

川崎病の病態への
好中球細胞外トラップの関与

よしだ ゆうすけ
吉田 裕輔

(成長発達臨床医学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

目次

第1章 緒言	1 頁
第2章 対象	3 頁
第3章 NETs の観察	6 頁
第4章 Cell-free DNA のリアルタイム PCR による NETs の定量	11 頁
第5章 NE/DNA 複合体の ELISA による NETs の定量	15 頁
第6章 考察	18 頁
第7章 結論	21 頁
謝辞	22 頁
単語・略語説明	23 頁
引用文献	25 頁
図表	30 頁

第1章 緒言

白血球は、生体にとって有害であるものや異質であるものを排除する免疫系細胞であり、白血球の一つである好中球は、異物・微生物・老廃組織などを細胞内に取り込む貪食作用によって排除するとされてきた。しかし近年、好中球の新しい機能として、好中球細胞外トラップ（neutrophil extracellular traps : NETs）が報告された¹⁾。これは、核内のクロマチンで構成される網目状の構造物に、好中球 elastase（Neutrophil elastase : NE）や myeloperoxidase（MPO）などの抗菌蛋白が付着したものであり、好中球が細胞外に放出することで殺菌作用をもたらす。その後 NETs は、細菌のみならず、ウイルス、真菌、原虫など幅広い微生物に対して殺作用を示すことが報告された²⁾⁻⁶⁾。NETs を形成した好中球は細胞死に至るとされ、この過程は従来の necrosis や apoptosis とは異なるタイプの細胞死ということで NETosis と呼ばれている。

一方で、NETosis に伴って細胞外に放出された核内クロマチンに含まれる DNA やヒストン、及び、それに付着した NE、MPO などの抗菌タンパクは、炎症の惹起による血管内皮細胞障害や血小板活性化による血管内血栓形成など、宿主側への強力な組織障害性を有し（図 1）、その制御機構の破綻による過剰な NETs 放出は、宿主側に病的な変化を及ぼし得ることが明らかとなった^{7),8)}。これまでに NETs の関与が報告されている疾患は、過剰炎症による輸血関連肺障害⁹⁾、敗血症に伴う凝固亢進 (DIC)^{10),11)} や、関節リウマチ¹²⁾⁻¹⁴⁾、Sjögren's syndrome、SLE¹⁵⁾⁻¹⁷⁾ などの自己免疫疾患ならびに家族性地中海熱¹⁸⁾ などの自己炎症性疾患など多岐にわたる。

川崎病（Kawasaki disease : KD）は、乳幼児に多く発症する全身性の血管炎をきたす疾患であり、現在も原因が特定されていないため特異的な診断法がなく、5つの主要症状（5日間以上持続する発熱、両側眼球結膜の充血、口唇・口腔内のびまん性発赤やイチゴ舌、不定形発疹、四肢末端の硬性浮腫ないし紅斑、非化膿性頸部リンパ節腫脹）の有無および参考条項に基づいて診断される症候群で

ある¹⁹⁾。また、重篤な合併症である冠動脈瘤は、若年性心筋梗塞や突然死の原因となっている²⁰⁾。標準治療であるアスピリンの内服および免疫グロブリン大量療法 (Intravenous immunoglobulin : IVIG) によって冠動脈瘤の合併率は大きく減少したものの、KD 患者の約 10~20%は治療に抵抗性を示し^{21), 22)}、現在においても KD 患者のうち約 3%は冠動脈瘤や冠動脈の拡大を含む心合併症をきたしている²³⁾。

血管炎に対する NETs の関与としては、これまでに大血管である腹部大動脈瘤²⁴⁾、小血管である抗好中球細胞質関連血管炎²⁵⁾、さらに、冠動脈の血管内皮障害および血栓形成による急性心筋梗塞への関与²⁶⁾ など、様々な太さの血管疾患において報告されている。しかし、KD 血管炎の病態において NETs が関与しているかどうかについての報告は未だない。

本研究の目的は、KD において NETosis の制御機構に異常が生じ NETs 形成が亢進しているかを解析し、KD 血管炎の病態における NETosis の関与を検討することである。

なお、本研究はヒト検体を使用するため、防衛医科大学校倫理委員会の承認を得て実施した。KD 患児からの検体採取は、受付番号 1110「川崎病における心合併症とバイオマーカーの関連性に関する研究」において実際した。また、健常小児からの検体採取は、受付番号 1143「原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究」において承認された健常小児からの採血の説明同意書を用いて、術前検査など、診療上採血が必要な場合に合わせ、十分な説明と同意の上で必要最小限の採血を行った。検体採取の際は、対象者もしくはその保護者に、研究目的・内容を文書および口頭によって十分に説明を行ったうえで、署名同意を得た。

第2章 対象

第1節 方法

(1) 選択基準

防衛医科大学校病院小児科外来を受診した患児を対象とした。KD群は、臨床的にKDと診断し血液検査を実施後、KDとして入院加療した症例とした。コントロール群は、KD以外の診療上の理由で血液検査を実施した患児を対象とした。

KDの診断は、厚生労働省川崎病研究班に診断基準として定義された主要症状を5ないし6症状を満たしたものとした。全症例が入院し、治療として、非ステロイド性抗炎症薬（アスピリンないしフルルビプロフェン）の内服やIVIGなどの標準治療の他、UTIによる治療を受けた。冠動脈病変など、KD心合併症をきたした症例は認めなかった。

(2) 検体採取

本研究に使用した血液は、患児と保護者に対して研究内容等を文書にて説明し同意書を取得した上で、診療のための採血と同時に採取した。採血量が不足した場合は診療上の検査を優先し、本研究のためだけに再度の採血はしないこととした。

KD急性期の検体は、KDの治療開始前に採取した（中央値：第4病日）。KD回復期の検体は、KDが寛解し退院した後の外来診療時の採血時に採取した（中央値：第25病日）。KD回復期群はいずれも低用量の非ステロイド性抗炎症薬を内服していた。

(3) 臨床データの統計学的解析

本研究の対象における臨床データそれぞれについて、各群間における統計学的解析を実施した。解析対象とする臨床データは、性別・血液検査時月齢・白血球数・好中球数・リンパ球数・血小板数・C-reactive protein (CRP)・総ビリルビン・aspartate aminotransferase (AST)・alanine aminotransferase (ALT)・血清アル

ブミン・血清ナトリウムとした。

本研究を通じ、全ての統計学的解析には、GraphPad PRISM version 6.07 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) を使用した。

KD 急性期群と健常コントロール群、KD 回復期群と健常コントロール群の 2 群間の有意差検定を Mann-Whitney U test にて実施し、P 値<0.05 を統計学的有意差ありとした。KD 急性期と KD 回復期のいずれでも解析し得た症例については、対応性のある 2 群間での有意差検定を Wilcoxon test にて実施し、P 値<0.05 を統計学的有意差ありとした。KD 群・健常コントロール群の 2 群間における性別の有意差検定は、Fisher's exact test を実施し、P 値<0.1 を統計学的有意差ありとした。

第 2 節 結果

KD 群：37 例、健常児コントロール群：5 例を対象とした。健常児コントロール群は、便秘や尿管ヘルニアに対する術前精査など、発熱および内服薬の無い患児とした。各群の臨床データを表 1 に示す。対象の臨床データは、中央値、25 パーセンタイルおよび 75 パーセンタイルで記載した。

KD 群と健常児コントロール群における性別および月齢の群間比較では、有意差を認めなかった。

KD 急性期群と KD 回復期群の対応性のある 2 群間の比較では、白血球数・好中球数・リンパ球数・CRP・総ビリルビン・ALT・血清アルブミン・血清ナトリウムにおいて有意差を認めた。

KD 急性期群と健常児コントロール群の比較では、白血球数・好中球数・CRP・血清アルブミン・血清ナトリウムにおいて有意差を認めた。一方、KD 回復期群と健常児コントロール群の比較では、いずれの項目においても有意差を認めなかった。

第 3 節 考察

統計学的解析の対象とした臨床データの項目は、KD 標準的治療である IVIG

への不応予測スコアとして代表的に臨床に用いられている小林スコア²⁷⁾、江上スコア²⁸⁾、佐野スコア²⁹⁾に含まれている項目とした。

KDは一般的に、男児の乳幼児に多く、急性期の血液データでは、好中球・CRPがほとんどの症例で高値となる。また症例によっては、総ビリルビン・AST・ALTが上昇し、血小板・血清アルブミン・血清ナトリウムが低下する。本研究の対象としたKD急性期群とKD回復期との比較において血小板・AST以外の項目が有意差を持って同様に变化しており、KD症例として一般的な集団と考えられた。また、KD回復期群の血液データは、健常児コントロール群のものと比較して有意差を認める項目は存在せず、KD回復期において、KDの炎症病態は十分に改善していると考えられた。

第4節 小括

KD急性期群は回復期群と比較して、有意差をもって臨床データは改善していた。健常児コントロール群に炎症徴候は認めなかった。

第3章 NETsの観察

第1節 背景

NETsは、本来核内に存在するクロマチンが細胞外に放出された状態であるため、クロマチンの構成要素であるDNAに選択的に結合する蛍光物質で染色したとき、核内でのみ染色されるはずの構造物を細胞外に認める¹⁾。またMPOやNEといったタンパクは本来細胞質内に存在するが、NETosis時にはクロマチンに付着し細胞外に放出される。そのため、それらタンパクを免疫蛍光染色した場合、DNA染色で染色された構造物と一致して染色される¹⁾。

そこで、NETsの有無あるいは形態を評価するために、DNAのAT結合に特異的に結合し発光するHoechst染色に重ねて、MPOおよびNEをそれぞれ免疫蛍光染色した後に蛍光顕微鏡で観察し、それらが一致した構造物として細胞外に認めるか検討した。

第2節 方法

(1) 末梢血からの好中球分離および調整

KD急性期、KD回復期および健常児コントロール群から無添加のまま採取した全血から、EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation Kit (#19666, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)を用いて好中球をNegative selectionによって分離した。まず、好中球以外の血球表面抗原に対する特異的な抗体を全血に添加し結合させた後、続けて磁気ナノパーティクルを添加し結合させた。5分間静置後、専用のEasySepマグネットに直接差し込み5分間静置した。その間、抗体および磁気ナノパーティクルが結合した細胞をチューブ壁に吸着させ、未標識の好中球のみデカンテーションによって新しいチューブに分離した。その結果、純度：97%以上の好中球浮遊液が得られた(図2A)。

分離後に得られた浮遊液を室温にて300g、5分間の遠心をした後、上清を吸引し2ml~3mlの10%FBS加RPMI1640(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)に再浮遊した。再浮遊液から10 μ lをサンプルとして採取

し、0.4w/v%トリパンブルー溶液（和光純薬、大阪）にて染色した後、TC-20™ 全自動セルカウンター（Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA）によって浮遊細胞の生存数を確認した。得られた生存数に基づいて 10%FBS 加 RPMI1640 を用いて生存細胞の濃度を 1×10^6 個/ml とした。

(2) 好中球の純度管理

上記の再浮遊した好中球液から $5 \mu\text{l}$ をサンプルとして採取し、カバーガラス上に広げ風乾した後、ライトギムザ染色液（武藤化学薬品、東京）を滴下し 1 分染色した後、同量の緩衝液を添加し 10 分染色した。洗浄した後、光学顕微鏡（NIKON ECLIPSE E600、Nikon、東京）による 400 倍視野にて複数の視野を検鏡し、白血球をカウントし好中球の割合を算出した。好中球精度 97%以上の好中球浮遊液を解析対象とした。

(3) 好中球浮遊液への血清添加

好中球を分離した血液とは別容器で採取したものを 45 分間室温にて静置し、十分に凝固させた後、 3°C 、 1500g 、10 分間で遠心し血清を分離した。得られた血清を別チューブに移した後、さらにそれを 3°C 、 15000g 、15 分間遠心した。得られた上清は熱非動化処理せず、上記の好中球浮遊液に最終濃度 6%となるよう添加した²⁶⁾（図 2B）。

(4) 好中球の分注および培養

24 ウェル培養プレートの底に丸形カルチャーカバーガラス（C1110、松浪硝子工業、大阪）を静置し、血清添加好中球浮遊液を 0.5 ml（約 5.0×10^5 個）分注した。その後、 CO_2 インキュベーター（Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA）にて、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で 4 時間培養した（図 2B）。

(5) 免疫染色

培養後、4%パラホルムアルデヒド（163-20145、和光純薬、大阪）を 2ml 添加

し室温にて 10 分間静置し固定した後、丸形カルチャーカバーガラスを培養プレートから取り出し、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline : PBS) (041-20211、和光純薬、大阪) にて 5 分間・3 回洗浄した。次に、PBS で希釈した 0.5% Triton™ X-100 (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany) に 1 分間静置した後、PBS にて 1 分間・3 回洗浄した。次に、ウシ胎児血清 (Bovine Serum Albumins : BSA) を PBS で 5% に調整したブロッキングバッファーに 37°C で 1 時間静置した後、ブロッキングバッファーにて 2000 倍に希釈した抗 MPO 抗体 (ab25989, abcam, England and Wales, UK) および 70 倍に希釈した抗 NE 抗体 (ab68672, abcam, England and Wales, UK) の混合液に 37°C で 1 時間静置した。静置後、PBS で 5 分間・3 回洗浄し、ブロッキングバッファーにて 600 倍に希釈した Alexa Fluor® 488 (ab150077, England and Wales, UK) および Alexa Fluor® 555 (ab150114, England and Wales, UK) の混合液に 37°C で 1 時間静置した。静置後、PBS で 5 分間・3 回洗浄し、PBS で 2 µg/ml に調整した Hoechst 33342 (PromoKine, Heidelberg, Germany) に室温で 15 分間静置した。静置後、PBS で 5 分間・2 回洗浄し、カバーガラスを封入剤 M・X (松浪硝子工業、大阪) にてスライドガラスに固着した。

(6) 蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE、大阪) を用いて観察した。蛍光フィルタは DAPI・GFP・TRITC の 3 種類を用いた。染色された糸状もしくは網状の構造物で、それぞれのフィルタで観察することができ、かつ Marge によってそれら全てが一致した構造物を NETs と判断した。

(7) 視野数のカウント

丸形カルチャーカバーガラスの全域を 20 倍対物レンズ (CFI Plan Apochromat Lambda、Nikon、東京) にて観察した 682 視野において、NETs を観察し得た視野数をカウントした (図 3)。

各群間における視野数について統計学的解析を実施した。

第3節 結果

(1) NETs の観察

KD 群：37 例中、単離培養した好中球の NETs 観察および視野数カウントを実施できたのは、検体採取し得た KD 急性期：24 例中 20 例、KD 回復期：29 例 26 例だった。そのうち、急性期および回復期のいずれも観察できたのは 11 例だった。KD 急性期および回復期の両者において、解析できた群とできなかった群の臨床データには有意差を認めなかった。KD 急性期では、20 例のうち 19 例において、細胞外に Hoechst で染色された糸状の DNA を認めた。また MPO・NE も同様に、それぞれの蛍光抗体で糸状に染色され、それぞれの画像を Merge したところ、DNA・MPO・NE が一致していることを確認することができ、NETs と判断した (図 4)。KD 回復期では、26 例のうち 17 例においては同様の構造物を認めず (図 5A)、9 例において認めた (図 5B)。健常コントロール群：5 例では、NETs をいずれも認めなかった (図 6)。

(2) 各群間における視野数の統計学的解析

KD 急性期群は健常児コントロール群と比較して有意に NETs を認めた視野数が多かった ($P=0.0002$) (図 7A)。KD 回復期群と健常児コントロール群との比較では、KD 回復期群において NETs を認める症例があったものの、有意差は認めなかった ($P=0.2441$) (図 7B)。急性期群：20 例と回復期群：26 例の有意差検定では、急性期群が有意に NETs を認めた視野数が多かった ($P=0.0029$) (図 8A)。急性期および回復期のいずれも観察し得た 11 例における対応性のある 2 群間比較 (Wilcoxon test) においても、急性期群が有意に NETs を認めた視野数が多かった (図 8B) ($P<0.0001$)。

第4節 考察

治療前の KD 急性期の患児の血液から好中球を単離し、*in vitro* において培養したところ、細胞外において DNA・MPO・NE が一致して染色された糸状もしくは網状の構造物を認め、それを NETs と判断した。NETs を認めた視野数にお

いても、KD 急性期群は健常児コントロール群および KD 回復期群より有意に多く、KD 急性期の好中球は NETosis を起こしやすい状態になっていることが明らかとなった。

大半の KD 回復期群の患児から単離培養した好中球では NETs 形成を認めなかったが、症例によっては NETs を観察し得るものがあった。ただし、視野数における健常児コントロール群との有意差は認めなかった。KD 回復期群の患児において、NETs の有無による臨床データの差異を認めず、回復期の NETs の有無が臨床的にどのような影響を及ぼしているかは明らかでない。

健常児コントロール群の解析では、NETs を認めた症例は認めなかった。臨床データ上においても炎症反応の上昇は認めず、小児の好中球は通常 NETosis を抑制されていると考えられた。

NETs を実際に認めた視野数のカウントを NETs の定量として実施したが、留意すべき点がある。即ち、カバーガラス上に散布する好中球数は各症例でほぼ同数だが、全ての症例において全く同一に好中球を散布できてはいない。そのため、好中球の偏在が強い視野では NETs 陽性率が過小評価され、分散している視野では陽性率が増加するというように、カバーガラス上の好中球の分布状況が、NETs 陽性としてカウントされる視野数に影響を及ぼす可能性がある。

第 5 節 小括

KD 急性期群の好中球を *in vitro* において培養したところ、NETs を観察し得た。また NETs を認めた視野数の統計学的比較では、KD 急性期群において、KD 回復期・コントロール群より有意に多くの NETs を観察し得た。また、大半の KD 回復期群の好中球では NETs を認めなかったが、症例によっては NETs を観察し得るものがあった。ただし、KD 回復期群と健常コントロール群との統計学的比較では有意差を認めなかった。

第4章 Cell-free DNA のリアルタイム PCR による NETs の定量

第1節 背景

Cell-free DNA (cfDNA) とは、生体内において本来核内にある DNA が血管内に循環しているものである。細菌などの外来微生物由来のもの³⁰⁾、悪性新生物の細胞からの漏出³¹⁾、胎盤を経由して母体内に循環している胎児の DNA³²⁾ など、その cfDNA の PCR 解析は多岐にわたる。

NETs においては、好中球の核内に含まれる DNA が細胞外に放出されるため cfDNA の上昇が予測され、実際に SLE の患者のループス腎炎増悪時に NETs および血漿中 cfDNA 濃度が上昇することが報告されている³³⁾。

第3章において、KD 患者から単離培養した好中球において NETs を認め、その視野数のカウントで定量化し各群間の比較を実施したが、より客観的な定量のため、培養上清中の cfDNA 中に含まれるハウスキーピング遺伝子であるリボヌクレアーゼ P (Ribonuclease P : RNaseP) を標的とした定量リアルタイム PCR を実施し、各群間について統計学的に解析した。

第2節 方法

- (1) 末梢血からの好中球分離および調整
- (2) 好中球の精度管理
- (3) 好中球浮遊液への血清添加

第3章と同様の方法で実施した。

- (4) 好中球の培養

24 ウェル培養プレートに、血清添加好中球浮遊液を 1 ml (約 1.0×10^6 個) 分注した。その後、第3章と同様の方法で3時間培養した。

- (5) Cell-free DNA を含む培養上清の回収

培養後の上清を 1.5ml の DNA low binding tube (eppendorf, Hamburg, Germany)

に回収し、500 mM のエチレンジアミン四酢酸 (Cayman chemical, Michigan, USA) を 20 μ l 添加した後、室温にて 16000g、10 分間遠心した。遠心後、上清を新しい DNA low binding tube に分注し、-80°Cにて保存した。

(6) Cell-free DNA を含む培養上清の精製

-80°Cに保存した培養上清を室温にて解凍し、Maxwell[®] Rapid Sample Concentrator 核酸精製キット (AS1480, Promega, Madison, Wisconsin, USA) を用いて 50 μ l に精製・濃縮した。精製後の DNA 量は Invitrogen[™] Qubit[™] 3 フルオロメーター (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて濃度を測定した。

(7) 定量リアルタイム PCR

RNaseP の定量は、リアルタイム PCR は蛍光標識プローブ法、いわゆる TaqMan プローブ法で実施した。反応総量は 20 μ l で、反応組成はサンプル DNA 1 μ l、TaqMan[™] 2 \times EagleTaq Universal PCR Master Mix (Roche, Basel, CHE)、Applied Biosystems[™] TaqMan[™] 20 \times RNaseP Primer-Probe (VIC[™] dye) Mix (#4316844, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) とした。PCR は、LightCycler[®] 480 II (Roche, Basel, CHE) を用い、96 ウェルプレートを使用し、50°C 2 分、95°C 10 分の初期ステップの後、45 サイクル (95°C 15 秒、60°C 1 分) で実施した。RNaseP のコピー数は、プラスミド DNA の段階希釈系列の増幅曲線から作成される検量線をもとに算出した。PCR で得られた RNaseP の測定値は、1 μ gDNA あたりに換算して最終定量値とした。

各群間において得られた測定値について、第 2 章と同様に統計学的解析を実施した。

第 3 節 結果

KD 群:37 例中、単離した好中球の培養上清中 cfDNA の定量リアルタイム PCR を実施できたのは、検体採取し得た KD 急性期 : 24 例中 21 例、KD 回復期 : 29

例中 25 例だった。そのうち、急性期および回復期のいずれも測定したのは 13 例だった。KD 急性期および回復期の両者において、解析できた群とできなかった群の臨床データには有意差を認めなかった。また、健常児コントロール群は 4 例の測定を実施した。

KD 群の対応性のある 13 例における Wilcoxon test では、急性期群が有意に高値であった ($P=0.0206$) (図 10B)。KD 急性期群と健常児コントロール群の比較では $P>0.999$ (図 9A)、KD 回復期群と健常児コントロール群の比較では $P=0.3736$ (図 9B) といずれも有意差を認めなかった。また、KD 急性期群と KD 回復期群の 2 群間比較では $P=0.0604$ と有意差を認めなかった (図 10A)。

第 4 節 考察

KD 急性期群と KD 回復期群の cfDNA 定量の比較では、対応性のある 2 群間比較において、KD 急性期群が有意に高値であった。この結果は、NETs 検鏡による視野数カウントの比較 (図 8B) と一致する。一方、KD 急性期群と KD 回復期群の全例比較では、視野数カウントの比較の結果と異なり有意差を認めなかった。その理由として、KD の NETs 形成の程度には症例差があるため、症例間のバイアスが除かれた対応性のある 2 群間比較においてのみ有意差を認めたと考えられる。KD 回復期でしか解析できていない症例のなかには、KD 急性期において cfDNA がさらに高値であったかもしれない。

KD 急性期の好中球では健常児コントロール群と比較して、検鏡において NETs を有意に多く認めたが cfDNA 定量では統計学的に有意差を認めなかった。その理由として、cfDNA 自体が NETosis のみに特異的なものではないことが考えられる。培養中の好中球が Apoptosis といった他の細胞死を生じた場合でも、細胞が崩壊し核内の DNA が上清中に放出されるため、cfDNA が上昇し得る。一方、KD 急性期に活性化された好中球の Apoptosis は抑制されていること³⁴⁾が報告されており、培養好中球の顕鏡で NETs を観察し得たことを鑑みると、KD 急性期群の cfDNA は NETosis 由来であり、健常コントロール群の cfDNA は Apoptosis 由来である可能性がある。

第5節 小括

KD 急性期群の患児の好中球を *in vitro* にて培養した培養上清中の cfDNA 量は、対応する KD 回復期群の患児のものと比較して有意差をもって高値であった。

KD 群とコントロール群との比較では有意差は認めなかったが、cfDNA が NETosis に特異的なものではなく、正常好中球でも生じうる Necrosis や Apoptosis の影響を受けている可能性が考えられる。

第5章 NE/DNA 複合体の ELISA による NETs の定量

第1節 背景

好中球エラスターゼ (Neutrophil elastase : NE) は、機能的に活性化された好中球において産生される酵素の一つであり、以下の報告のように KD の病態への関与が示唆されている。即ち、KD の剖検例による病理学的解析において冠動脈病変部位への NE 陽性好中球などの浸潤像が認められること³⁵⁾、KD 治療において NE を不活化させる UTI を IVIG と早期から併用することによって冠動脈病変発生率を減少させること³⁶⁾などである。

本研究において、KD 急性期の好中球は、*in vitro* の培養によって NETs を形成しており、細胞外に糸状に放出された DNA に MPO および NE が付着することが明らかとなった。そこで、KD における NETs の定量として、細胞外に放出された NE/DNA 複合体を定量し、各群間について統計学的に解析した。

第2節 方法

- (1) 末梢血からの好中球分離および調整
- (2) 好中球の精度管理
- (3) 好中球浮遊液への血清添加

第3章と同様の方法で実施した。

- (4) 好中球の培養

24 ウェル培養プレートの底に丸形カルチャーカバーガラス (C1110、松浪硝子工業、大阪) を静置し、血清添加好中球浮遊液を 100 μ l (約 1.0×10^6 個) 分注した。その後、第3章と同様の方法で3時間培養した。

- (5) 培養上清中の NE/DNA 複合体の精製・ELISA 法による定量

培養終了後、NETosis Assay Kit (#601010, Cayman chemical, Michigan, USA) のプロトコルに沿って培養上清中の NE を精製し、ELISA 法による測定まで -80°C

で凍結保存した。この精製の過程では、好中球を培養した培養プレートのウェルを2回洗浄することで浮遊しているNEを除去しており、DNAと結合しているNETs由来のNEのみを選択的に精製することができる(図11)。

ELISA法は、解析当日にサンプルを解凍後、上記キットのプロトコルに沿って実施した。標準直線の作成には、キットに付属している Human Neutrophil Elastase Assay Reagent を段階希釈したものを使用した。

各群間において得られた測定値について、第2章と同様に統計学的解析を実施した。

第3節 結果

KD群:37例中、単離した好中球の培養上清中のNEのELISAによる解析は、検体採取し得たKD急性期:24例中19例、KD回復期:29例26例だった。そのうち、急性期および回復期のいずれも解析したのは15例だった。KD急性期および回復期の両者において、解析できた群とできなかった群の臨床データには有意差を認めなかった。また、健常児コントロール群は4例にて解析した。

KD急性期群と健常児コントロール群の比較では、急性期群が $P=0.0282$ (図12A)と有意に高値であった。一方、回復期群と健常児コントロール群の比較では、 $P=0.6248$ (図12B)と有意差を認めなかったが、健常児コントロール群より高い傾向にあった。また、KD急性期群とKD回復期群の全例における2群間比較では、 $P=0.0048$ と有意差をもってKD急性群のNEが高値であった(図13A)。さらに、対応性のある15例における2群間比較(Wilcoxon test)においても、急性期群が有意に高値であった($P=0.0302$)(図13B)。

第4節 考察

末梢血から分離した好中球を培養した上清から精製したNE/DNA複合体のELISA法による定量の統計学的解析の結果は、第3章の顕鏡によるNETsの視野数カウントのものと一致した。即ち、KD急性期群の患児のNEが健常児コントロール群のものより有意に高値であること、KD急性期群とKD回復期群との

比較では、全例における 2 群間比較および対応性のある 2 群間比較のいずれも KD 急性期群が高値であること、また、KD 回復期群と健常児コントロール群との比較において、有意差はないものの KD 回復期群が高い傾向にあることである。したがって、今回 ELISA 法によって定量した NE は、NETs 特異的なものであると考えられる。

KD 回復期群でも 5 例において NE が高値である例を認めた。冠動脈病変を有する患児では、発症 3 か月後においても血漿中の NE が高値であるといった報告³⁷⁾もあるが、本研究の対象者には冠動脈病変を有する症例は無い。しかし、何らかの慢性的な炎症が持続していることを示唆するのかもしれない。

第 5 節 小括

KD 急性期群の好中球を *in vitro* にて培養した培養上清中の NE 量は、KD 回復期・コントロール群と比較して有意に高値であった。また、KD 回復期群の培養上清中の NE 量は、有意差は無いものの、コントロール群と比較して多い症例もあった。NE 測定値の動態は、形態学的な NETs 形成カウントのものとはほぼ一致していた。したがって、ELISA による NE 測定は cfDNA に比して NETs 形成をより特異的に反映していると考えられる。

第6章 考察

KD の病態において NETs が関与しているかどうかについての報告は、国内外ともない。今回の解析により、*in vitro* において培養した KD 急性期の末梢血好中球は、NETs 形成が亢進していることが判明した。従って、KD では NETosis の制御機構が破綻することによって NETs の過剰な放出が起こり、血管炎の病態形成に深く関与することが考えられる。また KD 回復期は健常コントロールと比較して、培養好中球の顕鏡によるカウントや、ELISA による NE/DNA 複合体の定量において、統計学的有意差は認めなかったものの NETs 形成が亢進している傾向にあった。これは、臨床における血液データ上は炎症が改善しているにもかかわらず、検査データではとらえることができない炎症の遷延化を反映しているのかもしれない。この状態がいつまで続くのかは不明であり、今後のさらなる解析が必要である。

本研究における NETosis の評価では、蛍光顕微鏡による NETs 形成の形態学的検討（多重免疫染色）を実施し、さらに NETs 形成の定量的解析として、(1)視野数のカウント、(2)培養上清中 cfDNA の定量リアルタイム PCR、(3)ELISA 法による NE/DNA 定量の3つを実施したが、それぞれ長所と短所が存在する。(1)NETs 形成を認めた視野数カウントでは、NETs を直接的に定量しているものの、カバーガラス上に散布した好中球の散布状態によって、過小もしくは過大評価の可能性はある。(2)分離した好中球の培養上清中 cfDNA のリアルタイム PCR 定量では、PCR の対象とする培養上清中 cfDNA の回収が容易であり症例ごとの回収率に差が出にくい、培養にともなって正常好中球にも生じる apoptosis によって cfDNA が上昇し得るため、NETs 特異性には欠ける。これが、KD 群とコントロール群間で有意差を認めなかった原因と考えられる。(3)培養上清中の NE/DNA 複合体の ELISA 法による定量は、NE/DNA 複合体が NETs に特異的な産物であるため、より高い精度での NETs の定量および各検体間の比較が可能だが、培養上清中に apoptosis によって細胞外に漏出した可溶性 NE などを除去しきれない可能性はある。こうした背景から今回の研究では、上述の3つの定量的方法を組み合わせることによって、NETs 形成量を総合的に判断した。

KDにおける血管炎の病態は未だ不明な点が多いが、以下に記す報告などから、KD急性期において好中球が機能的に活性化され、NEなどの抗菌タンパクによる血管内皮細胞障害が、KDの血管炎の病態や冠動脈病変形成に深く関与していることが示唆される。即ち、KD急性期の好中球は*in vitro*においてNEを過剰に産生³⁸⁾し、KD急性期から亜急性期にかけて血管内皮細胞を障害するため、血中の血管内皮細胞が増加する³⁹⁾。また、NEの不活化作用を有するウリナスタチン(Ulinastatin, urinary trypsin inhibitor : UTI)は*in vitro*において活性化好中球による血管内皮細胞障害を抑制する⁴⁰⁾。また、KD急性期に活性化された好中球のapoptosisが抑制されており³⁷⁾、IVIGは好中球のapoptosisを誘導することにより末梢血好中球数を減少させる⁴¹⁾⁻⁴³⁾。さらに、UTIをIVIGとともに早期から併用することによって冠動脈病変発生率が減少する³⁶⁾などでの報告がある。こうした報告の背景と本研究の結果から、NETs形成はKD血管炎の発症において、NE放出を介して、あるいは、クロマチンに含まれるDNAやヒストンがもつ細胞障害性による直接的な血管内皮細胞への障害などによって関与している可能性が考えられる。

KDにおけるNETosis関与のイメージを図15に提示する。何らかの刺激によって活性化された好中球はNEや活性酸素などを過剰に産生することで血管炎の病態に深く関与すると考えられている。今回の研究によって、好中球はさらにNETsを細胞外に過剰に放出することで、血管内細胞障害を引き起こしKD血管の病態に関与することが示唆された。また、活性化された好中球は血管内皮細胞への接着因子の発現を増強させるとともに、NETsによる物理的な血流停滞によって活性化好中球と血管内皮細胞の接着がさらに促進され、その結果、血管外への好中球の遊走が促進され、血管外への炎症の波及が生じている可能性がある。

本研究のLimitationとして、第1に、本研究では、KD急性期の末梢血好中球はNET形成が亢進している状態にあることは*in vitro*において明らかにしたが、生体内において実際にNETosisが生じているかは証明できていない。しかし、NETs形成がKD血管炎の病態に関与することは示唆された。

第2に、分離・培養している好中球が末梢血内由来のものだけであることで

ある。急性心筋梗塞の急性期に関与している NETosis は、梗塞冠動脈から得られた好中球と非梗塞冠動脈のものとは、その発生に差があるとの報告²⁶⁾がある。KD は全身の血管炎ではあるものの、合併症として冠動脈瘤をきたす疾患であり、末梢静脈内の好中球と冠動脈内のものとは差があるかもしれない。ただ、KD を発症した児から冠動脈血を採取することは、冠動脈瘤を呈しない限り臨床上不可能であり検証は困難である。

今後の検討課題として、第 1 に、IVIG をはじめ UTI やステロイドなど既存の治療が NETs 形成に与える影響の解析が挙げられる。KD の標準治療である IVIG は、その効果は認められているものの未だ作用機序が不明であり、その投与方法にはいまだ議論がある。治療薬の作用機序の解明は、より効果的な投与方法の発見に寄与でき、結果的に冠動脈瘤などの重篤な KD 合併症の低減に寄与できる。

第 2 に、NETs タンパクの解析が挙げられる。これまでに、家族性地中海熱における IL-1 β ¹⁸⁾、急性心筋梗塞の急性期における組織因子²⁶⁾など、疾患特異的な NETs タンパクが報告されている。KD の NETosis に MPO や NE 以外に特異的な NETs タンパクを見出すことができれば、KD の原因究明や疾患特異的 NETs タンパクを標的とした新規治療薬の開発が期待できる。

第 3 に KD の NETosis における細胞内シグナル伝達の分子メカニズムの解析が挙げられる。IVIG やアスピリンといった標準治療への抵抗性を示す症例の病因機序が不明である一方、KD への新しい治療法として、抗 Tumor necrosis factor (TNF)-alpha 抗体 (Infliximab) が報告⁴⁴⁾され、国内においてもその有効性が報告された⁴⁵⁾。このように、KD の好中球におけるサイトカインの役割や、その細胞内シグナル伝達 (例えば TNF/Fas-ligand/Fas 経路) の詳細を明らかにすることができれば、NETosis 形成の機序や KD の原因究明および合併症を低下させる新規治療の発見にもつながることが期待される。

第7章 結論

KD の末梢血好中球を *in vitro* にて培養し NETs 形成を観察し、さらに培養上清中の cfDNA および NE/DNA 複合体を測定した。

- (1) 形態学的検討では、KD 急性期および KD 回復期の一部において細胞外に DNA・MPO・NE が一致して糸状に染色され、NETs と判断した。
- (2) NETs を認めた視野数のカウントでは、KD 急性期群が KD 回復期・コントロール群と比較して有意に多くの NETs を観察し得た。
- (3) 培養上清中に cfDNA のリアルタイム PCR 定量では、KD 急性期群の cfDNA 量は、対応する KD 回復期と比較して有意差をもって高値であった。
- (4) 培養上清中の NE/DNA 複合体の ELISA 法による定量では、KD 急性期群の NE 量は、KD 回復期・コントロール群と比較して有意に高値であった。

以上、KD 急性期において NETosis は亢進していることが示唆され、KD おける血管炎の病態には、NETs 形成が深く関与していると考えられる。したがって NETs の解析は、KD の原因究明や治療法の新規発見に貢献し、結果として KD 合併症の低減、ひいては KD 症例の予後改善に寄与する可能性がある。

【謝辞】

本研究の実施及び本論文の作成にあたり、全般にわたりご指導を賜りました
防衛医科大学校小児科学講座 野々山恵章教授に謹んで感謝申し上げます。

また、貴重なご指導ご指摘をいただきました防衛医科大学校医学教育部看護
学科 竹下誠一郎教授をはじめ、小児科学講座の諸先生方、そして検体採取に
ご同意くださいました患者およびその保護者の皆様に心より感謝いたします。

防衛医科大学校小児科学講座

川村 陽一 先生

金井 貴志 先生

関中佳奈子 先生

関中 悠仁 先生

小倉 友美 先生

座波 清誉 先生

賀佐 希美子 様

【単語・略語説明】

クロマチン

核内に存在する DNA とタンパク質の複合体。

好中球 elastase (Neutrophil elastase : NE)

好中球が産生するタンパク分解酵素 (セリンプロテアーゼ) の一つ。菌や毒素を分解する。

Myeloperoxidase (MPO)

好中球のアズール顆粒内が産生する酵素の一つ。体内において過酸化水素のペルオキシド構造を切断することで次亜塩素酸を産生する。

Necrosis

細胞の壊死。微生物の感染、物理的ダメージ、血流欠乏など外的要因による細胞死。

Apoptosis

プログラムされた細胞死。腫瘍化した細胞の除去や生物発生過程などに生じる内的要因による細胞死。

免疫グロブリン大量療法 (Intravenous immunoglobulin : IVIG)

献血由来のヒト血液から、免疫グロブリン (Immunoglobulin) のうち、Immunoglobulin G のみを精製した製剤を、2 g/kg 投与する川崎病への標準的な治療法。アスピリン内服との組み合わせにより、冠動脈瘤の合併率を大幅に低下させた。

ウリナスタチン (Ulinastatin, urinary trypsin inhibitor : UTI)

ヒト尿から分離・精製された種々のタンパク分解酵素に対する多価酵素阻害剤。臨床的に急性循環不全、急性膵炎などに使用される。川崎病に対する効

果としては、サイトカインの抑制、白血球からの産生・遊離の抑制、血管内皮細胞の保護、好中球ライソソーム膜の安定化、放出された NE の不活化などが提唱されている。

Polymerase chain reaction (PCR)

2 本鎖 DNA が温度により解離・結合状態が変化する性質を応用した核酸増幅技術。反応の進行には精密な温度変化が必要であるため、サーマルサイクラーと呼ばれる専用の機器を必要とする。また、反応の結果を確認するには電気泳動など別の工程を必要とする。

リアルタイム PCR

PCR により 1 サイクル毎に DNA が 2 倍になっていく増幅の様子をリアルタイムにモニタリングする検査法。PCR 増幅産物を蛍光により検出し、PCR 産物濃度があらかじめ分かっている標準曲線の増幅曲線と、サンプルの増幅曲線を比較することでサンプルに含まれる DNA 量を計算する。

ハウスキーピング遺伝子

一部の組織・細胞で特異的に発現する遺伝子と異なり、多くの組織・細胞において共通に発現する遺伝子。

リボヌクレアーゼ P (Ribonuclease P)

リボ核酸を分解し、オリゴヌクレオチドやモノヌクレオチドに分解する酵素。

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

試料溶液中に含まれる目的の物質を抗原ないし抗体として、特異抗体あるいは抗原を添加し結合させることで捕捉し、酵素反応を利用して発光させ、吸光度測定にて検出・定量する方法。濃度があらかじめ分かっている目的の物質の吸光度を用いた標準直線をもとに近似値を計算し濃度を算出する。

【引用文献】

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303: 1532-5, 2004.
2. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host Microbe* 12: 109-116, 2012.
3. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8: 668–676, 2006.
4. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5: e1000639, 2009.
5. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6748–6753, 2009.
6. DeSouza-Vieira T, Guimarães-Costa A, Rochael NC, Lira MN, Nascimento MT, Lima-Gomez PS, Mariante RM, Persechini PM, Saraiva EM. Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: role of PI3Kg, ERK, PI3Ks, KC, and [Ca²⁺]. *J Leukoc Biol* 100: 801-810, 2016.
7. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198: 773-783, 2012.
8. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest* 126: 1612-20, 2016.
9. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, Cifuni SM, Fuchs TA, von Andrian UH, Hartwig JH, Aster RH, Wagner DD. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood* 119: 6335–6343, 2012.
10. Yang S, Qi H, Kan K, Chen J, Xie H, Guo X, Zhang L. Neutrophil extracellular traps

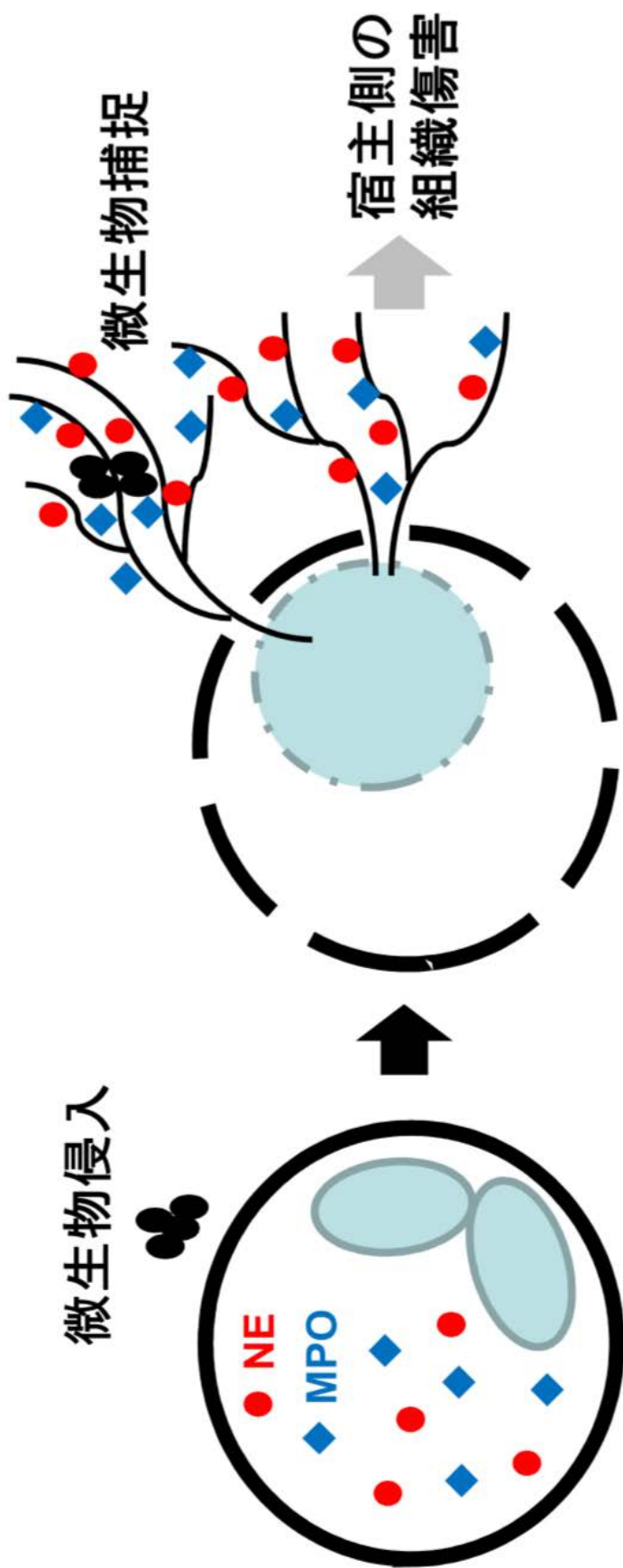
- promote hypercoagulability in patients with sepsis. *Shock* 47: 132-139, 2017.
11. Delabranche X, Stiel L, Severac F, Galoisy AC, Mauvieux L, Zobairi F, Lavigne T, Toti F, Anglès-Cano E, Meziani F, Boisramé-Helms J. Evidence of NETosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Shock* 47: 313-317, 2017.
 12. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther* 16: R122, 2014.
 13. Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, Alcaro MC, Paolini I, Barbetti F, Boscaro F, Panza F, Puxeddu I, Rovero P, Migliorini P. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis* 73: 1414-1422, 2014.
 14. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, Thompson P, Chen P, Fox DA, Pennathur S, Kaplan MJ. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 5: 178ra40, 2013.
 15. Dwivedi N, Neeli I, Schall N, Wan H, Desiderio DM, Csernok E, Thompson PR, Dali H, Briand JP, Muller S, Radic M. Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity. *FASEB J* 28: 2840-2851, 2014.
 16. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Detection of SLE antigens in neutrophil extracellular traps (NETs). *Methods Mol Biol* 1134: 151–161, 2014.
 17. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 9813–9818, 2010.
 18. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, Nakos K, Tsironidou V, Koffa M4, Boumpas DT5, Ritis K. Neutrophil extracellular traps IL-1 β -mediated in inflammation Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 75: 269-277, 2016.
 19. Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S, Shigematsu I, Yanagawa H. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan.

Pediatrics 54: 271-276, 1974.

20. Kato H, Koike S, Yamamoto M, Ito Y, Yano E. Coronary aneurysms in infants and young children with acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome. *J Pediatr* 86: 892-898, 1975.
21. Jane W. Newburger, Masato Takahashi, Alexa S. Beiser, Jane C. Burns, John Bastian, Kyung Ja Chung, Steven D. Colan, C. Elise Duffy, David R. Fulton, Mary P. Glode, Wilbert H. Mason, H. Cody Meissner, Anne H. Rowley, Stanford T. Shulman, Venudhar Reddy, Robert P. Sundel, James W. Wiggins, Theodore Colton, Marian E. Melish, Fred S. Rosen. A single intravenous infusion of gamma globulin as compared with four infusions in the treatment of acute Kawasaki syndrome. *N Engl J Med* 324: 1633-1639, 1991.
22. Nakamura Y, Yashiro M, Uehara R, Sadakane A, Tsuboi S, Aoyama Y, Kotani K, Tsogzolbaatar EO, Yanagawa H. Epidemiologic features of Kawasaki disease in Japan: results of the 2009–2010 nationwide survey. *N Engl J Med* 22: 216–221, 2012.
23. Nakamura Y. *Kawasaki Disease: 79-84*, SPRINGER NATURE, August 2016.
24. Yan H, Zhou HF, Akk A, Hu Y, Springer LE, Ennis TL, Pham CTN. Neutrophil Proteases Promote Experimental Abdominal Aortic Aneurysm via Extracellular Trap Release and Plasmacytoid Dendritic Cell Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 1660-1669, 2016.
25. Söderberg D, Kurz T, Motamedi A, Hellmark T, Eriksson P, Segelmark M. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatology (Oxford)* 54: 2085-2094, 2015.
26. Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Tsironidou V, Giatromanolaki A, Skendros P, Konstantinides S, Ritis K. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 36: 1405-1414, 2015.
27. Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, Okada Y, Tamura K, Tomomasa T, Kobayashi T, Morikawa A. Prediction of intravenous immunoglobulin unresponsiveness in patients with Kawasaki disease. *Circulation* 113: 2606-2612, 2006.

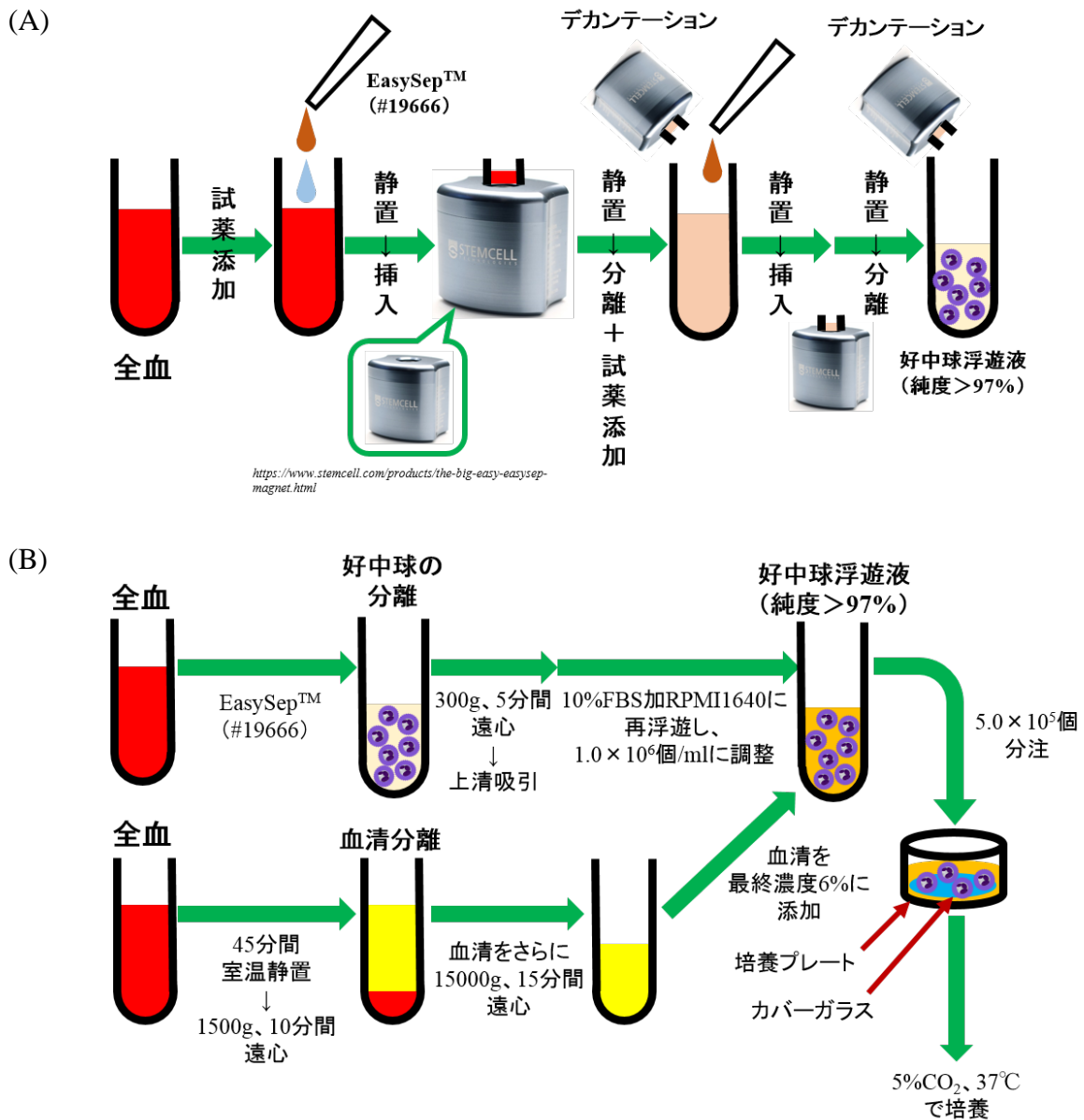
28. Egami K, Muta H, Ishii M, Suda K, Sugahara Y, Iemura M, Matsuishi T. Prediction of resistance to intravenous immunoglobulin treatment in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 149: 237-240, 2006.
29. Sano T, Kurotobi S, Matsuzaki K, Yamamoto T, Maki I, Miki K, Kogaki S, Hara J. Prediction of non-responsiveness to standard high-dose gamma-globulin therapy in patients with acute Kawasaki disease before starting initial treatment. *Eur J Pediatr* 166: 131-137, 2007.
30. Vernon SD, Shukla SK, Conradt J, Unger ER, Reeves WC. Analysis of 16S rRNA gene sequences and circulating cell-free DNA from plasma of chronic fatigue syndrome and non-fatigued subjects. *BMC Microbiol* 2: 39, 2002.
31. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 22: 4157-4164, 2004.
32. Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta* 25 Suppl A:S93-S101, 2004.
33. Zhang S, Lu X, Shu X, Tian X, Yang H, Yang W, Zhang Y, Wang G. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 53: 2763-2771, 2014.
34. Tsujimoto H, Takeshita S, Nakatani K, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I. Delayed apoptosis of circulating neutrophils in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 126: 355-364, 2001.
35. Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S, Wakayama M, Yokouchi Y. Neutrophilic involvement in the damage to coronary arteries in acute stage of Kawasaki disease. *Pediatr Int* 47: 305-310, 2005.
36. Kanai T, Ishiwata T, Kobayashi T, Sato H, Takizawa M, Kawamura Y, Tsujimoto H, Nakatani K, Ishibashi N, Nishiyama M, Hatai Y, Asano Y, Kobayashi T, Takeshita S, Nonoyama S. Ulinastatin, a urinary trypsin inhibitor, for the initial treatment of patients with Kawasaki disease: a retrospective study. *Circulation* 124: 2822-8, 2011.

37. Biezeveld MH, van Mierlo G, Lutter R, Kuipers IM, Dekker T, Hack CE, Newburger JW, Kuijpers TW. Sustained activation of neutrophils in the course of Kawasaki disease: an association with matrix metalloproteinases. *Clin Exp Immunol* 141: 183-188, 2005.
38. Takeshita S, Nakatani K, Kawase H, Seki S, Yamamoto M, Sekine I, Yoshioka S. The role of bacterial lipopolysaccharide-bound neutrophils in the pathogenesis of Kawasaki disease. *J Infect Dis* 179: 508-512, 1999.
39. Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I. Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 131: 536-540, 2003.
40. Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Sekine I. Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leukoc Biol* 69: 241-247, 2001.
41. Tsujimoto H, Takeshita S, Nakatani K, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I. Intravenous immunoglobulin therapy induces neutrophil apoptosis in Kawasaki disease. *Clin Immunol* 103: 161-168, 2002.
42. Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Sekine I. Intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations induce apoptosis in TNF-alpha-stimulated endothelial cells via a mitochondria-dependent pathway. *Clin Exp Immunol* 127: 445-454, 2002
43. Takeshita S, Tsujimoto H, Nakatani K. Intravenous immunoglobulin preparations promote apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils via an oxygen-dependent pathway in vitro. *APMIS* 113: 269-277, 2005.
44. Weiss JE, Eberhard BA, Chowdhury D, Gottlieb BS. Infliximab as a novel therapy for refractory Kawasaki disease. *J Rheumatol* 31: 808-10, 2004.
45. Mori M, Hara T, Kikuchi M, Shimizu H, Miyamoto T, Iwashima S, Oonishi T, Hashimoto K, Kobayashi N, Waki K, Suzuki Y, Otsubo Y, Yamada H, Ishikawa C, Kato T, Fuse S. Infliximab versus intravenous immunoglobulin for refractory Kawasaki disease: a phase 3, randomized, open-label, active-controlled, parallel-group, multicenter trial. *Sci Rep* 8: s41598-017-18387-7, 2018.



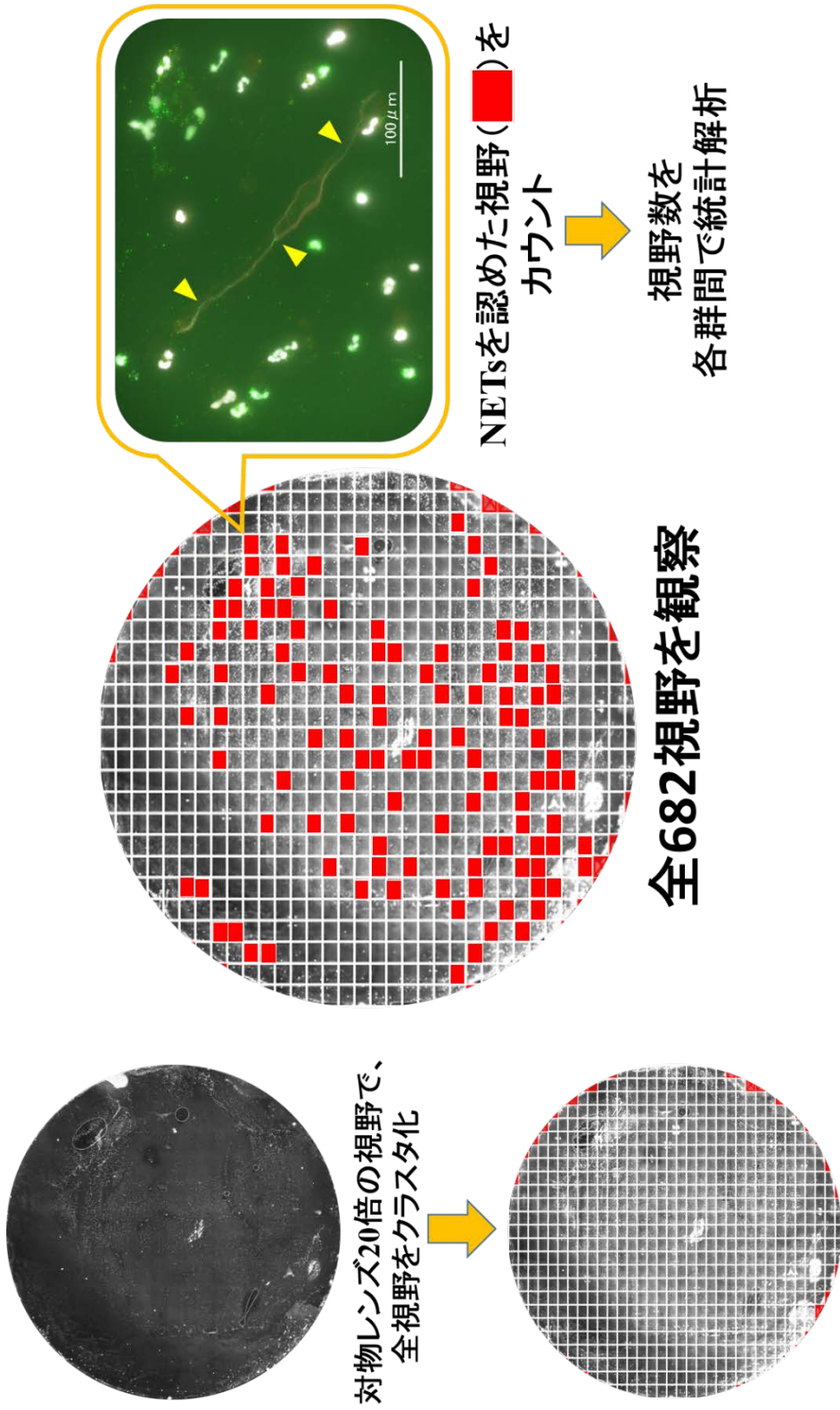
【図1】 好中球細胞外トラップ (NETs) の略図

核 (水色) からクロマチンが網目状に放出され、好中球エラスターゼや Myeloperoxidase が付着することで微生物の補足、殺菌を行うとともに、その炎症によって宿主側への組織障害をもたらす。

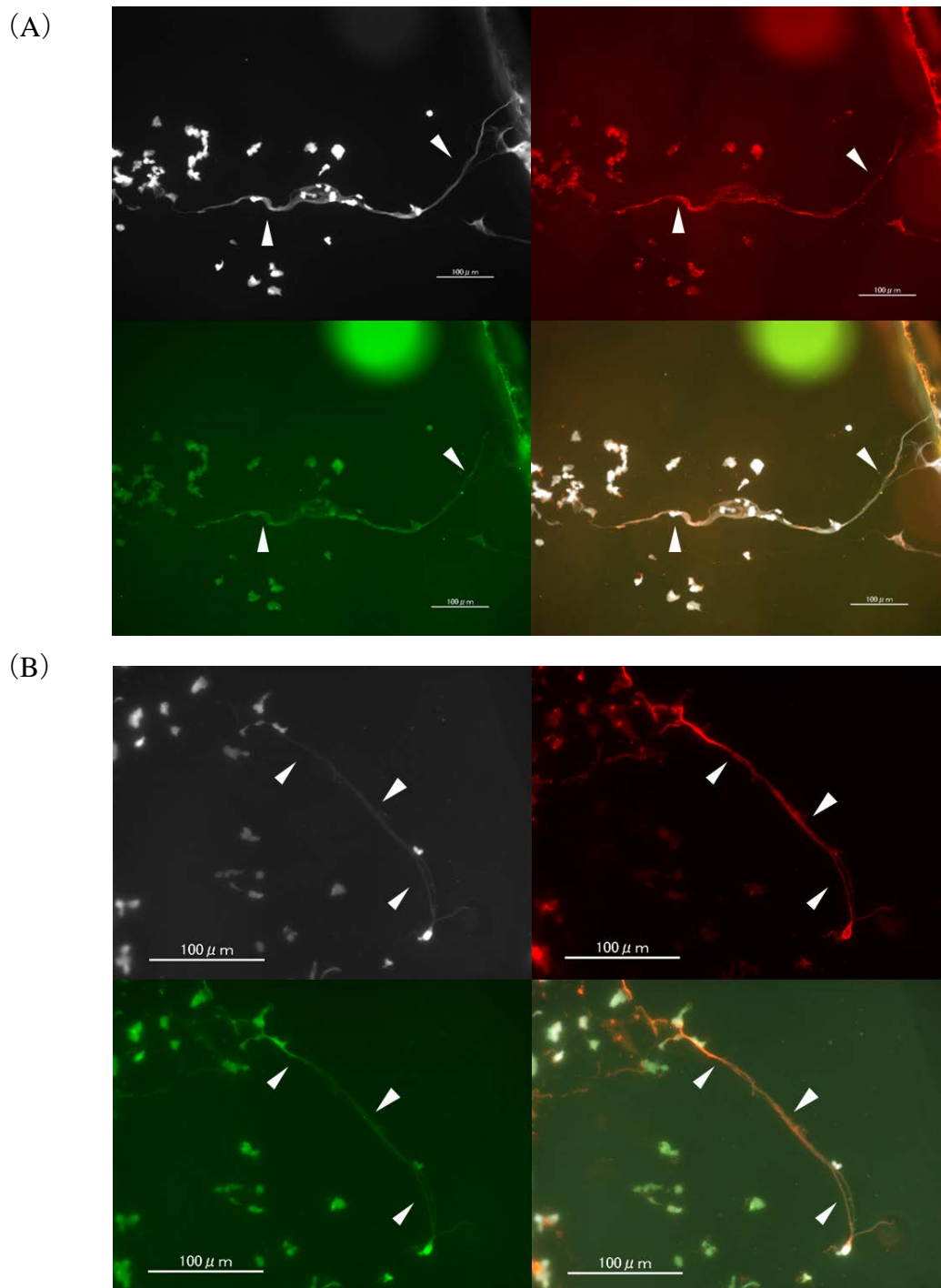


【図 2】 全血からの好中球分離および好中球浮遊液の作成・分注

(A) EasySep™ Direct Human Neutrophil Isolation Kit を用いた全血からの好中球の分離。(B)分離した好中球の培養までの過程。

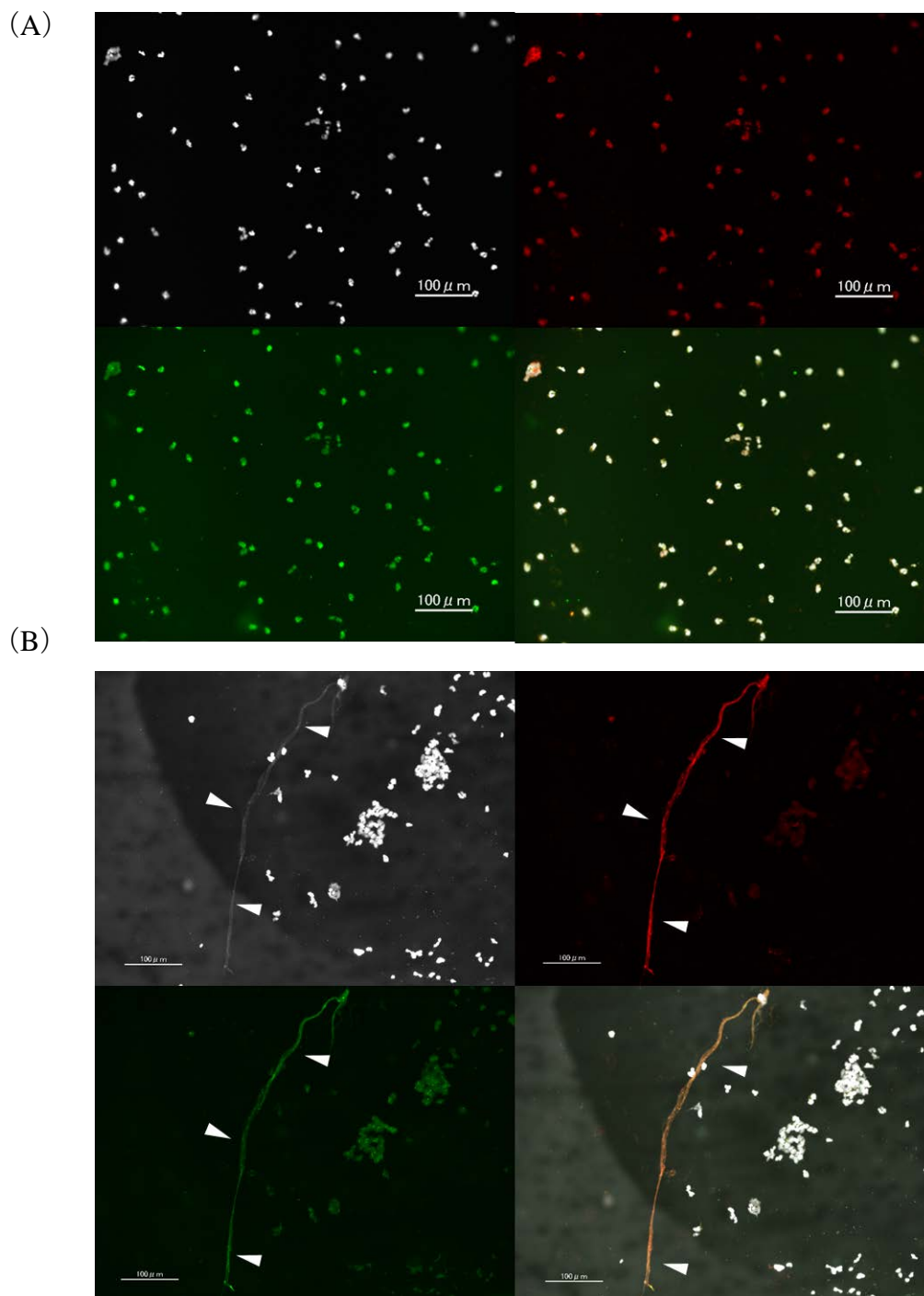


【図3】 NETsを観察し得た視野数のカウント方法
 蛍光顕微鏡 (BZ-X710) を使用し、20倍対物レンズの視野にて丸形カルチャーカーガラスの全領域を細分化した。
 計682視野を検鏡し、NETsを認めた視野数を各群でカウントした。



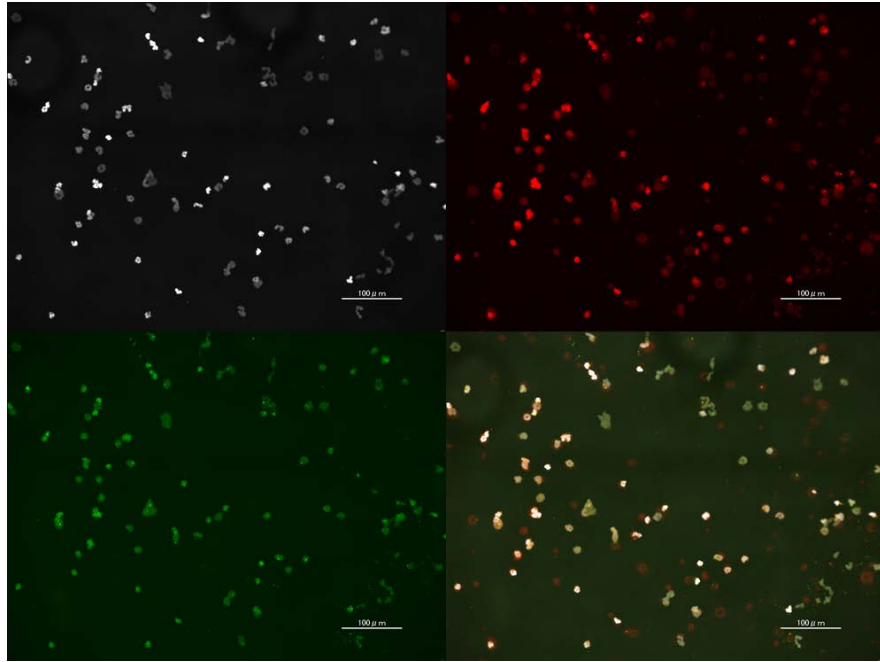
【図 4】 KD 急性期群における検鏡像

(A) 200 倍対物レンズ、(B) 400 倍対物レンズでの検鏡像。蛍光フィルタはそれぞれ、左上：DAPI (白：DNA)、右上：TRITC (赤：MPO)、左下：GFP (緑：NE)。右下は Marge 像。DNA、MPO、NE が、細胞外に糸状に染色され、Marge 像にて一致している NETs を多数認めた (arrow head)。



【図 5】 KD 回復期群における検鏡像

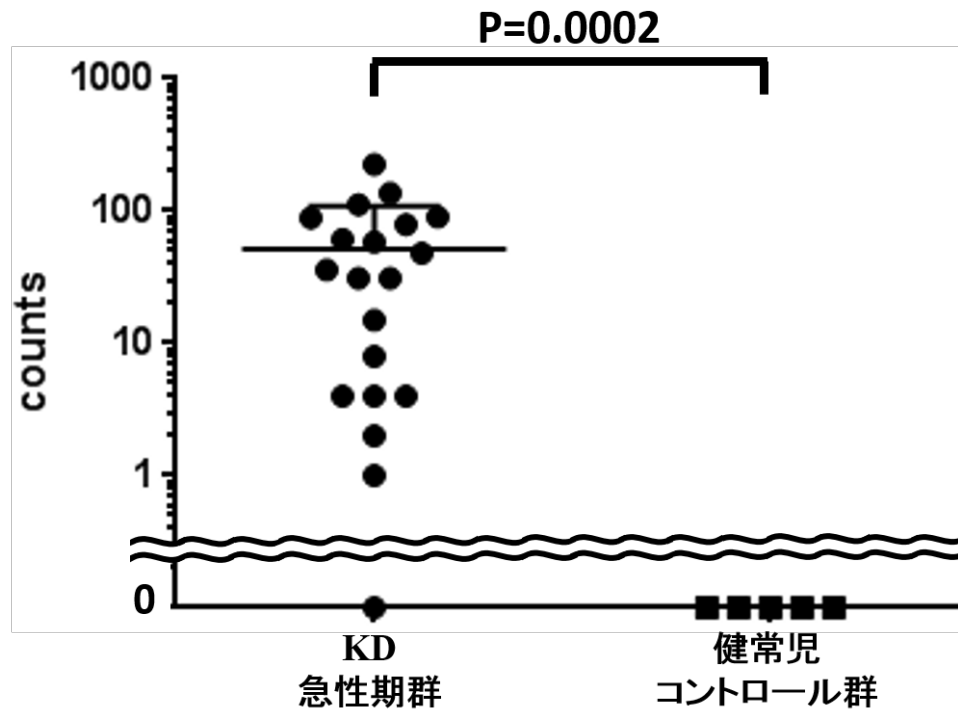
蛍光フィルタは図 4 と同様。(A)、(B) いずれも 200 倍対物レンズでの検鏡像。KD 回復期群のほとんどの好中球の培養では (A) のように NETs を認めなかった。回復期の中には、(B) のように NETs をわずかに認めるものもあった (arrow head)。



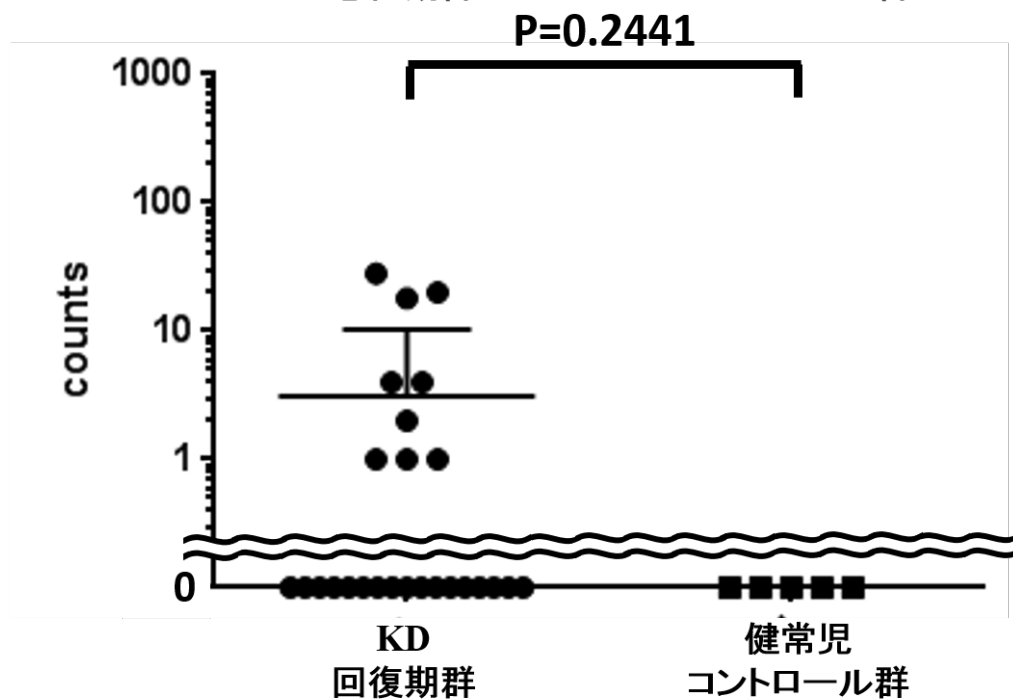
【図 6】 健常児コントロール群における検鏡像

蛍光フィルタは図 4 と同様。200 倍対物レンズでの検鏡像。NETs を認めなかった。

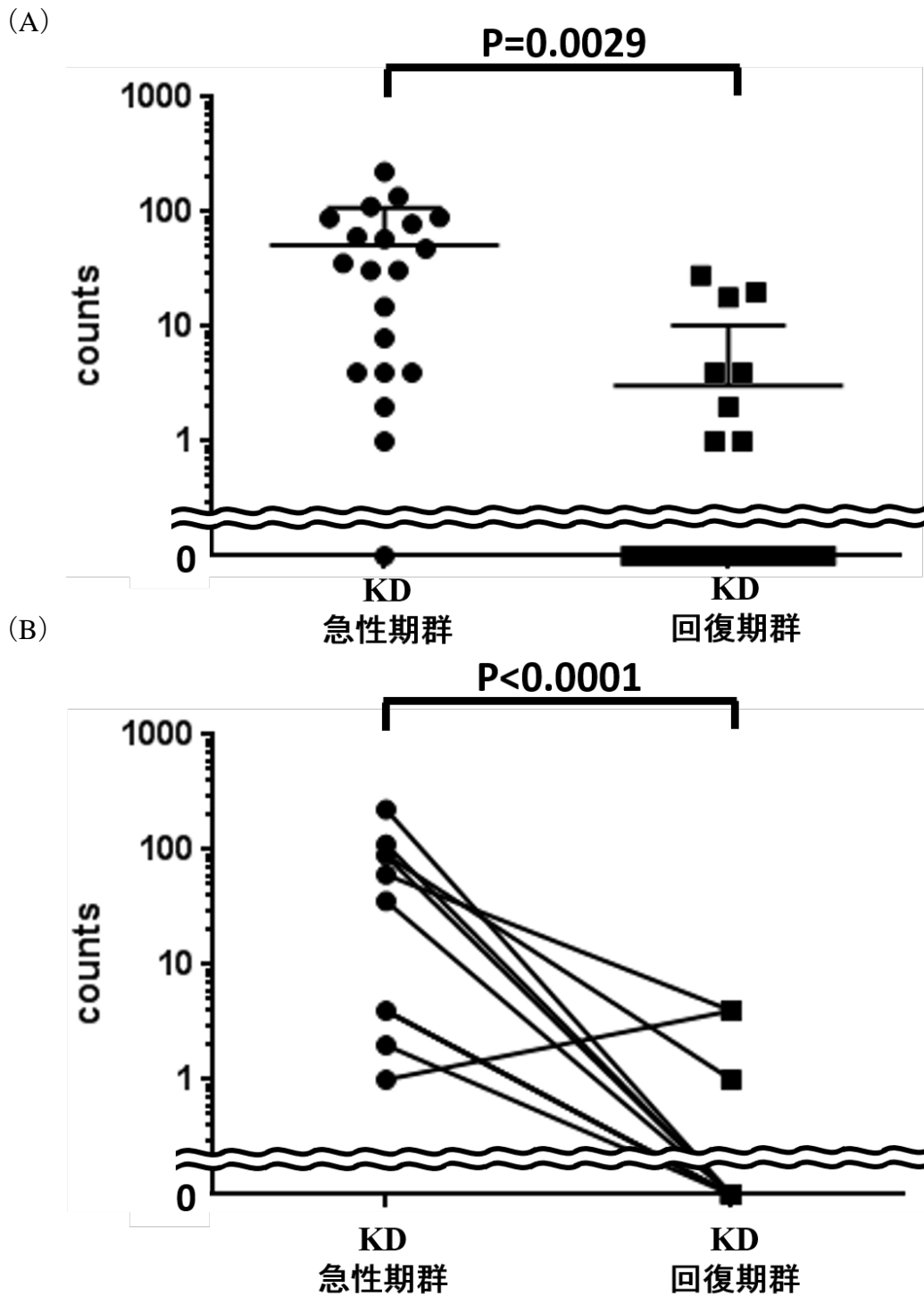
(A)



(B)

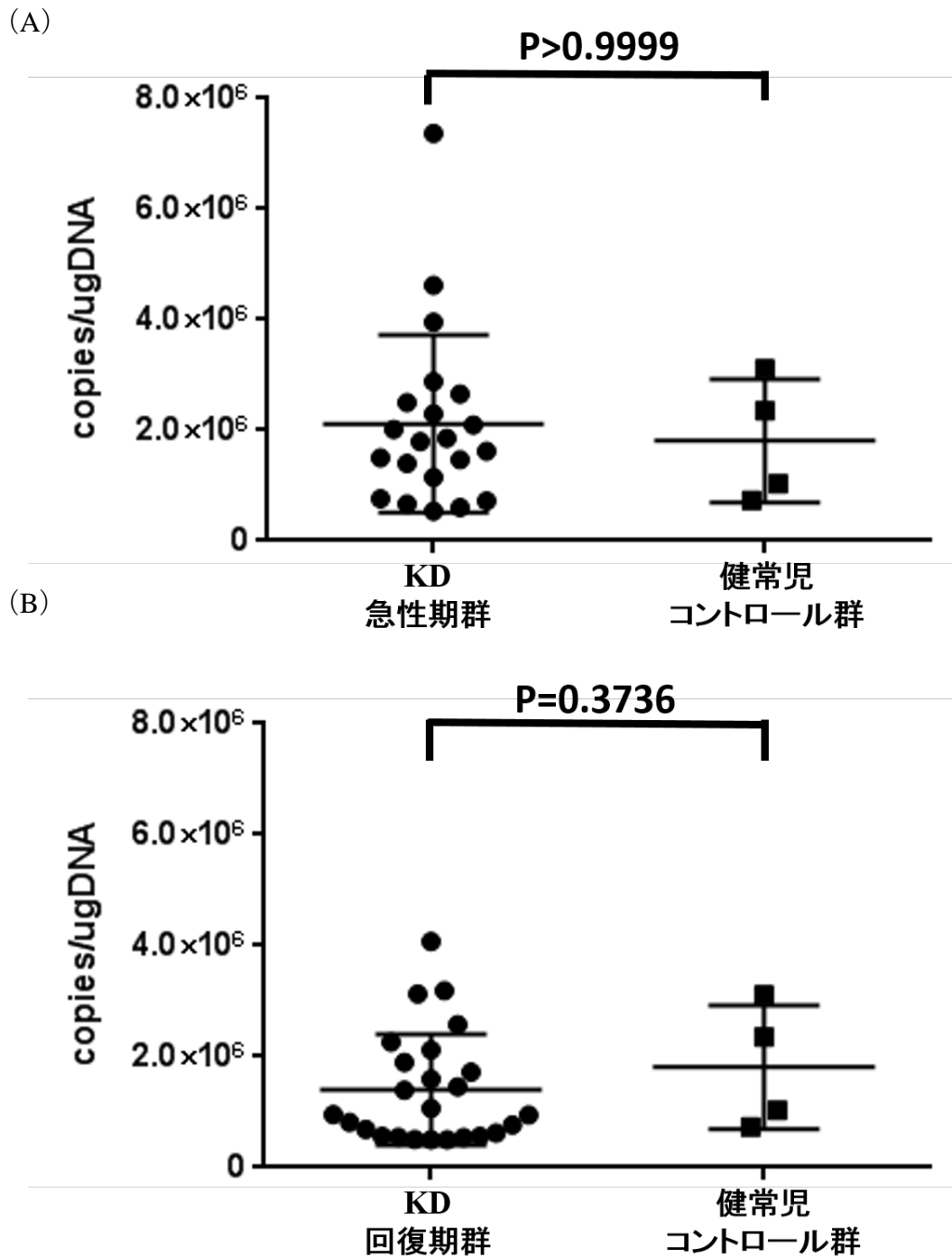


【図7】 NETsを認めた視野数：KD群と健常児コントロール群の比較
いずれも縦軸は対数。有意差検定はMann-Whitney U testにて実施。(A) KD急性期群(N=20)は健常児コントロール群(N=5)と比較して有意にNETsを認めた視野数が多かった($P=0.0002 < 0.05$)。(B) KD回復期群(N=26)との比較では有意差を認めなかった。

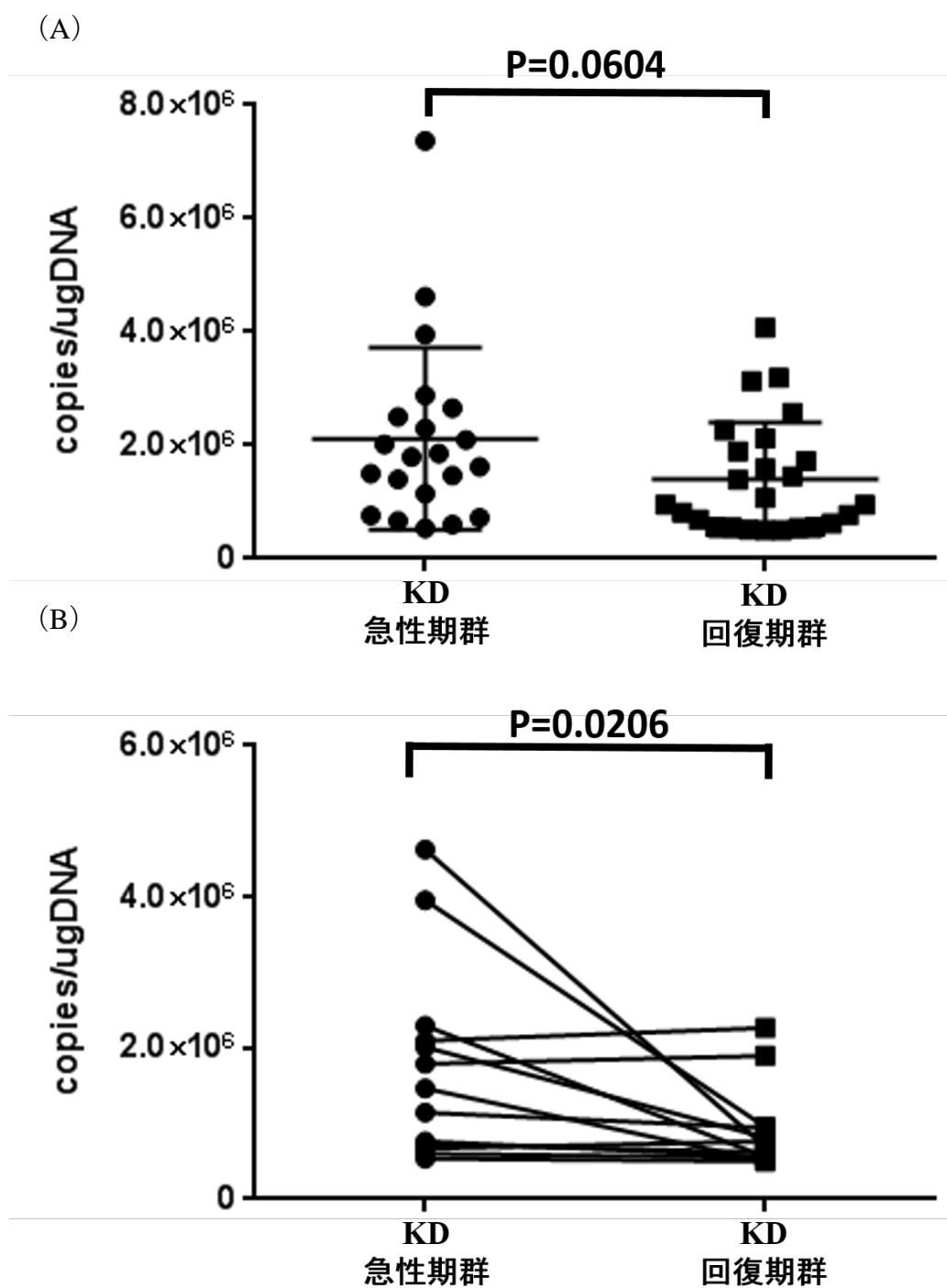


【図 8】 NETs を認めた視野数：KD 急性期群と回復期群の比較

(A) 縦軸は対数。急性期群と回復期群の有意差検定を Mann-Whitney U test にて実施。急性期群が有意に NETs を認めた視野数が多かった ($P=0.0029 < 0.05$)。 (B) 急性期と回復期のいずれも観察した 11 例について有意差検定を Wilcoxon test にて実施した。急性期群が有意に NETs を認めた視野数が多かった ($P < 0.0001$)。

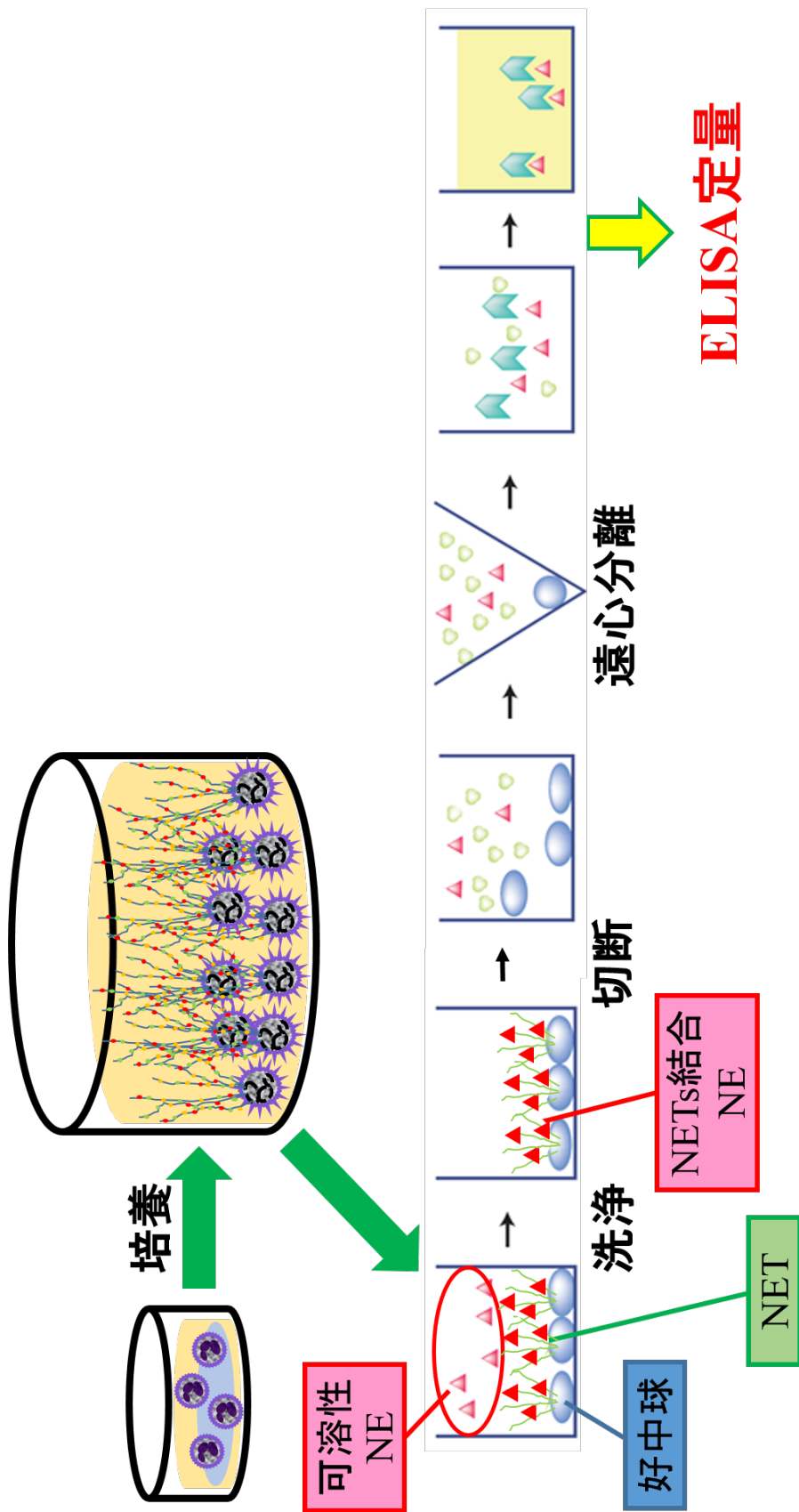


【図 9】 Cell-free DNA の定量：KD 群と健常児コントロール群の比較
 いずれも有意差検定は Mann-Whitney U test にて実施。(A) KD 急性期群 (N=21) は健常児コントロール群 (N=4) との比較では有意差を認めなかった ($P > 0.9999$)。 (B) KD 回復期群 (N=25) との比較でも有意差を認めなかった ($P = 0.3736$)。



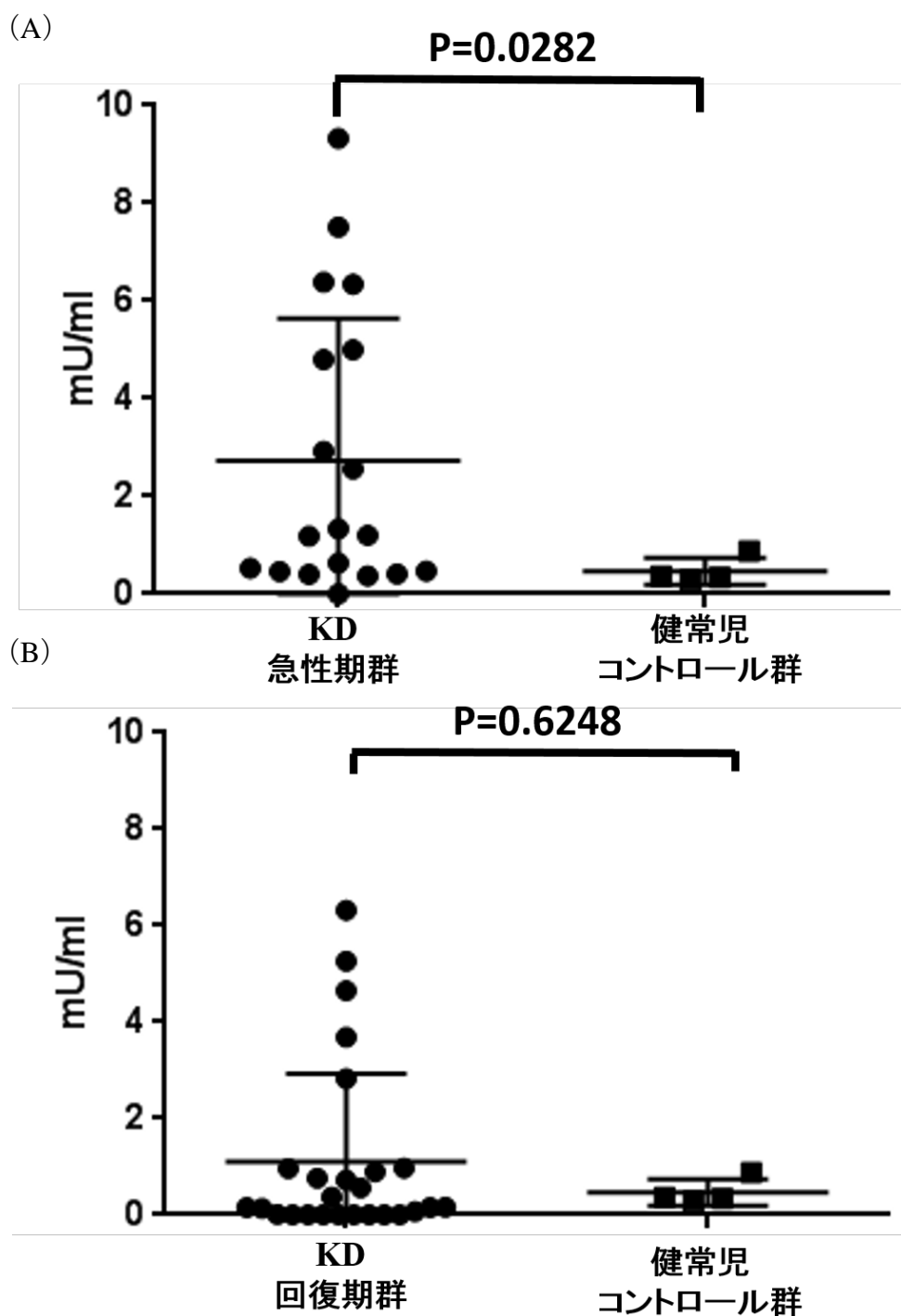
【図 10】 Cell-free DNA の定量：KD 急性期群と回復期群の比較

(A) 急性期群と回復期群の有意差検定を Mann-Whitney U test にて実施。二群間において有意差を認めなかった ($P=0.0604 > 0.05$)。 (B) 急性期と回復期のいずれも観察した 13 例について有意差検定を Wilcoxon test にて実施した。急性期群が有意に高値であった ($P=0.0206 < 0.05$)。



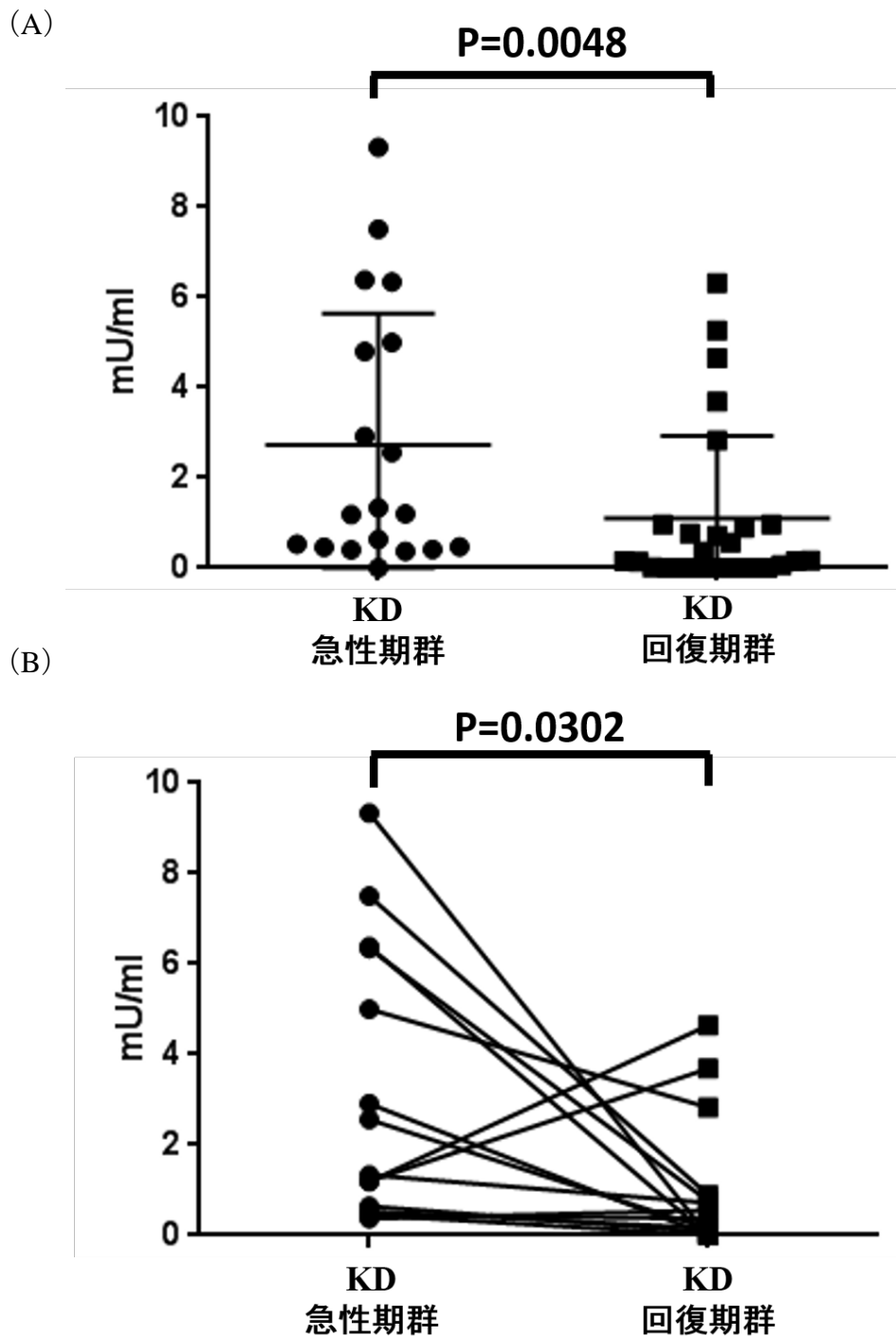
<https://www.caymanchem.com/pdfs/601010.pdf>

【図 11】 培養上清からの NE の精製 (<https://www.caymanchem.com/pdfs/601010.pdf> の図を改変)



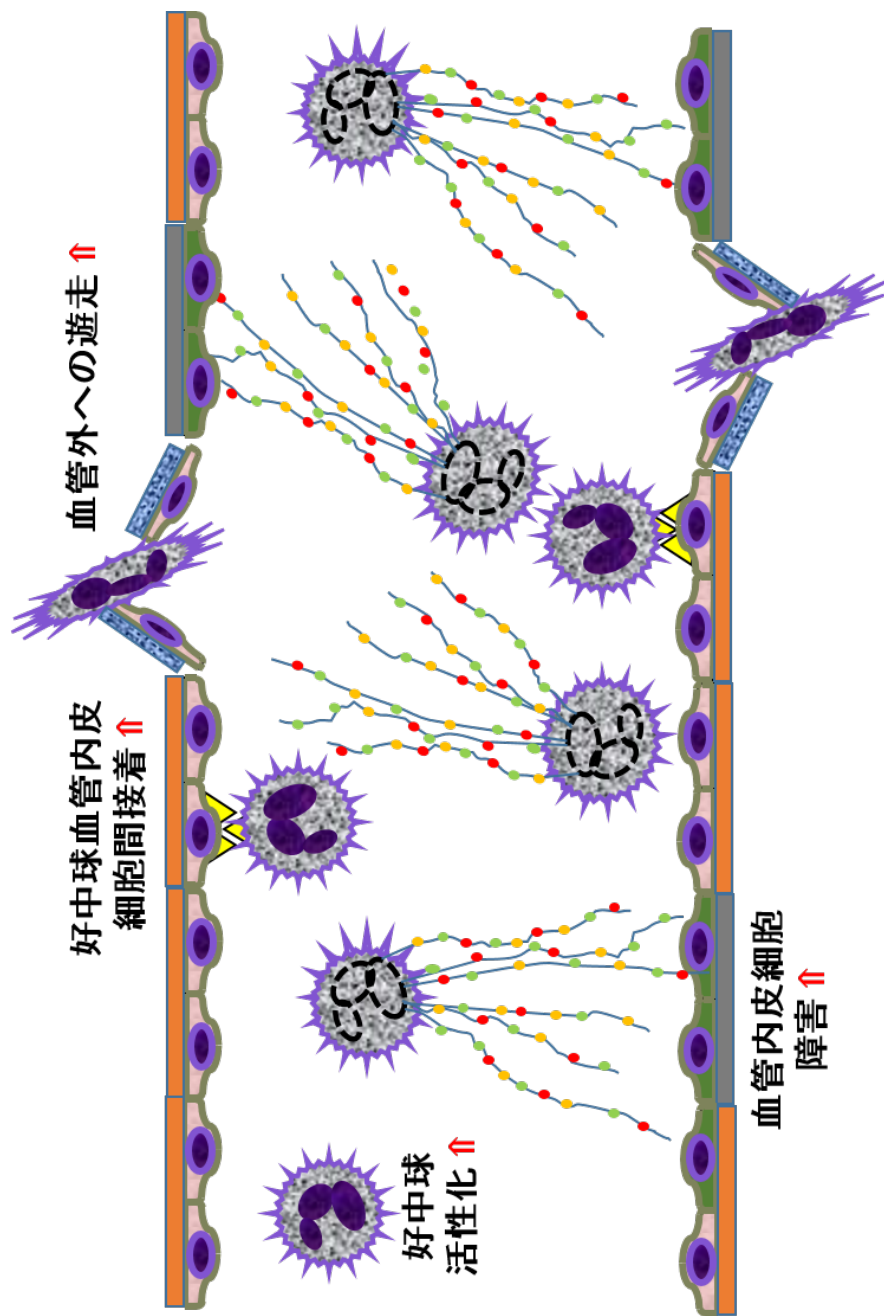
【図 12】 NE の定量：KD 群と健常児コントロール群の比較

いずれも有意差検定は Mann-Whitney U test にて実施。(A) KD 急性期群 (N=19) は健常児コントロール群 (N=4) と比較して、NE h s 有意に高値であった ($P=0.0282 < 0.05$)。 (B) KD 回復期群 (N=26) との比較では有意差を認めなかった ($P=0.6428$)。



【図 13】 NE の定量：KD 急性期群と回復期群の比較

(A) 急性期群と回復期群の有意差検定を Mann-Whitney U test にて実施。急性期群が有意に高値であった ($P=0.0048 < 0.05$)。 (B) 急性期と回復期のいずれも観察した 15 例について有意差検定を Wilcoxon test にて実施。急性期群が有意に高値であった ($P=0.0302 < 0.05$)。



【図 15】 NETs の KD 血管炎へのイメージ
 好中球は NETs を細胞外に過剰に放出することで、血管内皮細胞障害を引き起こし KD 血管炎の病態に関与する。また、活性化された好中球は血管内皮細胞への接着因子の発現を増強させるとともに、NETs による物理的な血流停滞によって活性化好中球と血管内皮細胞の接着がさらに促進され、その結果、血管外への好中球の遊走が促進され、血管外への炎症の波及が生じる。

	川崎病群		コントロール群
	急性期 (n=37)	回復期 (n=37)	健常児 (n=5)
性別 (男%)	25 (67.6%)		2 (40%)
月齢	25 (13-44)		18 (13-100)
白血球数 (/mm ³)	13500* ** (11900-17600)	8200 (6800-10800)	9300 (5700-9400)
好中球数 (/mm ³)	9540* ** (8880-12285)	2912 (1952-3896)	2139 (1952-2472)
リンパ球数 (/mm ³)	3335 (1872-5460)	4898* (3698-6017)	6138 (2550-6157)
血小板数 (×10 ⁴ /mm ³)	33.9 (28.0-42.3)	37.9 (29.6-46.4)	38.6 (32.6-40.8)
CRP (mg/dL)	6.6* ** (4.3-12.8)	0.3 (0.3-0.3)	0.3 (0.3)
総ビリルビン (mg/dL)	0.54* (0.40-0.91)	0.33 (0.28-0.46)	0.37 (0.30-0.46)
AST (IU/L)	37 (28-70)	37 (33-40)	37 (28-38)
ALT (IU/L)	36* (15-75)	16 (13-19)	17 (17-18)
血清アルブミン (g/dL)	3.6 (3.5-3.9)	4.2* (4.0-4.4)	4.5** (4.3-4.5)
血清 Na (mEq/L)	134 (133-136)	138* (137-139)	139** (139-139)

【表 1】 対象の臨床データおよび 2 群間の統計学的有意差検定

- * : KD 急性期群と KD 回復期群の対応する 2 群間比較において、Wilcoxon test にて有意に高値。
- ** : KD 急性期群と健常児コントロール群との比較において、Mann-Whitney U test にて有意に高値。
- P 値<0.05 を統計学的有意差ありとし赤文字で示した。