



Title	MP0-ANCA関連血管炎に対するPeptidylarginine deiminase阻害薬の効果および好中球細胞外トラップの血管内皮細胞障害に対するリコンビナントトロンボモジュリンの効果
Author(s)	楠, 由宏
Description	配架番号 : 2331
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12809号
Issue Date	2017-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12809
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66919
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshihiro_Kusunoki.pdf



学 位 論 文

MPO-ANCA 関連血管炎に対する

Peptidylarginine deiminase 阻害薬の効果および
好中球細胞外トラップの血管内皮細胞障害に対する
リコンビナントトロンボモジュリンの効果

(The Effect of Peptidylarginine Deiminase Inhibitor on
MPO-ANCA-Associated Vasculitis and the Effect of
Recombinant Thrombomodulin on Vascular Endothelial
Cytotoxicity of Neutrophil Extracellular Traps)

2017 年 6 月

北 海 道 大 学

楠 由宏

学 位 論 文

MPO-ANCA 関連血管炎に対する

Peptidylarginine deiminase 阻害薬の効果および
好中球細胞外トラップの血管内皮細胞障害に対する
リコンビナントトロンボモジュリンの効果

(The Effect of Peptidylarginine Deiminase Inhibitor on
MPO-ANCA-Associated Vasculitis and the Effect of
Recombinant Thrombomodulin on Vascular Endothelial
Cytotoxicity of Neutrophil Extracellular Traps)

2017 年 6 月

北 海 道 大 学

楠 由宏

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
第一章	
背景	8 頁
実験方法	11 頁
実験結果	14 頁
考察	24 頁
第二章	
背景	28 頁
実験方法	30 頁
実験結果	32 頁
考察	42 頁

総括及び結論	44 頁
謝辞	45 頁
引用文献	46 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. Yoshihiro Kusunoki, Daigo Nakazawa, Haruki Shida, Fumihiko Hattanda, Arina Miyoshi, Sakiko Masuda, Saori Nishio, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Suppresses Neutrophil Extracellular Trap Formation and MPO-ANCA Production. *Front Immunol* 7, 227, 2016.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Yoshihiro Kusunoki, Daigo Nakazawa, Haruki Shida, Fumihiko Hattanda, Arina Miyoshi, Sakiko Masuda, Saori Nishio, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. The Effect of Peptidylarginine Deiminase 4 Inhibitor on MPO-ANCA Production in Mouse Model. ISN Nexus Symposium April 14-17 2016, Berline, Germany
2. 楠 由宏, 中沢 大悟, 志田 玄貴, 八反田 文彦, 三次 有奈, 益田 紗季子, 西尾 妙織, 外丸 詩野, 渥美 達也, 石津 明洋. Peptidylarginine deiminase 4 阻害薬は好中球細胞外トラップの形成阻害を介して MPO-ANCA 産生を抑制する. 日本リウマチ医学会総会・学術総会 2016 年 4 月 21~23 日 横浜
3. 楠 由宏, 中沢 大悟, 志田 玄貴, 八反田 文彦, 三次 有奈, 益田 紗季子, 西尾 妙織, 外丸 詩野, 渥美 達也, 石津 明洋. MPO-ANCA 関連血管に対する PAD4 阻害薬の効果. 日本腎臓学会総会・学術総会 2014 年 7 月 4~6 日 横浜

緒言

MPO-ANCA 関連血管炎 (MPO-AAV)はミエロペルオキシダーゼ(MPO)を対応抗原とする抗好中球細胞質抗体(MPO-ANCA)産生を特徴とする小型血管炎である。腎臓や肺を好発臓器とするが、その他にも神経や皮膚など全身臓器を標的とする。腎臓や肺が侵された場合には、急速進行性糸球体腎炎や肺出血など致命的な病態を来すことがあり、腎代替療法や緊急呼吸管理の導入などを含め、早期の適切な治療介入が重要となるが、その病態はまだ解明されていない部分が多い。

これまでの研究で自己抗体である MPO-ANCA が好中球表面に表出された MPO に結合し、それが好中球を過剰に活性化させ、微小血管炎を来すことが示されているが、MPO-ANCA 産生の機序自体は不明であった。これに対し近年、MPO-ANCA 産生に好中球細胞外トラップ (NETs)と呼ばれる好中球の細胞死形態の一種の制御異常が関与しているという報告があり、MPO-ANCA と NETs の関係が注目されている。

NETs とは、2004年に Brinkmann らによって初めて報告された好中球の新しいタイプの細胞死である。これは、好中球が LPS や fMLP など特定の刺激を受けると、MPO やエラスターゼなど殺菌蛋白に装飾された DNA 線維を放出して細胞死に至る、というものである。この NETs は生体内で放出した DNA 線維で細菌をトラップし、さらに DNA 線維にちりばめられた殺菌蛋白によって殺菌作用を発揮することが想定されており、自然免疫において重要な役割を果たしていると考えられている(Figure 1)。その一方で、NETs が適切に処理されなければ、本来は細胞内に存在する DNA や蛋白が細胞外に露出した状態となり、それらが長期間生体局所に存在することにより自己抗原として認識される可能性が指摘されている。一方で、最近では NETs 自体が有する組織障害性の問題点も報告されている。

現在 MPO-AAV の治療薬としてステロイドやシクロフォスファミド、リツキシマブなど免疫抑制薬に関しては一定の効果が確立されているが、NETs と MPO-ANCA との関連が報告されたことにより、NETs を標的とした新しい治療薬の開発が期待されている。

本研究では NETs を標的とした治療薬として、以下のふたつを解析対象とした。ひとつは、自己抗原の供給源となる NETs の形成を阻害し、MPO-ANCA 産

生を抑制する可能性が期待される Peptidylarginine deiminase (PAD)阻害薬である。そして、もうひとつは、NETs の有する組織障害性を阻害する可能性が期待されるリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)である。

第一章では、NETs の誘導経路で不可欠な脱イミノ化の過程を阻害する NETs 形成阻害薬としての PAD 阻害薬の効果について MPO-ANCA 産生モデルマウスを用いた研究成果について述べる。

我々は NETs 形成経路において中心的役割を果たしている PAD4 の作用を阻害することによって NETs 形成および MPO-ANCA 産生、さらには MPO-AAV 発症を抑制できるのではないかと考えた。そこで、この仮説を検証するために、Nakazawa らの報告を参考にして BALB/c マウスを用いて MPO-ANCA 産生の副作用を有することが知られている抗甲状腺薬であるプロピルチオウラシル (PTU)と、炎症惹起物質である phorbol myristate acetate (PMA)の投与により MPO-AAV モデルマウスを作製し、このモデルに PAD 阻害薬である Cl-amidine を投与することによって NETs 形成や MPO-ANCA 産生、さらには MPO-AAV の発症が抑制できるか検討した。

第二章では NETs の血管内皮細胞障害性に対する rTM の効果を検証した実験について述べる。

トロンボモジュリン (TM)は血管内皮細胞表面に発現する糖蛋白であり、その生理機能として抗凝固作用や活性化プロテイン C (APC)を介した抗炎症作用などが知られており、その細胞外ドメインの遺伝子組み換え製剤である rTM は日本において播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療薬として広く使用されている。

一方で、in vitro で細胞外ヒストンが血管内皮障害作用を有することが知られており、この作用が rTM にて減少したという報告がある。細胞外ヒストンは NETs の主要な構成成分のひとつであり、TM がヒストンに直接結合することが知られている。我々は NETs の血管内皮細胞障害作用にヒストンが関与しており、これに対して rTM が細胞障害抑制作用を示すかを、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)を用いて検証した。

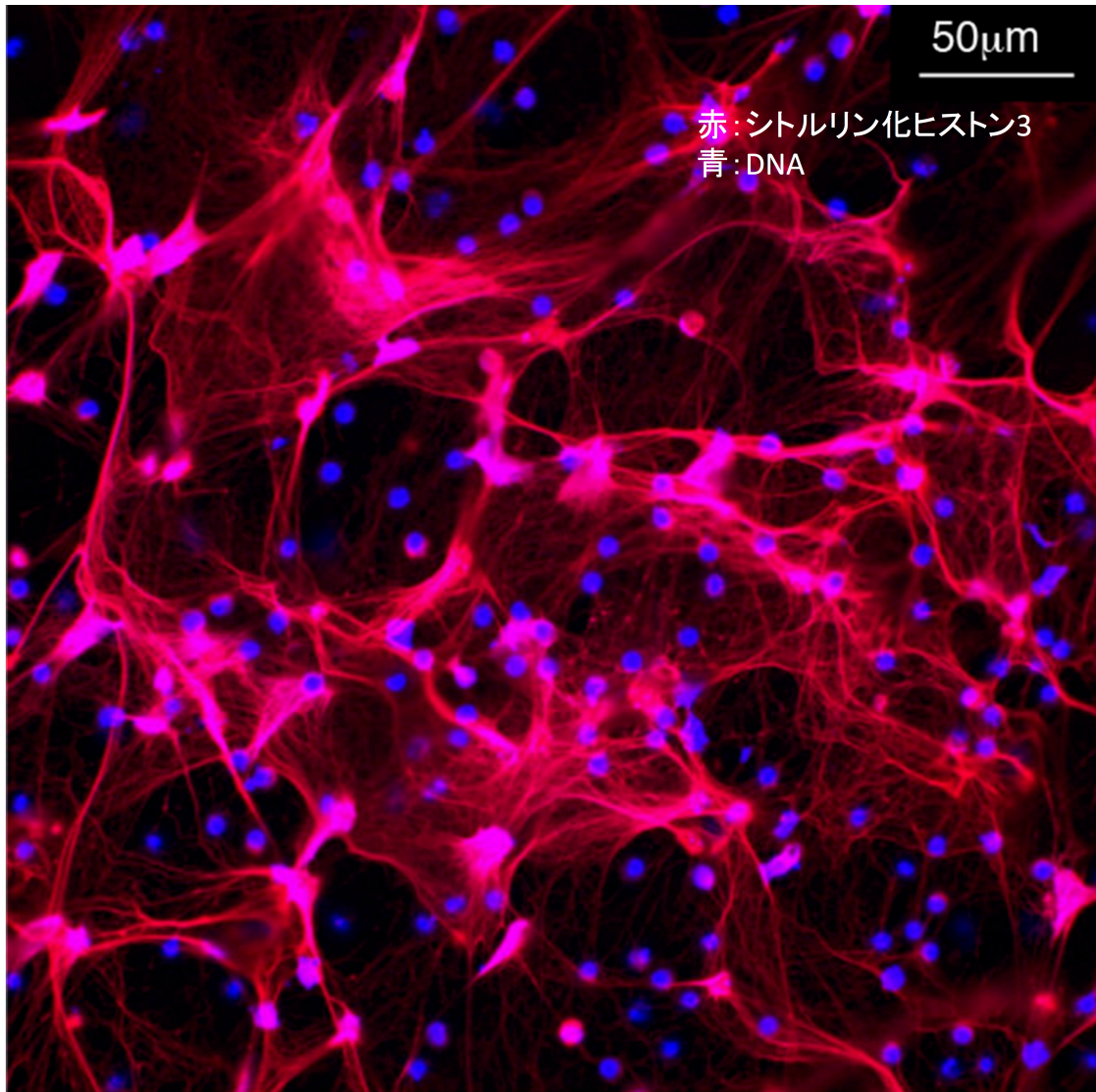


Figure 1. NETs の蛍光抗体法による染色像

Peter C et al, Leukoc Biol 2016 Feb;99(2): p257 より引用改変

略語表

ANCA	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody
B6/J	C57BL/6 J
B6/N	C57BL/6 N
BUN	Blood Urea Nitrogen
Cit H3	Citrullinated Histone 3
Cr	Creatinine
CRP	C-reactive protein
DAB	3, 3'-Diamino Benzidine
DBA	Dilute Brown Agouti
DAPI	4', 6-Diamidine-2'-Phenylindole Dihydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
fMLP	N-Formylmethionine-Leucyl-Phenylalanine
HE	Hematoxylin and Eosin
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
LDH	Lactate dehydrogenase
LPS	Liopolysaccharide
MPO	Myeloperoxidase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NZW	New Zealand White
PAD 4	Peptidylarginine Deiminase 4
PAR-1	Protease-activated receptor-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyde
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PR3	Proteinase 3
PHOX	Phagocytic oxidase (= NADPH oxidase enzyme complex)
PTU	Propylthiouracil
rTM	recombinant Thrombomodulin
SD	Standard Deviation
TM	Thrombomodulin

TNF- α Tumor Necrosis Factor- α

WKY Wistar Kyoto

第一章

MPO-ANCA 関連血管炎に対する Peptidylarginine deiminase 阻害薬の効果

背景

MPO-ANCA 関連血管炎 (MPO-AAV)はミエロペルオキシダーゼ(MPO)を対応抗原とする抗好中球細胞質抗体(MPO-ANCA)産生を特徴とする小型血管炎である。腎臓や肺を好発臓器とするが、その他にも神経や皮膚など全身臓器を標的とする。腎臓や肺が侵された場合には、急速進行性糸球体腎炎や肺出血など致命的な病態を来すことがあり、早期の適切な治療介入が重要となるが、その病態はまだ解明されていない部分が多い。

これまでの研究で自己抗体である MPO-ANCA の病原性が示されているが、MPO-ANCA 産生の機序は不明であった。これに対し近年、MPO-ANCA 産生に好中球細胞外トラップ (NETs)の制御異常が関与しているという報告があり、MPO-ANCA と NETs の関係が注目されている¹⁻³。

NETs とは、2004 年に Brinkmann らによって初めて報告された好中球の新しいタイプの細胞死である⁴。これは、好中球が MPO やエラスターゼなど殺菌蛋白に装飾された DNA 線維を放出して細胞死に至る、というものであり、自然免疫において重要な役割を果たしていると考えられている。その一方で、NETs が適切に処理されなければ、本来は細胞内に存在する DNA や蛋白が細胞外に露出した状態となり、それらが自己抗原として認識される可能性が指摘されている^{2,5}。

現在 MPO-AAV の治療薬としてステロイドやシクロフォスファミド、リツキシマブなど免疫抑制薬に関しては一定の効果が確立されているが、NETs と MPO-ANCA との関連が報告されたことにより、NETs を標的とした新しい治療薬の開発が期待されている。

NETs 形成に至る経路は不明な点が多いが、主に細菌に由来する fMLP や LPS の刺激などにより、活性酸素種産生を介して peptidylarginine deiminase 4 (PAD4)を活性化する経路と、活性酸素種産生を介さずに PAD4 を活性化する経路が考えられている⁶。活性化された PAD4 は核内に移行し、不明の経路を経て核膜の破綻を誘導し、それによって DNA やヒストンが細胞質蛋白と混合され、さらに細胞膜も破れて細胞内物質が細胞外へ放出され NETs が完成する (Figure 2)。

PAD は、蛋白質のアルギニンを脱イミノ化してシトルリンに変換する機能を

有する酵素群であり, 1-4, 6 の 5 つのサブタイプが知られている⁷. 発現分布はサブタイプにより異なり, それに伴い関連する疾患も異なっている. PAD4 は好中球を含む血球系細胞に発現しており, PAD4 の制御異常と関節リウマチや多発性硬化症などとの関連が報告されている^{8,9}. PAD4 の NETs 誘導経路での役割は, ヒストン尾部のアルギニンをシトルリンに変換して立体構造を変化させることにより, クロマチンの脱凝縮を起こすことである. そしてこの過程は NETs 形成に不可欠であることが知られている¹⁰.

Nakazawa らは, WKY ラットに抗甲状腺薬である PTU と炎症惹起物質である PMA を投与することによって MPO-ANCA 産生および糸球体腎炎, 肺出血を来すラットモデルを作製した². このモデルでは, PMA を注射した腹腔内に分解されにくい異常な NETs が形成され, これが生体局所に長期間存在することにより MPO に対する免疫寛容が破綻し, MPO-ANCA の産生が誘導され, MPO-AAV が誘導された可能性が考察されている.

本研究では *in vitro* で好中球に対して PMA および PTU 投与による NETs 誘導系を作製し, PAD 阻害剤である Cl-amidine の効果を検証した. さらに *In vivo* で MPO-ANCA 産生マウスを作製し, このモデルへの Cl-amidine 投与による効果を検証した.

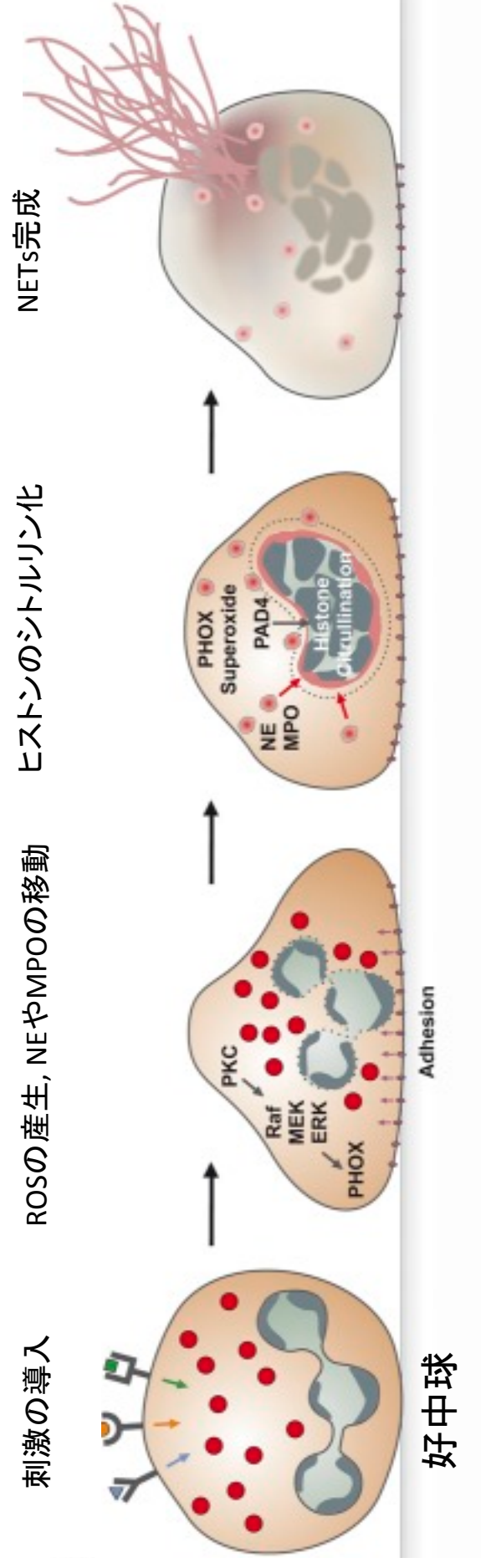


Figure 2. NETs 誘導のシエーマ

Brinkmann et al. J Cell Biol. 2012 Sep 3;198(5):p774 より一部改正して引用

方法

< *In vitro* 実験 >

1) 好中球の分離

健康人末梢血から Polymorphprep (Axis-Shield)を用いて、同剤と等量の血液を重層し、室温で 400G にて 40 分遠心し、好中球を分離した。

2) NETs 誘導

分離した好中球を RPMI 1640 培地(Sigma-Aldrich)で $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整し、4well チャンバースライド (Falcon)に 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ 播種した。さらに PMA (Sigma-Aldrich)は 20nM, PTU (Chugai Pharmaceutical) は 20 μM の濃度で、a)添加無し, b)PMA のみ, c)PTU のみ, d)PMA+PTU となるように 4 通りの well を作製し、37°Cで 2 時間培養した。

3) Cl-amidine 添加による NETs 抑制実験

分離した好中球を RPMI1640 培地で $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整し、4well チャンバースライドに 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ 播種したものに、PAD 阻害薬である Cl-amidine (Calbiochem)を 200 μM となるように添加し、37°Cで 15 分培養した後、PMA 単独、もしくは PMA と PTU を添加して、37°Cで 2 時間培養した。

4) NETs の評価, 定量

2 時間の培養後、すべての well 内の上清を除去し、4%PFA を添加して室温で 15 分固定した。PBS で 3 回洗浄後に、一次抗体として 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の rabbit anti-human citrullinated histone 3 (Cit-H3) polyclonal antibody (Abcam)を 1 時間室温で反応させ、二次抗体として 500 倍希釈の Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen)を 1 時間室温にて反応させた。PBS で 3 回洗浄後、DAPI (Sigma-Aldrich)を含む封入剤で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。NETs 誘導の定量評価は、1 スライド当たり 100 倍にて 5 視野ランダムに撮像し、1 視野当たりの Cit-H3 陽性細胞数を測定した。

< *In vivo* 実験 >

1) 使用するマウス系統の選択

どの系統のマウスを用いるのが良いか検討するため、予備的に BALB/c, NZW, B6/N, B6/J, DBA の 5 系統のマウスを用いて以下の実験を行った。PTU を 5%Glucose に 1mg/ml となるように溶解し、各系統のマウス 5 匹ずつに連日経口投与し、day0 と day7 に PMA を 50ng 腹腔内注射した。この方法で、マウスは 1 日当たり約 2.5mg の PTU を摂取した。5 系統すべてのマウスを day28 に屠殺して血清中の MPO-ANCA 値を測定し、全身臓器を組織学的に検索した。なお、動物実験は北海道大学動物実験に関する規程に従って行った。

2) MPO-ANCA 産生マウスモデルへの Cl-amidine 投与

予備検討の結果、BALB/c を用いることとした。14 週齢の雌の BALB/c マウスを、vehicle 群 (n=13) と Cl-amidine 群 (n=7) の二群に分けた。vehicle 群は給水ボトルに PTU 調整液 (1mg/ml) を入れて経口投与し、day0 と day7 に PMA50ng を腹腔内注射した。それに加えて連日 200 μ l の PBS を腹腔内注射した。Day13-14 に代謝ケージを用いて蓄尿し、day14 に屠殺して採血と解剖を行った。Cl-amidine 群は、Cl-amidine 0.3mg を 200 μ l の PBS に溶解して連日腹腔内注射し、その他の手順は vehicle 群と同様に行った。

3) 生化学検査

血尿は Dipstick (Siemens Healthcare) を用いて評価した。尿蛋白、尿中 Cr、血清 BUN、血清 Cr、血清 CRP 測定は岸本研究所に依頼した。ELISA による血清 MPO-ANCA 値の測定は A-CLIP 研究所に依頼した。

4) 組織学的評価

Day14 に解剖を行い、肺、腎臓、腹膜を採取した。それぞれ 10%ホルマリンにて固定し、肺と腎臓はパラフィン包埋切片を HE 染色して評価した。腹膜組織は、既報に従い、一次抗体として rabbit anti-human Cit-H3 polyclonal antibody (Abcam) を用い、酵素抗体法にて DAB を発色させて組織学的評価を行った^{11,12}。1 スライド当たり 100 倍にて 5 視野ランダムに撮像し、1 視野当たりの浸潤分葉核球に占める Cit-H3 陽性細胞の割合を測定した。

5) 統計学的解析

Student の t 検定または一元配置分散分析 one-way ANOVA 後の Tukey または Dunnett の多重比較検定にて群間比較を行い, p 値が 0.05 未満をもって有意とした.

結果

< *In vitro* 実験結果 >

1) NETs 誘導に対する Cl-amidine の効果

PMA により刺激された好中球は既報の通り流線型の NETs を形成し(図 1a), PMA および PTU によって刺激された好中球も既報の通り円型の NETs を形成した(図 1c). これに対し, PAD 阻害薬である Cl-amidine で処理した好中球は PMA 単独, PMA および PTU による刺激を受けても NETs 形成はほとんどみられなかった (図 1b, d).

また, 添加した試薬別に NETs 陽性細胞数を定量したところ, Cl-amidine 添加により NETs 陽性細胞は有意に減少しており(図 2), Cl-amidine は流線型 NETs と円型 NETs いずれの形成も阻害することが確認された.

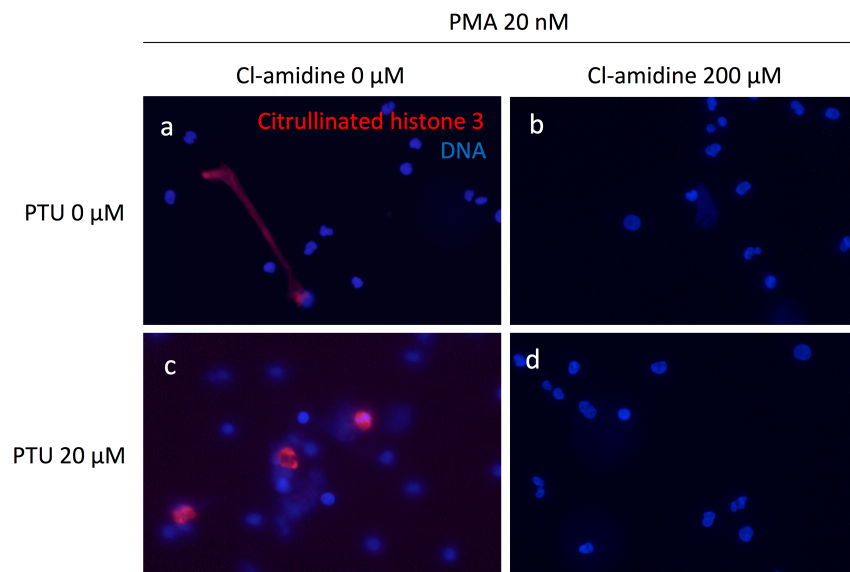


図 1. *In vitro* における Cl-amidine の NET 誘導への影響

a) PMA b) PMA+Cl-amidine c) PTU+PMA d) PTU+PMA+Cl-amidine (a-d; $\times 400$). 青は DNA, 赤は Cit-H3 を示す.

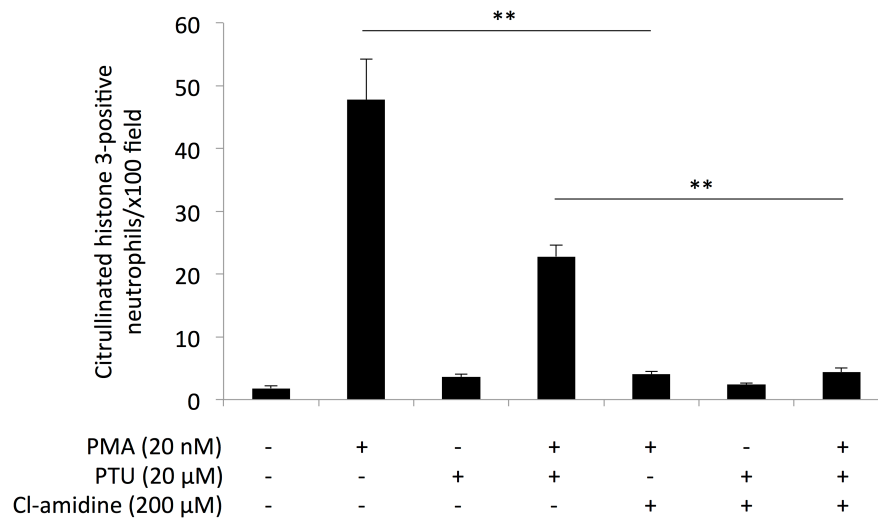


図 2. 添加試薬別の Cit-H3 陽性細胞数

PMA, PMA および PTU によって誘導される Cit-H3 陽性細胞数は Cl-amidine 添加により有意に減少した. 平均値±標準誤差, N=4-5, **p<0.01.

< *In vivo* 実験結果 >

1) 使用するマウス系統の選択

BALB/c, NZW, B6/N, B6/J, DBA の 5 系統のマウスに PTU を経口投与し, day0 と day7 に PMA を腹腔内注射した. Day28 の血清において, BALB/c マウスと NZW マウスの MPO-ANCA 値がその他の系統と比べて高値であった (BALB/c $100.4 \pm 12.0 \text{ ng/ml}$, NZW $96.1 \pm 12.8 \text{ ng/ml}$, B6/J $31.6 \pm 5.79 \text{ ng/ml}$, B6/N $41.3 \pm 0.89 \text{ ng/ml}$, DBA $32.0 \pm 4.06 \text{ ng/ml}$) (図 3a, b). すべての系統で血尿, 蛋白尿は陰性であり, 血清中の CRP 値, Cr 値, BUN 値の上昇も認めなかった (図 3b). 病理組織学的な検討では, いずれの系統のマウスにも明らかな腎炎・血管炎は確認されなかった (図 3c).

以上より, BALB/c マウスを MPO-ANCA 産生モデルとして使用することとした. なお, BALB/c マウスは day14 の採血にて, 血清 MPO-ANCA 値が $79.0 \pm 5.70 \text{ ng/ml}$ とすでに十分な抗体価を示しており, 実験期間は 14 日間とした.

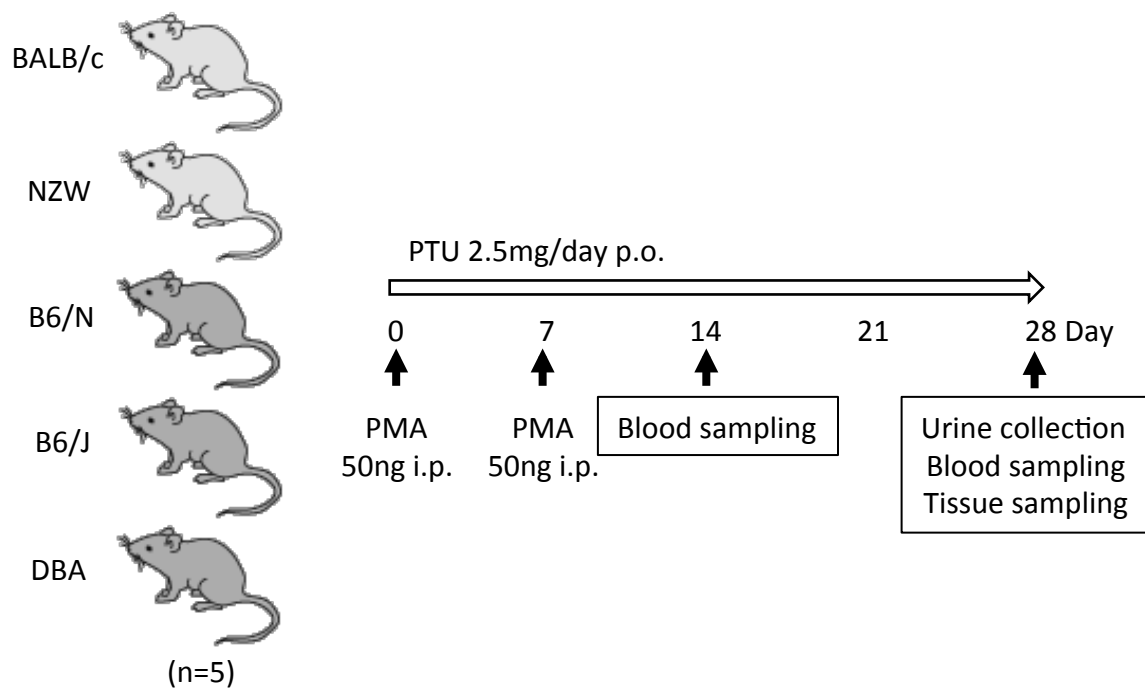


図 3. 使用するマウス系統を選択するための予備実験

BALB/c, NZW, B6/N, B6/J, DBA の 5 系統のマウス 5 匹ずつに PTU 2.5mg を連日経口投与し, day0 と day7 に PMA を 50ng 腹腔内注射した. Day14 に採血して血清 MPO-ANCA 値を測定し, day28 に屠殺して, 採血および解剖を行った. また, 屠殺前日に蓄尿し, 尿検査を行った.

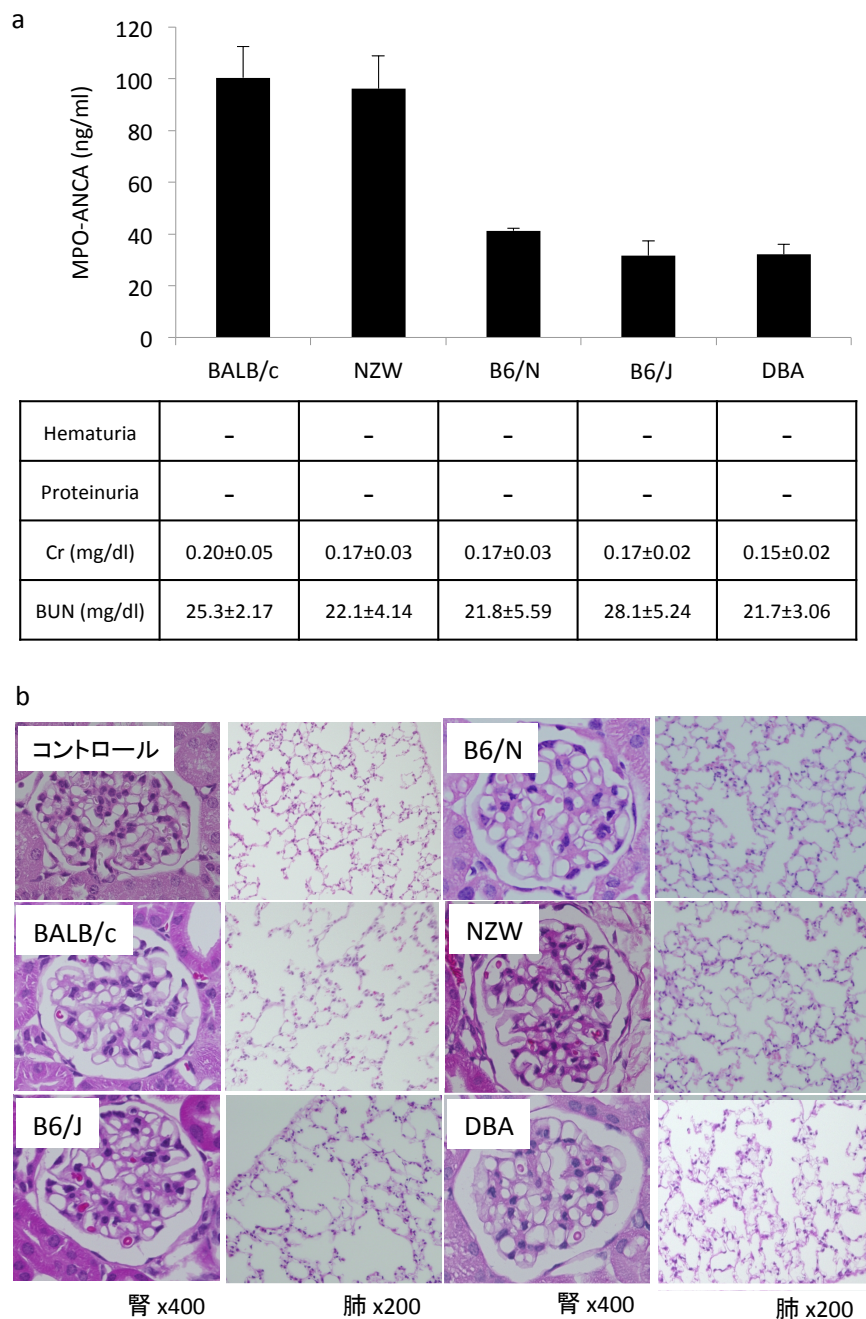


図 4. PTU および PMA 投与による各系統マウスへの影響

a) Day28 における系統別の血清 MPO-ANCA 値を示す. BALB/c および NZW の血清 MPO-ANCA 値が他の系統に比べて高値であった. 表は系統別の尿潜血, 蛋白尿, 血清 Cr 値, 血清 BUN 値を示す. 尿所見はすべて陰性で, いずれの系統でも血清 Cr 値や血清 BUN 値の上昇は認めなかった.

b) 5 系統マウスの腎と肺組織の HE 染色像. (左段が腎; ×400, 右段が肺; ×200). いずれの系統も腎炎や肺胞出血を発症しなかった.

2) 腹膜における Cl-amidine の NETs 形成阻害作用

14 週齢の雌の BALB/c マウスを, vehicle 群 (n=13) と Cl-amidine 群 (n=7) の二群に分けた. 両群とも, PTU を 2.5mg/day 経口投与し, day0 と day7 に PMA50ng を腹腔内注射した. Vehicle 群には連日 200μl の PBS を腹腔内注射した. Day13-14 に代謝ケージを用いて蓄尿し, day14 に屠殺して採血と解剖を行った. Cl-amidine 群は, Cl-amidine 0.3mg を 200μl の PBS に溶解して連日腹腔内注射し, その他の手順は vehicle 群と同様に行った (図 5a).

Day 14 に採取した腹膜組織を用いて Cit-H3 陽性細胞を免疫組織化学的に検出した. Cl-amidine 群では腹膜に浸潤した分葉核球中に占める Cit-H3 陽性細胞の割合が vehicle 群に比べて有意に低値であった(38%減少) (図 5b, c).

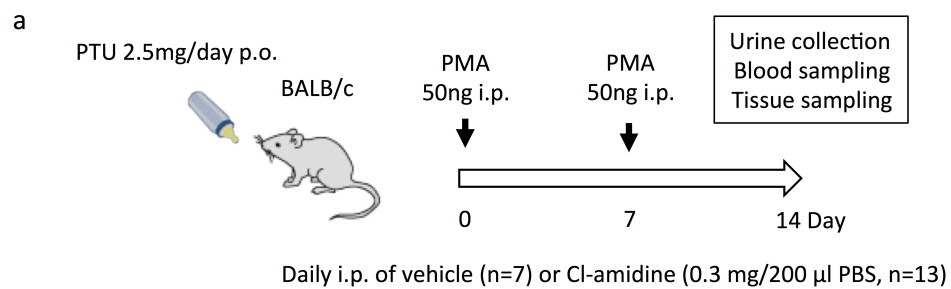
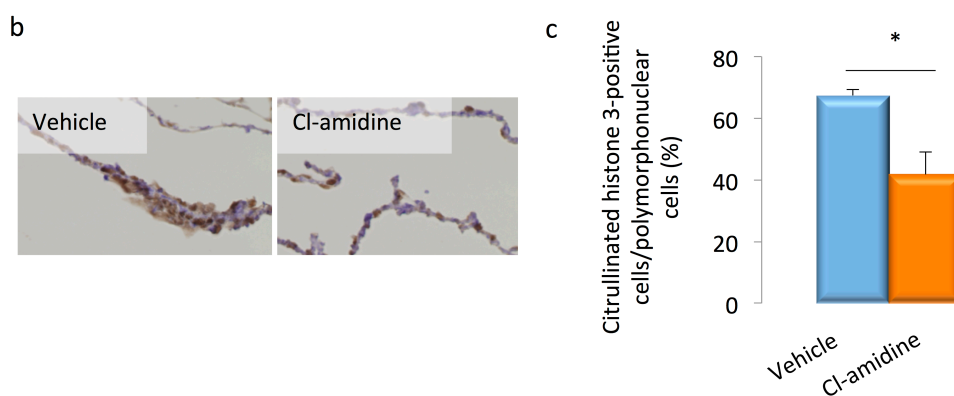


図 5. 腹膜組織における NETs 誘導に対する Cl-amidine の影響

a) 実験プロトコルを示す.

b) 茶色が Cit-H3 陽性細胞を示している.

c) 1 スライド当たり 100 倍にて 5 視野ランダムに撮像し, 1 視野当たりの浸潤分葉核球に占める Cit-H3 陽性細胞の割合を測定した. 平均値±標準誤差, N=7-13, * $p<0.05$.

3) Cl-amidine による MPO-ANCA 産生の抑制

Day14 における MPO-ANCA 抗体価は Cl-amidine 群で平均 33ng/ml, vehicle 群で平均 133ng/ml であり, 明らかな有意差をもって Cl-amidine 群で低値であった (図 6).

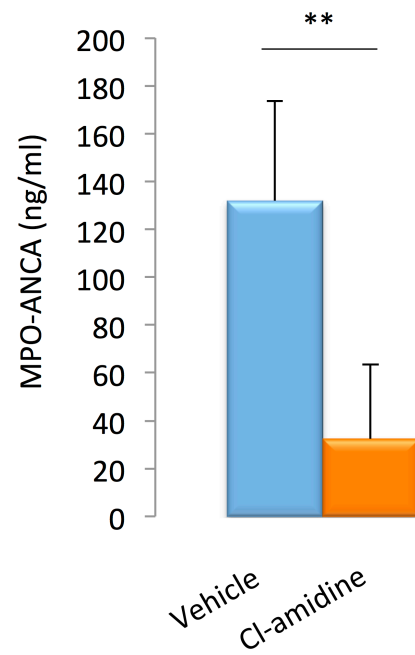


図 6. MPO-ANCA 産生に対する Cl-amidine の影響

Day14 における vehicle 群と Cl-amidine 群の MPO-ANCA 値を示す. 平均値±標準誤差, N=7-13, **p<0.01

考察

PMA によって刺激された好中球は、殺菌蛋白のちりばめられた脱凝縮した DNA を放出して NETs を形成する⁴. NETs は細菌に結合して殺菌能力を発揮し、自然免疫において重要な役割を果たすと考えられている. 慢性肉芽腫症患者では NETs を形成することができないために様々な細菌や真菌感染に罹りやすいが、遺伝子治療によって NETs 誘導能を回復させることにより、これらの感染に対する抵抗性が獲得されたことも報告されている¹³.

PMA による刺激を受けた好中球は、NETs 形成を経て細胞死に至る¹⁴. この細胞死はアポトーシスともネクローシスとも異なる特徴をもっており、NETosis と名付けられた¹⁵. 一方で Clark らは、NETs 形成の後、好中球は必ずしも細胞死には至らないことを報告した¹⁶. 好中球が貪食能や遊走能を保ちながら NETosis を起こしうることも報告され^{17,18}, これを vital NETosis と呼ぶようになった. これに対し前述の古典的 NETosis は suicidal NETosis を呼ばれるようになった.

NETs は自然免疫において重要である一方で有害な側面も持っている^{19,20}. NETs の有害性として、血小板凝固亢進作用や血管内皮細胞への直接的な組織傷害²¹⁻²³, 病原性を有する自己抗体産生への関与が指摘されている^{2,5}. 例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)患者の 30-40%で血清中の DNase I の作用低下による NETs 分解能の低下が指摘されており、そのことが抗 DNA 抗体産生ならびに疾患重症度に関係していることが報告されている⁵. また、ラットを用いた実験では、PTU により異常な形態を呈し DNase I 抵抗性を示す NETs が形成され、この NETs に含まれる MPO が免疫システムに認識されて MPO-ANCA 産生に繋がっていることも示唆されている². PTU の一部は MPO によって代謝されることが知られており、その際に MPO の構造変化が生じて²⁴, MPO に対する免疫寛容の破綻が誘導される可能性が示唆されている.

本研究で、我々は MPO-ANCA 産生モデルマウスを作製した. 5 系統のマウスを用いて既報のラットモデルのプロトコルを参照に², PTU と PMA を投与してその反応をみたところ、興味深いことに、系統によって MPO-ANCA 産生の程度に差を認めた. 系統による差異の要因は今後さらに追求が必要であるが、BALB/c マウスの Th2 優位性²⁵や NZW マウスの自己免疫背景²⁶が MPO-ANCA

産生の生じやすさに関与した可能性がある。一方で、既報の WKY ラットによる実験では軽度ながら肺胞出血や糸球体腎炎が発症したのに対し²、マウスモデルでは血管炎を示唆する所見を認めなかった。PTU および PMA 投与による MPO-AAV の誘導には種差が存在する可能性が示唆される。

Neeli らは炎症環境下において活性化好中球における PAD4 依存性のヒストンの脱イミノ化を実証した²⁷。PAD4 機能に障害をもつ好中球では NETs が誘導されず、PAD4 が NETs 形成において重要な役割をもつことが明らかになっている²⁸。同様に PAD 阻害剤である Cl-amidine がヒストン H3 のシトルリン化を阻害し、好中球性の前骨髄球である HL60 細胞におけるカルシウムイオノフォアや *Shigella flexneri* 刺激による NETs 形成を抑制することが報告されている²⁹。さらに、Cl-amidine はループス腎炎モデルマウスにおいて NETs 形成を抑制することが報告されている³⁰。Cl-amidine は PAD のシステインを不可逆的に不活性化することが明らかになっている³¹。

これらの知見から、我々は Cl-amidine を使用してヒストンのシトルリン化、そしてそれに引き続く NETs 形成を阻害する実験を *in vitro* ならびに *in vivo* で行った。本研究では *in vitro*, *in vivo* にて既報の Cl-amidine による NETs 形成抑制作用を確認し、さらに *in vivo* において Cl-amidine が MPO-ANCA 産生を抑制することを明らかにした。これらの結果から、過剰な NETs 形成が MPO-ANCA 産生に関与しているとする Nakazawa らの説が支持された。より直接的に MPO-ANCA 産生における PAD4 依存性の NETs 形成の関与を実証するためには、PAD4 ノックアウトマウスを用いた実験が必要である。

本研究における limitation は、*in vivo* における NETs の生成量を反映する指標として、血清中の MPO-DNA 複合体を測定しなかったことである。しかし、PMA および PTU によって誘導された NETs は血清中に可溶型としてほとんど存在しないことが示されているため²、本研究では組織の免疫染色によって Cit-H3 を検出することにより NETs 形成を評価した。

また、本研究で作製したマウスモデルでは血管炎の表現型を得ることができなかったため、Cl-amidine の MPO-ANCA 産生抑制効果が MPO-AAV 発症にどのような効果をもたらすのかを検証できなかったことも付記すべき limitation である。マウスモデルにおいて PMA および PTU の増量や投与期間の延長などが血管炎発症を誘導しうるのか、今後の検証が必要である。

MPO-ANCA は MPO-AAV において主要な病原性因子であることが知られて

おり^{32,33}, 病原性自己抗体の産生を抑制する効果を持つ Cl-amidine は MPO-AAV の治療薬の候補となり得る. 既報では SLE³⁰ や多発性硬化症³⁴, コラーゲン誘導関節炎³⁵, 炎症性腸疾患³⁶ などの動物モデルに対する Cl-amidine の一定の効果が報告されている. 安全性, 忍容性などは今後検証されなければならないが, Cl-amidine は MPO-AAV を含めた NETs 関連疾患に対する新しい治療薬の候補となると考えられる.

第二章

好中球細胞外トラップの血管内皮細胞障害に対する
リコンビナントトロンボモジュリンの効果

背景

第一章で述べたように, NETs は長時間生体内局所に存在することにより自己抗原となり得ることが報告されているが, それと同時に NETs による直接的な血管内皮細胞障害についても報告がある³⁷.

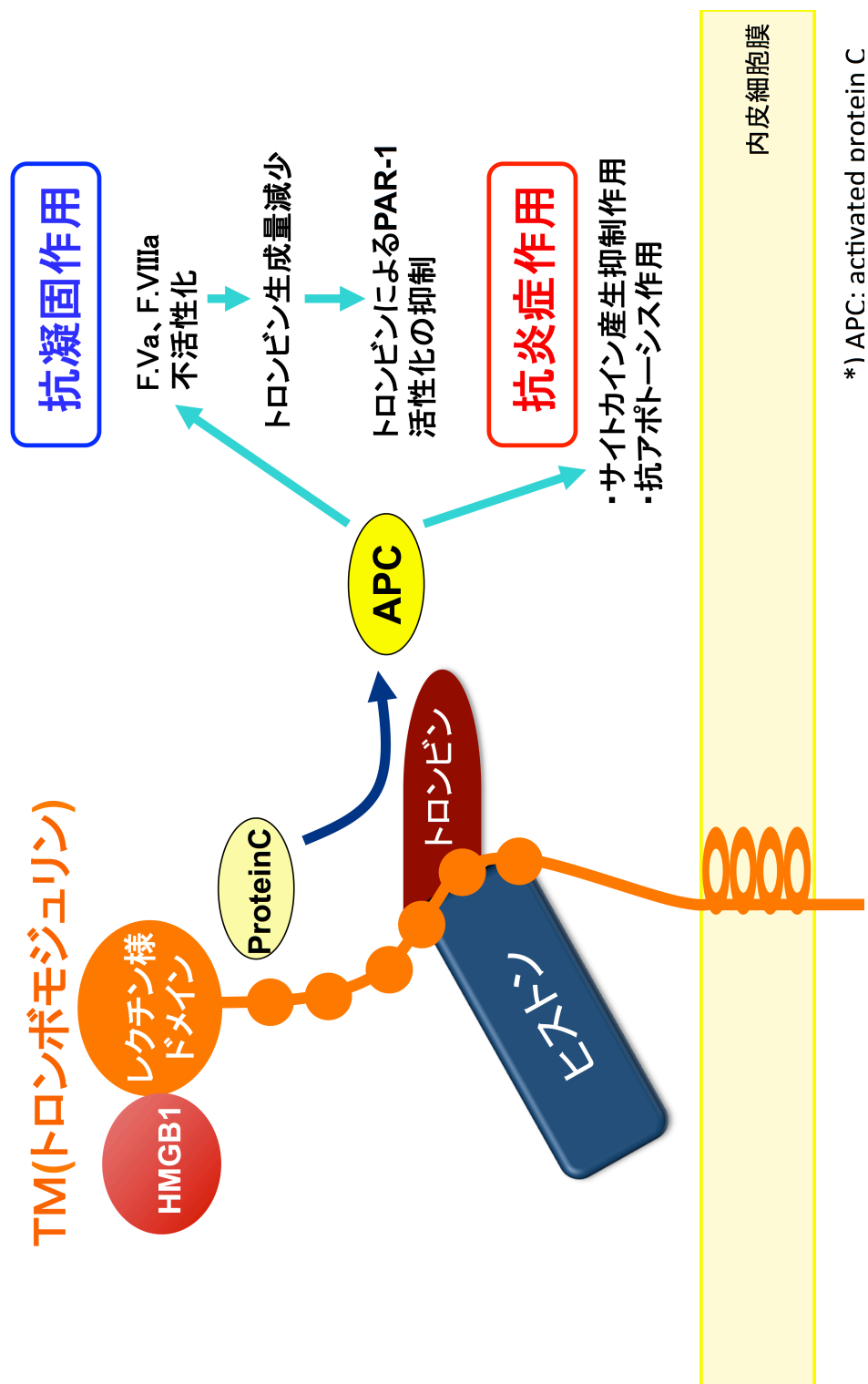
血管内皮細胞表面に発現する 105kDa の糖蛋白質であるトロンボモジュリン(TM)は生体内において活性化プロテイン C(APC)を介する, または介さない経路で抗凝固作用や抗炎症作用を発揮することが知られている(図 7). 2008 年より本邦で TM の細胞外領域の遺伝子組み換え製剤であるリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)が播種性血管内凝固症候群(DIC)における治療薬として広く使用されているが, その効果の詳細な機序についてはまだ不明な点も多い.

NETs の形成に伴って放出される細胞外ヒストンについては, 好中球の遊走や血小板凝集, 血管内皮細胞障害を促進作用が知られており²³. また, rTM により, ヒストンの凝固亢進作用が抑制されたという報告がある²¹.

TM を構成するドメインにおいて上皮成長因子(EGF)様ドメインは直接ヒストンに結合することが明らかになっているが, その生理的意義は現在のところ不明である.

以上を踏まえ, 我々はヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて NETs およびその細胞障害の主役と想定されているヒストン, ならびに NETs そのものによる細胞障害性を rTM によって抑制できるか検証した.

また, Damage-associated molecular patterns (DAMPs)の 1 種で, かつ NETs の構成成分である High mobility group box-1 (HMGB-1)は好中球の TLR4 を介して NETs を誘導するという報告がある³⁸. さらに rTM は HMGB-1 に直接結合して抗炎症作用を発揮することが明らかになっており³⁹, 誘導された NETs 中の HMGB-1 による NET 誘導を rTM によって抑えられるのではないかと考え, rTM によって NETosis そのものを抑制できるかについても検証した.



*) APC: activated protein C

図 7. リコニンビサントトロンボモジュリンの作用

方法

1) 好中球の分離

健康人末梢血から Polymorphprep (Axis-Shield)を用いて、同剤と等量の血液を重層し、室温で 400G にて 40 分遠心し、好中球を分離した。

2) rTM 添加による NETs 誘導抑制実験

分離した好中球を RPMI1640 培地で $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整し、4well チャンバースライドに 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ播種した。そのうち 2 つの well に、rTM を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、37°C で 60 分培養した後、2 つの well に PMA (Sigma-Aldrich) を 40nM の濃度になるように添加し、a) 添加無し、b)rTM100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のみ、c)PMA のみ、d)PMA+ rTM となるように 4 通りの well を作製し、37°C で 2 時間培養した。その後、すべての well 内の上清を除去し、4%PFA を添加して室温で 15 分固定した。PBS で 3 回洗浄後に、一次抗体として 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の rabbit anti-human citrullinated histone 3 (Cit-H3) polyclonal antibody (Abcam)を 1 時間室温で反応させ、二次抗体として 500 倍希釈の Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen)を 1 時間室温にて反応させた。PBS で 3 回洗浄後、DAPI (Sigma-Aldrich)を含む封入剤で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。NETs 誘導の定量評価は、1 スライド当たり 100 倍にて 5 視野ランダムに撮像し、1 視野当たりの Cit-H3 陽性面積を Image J で測定した。

3) ヒストンの HUVEC に対する細胞障害性の評価および rTM の効果

96 well プレート上に HuMedia で $5 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した HUVEC 細胞溶液を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 添加して一晩培養した。その後、培地を交換して 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の未分画ヒストン(Sigma Aldrich)を添加し、5 時間培養後に LDH 放出試験で細胞障害度を評価した。LDH 放出試験は cytotoxicity LDH assay kit-WST (Dojindo)を用いて行った。

ヒストンの細胞障害性に対する rTM の効果はヒストン濃度を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に固定し、rTM を 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 1 時間静置してからヒストンを添加し、4 時間培養後に LDH 放出試験で細胞障害

性を評価した.

4) HUVEC 添加用 NETs の準備

健康人から分離した好中球を RPMI 1640 培地(Sigma-Aldrich)で $1 \times 10^5/\text{ml}$ となるように調整し, 10cm dish に 10ml 播種した. さらに PMA (Sigma-Aldrich) を 40nM の濃度になるよう添加し, 37°C で 4 時間培養した. その後, 上清を廃棄し, 1ml の HuMedia を添加した後に底面に残存している NETs をセルスクレーパーを用いて回収した.

回収した NETs は well 添加時に 1x (=好中球 1.7×10^3 由来/ml), 3x (= 5.1×10^4 由来/ml), 5x (= 8.5×10^4 由来/ml), 10x (= 1.7×10^5 由来/ml)となるようにそれぞれ添加量を決めて HuMedia にて希釈調整した.

5) NETs の HUVEC に対する細胞傷害性の評価および rTM の効果

回収した NETs を well 添加時に 1x (=好中球 5.0×10^3 由来), 3x (= 1.0×10^4 由来), 5x (= 2.5×10^4 由来), 10x (= 5.0×10^4 由来)となるようにそれぞれ添加量を決めて HuMedia にて希釈調整した. それぞれの濃度の NETs を HUVEC へ添加して 5 時間培養し, その後 Cell counting kit-8 を用いて細胞生存率を測定した.

6) 統計学的解析

Student の t 検定または一元配置分散分析 one-way ANOVA 後の Tukey または Dunnett の多重比較検定にて群間比較を行い, p 値が 0.05 未満をもって有意とした.

結果

1) rTM による NETs 誘導抑制効果

rTM100ng/ml による 1 時間の前培養にて PMA によって誘導される NETs は有意に抑制された(図 8, 9).

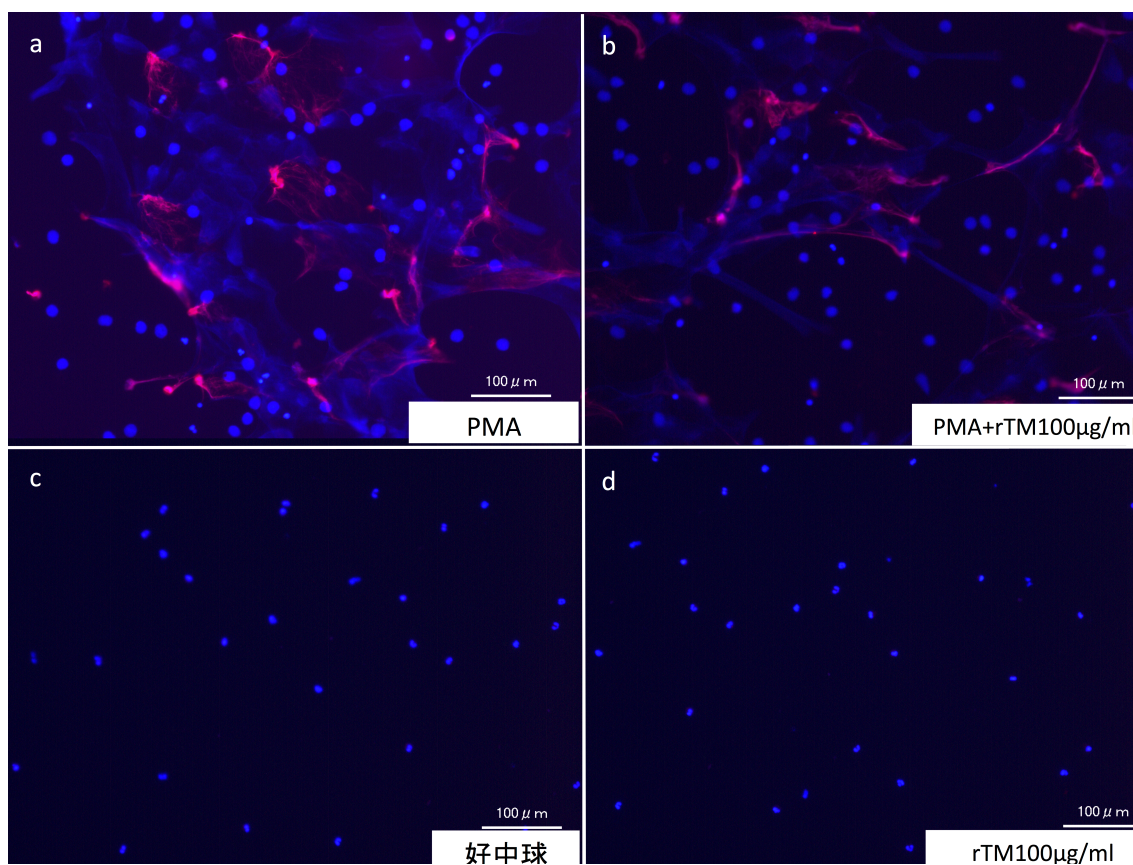


図 8 . rTM の NETs 誘導への影響

a) PMA b) PMA+rTM100 μ g/ml c) 添加なし d) rTM100 μ g/ml

(a-d; $\times 200$). 青は DNA, 赤は Cit-H3 を示す.

シトルリン化ヒストンH3 陽性面積

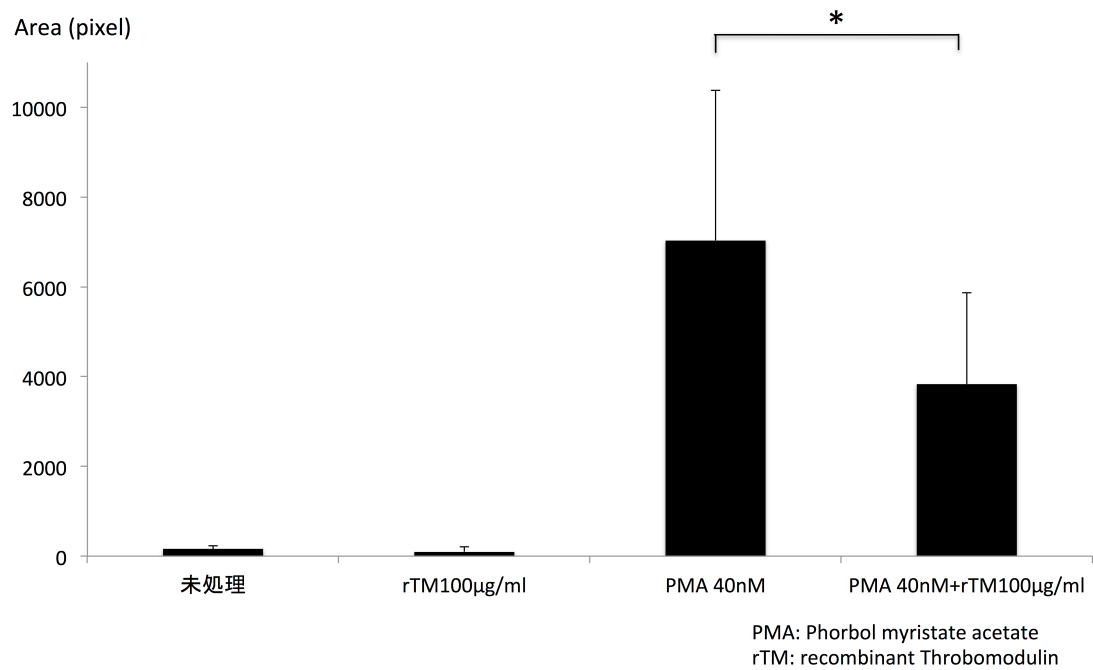


図 9. 添加試薬別の Cit-H3 陽性面積

添加試薬別に Image J にて 1 スライド当たり 100 倍視野にて 5 視野ランダムに撮像し, 1 視野当たりの Cit-H3 陽性面積を測定した. 平均値±標準誤差, N=3, * $p<0.05$.

2) ヒストンによる HUVEC に対する細胞障害性の確認

既報の通り、ヒストンの濃度依存性に細胞障害性の上昇が認められた(図 10).

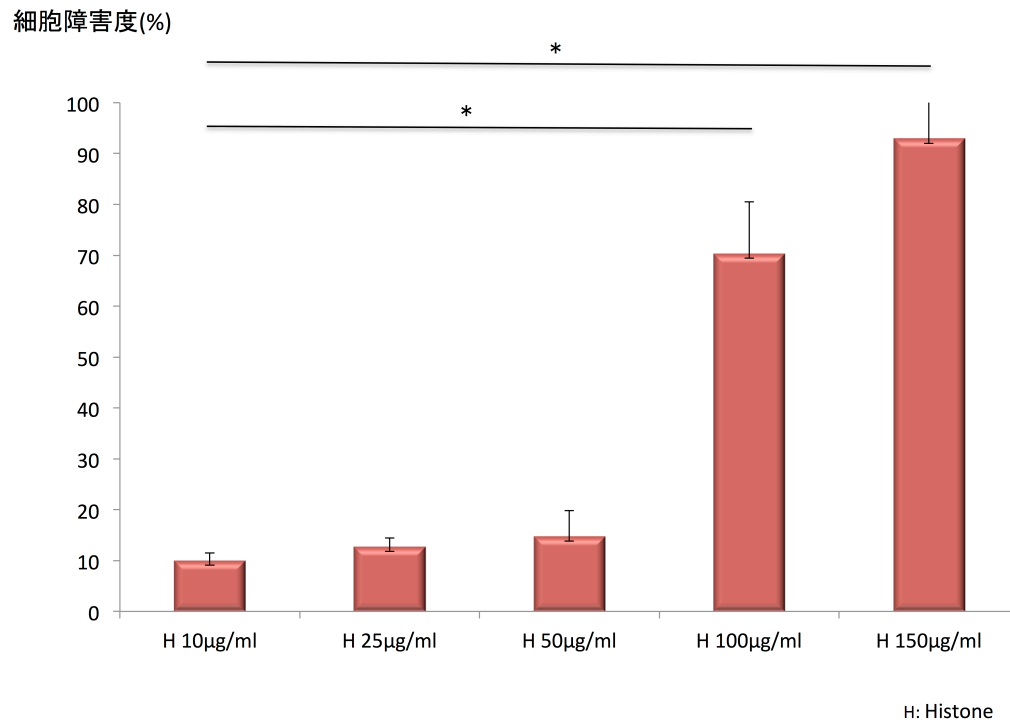


図 10. ヒストンの HUVEC への細胞障害

10~150 μ g/ml のヒストン濃度で HUVEC を 4 時間培養し, LDH 放出試験で細胞障害度を測定した. 平均値 $\pm$ 標準誤差, N=5, *p<0.05.

3) ヒストンによる血管内皮細胞障害に対する **rTM** の抑制効果

100 μ g/ml 以上の **rTM** で 1 時間前培養することにより, ヒストンの HUVEC に対する細胞障害性が抑制された(図 11).

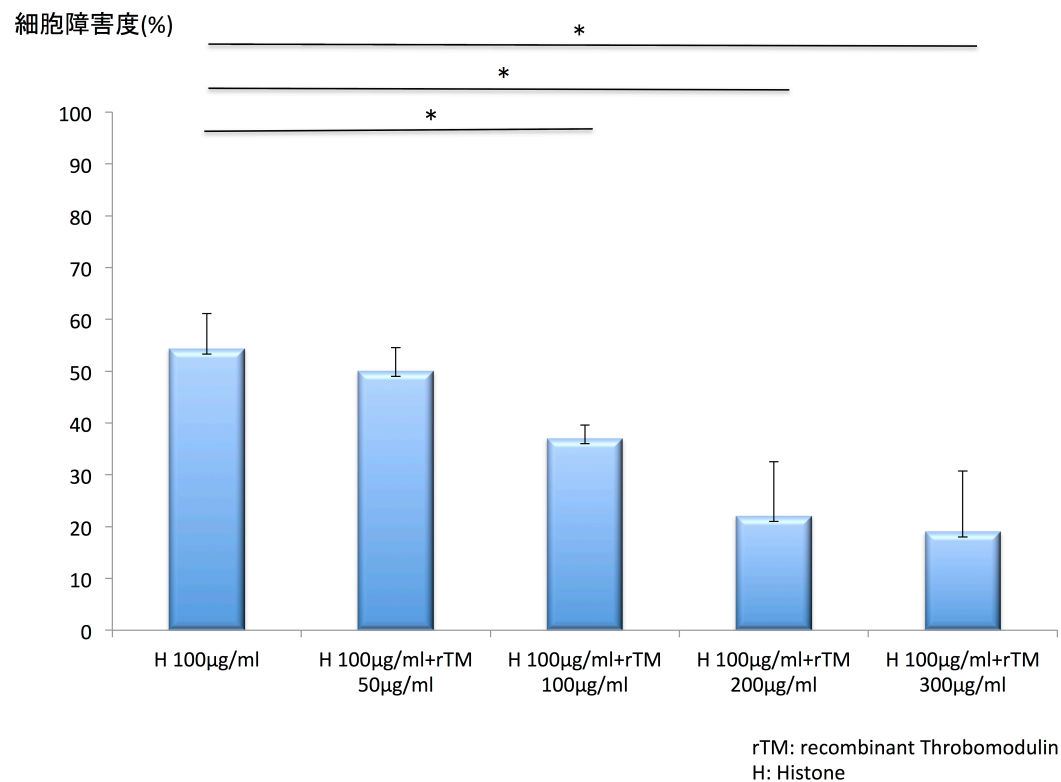


図 11. 添加濃度別の rTM のヒストンによる血管内皮細胞障害の抑制効果
前培養として 50～300 μ g/ml の rTM を添加し, ヒストン 100 μ g/ml で 4 時間培養した後, LDH 放出試験で細胞障害性を測定した. 平均値 $\pm$ 標準誤差, N=5, *p<0.05.

4) NETs による HUVEC に対する細胞障害性

添加した NETs の濃度が高いほど HUVEC の細胞生存率は低下しており, NETs の HUVEC に対する濃度依存的な細胞障害性が認められた(図 12).

細胞生存率(%)

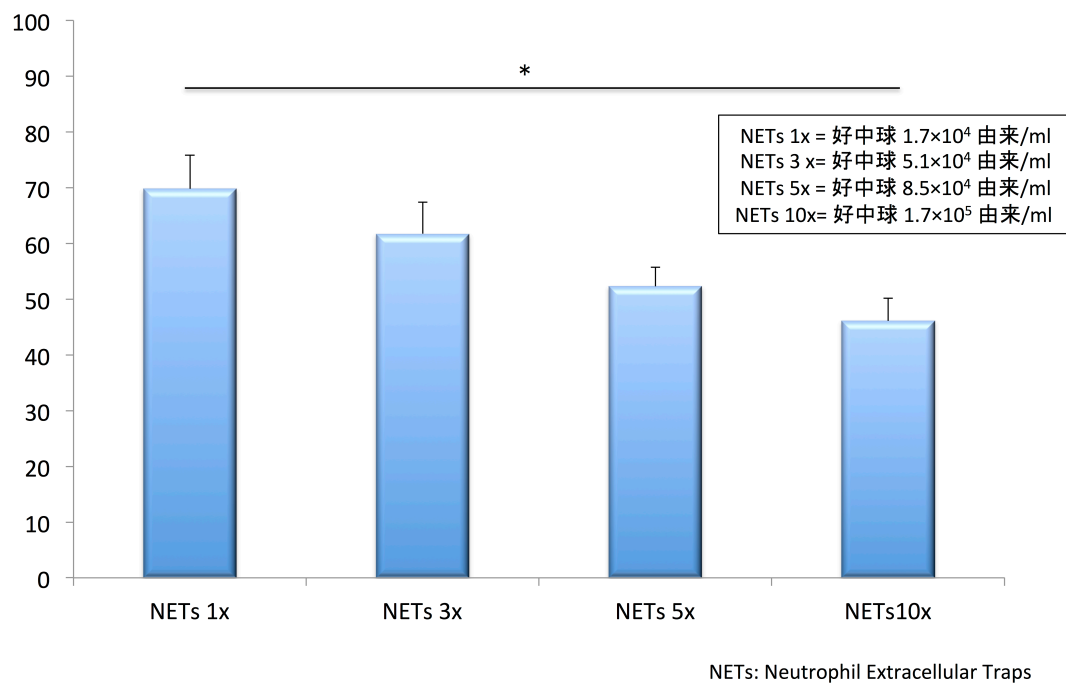


図 12. 添加 NETs の濃度別の HUVEC に対する細胞障害性

種々の濃度の好中球数から誘導した NETs を HUVEC に添加し, 4 時間後に WST assay によって細胞生存率を測定した. 平均値±標準誤差, N=5, * $p < 0.05$.

5) NETs による血管内皮細胞障害に対する rTM の抑制効果

rTM は $100\ \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で NETs 5x の細胞障害性を有意に抑制することが確認された(図 13).

細胞生存率 (%)

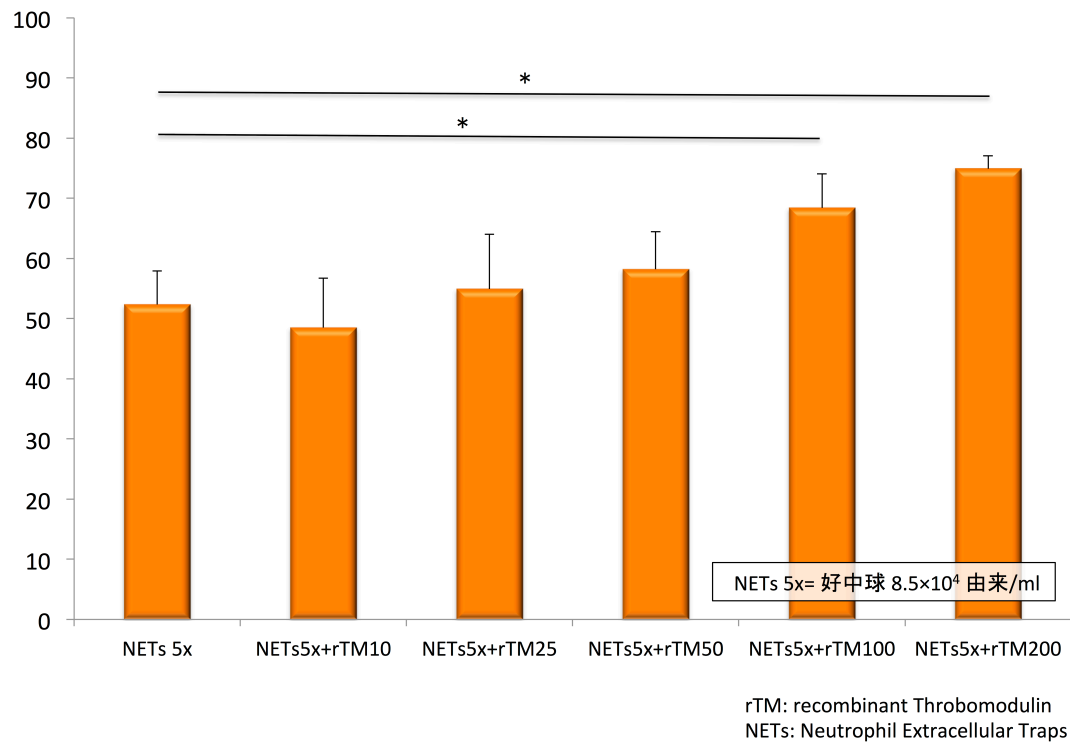


図 13. 添加濃度別の rTM の NETs による血管内皮細胞障害の抑制効果
前培養として $50 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ の rTM を添加し, NETs 5x (好中球 8.5×10^4 由来/ml) で 4 時間培養した後, WST-assay 試験で細胞生存率を測定した. 平均値 $\pm$ 標準誤差, $N=5$, $*p<0.05$.

考察

TMは血管内皮細胞表面に発現する分子量105kDaの糖蛋白であり、レクチン様ドメイン、EGF様ドメイン、セリン/スレオニン残基に富むドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインから構成される⁴⁰.

TMの生体内での生理機能としては、トロンビンと結合してトロンビン-TM複合体となり、これがプロテインCを活性化することによるAPCを介した抗凝固作用⁴¹や抗炎症作用⁴²、細胞保護作用⁴³などがよく知られている。一方で、TMはAPCを介さない生理機能も有しており、レクチン様ドメインはDAMPsであるHMGB-1に直接結合して抗炎症作用を発揮する³⁹。また、同ドメインは他にもLPSなどのpathogen-associated molecular patterns (PAMPs)のTLR4/CD14への結合阻害や⁴⁴、補体経路の古典経路およびレクチン経路の活性化抑制作用も報告されている⁴⁵。EGF様ドメインはAPC活性化作用や⁴⁶、トロンビンとの結合を介したthrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)活性化による線溶系阻害作用⁴⁷、さらに補体制御作用^{48, 49}などが報告されている。また、細胞外ヒストンへEGF様ドメインが直接結合することが明らかになっている^{37, 50}。

NETs誘導のシグナル伝達に関しては不明な点が多いが、誘導刺激の種類によって経路が異なり、NADPH酸化酵素を介さない経路と介する経路があることが報告されている⁵¹。rTMによって血小板共培養によるLPS誘導NETosisが抑制されたことが報告されているが⁵²、これはrTMの血小板TLR-4/CD14への拮抗阻害作用⁴⁴による可能性が考えられる。一方でPMAによって誘導されるNETsはLPSに誘導されるNETsとは異なる経路で形成され则认为られている。

また、HMGB-1は好中球のTLR4を介してNETsを誘導するという報告がある³⁸。そこで我々はPMA誘導NETosisもrTMによって抑制される可能性を考えた。実際に、rTMによる前培養後にPMAを添加したところ、NETs形成の有意な抑制が確認された。このPMA誘導NETsの抑制はNETs中のHMGB-1によるNETs誘導作用がrTMによって阻害されたことによる可能性が考えられるが、PMAにより誘導されるNETsはrTMでは抑制されないという相反する報告もあり⁵³、今後さらに詳しい探求が必要である。なお、補体とNETsの関係に関し

では前述のように rTM は補体を制御することが知られており、補体制御因子である Factor H が NETs 誘導を制御していることを示した報告や⁵⁴, C3a 受容体の upregulation により NETs 誘導が上昇すること⁵⁵, さらには C5 阻害剤によって NETs 誘導が抑制されたという報告もある⁵⁶. したがって, *in vivo* では補体に関連した NETs 誘導の抑制効果も加えて期待できると考えられる.

また, 本研究では既報におけるヒストンの細胞障害性をまず LDH 放出試験にて確認し, 新規の事実としてこの系に rTM による前培養を行うことによってヒストンの細胞障害性が抑制されることを実証した. さらに, ヒストンと同様に NETs 自体の細胞障害性も rTM によって抑制されることが明らかになった. なお, NETs の HUVEC に対する細胞障害性の評価方法に関しては LDH 放出試験では好中球由来の LDH の影響が出てしまうため, 生細胞の活性を測定する WST-8 assay にて評価した.

細胞外ヒストンは NETs の直接的な組織障害性の主たる要因である可能性が報告されており²¹, 本研究にて得られた rTM の NETs による血管内皮細胞障害に対する抑制効果は主にヒストンに対する効果である可能性が考えられた. 今後, NETs 成分に含まれるヒストンの濃度を測定し, そのことを明らかにする必要がある.

本研究では rTM は PMA 誘導 NETosis の抑制, ならびに NETs による細胞障害性の軽減効果を認めた. すでに産生された NETs による細胞障害性を抑制しつつ, 新たな NETs 産生を抑制することで NETs に関連した病態の改善に寄与する可能性を示唆している.

今後は MPO-ANCA の産生とともに半月体形成性糸球体腎炎を発症する SCG/KJ マウスを用いて, rTM の効果を検討する予定である. なお, 本実験では血管内皮細胞障害の程度を, 用いた assay の測定感度以上にするために, 実臨床よりも高い濃度でヒストンを使用した. その細胞障害性を抑制するために rTM も高濃度を要したが *in vivo* では臨床的な投与量に近い量でヒストンによる血管内皮細胞障害を抑制できる可能性があると考えられるため, *in vivo* の実験では用量をできる限り実臨床に沿った濃度で行うよう計画している.

総括および結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである。

- ・ ヒト好中球において PTU および PMA の添加によって誘導される円形の NETs 形成が PAD 阻害薬である Cl-amidine の添加により抑制された。
- ・ PTU および PMA の投与によって BALB/c, NZW, B6/J, B6/N, DBA マウスいずれにおいても MPO-ANCA 産生が誘導され、特に BALB/c と NZW の 2 系統で抗体価が高かった。
- ・ PAD 阻害薬である Cl-amidine の投与により MPO-ANCA 産生モデルマウスにおける腹膜での NETs 形成が抑制された。
- ・ Cl-amidine の投与により MPO-ANCA 産生モデルマウスにおける MPO-ANCA 産生が抑制された。
- ・ rTM によって PMA による NETs の誘導が部分的に抑制された。
- ・ rTM によってヒストンおよび NETs の HUVEC に対する細胞障害性が抑制された。

本論文第一章では, NETs の形成に不可欠な PAD4 の働きを阻害することにより, MPO-ANCA の産生に NETs の過剰が関与していることを *in vivo* で初めて証明した。また, MPO-ANCA は MPO-AAV の主要な病原因子であることから, MPO-ANCA の産生を抑制する PAD 阻害剤が, MPO-AAV の新たな治療薬の候補となる可能性を示した。

第二章では rTM ヒストンおよび NETs の直接的な血管内皮細胞障害性の抑制ならびに NETs の誘導そのものを抑える作用を有していることを証明し, rTM が, MPO-AAV も含めた NETs 関連疾患の病態改善に寄与できる可能性を示した。

謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学研究科内科学講座 免疫・代謝内科学分野博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同先行教授渥美達也先生ならびに保健科学研究院病態解析学分野 石津明洋教授には本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本研究において本大学病理学講座分子病理学分野准教授外丸詩野先生、本分野助教中沢大悟先生には実験を遂行するにあたり、実験計画・方法ならびに結果の解釈に関しての考察の組み立てなど多くのご指導・ご助言をいただきました。深く感謝いたします。

本分野講師西尾妙織先生には、学内留学に近い状況にありながら当分野にて実験を継続できる恵まれた実験環境を用意いただき、さらに日々の実験に対するご指導・ご助言を終始いただきました。ここに深く感謝の意を表します。

志田玄貴先生、三次有奈先生、山本準也先生ならびに保健科学研究院病態解析学分野助教益田紗季子先生には大学院大学時代に研究を遂行するにあたり多くのご助言、ご指導をいただきました。ここに深謝いたします。

本分野膠原病グループ Olga Amengual 先生には英語教育、学会発表におけるプレゼンテーションなど、多大なるご指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

大学院生の牧田実先生、八反田文彦先生、谷村瞬先生には日頃より有益なご助言、ご検討をいただきました。こころより感謝を申し上げます。

国立病院機構北海道医療センター腎臓内科柴崎跡也先生、本分野腎グループ助教の石川康暢先生、NTT 札幌病院腎臓内科中垣祐先生には日頃より有益なご助言をいただき心より感謝を申し上げます。

また、当時腎グループ実験助手として勤務されていた三輪真記子さん、現実験助手の三崎麻里子さん、齋藤由佳さん、福士なつ美さんにも日々の実験のご協力をいただき深謝致します。

また、最後に、本研究を支えて下さった免疫代謝内科学分野のすべての皆様に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schonermarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., Grone, H. J., Brinkmann, V. & Jenne, D. E. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* **15**, 623-625 (2009).
- 2 Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M. & Ishizu, A. 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 (2012).
- 3 Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarnotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., Piconese, S., Parenza, M., Guiducci, C., Vitali, C. & Colombo, M. P. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* **120**, 3007-3018 (2012).
- 4 Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535 (2004).
- 5 Hakkim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R. E. & Zychlinsky, A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9813-9818 (2010).
- 6 Remijsen, Q., Kuijpers, T. W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P. & Vanden Berghe, T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* **18**, 581-588 (2011).
- 7 Wang, S. & Wang, Y. Peptidylarginine deiminases in citrullination,

- gene regulation, health and pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 1126-1135 (2013).
- 8 Yamada, R. Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **4**, 201-206 (2005).
 - 9 Kenealy, S. J., Babron, M. C., Bradford, Y., Schnetz-Boutaud, N., Haines, J. L., Rimmeler, J. B., Schmidt, S., Pericak-Vance, M. A., Barcellos, L. F., Lincoln, R. R., Oksenberg, J. R., Hauser, S. L., Clanet, M., Brassat, D., Edan, G., Yaouanq, J., Semana, G., Cournu-Rebeix, I., Lyon-Caen, O. & Fontaine, B. A second-generation genomic screen for multiple sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 1070-1078 (2004).
 - 10 Mohanan, S., Cherrington, B. D., Horibata, S., McElwee, J. L., Thompson, P. R. & Coonrod, S. A. Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem. Res. Int.* **2012**, 895343 (2012).
 - 11 Nakazawa, D., Tomaru, U., Yamamoto, C., Jodo, S. & Ishizu, A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front. Immunol.* **3**, 333 (2012).
 - 12 Imamoto, T., Nakazawa, D., Shida, H., Suzuki, A., Otsuka, N., Tomaru, U. & Ishizu, A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin. Exp. Rheumatol.* **32**, 149-150 (2014).
 - 13 Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A. & Reichenbach, J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* **114**, 2619-2622 (2009).
 - 14 Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231-241 (2007).
 - 15 Steinberg, B. E. & Grinstein, S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE* **2007**, pe11 (2007).

- 16 Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H. & Kubes, P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463-469 (2007).
- 17 Pilschek, F. H., Salina, D., Poon, K. K., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., Robbins, S. M., Green, F. H., Surette, M. G., Sugai, M., Bowden, M. G., Hussain, M., Zhang, K. & Kubes, P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **185**, 7413-7425 (2010).
- 18 Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytniuk, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J. & Kubes, P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**, 1386-1393 (2012).
- 19 Doring, Y., Weber, C. & Soehnlein, O. Footprints of neutrophil extracellular traps as predictors of cardiovascular risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1735-1736 (2013).
- 20 Grayson, P. C. & Kaplan, M. J. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 253-264 (2016).
- 21 Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., Taylor, F. B., Esmon, N. L., Lupu, F. & Esmon, C. T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* **15**, 1318-1321 (2009).
- 22 Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., Jr., Wroblewski, S. K., Wakefield, T. W., Hartwig, J. H. & Wagner, D. D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15880-15885 (2010).
- 23 Fuchs, T. A., Brill, A. & Wagner, D. D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1777-1783 (2012).

- 24 Lee, E., Hirouchi, M., Hosokawa, M., Sayo, H., Kohno, M. & Kariya, K. Inactivation of peroxidases of rat bone marrow by repeated administration of propylthiouracil is accompanied by a change in the heme structure. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2151-2153 (1988).
- 25 Huang, X. R., Holdsworth, S. R. & Tipping, P. G. Th2 responses induce humorally mediated injury in experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 1101-1108 (1997).
- 26 Lang, J. & Bellgrau, D. A T-cell functional phenotype common among autoimmune-prone rodent strains. *Scand. J. Immunol.* **55**, 546-559 (2002).
- 27 Neeli, I., Khan, S. N. & Radic, M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J. Immunol.* **180**, 1895-1902 (2008).
- 28 Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N. & Wang, Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **207**, 1853-1862 (2010).
- 29 Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D. & Coonrod, S. A. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **184**, 205-213 (2009).
- 30 Knight, J. S., Zhao, W., Luo, W., Subramanian, V., O'Dell, A. A., Yalavarthi, S., Hodgins, J. B., Eitzman, D. T., Thompson, P. R. & Kaplan, M. J. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J. Clin. Invest.* **123**, 2981-2993 (2013).
- 31 Luo, Y., Arita, K., Bhatia, M., Knuckley, B., Lee, Y. H., Stallcup, M. R., Sato, M. & Thompson, P. R. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry* **45**, 11727-11736 (2006).
- 32 Jennette, J. C. & Falk, R. J. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**,

- 463-473 (2014).
- 33 Kallenberg, C. G. Pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33**, S11-14 (2015).
 - 34 Moscarello, M. A., Lei, H., Mastronardi, F. G., Winer, S., Tsui, H., Li, Z., Ackerley, C., Zhang, L., Raijmakers, R. & Wood, D. D. Inhibition of peptidyl-arginine deiminases reverses protein-hypercitrullination and disease in mouse models of multiple sclerosis. *Dis. Model. Mech.* **6**, 467-478 (2013).
 - 35 Willis, V. C., Gizinski, A. M., Banda, N. K., Causey, C. P., Knuckley, B., Cordova, K. N., Luo, Y., Levitt, B., Glogowska, M., Chandra, P., Kulik, L., Robinson, W. H., Arend, W. P., Thompson, P. R. & Holers, V. M. N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* **186**, 4396-4404 (2011).
 - 36 Chumanevich, A. A., Causey, C. P., Knuckley, B. A., Jones, J. E., Poudyal, D., Chumanevich, A. P., Davis, T., Matesic, L. E., Thompson, P. R. & Hofseth, L. J. Suppression of colitis in mice by Cl-amidine: a novel peptidylarginine deiminase inhibitor. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G929-938 (2011).
 - 37 Nakahara, M., Ito, T., Kawahara, K., Yamamoto, M., Nagasato, T., Shrestha, B., Yamada, S., Miyauchi, T., Higuchi, K., Takenaka, T., Yasuda, T., Matsunaga, A., Kakihana, Y., Hashiguchi, T., Kanmura, Y. & Maruyama, I. Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. *PLoS One* **8**, e75961 (2013).
 - 38 Tadie, J. M., Bae, H. B., Jiang, S., Park, D. W., Bell, C. P., Yang, H., Pittet, J. F., Tracey, K., Thannickal, V. J., Abraham, E. & Zmijewski, J. W. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **304**, L342-349 (2013).
 - 39 Abeyama, K., Stern, D. M., Ito, Y., Kawahara, K., Yoshimoto, Y., Tanaka, M., Uchimura, T., Ida, N., Yamazaki, Y., Yamada, S., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Iino, S., Taniguchi, N. & Maruyama, I. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility

- group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J. Clin. Invest.* **115**, 1267-1274 (2005).
- 40 Suzuki, K., Kusumoto, H., Deyashiki, Y., Nishioka, J., Maruyama, I., Zushi, M., Kawahara, S., Honda, G., Yamamoto, S. & Horiguchi, S. Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J.* **6**, 1891-1897 (1987).
- 41 Dittman, W. A. & Majerus, P. W. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood* **75**, 329-336 (1990).
- 42 Joyce, D. E., Gelbert, L., Ciaccia, A., DeHoff, B. & Grinnell, B. W. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 11199-11203 (2001).
- 43 Eguchi, R., Fujimori, Y., Okada, M., Tamaki, H., Wakabayashi, I. & Ogawa, H. Recombinant human soluble thrombomodulin attenuates FK506-induced endothelial dysfunction through prevention of Akt inactivation. *Exp. Cell Res.* **323**, 112-117 (2014).
- 44 Shi, C. S., Shi, G. Y., Hsiao, H. M., Kao, Y. C., Kuo, K. L., Ma, C. Y., Kuo, C. H., Chang, B. I., Chang, C. F., Lin, C. H., Wong, C. H. & Wu, H. L. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood* **112**, 3661-3670 (2008).
- 45 Wang, H., Vinnikov, I., Shahzad, K., Bock, F., Ranjan, S., Wolter, J., Kashif, M., Oh, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Kirschfink, M., Conway, E. M., Madhusudhan, T. & Isermann, B. The lectin-like domain of thrombomodulin ameliorates diabetic glomerulopathy via complement inhibition. *Thromb. Haemost.* **108**, 1141-1153 (2012).
- 46 Dahlback, B. & Villoutreix, B. O. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* **579**, 3310-3316 (2005).
- 47 Wang, W., Boffa, M. B., Bajzar, L., Walker, J. B. & Nesheim, M. E. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol. Chem.* **273**, 27176-27181 (1998).

- 48 Campbell, W. D., Lazoura, E., Okada, N. & Okada, H. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol. Immunol.* **46**, 131-134 (2002).
- 49 Leung, L. L., Myles, T., Nishimura, T., Song, J. J. & Robinson, W. H. Regulation of tissue inflammation by thrombin-activatable carboxypeptidase B (or TAFI). *Mol. Immunol.* **45**, 4080-4083 (2008).
- 50 Ammollo, C. T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N. L. & Esmon, C. T. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 1795-1803 (2011).
- 51 Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: how vital is it? *Blood* **122**, 2784-2794 (2013).
- 52 Shimomura, Y., Suga, M., Kuriyama, N., Nakamura, T., Sakai, T., Kato, Y., Hara, Y., Yamashita, C., Nagasaki, H., Kaneki, M. & Nishida, O. Recombinant human thrombomodulin inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro. *Journal of intensive care* **4**, 48 (2016).
- 53 Saigo, K., Mori, C., Iwamoto, S., Shirai, K., Uematsu, T., Takenokuchi, M., Kono, M. & Imoto, S. Recombinant thrombomodulin does not impair neutrophil functions. *J. Thromb. Thrombolysis* **39**, 536-538 (2015).
- 54 Schneider, A. E., Sandor, N., Karpati, E. & Jozsi, M. Complement factor H modulates the activation of human neutrophil granulocytes and the generation of neutrophil extracellular traps. *Mol. Immunol.* **72**, 37-48 (2016).
- 55 Guglietta, S., Chiavelli, A., Zagato, E., Krieg, C., Gandini, S., Ravenda, P. S., Bazolli, B., Lu, B., Penna, G. & Rescigno, M. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. *Nature communications* **7**, 11037 (2016).
- 56 Garcia, C. C., Weston-Davies, W., Russo, R. C., Tavares, L. P., Rachid, M. A., Alves-Filho, J. C., Machado, A. V., Ryffel, B., Nunn, M. A. & Teixeira, M. M. Complement C5 activation during influenza A

infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. *PLoS One* **8**, e64443 (2013).