

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08699

研究課題名(和文) 病理標本における好中球細胞外トラップ(NETs) 検出法の確立と関連疾患の病態解明

研究課題名(英文) Detection of neutrophil extracellular traps (NETs) in pathological specimens and elucidation of the NETs related diseases

研究代表者

塩竈 和也 (Shiogama, Kazuya)

藤田医科大学・医療科学部・講師

研究者番号：10387699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：好中球細胞外トラップ(NETs)とは、好中球が網目状に変化して病原体を捕獲する好中球独自の細胞死である。従来、膿瘍などの線維素化膿性炎において、フィブリンの析出だと思われていた網目状構造物の中に、NETsが含まれている可能性がある。われわれは、ホルマリン固定パラフィン切片ならびに細胞診標本におけるNETsの組織化学的解析を試みた。ラクトフェリンが最も良好なNETsマーカーだった。NETsおよびフィブリンは高確率で共存しており、NETsマーカーを用いた免疫染色のみならず、HE染色における線維サイズでNETsを鑑別できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでフィブリンの析出だと思われてきた網目状構造物の中にNETsが含まれていることを免疫組織化学的解析によって明らかにした。その結果、病理診断の基本となるHE染色において、NETsとフィブリンを鑑別することに成功した。この研究成果は、今後のNETsとフィブリンを鑑別するための病理診断基準になりえる。免疫染色をベースとする本研究は、特別な設備を使用しないため、今後のNETs研究において幅広く利用されることが大いに期待される。とくに、NETsが引き金になって生じる各種疾患の解明に役立つツールになる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In 2004, it has been found that stimulated neutrophils can produce extracellular fibrils called neutrophil extracellular traps (NETs) that trap to kill microorganisms.

NETs are composed of chromatin components and antimicrobial factors. Fibrillar structures are observed in HE-stained sections and cytology specimens of fibrinous inflammation, including abscess. Not only fibrin but also NETs maybe included in these fibrillar material. We immunohistochemically investigated how NETs are involved in the process of fibrinous inflammation using FFPE and cytology specimens. Lactoferrin is the best NETs marker regardless of fibril size. NETs and fibrin can be distinguished using combination of HE-stained sections and immunostaining with some NETs markers. NETs and fibrin are co-localized in almost cytology specimens. NETs can be demonstrated using immunostaining with some NETs markers in cytology specimens. It is suggested that chromatin rich basophilic fibrils are comprised of NETs.

研究分野：免疫組織化学

キーワード：好中球細胞外トラップ NETosis 免疫染色 ホルマリン固定パラフィン切片 細胞診

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ (Neutrophil Extracellular Traps: NETs) とは、2004年に報告された好中球がもつ新しい生体防御機能である (Brinkmann V et al., *Science*, 2004)。細菌などの刺激によって活性化した好中球が DNA を含む核成分と細胞質成分を融合させて、網目状に形態変化することによって病原体をトラップする (図1)。好中球の自爆ともいえるこの現象は、apoptosis でも necrosis でもない好中球独自の細胞死であり、NETosis と名付けられている。この機能は感染防御に大きく貢献する反面、病理学分野において新たに解決すべき問題を生み出した。これまで大葉性肺炎や膿瘍などの線維素化膿性炎において、フィブリンの析出と思われてきた網目状構造物が、実は NETs の可能性があり、両者の鑑別が必要となっている (図2)。現時点では、病理診断で NETs とフィブリンの鑑別は要求されていないが、近い将来、HE 染色および免疫染色の双方向から両者を鑑別できる病理診断基準ならびに検出法が求められることは想像に難くない。

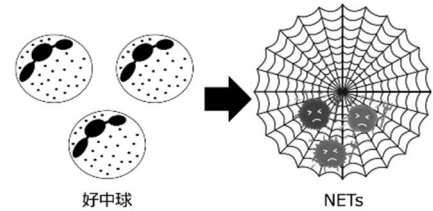


図1. 好中球におけるNETs形態変化の模式図

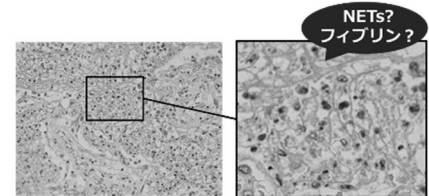


図2. 大葉性肺炎症例における網目状構造物

NETs は生体防御機能として発見されたが、近年では NETs と疾患との関連が相次いで報告されている。NETs が適切に処理されない場合、細胞外に放出された NETs 成分が抗原となって自己抗体の産生が誘発されるため、ANCA 血管炎 (Kessenbrock K et al., *Nat Med*, 2009)、関節リウマチ (Khandpur R., *Sci Transl Med*, 2013) および SLE (Knight JS et al., *J Clin Invest*, 2013) などの自己免疫疾患を引き起こす。さらに、血小板の活性化を誘導して、敗血症性 DIC (Hashiba M et al., *J Surg Res*, 2015) や悪性腫瘍の転移 (Cools-Lartigue J et al., *J Clin Invest*, 2013) などの引き金となることが次々と明らかになっている。NETs 関連疾患の研究は始まったばかりで、病態解明のためにも NETs 現象を病理学的見地からひも解くことは大きな意味をもつ。

NETs 研究の多くは、*in vitro* レベルにとどまっており、とくに、病理標本を対象とした NETs の網羅解析はほとんど行われていない。病態の現場を観察できる病理標本の利点を活かして、基礎研究にとどまらない臨床へのフィードバックも視野に入れた研究に発展させる。

### 2. 研究の目的

好中球が網目状に形態変化して病原体を捕獲する好中球細胞外トラップ (NETs) をホルマリン固定パラフィン切片から検出するための技術開発を行う。NETs の発見によって、病理組織化学的に NETs とフィブリンの鑑別が必要となっている。HE 染色における NETs とフィブリンの鑑別ポイントを突き止め、諸種 NETs マーカーによる免疫染色を組み合わせ、病理標本における NETs の実態解明に迫る。NETs は生体防御機能のみならず、諸種疾患の引き金になることが次々と報告されている。本研究は、いまだ十分に行われていない NETs の病理学的網羅解析の先駆的な研究になると位置づけられ、NETs の病理組織化学的検出にとどまらず、NETs 関連疾患の病態解明につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

1) ホルマリン固定パラフィン切片で検出可能な NETs マーカーを明らかにする。

下記の諸種マーカーを対象として、NETs の病理組織化学的証明法を確立する。これまでの NETs 研究では、myeloperoxidase (MPO) や neutrophil elastase (NE) などの検出にとどまっているが、本研究で展開する多種類の NETs マーカーを対象とした大規模解析はいまだ行われていない。一次顆粒から三次顆粒における NETs の関与も未解明のままである。ホルマリン固定パラフィン切片に適応可能なマーカーを探り、吸収試験および免疫電顕による特異性の確認を行う。先行実験で染色良好だった lactoferrin に関しては、エピトープの異なる複数種のモノクローナル抗体を用いて比較する。

- ・ 核成分：single stranded DNA、citrullinated histone H3 (cit-H3)、histone H2A・H2B・H3・H4、Brm (クロマチン変換因子)
- ・ 一次顆粒 (アズール顆粒)：MPO、NE、cathepsin G、 $\alpha$ -defensin 1、proteinase 3
- ・ 二次顆粒 (特殊顆粒)：lactoferrin (ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体)、cathelicidin、matrix metalloproteinase 8 (MMP-8)、alkaline phosphatase (ALP)、pentraxin-3 (PTX3)
- ・ 三次顆粒 (ゼラチナーゼ顆粒)：gelatinase (MMP-2、MMP-9)、arginase I
- ・ その他の成分：neutrophil cytosolic factor 1 (NCF1)、CD15、lysozyme (一次顆粒から三次顆粒のすべてに含まれる加水分解酵素)

2) 臨床検体を用いて、NETs とフィブリンの特徴を明らかにする。

HE 染色における NETs とフィブリンの形態学的特徴を解明する。網目状構造物のサイズや染色性、背景の好中球の形態に注目して両者の鑑別基準を確立する。HE 染色結果と免

疫染色結果を照らし合わせて総合的に評価する。

3) NETs 関連疾患の疾患別特徴を NETs マーカーによって明らかにする。

線維素化膿性炎（大葉性肺炎、膿瘍、虫垂炎）、ANCA 血管炎、関節リウマチ、SLE および敗血症性 DIC のホルマリン固定パラフィン切片および好中球浸潤の目立つ胸腹水、喀痰および子宮頸部擦過の細胞診標本を対象とする。本学大学病院に保管されている症例を対象とした系統的な解析によって、大きな成果が期待できる。

4) 各種細胞死（NETosis、apoptosis、autophagy）の関与を明らかにする。

新たに確立する NETosis 検出法に加えて、apoptosis および autophagy 検出のための免疫染色結果を総合評価する。本研究が、病理切片上における各種細胞死の病理学的網羅解析を先駆けて実現する。

#### 4. 研究成果

本学大学病院に保管されているホルマリン固定パラフィンブロックのうち、HE 染色で好中球浸潤と網目状構造物が目立つ線維素化膿性炎の大葉性肺炎、膿瘍および虫垂炎を各 30 例ずつ選出した。さらに、病理標本中の血管内皮細胞を目安として、網目状構造物を細い線維、太い線維および塊状の線維の 3 種類に分類した。代表症例を用いて、各種マーカーを用いた免疫染色の至適検出条件の設定を行った。核成分の証明として、single stranded DNA、cit-H3 の 2 種類、好中球細胞質成分の証明として、一次顆粒に対する抗体が MPO、NE、lactoferrin（モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体）の 4 類を NETs マーカーとした。細い線維および太い線維のいずれにおいても、lactoferrin が最も検出率が高い NETs マーカーだった。細い線維は NETs が多くを占めており（14/18 例、78%）、好中球の破壊が目立ち、ヘマトキシリン好性の領域に NETs が高頻度に認められる傾向があった。太い線維の大半はフィブリンであり（17/23 例、74%）、多くの場合、NETs と共発現していた（18/23 例、78%）。塊状の線維は、いずれもフィブリンだった。細い線維は、lactoferrin 以外の好中球細胞質成分マーカーが陽性を示したが、太い線維はいずれも陰性だった。

細胞診標本における NETs の免疫組織化学的解析を行った。目的箇所を細胞転写したのち、各種 NETs マーカーおよびフィブリンマーカーによる免疫染色を行った。子宮頸部スミア標本を 15 例、乳腺穿刺吸引標本 40 例を対象とした。子宮頸部スミア標本のいずれも NETs とフィブリンの同時発現が確認された。ヘマトキシリン好性あるいはライトグリーン好性と色調が異なる線維状構造物のいずれにおいても NETs が証明された。パパニコロウ染色で線維状構造物が不鮮明な標本でも、NETs は観察された。粘液あるいは核線だと思われていた線維状構造物は、アルシアン青および NETs 陽性を示し、両者は混在していた。乳腺穿刺吸引標本では cit-H3、lactoferrin および MPO は全例陽性を示した。フィブリンは 35/40 例（87.5%）で陽性を示し、いずれも NETs との同時発現が確認された。フィブリンのみが陽性を示す症例は確認されず、各種 NETs マーカーのみが陽性を示す症例は 5/40 例（12.5%）だった。そのうち、ヘマトキシリン好性を示す明瞭な線維は 4/5 例（80%）を占め、ライトグリーン好性を示す線維は 1/5 例（20%）だった。細胞診標本における線維状構造物には NETs が大きく関与していることを明らかにした。一部の症例に NETs の単独発現が認められたが、ほとんどの場合、NETs はフィブリンと共存していた。NETs マーカーのみが陽性を示すヘマトキシリン好性の明瞭な線維は、核線の可能性が示唆された。

同じ線維状形態を示す NETs と核線の鑑別に着目して、細胞診標本を用いた免疫組織化学的解析を行った。パパニコロウ染色で好中球浸潤と線維状構造物が確認された喀痰細胞診標本 42 例を対象とした。核線とは、1963 年に宮西氏が定義した概念である。この宮西氏分類に従って、細胞診標本上の線維状構造物を 3 種類（線状、帯状、顆粒状）に分類した。目的箇所を細胞転写したのち、各種 NETs マーカーを用いた免疫染色を施行した。宮西氏の分類において線状の形態を示す線維状構造物に明瞭な陽性シグナルが認められた。3/15 例の線維状構造物に対して、各種 NETs マーカーが強陽性を示した。それらはいずれもヘマトキシリン好性の線維状構造物だった。弱陽性を示す症例は、12/15 例確認された。大部分が判定困難であり、それらは帯状あるいは顆粒状の形態を示す線維状構造物が多くを占めた。アルシアン青染色を加えた二重染色によって、線状のヘマトキシリン好性の線維状構造物を NETs と粘液に染め分けることに成功した。さらに、両者は単独発現や共存発現を示すことを見出した。免疫染色で判定困難な帯状の形態を示す線維状構造物は、ほとんどが粘液成分だった。ミエロペルオキシダーゼおよびラクトフェリン免疫染色では、通常形態の好中球の核に陽性を示す細胞像（核と細胞質成分の融合段階だと思われる）が確認された。

病理標本における NETs の超微構造解析について検討を加えた。NETs ならびにフィブリンがそれぞれ陽性を示す部位を複数ヶ所選出し、走査型電子顕微鏡による観察を試みた。NETs 線維は  $98 \pm 13$  nm、フィブリンは  $466 \pm 98$  nm を示し、両者に有意差が認められた。さらに、NETs が明瞭に確認された組織標本および細胞診標本を選出して、NETs マーカーを用いた免疫電顕を施行した。解析の結果、NETs 線維には好中球細胞質成分である lactoferrin が顆粒状に付着していることを見出した。フィブリンにおける免疫電顕では、NETs よりも数倍太い線維にびまん性に陽性を示し、NETs およびフィブリンの両者のサイズ感や構造の違いを鑑別することができた。同一部位を共焦点レーザー顕微鏡と走査型電子顕微鏡の両方で観察する方法である光 - 電子相関顕微鏡（Correlative light and electron

microscopy: CLEM) 法を用いてさらなる解析を加えた。免疫電顕と同様に、lactoferrin は顆粒状に陽性、フィブリンは線維状に陽性を示し、顆粒や線維状構造物の立体構築までとらえることができた。細胞診標本でも同様に、MPO、NE、lactoferrin などの好中球の細胞質内顆粒は顆粒状に線維に付着し、線維状に変化した核成分を捕らえる cit-H3 が線維状に陽性を示す像が確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiogama K, Onouchi T, Mizutani Y, Sakurai K, Inada KI, Tsutsumi Y	4. 巻 49
2. 論文標題 Visualization of neutrophil extracellular traps and fibrin meshwork in human fibrinopurulent inflammatory lesions. I. Light microscopic study	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 109-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1267/ahc.16015">https://doi.org/10.1267/ahc.16015</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Onouchi T, Shiogama K, Matsui T, Mizutani Y, Sakurai K, Inada KI, Tsutsumi Y	4. 巻 49
2. 論文標題 Visualization of neutrophil extracellular traps and fibrin meshwork in human fibrinopurulent inflammatory lesions. II. Ultrastructural study	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1267/ahc.16016">https://doi.org/10.1267/ahc.16016</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Onouchi T, Shiogama K, Matsui T, Mizutani Y, Takaki T, Tsutsumi Y	4. 巻 49
2. 論文標題 Visualization of neutrophil extracellular traps and fibrin meshwork in human fibrinopurulent inflammatory lesions. III. Correlative light and electron microscopic study	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 141-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1267/ahc.16028">https://doi.org/10.1267/ahc.16028</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuya Shiogama
2. 発表標題 Visualization of neutrophil extracellular traps (NETs) in histo- and cytopathology specimens
3. 学会等名 The 13th Japan-China Joint Seminar Histochemistry and Cytochemistry, 2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩竈和也、小林加奈、道場彩乃、舟橋正範、今枝義博、尾之内高慶、平山将也、金子千之、柳田隆正、稲田健一、安倍雅人
2. 発表標題 好中球細胞外トラップと核線の鑑別：宮西分類に基づいた免疫組織化学的解析
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会春期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾之内高慶、平山将也、塩竈和也
2. 発表標題 パラフィン切片を用いての光 - 電子相関顕微鏡
3. 学会等名 第124回日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾之内高慶、塩竈和也、平山将也
2. 発表標題 パラフィン切片を用いた光 - 電子相関顕微鏡法の応用
3. 学会等名 第17回コ・メディカル形態機能学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩竈和也、舟橋正範、尾之内高慶、水谷泰嘉、今枝義博、金子千之、柳田隆正、稲田健一、安倍雅人、堤 寛
2. 発表標題 細胞診標本から好中球細胞外トラップをとらえる
3. 学会等名 第107回日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩竈和也、舟橋正範、尾之内高慶、水谷泰嘉、今枝義博、稲田健一、金子千之、柳田隆正、安倍雅人、堤 寛
2. 発表標題 細胞診標本から好中球細胞外トラップ (NETs) をとらえる
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩竈和也
2. 発表標題 私の推奨する細胞診技術 好中球細胞外トラップ (NETs) 細胞診標本における免疫組織化学
3. 学会等名 第56回日本臨床細胞学会秋期大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塩竈和也、山本風香、水谷泰嘉、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤寛
2. 発表標題 Identification of neutrophil extracellular traps in cytology specimens.
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塩竈和也、櫻井浩平、稲田健一、堤寛
2. 発表標題 炎症性細胞診標本中に好中球細胞外トラップは存在するのか？
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会総会春期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塩竈和也、尾之内高慶、水谷泰嘉、櫻井浩平、稲田健一、堤寛
2. 発表標題 NETs and fibrin distinction with HE staining and immunostaining
3. 学会等名 第105回日本病理学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 尾之内高慶、塩竈和也、水谷泰嘉、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛
2. 発表標題 NETsとフィブリンの微細構造 共焦点レーザー顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いたCLEM解析
3. 学会等名 第57回日本組織細胞化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 塩竈和也
2. 発表標題 病理診断に利用可能な技術 高感度法の応用と環境にやさしい染色法
3. 学会等名 第57回日本組織細胞化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 尾之内高慶、塩竈和也、水谷泰嘉、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛
2. 発表標題 光-電子相関顕微鏡法によるNETsとフィブリンの微細構造解析
3. 学会等名 第105回日本病理学会
4. 発表年 2016年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	尾之内 高慶  (Onouchi Takanori)  (20632954)	藤田保健衛生大学・研究支援推進センター・講師   (33916)	
研究 分担者	堤 寛  (Tsutsumi Yutaka)  (80138643)	藤田保健衛生大学・医学部・教授   (33916)	