感染と NETs (neutrophil extracellular traps) 形成の関わりから 敗血症と自己免疫疾患を眺める

松久明生¹・奥井文²・堀内祥行²

¹ 扶桑薬品工業(株) 機器診断薬部

² 扶桑薬品工業(株) 研究開発センター

¹ 〒536-8523 大阪市城東区森之宮 2-3-11

E-mail: a-matsuhisa@fuso-pharm.co.jp

[受理: 2018 年 3 月]

感染に対する最初のディフェンスラインである好中球が, NETosis という細胞死をとる事が 2004 年に報告され, アポトーシス, ネクローシスと区別された。この現象は既に基礎と臨床領域において示唆されていた。NETosis は PMA 等の化学物質, IL-8 等のサイトカイン, PAMPs または DAMPs, 細菌等の微生物, ANCA 等の自己抗体とその抗原複合体の刺激によって誘導される。好中球由来の呼吸バーストによる O_2^- 発生が NETs 形成の引き金となる。NETs には好中球の細胞形態が完全に崩壊するもの, 或いは形態を保持し食食機能を維持しているものがある。NETs は細菌に対する捕獲と殺傷力を発揮するが, 宿主にも障害を与える。この時, NETs 形成に関与する酵素を阻害すると, その形成は抑制される。細菌はヌクレアーゼを分泌する事により NETs を分解し, 捕獲から逃れる事ができる。ヌクレアーゼ産生菌株を用いた感染モデル動物は非産生株にくらべ感染感受性が亢進する。慢性肉芽腫症 (CGD) 患者では NADPH オキシダーゼ 2 (Nox2) 活性がなく易感染性であり, その重症化は NETs が形成されない事も関与している。全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清は DNase1 に対する阻害活性が認められ, NETs 分解活性が低下している。これにより DNA を含む NETs 成分に対する自己抗体が誘導されると考えられる。このように感染症・敗血症・自己免疫疾患を含めた炎症病態と NETs 形成との密接な因果関係が明らかになってきた。今後, これらの疾患発症の解明には NETs 形成のメカニズムを考慮に入れる必要がある。

英語略記: 本文, 図表中の英語略記の名称は略記表 (表 2) を参照のこと。

1. はじめに

局所感染が引き金となり, 全身性炎症反応症候群 (SIRS) の遷延化による重篤な敗血症特有の病態を引き起こす事が知られている (33, 124)。この発症過程において NETs 形成が重要な役割を担っていることが動物モデル・臨床知見により示唆されている (28, 159, 209)。一方, 慢性的な炎症過程では NETs が分解されずに抗原として認識され, 自己抗体が誘導される事により, 局所から全身性に至る様々なタイプの自己免疫疾患を発症させる事も明らかになっている (48, 58, 105)。

このように急性から慢性炎症までの発症過程において, NETs 形成のメカニズムを考慮した炎症病態の解明が必要となっている。この視点から NETosis の基本的性質に触れ,

NETs 形成と敗血症や自己免疫疾患等との因果関係について言及する。また, NETs 制御の破綻が招く, これらの疾患に関与する重要な機能蛋白分子について述べる。さらに, NETosis から見た炎症概念についてコメントを加える。

2. NETs の周辺から

2004 年に Brinkmann らによって NETs が初めて報告され (18), 好中球による細菌との戦いにおいて, ファゴサイトーシス (食食作用) だけでなく, NETosis という細胞死を取る事によって細菌を補足・殺傷する事が明らかになった。さらに, NETosis は, その形成過程においてアポトーシス・ネクローシスと区別された (45, 147)。NETosis の役割は, cellular kamikaze (200), beneficial suicide (19) と表現されるように, 死してなお侵入者と戦う好中球の最

終兵器に喩えられる。それ故に弾 (NETs) は宿主側にも着弾し、とりわけ肺・腎臓の微小循環血管系を支える細動脈・毛細血管・細静脈が傷害を受ける (152, 209)。

NETosis には、細胞死を伴う suicide lytic NETosis と NETs を放出しながら好中球機能を維持している vital NETosis とに区別されるが (200, 204), その機序と役割の違いは明らかではない。本論文ではこの両タイプをすべて NETosis と表記する。NETosis の報告は前者を扱っている場合が多く、細胞が完全崩壊し蜘蛛の巣状の NETs 構造のみを残したものと後者の細胞形態を保っているものとでは前者の方が NETs を判別し易い事も理由の一つである (211)。

自然免疫応答の過程から見た NETs の役割は未だ謎が多いが、感染が引き金になった NETs 形成から炎症終息までの標準的なシナリオは描ける (図 1)。

このシナリオの①～⑩の順に従って補足説明をする。
①：好中球は血管内を可逆的にローリング・接着を繰り返している状態である。この時、細菌成分等の PAMPs または DAMPs (表 1) によってプライミングされると、Nox2 サブユニットが細胞膜等へアッセンブルした状態 (31, 37, 162), 或いは細胞表面に PR-3, LAMP-2, Fcγ-R, Mac1 を発現している状態となる (図 2)。また、血管壁をローリングしていれば、内皮細胞の平坦化と好中球の連鎖などが生じ、感染局所への集積の契機となる (43, 208)。その後の完全な活性化には自己抗体も含め多様な分子・血小板・血管内皮細胞を含めた相互作用が関与している (表 1) (91, 152)。②：Nox2 による O_2^- の O_2^- への過剰変換が起爆剤となり NETosis への扉が開かれる。NETs 形成はサイトカラシン D 処理によっても阻害されないため、ファゴサイトーシス非依存性 ROS-依存性細胞死とされる (45)。

Nox2 活性化による ROS 発生と NETs 誘導までの過程に

- ① 感染局所での好中球の集積・活性化(プライミング)
- ② 微生物等への応答：ROSの産生・放出(28)
ROS依存性経路の起動(167)
- ③ 好中球内顆粒の活性化(167)
顆粒内蛋白分子の放出(脱顆粒)
- ④ 顆粒由来NE・MPOの核内移動によるヒストンの部分分解
クロマチン構造の脱濃縮(112, 131)
- ⑤ PAD4によるヒストンシトルリン化
クロマチンの膨化(188)
- ⑥ 核膜消失によるクロマチン～細胞質成分混合
クロマチンのNETs成分の取込(45)
- ⑦ クロマチン複合体による細胞膜崩壊
NETs放出
- ⑧ NETosisの完了
- ⑨ NETsによる微生物の捕獲・殺傷
炎症の増幅
- ⑩ NETsの分解・炎症の終息
障害部位の修復

図 1. 感染局所での NETs 形成のシナリオ

は様々な経路の交差が想定される (36, 134, 144, 167)。従って、どのようなシグナル伝達経路に ROS が関与し、これらの経路の駆動力となる機能蛋白分子が、どのように活性化されて NETosis を誘導していくかを解明することが焦点となる (36, 193)。この視点から、NETosis を誘導する ROS はファゴソーム内における高濃度 (O_2^- : 4 M 以上; 高レベル ROS) の殺傷用のもではなく、むしろ低濃度 (例えば、 O_2^- から変換される H_2O_2 : μM レベル; 細胞内低レベル ROS) による、多様な経路を活性化させるセカンドメッセンジャー的な役割のものである事が示唆される (144, 147, 148, 167)。③：ファゴサイトーシス (図 3) は、ファゴソームと顆粒が融合してファゴリソーム形成へと進み、取り込まれた病原体を殺傷する過程である。なぜ脱顆粒に次いで NETosis へ移行するのか。この解明には、細胞外へ拡散した ROS や細胞外へ放出された蛋白分子の影響をも視野に入れなければならない。④～⑤：この脱濃縮はクロマチンを構成するヌクレオソームを糸巻のように凝縮しているヒストンが部分分解される事によって起こる。さらに ROS 依存的に PAD4 が活性化され、ヒストンのシトルリン化によりクロマチンの巻き戻しによる膨化が加速される (96, 151, 188)。⑥：核膜消失は好中球特有の多形核構造と関連がある事が示唆される (128, 129)。⑦～⑧：細胞膜を突き破る現象が NETosis の最終段階である。これは細胞膜を裏打しているアクチン重合体が NET 成分中の蛋白分解酵素等によって分解され、NETs がバネのように飛び出すと説明されている (112)。

細胞内外のシグナル伝達から見た NETs 形成過程では、多彩な経路間のクロストークが示唆されている。例えば、i) LPS, HMGB1 等による TLRs 依存性のシグナル伝達経路 (67, 169) を介した Nox2 の活性化経路, ii) Raf～MEK～ERK 依存性のリン酸化経路 (57, 82) を介した Nox2 活性化経路, iii) Nox2 活性化とオートファジー形成が互いに相補する経路 (147, 157) 等が NETs 形成過程に流入している。以上は ROS 依存性の経路であるが、それ以外の ROS 非依存性経路による NETs 誘導も指摘されている (134)。

NETs 形成は、骨髄由来の細胞群であるマクロファージ・単球、或いは好酸球・マスト細胞等の顆粒保有細胞 (20) においても見出されている (6, 158, 177, 184, 203)。これらを、好中球を含めて (NETosis の N を外して) ETosis と総称する (52)。ETosis は共通して微生物を捕獲・殺傷する (52, 185)。好酸球もミトコンドリア DNA を含む小規模な ETs 成分を放出する過程 (viable-ETosis に相当する) (203, 205) とヒストンを含むクロマチンごと放出する過程が認められる (suicidal ETosis に相当する) (177)。また HL-60, U937, THP-1 を含めた好中球様ヒト骨髄性株化細胞においても同様な現象が確認されている (116, 117)。これら細胞群の共通した形態学的特徴はリンパ球における球形型核とは異なり、多形型核 (株化細胞では好中球様細胞に分化後の核の形態) であることに加え、Nox2 gp91phox ユニットを保有している事である (144)。

表 1. NETs インデューサー (誘導因子) と NETs コンポーネント (成分)

物質名 (NET 誘導因子)	物質名及び関与細胞等	NET 誘導因子	NET 成分
PAMPs (菌体分子群)	DAMPs (警告分子群) 及び関与細胞		
ジアシルリポペプチド	活性化内皮細胞	○	
2 本鎖 RNA	殺菌性/透過性増強タンパク質 (BPI)		○
フラジェリン *	ヒト β -ディフェンシン 2		○
リポタンパク	カルシウムイオン	○	
リポテイコ酸 (グラム陽性菌膜分子)	カテリシジン LL-37	○	
リポフォスホグリカン	カテプシン G		○
LPS (グラム陰性桿菌膜分子) *	クロマチン		○
<i>Mannheimia haemolytica</i> leukotoxin	ディフェンシン (ヒトを含む脊椎動物他の相同タンパク質)		○
菌体因子	フィブリノーゲン (NETs, DIC に関与)	○	
Panton-Valentine ロイコシジン, オートリシン, リパーゼ	グラチナーゼ B		○
ペプチドグリカン (真菌等の膜菌体分子)	グルコースオキシダーゼ	○	
1 本鎖 RNA	顆粒球単球コロニー刺激因子+リポ多糖 *	○	
非メチル化 CpG DNA	顆粒球単球コロニー刺激因子+補体 C5a *	○	
酵母由来 B-グルカン	ヒストン		○
<i>Staphylococcus epidermidis</i> δ トキシン	HMGB-1		○
トリアシルリポペプチド	インターロイキン-1 α	○	
微生物	インターフェロン- α +補体 5a	○	
<i>Aspergillus fumigatus</i> (胞子または菌糸)	インターロイキン-8 *	○	
<i>Candida albicans</i> (菌糸または酵母)	ラクトフェリン		○
<i>Cryptococcus gattii</i>	ミエロペルオキシダーゼ		○
<i>Cryptococcus neoformans</i>	壊死組織	○	
<i>Eimeria bovis</i>	好中球エラストーゼ		○
<i>Enterococcus faecalis</i>	ペントラキシン 3		○
<i>Equine spermatozoa</i>	血小板活性化因子	○	
<i>Escherichia coli</i>	血小板	○	
<i>Haemophilus influenzae</i>	S100s タンパク質	○	
<i>Helicobacter pylori</i>	サーファクタント蛋白質 A	○	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	サーモシン	○	
<i>Lactococcus lactis</i>	Toll 様受容体 4 を含む Toll 様受容体群	○	
<i>Leishmania amazonensis</i> (promastigotes/amastigotes)	腫瘍壊死因子 - α *	○	
<i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. major</i> , <i>L. chagasi</i> (promastigotes)	MPO-ANCA *	○	
<i>Listeria monocytogenes</i>	ウィルス		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. canettii</i>	サル免疫不全ウイルス-1	○	
<i>Serratia marcescens</i>	猫白血病ウイルス	○	
<i>Shigella flexneri</i>	化学的因子		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ピロリン酸カルシウム	○	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	カルシウムイオノフォア	○	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	過酸化水素を含む活性酸素種	○	
<i>Syncytiotrophoblast microparticles</i>	ホルボール 13-ミリステート 13-アセテート (PMA) *	○	
Uropathogenic <i>E. coli</i>	PMA+カルシウムイオノフォア *	○	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	スタチン	○	
	尿酸	○	
	一酸化窒素	○	

1) PAMPs と DAMPs : 従来 DAMPs (danger-associated molecular patterns) はアラーム (内因性物質としての生体内警告因子) の意味で用いられていたが、最近では外因性物質としての PAMPs を含めた総称 (DAMPs: damage-associated molecular patterns) として用いられるようになったので使い方に注意が必要である (63, 150)。NETs 誘導分子としての PAMPs は細菌・真菌等が血中因子によって分解されたもの、微生物が分泌する毒素を含んでいる。2) 微生物では細菌・真菌だけでなく、原虫 (トキソプラズマ) も含まれる。細菌では日和見感染菌・毒素原性細菌が含まれる。3) DAMPs としてはサイトカインと PAMPs, 補体等で修飾された微生物が組み合わされて NETs を誘導する場合が多い。また、4) 化学物質に該当しているピロリン酸, 尿酸は DAMPs であり痛風患者の局所炎症部位から結晶として NETs を誘導する。5) NETs 成分の多くは DAMPs に該当するものが多い。*を付した物質は Nox2 のアッセンブルを誘導するものである。これがプライミングである。詳細な NETs 成分に関しては NETs データベース : <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/lc/index.cgi> 参照。

図2. 微小血管系で発症する敗血症性 DIC における NETs の役割

PAMPs 又は DAMPs 等の刺激を受けた好中球はプライミングされた状態になり、細胞表面に様々な蛋白分子を発現する。この状態で血管内皮細胞表面をローリングしながら、Mac1 等を介して炎症部位等に接着する。その結果、好中球と内皮細胞とが直接相互作用し、炎症部位に好中球が貼りつくように集積する。この局所での障害部位では、血小板～好中球～血管内皮細胞間の相互作用を増強しながら血液凝固反応を亢進していく (80)。これが不可逆的に亢進すると NETs 形成と血栓形成が相乗的に増幅され (17, 46)、敗血症性 DIC による多臓器不全を誘発する (47)。

図3. ファゴサイトーシスと NETosis

細菌に対する捕獲・殺傷作用としてのファゴサイトーシス (左半分) と NETosis (右半分) を対比した。前者ではファゴソーム膜上で Nox2 がエフェクター (Nox2 サブユニット) によって活性化され、 O_2 を O_2^- に変換される。これによって H_2O_2 ・ $HOCI$ ・1 重項酸素・HOSCN 等が生産される。同時に、ファゴソームにアズール顆粒 (AG)、特殊顆粒 (SG)、3 次顆粒 (3rdG) が融合しファゴリソソームを形成し、抗菌蛋白分子が放出される。ROS とこれらの分子が相乗作用的に協業して、貪食された細菌は殺滅される。一方、NETs 形成ではファゴリソソーム形成はなく、上述の顆粒内蛋白分子は細胞質内に放出され、核膜消失とクロマチン膨化と共に NETs 成分を構成する。この NETs 成分は細胞崩壊と共に直接細菌を捕獲し、NETs 構造と NETs 成分の抗菌作用が相乗的ネットワークとも言うべき作用 (抗菌物タンパク分子ネットワークとも形容できる) を発揮して捕獲した細菌を殺傷する。NETs 誘導に必要な ROS はどこで生産されるのかは不明である。ここでは vital NETs (上部右側) と suicidal NETs (中央部右側) を示した。

3. 方法論的な注意点

In vitro で NETosis を誘導する場合 (図 4), 好中球全体の 20~30% の割合で不均一に発生し (45, 200), この事が NETs 形成の定量的な評価を難しくしている。例えば, NETosis を起こしていない細胞も多く含まれている中で, ROS を測定する場合, どこで産生された ROS が NETs に関与しているのかを同定する必要がある (86)。この場合さらに, ファゴソーム由来の ROS と細胞質由来の ROS を区別する必要もある (86)。前者の ROS プールのうち, H_2O_2 等は膜透過性で微量ではあるが細胞質内へも拡散する (144)。Nox2 は顆粒等の非ファゴソーム性細胞内オルガネラにも存在し, ROS を産生する (36)。また, ミトコンドリアでも ROS を産生している (36)。これらの細胞質由来 ROS が NETs 誘導に関与している事が示唆される。しかし, これに対応する検出系は確立されていない (36)。また NETs はディッシュ等の支持体に接着しているもの, 上清中に拡散しているものがある。NETs は好中球が集積している箇所が多くが観察され (155), 好中球の亜集団の関与も指摘されている (175)。さらに, NETs 形成率の個体差も無視できない等 (7), NETs 解析には超えるべきハードルが沢山ある。

また, 顆粒球, 各細胞株における ETosis の経路は, ETs 誘導薬剤 (スタチン, 尿酸, PMA, 過酸化水素他) の種類によっても異なる (26, 134, 158)。我々は NETosis が PMA によって誘導される経路 (45) とホスホチオエート型核酸 (S 化オリゴ (核酸)) によって誘導される経路が異なる事を見出した (図 4, 図 5)。すなわち, DPI 阻害 (Nox2 阻害剤) ではいずれも同程度の阻害を示したが, PKC 阻害 (リン酸化経路の阻害剤) による NETs 形成の有無を調べると S 化 ODN によって誘導される経路は PMA が直接

活性化する PKC とは別のアイソフォーム (32) が関与している事が示唆された。(以上, 免疫学会発表 (126, 127), 投稿準備中)。このように好中球内に取り込まれた S 化オリゴ (核酸) 等の薬剤はアイソフォームの異なる PKC を活性化する経路が存在し, NETs 形成を伴う炎症などを誘導する可能性がある。

また, ミエロイド系細胞株を用いて NETosis を検討する場合に注意しなければならない点がある。これらの株は, 樹立時の細胞分化の段階により顆粒形成が未熟であり, 顆粒内蛋白分子の発現が不完全である場合がある (139)。それ故, NETs 成分によって NETosis を評価する場合では, マーカーとなる蛋白分子の構造・活性が未熟なものも含まれている。HL-60 株化細胞を用いる場合では, 好中球様細胞への分化誘導が不完全のままであればアポトーシスが誘導される可能性もある (125)。また, 急性骨髄性白血病 (AML) 患者や新生児の好中球では NETs 誘導に関与する顆粒形成が未成熟なため, NETs 形成できない例もある (100, 202)。

4. 好中球の細胞死を見直す

骨髓内プールから末梢血にでてきた成熟好中球の循環時間は 5 時間程度, 感染等の刺激により血管外の組織へ遊走した場合でも, 長くて 1~2 日位でアポトーシスにより寿命を終えるとされる (14)。また, ファゴサイトーシスが原因でアポトーシスが誘導される場合を PICD と呼ぶ (81)。一方, 好中球のネクローシスは低酸素状態・虚血等の病的環境下や, 高温・毒素等の物理的・化学的作用によって引き起こされる不慮の死であり, 受動的な細胞の崩壊であるとされてきた。

最近, プログラムされたカスパーゼ依存的な細胞死はアポトーシスであり, プログラムされない細胞死はネクロー

図 4. *In vitro* における PMA および S 化オリゴによる好中球の NETs 誘導

ヒト健康人好中球を *in vitro* で各々 PMA, S 化オリゴ (phosphorothioated single strand oligodeoxynucleotides) を NETs 誘導至適濃度 20 nM, 1 μ M で刺激すると, 共に NETs が誘導される。NETs は NETs 成分である NE, MPO, Cit-H に対する抗体によって確認される (126)。MPO: ミエロペルオキシダーゼ, NE: 好中球エラスターゼ, cit-H: シトルリン化ヒストン 4, S 化オリゴ: ホスホチオエート化一本鎖オリゴデオキシ核酸, 核酸染色: SytoxGreen 染色。

A. 各種阻害剤によるROS産生への影響

B. NETs形成への影響

阻害剤	標的	刺激	NETs形成		
			阻害剤濃度		
			[10µM]	[1µM]	[0.1µM]
DPI	Nox2	S化オリゴ	—	—	—
		PMA	—	—	—
Gö6976	PKC (α, β, μ)	S化オリゴ	—	—	+
		PMA	+	+	+
Gö6983	PKC (α, β, γ, δ, ε)	S化オリゴ	—	—	+
		PMA	—	—	+

+: NETs形成有り —: NETs形成無し

図5. PMA刺激とS化オリゴ刺激によるNET誘導のカスケードの違い

A: 図4の系でNox2阻害剤であるDPIで処理するとROS発生は殆ど抑制される。一方、PKCアイソフォーム活性を差別化できる阻害剤で処理すると、PMAとS化オリゴ(核酸)でのROS産生の挙動は異なる。B: Nox2阻害剤であるDPIで処理すると濃度に関わりなくNETs形成は阻害される。一方、異なるPKCアイソフォームを阻害するGö6976(選択的PKC-α, β, μ阻害剤)とGö6983(広範囲なPKC-α, β, γ, δ, ε阻害剤)を用いたNETs形成の有無を比較すると、前者阻害剤ではPMAによるNETs誘導は阻害されないが、S化オリゴ(核酸)によるNETs誘導を選択的に阻害する。一方、後者阻害剤では高濃度ではPMA, S化オリゴ(核酸)によるNETs誘導を非選択的に阻害するが、低濃度では共に阻害されない(127)。これは、Nox2活性化の上流においてPMA, S化オリゴ(核酸)のリン酸化経路が異なるためだと考えられる(本文参照)。

シスであるという差別化が当てはまらない細胞死が確認されている。前者に於いてはカスパーゼ-1依存的な(のちにインフラマソーム依存的に拡大された)後期アポトーシス様細胞死を、炎症に基づくプログラムされた細胞死としてパイロプトーシス(pyroptosis)(29)、また後者においてはプログラムされたネクロトーシスをカスパーゼ非依存性細胞死—ネクロプトーシス(necroptosis)として区別されている(54)。この現象は、骨髄由来の株化細胞や初代細胞で観察されている(11, 74)。これらの細胞死は局所での緊急状況を細胞社会に知らせるための“dying message”と考えられるが(198)。NETosisもその可能性が高いのではないだろうか(146)。

好中球が*Staphylococcus aureus*の産生する白血球溶解毒素(PVL)により溶解される事はよく知られている。この現象はpathogen-mediated host cell killing, 又はpathogen-induced cell lysisと呼ばれている。このような作用を有するPVL, ロイコトキシン(Luk)GH, hemolytica-LKT, オートリシンはNETs誘導物質としても報告されている(6, 102, 140)。マクロファージにも同様な報告がある(6)。今後、これらの細胞死とNETosisの経路がどう関わっているのか、その解明が期待される。

では、なぜ好中球を含めてETosisという際立った細胞死が存在するのだろうか? また、好中球の主要機能である

ファゴサイトーシスとNETosisがどのように関わっているのだろうか。そのヒントとなるファゴサイトーシスの特徴を概括したい。

5. NETosisを理解するための 好中球ファゴサイトーシスを概括する

ヒトでは白血球全体の70%以上を占める好中球の最も重要な役割は、微生物等に対するファゴサイトーシスと、その後の各種顆粒が融合したファゴリソソーム内での殺菌・消化である(図3)。ファゴソームは細胞膜からの陥入であり、由来的には細胞膜の一部とも考えられる。好中球は、この役割に特化して形態学的・エネルギー代謝的に最適化されている。

細胞内の核の占める体積は細胞質に比べ非常に大きく、特異な多形核(分葉形)であり、核膜内側にクロマチンが凝集している。わずかにミトコンドリアが点在し、O₂から呼吸鎖を介した好氣的エネルギー代謝はあまり利用されていない。TCAサイクル経由のグルコース消費は全体の僅か5%以下であり、エネルギーの大部分は解糖系から得られている。食食時では解糖系のHMP側路が活性化され、静止期に比べグルコース消費量が約30%も上昇する。それによって膜上のNox2にNADPHが供給されNADP⁺に変換される。この時Nox2はファゴソーム内に自由拡散した

O_2 を O_2^- に変換する。敗血症時の好中球性呼吸バースト (NADPH オキシダーゼ バーストとも言う) による急激な O_2 消費は Nox2 の仕業であり、TCA サイクル要求性ではない。 O_2^- は化学的に直ちに H_2O_2 に変換され、膜透過性になる。 H_2O_2 は MPO の基質となり、HOCl 等のハロゲン化酸を産生する。このようなファゴリソソーム内の過剰な ROS プールは、顆粒由来蛋白分子と協業して微生物の殺傷にあたる (144, 192)。

微生物侵入によって局所に集積した好中球は各々ファゴサイトーシスと NETosis の両態勢で対応し、お互いに相互作用していると考えられる (16, 194, 201)。ファゴソーム由来 ROS は主に殺菌に用いられる。一方、細胞内外へ拡散した微量の ROS は NETosis を誘導し、侵入した微生物を効率よく捕獲・殺傷していると推定される (36, 135, 144)。このような相互作用は、従来のファゴサイトーシスだけでは把握できなかったダイナミックな生体応答の仕方である。

このような現象は以前には見出されていなかったのか。以下、臨床とラボベンチからの報告を紹介する。

6. ベッドサイドとラボベンチでの NETs を示唆する報告 —古きを訪ね新しきを知る

菌血症の診断法として、古典的なグラム染色法等を用いた白血球内外の細菌を判定する簡易法がある。この方法は現在でも緊急時の重症感染症診断法として救急救命室で実施する施設もある。以下、1970 年から 90 年代にかけて、臨床医の注意深い顕微鏡観察による短い報告を紹介する。

1 報目は、血液スメア観察により白血球内外の細菌数の比率が感染症の重症度の指標になり (41)、細菌の分布が白血球外に多いと敗血症が増悪化しているとしている。2 報目では、血液スメア観察により白血球外の細菌が観察され、白血球減少と血小板減少を伴う重症敗血症例であり (44)、血小板減少傾向等から DIC を伴っている事が示唆される (47)。3 報目は、DIC における末梢血スメア所見から障害された内皮細胞と多数の核を含む塊 (おそらく内皮細胞由来)、好中球内のグラム陰性双球菌が観察されたというものである (55)。グラム染色法等では細胞外 NETs 構造は染色されにくく、細菌のみ観察される事、感染モデルではファゴサイトーシスによって取り込まれる細菌よりも NETosis で補足される細菌の方が多いという知見を併せると (28, 201)、敗血症と NETs との関連が示唆される。

ANCA 関連腎炎 (後述) に認められるフィブリノイド壊死の病理所見は微小血管炎における好中球の核破砕物と浸潤像を特徴とする (白血球破砕性血管炎とも言う) (72)。これも NETosis が伴っている事が暗示される。

一方、1980 年代に好中球または好中球様株化細胞を PMA 処理すると、細胞質と核膜の境界が消失し、アポトーシスともネクロトーシスとも分類できない細胞死 (恐らくは NETosis) がラボベンチから報告されている (40, 170, 174)。

これらの観察結果は細菌感染が引き金となった微小血管系の過剰炎症反応に NETs が伴っている、或いは *in vitro* での NETs 誘導化学物質添加により NETosis が惹起されたものと解釈できる。

7. 感染と NETs 形成による応答とその制御

NETs の生体防御としての役割は好中球の役割から少しも逸脱してはいないとも考えられる。なぜなら、NETosis はファゴサイトーシスこそ介さないが、飛び道具としての細胞外ネット (網) によって微生物を捕獲し、元々ファゴソーム内 (謂わば細胞内ネット) で細菌を殺傷する抗微生物蛋白分子 (弾丸) が、ネット (細胞外クロマチン断片) に仕込まれて効率よく標的を攻撃していると解釈できるからである。

しかしながら、以下の疑問が沸いてくる。感染局所で好中球はこの二つの道具 (ファゴサイトーシスと NETosis) をどう使い分けているのか。ファゴサイトーシスでは対応できない場合での、元々備わっている防御様式なのか、それとも免疫応答における未知な役割が隠されているのか。この謎に対する答えは、マスト細胞では貪食能が無いにも関わらず、ETosis によって微生物を捕獲・殺傷できるという現象 (phagocytosis-independent antimicrobial activity) (184) に糸口があると考えられる。

In vitro 或いは感染モデル動物を用いた細菌、真菌、ウイルス等の NETs 誘導による捕獲・殺傷作用は確認されている (表 1) (18, 39, 140, 179, 190)。しかしながら、すべての微生物に対して、NETs が有効に働く訳ではない (185)。これは、「すべての微生物がファゴサイトーシスで殺滅される訳ではない」というのと同じ意味ではない。では、NETosis は生体応答としての感染防御において、どのようにファゴサイトーシスとは異なった仕方で係わっているのだろうか (20, 146, 190)。以下、感染防御における NETs の役割をファゴサイトーシスと差別化しながら述べてみたい。

第一に NETs が微生物を効率よく捕獲し、感染の全身拡散を防いでいる事は容易に想像できる (93, 109, 133)。この視点からは細菌が分泌するヌクレアーゼの役割に一つの根拠を与えてくれる。細菌は NETs によって殺傷されるが、ヌクレアーゼ (DNase, SdaI ヌクレアーゼ等) を発現している細菌は捕獲されても、NETs を分解する事で脱出することが出来る (8, 10, 22, 186)。感染モデルでは、ヌクレアーゼを保有しない菌株は侵入局所に留まり、感染は終息する。一方、ヌクレアーゼ保有株 (多くは野生株) は増殖し続け、全身に播種されて重篤化し、宿主の生存率を著しく低下させる。この場合、ヌクレアーゼはビルレンスファクターである。この状況では細菌を攻撃している武器は主にファゴサイトーシスであり、NETs が感染防御に対して決して脇役では無い事が伺われる。

ヌクレアーゼに限らず、細菌は様々な手段を駆使して NETs から逃れる事ができる。例えば、カタラーゼ産生菌

は NETs 形成に必要な H_2O_2 を分解し、NETs 誘導を抑制する。*Streptococcus pneumoniae* ではリポテイコ酸 (LTA) を含む細胞壁の最外殻を、ポリサッカライドを主成分とする莢膜で覆う事により、また *Pseudomonas aeruginosa* では宿主血清由来のシアル酸で自身をコートして、好中球上のシアル酸結合レクチン (Siglec)-9 との結合を介する事などにより、好中球活性化と NETs 放出を抑制させる事が知られている (24, 85, 92, 189)。これに対して宿主は NETs にも含まれる成分 NE, MPO により、これらのビルレンスファクターを不活化し (18, 191)、血中コレクチン、補体成分は NETs による標的の捕獲を支援する等 (18, 35) で対抗している。

真菌は細菌とは異なり、菌糸 (hyphae)、孢子 (spore)、分生子 (conidia)、酵母様フォーム等と呼ばれる形態を有する。これに対し好中球はファゴサイトーシス、ROS の細胞外放出、脱顆粒、NETs 等様々な攻撃法で対応するが (123)、真菌種によって殺菌されるプロセスは異なる。*Candida albicans* のような酵母様真菌では NETs で殺菌できるし (180)、ファゴサイトーシスによっても、非オプソニン化 CR3 依存的に、或いはオプソニン化 Fc γ -R 依存的に殺菌される (50)。真正真菌の菌糸はファゴサイトーシスではサイズの攻撃しにくいと考えられるが、抗体依存的 (前記オプソニン化 Fc γ -R) に殺菌される事が、動物実験でも免疫不全ヒト症例でも報告されている (25)。*Aspergillus fumigatus* に対しては NETs 非依存的であり、分生子や菌糸に対しては CR3 (前記) を介する場合、Fc γ -R (前記) を介する場合がある (38, 49)。一般に真正真菌に対しては、NETs の役割は静菌的に作用し、菌糸や孢子が局所から全身に伝播しないようにしていると考えられている (108)。CGD 患者への Nox 遺伝子治療による真菌感染に対する抵抗性の回復はファゴサイトーシス後のファゴソーム内の ROS 産生による殺菌能の回復と、ROS 依存性 NETs による静菌作用による全身伝播への抑制による協業によって感染症に対する抵抗性の回復と考えられる。最近、真菌に限らず細菌塊等のサイズに対して、好中球によるファゴサイトーシスでは対象が大きすぎる場合、このサイズを認識する機構があり、NETs で対応するという報告がある (15)。一方、*Aspergillus fumigatus* の孢子から産生される hydrophobin RodA は NETs 形成を阻害する (21) 事ができる。いずれにせよ、真菌の様々な形態変化は細菌より格段に NETs による殺滅能力を制限または抑制する原因となっている。

HIV 等のウイルス感染に対しても NETs は抑制的に働く (69, 153)。この場合、ウイルスゲノムやエンベロープは TLRs 等を介して NETs を誘導し、その結果、NETs は静電的な相互作用によりウイルスに接着する。捕獲されたウイルスは血中ヌクレアーゼ等によって不活化され細胞への感染力は抑えられる (153)。

そこで、感染防御に対する両者の役割を位置づけ、概括してみる。

ファゴサイトーシスでは、活性化した好中球は炎症性サイトカイン、ケモカイン、ROS 等を産生し、さらに脱顆粒により様々なエフェクター分子を分泌する。それによって好中球は他の免疫細胞とも相互作用を行い、より高度な防御態勢をとる事はよく知られている。このように好中球のファゴサイトーシスは、生体防御機構の最初のディフェンダーとしての役割を果たすための重要な機能として位置づけられる。一方、NETs は生体内に侵入したウイルス・微生物をトラップし、様々な抗菌作用のある NETs 成分を放出する事により、結果的に感染防御の役割を果たしている。同時に細胞障害性の高い成分をも放出し (表 1)、未だ予測できない役割を含んでいる。この意味で NETosis は感染防御に止まらない生体における多能性を持っている可能性が示唆される。

例えば、Plijev らは好中球の IFN- γ を介した MHC クラス 2 誘導には Nox2 の活性化が必要である事を示し (141)、その ROS 産生により NETs が誘導されることを暗示させた。Tillack らは NETs が T 細胞に接触する事により T 細胞のプライミングを誘導し、獲得免疫系細胞に働きかける事を示した (172)。また、NETs が樹状細胞 (DCs) の TLRs を介して T 細胞を活性化する事も示唆されている (91)。さらに NETs が B 細胞のクラススイッチによる抗体産生誘導に関与している可能性もある (142)。この NETs と免疫系細胞間の連携が破綻した場合、自己免疫疾患の発症が誘導される事が示唆される (48, 91)。

このように NETs は、ヒストンを含むクロマチンを防御手段とする事自体がファゴサイトーシスよりも起源の古い、‘danger-signal’ 「自己の危機」を認識するための装置ではないだろうか (20)。

ところで、NETs はどのようにして微生物を捕獲・殺傷できるのか？ NETs 構造の背骨であるクロマチンの表面は強い陽性電荷であり、対する細菌、真菌、ウイルスの表面は陰性電荷とされる (139, 153, 178)。この静電的相互作用により、両者の接触面が増大し標的が捕捉され、NETs 成分同士の相乗的な殺傷力 (これを抗微生物蛋白分子ネットワークとも形容できる) が働くものと考えられる (131, 184)。

易感染性を示す遺伝子欠損マウスとして、グルタチオン還元酵素 (GSR) 欠損マウス、HMP 側路の主要酵素グルコース 6 リン酸フォスファターゼ (G6-P) 欠損マウス、NETs 成分である NE 欠損マウス、ミエロイド蛋白質 14 (MRP14) 欠損マウス、MPO 欠損マウス、カタレプシン G 欠損マウス、PAD4 欠損マウス等が挙げられる (2, 9, 98, 106, 131, 144, 197)。しかしながら、これらの欠損マウスのうち、G6PD, NE, MPO, Cathepsin G, MRP14 等は NETs だけでなく他の殺菌機構でも働く遺伝子である。このうち PAD4 は他の殺菌ツールを含まない、NETs 形成に特異的な遺伝子欠損マウスと言える。すなわち、PAD4 欠損マウスは NETs が形成されないことが本質的に殺菌能の低下と感染防御に係わっている。また、NETs 成分中の細胞質由

来カルプロテクチン欠損マウスは重篤なカンジダ症、深在性アスペルギルス症を発症させる (13, 178)。しかしながら、こうした欠損マウスを用いた NETs の役割の解析はヒトの感染病態と似ていても、好中球の自然免疫応答の仕方に種差があり、NETs が関与するヒトの炎症疾患発症のメカニズムとは異なっている可能性も示唆される (111)。今後、欠損動物の感染によって引き起こされる炎症反応の注意深い解析が必要である。

8. Suicidal NETosis と Vital NETosis —往きて帰らぬものと生き残るものの役割

PMA による suicidal NETosis 誘導では数時間を要し、vital NETosis では菌体等により生体メディエーター (TLRs, 血小板, 補体レセプター (CR3)) 等を介して、数十分から 1 時間位で NETs が観測される (23, 28, 140, 200, 204)。Parker らは刺激の違いによって NETs 誘導する経路に ROS 依存性と非依存性経路の存在を指摘している (134)。前者が数時間応答型細胞溶解性経路を介した Nox2-産生 ROS-依存性 suicide NETosis である。後者が数十分迅速応答型非溶解性経路を介した ROS-非依存性 vital NETosis に相当するものと考えられる。従って、vital NETosis は必ずしも suicidal NETosis の途中段階と言うわけではない。この刺激の違いによって応答に時間差ができる例は、Nox2 のプライミングや活性化に要する場合にも認められる。これらの応答の時間的な違いは、刺激の違いが各々の Nox2 サブユニットのリン酸化経路の違いとなり、これが NETs 応答の時間的な差となって現れていると示唆される (31, 37, 144)。

また、細胞内外での ROS 依存性経路による NETs 誘導も考慮しなければならない。即ち、両タイプの NETs 形成は好中球が集積する細胞内外の ROS の局所的な拡散によって誘導される状況即応型反応の結果である事も否定できないからである。

9. NETs 成分の両刃の剣としての抗微生物作用と 生体への障害作用

NETs 構成成分は主に 1) 核内成分, 2) 顆粒内成分, 3) 細胞質成分に分類される (14)。1) では NETs の背骨であるゲノム DNA, ヒストンと HMGB1, PAD4 等の非ヒストン系蛋白分子等が含まれる。2) では主に 3 種類の顆粒内に含まれる蛋白分子であり、アズール顆粒内の i) MPO・カタプシン G・PR-3・NE・リゾチーム, BPI, ディフェニンシン等, 特殊顆粒内の ii) ラクトフェリン・ペントラキシン 3 等, 3 次顆粒内の iii) グラチナーゼ等が挙げられる (図 5) (14, 139)。抗微生物活性蛋白分子を含むこれらの顆粒は好中球が骨髄から分化、成熟していく過程で順次形成されていく。その際、顆粒内蛋白分子として合成された後、顆粒内へソーティングされ、再合成はされないとされる (139)。3) では、カルプロテクチン等がある (178)。NETs 成分として組み込まれるのは、これら約 30 種の強

陽性電荷を有する蛋白分子である (133, 190)。血中ではファゴソーム内環境と違い、DNase やプロテアーゼ阻害分子に暴露されており失活される可能性もある。しかし、NETs は血管壁等の血管内皮細胞表面に接着しており (この状態が亢進したものが図 2 に示した血栓形成である)、NETs の背骨であるゲノム DNA が分解されない限り、これらの成分は失活しないとされる (NETs 活性はこの背骨構造依存的に発揮する) (16, 59, 200)。

ゲノム DNA・ヒストンの抗微生物活性は知られているが (59), DAMPs としても強い毒性を有する。このため、感染局所での生理的環境下では NETs の血管内皮細胞表面等への接着により、NETs 成分の全身への拡散を抑制しているとも解釈される (93, 155)。DAMPs には NETs 成分、或は NETs 誘導成分が多く含まれ (表 1)、これらの分子群はパターン認識レセプター (PRRs) 等を介して炎症性サイトカイン類を細胞外へ放出させ (169)、急性 (敗血症)、或いは慢性の炎症 (自己免疫疾患) を遷延化させる要因となる。これがホメオスタティックに抑制されなければ、さらに NETs 誘導を繰り返し、炎症は全身性に増悪化の方に進行する事は容易に想像できる (図 6)。

この NETs 連鎖による炎症増幅に深く関与している蛋白分子群について触れる。

10. NETs 現象に関与している重要な蛋白分子群

1) Nox2 による ROS 産生は NETosis の必須な引き金である

好中球がプライミングされると細胞質内 Nox2-細胞質内サブユニット (p67, p40, p47phox の各サブユニット) がリン酸化を受け、細胞膜上の主サブユニット (gp91, p22phox) とファゴソーム膜上でアッセンブルする。これにより O_2^- 産生態勢になり (37, 162), NETs 経路が起動される。PMA 処理では細胞膜を透過し直接 PKC が活性化され、各サブユニットのリン酸化によって Nox2 が活性化され NETs を誘導する。また、DPI 等の Nox2 阻害剤処理により NETs 形成は阻害される (137)。

Nox2 を介して産生された O_2^- は、 H_2O_2 に変換されアズール顆粒内に存在する MPO の基質となり、より強力な抗菌分子ヒドロキシラジカルへ変換される (144)。NETs 誘導する Nox2 の局在に関しては、酸化的バーストの場所 (ファゴソーム膜上 Nox2)、ミトコンドリア由来-ROS を産生する場所、或いは顆粒内 (非ファゴソーム性細胞内オルガネラ) に各々 Nox2 サブタイプが偏在しており (36, 144, 167)、どの Nox2 が NETs に関与しているのかは明確ではない (図 3)。

CGD 患者では 5 つの Nox2-サブユニット遺伝子の一部に変異または欠失が認められ、Nox 活性がなく ROS 産生能がないため、微生物に対する殺傷力がないとされる (66)。この患者好中球は NETs 形成能がない (12, 45)。CGD 患者 (このうち 30% が gp91phox 欠損とされる) に正常な gp91phox を遺伝子導入すると、NETs 形成能が回

図 6. 臓器内循環血管系等における NETs-ANCA vicious cycle

慢性炎症性部位の微小血管系では好中球～血小板～血管内皮細胞間で閉鎖空間を形成しながら、①から③のプロセスで NETs が形成される。④で NETs による障害作用が慢性的に持続され、自己抗体 ANCA が誘導される。炎症性サイトカインを介した ANCA～NETs 形成が繰り返され、自己免疫疾患を発症する。これは cytokine-ANCA-NETs sequence による vicious cycle と表現する事ができる。このような慢性炎症性疾患には ANCA 関連血管炎を含む自己免疫疾患がある (⑤)。また、比較的大い血管系では NETs 形成によって、アテローム性血管炎（動脈）、或いは DVT（深部静脈血栓症）の発症（静脈）の亢進または増悪化が挙げられる (17, 165)。

復し、致命的なアスペルギルス症を制御できる (12)。この事はこれら病原性真菌の感染に対してはファゴサイトーシスだけではなく NETs が形成されない事も関与している事が窺われる (12, 133)。

CGD 患者好中球に MPO の基質 H_2O_2 、或いは MPO の産物 $HOCl$ 添加により NETs が誘導又は制御される事が知られている (3, 130)。一方、MPO の酵素活性は NET 形成に必須ではないとも言われている (112, 131)。MPO を完全欠損した患者は NETs 形成能がないが、部分的に欠損した患者、或いは MPO 活性阻害剤を用いてもゆっくりではあるが NETs が誘導される (134, 135)。これは MPO 活性の不完全な患者においては、CGD 患者に比べ、感染防御に対して致命的とはならない事との関連が示唆される。

2) NETs 形成を加速する NE・MPO の相乗効果

血管局所で炎症反応が起こった場合、細胞表面に PR3 を発現した好中球は、血管内皮上でローリングと接着を繰り返す (110)。顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者の好中球は ANCA (後述) と結合することで活性化される。その結果、MPO, NE, サイトカイン等の炎症性メディエーターが分泌され微小血管局所に障害を与える (図 6)。これが慢性的に繰り返されると炎症が増悪化される。この捉え方を cytokine-ANCA sequence theory (30) と言う。血管内皮細胞と相互作用を繰り返すことで、NETs 形成を伴う局所的な閉鎖空間を形成し (図 2, 図 6)、血小板を含むこれらの障害因子 (DAMPs, 表 1) がパラクライン/オートクライン的に好中球にも作用していると考えられる (73, 152, 173, 176)。その結果、さらに NETs が誘導されるという

cytokine-NETs sequence (70, 118) とも言うべき連鎖が起こっていると推定されている (図 6)。

一方、細胞内では、膜透過性 H_2O_2 がアズール顆粒膜に埋め込まれた NE-MPO 複合体を活性化し解離させる。この複合体はアズロソームと呼ばれる (図 5) (112)。NE と MPO は先述したようにクロマチンの膨化を加速する。この協業作用の事を MPO・NE の相乗効果と呼ぶ (112, 131)。

ループス腎炎患者の病態の増悪化は NE・MPO の過剰発現が背景にあり、臨床的にもこの相乗効果が関与している事が示唆される (89)。

3) HMGB1 は敗血症と自己免疫疾患の重症化に強く関わる

HMGB1 は核内ゲノムに結合している非ヒストン系蛋白質であり、ヌクレオソームの転写制御に関与している。細胞外では、多機能性アラミンンとして、急性の炎症疾患或いは自己免疫疾患などの慢性炎症疾患にも関与している (1, 62)。細胞外 HMGB1 アイソフォーム（還元型、2 硫化型、酸化型）の構造的な違いとアポトーシス、ネクローシス、パイロプトーシス、NETosis の誘導とは対応関係があるとされる (101)。

細胞外 HMGB1 は活性化血小板が主要な供給源であることが明らかにされた (107)。この HMGB1 は、好中球上の RAGE または TLR4 を介して Nox2 を活性化させ、NETosis を誘導する (168, 169)。血中 HMGB1 は敗血症の重症化に関与し敗血症後期致死因子と呼ばれたが (187)、自己免疫疾患発症にも深く関わり、血管炎、関節リウマチ (RA)、SLE の患者検体（滑液膜、滑液 (SF)、

血清等)から高濃度で検出される(1, 53, 143)。

さらに, HMGB1は抗HMGB1抗体によってマスクされており(181), RA, 自己免疫性肝炎(AIH), 潰瘍性大腸炎(UC), SLE患者からは抗原・抗体複合体(この種の抗体を自己制御抗体とも形容されている(1))が高濃度で検出される(1, 53)。HMGB1はMPO-ANCAと同様に重要な自己抗原となる。HMGB1-DNA複合体としても挙動し, SLEにおける抗dsDNA抗体誘導にはこの複合体が必要であるとされる(1)。HMGB1はこれらの疾患の重症化に強く関わっている因子ではあるが, 上述の複合体を形成しており, 正確な測定法は確立されているとは言えず(95, 181), 疾患との作用機序は十分把握できていない。

4) PAD4のシトルリン化には2つ役割がある

ヒトPAD4は単球, 好酸球, 好中球細胞質内に存在し, 核内移行シグナルを持つ。核内ではヒストンを基質とし, モノメチル化アルギニン残基を脱アミノ化(これをシトルリン化ヒストンという: Cit-H)することにより(115), クロマチンの弛緩(遺伝子発現におけるゲノムの巻き戻し)に働く。PAD4活性化にはNox2を介したROS産生が必要である(151)。このROS依存的PAD4はNEやMPOと同様にNETsを誘導する事は先述した(188)。Cit-HはゲノムDNAと共にNETsの背骨を形成しており, 他の細胞質由来のNETs成分と比べ確実なNETsマーカーと言える。PAD4ノックアウトマウスはNETs形成能がなく, 易感染性であることからPAD4は感染制御に重要な役割を担っているとされる(98)。PAD4をCl-amidine等で阻害するとシトルリン化は減少しNETs形成が抑制される(27)。

SLE, RA患者では炎症局所或いは全身においてPAD4活性の上昇が認められ, その自己抗原はcit-H以外の多様なシトルリン化蛋白分子をも含んでいる(84)。これらに対する抗シトルリン化ペプチッド抗体(ACPA)は, RAの予測因子としても感度・特異度の高いマーカーである(156)。それ故に, PAD4の阻害剤はRAだけでなく他の自己免疫疾患の治療薬になりうるが(27, 88, 103), 感染防御力が低下することも予想される(98)。

また, RA患者血清やSFは強力にNETs形成を誘導する事が知られている。RAの病態の増悪化はPAD4によるNETs誘導とACPA形成という悪循環によるものと考えられる(84)。

5) NETs形成によるヒストンの放出はダークサイドからの贈り物

NETs成分としてのcit-Hは, ゲノムDNA対ヒストン重量比が約1対1である事からNETs構造を強固に補強している事が推定される(90, 99)。

ヒストンには*in vitro*においてグラム陽性・陰性細菌, 真菌を含む抗微生物活性を有する(79)。本来ゲノムDNAと共に核の中にあるが, 一旦細胞外へ放出されれば致命的なDAMPsとして作用する(表1)(196)。特に微小血管環境での血管内皮に障害を与え, 血液凝固系を活性化し, 敗血症性DICや深部静脈血栓症DVTを誘発する(4, 17,

160)(図2, 図6)。細胞外ヒストンに対する抗体投与は, 敗血症を発症させたモデル動物に延命効果がある(196)。細胞外ヒストンを切断する活性化プロテインC(APC)には抗凝固作用があり, 敗血症の治療薬となり得る(4, 196)。また, ヒストンミミック化合物は敗血症治療薬の候補となる(121)。

6) DNase1はNETsによる炎症の終息に直接手を下している

SLE発症の診断的背景からSLE患者においては高濃度血清DNAの存在とループス腎炎発症に因果関係が認められ(61, 114), 血清中のDNA抗体や細胞外DNA-抗DNA抗体複合体の出現は糸球体基底膜(GBM)への沈着が進行している事が示唆されていた(60)。さらに, 進行性糸球体腎炎を発症する活性型SLE患者では血清DNase1に変異が認められ, 本酵素の活性低下とこれらの疾患との関連が示唆されていた(105, 199)。また, DNase I-欠損マウスではループス腎炎様の症状を呈する事が知られている(120)。

HakkimらはSLE患者血清中で形成されたNETsは長時間残留しほとんど分解されないが(これを非分解性血清と言い, SLE病態の悪化の指標にもなる), 健常人血清中NETsは速やかに分解される事を見出した。この原因は患者血清中DNase1が基質とする血清DNAに対するDNA抗体結合による障害であるとした(58)。また, DNaseI活性の低下の可能性もあり, この原因はDNase変異が関与していることを示唆した。RA患者では健常人と同レベルでNETsを分解するにも関わらず(58), SLE患者と同様にNETs形成が誘導されやすい(48, 91)。これはRA患者好中球では好中球に対する自己抗体により, すでに好中球はプライミング状態であることが示唆される(78)。

また, ANCA関連血管炎(AAV), MPA患者においてもDNase活性は低いとされる(119)。ANCA誘導モデルマウスにDNaseIを血中投与するとANCA形成が減少する(154)。SLE患者での同様の試みは失敗しているが(182), これは自己抗体と血清DNAとの結合によってDNaseが障害されたものと考えられる。嚢胞性繊維症(CF)患者炎症部位にDNaseI処理すると炎症が緩和する(132)。或いはNETsが関与しているとされる糖尿病マウスにDNaseIを投与すると同様な現象が観察される(194)。以上からDNaseI活性がNETsによって誘導される炎症の終息に強く関与していることが示唆される。

11. NETsとその関連疾患

NETosisが関与している疾患は動物モデルも含めて, 先述した自己免疫疾患・敗血症・感染症とその関連疾患(16, 200), 肺炎・急性肺障害(ALI)/急性呼吸窮迫症候群(ARDS)(209), CFによる肺胞障害(132), 慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の気道炎症(122), 感染性壊死性筋膜炎(22), 虫垂炎(18), 糖尿病(194), アルツハイマー病(210), 妊娠中毒症(56), 歯周炎(183)等が挙げられ

る。このように広範囲な炎症性疾患、及びそれらの炎症部位に NETs の関与が確認されている。

以下、NETs と敗血症、或いは自己免疫疾患としての血管炎とのかかわりについて簡単に触れる。

1) 敗血症との病態との関連

近年、敗血症の国際標準的な定義は「感染により引き起こされた SIRS である」としている (33)。日本は独自性を保ちながらも世界的なガイドライン SSCG2013 (33) と調和している (124)。ガイドラインでは敗血症は感染症としての診断上の定義が困難であり、臨床現場での患者の感染状況による医師の診断・治療細目 (33) に任せている。SSCG では菌血症は敗血症の必須の診断要件ではなく、敗血症によって惹起される高サイトカイン血症の指標としての IL-6、プロカルシトニン、プレセプシン、乳酸等の生体マーカーが治療に直結する診断項目として重要視される (33, 124)。敗血症の発症は、感染の有無にかかわらず、大量の血液中 PAMPs または DAMPs による持続的な SIRS 応答であり (51)、その遷延化を亢進させ、臓器障害を加速させる事に好中球が大きく関与している (136)。すなわち、敗血症性 (好中球由来) の呼吸バーストによって Nox2 が誘導する ROS 産生レベルは亢進しており、血中サイトカインレベルはサイトカインストームを呈している (64)。さらに血中好中球内転写レベルではゲノミックストーム (195) の状態にある (以上の状態を免疫的麻痺 (94) と形容できる)。これらの好中球は全身臓器内の微小血管系に集積して、プライミングされた状態であると言える。この時、血小板上の TLR2 または TLR4 に PAMPs が結合すると血小板は活性化される。活性化された血小板は、HMGB1 を放出するとともに (この HMGB1 は好中球上の TLR4 または RAGE を介して細胞内炎症性経路を活性化する)、好中球と複合体を形成し、NETs を誘導する。NETs の主要成分であるヒストンは、さらに血小板を凝集させ NETs 形成を増幅させる。この活性化には血小板と好中球との相互作用だけでなく、好中球と血管内皮細胞、血小板と血管内皮細胞との相互作用が増強しあいながら血液凝固反応が亢進していくと考えられる。これが、DIC を伴う敗血症の重症過程の一つであるとされる (28, 45, 46, 68, 97, 107, 163, 166) (図 2)。このような生体内凝固過程を、cell-based process of hemostasis (80) として捉えられ、好中球と血小板の相互作用による敗血症の発症から遷延化による多臓器不全を伴う重症化を考える上で重要なモデルとなる。

以前から血中循環性ヌクレオソームと多臓器傷害 (MODS) との相関性が臨床的にも認められてきたが、最近では高濃度血清由来 DNA を cf (細胞外)-DNA/NETs として捉え直されている (104)。

感染症から敗血症へ至る過程のどの段階での NETs が重症化に関与しているのか、さらなる研究が待たれる。

2) 感染症が誘導する自己免疫疾患

以前から感染と自己免疫疾患との関連性は疫学的に、或

いは免疫学的モデルからも言及されてきた (34, 77, 161)。SLE 患者の 30-50% が感染症を契機に発症すると言われている (34)。

分子相同性仮説 (5, 206) によれば、病原因子によって修飾された生体成分が抗原となり、抗体が誘導される。或いは生体類似分子である病原因子そのものが抗原として認識され、その抗体が生体由来の相同性分子と交差し自己抗体として作用するとされる。前者では歯肉炎原因菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来の peptidylarginine deiminase (PAD) が生体分子をシトルリン化し抗原性を誘導する例 (103) が挙げられる。後者の例ではカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) 腸炎によるギランバレー症候群 (207)、細菌のアドヘシン (FimH) が誘導する LAMP-2 による巣状壊死性糸球体腎炎 (FNGN) の発症 (75) が報告されている。さらに、ウェゲナー肉芽腫症は *Staphylococcus aureus* 感染との複合的な炎症疾患であるが、後述する PR-3-ANCA の誘導は *S. aureus* 由来の分子相同的な交差が原因である事も示唆されている (77, 138)。いずれも免疫寛容性の破綻であるが、その発症機序は明らかではない。

3) NETs が誘導する ANCA 関連血管炎について

ANCA 関連血管炎は、Chapel Hill Consensus Conference 分類 (71) に従い、小型血管炎に分類される。腎臓の細動脈～毛細血管～細静脈の微小血管環境に発症する顕微鏡的多発血管炎 (MPA) がよく知られ、急性進行性糸球体腎炎として好発する (71)。

好中球成分に対する自己抗体 (ANCA) が出現し、免疫組織化学的には細胞質周辺型染色パターン (c-ANCA (cytoplasmic) : 対応抗原は主に NE, PR3 が相当する) と核周辺型染色パターン (p-ANCA (perinuclear) : 対応抗原は主に MPO, HMGB1, LAMP-2 が相当する) に分類される (76, 164)、c-ANCA と p-ANCA として鑑別診断される。これら自己抗原は主要標的抗原と呼ばれる。ANCA は血管炎だけでなく SLE, RA の発症にも関与し、この場合、マイナー標的抗原としてディフェンシン、BPI, ラクトフェリン等が対応抗原とされる (171)。

以上、MPA を含む ANCA 関連は従来、何らかの炎症が原因で細胞から DNA とか細胞内蛋白質 (NE, MPO, PR3 等) が放出又は細胞表面に発現され細胞外環境において持続的に暴露されることで抗原として認識されてしまい、ANCA として自己抗体を誘導するとされてきた。これがなぜ、好中球成分に由来する自己抗体であるのか、或いは MPA 等の血管炎が発症するのかは長年謎であった。このような ANCA 関連血管炎の発症機序の説明として、ANCA-cytokine-sequence 説が提唱されてきた。すなわち、慢性炎症の過程において、①生産された ANCA は好中球に発現している対応抗原と反応し、好中球を活性化させる。②放出された対応抗原と ANCA が結合し、Fcγ-R を介して好中球を活性化させる。この炎症過程における、サイトカインと ANCA との増幅によるものであるとされてきたが、好中球の積極的な役割が十分解明されていなかった。

Sangaletti らは, NETs と反応させたミエロイド系樹状細胞をマウスに投与する事で MPO-ANCA が生産され, さらに血管炎が発症する事を証明した (154)。Kessenbrock らは *in vitro* で ANCA が NETs を誘導する事を示した。さらに MPA を発症した患者腎臓糸球体組織から免疫組織化学的な手法により NETs を検出し, AAV の原因が NETs である事を明らかにした (83)。ANCA は微小循環局所において, 単独又は ANCA 対応抗原複合体によって好中球表面の Fc レセプター, MPO, PR-3 等を介して結合し, 好中球を活性化させ NETosis を誘導する (42, 149)。この誘導の繰り返し病態をさらに増悪化させる事も動物モデルを含め明らかにされている (119)。これが ANCA-cytokine-NETs sequence 又は NET-vicious cycle (119) とも言うべき炎症増幅による負の連鎖であると言える (図 6)。

Kessenbrock らの報告以後, 糸球体腎炎では ANCA に限らず, このような NETs 障害が不可逆に進行し, 腎不全に至る経路が, 疾患発症の主要な機序の一つであると認識されてきている。

このように, ANCA の出現は, 核内や顆粒内, 或いは細胞質内の蛋白分子が NETs 成分として抗原提示され, 各々の成分に対する自己抗体が誘導された結果であるが, その誘導の機序はよくわかってはいない。

12. ETosis による新しい炎症理論のヒントを求めて

以上, 炎症反応と感染症・敗血症・自己免疫疾患・慢性炎症疾患との因果関係は NETs 形成を介して限りなく重なっている事を述べてきた。今後, 病態モデル・臨床上の疾患・細胞レベルでの NETosis の発生機序の追跡により NETs の炎症性疾患と自然免疫との関わりが一層明らかにされるであろう。とりわけ, NETs による自己抗原提示と自己抗体産生のメカニズムの解明は, 難治性疾患への治療のためには避けて通れないハードルである (87, 145)。

このような炎症性疾患に対して, 自然炎症という捉え方もできる (65, 113)。自然炎症とは, 外因性因子・内因性因子を含む DAMPs による炎症反応が軽微ではあるが慢性的に持続し, 最終的には宿主の臓器を廃絶させるという炎症性疾患発症に関する概念である。これに NETs を関連づけると, まず生体局所で感染等が原因で NETosis が誘導される。それが終息しないで慢性的に全身レベルで免疫寛容性の破綻が進行する。最終的には NETs が自己免疫疾患, 血管炎, 動脈硬化, 血栓形成, 糖尿病等を発症させるというシナリオまで拡張できる。

19 世紀にメチニコフは「kein Entzündung ohne Phagocyte (食細胞なしには炎症は起こらない)」とし, ファゴサイトーシスを基礎においた炎症理論を提出した。今後はファゴサイトーシスだけでなく貪食機能を持たない顆粒球による ETosis をも視野に入れた炎症理論を展開できる可能性がある。それによって, 治療困難な炎症性疾患の診断学的把握, 或いは NETs 形成を指標とした自己免疫疾患治療薬の開発への道が開かれるものと確信している。

表 2. 本文・図表に用いられている英語略記表

略語	正式名称
AAV	ANCA associated vasculitis
ACPA	Anti-citrullinated peptide antibody
AIH	Autoimmune hepatitis
ALI	Acute lung injury
AML	Acute myelogenous leukemia
ANCA	Antineutrophil cytoplasmic antibody
APC	Activated protein C
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BPI	Bactericidal/permeability-increasing protein
CGD	Chronic granulomatous disease
CF	Cystic fibrosis
CI-amidine	N- α -benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-l-ornithine amide
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CR3	Complement receptor-3
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DC	Dendritic cell
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DPI	Diphenylene iodonium
dsDNA	double-stranded DNA
DVT	Deep vein thrombosis
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fc γ R	Fc gamma receptor
FNGN	Focal necrotizing glomerulonephritis
G6-P	Glucose-6-phosphatase
GBM	Glomerular basement
gp91phox	gp91 phagocytic oxidase
GSR	Glutathione reductase
HIV	Human immunodeficiency virus
HMGB1	High mobility group box 1
HMP	Hexose monophosphate pathway
IFN- γ	Interferon- γ
LAMP-2	Lysosome-associated membrane protein 2
haemolytica Lkt	Mannheimia haemolytica leukotoxin
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichoic acid
LukGH	leukotoxin GH
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MHC	Major histocompatibility complex
Mit-ROS	Mitochondria-ROS
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MOF	Multiple organ failure
MPA	Microscopic polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
MRP14	Myeloid-related protein 14
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	Neutrophil elastase
NETs	Neutrophil extracellular traps
Nox	NADPH oxidase
PAD4	Peptidylarginine deiminase 4
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PICD	Phagocytosis-induced cell death
PLV	Panton-Valentine leukocidin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PR3	Proteinase 3
PRRs	Pattern recognition receptors
RA	Rheumatoid Arthritis
Raf	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
RAGE	Receptor for advanced glycation end-product
ROS	Reactive oxygen species
SF	Synovial fluid
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SLE	Systemic lupus erythematosus
SSCG2013	Surviving Sepsis Campaign guidelines 2013
TCA	Tricarboxylic acid
TLRs	Toll-like receptors
UC	Ulcerative colitis

謝 辞

本総説の中心課題である好中球による細胞死 (NETosis) を考察するにあたり、元大阪市立大学医学部第2生理学講座教授北川誠一先生には大変多くのご教示を頂きました。また、本総説を仕上げるにあたり、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科感染症制御学領域教授山崎伸二先生には丁寧に査読をして頂き、適切なコメントとアドバイスを頂きました。この場をおかりして深謝いたします。また、長年、敗血症領域の製品開発にむけて共に歩んできた扶桑薬品工業株式会社研究開発センター研究員井上慎一氏のサポートに感謝いたします。最後に、本論文投稿の機会を頂きました同機器診断薬部門長鈴木章夫氏に厚くお礼申し上げます。

発表内容に関連し、開示すべき COI 関係にある企業などはない。

文 献

- Abdulahad, D.A., Westra, J., Bijzet, J., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., Bijl, M. (2011): High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Therapy*. **13**, R71.
- Achouiti, A., Vogl, T., Urban, C.F., Röhm, M., Hommes, T.J., van Zoelen, M.A., Florquin, S., Roth, J., van't Veer, C., de Vos, A.F., van der Poll, T. (2012): Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in gram-negative pneumonia derived sepsis. *PLoS Pathog.* **8**, e1002987.
- Akong-Moore, K., Chow, O.A., von Köckritz-Blickwede, M., Nizet, V. (2012): Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS One* **7**, e42984.
- Ammollo, C.T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N.L., Esmon, C.T. (2011): Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 1795–1803.
- Ang, C.W., Jacobs, B.C., Laman, J.D. (2004): The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* **25**, 61–66.
- Aulik, N.A., Hellenbrand, K.M., Czubrynski, C.J. (2012): Mannheimia haemolytica and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infect. Immun.* **80**, 1923–1933.
- Barrientos, L., Marin-Esteban, V., de Chaisemartin, L., Le-Moal, V.L., Sandré, C., Bianchini, E., Nicolas, V., Pallardy, M., Chollet-Martin, S. (2013): An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* **4**, 166.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., Henriques-Normark, B. (2006): An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* **16**, 401–407.
- Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T.J., Abraham, S.N., Shapiro, S.D. (1998): Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* **4**, 615–618.
- Berends, E.T., Horswill, A.R., Haste, N.M., Monestier, M., Nizet, V., von Köckritz-Blickwede, M. (2010): Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate. Immun.* **2**, 576–586.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T. (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 99–109.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R.A., Zychlinsky, A., Reichenbach, J. (2009): Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* **114**, 2619–2622.
- Bianchi, M., Niemiec, M.J., Siler, U., Urban, C.F., Reichenbach, J. (2011): Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1243–1252.
- Borregaard, N. (2010): Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–670.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., Papayannopoulos, V. (2014): Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* **15**, 1017–1025.
- Branzk, N., Papayannopoulos, V. (2013): Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin. Immunopathol.* **35**, 513–530.
- Brill, A., Fuchs, T.A., Savchenko, A.S., Thomas, G.M., Martinod, K., De Meyer, S.F., Bhandari, A.A., Wagner, D.D. (2012): Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J. Tromb. Haemost.* **10**, 136–144.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535.
- Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007): Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 577–582.
- Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2012): Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* **198**, 773–783.
- Bruns, S., Kniemeyer, O., Hasenberg, M., Aimaniananda, V., Nietzsche, S., Thywissen, A., Jeron, A., Latgé, J.P., Brakhage, A.A., Gunzer, M. (2010): Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* **6**, e1000873.
- Buchanan, J.T., Simpson, A.J., Aziz, R.K., Liu, G.Y., Kristian, S.A., Kotb, M., Feramisco, J., Nizet, V. (2006): DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* **16**, 396–400.
- Byrd, A.S., O'Brien, X.M., Johnson, C.M., Lavigne, L.M., Reichner, J.S. (2013): An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Immunol.* **190**, 4136–4148.
- Carlin, A.F., Uchiyama, S., Chang, Y.C., Lewis, A.L., Nizet, V., Varki, A. (2009): Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**, 3333–3336.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A. (2012): Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe* **11**, 447–456.
- Chow, O.A., von Köckritz-Blickwede, M., Bright, A.T., Hensler, M.E., Zinkernagel, A.S., Cogen, A.L., Gallo, R.L., Monestier, M., Wang, Y., Glass, C.K., Nizet, V. (2010): Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe* **8**, 445–454.
- Chumanevich, A.A., Causey, C.P., Knuckley, B.A., Jones, J.E., Poudyal, D., Chumanevich, A.P., Davis, T., Matesic, L.E.,

- Thompson, P.R., Hofseth, L.J. (2011): Suppression of colitis in mice by Cl-amidine: a novel peptidylarginine deiminase inhibitor. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G929–G938.
- 28) Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoey, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercos, E., Devinney, R., Doig, C.J., Green, F.H., Kubes, P. (2007): Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463–469.
 - 29) Cookson, B.T., Brennan, M.A. (2001): Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* **9**, 113–114.
 - 30) Csernok, E. (2003): Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and pathogenesis of small vessel vasculitides. *Autoimmun. Rev.* **2**, 158–164.
 - 31) Dang, P.M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O.N., Gougerot-Pocidalo, M.A., El-Benna, J. (2006): A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **116**, 2033–2043.
 - 32) Davidson-Moncada, J.K., Lopez-Lluch, G., Segal, A.W., Dekker, L.V. (2009): Involvement of protein kinase D in Fc gamma-receptor activation of the NADPH oxidase in neutrophils. *Biochem. J.* **363**, 95–103.
 - 33) Dellinger, R.P., Levy, M.M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S.M., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Douglas, I.S., Jaeschke, R., Osborn, T.M., Nunnally, M.E., Townsend, S.R., Reinhart, K., Kleinpell, R.M., Angus, D.C., Deutschman, C.S., Machado, F.R., Rubenfeld, G.D., Webb, S., Beale, R.J., Vincent, J.L., Moreno, R. (2013): Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* **39**, 165–228.
 - 34) Doria, A., Canova, M., Tonon, M., Zen, M., Rampudda, E., Bassi, N., Atzeni, F., Zampieri, S., Ghirardello, A. (2008): Infections as triggers and complications of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* **8**, 24–28.
 - 35) Douda, D.N., Jackson, R., Grasmann, H., Palaniyar, N. (2011): Innate immune collectin surfactant protein D simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping. *J. Immunol.* **187**, 1856–1865.
 - 36) Dupre-Crochet, S., Erard, M., Nube, O. (2013): ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.* **94**, 657–670.
 - 37) El-Benna, J., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A. (2008): Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol.* **30**, 279–289.
 - 38) Ellett, F., Jorgensen, J., Frydman, G.H., Jones, C.N., Irimia, D. (2017): Neutrophil Interactions Stimulate Evasive Hyphal Branching by *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **13**, e1006154.
 - 39) Ermert, D., Zychlinsky, A., Urban, C. (2009): Fungal and bacterial killing by neutrophils. *Methods Mol. Biol.* **470**, 293–312.
 - 40) Esaguy, N., Aguas, A.P., Vilanova, M., Silva, M.T. (1991): Activation of human neutrophils by phorbol ester decreases the cytoplasm compactness and the lactoferrin content of the granulocytes. *J. Leukoc. Biol.* **199**, 444–452.
 - 41) Faden, H.S. (1976): Early diagnosis of neonatal bacteremia by buffy-coat examination. *J. Pediatr.* **88**, 1032–1034.
 - 42) Falk, R.J., Terrell, R.S., Charles, L.A., Jennette, J.C. (1990): Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4115–4119.
 - 43) Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M. (1998): Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med.* **187**, 903–915.
 - 44) Fife, A., Hill, D., Barton, C., Burden, P. (1994): Gram negative septicemia diagnosed on peripheral blood smear appearances. *J. Clin. Pathol.* **47**, 82–84.
 - 45) Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241.
 - 46) Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Jr. Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., Wagner, D.D. (2010): Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 15880–15885.
 - 47) Gando, S., Otomo, Y. (2015): Local hemostasis, immunothrombosis, and systemic disseminated intravascular coagulation in trauma and traumatic shock. *Crit. Care* **19**, 72.
 - 48) Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., Barrat, F.J., Banchereau, J., Pascual, V. (2011): Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**, 73.
 - 49) Gazendam, R.P., van Hamme, J.L., Tool, A.T., Hoogenboezem, M., van den Berg, J.M., Prins, J.M., Vitkov, L., van de Veerdonk, F.L., van den Berg, T.K., Roos, D., Kuijpers, T.W. (2016): Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *J. Immunol.* **196**, 1272–1283.
 - 50) Gazendam, R.P., van Hamme, J.L., Tool, A.T., van Houdt, M., Verkuijlen, P.J., Herbst, M., Liese, J.G., van de Veerdonk, F.L., Roos, D., van den Berg, T.K., Kuijpers, T.W. (2014): Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. *Blood* **124**, 590–597.
 - 51) Gentile, L.F., Moldawer, L.L. (2013): DAMPs, PAMPs and the origins of SIRS in bacterial sepsis. *Shock* **39**, 113–114.
 - 52) Goldmann, O., Medina, E. (2012): The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front. Immunol.* **3**, 420.
 - 53) Goldstein, R.S., Bruchfeld, A., Yang, L., Qureshi, A.R., Gallowitsch-Puerta, M., Patel, N.B., Huston, B.J., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Gregersen, P.K., Czura, C.J., Sloan, R.P., Sama, A.E., Tracey, K.J. (2007): Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and high mobility group box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Mol. Med.* **13**, 210–215.
 - 54) Golstein, P., Kroemer, G. (2007): Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 37–43.
 - 55) Goodall, H.B. (1982): Evaluation of buffy coat microscopy for the early diagnosis of bacteraemia-meningococcal septicemia. *J. Clin. Pathol.* **35**, 691–692.
 - 56) Gupta, A.K., Hasler, P., Holzgreve, W., Hahn, S. (2007): Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Semin. Immunopathol.* **29**, 163–167.
 - 57) Hakkim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., Waldmann, H. (2011): Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 75–77.
 - 58) Hakkim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., Zychlinsky, A. (2010): Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 9813–9818.

- 59) Halverson, T.W.R., Wilton, M., Poon, K.K.H., Petri, B., Lewenza, S. (2015): DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* **11**, e1004593.
- 60) Harbeck, R.J., Bardana, E.J., Kohler, P.F., Carr, R.I. (1973): DNA: anti-DNA complexes: their detection in systemic lupus erythematosus sera. *J. Clin. Invest.* **52**, 789–795.
- 61) Harbeck, R.J., Hoffmann, A.A., Carr, R.I. (1975): Studies on the nature of circulating DNA in systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Rheumatol.* **2**, 194–203.
- 62) Harris, H.E., Andersson, U., Pisetsky, D.S. (2012): HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 195–202.
- 63) Harris, H.E., Rauti, A. (2006): Alarmin (g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep.* **7**, 774–778.
- 64) Harrison, C. (2010): Sepsis: calming the cytokine storm. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 360–361.
- 65) Headland, S.E., Norling, L.V. (2015): The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin. Immunol.* **27**, 149–160.
- 66) Heyworth, P.G., Cross, A.R., Curnutte, J.T. (2003): Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 578–584.
- 67) Huang, H., Tohme, S., Al-Khafaji, A.B., Tai, S., Loughran, P., Chen, L., Wang, S., Kim, J., Billiar, T., Wang, Y., Tsung, A. (2015): Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology* **62**, 600–614.
- 68) Ito, T. (2014): PAMPs and DAMPs as trigger for DIC. *J. Intensive Care* **2**, 67.
- 69) Jenne, C.N., Wong, C.H., Zemp, F.J., McDonald, B., Rahman, M.M., Forsyth, P.A., McFadden, G., Kubes, P. (2013): Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* **13**, 169–180.
- 70) Jennette, J.C., Falk, R.J. (2014): Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 463–473.
- 71) Jennette, J.C., Falk, R.J., Bacon, P.A., Basu, N., Cid, M.C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L.F., Gross, W.L., Guillevin, L., Hagen, E.C., Hoffman, G.S., Jayne, D.R., Kallenberg, C.G., Lamprecht, P., Langford, C.A., Luqmani, R.A., Mahr, A.D., Matteson, E.L., Merkel, P.A., Ozen, S., Pusey, C.D., Rasmussen, N., Rees, A.J., Scott, D.G., Specks, U., Stone, J.H., Takahashi, K., Watts, R.A. (2013): 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* **65**, 1–11.
- 72) Jennette, J.C., Thomas, D.B. (2001): Crescentic glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **16**, 80–82.
- 73) Jerk, U., Rolle, S., Purfurst, B., Luft, F.C., Nauseef, W.M., Kettritz, R. (2013): $\beta 2$ Integrin-mediated cell-cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 12910–12919.
- 74) Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., Krysko, D.V. (2013): Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* **38**, 209–223.
- 75) Kain, R., Exner, M., Brandes, R., Ziehermayr, R., Cunningham, D., Alderson, C.A., Davidovits, A., Raab, I., Jahn, R., Ashour, O., Spitzauer, S., Sunder-Plassmann, G., Fukuda, M., Klemm, P., Rees, A.J., Kerjaschki, D. (2008): Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat. Med.* **14**, 1088–1096.
- 76) Kain, R., Matsui, K., Exner, M., Binder, S., Schaffner, G., Sommer, E.M., Kerjaschki, D. (1995): A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *J. Exp. Med.* **181**, 585–597.
- 77) Kallenberg, C.G., Tadema, H. (2008): Vasculitis and infections: contribution to the issue of autoimmunity reviews devoted to “autoimmunity and infection”. *Autoimmun. Rev.* **8**, 29–32.
- 78) Kaplan, M.J. (2011): Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 691–699.
- 79) Kawasaki, H., Iwamuro, S. (2008): Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug Targets* **8**, 195–205.
- 80) Kazzaz, N.M., Sule, G., Knight, J.S. (2016): Intercellular Interactions as Regulators of NETosis. *Front Immunol.* **7**, 453.
- 81) Kennedy, A.D., DeLeo, F.R. (2009): Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* **43**, 25–61.
- 82) Keshari, R.S., Verma, A., Barthwal, M.K., Dikshit, M. (2013): Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J. Cell Biochem.* **114**, 532–540.
- 83) Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönermarck, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Gröne, H.J., Brinkmann, V., Jenne, D.E. (2009): Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* **15**, 623–625.
- 84) Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D.A., Pennathur, S., Kaplan, M.J. (2013): NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5**, 178ra40.
- 85) Khatua, B., Bhattacharya, K., Mandal, C. (2012): Sialoglycoproteins adsorbed by *Pseudomonas aeruginosa* facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 641–655.
- 86) Kirchner, T., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., Behnen, M. (2012): The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm.* **2012**, 849136.
- 87) Knight, J.S., Carmona-Rivera, C., Kaplan, M.J. (2012): Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* **3**, 380.
- 88) Knight, J.S., Zhao, W., Luo, W., Subramanian, V., O'Dell, A.A., Yalavarthi, S., Hodgins, J.B., Eitzman, D.T., Thompson, P.R., Kaplan, M.J. (2013): Peptidyl arginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J. Clin. Invest.* **123**, 2981–2993.
- 89) Koenig, K.F., Kalbermatter, S.A., Menter, T., Mayr, M., Kiss, D. (2014): Rapidly progressive lupus nephritis with extremely high levels of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Case Rep. Nephrol. Urol.* **4**, 5–11.
- 90) Kornberg, R.D., Lorch, Y. (1999): Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285–294.
- 91) Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciardi, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y.J., Gilliet, M. (2011): Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**, 73.
- 92) Lauth, X., von Köckritz-Blickwede, M., McNamara, C.W., Myskowski, S., Zinkernagel, A.S., Beall, B., Ghosh, P., Gallo, R.L., Nizet, V. (2009): M1 protein allows group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin

- inhibition. *J. Innate. Immun.* **1**, 202–214.
- 93) Lee, W.L., Grinstein, S. (2004): Immunology. The tangled webs that neutrophils weave. *Science* **303**, 1477–1478.
 - 94) Leentjens, J., Kox, M., van der Hoeven, J.G., Netea, M.G., Pickkers, P. (2013): Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1287–1293.
 - 95) Lehner, J., Wittwer, C., Fersching, D., Siegele, B., Holdenrieder, S., Stoetzer, O.J. (2012): Methodological and preanalytical evaluation of an HMGB 1 immunoassay. *Anticancer Res.* **32**, 2059–2062.
 - 96) Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X.A., Santy, L., Wang, Y. (2012): PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* **3**, 307.
 - 97) Levi, M., Schultz, M., van der Poll, T. (2013): Sepsis and thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* **39**, 559–566.
 - 98) Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., Wang, Y. (2010): PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **207**, 1853–1862.
 - 99) Luger, K., Richmond, T.J. (1998): DNA binding within the nucleosome core. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 33–40.
 - 100) Lukasova, E., Koristek, Z., Klabusay, M., Ondrej, V., Grigoryev, S., Bacikova, M., Falk, M., Vavrova, J., Kohutova, V., Kozubek, S. (2013): Granulocyte maturation determines ability to release chromatin NETs and loss of DNA damage response; these properties are absent in immature AML granulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 767–779.
 - 101) Magna, M., Pisetsky, D.S. (2014): The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Mol. Med.* **20**, 138–146.
 - 102) Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Freedman, B., Dorward, D.W., DeLeo, F.R. (2013): *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* **191**, 6022–6029.
 - 103) Mangat, P., Wegner, N., Venables, P.J., Potempa, J. (2010): Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* **12**, 209.
 - 104) Margraf, S., Lögters, T., Reipen, J., Altrichter, J., Scholz, M., Windolf, J. (2008): Neutrophil-derived circulating Free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock* **30**, 352–358.
 - 105) Martínez Valle, F., Balada, E., Ordi-Ros, J., Vilardell-Tarres, M. (2008): DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* **7**, 359–363.
 - 106) Martinod, K., Witsch, T., Arley, K., Gallant, M., Remold-ODonnel, E., Wagner, D.D. (2016): Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 551–558.
 - 107) Maugeri, N., Campana, L., Gavina, M., Covino, C., De Metrio, M., Panciroli, C., Maiuri, L., Maseri, A., D'Angelo, A., Bianchi, M.E., Rovere-Querini, P., Manfredi, A.A. (2014): Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 2074–2088.
 - 108) McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., Heesemann, J., Ebel, F. (2010): NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* **12**, 928–936.
 - 109) McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., Kubes, P. (2012): Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **12**, 324–333.
 - 110) McEver, R.P. (2010): Rolling back neutrophil adhesion. *Nat. Immunol.* **11**, 282–284.
 - 111) Mestas, J., Hughes, C.C. (2008): Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738.
 - 112) Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., Papayannopoulos, V. (2014): A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* **8**, 883–896.
 - 113) Miyake, K., Kaisho, T. (2014): Homeostatic inflammation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **30**, 85–90.
 - 114) Mohan, C., Adams, S., Stanik, V., Datta, S.K. (1993): Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J. Exp. Med.* **177**, 1367–1381.
 - 115) Nakashima, K., Hagiwara, T., Yamada, M. (2002): Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 49562–49568.
 - 116) Nakayama, T., Saitoh, H. (2015): Tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap (NET)-like structures in cultured human myeloid cell lines. *Cell Biol. Int.* **39**, 355–359.
 - 117) Nakayama, T., Saitoh, N., Morotomi-Yano, K., Yano, K., Nakao, M., Saitoh, H. (2016): Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like cell death in cultured human leukemia cells. *Cell Biol. Int.* **40**, 597–602.
 - 118) Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T., Ishizu, A. (2014): Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 990–997.
 - 119) Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M., Ishizu, A. (2012): Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* **64**, 3779–3787.
 - 120) Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., Mörry, T. (2000): Features of systemic lupus erythematosus in DNase1-deficient mice. *Nat. Genet.* **25**, 177–181.
 - 121) Nicodeme, E., Jeffrey, K.L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C.W., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C.M., Lora, J.M., Prinjha, R.K., Lee, K., Tarakhovsky, A. (2010): Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* **468**, 1119–1123.
 - 122) Obermayer, A., Stoiber, W., Krautgartner, W.D., Klappacher, M., Kofler, B., Steinbacher, P., Vitkov, L., Grabcanovic-Musija, F., Studnicka, M. (2014): New aspects on the structure of neutrophil extracellular traps from chronic obstructive pulmonary disease and in vitro generation. *PLoS One* **9**, e97784.
 - 123) O'Brien, X.M., Reichner, J.S. (2016): Neutrophil Integrins and Matrix Ligands and NET Release. *Front. Immunol.* **7**, 363.
 - 124) Oda, S., Aibiki, M., Ikeda, T., Imaizumi, H., Endo, S., Ochiai, R., Kotani, J., Shime, N., Nishida, O., Noguchi, T., Matsuda, N., Hirasawa, H. (2014): The Japanese guidelines for the management of sepsis. *J. Intensive Care* **2**, 55.
 - 125) Ohta, H., Sweeney, E.A., Masamune, A., Yatomi, Y., Hakomori, S., Igarashi, Y. (1995): Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells: a possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation. *Cancer Res.* **55**, 691–697.
 - 126) Okui, A., Horiuchi, Y., Yamamoto, S., Matsuhisa, A. (2015):

- Characteristic feature of ssODNs that induces neutrophil NETosis with high specificity. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.
- 127) Okui, A., Horiuchi, Y., Yamamoto, S., Matsuhisa, A. (2016): Mechanism of highly specific ssODNs-induced neutrophil NETosis. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.
 - 128) Olins, A.L., Hoang, T.V., Zwerger, M., Herrmann, H., Zentgraf, H., Noegel, A.A., Karakesisoglou, I., Hodzic, D., Olins, D.E. (2009): The LINC-less granulocyte nucleus. *Eur. J. Cell Biol.* **88**, 203–214.
 - 129) Olins, A.L., Zwerger, M., Herrmann, H., Zentgraf, H., Simon, A.J., Monestier, M., Olins, D.E. (2008): The human granulocyte nucleus: unusual nuclear envelop and hetrochromachin composition. *Eur. J. Cell Biol.* **87**, 279–290.
 - 130) Palmer, L.J., Cooper, P.R., Ling, M.R., Wright, H.J., Huissoon, A., Chapple, I.L. (2012): Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin. Exp. Immunol.* **167**, 261–268.
 - 131) Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkin, A., Zychlinsky, A. (2010): Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **191**, 677–691.
 - 132) Papayannopoulos, V., Staab, D., Zychlinsky, A. (2011): Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One* **6**, e28526.
 - 133) Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A. (2009): NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* **30**, 513–521.
 - 134) Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (2012): Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 841–849.
 - 135) Parker, H., Winterbourn, C.C. (2013): Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* **3**, 424.
 - 136) Partrick, D.A., Moore, F.A., Moore, E.E., Barnett, C.C. Jr, Silliman, C.C. (1996): Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz.* **4**, 194–210.
 - 137) Patel, S., Kumar, S., Jyoti, A., Srinag, B.S., Keshari, R.S., Saluja, R., Verma, A., Mitra, K., Barthwal, M.K., Krishnamurthy, H., Bajpai, V.K., Dikshit, M. (2010): Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide* **22**, 226–234.
 - 138) Pendergraft, W.F. 3rd., Preston, G.A., Shah, R.R., Tropsha, A., Carter, C.W. Jr., Jennette, J.C., Falk, R.J. (2004): Autoimmunity is triggered by cPR-3 (105–201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat. Med.* **10**, 72–79.
 - 139) Pham, C.T.N. (2006): Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Immunol. Rev.* **6**, 541–550.
 - 140) Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, M.G., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P. (2010): A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **185**, 7413–7425.
 - 141) Pliyev, B.K., Dimitrieva, T.V., Savchenko, V.G. (2015): Cytokine-mediated induction of MHC class II in human neutrophils is dependent on NADPH oxidase activity. *Eur. J. Cell Biol.* **94**, 67–70.
 - 142) Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D.M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J.B., Serrano, S., Lorente, J.A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., Alameda, F., Baró, T., de Heredia, C.D., Torán, N., Català, A., Torrealadell, M., Fortuny, C., Cusí, V., Carreras, C., Diaz, G.A., Blander, J.M., Farber, C.M., Silvestri, G., Cunningham-Rundles, C., Calvillo, M., Dufour, C., Notarangelo, L.D., Lougaris, V., Plebani, A., Casanova, J.L., Ganai, S.C., Diefenbach, A., Aróstegui, J.I., Juan, M., Yagüe, J., Mahlaoui, N., Donadieu, J., Chen, K., Cerutti, A. (2011): B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* **13**, 170–180.
 - 143) Pullerits, R., Urbonaviciute, V., Voll, R.E., Forsblad-D’Elia, H., Carlsten, H. (2011): Serum levels of HMGB1 in postmenopausal patients with rheumatoid arthritis: associations with proinflammatory cytokines, acute-phase reactants, and clinical disease characteristics. *J. Rheumatol.* **38**, 1523–1525.
 - 144) Rada, B., Leto, T.L. (2008): Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib. Microbiol.* **15**, 164–187.
 - 145) Rarok, A.A., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G. (2003): Neutrophil-activating potential of antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 3–15.
 - 146) Remijsen, Q., Kuijpers, T.W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T. (2011): Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* **18**, 581–588.
 - 147) Remijsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., Vandenabeele, P. (2011): Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* **21**, 290–304.
 - 148) Reth, M. (2002): Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* **3**, 1129–1134.
 - 149) Reumaux, D., Vossebeld, P.J., Roos, D., Verhoeven, A.J. (1995): Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* **86**, 3189–3195.
 - 150) Rittirsch, D., Flierl, M.A., Ward, P.A. (2008): Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 776–787.
 - 151) Rohrbach, A.S., Slade, D.J., Thompson, P.R., Mowen, K.A. (2012): Activation of PAD4 in NET formation. *Front. Immunol.* **3**, 360.
 - 152) Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S.P., Lohmeyer, J., Preissner, K.T. (2012): Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* **7**, e32366.
 - 153) Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Akira, S. (2012): Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**, 109–116.
 - 154) Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarnotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., Piconese, S., Parenza, M., Guiducci, C., Vitali, C., Colombo, M.P. (2012): Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* **120**, 3007–3018.
 - 155) Schauer, C., Janko, C., Munoz, L.E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., Frey, B., Lell, M., Manger, B., Rech, J., Naschberger, E., Holmdahl, R., Krenn, V., Harrer, T., Jeremic, I., Bilyy, R., Schett, G., Hoffmann, M., Herrmann, M. (2014): Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* **20**, 511–517.
 - 156) Schellekens, G.A., Visser, H., de Jong, B.A., van den Hoogen,

- F.H., Hazes, J.M., Breedveld, F.C., van Venrooij, W.J. (2000): The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* **43**, 155–163.
- 157) Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. (2011): Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 30–38.
- 158) Schorn, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., Herrmann, M. (2012): Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.* **3**, 277.
- 159) Seeley, E.J., Matthay, M.A., Wolters, P.J. (2012): Infection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **303**, L355–L363.
- 160) Semeraro, F., Ammollo, C.T., Morrissey, J.H., Dale, G.L., Friese, P., Esmon, N.L., Esmon, C.T. (2011): Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* **118**, 1952–1961.
- 161) Sfriso, P., Ghirardello, A., Botsios, C., Tonon, M., Zen, M., Bassi, N., Bassetto, F., Doria, A. (2010): Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 385–395.
- 162) Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J., Banerjee, A., Silliman, C.C. (2005): Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1025–1042.
- 163) Slaba, I., Wang, J., Kolaczowska, E., McDonald, B., Lee, W.Y., Kubes, P. (2015): Imaging the dynamic platelet-neutrophil response in sterile liver injury and repair in mice. *Hepatology* **62**, 1593–1605.
- 164) Sobajima, J., Ozaki, S., Uesugi, H., Osakada, F., Inoue, M., Fukuda, Y., Shirakawa, H., Yoshida, M., Rokuhara, A., Imai, H., Kiyosawa, K., Nakao, K. (1999): High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* **44**, 867–873.
- 165) Stakos, D.A., Kambas, K., Konstantinidis, T., Mitroulis, I., Apostolidou, E., Arelaki, S., Tsironidou, V., Giatromanolaki, A., Skendros, P., Konstantinides, S., Ritis, K. (2015): Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **36**, 1405–1414.
- 166) Stark, K., Philippi, V., Stockhausen, S., Busse, J., Antonelli, A., Miller, M., Schubert, I., Hoseinpour, P., Chandraratne, S., von Brühl, M.L., Gaertner, F., Lorenz, M., Agresti, A., Coletti, R., Antoine, D.J., Heermann, R., Jung, K., Reese, S., Laitinen, I., Schwaiger, M., Walch, A., Sperandio, M., Nawroth, P.P., Reinhardt, C., Jäckel, S., Bianchi, M.E., Massberg, S. (2016): Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood* **128**, 2435–2449.
- 167) Stoiber, W., Obermayer, A., Steinbacher, P., Krautgartner, W.D. (2015): The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules* **5**, 702–723.
- 168) Tadić, J.M., Bae, H.B., Banerjee, S., Zmijewski, J.W., Abraham, E. (2012): Differential activation of RAGE by HMGB1 modulates neutrophil-associated NADPH oxidase activity and bacterial killing. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C249–C256.
- 169) Tadie, J.M., Bae, H.B., Jiang, S., Park, D.W., Bell, C.P., Yang, H., Pittet, J.F., Tracey, K., Thannickal, V.J., Abraham, E., Zmijewski, J.W. (2013): HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll like receptor 4. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **304**, L342–L349.
- 170) Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., Sendo, F. (1996): Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 229–240.
- 171) Talor, M.V., Stone, J.H., Stebbing, J., Barin, J., Rose, N.R., Burek, C.L. (2007): Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clin. Exp. Immunol.* **150**, 42–48.
- 172) Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., Sospedra, M. (2012): T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* **188**, 3150–3159.
- 173) Tonnesen, M.G. (1989): Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J. Invest. Dermatol.* **93**, 53S–58S.
- 174) Tsan, M.F. (1980): Phorbol myristate acetate induced neutrophil autotoxicity. *J. Cell Physiol.* **105**, 327–334.
- 175) Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D.N., Suzuki, F. (2004): Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* **21**, 215–226.
- 176) Tull, S.P., Bevins, A., Kuravi, S.J., Satchell, S.C., Al-Ani, B., Young, S.P., Harper, L., Williams, J.M., Rainger, G.E., Savage, C.O. (2012): PR3 and elastase after PAR1 signaling and trigger vWF release via a calcium-independent mechanism from glomerular endothelial cells. *PLoS One* **7**, e43916.
- 177) Ueki, S., Melo, R.C., Ghiran, I., Spencer, L.A., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (2013): Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* **121**, 2074–2083.
- 178) Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., Zychlinsky, A. (2009): Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000639.
- 179) Urban, C.F., Lourido, S., Zychlinsky, A. (2006): How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol.* **8**, 1687–1696.
- 180) Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006): Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* **8**, 668–676.
- 181) Urbonaviciute, V., Fürnrohr, B.G., Weber, C., Haslbeck, M., Wilhelm, S., Herrmann, M., Voll, R.E. (2007): Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 67–74.
- 182) Villalta, D., Tozzoli, R., Tonutti, E., Bizzaro, N. (2007): The laboratory approach to the diagnosis of autoimmune diseases: is it time to change? *Autoimmun. Rev.* **6**, 359–365.
- 183) Vitkov, L., Klappacher, M., Hannig, M., Krautgartner, W.D. (2009): Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J. Periodontol. Res.* **44**, 664–672.
- 184) von Köckritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., Medina, E. (2008): Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular formation. *Blood* **111**, 3070–3080.
- 185) von Köckritz-Blickwede, M., Nizet, V. (2009): Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J. Mol. Med.* **87**, 775–783.
- 186) Walker, M.J., Hollands, A., Sanderson-Smith, M.L., Cole, J.N., Kirk, J.K., Henningham, A., McArthur, J.D., Dinkla, K., Aziz, R.K., Kansal, R.G., Simpson, A.J., Buchanan, J.T., Chhatwal, G.S., Kotb, M., Nizet, V. (2007): DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection.

- Nat. Med. **13**, 981–985.
- 187) Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A., Tracey, K.J. (1999): HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**, 248–251.
 - 188) Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., Allis, C.D., Coonrod, S.A. (2009): Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **184**, 205–213.
 - 189) Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2007): Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* **9**, 1162–1171.
 - 190) Wartha, F., Beiter, K., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2007): Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 52–56.
 - 191) Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S.D., Weiss, J., Zychlinsky, A. (2002): Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417**, 91–94.
 - 192) Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. (2013): Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox. Signal.* **18**, 642–660.
 - 193) Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., Hampton, M.B. (2016): Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 765–792.
 - 194) Wong, S.L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A.B., Kahn, C.R., Wagner, D.D. (2015): Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis which severely impairs wound healing. *Nat. Med.* **21**, 815–819.
 - 195) Xiao, W., Mindrinos, M.N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A.G., Gao, H., Hayden, D.L., Hennessy, L., Moore, E.E., Minei, J.P., Bankey, P.E., Johnson, J.L., Sperry, J., Nathens, A.B., Billiar, T.R., West, M.A., Brownstein, B.H., Mason, P.H., Baker, H.V., Finnerty, C.C., Jeschke, M.G., López, M.C., Klein, M.B., Gamelli, R.L., Gibran, N.S., Arnoldo, B., Xu, W., Zhang, Y., Calvano, S.E., McDonald-Smith, G.P., Schoenfeld, D.A., Storey, J.D., Cobb, J.P., Warren, H.S., Moldawer, L.L., Herndon, D.N., Lowry, S.F., Maier, R.V., Davis, R.W., Tompkins, R.G. (2011): A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2581–2590.
 - 196) Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F., Esmon, C.T. (2009): Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* **15**, 1318–1321.
 - 197) Yan, J., Meng, X., Wancket, L.M., Lintner, K., Nelin, L.D., Chen, B., Francis, K.P., Smith, C.V., Rogers, L.K., Liu, Y. (2012): Glutathione reductase facilitates host defense by sustaining phagocytic oxidative burst and promoting the development of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* **188**, 2316–2327.
 - 198) Yang, Y., Jiang, G., Zhang, P., Fan, J. (2015): Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.* **19**, 12.
 - 199) Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., Kuroda, Y. (2001): Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* **28**, 313–314.
 - 200) Yipp, B.G., Kubes, P. (2013): NETosis: how vital is it? *Blood* **122**, 2784–2794.
 - 201) Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., Malawista, S.E., de Boisleury Cheavance, A., Zhang, K., Conly, J., Kubes, P. (2012): Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**, 1386–1393.
 - 202) Yost, C.C., Cody, M.J., Harris, E.S., Thornton, N.L., McInturff, A.M., Martinez, M.L., Chandler, N.B., Rodesch, C.K., Albertine, K.H., Petti, C.A., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A. (2009): Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood* **113**, 6419–6427.
 - 203) Yousefi, S., Gold, J.A., Andina, N., Lee, J.J., Kelly, A.M., Kozlowski, E., Schmid, I., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G.J., Simon, H.U. (2008): Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat. Med.* **14**, 949–953.
 - 204) Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., Simon, H.U. (2009): Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* **16**, 1438–1444.
 - 205) Yousefi, S., Simon, D., Simon, H.U. (2012): Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 736–739.
 - 206) Yuki, N. (2007): Ganglioside mimicry and peripheral nerve disease. *Muscle Nerve* **35**, 691–711.
 - 207) Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S., Miyatake, T. (2005): A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* **178**, 1771–1775.
 - 208) Zarbock, A., Ley, K., Rodger, K.L., McEver, R.P., Hidalgo, A. (2011): Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743–6751.
 - 209) Zawrotniak, M., Rapala-Kozik, M. (2013): Neutrophil extracellular traps (NETs)-formation and implications. *Acta Biochim. Pol.* **60**, 277–284.
 - 210) Zenaro, E., Pietronigro, E., Bianca, V.D., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., Montresor, A., Carlucci, T., Nani, S., Tosadori, G., Calciano, L., Catalucci, D., Berton, G., Bonetti, B., Constantin, G. (2014): Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat. Med.* **21**, 880–886.
 - 211) Zhao, W., Fogg, D.K., Kaplan, M.J. (2015): A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J. Immunol. Methods* **423**, 104–110.

Viewing sepsis and autoimmune disease in relation with infection and NETs-formation

Akio MATSUHISA¹, Akira OKUI² and Yoshiyuki HORIUCHI²

¹*Medical Device & Diagnostic Dept., Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.*

²*Research & Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.*

Neutrophil has been widely recognized as body's first line of defence against pathogens. NETosis was first reported in 2004 as a programmed cell death of neutrophil and distinguished from apoptosis and necrosis. This phenomenon has been already observed in both basic and clinical research. NETosis is induced by various stimulants such as PMA, IL-8, DAMPs/PAMPs, bacteria, and antigen-antibody complex including self-antibody such as ANCA. It is known that there are two types of NETosis following bacterial infections. Although both of them have the ability to capture and kill bacteria, they also damage the host tissues. The inhibition of the NETs-related enzymes prevents the NETs formation at that time. The production of O_2^- from respiratory burst of neutrophils triggers NETs formation. In the first type of NETosis, neutrophils are completely collapsed, while in the second type, they maintain the morphology and the ability of phagocytosis. However, bacteria can escape from NETs by degrading NETs with their secreting nucleases. Thus the animal models of infection, using these bacteria, oftentimes suffer from severe infectious diseases. Human CGD (Chronic Granulomatosis Disease) patients who do not have Nox2 are immunocompromised, and highly susceptible to infection due to the defect of NETs formation. On the other hand, SLE patients are unable to break down the NETs as their serum inhibits the DNase1 activity, which results in autoantibody generation against NETs as well as self-DNA. It is getting clear that there is a relationship between inflammatory diseases, including infectious diseases, Sepsis and autoimmune diseases, and NETs. Therefore, it is important to re-evaluate the inflammatory disorders from NETs' perspective, and to incorporate the emerging concepts for better understanding the mechanisms involved.