



【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- ・ [診療ガイドライン](#)
- ・ [研修医のお役立ち論文コンテンツ](#)
- ・ [用語集](#)

本編は次ページより掲載しております。

好中球が関与する凝固の活性化と血栓形成

射場敏明*

The role of neutrophil in activation of coagulation and thrombus formation

Toshiaki IBA

要約：近年、毛細血管内や組織中で生じる微小血栓、あるいは大血管内で生じる動脈・静脈血栓の形成における好中球の関与が注目されるようになってきている。好中球は自然免疫の最前線で機能する血球であるが、これが感染防御の一環として凝固活性化を活用していることが明らかになり、この方面の研究に新しい局面が展開した。すなわち、感染に際して好中球はDNAや核タンパク、さらに細胞質内のプロテアーゼ等で構成される neutrophil extracellular traps (NETs) を放出して病原体の処理をおこない、同時に凝固反応や血小板活性化によって血栓形成を誘導し、感染の進展を防止していることが明らかにされてきた。しかしこのような機構は、反面、播種性血管内凝固症候群 (DIC) や血栓症の原因にもなり、必ずしも益となることばかりではない。本稿では NETs 以外にも、tissue factor やマイクロパーティクル、damage-associated molecular pattern など、好中球が関与する血栓形成に関する最近の知見を紹介する。

Key words: neutrophil, neutrophil extracellular traps, histone, damage-associated molecular patterns, tissue factor

1. 敗血症における好中球の凝固活性化

感染に際して、自然免疫と血液凝固が相互に協調しつつ機能していることは広く認知されている¹⁾。従来、敗血症における凝固の活性化は、単球/マクロファージ系細胞の tissue factor (TF) 発現に起因すると考えられてきた²⁾。これは、かつては白血球系の細胞のなかで TF を発現するのは単球のみであり、好中球やリンパ球では TF 発現がみられないとされてきたからである。しかし数的には圧倒的多数であり、炎症の最前線で機能する好中球の関与なくして凝固

の活性化は効率的にはすすまないだろうということは容易に想像される。好中球の凝固イニシエータとしての役割については、最近になって炎症部位に集積する好中球が neutrophil extracellular traps (NETs) 放出を介して TF 発現をおこなうこと³⁾、さらに核内のヌクレオソーム、ヒストンなどの damage-associated molecular patterns (DAMPs) 類やマイクロパーティクルなどを介して向凝固に深く関与していることが明らかにされ⁴⁾、敗血症における過凝固状態の発現においては、むしろ主導的な働きを果たしているのではないかと考えられるようになってきている⁵⁾ (図 1)。さらにこの方面の研究は、生体顕微鏡観察によって血管内での内皮細胞や白血球、血小板の相互作用が直接観察可能となり、さらに深まりつつある。Darbousset らは⁶⁾、レーザー惹起血管内皮障害後の血栓形成において、好中球、単球、および血小



射場敏明

1984 (S59) 年3月 順天堂大学医学部卒業
 1987 (S62) 年4月 順天堂大学医学部外科学第二講座 助手
 1989 (H元年) 6月 千葉大学医学部救急部集中治療部 専攻生
 1989 (H元年) 9月 エール大学血管外科 客員研究員
 1997 (H9) 年11月 順天堂大学医学部外科学第二講座 講師
 2006 (H18) 年11月 順天堂大学医学部救急災害医学研究室 助教授
 2007 (H19) 年12月 順天堂大学医学部救急災害医学研究室 教授

*責任者連絡先：
 順天堂大学救急・災害医学
 〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1
 Tel: 03-3813-3111, Fax: 03-3814-5421
 E-mail: toshiiba@juntendo.ac.jp

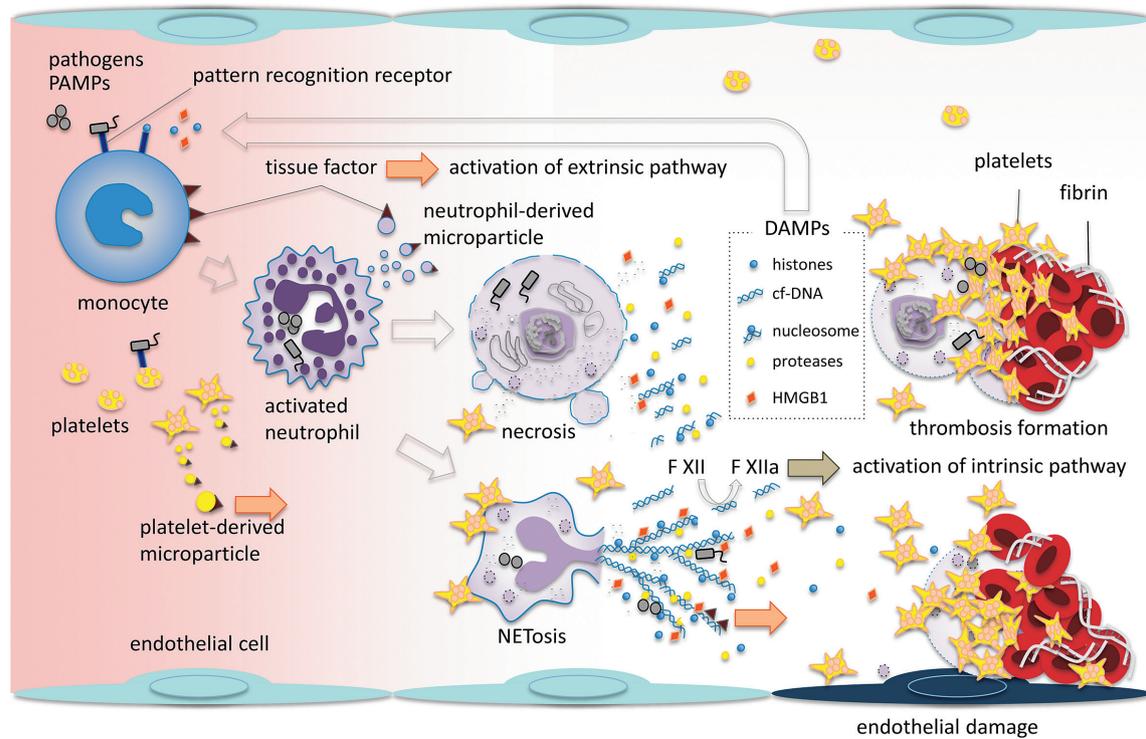


図1 敗血症における血管内凝固の活性化と血栓形成

敗血症においては、病原体由来の pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) が細胞膜上の特定の受容体 (pattern recognition receptor, PRR) に結合することによって単球や血小板などが活性化され、活性化した単球や血小板は好中球を刺激して細胞死や neutrophil extracellular traps (NETs) の放出を誘導する。NETs は本来病原体処理を目的とした機構と考えられているが、同時に血管内皮障害等の組織障害をもたらし、血管内腔の抗血栓性低下の原因となる。一方、好中球の細胞死に伴って細胞外に逸脱した damage-associated molecular pattern (DAMPs) は、PRR を介して再び細胞の活性化を行うことになる。さらに活性化された好中球や血小板からは、tissue factor を発現したマイクロパーティクルが多量に放出されて外因系凝固を活性化し、NETs 放出 (NETosis) によって細胞外に露出した DNA による内因系凝固の活性化と相俟って、敗血症における凝固亢進状態が進行していく。

板の挙動を分析し、傷害直後に血小板に先行して内皮に接着するのは好中球であることを報告している。それによると、好中球は leukocyte function antigen-1 (LFA-1)-Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) 接合を介して内皮障害部位に接着し、これに続いて血小板が局所に集積、単球はやや遅れて障害部位に形成された血栓に接着するとのことである。そして好中球における TF 発現が低いマウスでは血栓形成やフィブリンの生成速度が大幅に低下するため、血栓形成においては好中球の TF 発現と外因系凝固の活性化が重要性であることが報告されている⁷⁾。しかし好中球と血小板の関係については、血小板こそ好中球の活性化に重要な役割を果たしているとする見解もみられる⁸⁾。たしかに血小板中のケモカインや脂質メディエータなどのケミカルメディエータによっ

て好中球の活性化が行われることについての報告は枚挙にいとまがない⁹⁾。好中球と血小板、いずれが血栓生成を主導しているかは別として、両者の間には密接なクロストークが存在し、互いに協調して機能していることは広く受け入れられている事実である¹⁰⁾。

2. 好中球における tissue factor 発現と炎症・凝固

TF は凝固第 VII 因子・活性化第 VII 因子に対する膜受容体タンパク質であり、外因系凝固のイニシエータとして機能する。悪性腫瘍や感染症では TF の血中レベルが増加し、血栓症の主たる要因になっていると考えられている¹¹⁾。TF を発現する血球細胞

としては単球がよく知られているが、好中球がTFを発現するか否かについては見解が分かれていた。最近では発現しているという意見が主流となりつつあるあるが、TFの由来については未だ論争が続いている¹²⁾。従来、好中球にはTF産生能はないと考えられてきたが、まずImamuraらは¹³⁾、炎症性刺激のもとでは好中球が*de novo*産生を始めるようになると報告した。その後、好中球はマイクロパーティクル由来のTFを取り込んで発現しているのではないかという見解が発表された³⁾。さらに最近の実験では、深部静脈血栓症や悪性腫瘍に伴う血栓形成においては、好中球から放出されるNETsとNETsにおけるTF発現が重要な役割を演じていることが示されている¹⁴⁾。すなわち血栓形成過程において、NETsはフィブリン沈着のための足場を提供し、血小板を活性化してこれを凝集させ、血栓形成に貢献しているというわけである。他にもKambasらのグループは¹⁵⁾、グラム陰性菌感染症患者由来の好中球ではNETsにおけるTF発現が凝固反応を促進し、患者血清もしくは炎症性メディエータで処理した好中球もTFを発現することを報告している。このプロセスではオートファゴソーム中にTFの局在が示されており、オートファジー機構を介してNETsにTFが供給されることが示されている。

3. 白血球由来のマイクロパーティクルと凝固・炎症

マイクロパーティクルは細胞から放出される0.1~1.0 μm大の細胞断片ともいえる微小粒子である。マイクロパーティクルには、親細胞由来の膜タンパク、細胞質タンパク、あるいは脂質メディエータ類および細胞器などが含まれており、血管の恒常性を維持したり、あるいはそれを抑制したりする調節作用がみられることが知られている。血栓形成においては、とくに血小板由来のマイクロパーティクルの役割が大きい¹¹⁾、白血球由来のマイクロパーティクルもこれにかかわっている。由来血球としては、好中球、単球/マクロファージ、リンパ球など、ほとんどの白血球が含まれており、これらのマイクロパーティクルにはTFや抗凝固物質が含まれているとされている。それらが止血および血栓形成に関与

していることは容易に想像できるが、同時に炎症の活性化や、逆に炎症を鎮静化する反応もマイクロパーティクルによって制御されていると考えられている。このような凝固・炎症の調節作用に加えて、白血球由来のマイクロパーティクルは内皮機能を維持したり、逆に障害を誘導したりすることで、内皮機能調節にも関与しているらしい¹⁶⁾。さらに最近ではアテローム性動脈硬化症や喫煙、糖尿病、睡眠時無呼吸症などの患者では高レベルの白血球由来のマイクロパーティクルが血中に存在し、慢性的な血管炎症などに関与していることが認知され¹⁷⁾、マイクロパーティクルの測定は、心血管イベントの予測に有用であるとする報告もある¹⁸⁾。このようにマイクロパーティクルは内皮機能を変化させ、血管壁におけるアテローム性動脈硬化の進行に必要な炎症細胞の動員を促進していることが明らかにされつつある。さらに不安定プラーク内の血管新生を促進し、プラーク破綻部位における凝固および血小板活性化にも関与し、血管新生にも関わっていることが想定されている¹⁹⁾。

4. 好中球由来 DAMPs と凝固・炎症

感染に際して、好中球は、貪食、顆粒タンパク質の放出などの手段で病原体の処理を行っているが、十分に処理しきれない場合は細胞死をきたし、自らの死によって病原体の処理を試みようとする。このNETs放出をともなう細胞死はNETosisと呼ばれる現象であるが²⁰⁾、その際、直近の病原体はこの機構によって処理され、細胞外に逸脱したヌクレオソームやヒストンなどのDAMPsは炎症性メディエータとして作用し、全身的な炎症・凝固反応を誘導することが知られている。DAMPsとして知られているものには、前述のヌクレオソームやヒストン以外にも、DNAやHigh Mobility Group Box 1(HMGB-1)といった核内物質が多く、言い換えれば核内には炎症惹起物質が多量に含まれているということになる。このうちHMGB1は“death mediator”とも称される重要な後期炎症性メディエータであり、敗血症重症化との関連が示されている。たとえばLPSで刺激されたマクロファージではHMGB1 mRNAの発現が増加し、細胞質内のHMGB-1濃度が増加する²¹⁾。

さらに血中に逸脱した HMGB-1 レベルは、敗血症の重症度を反映することも報告されている²²⁾.

HMGB-1 以外の DAMPs としては cell-free DNA やヒストンが注目されている。健常人においても血漿中には少量の cell-free DNA が存在し、その由来は主としてアポトーシスした白血球や骨髄細胞であることが報告されているが²³⁾、存在意義については明らかになっていない。一方、敗血症において多数の白血球がアポトーシスに加えてネクローシスや NETosis などの細胞死をきたすと、一時に多量の DAMPs が血漿中に逸脱して、炎症や凝固反応を活性化され、敗血症に特有の複雑な病態が形成されていく。DAMPs については、重症敗血症や敗血症性ショックでヌクレオソームやヒストンの測定を行うと、それら血中レベルが上昇しており、予後予測因子や臓器障害の指標となり得ることが報告されている²⁴⁻²⁶⁾。

5. NETs による凝固・血小板の活性化

NETs は、2004 年に Brinkmann ら²⁷⁾によって発見された好中球から放出される構造物で、DNA による網目状構造を基本骨格とし、これにヒストンとミエロペルオキシダーゼ、カテプシン G、エラスターゼなどの顆粒タンパクが付着して構成されている。NETs は病原体の全身播種を防ぎ、生体防御に貢献していることが明らかになっているが、同時に強力な凝固活性化作用、血小板活性化作用、血管内皮細胞障害作用も有することも明らかにされている²⁸⁾。NETs 形成は、まずリポポリサッカライドやペプチドグリカンなどの病原体由来の pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) が pattern recognition receptor に結合することで活性化された好中球が、NADPH オキシダーゼによる活性酸素種を産生することで開始される²⁹⁾。続いて、生じた活性酸素種が peptidyl-arginine deiminase type4 (PAD4) の核内移行を促進し、さらに PAD4 が核タンパクヒストンをシトルリン化することで DNA の脱凝縮が進行し³⁰⁾、その後核膜や細胞膜の破断によって細胞外への放出へとつながっていく。上記の反応は、活性化血小板により効率的に刺激されることが知られているが³¹⁾、その際、血小板は PAMPs のみならず、宿主由来の DAMPs

が pattern recognition receptor に結合することによっても活性化され、自己増幅的に好中球を活性化して NETs 放出を誘導することが知られている⁸⁾。

NETs は感染性疾患、非感染性疾患を問わず、多くの血栓形成がかかわる病態に関与している。たとえば輸血の合併症である transfusion-related acute lung injury (TRALI) については NETs 放出によって肺障害がもたらされ³²⁾、肺炎においては、NETs 形成や NETs 関連物質の増加が肺胞内のフィブリン析出をはじめとする急性肺障害の病態形成に関与していることが報告されている³³⁾。

NETs による凝固活性化においては、核内物質以外にも好中球顆粒に含まれている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が向凝固や血栓形成に関与していることが報告されている³⁴⁾。すなわちこれらの各因子は TF や凝固第 XII 因子依存性の凝固反応を促進するとともに、抗凝固活性をもつ tissue factor pathway inhibitor を分解することによっても向血栓性を高めているとされている。敗血症では生体は血液凝固を活性化することによって感染源となっている部位の微小血管中に病原体を封じ込めて処理し、組織への侵入を食い止めようとしており^{35,36)}、これは生体にとって有益かつ必要な反応であるが、もし病原体が存在しない状態でこのような炎症反応が起こると、好中球由来のセリンプロテアーゼやヌクレオソームは致死的な血栓症や心筋梗塞、脳卒中の原因となり生体に害を及ぼすことになる³⁶⁾。NETs は病原体の侵入に際しては有用なツールであるが、一方で血栓症の原因にもなるという側面も持ち合わせているわけである。このような二面性をうまく調整していくためには、凝固活性化のより詳細なメカニズムを理解していくことが必須であり、安易にこれを調整すると期待した結果は得られないばかりか、かえって不利益を被る可能性があることに留意しておかねばならない。

6. NETs が誘導する深部静脈血栓

深部静脈血栓塞栓症の研究は、これまで凝固学的、あるいは分子病態学的なアプローチが主流を中心に行われてきた。しかし光学機器の開発により、最近では形態学的なアプローチも関心を集めるよう

になっている。そして、これにともなって遅れていた血栓形成における血小板や好中球などの血球成分や、血管内皮や内皮下組織など血管壁の関与の研究が急速にすすめられるようになった。とくに生体顕微鏡や2光子励起顕微鏡(two-photon excitation microscopy)、共焦点レーザー顕微鏡などは生体内における各種の血球の挙動をリアルタイムで3次元的に観察可能にする手法であり、今後の成果が期待されている³⁷⁾。そもそも重症病態や敗血症患者では深部静脈血栓の発生頻度が高いことが知られている³⁸⁾。このような血栓の形成過程においては好中球の関与が考えられている。Fuchsらは³⁹⁾、フィブリンやvon Willebrand factorとともにNETsが静脈血栓形成を誘導すると述べている。感染刺激で放出されたNETsについては、強力な血小板活性化作用や凝固活性を有するヒストンが、内皮細胞を障害しつつ血栓形成を誘導すること⁴⁰⁾。さらにNETsの骨格を形成するDNAが血液凝固第XII因子を活性化して内因系凝固を活性化し、血栓の増大につながっていくことなどが明らかにされている⁴¹⁾。Martinodら⁴²⁾は血管狭窄モデルをもちいて、野生型マウスでは90%に見られた静脈血栓が、NETs放出に必須のPAD4を欠損したマウスでは10%未満にしか見られなかったことを報告し、NETsの重要性を示している。深部静脈血栓におけるNETsの関与は感染症のみならず、悪性腫瘍⁴³⁾や自己免疫疾患⁴⁴⁾のような非感染性疾患においても同様にみられることが報告されている。

7. 自己免疫疾患とNETs

自己免疫疾患に合併する血管炎や血栓形成においてもNETsの関与が知られている。まず関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)においては、PAD4をコーディングしている*PADI4*がRA自体の感受性遺伝子であることが報告され、RAとNETsの関連が注目されている⁴⁴⁾。*PADI4*のRAにおける重要性については議論の余地があるところであるが、他にもRAの病態形成に重要な自己抗原や自己抗体はNETsに由来している可能性が指摘されている⁴⁵⁾。

抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)関連血管炎では、細胞質内のミエロ

ペルオキシダーゼ、もしくはプロテイナーゼ3に対する自己抗体が産生されており、これによって多発血管炎や多発血管炎肉芽腫症、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症などの血管炎が生じる。これらの疾患においては、病態形成においてNETsの関与が報告されている⁴⁶⁾。Kessenbrockらは⁴⁷⁾、ANCA関連血管炎患者の腎糸球体に形成された半月体中にNETs形成を見だし、臓器障害の直接的な原因になっていることを指摘している。さらにACNA関連血管炎では、静脈血栓塞栓症の有病率が高いことも報告されている⁴⁸⁾。これについてKambasらは⁴⁹⁾、ANCA関連血管炎患者においてTFを発現した好中球や循環DNA、TF発現マイクロパーティクル(MPs)などの検討を行い、活動期の末梢血中好中球ではTF発現やNETs放出が増加し、血漿中におけるマイクロパーティクルが増加することを報告している。

他にもsystemic lupus erythematosus(SLE)患者の一部では、NETsの骨格を形成するDNAを分解するためのDNase I活性が低下していることが報告されている。このためSLE患者ではNETsにともなって放出されたDNAが分解されにくく、抗DNA抗体が形成されやすくなり、さらにNETsにともなう障害も見られやすくなるようである⁵⁰⁾。

8. NETs・ヒストン対策

NETsやヒストンを標的とする治療法の開発は今後の課題である。しかし血漿中にはアルブミンやpentraxin(PTX)などのヒストン中和物質が存在していることが知られている⁵¹⁾。PTXのうちPTX3は自然免疫において重要な役割を担っている分泌タンパクである。各種炎症・感染症で増加し、細菌処理に貢献していると考えられていたが、その詳細は不明であった。Daigoらは⁵²⁾、敗血症患者血中でPTX3が結合するタンパクをプロテオミクス解析により網羅的に検索し、PTX3結合タンパクとしてNETsの構成タンパクであるアズロシジン(AZU1)やミエロペルオキシダーゼ(MPO)、ヒストンなどを同定した。さらにPTX3はAZU1やMPO、ヒストンと結合することによってNETsの傷害性を緩和していることを明らかにした。ちなみにPTXファミリーに属する急性相タンパクであるC-reactive proteinにも

抗ヒストン作用がみられることが知られている⁵³⁾。一方、治療薬としては活性化プロテイン C⁵⁴⁾やヘパリン類⁵⁵⁾による抗ヒストン効果が報告されているが、これらの臨床的な効果については今のところ報告がない。今後、NETs やヒストンを制御することによって、血栓症や炎症の制御が可能になることが期待される。

著者の利益相反 (COI) の開示：
研究費 (小野薬品工業株式会社)

文献

- van der Poll T, Herwald H: The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb Haemost* **112**: 640–648, 2014.
- Osterud B: Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* **9** Suppl 1: S9–14, 1998.
- Kambas K, Mitroulis I, Ritis K: The emerging role of neutrophils in thrombosis—the journey of TF through NETs. *Front Immunol* **3**: 1–8, 2012.
- Liaw PC, Ito T, Iba T, Thachil J, Zeerleder S: DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev* 2015 Dec 31. pii: S0268-960X(15)00097-1.
- Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Murai M: Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J Intensive Care* **1**: 13, 2013.
- Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, Renné T, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L: Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* **120**: 2133–2143, 2012.
- Darbousset R, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C: Involvement of neutrophils in thrombus formation in living mice. *Pathol Biol* **62**: 1–9, 2014.
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P: Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**: 463–469, 2007.
- Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SH, Weitz JI, Liaw PC: Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**: 1977–1984, 2014.
- Ghasemzadeh M, Hosseini E: Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* **131**: 191–197, 2013.
- Owens AP, Mackman N: Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* **108**: 1284–1297, 2011.
- Iba T, Miki T, Hashiguchi N, Tabe Y, Nagaoka I: Is the neutrophil a ‘prima donna’ in the procoagulant process during sepsis? *Crit Care* **18**: 230, 2014.
- Imamura T, Kaneda H, Nakamura S: New functions of neutrophils in the arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Lab Invest* **82**: 1287–1295, 2002.
- Martinod K, Wagner DD: Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* **123**: 2768–2776, 2014.
- Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E, Girod A, Chrysanthopoulou A, Pneumatikos I, Skendros P, Kourtzelis I, Koffa M, Kotsianidis I, Ritis K: Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis. *PLoS ONE* **7**: e45427, 2012.
- Angelillo-Scherrer A: Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res* **110**: 356–369, 2012.
- Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, Piercecchi-Marti MD, Bartoli MA, Arnaud L, Mancini J, Boudes A, Sarlon E, Thevenin B, Leroyer AS, Squarcioni C, Magnan PE, Dignat-George F, Sabatier F: Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *J Am Coll Cardiol* **62**: 1436–1441, 2013.
- Augustine D, Ayers LV, Lima E, Newton L, Lewandowski AJ, Davis EF, Ferry B, Leeson P: Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress. *Circ Res* **114**: 109–113, 2014.
- Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY: Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* **8**: 2358–2368, 2010.
- Kaplan MJ, Radic M: Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* **189**: 2689–2695, 2012.
- Wu CX, Sun H, Liu Q, Guo H, Gong JP: LPS induces HMGB1 relocation and release by activating the NF- κ B-CBP signal transduction pathway in the murine macrophage-like cell line RAW264.7. *J Surg Res* **175**: 88–100, 2012.
- Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ, Lee ML, Andersson J, Tokics L, Treutiger CJ: Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* **33**: 564–573, 2005.
- Thammavongsa V, Missiakas DM, Schneewind O: Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* **342**: 863–866, 2013.
- Chen Q, Ye L, Jin Y, Zhang N, Lou T, Qiu Z, Jin Y, Cheng B, Fang X: Circulating nucleosomes as a predictor of sepsis and organ dysfunction in critically ill patients. *Int J Infect Dis* **16**: e558–564, 2012.
- Zeerleder S, Stephan F, Emonts M, de Kleijn ED, Esmon CT, Varadi K, Hack CE, Hazelzet JA: Circulating nucleosomes and severity of illness in children suffering from meningococcal sepsis treated with protein C. *Crit Care Med* **40**: 3224–3229, 2012.
- Miki T, Iba T: Kinetics of circulating damage-associated molecular patterns in sepsis. *J Immunol Res* 2015: 424575, 2015.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann

- Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**: 1532–1535, 2004.
- 28) Fuchs TA, Bhandari AA, Wagner DD: Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood* **118**: 3708–3714, 2011.
 - 29) Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T: Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* **18**: 581–588, 2011.
 - 30) Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y: PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* **207**: 1853–1862, 2010.
 - 31) Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA: Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res* **112**: 1506–1519, 2013.
 - 32) Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, Cifuni SM, Fuchs TA, von Andrian UH, Hartwig JH, Aster RH, Wagner DD: Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood* **119**: 6335–6343, 2012.
 - 33) Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, Phoon MC, van Rooijen N, Chow VT: Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol* **179**: 199–210, 2011.
 - 34) Perrin J, Lecompte T, Tournier A, Morlon L, Marchand-Arvier M, Vigneron C: In vitro effects of human neutrophil cathepsin G on thrombin generation: Both acceleration and decreased potential. *Thromb Haemost* **104**: 514–522, 2010.
 - 35) Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* **369**: 840–851, 2013.
 - 36) Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B: Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* **16**: 887–896, 2010.
 - 37) Key NS: Bench to bedside: new developments in our understanding of the pathophysiology of thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* **35**: 342–345, 2013.
 - 38) Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup: Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* **41**: 580–637, 2013.
 - 39) Fuchs TA, Brill A, Wagner DD: Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 1777–1783, 2012.
 - 40) Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA, Wagner DD: Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* **10**: 136–144, 2012.
 - 41) Schulz C, Engelmann B, Massberg S: Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* **11** Suppl 1: 233–241, 2013.
 - 42) Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, Hu J, Wang Y, Wagner DD: Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 8674–8679, 2013.
 - 43) Demers M, Wagner DD: NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost* **40**: 277–283, 2014.
 - 44) Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Bridges SL, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; RACI consortium; GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM: Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**: 376–381, 2014.
 - 45) Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A: Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol* **32**: 149–150, 2014.
 - 46) Tang S, Zhang Y, Yin SW, Gao XJ, Shi WW, Wang Y, Huang X, Wang L, Zou LY, Zhao JH, Huang YJ, Shan LY, Gounni AS, Wu YZ, Zhang JB: Neutrophil extracellular trap formation is associated with autophagy-related signalling in ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* **180**: 408–418, 2015.
 - 47) Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönhermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE: Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* **15**: 623–625, 2009.
 - 48) Stassen PM, Derks RP, Kallenberg CG, Stegeman CA: Venous thromboembolism in ANCA-associated vasculitis—incidence and risk factors. *Rheumatology (Oxford)* **47**: 530–534, 2008.
 - 49) Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, Apostolidou E, Skendros P, Girod A, Arelaki S, Froudarakis M, Nakopoulou L, Giatromanolaki A, Sidiropoulos P, Koffa M, Boumpas DT, Ritis K, Mitrulis I: Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may

- promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis* **3**: 1854–1863, 2014.
- 50) Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A: Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 9813–9818, 2010.
- 51) Iba T, Hamakubo T, Nagaoka I, Sato K, Jecko T: Physiological levels of pentraxin 3 and albumin attenuate vascular endothelial cell damage induced by histone H3 in vitro. *Microcirculation* **23**: 240–247, 2016.
- 52) Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, Sudou Y, Kodama T, Naito M, Inoue K, Hamakubo T: The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. *Mol Cell Proteomics* **11**: M111, 015073, 2012.
- 53) Abrams ST, Zhang N, Dart C, Wang SS, Thachil J, Guan Y, Wang G, Toh CH: Human CRP defends against the toxicity of circulating histones. *J Immunol* **191**: 2495–2502, 2013.
- 54) Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmo NL, Lupu F, Esmo CT: Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* **15**: 1318–1321, 2009.
- 55) Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Kadota K, Sato K: Heparins attenuated histone-mediated cytotoxicity in vitro and improved the survival in a rat model of histone-induced organ dysfunction. *Intensive Care Med Exp* **3**: 36, 2015.