

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07448

研究課題名（和文）病理標本におけるNETsおよびMETsの疾患網羅解析：関連疾患の病態解明

研究課題名（英文）Exhaustively analysis of NETs and METs related diseases in paraffin sections

研究代表者

塩竈 和也（Shiogama, Kazuya）

藤田医科大学・医療科学部・准教授

研究者番号：10387699

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは、各種疾患におけるNETsの検出に加えて、ホルマリン固定パラフィン切片におけるMETsの免疫組織化学的検出法を確立した。膠芽腫におけるMETsの検出に成功し、潰瘍性大腸炎およびクローン病ではほとんどの症例にNETsおよびMETsが関与していることを証明した。炎症性腸疾患の便中バイオマーカーであるカルプロテクチンは、NETsおよびMETsを検出できる汎ETosisマーカーとして推奨された。好中球浸潤が顕著な大腸癌では、ステージ2とステージ3の間に有意差（ $p<0.05$ ）が認められ、ステージが上がるにつれてNETs陽性率が高くなる傾向を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルマリン固定パラフィン切片におけるMETsの検出を確立することができた。炎症性疾患や一部の悪性腫瘍において、NETs以外にもMETsが関与し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。さらに、NETs発現ががん患者の予後と関連していること、炎症性肺疾患においてNecroptosisがNETsの引き金となることを見出した。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、今後の細胞死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。悪性腫瘍においては患者予後を予測するツールとしても活用される可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：We have established immunohistochemical detection of macrophage extracellular traps (METs) in formalin-fixed paraffin-embedded sections, in addition to detection of neutrophil extracellular traps (NETs) in various diseases. We successfully detected METs in glioblastoma and demonstrated that NETs and METs are involved in most cases of ulcerative colitis and Crohn's disease. Calprotectin, a stool biomarker for inflammatory bowel disease, was recommended as a pan-ETosis marker capable of detecting NETs and METs. We found a significant difference ($p<0.05$) between stage 2 and stage 3 colorectal cancer with significant neutrophil infiltration, and a trend toward higher NETs positivity with increasing stage.

研究分野：細胞死

キーワード：細胞死 NETs METs カルプロテクチン 炎症性腸疾患 がん微小環境

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

1) 「NETs と同様に、METs を FFPE 切片から特異的に検出することは可能なのか？」

『NETs』とは、2004年に報告された好中球がもつ貪食以外の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、線維状に形態変化し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、アポトーシスでもネクローシスでもない好中球独自の細胞死として位置づけられている。われわれは、すでに FFPE 切片における NETs の免疫組織化学的検出法を確立している。さらに、HE 染色における NETs とフィブリンの鑑別予測など日常の病理診断に応用可能な技術として構築した (Shiogama K et al, *Acta Histochem Cytochem*, 2016)。『METs』とは、近年報告されたマクロファージ独自の細胞死であり (図2)、好中球と同様に外部刺激によって活性化した後に線維状に形態変化する細胞外トラップである (Chow O A et al, *Cell Host Microbe*, 2010)。NETs と比べて METs に関する研究報告は数少なく、とくに FFPE 切片を用いた METs の検出および病理学的解析は手つかず状態である。われわれは、NETs の免疫組織化学的検出法を確立済みであり、このノウハウを活用すれば FFPE 切片からの METs の免疫組織化学的検出法を確立できる可能性が高い。また、NETs と METs を同一箇所から同時に検出できる技術は確立されていない。この方法は、今後の細胞外トラップ研究に必要な技術であるとともに、この分野の発展に貢献する可能性が十分にある。

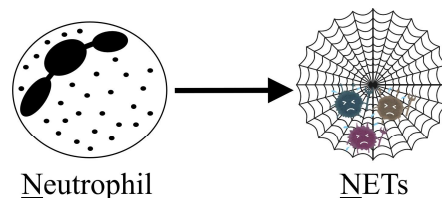


図1. NETsの模式図
線維状に形態変化する好中球独自の細胞死

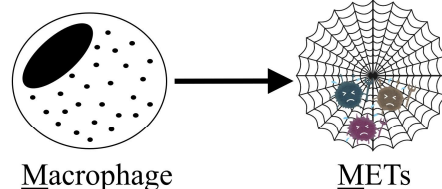


図2. METsの模式図
線維状に形態変化するマクロファージ独自の細胞死

2) 「各種自己免疫疾患およびがん微小環境において、NETs と METs はどのように関与しているのか？」

NETs は生体防御機能として発見されたが、近年では NETs が引き金となって諸種疾患を招くこと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とされる。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) や悪性腫瘍の浸潤・転移 (Cools-Lartigue J et al., *J Clin Invest*, 2013) などを誘発することが次々と明らかになっている。NETs だけにとどまらず、METs においても同様に自己免疫疾患や悪性腫瘍をはじめとした病態において、多岐にわたり影響を及ぼしている可能性が十分考えられる。この分野の研究は発展途上であり、病態解明のためにも NETs・METs 発現を FFPE 切片による病理学的見地からひも解くことは大きな意味をもつ。NETs・METs 研究の多くは *in vitro* レベルにとどまっており、とくに FFPE 切片の病理標本を対象とした網羅解析はほとんど行われていない。好中球およびマクロファージが浸潤している各種自己免疫疾患の病変部およびがん微小環境において、NETs と METs がどのように関与しているか現時点では不明なままである。

3) 「各種細胞死は、病変部でどのように誘導されているのか？」

NETs と METs 以外の制御される細胞死として、アポトーシス、オートファジー、ネクロプトーシス (RIPK1/RIPK3/MLKL 誘導ネクローシス様細胞死)、パイロトーシス (炎症を惹起する caspase-1/4/5/11 誘導細胞死) 等がある。それぞれ独自の実行経路によって細胞死が能動的に誘導され、炎症などの状況下で重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、これら各種細胞死が病変部でどのように誘導されているのか、疾患と各種細胞死に何らかの因果関係があるのか、いまだ明らかにされていない。これら各種細胞死を FFPE 切片の同一標本上で証明する技術を確立することで、細胞死の網羅解析を先駆けて実現できる。

2. 研究の目的

FFPE 切片を用いた疾患網羅的発現解析によって、自己免疫疾患およびがん微小環境における NETs・METs 発現の意義と病態解明をめざし、病理診断に活用できる技術へと発展させることが本研究の目的および学術的独自性である。培養細胞を中心とした *in vitro* レベルでのアプローチは進んでいるが、われわれが得意とする FFPE 切片を用いた免疫組織化学的手法による網羅解析はほとんど行われていない。FFPE 切片を用いた病理学的解析には、*in vitro* レベルでは実現し得ない『病変部位を直接観察できる』という最大の利点をもつ。本研究を加速させて、基礎研究にとどまらないトランスレーショナルリサーチ（橋渡し研究）として発展させることを最終目標とする。

3. 研究の方法

1) FFPE 切片を対象とした METs の免疫組織化学的検出法の確立

われわれが確立した NETs の免疫組織化学的検出法のノウハウを活用して、METs の FFPE 切片における免疫組織化学的検出法を確立する。マクロファージマーカーである CD11c/Integrin alpha X、CD14、CD68、CD163、CD206 を用いて METs の検出を行う。核成分 (citrullinated histone H3) および細胞質内顆粒 (lysozyme をはじめとした計 11 種類) については、すでに至適検出条件を確立済みである。各種細胞質内顆粒は、好中球と交差反応が生じる可能性があるため、好中球とマクロファージに対して免疫染色を施行し、反応性および特異性の確認を行う。陽性コントロールとして、マクロファージ細胞株である U937 の FFPE セルブロックを用いる。陽性シグナル確認後、実際に好中球およびマクロファージが浸潤している FFPE 病理検体を用いてマクロファージの特異性を確認する。検出法は、ポリマー法を基準として、LSAB 法、タイラマイド増感法、Duolink proximity ligation assay (PLA) を比較する。

2) 自己免疫疾患および悪性腫瘍における NETs・METs の検出と病態解析

本学大学病院に保管されている FFPE 標本のうち、ANCA 血管炎、関節リウマチ、SLE および敗血症性 DIC、胃癌、大腸癌を選出する。われわれが確立した諸種マーカーを用いた NETs・METs 免疫染色によって、病変部における NETs と METs の関与、疾患別マーカーの比較に着目して病理学的網羅解析を行う。胃癌・大腸癌においては、がん微小環境を重点的に解析し、分化度、深達度、脈管侵襲の有無、遠隔転移の有無、予後等の臨床データと照らし合わせて比較解析する。

3) 同一切片からの各種細胞死の同時証明 (多重蛍光染色)

NETs、METs、アポトーシス、オートファジー、ネクロプトーシス、パイロトーシスを含めた各種細胞死の検出法を確立し、多重染色によって同一切片から同時に検出する。アポトーシスマーカー (cleaved caspase 3 & actin, gamma-H2A.X) とオートファジーマーカー (LC3, Beclin-1, p62) はすでに至適検出条件を確立済みである。ネクロプトーシスマーカー (RIPK1, RIPK3, MLKL) およびパイロトーシスマーカー (cleaved caspase 1 & 4/5 & 11, Gasdermin D) の至適検出条件を確立する。多重染色を実現可能にするために、OPAL Multiplex IHC Detection Kit (PerkinElmer 社) を用いる。この染色キットは最大 7 つのタンパク分子を蛍光染色で同時に検出することが可能であり、各種細胞死を同一切片から多角的に分析する。

4. 研究成果

われわれは、好中球細胞外トラップ (Neutrophil Extracellular Traps: NETs) の組織化学的解析に着目して研究を進めてきた。これまでの技術を活かしてホルマリン固定パラフィン切片におけるマクロファージ細胞外トラップ (Macrophage Extracellular Traps: METs) の免疫組織化学的検出法の確立を行った。ホルマリン固定パラフィン切片における METs の証明として、CD68、CD163、CD204 が良好なマーカーだった。M1 型マクロファージを証明する CD11c と CD80 の検出系を確立するまでには至らなかったが、M1 型と M2 型マクロファージを認識する CD68、M2 型マクロファージを認識する CD163 あるいは CD204 の二重染色を行うことで、M1 型と M2 型マクロファージを鑑別する方法を確立した。結核症について、好中球やマクロファージが浸潤した肺胞内部では、cit-H3、NETs マーカーである myeloperoxidase (MPO)、neutrophil elastase (NE) および lactoferrin (LF) が線維状に陽性を示し、NETs の存在が確認された。BCG 免疫染色において線維状に検出された部分と一致して、cit-H3 が線維状に陽性を示し、NETs に捕らえられた結核菌の検出に成功した。乾酪壊死は NETs

マーカーが陽性を示し、**METs** の存在は確認できなかった。大腸癌では、がん腺腔内の壊死部に **NETs** が確認され、**METs** の存在は確認できなかった。壊死部の **NETs** は、**HE** 染色所見により 1) 好塩基性の線維状 **NETs**、2) 線維状が不明瞭な **NETs**、3) 好酸性壊死内の **NETs** に分類された。いずれにおいても **NETs** マーカーが陽性を示し、光 - 電子相関顕微鏡 (**Correlative light and electron microscopy: CLEM**) 法によって、線維状の核成分に **MPO** の顆粒状シグナルが確認された。

神経膠腫の中で最も悪性度が高い膠芽腫のホルマリン固定パラフィン切片を対象とし、膠芽腫におけるマクロファージの関与と形態学的変化ならびに **METs** について免疫組織化学的解析を行った。**Iba1**、**CD163** あるいは **CD204** を組み合わせた免疫多重染色により、**M1** および **M2** マクロファージを鑑別する検出法を確立した。**M2** マクロファージは正常領域と膠芽腫の微小血管増殖の周囲にはごく少量しか存在しなかったが、正常血管の周囲、腫瘍浸潤部位および **Palisading necrosis** に移行するに従い増加傾向を示し、活性化した **M2** マクロファージが多くを占めた。また、限定的ではあるものの腫瘍部と壊死部の境界付近で **METs** を検出することに成功し、フィブリンやラクtofエリンと共存していた。**M2** マクロファージは炎症抑制因子だけでなく、生体防御機能の一つである **METs** 形成にも関与しており、不安定な状況下で様々な役割を担うことが明らかとなった。

各種疾患における **NETs** および **METs** の関与について、免疫染色を用いて病理学的解析を行った。潰瘍性大腸炎およびクローン病では、ほとんどの症例に **NETs** が関与していることが証明された。一部の症例において、炎症粘膜の一部に **METs** マーカーが線維状に陽性を示した。この結果はこれまでと同様に、**METs** は非常に限定的に生じる細胞死として確認された。炎症性腸疾患の便中バイオマーカーであるカルプロテクチンは、**NETs** および **METs** 陽性部位にいずれも明瞭な陽性シグナルを示し、**NETs** および **METs** を検出できる汎 **ETosis** マーカーとして推奨された。低化胞巣周囲、癌組織と正常組織の境界部において、好中球浸潤は認められるものの **NETs** は確認されなかった。癌先進部では、浸潤した好中球の一部が **NETs** を形成しており、サバイバル型 **NETs** が大半を占めた。壊死部では、**citH3** および **MPO** が陽性を示し、特攻隊型 **NETs** が確認された。**Necroptosis** は新しいプログラム細胞死の概念であり、各種炎症性疾患の 9/11 例は **necroptosis** および **NETs** とも高い陽性率 (20~35%) を示した。7/11 例は **necroptosis** より **NETs** が高い陽性率を示し、**NETs** のみの発現が認められた症例が 2/11 例あった。今回の検討によって、**necroptosis** が引き金となって **NETs** を誘導している可能性が高いことを見出した。症例間で **necroptosis** および **NETs** の陽性率にばらつきが生じたため、**necroptosis** を介さずに自発的に細胞死を引き起こしたのか、あるいは **necroptosis** マーカーの活性が弱まったことによって **FFPE** 切片上では検出できなかった可能性が高い。

がん微小環境における好中球に注目して、**NETs** とがんとの関係性を明らかにするための免疫組織化学的解析を行った。好中球浸潤が顕著な癌先進部および膿瘍において **NETs** 陽性率はばらつきがあり、**NETs** 陽性率が 5%以上を示した症例は、癌先進部で 6/29 例、膿瘍で 1/7 例に限られた。癌先進部では線維状の **suicidal** 型 **NETs** と好中球の形状を維持した **vital** 型 **NETs** が混在して認められたが、膿瘍ではほとんどが **vital** 型 **NETs** の形状で発現していた。患者予後との関係について、ステージ 2 とステージ 3 の間に有意差 ($p < 0.05$) が認められ、ステージが上がるにつれて **NETs** 陽性率が高くなる傾向を見出した。

Pyroptosis、**Apoptosis**、**Necroptosis** の 3 つのプログラム細胞死を複合的に引き起こす新しい細胞死の概念 **PANoptosis** について、炎症性疾患と悪性腫瘍を対象に病理学的網羅解析を行った。炎症性疾患では、肺病変において **Necroptosis** は高い陽性率を示し、大半が **NETs** とともに同程度発現が確認されたものの、**Pyroptosis** はほぼ陰性、**Apoptosis** は **Necroptosis** より低発現だった。悪性腫瘍では、**Pyroptosis** と **Apoptosis** は壊死部や癌細胞に多く発現が認められたが、**Necroptosis** は肺癌 1/7 例のみ陽性を示した。**PANoptosis** に関与する 3 つの細胞死が同時に起こる症例は認められなかった。**Necroptosis** と **NETs** は密接な関係性にあることが確認された。炎症性疾患では肺病変において **Necroptosis** 発現が目立ち、悪性腫瘍においては **Pyroptosis** と **Apoptosis** が主体であることから、臓器あるいは病態によって細胞死実行経路が異なる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Odani K, Abe J, Tsuyuki Y, Yanagita S, Shiogama K, Tachibana M, Tsutsumi Y	4. 巻 18
2. 論文標題 Acute coronary syndrome in acute myeloid leukemia with maturation accompanying megakaryocytic differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Patholgy	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/8886298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Y, Tsutsumi Y, Takeuchi C, Shiogama K, Mizutani Y, Inada KI, Yamamichi N, Koike K	4. 巻 70
2. 論文標題 Nuclear staining of claudin-18 is a new immunohistochemical markers for diagnosing intramucosal well-differentiated gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 644-652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi Y, Shiogama K, Sakurai K, Arase T, Domoto H	4. 巻 9
2. 論文標題 p16 immunostaining can avoid overdiagnosis in postmenopausal cervical cytology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Research Journal of Medicine and Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.30918/IRJMMS.91.20.056	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 塩竈和也	4. 巻 48
2. 論文標題 NETsの免疫組織化学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Technology	6. 最初と最後の頁 2-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 道場彩乃、塩竈和也、平山将也、山田勢至、尾之内高慶、金子千之、柳田隆正、塚本徹哉、安倍雅人
2. 発表標題 膠芽腫において腫瘍随伴マクロファージ (TAM) はマクロファージ細胞外トラップ (METs) 形成に関する
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道場彩乃、塩竈和也
2. 発表標題 TAMはマクロファージ細胞外トラップ (METs) 形成に関与しているか 膠芽腫における免疫組織化学的解析
3. 学会等名 第69回日本医学検査学会
4. 発表年 2020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 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 (国際学会)
4. 発表年 2019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	塚本 徹哉 (Tsukamoto Tetsuya) (00236861)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究 分担者	尾之内 高慶 (Onouchi Takanori) (20632954)	藤田医科大学・オープンファシリティセンター・講師 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------