に関与するが、血管炎にまで至るには

NETsがDNase I抵抗性を有し、ANCA抗原を持続的に提供することが必要であると考えられる。

本研究は、これまで報告があったMPAだけではなく、GPAやEGPAにおける壊死性病変部においてもNETsの沈着を初めて示した。血管炎病変においては、壊死を認めるPANやCAではNETsの沈着をほとんど認めなかったことから、NETs染色は壊死性血管炎の鑑別に有用である可能性がある。肺の肉芽腫病変においては、壊死を形成するGPAと結核でNETsの沈着が認められた。しかし、DNase Iに対する感受性が異なっており、GPAで形成されるNETsはDNase Iに抵抗性を示していた。これまで生体内におけるDNase I抵抗性NETsの形成は、ラットにおいてPTU的作用により誘導されることがわかっていたが、今回の研究で初めてヒトの体内で、PTUの作用がない状態で、DNase I抵抗性NETsが形成されていることが明らかとなった。DNase I抵抗性NETsが形成される機序は明らかではないが、遺伝的要因や環境要因が関与している可能性が考えられる。GPAと結核の組織学的特徴は壊死性肉芽腫の形成であり、いずれもANCA陽性となりうるため、鑑別が困難な例も認められる。その場合、壊死性肉芽腫に存在するNETsのDNase I消化処理が両者の鑑別に有用となるかもしれない。

本研究の限界として、以下が挙げられる。一つ目は症例数が少ないことである。ANCA関連血管炎は比較的稀な疾患であり、組織標本の入手が困難であった。そのため、病変部に占めるNETs陽性面積と疾患活動性やANCA抗体価、疾患発症時期との比較などができなかった。今後症例数を増やし、上記の比較を検討したいと考えている。二つ目はNETsの好中球マーカーとしてCD15を使用した点である。通常、NETsを証明する場合には細胞外DNAやCit H3などの核成分とMPOやエラスターゼなどの好中球顆粒タンパクの共局在を示す。本研究においてもMPOによる染色を試みたが、良好な陽性所見が得られなかったため、CD15を採用した。

本研究によりANCA関連血管炎の壊死性病変にNETsが認められること、さらに沈着するNETsはDNase I抵抗性を示していることが明らかとなった。組織におけるNETs沈着の有無は、ANCA関連血管炎とその鑑別疾患との診断に有用であると考えられる。また、DNase I抵抗性NETsは壊死性病変の形成やANCA産生、血管炎の発症に関与すると考えられ、ANCA関連血管炎の病因病態解明の一助に寄与できたと考えられる。DNase I抵抗性NETsは治療標的になる可能性があり、NETsがDNase I抵抗性を獲得する機序を解明し、その産生を抑制することが出来れば、ANCA関連血管炎の発症を防ぐことにつながるかもしれない。

3.5 結論

本研究により以下のことが明らかとなった。

- NETs は免疫蛍光染色の他、ヘマトキシリン単染色でも同定可能であった。
- FFPE 組織標本中の NETs は DNase I により分解された。
- ANCA 関連血管炎の MPA と EGPA の壊死性血管炎局所に NETs の沈着が認められた。
- ANCA 関連血管炎では、壊死のない血管炎病変部ならびに病変周囲の正常組織においても NETs が認められた。
- 結核の壊死性肉芽腫内に沈着する NETs は DNase I で容易に分解されるのに対し、ANCA 関連血管炎に沈着する NETs は DNase I 抵抗性を示していた。ヒトの体内で、かつ PTU の作用がない状況で DNase I 抵抗性 NETs が形成されることが初めて示された。

これらのことから、NETs は ANCA 関連血管炎の病態形成に深く関与することが示唆された。ANCA 関連血管炎で形成される DNase I 抵抗性 NETs は分解されにくく生体内に長期間存在することで、ANCA 抗原を持続的に提供したり、血管を長期間障害し続けることで、血管炎の発症に関与すると考えられる。今後は DNase I 抵抗性 NETs の形成メカニズムを明らかにし、さらに、DNase I 抵抗性から DNase I 感受性へと導く方法を開発したいと考えている。また、NETs 染色と DNase I 消化試験は ANCA 関連血管炎の鑑別診断において有用である可能性も示した。引き続き、NETs 染色の症例数を増やすとともに、今回検討できなかったその他の鑑別疾患においても NETs 沈着の有無や組織に沈着する NETs の DNase I 感受性を明らかにし、その有用性をさらに示していく必要がある。

4. 総括および結論

第一章では、フローサイトメトリーを用いた簡便かつ客観的、定量的な NETs 測定法を確立した。In vitro および in vivo で形成された NETs 形成好中球を測定することができ、本検出法は新たな NETs 測定方法として有用であると考えられた。

第二章では、免疫蛍光染色を用いて FFPE 組織標本における NETs 検出法を確立し、ANCA 関連血管炎の壊死性病変部における NETs の沈着を明らかにした。また、沈着する NETs は DNase I に抵抗性を示しており、ANCA 関連血管炎の壊死性病変の形成や ANCA 産生に関与していることが示唆された。今後、DNase I 抵抗性 NETs の形成機序が解明され、その形成を抑制することができれば、ANCA 関連血管炎の発症を抑制できる可能性がある。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の機会を与えてくださった北海道大学大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室渥美達也教授に厚くお礼申し上げます。本研究の遂行にあたり、終始丁寧なご指導とご助言を頂いた大学院保健科学研究院病態解析学分野の石津明洋教授に心から感謝いたします。有益なご討論やご助言を頂きました大学院医学研究院分子病理学教室の外丸詩野准教授、大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室の中沢大悟特任助教、大学院医学研究院死因究明教育研究センターの田中 敏特任准教授に深く感謝いたします。

実験の一部と一緒に遂行してくれた医学部保健学科の清水咲花さんと大学院保健科学院の野々川茉佑さんに感謝いたします。細菌をご提供いただきました大学院保健科学研究院の松尾淳司助教に深く感謝いたします。貴重な症例の病理標本をご提供いただきました市立札幌病院病理診断科の辻 隆裕先生、岩崎沙理先生、北海道大学病院ゲノム・コンパニオン診断研究部門の畑中 豊特任准教授、東北医科薬科大学医学部皮膚科学講座の川上民裕主任教授に深く感謝いたします。併せて、検体を使用させていただいた患者の皆様、血液をご提供くださったボランティアの方々に御礼申し上げます。

NETs-plus ミーティングで様々なご助言と討論を頂きました大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室の楠 由宏先生、八反田文彦先生、志田玄貴先生、北海道大学病院輸血・検査部の魚住 諒さんに感謝いたします。

English seminarでは様々なご助言を頂きました大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室Olga Amengual助教とグループのメンバーの先生方に感謝いたします。

日々の実験を遂行するにあたりサポートしてくれた大学院保健科学研究院病態解析学分野学術研究員西端友香さんを始めとする病理・免疫検査学研究室の皆様心より感謝申し上げます。

本研究の遂行には、文部科学省科学研究費（26293082）、厚生労働省科学研究費、日本医療研究開発機構研究費（15ek0109104, 15ek0109121）を使用させていただきました。この場を借りて、御礼申し上げます。

最後に、いつも側で支えてくれた夫と両親、そしていつも癒しをくれた娘に心から感謝します。

6.利益相反

本研究に開示すべき利益相反状態はありません。

7. 引用文献

Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, Reichenbach J (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* **114**, 2619-22.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-5.

Butt AN, Swaminathan R (2008). Overview of Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum. *Ann NY Acad Sci.* **1137**, 236-242.

Chaiamnuay S, Heck LW (2005). Antineutrophil cytoplasmic antibody vasculitis associated with Mycobacterium avium intracellulare infection. *J Rheumatol.* **32**, 1610-1612.

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* **13**, 463-9.

Csernok E (2003). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and pathogenesis of small vessel vasculitides. *Autoimmun. Rev.* **2**, 158.

Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB (1982). Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br. Med. J.* **285**, 606.

Desai J, Mulay SR, Nakazawa D, Anders HJ (2016). Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is "NETosis" = necroptosis? *Cell Mol Life Sci.* **73**, 2211-9.

Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, Pogue J, Liaw KL, Weitz JI, Cook DJ, Fox-

Robichaud AE, Liaw PC, G (2012). Canadian Critical Care Translational Biology. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* **16**, R151.

Flores-Suárez LF, Cabiedes J, Villa AR, van der Woude FJ, Alcocer-Varela J (2003). Prevalence of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with tuberculosis. *Rheumatology (Oxford)*. **42**, 223-9.

Fox CH, Jonson FB, Whiting J, Roller PP (1985). Formaldehyde Fixation. *J Histochem Cytochem*. **33**, 845-853.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. **76**, 231-41.

Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. **3**, 73ra20.

Gavillet M, Martinod K, Renella R, Harris C, Shapiro NI, Wagner DD, Williams DA (2015). Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am. J. Hematol*. **90**, 1155–1158.

Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107**, 9813-9818.

Jorch SK, Kubes P (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. **23**, 279-287.

Kaplan MJ, Radic M (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. **189**, 2689-95.

Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, Brinkmann V, Bernuth HV, Zychlinsky A (2017). Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife* **6**, e24437.

Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemärck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* **15**, 623-5.

Kohler C, Barekati Z, Radpour R, Zhong XY (2011). Cell-free DNA in the Circulation as a Potential Cancer Biomarker. *Anticancer Research* **31**, 2623-2628.

Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* **207**, 1853–1862.

Ma YH, Ma TT, Wang C, Wang H, Chang DY, Chen M, Zhao MH (2016). High-mobility group box 1 potentiates antineutrophil cytoplasmic antibody-inducing neutrophil extracellular traps formation. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 2.

Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, Oberholzer PA, Baumann C, Fey MF, Dummer R, Simon HU, Yousefi S (2004). Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem.* **279**, 44123-32.

Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, Takenaka N, Gocho T, Huq MA, Takeyama N (2018). Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care.* **22**, 176.

Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A (2016). NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta.* **459**, 89-93.

Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A (2011). Myeloperoxidase is required for

neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* **117**, 953–959.

Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V (2014). A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* **8**, 883-96.

Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, Kourtzelis I, Drosos GI, Boumpas DT, Ritis K (2011). Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One.* **6**, e29318.

Miyoshi A, Yamada M, Shida H, Nakazawa D, Kusunoki Y, Nakamura A, Miyoshi H, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A (2016). Circulating neutrophil extracellular trap levels in well-controlled type 2 diabetes and pathway involved in their formation induced by high-dose glucose. *Pathobiology* **83**, 243–251.

Mohanan S, Horibata S, McElwee JL, Dannenberg AJ, Coonrod SA (2013). Identification of macrophage extracellular trap-like structures in mammary gland adipose tissue: a preliminary study. *Front Immunol.* **4**, 67.

Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A (2012a). Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis, *Arthritis Rheum.* **64**, 3779–3787.

Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A (2012b). Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol.* **3**, 333.

Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A (2014). Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol.*

25, 990.

Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* **191**, 677-91.

Parker H, Winterbourn CC (2012). Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* **3**, 424.

Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, et al. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* **185**, 7413-25.

Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muniz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, Chacon-Salinas R, Estrada-Parra S, Estrada-Garcia I (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **89**, 29-37.

Soderberg D, Kurz T, Motamedi A, Hellmark T, Eriksson P, Segelmark M (2015). Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatology (Oxford)* **54**, 2085–2094.

Sørensen OE, Borregaard N (2016). Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest.* **126**, 1612-20.

Steinberg BE, Grinstein S (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE.* 2007, pe11.

Ueki S, Melo RC, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF (2013). Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* **121**, 2074–83.

von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K,

Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* **111**, 3070–80.

Vorobjeva NV, Pinegin BV (2014). Neutrophil extracellular traps: mechanism of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Mosc)* **79**, 1286-96.

Wada N, Mukai M, Kohno M, Notoya A, Ito T, Yoshioka N (2002). Prevalence of serum anti-myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) in patients with Graves' disease treated with propylthiouracil and thiamazole. *Endocr J.* **49**, 329-34.

Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, C. Allis D, Coonrod SA (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* **184**, 205–213.

Webster SJ, Daigneault M, Bewley MA, Preston JA, Marriott HM, Walmsley SR, Read RC, Whyte MK, Dockrell DH (2010). Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol.* **185**, 2968-79.

Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC (2002). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J. Clin. Invest.* **110**, 955.

Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* **15**, 1318–13121.

Yang J, Yao LP, Dong MJ, Xu Q, Zhang J, Weng WW, Chen F (2017). Clinical Characteristics and Outcomes of Propylthiouracil-Induced Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis in Patients with Graves' Disease: A Median 38-Month Retrospective Cohort Study from a Single Institution in China. *Thyroid.* **27**, 1469-1474.

Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* **18**, 1386-93.

Yipp BG, Kubes P (2013). NETosis: how vital is it? *Blood* **122**, 2784-2794.

Yoshida M, Sasaki M, Sugisaki K, Yamaguchi Y, Yamada M (2013). Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. *Clin Kidney J.* **6**, 308-12.

Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, Taylor-Cousar JL, Saavedra MT, Randell SH, Vasil ML, et al. (2011). Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One.* **6**, e23637.

Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Simon HU (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* **14**, 949-53.

Zhang S, Lu X, Shu X, Tian X, Yang H, Yang W, Zhang Y, Wang G (2014). Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern. Med.* **53**, 2763-2771.

Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ (2015). A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J. Immunol. Methods* **423**, 104-110.

中沢大悟, 西尾妙織, 外丸詩野, 渥美達也, 石津明洋. 血管炎の発症機序と NETs. 日本腎臓学会誌 **56**, 117-123 (2014).