



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 益田 紗季子

審査担当者	主査	教授	清野	研一郎
	副査	教授	村上	正晃
	副査	教授	安斉	俊久
	副査	教授	小林	弘一

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)

好中球細胞外トラップ（NETs）は自然免疫において重要な役割を持っている一方で、自己抗体産生や血管内皮細胞障害、血栓形成など身体に負の影響を与えることが報告されている。また、抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎を始め、全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの自己免疫疾患との関連も報告されている。本研究では新たな NETs 測定方法を確立するためにフローサイトメトリーと免疫蛍光染色を用いて NETs の検出を行った。フローサイトメトリーを用いた NETs 測定においては、細胞膜非透過性核酸染色剤 SYTOX Green を用いて、簡単かつ定量的、客観的な NETs 測定方法を確立し、確立した方法を用いて生体内に形成された NETs を検出することができた。免疫蛍光染色を用いた NETs 検出においては、ANCA 関連血管炎の壊死性病変部において DNase I 抵抗性 NETs の沈着を認めた。DNase I 抵抗性 NETs は壊死性病変の形成や ANCA の産生に関与していると考えられた。

審査にあたり、まず副査の村上教授からネクロシスと DNase I 感受性 NETs、DNase I 抵抗性 NETs の鑑別方法についての質問があり、申請者は、ネクロシス細胞と NETs 形成細胞はどちらも細胞膜の破綻が認められるため、形態学的に両者を鑑別することは難しいが PCR による遺伝子検査が有用であること、DNase I 抵抗性または感受性の NETs の鑑別には免疫蛍光染色を用いた DNase I 消化試験で鑑別が出来ると回答した。次に、フローサイトメトリーにおける検出において、NETs マーカーであるシトルリン化ヒストンが検出できなかったことに関して、固定などの条件検討により検出されるようになるかについての質問があり、既報では固定した細胞を用いてシトルリン化ヒストンとミエロペルオキシダーゼの染色により NETs を同定したという報告があり、本検出法でも固定処理を行ったが、固定処理による細胞膜構造の変化などが原因となり、未刺激の好中球も SYTOX Green に陽性となったことを回答した。

次に、副査の安斉教授から、ANCA 関連血管炎の病態において、マクロファージの関与があるが、実際の患者組織においてはマクロファージなどの炎症細胞との関連は明らかになっているかという質問があり、申請者は、M1/M2 マクロファージの免疫蛍光染色を施行したが、有意な所見が得られなかったこと、多発血管炎性肉芽腫症における既報では M2 マクロファージ優位であることが報告されていると回答した。フローサイトメトリーを用いて細菌誘導 NETs を検出する実験において、*Pseudomonas aeruginosa* に比べ *Staphylococcus aureus* の方が NETs 誘導率が高かった理由についての質問があり、申請者は、グラム陰性菌である前者は TLR4 を介して、グラム陽性菌である後者は TLR2 を介して NETs 形成が誘導されると考えられるが、TLR の違いが NETs 誘導率に影響を与える可能性があるかと回答した。

次に、副査の小林教授から、NETosis はプログラムされたネクロシス、ネクロトーシスの一種であるとのことだが、ネクロトーシスのシグナル伝達経路に関与する RIPK3 や MLKL の遺伝子を欠損させた細胞では NETs 形成が誘導されないことを確認した既報があるかについての質問があり、申請者は、RIPK3 や MLKL の遺伝子を欠損させた細胞の既報は把握していないが、NETs を誘導する際に RIPK3 阻害薬を作用させることで NETs 形成が抑制されたという報告があると回答した。さらに、生体内では DNase I 抵抗性 NETs も DNase I 感受性 NETs もいずれも形成されているが、すぐに分解され組織には DNase I 抵抗性 NETs のみが残っている可能性があるのではないかと質問があり、申請者は、肺炎においても NETs 形成が認められるが、DNase I に分解されているためか DNA の陽性所見が弱いことから、DNase I 感受性 NETs の DNA は生体内で速やかに分解されている可能性があるかと回答した。

最後に、主査の清野教授から、フローサイトメトリーでの実験において使用した核酸染色剤 SYTOX Green に染まる細胞の特異性について質問があり、申請者は、今回の検出系において SYTOX Green は NETs 中の DNA の他に、死細胞も染まると考えられると回答した。ホルマリン固定した DNA が DNase I によって分解されるかポジコンで確認したかどうかについての質問があり、申請者は、in vitro で誘導した NETs のホルマリン固定パラフィン包埋切片を DNase I で処理することで、DAPI またはヘマトキシリンに染まる細胞外 DNA が消失することを確認したと回答した。

この論文は、フローサイトメトリーを用いた定量的客観的な NETs 測定法を確立し、生体内で形成された NETs を検出できたことを示した。また、免疫蛍光染色を用いて ANCA 関連血管炎の壊死性病変における NETs の検出を行い、ヒトの生体内に DNase I 抵抗性 NETs の沈着が認められることを初めて示した。確立したこれらの NETs 検出法は今後様々な NETs 関連疾患の病因病態解明に応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。