

敗血症/COVID-19 における NETs と血栓症

伊藤隆史*

NETs-related thrombotic complications in sepsis and COVID-19

Takashi ITO

要約：感染や組織損傷の兆候を察知すると、好中球は活性化する。活性化した好中球は、微生物やデブリスを貪食したり、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) と呼ばれる網状構造物を細胞外に放出したりして、感染防御に寄与している。その一方で、同様のメカニズムが、組織損傷を悪化させてしまう要因にもなっていて、NETs 放出は適切にコントロールされる必要があると考えられる。本稿では、感染症病態における NETs 放出の光と陰について概説し、そのなかでも特に、血栓症との関連について考察していく。

Key words: neutrophil extracellular traps (NETs), immunothrombosis, disseminated intravascular coagulation (DIC), COVID-19, extracellular histone

1. はじめに

我々は一日に約 100 億個の好中球をつくり、骨髄から循環血液中へと送り出している。循環血液中の好中球の半減期は半日ほどで、全身循環から離れた好中球は、骨髄、脾臓、肝臓、肺、消化管粘膜、皮膚などのリンパ組織に入り、組織マクロファージや樹状細胞に貪食されてライフサイクルを終える。このようなサイクルは、24 時間一定のリズムで回っているわけではなく、休息時間帯（ヒトでは夕方から夜）には循環する好中球の割合が増え、活動時間帯（ヒトでは朝方から昼）には組織に浸潤する好中球の割合が増える¹⁾。このことは、怪我のリスクの高い活動時間帯に、組織で待ち構える白血球数を増やす戦略なのかもしれない。

2. 好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) 放出のメカニズム

微生物が体内に侵入してきた際、好中球は微生物

を貪食し、貪食した小胞内に活性酸素種やタンパク質分解酵素などを投入して殺菌しようとする。NETs 放出はこれとは別の微生物捕獲・殺菌機構として 2004 年に初めて報告されたもので、DNA に好中球エラスターゼ、ミエロペルオキシダーゼ、カテプシン G、ヒストンなどが付着した網状の構造物を細胞外に放出することで、細胞外での微生物の不動化・殺菌を可能にしている²⁾。好中球は死にながら NETs 放出することもあれば (apoptosis や necrosis とは異なる細胞死で NETosis と呼ばれる)、生きたまま NETs を放出する仕組みも備えている。

活性化に伴う好中球の段階的変化と NETosis のメカニズムを図 1 に示す。活性化する前の好中球においては (図 1A-①)、DNA 成分 (青色に標識) は分葉した核の中に、好中球エラスターゼ (緑色に標識) は細胞質の顆粒の中に局在している。活性化に伴い、好中球エラスターゼは核の中に移行し (図 1A-②)、クロマチンの脱凝縮が生じ (図 1A-③)、細胞膜の破綻に伴って DNA・好中球エラスターゼ複合体が細胞外に放出される (図 1A-④)。これらの行程は、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼによる活性酸素種産生に依存して進むことが知られているが (図 1B)、一方で、NADPH オキシダーゼ非依存性で活性酸素種非依存性の NETs 放出機序があることも知られている³⁾。また、

*責任者連絡先：

熊本大学大学院生命科学研究部生体情報解析学講座
〒862-0976 熊本市中央区九品寺4丁目24番1号
Tel: 096-373-5494
E-mail: tito@kumamoto-u.ac.jp

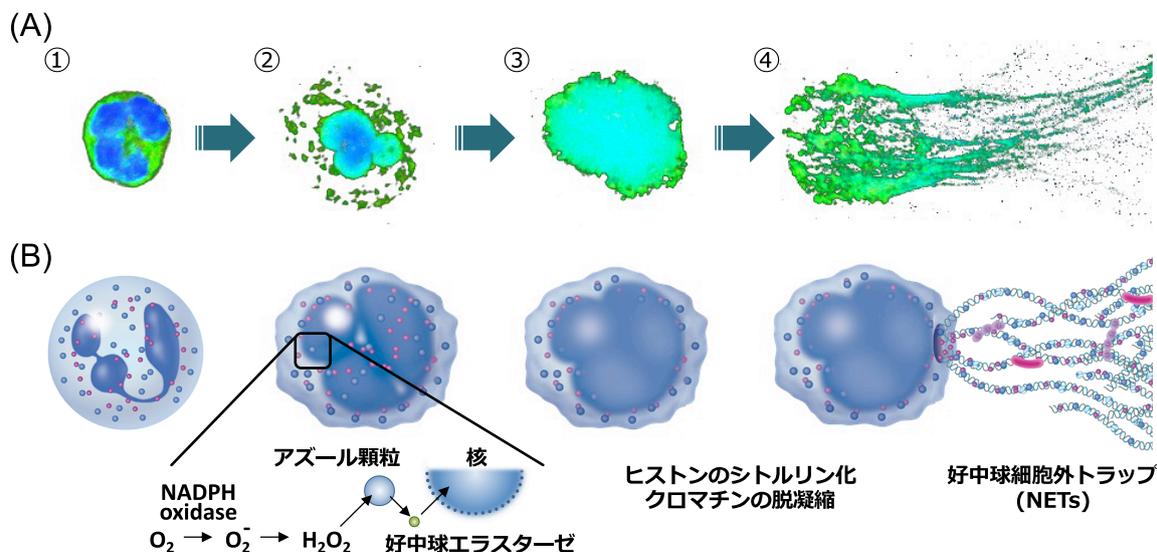


図1 好中球の活性化と NETs 放出メカニズム

(A) 活性化する前の好中球 (①) においては、DNA 成分 (青色に標識) は分葉した核の中に、好中球エラスターゼ (緑色に標識) は細胞質の顆粒の中に局在している。活性化に伴い、好中球エラスターゼは核の中に移行し (②)、クロマチンの脱凝縮が生じ (③)、細胞膜の破綻に伴って DNA・好中球エラスターゼ複合体が細胞外に放出される (④)。(B) 上記行程は、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼによる活性酸素種産生に依存して進むことが知られているが、NADPH オキシダーゼ非依存性で活性酸素種非依存性の NETs 放出機序もある。また、クロマチン脱凝縮の過程においては、protein-arginine deiminase 4 (PAD4) によるヒストンのシトルリン化が重要であることが知られているが、PAD4 非依存性でシトルリン化非依存性の NETs 放出機序もある。

クロマチン脱凝縮の過程においては、protein-arginine deiminase 4 (PAD4) という酵素によるヒストンのシトルリン化が重要であることが知られているが、PAD4 非依存性でシトルリン化非依存性の NETs 放出機序があることも知られている⁴⁾。細胞膜の破綻を伴わない、分泌小胞を介した NETs 放出機序も知られていて、刺激の種類や好中球の不均一性によって、多種多様な NETs 放出機序があると考えられる。

3. 感染症病態における NETs 放出の生理的意義

NETs は細胞外において、黄色ブドウ球菌や大腸菌などの細菌、カンジダやアスペルギルスなどの真菌を捕獲する。生体内においては、主に肝臓の類洞内において、NETs が微生物を捕獲する様子が観察されていて、この機構が破綻すると、全身への微生物の拡散を招いてしまう⁵⁻⁷⁾。NETs が微生物を捕獲するメカニズムについては十分にわかっていないが、NETs の主成分である DNA の荷電が関係していると

考えられている。A 群レンサ球菌や肺炎球菌などは、DNA 分解酵素 (DNase) を発現する形質を獲得することで、NETs から逃れて全身に拡散して重症感染症を引き起こすことが報告されている^{8,9)}。また、DNase を投与した場合にも、NETs が破綻して微生物の拡散が助長されることが報告されていて、細胞外に放出された DNA が感染防御に一定の役割を果たしていることが示唆される¹⁰⁾。

NETs には捕獲した微生物を死滅させる作用も備わっていると考えられている。NETs の構成成分であるヒストンや好中球エラスターゼなどには殺菌作用が報告されていて、生体外の実験系においては、NETs が微生物を死滅させることが示されている^{2,11)}。その一方で、生体内においては、ヒストンや好中球エラスターゼの作用を阻害する制御因子が血漿中に豊富に含まれていて^{12,13)}、殺菌作用がどこまで発揮されるか不明である。NETs に捕獲された黄色ブドウ球菌やカンジダは、DNase 処理によって解放すると再び増殖することから、死滅してはいない

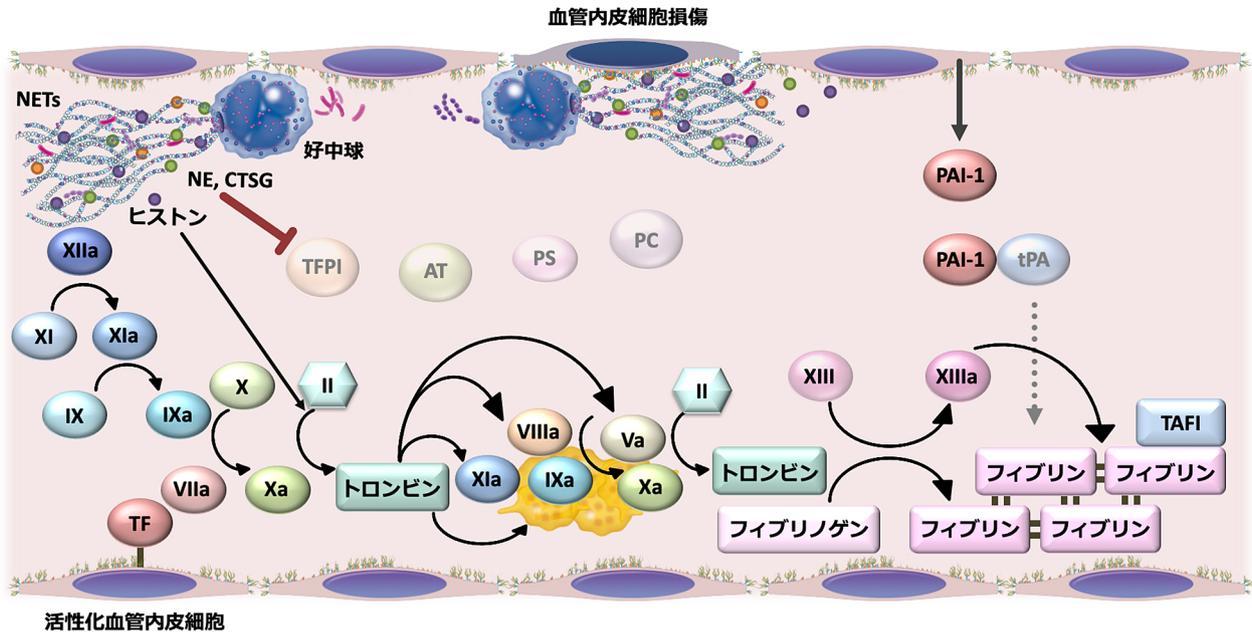


図2 NETsと血栓形成

NETsの構成成分のうち、陰性荷電したDNAは、血液凝固第XII因子(FXII)やFXIと接触し、内因系血液凝固経路を活性化する。細胞外ヒストンは、FXaによるプロトロンビンの活性化を、FVaやリン脂質非依存性に促進する。好中球エラスターゼ(NE)やカテプシンG(CTSG)などのセリンプロテアーゼは、組織因子経路インヒビター(TFPI)を分解して不活化することで、外因系血液凝固経路を促進する。また、NETs表面には組織因子(TF)、von Willebrand因子、フィブロネクチンなどが結合し、NETs表面での凝固活性化、血小板血栓の形成の足場を提供している。

という報告もある¹⁴⁾。このように、NETsの直接的な殺菌作用については議論の余地が残っているが、不動化することによって、別の細胞による貪食や殺菌を補助している可能性も考えられる。

4. NETsと血栓形成

NETsはDNA、ヒストン、好中球エラスターゼ、カテプシンGなどの成分によって構成されているが、これらの成分には血栓形成を促進する作用(図2)が報告されている¹⁵⁾。陰性荷電したDNAは血液凝固第XII因子(FXII)やFXIと接触し、内因系血液凝固経路を活性化する¹⁶⁾。細胞外ヒストンはプロトロンビンフラグメントF1+2に結合し、FXaによるプロトロンビンの活性化を、FVaやリン脂質非依存性に促進する¹⁷⁾。好中球エラスターゼやカテプシンGなどのセリンプロテアーゼは、組織因子経路インヒビターを分解して不活化することで、外因系血液凝固経路を促進する¹⁸⁾。また、NETs表面には組織

因子、von Willebrand因子、フィブロネクチンなどが結合し、NETs表面での凝固活性化、血小板血栓の形成の足場を提供していると考えられる^{16,19)}。

NETsと血栓症との関連については、様々な動物モデルならびに臨床研究で報告されている。深部静脈血栓症では、血栓のなかにNETsが観察され、PAD4欠損マウスやDNase処理によって血栓を減少させられることから、NETsが静脈血栓症の病態に関与していることが示唆される^{16,20,21)}。動脈血栓症においては、NETsが血栓の安定化や心血管イベントの発生に関与している可能性が示唆されている^{22,23)}。また、微小血管においても、NETsが血管内皮細胞傷害ならびに血管閉塞に関与していることが示唆されている^{5,18,24)}。

5. 敗血症病態におけるNETs放出の光と陰

NETs放出は微生物を捕獲し、殺菌するのに寄与していることから、感染症に対する生体防御機構の一

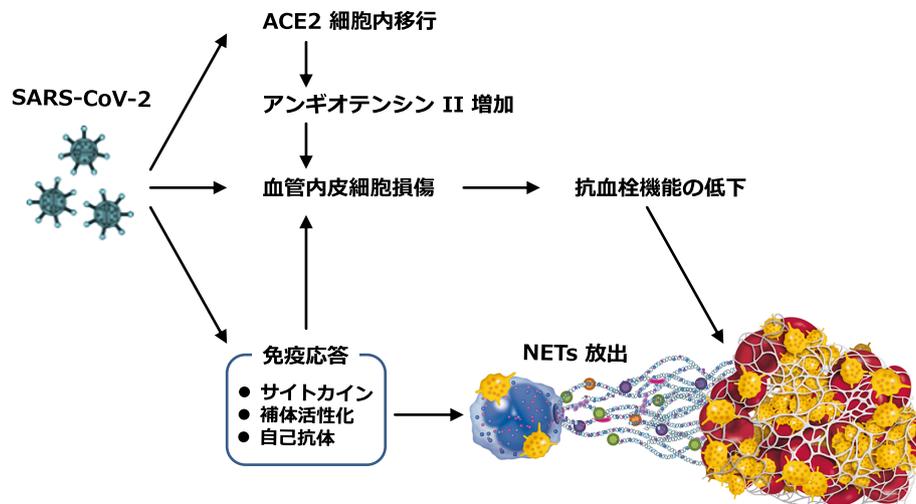


図3 COVID-19病態におけるNETsと血栓症

SARS-CoV-2ウイルス感染に伴って、細胞表面の受容体であるアンギオテンシン変換酵素2 (ACE2) が細胞内に移行すると、ACE2が本来担っているアンギオテンシンIIからアンギオテンシン(1-7)への変換機能が低下する。これによって、アンギオテンシンIIの血管収縮作用、炎症増強作用、血栓形成促進作用が強まる。また、SARS-CoV-2ウイルスに感染した血管内皮細胞は、その毒性によって抗血栓機能が低下する。さらに、炎症性サイトカインの産生、補体活性化、NETs放出が誘導され、血管内皮細胞損傷ならびに血管内血栓形成に至ると考えられる。重症COVID-19症例では、自己抗体産生も幅広く誘導され、抗リン脂質抗体が細胞表面に結合することで、血管内皮細胞、血小板、好中球などの細胞と血液との境界面が血栓形成の方向に向かう可能性が考えられる。

つと考えることができる。また、NETsによって促進される血栓形成も、微生物を局所に封じ込めるための自然免疫機構の一つとして捉えられ、このような血栓は免疫血栓 (immunothrombosis) として注目されている²⁵⁾。その一方で、NETsやその成分は、微生物に対してだけでなく宿主細胞に対しても傷害性があり、血管内血栓形成は、微生物の拡散を防ぐと同時に虚血性臓器障害を引き起こすリスクも伴うことから、NETs放出が全身の広範囲に拡大した場合には、メリットよりもデメリットの方が大きくなることが想定される^{26,27)}。実際、大腸菌感染による敗血症モデルマウスにおいて、PAD4欠損マウスやDNase処理によってNETsを減少させると、微小循環障害が改善し、臓器障害も軽減することから^{7,28)}、NETs放出には負の側面もあると考えられる。

NETsの構成成分の一つであるヒストンは、細胞外に遊離した際の細胞傷害性が強く²⁹⁾、病態との関わりで注目されている。ヒストンは主要な核内タンパク質で、(NETs放出に伴って)好中球から細胞外に放出されるが³⁰⁾、一般的な細胞からは放出されに

くい³¹⁾。細胞外に放出されたヒストンは、血液凝固を活性化するとともに、血管内皮細胞傷害を引き起こし^{27,32)}、血栓症や臓器障害の誘因となりうる^{33,34)}。

NETs放出のメリットとデメリットが報告されるなか、敗血症病態においてNETs放出を減少させた場合、生存率にはどのような影響が及ぶだろうか。盲腸結紮穿孔による敗血症モデルマウスにおいて、PAD4欠損マウスの生存率は野生型マウスとほとんど変わらないことが報告されている³⁵⁾。一方、DNase処理もしくは抗ヒストン抗体投与を、抗菌薬投与と組み合わせると、敗血症モデルマウスの生存率を改善できる可能性が示唆されている^{36,37)}。このように、NETsを抑制しつつ、それによって弱まる可能性がある感染防御は抗菌薬で代用するという戦略で、敗血症の際の生存率を向上できるかもしれない。

6. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病態におけるNETsと血栓症

COVID-19の病理解剖所見では、肺の血管床に広

範な血管内血栓形成と血管内皮細胞傷害が認められる³⁸⁾。SARS-CoV-2 ウイルス感染後には、好中球や炎症性マクロファージが肺に集積し、炎症性サイトカインが誘導されるとともに、補体系や血液凝固系が強く活性化され(図3)、血管内皮細胞傷害ならびに血管内血栓形成に至ると考えられている³⁹⁾。また、この過程において、好中球-血小板複合体が形成され、NETsが放出されることで、NETsを足場とした血管内血栓形成が進行する可能性が示唆されている⁴⁰⁾。ただ、肺局所において血管内血栓形成が強く誘導されるのが、COVID-19に伴う血栓症の特徴であり、敗血症に伴う典型的な播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation: DIC)のように全身の微小血管で血管内凝固と消費性凝固障害が進む病態とは異なると考えられる⁴¹⁾。

では、COVID-19の病態において、何がNETs放出と血管内血栓形成を誘導するのだろうか?重症COVID-19症例では、濾胞外B細胞が関与すると考えられる自己抗体が幅広く誘導されていて、その中には、血管、脳、心臓などに発現している自己抗原を認識する抗体も含まれる⁴²⁾。COVID-19で入院となった患者の血清を調べると、その半数近くにおいて抗リン脂質抗体が検出され、これらの抗リン脂質抗体が細胞表面に結合することで、血管内皮細胞、血小板、好中球などの細胞と血液との境界面を血栓形成の方向に向かわせている可能性が考えられる⁴³⁾。これらのCOVID-19患者血清由来のIgGを好中球にふりかけるとNETs放出が誘導され、マウスに投与すると血栓症が増悪することから、COVID-19の病態においてNETs放出ならびに血栓症を誘導するものとして、抗リン脂質抗体は重要な役割を果たしているかもしれない。

7. おわりに

NETs放出は宿主の感染防御機構の一つであり、これに対して、一部の微生物はNETsを分解する機構を進化させてきた。その一方で、NETsは組織損傷を引き起こす要因にもなり、適切に制御されなければ、敗血症、自己免疫疾患、血栓症の病態を悪化させてしまう。好中球の機能を完全に抑制してしまうこと

は不利益が大きいと考えられるが、時間的・空間的に制御することが可能になれば、炎症性疾患のより良いコントロールに繋がるかもしれない⁴⁴⁾。

著者の利益相反(COI)の開示:

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) Cossio I, Lucas D, Hidalgo A: Neutrophils as regulators of the hematopoietic niche. *Blood* **133**: 2140–2148, 2019.
- 2) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**: 1532–1535, 2004.
- 3) Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps: The biology of chromatin externalization. *Dev Cell* **44**: 542–553, 2018.
- 4) Castanheira FVS, Kuberski P: Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood* **133**: 2178–2185, 2019.
- 5) Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al.: Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**: 463–469, 2007.
- 6) Yipp BG, Petri B, Salina D, et al.: Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* **18**: 1386–1393, 2012.
- 7) McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, et al.: Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **12**: 324–333, 2012.
- 8) Walker MJ, Hollands A, Sanderson-Smith ML, et al.: DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nat Med* **13**: 981–985, 2007.
- 9) Beiter K, Wartha F, Albiger B, et al.: An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**: 401–407, 2006.
- 10) Yipp BG, Kuberski P: NETosis: How vital is it? *Blood* **122**: 2784–2794, 2013.
- 11) Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, et al.: A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **185**: 7413–7425, 2010.
- 12) Abrams ST, Zhang N, Dart C, et al.: Human CRP defends against the toxicity of circulating histones. *J Immunol* **191**: 2495–2502, 2013.
- 13) Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**: 365–376, 1989.
- 14) Menegazzi R, Decleva E, Dri P: Killing by neutrophil extracellular traps: Fact or folklore? *Blood* **119**: 1214–1216, 2012.
- 15) Martinod K, Wagner DD: Thrombosis: Tangled up in NETs. *Blood* **123**: 2768–2776, 2014.
- 16) von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, et al.: Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* **209**: 819–835, 2012.

- 17) Abrams ST, Su D, Sahraoui Y, et al.: Assembly of alternative prothrombinase by extracellular histones initiates and disseminates intravascular coagulation. *Blood* **137**: 103–114, 2021.
- 18) Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al.: Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* **16**: 887–896, 2010.
- 19) Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al.: Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 15880–15885, 2010.
- 20) Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al.: Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* **10**: 136–144, 2012.
- 21) Martinod K, Demers M, Fuchs TA, et al.: Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8674–8679, 2013.
- 22) Longstaff C, Varjú I, Sótonyi P, et al.: Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem* **288**: 6946–6956, 2013.
- 23) Borissoff JI, Joosen IA, Versteilen MO, et al.: Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**: 2032–2040, 2013.
- 24) Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, et al.: Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* **358**: 1202–1206, 2017.
- 25) Engelmann B, Massberg S: Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**: 34–45, 2013.
- 26) Ito T: PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care* **2**: 67, 2014.
- 27) Ito T, Kakuuchi M, Maruyama I: Endotheliopathy in septic conditions: Mechanistic insight into intravascular coagulation. *Crit Care* **25**: 95, 2021.
- 28) McDonald B, Davis RP, Kim SJ, et al.: Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* **129**: 1357–1367, 2017.
- 29) Silvestre-Roig C, Braster Q, Wichapong K, et al.: Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature* **569**: 236–240, 2019.
- 30) Ito T, Nakahara M, Masuda Y, et al.: Circulating histone H3 levels are increased in septic mice in a neutrophil-dependent manner: Preclinical evaluation of a novel sandwich ELISA for histone H3. *J Intensive Care* **6**: 79, 2018.
- 31) Furubeppu H, Ito T, Kakuuchi M, et al.: Differential regulation of damage-associated molecular pattern release in a mouse model of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Front Immunol* **12**: 628822, 2021.
- 32) Abrams ST, Zhang N, Manson J, et al.: Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **187**: 160–169, 2013.
- 33) Nakahara M, Ito T, Kawahara K, et al.: Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. *PLoS One* **8**: e75961, 2013.
- 34) Yokoyama Y, Ito T, Yasuda T, et al.: Circulating histone H3 levels in septic patients are associated with coagulopathy, multiple organ failure, and death: A single-center observational study. *Thromb J* **17**: 1, 2019.
- 35) Martinod K, Fuchs TA, Zitomersky NL, et al.: PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. *Blood* **125**: 1948–1956, 2015.
- 36) Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al.: Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS One* **11**: e0148142, 2016.
- 37) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al.: Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* **15**: 1318–1321, 2009.
- 38) Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al.: Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* **383**: 120–128, 2020.
- 39) Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, et al.: Vascular disease and thrombosis in SARS-CoV-2-infected Rhesus macaques. *Cell* **183**: 1354–1366.e1313, 2020.
- 40) Nicolai L, Leunig A, Brambs S, et al.: Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation* **142**: 1176–1189, 2020.
- 41) Umemura Y, Yamakawa K, Kiguchi T, et al.: Hematological phenotype of COVID-19-induced coagulopathy: Far from typical sepsis-induced coagulopathy. *J Clin Med* **9**: 2875, 2020.
- 42) Wang EY, Mao T, Klein J, et al.: Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature* **595**: 283–288, 2021.
- 43) Zuo Y, Estes SK, Ali RA, et al.: Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci Transl Med* **12**: eabd3876, 2020.
- 44) Adrover JM, Aroca-Crevillén A, Crainiciuc G, et al.: Programmed ‘disarming’ of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nat Immunol* **21**: 135–144, 2020.