



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	益田, 紗季子
Description	配架番号 : 2488
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13697号
Issue Date	2019-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74985
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sakiko_Masuda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 益田 紗季子

学 位 論 文 題 名

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)

【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100nM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10U/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。