

# 脳血管内治療の回収血栓を対象とした分子病理解析による 新規個別化脳梗塞治療法の開発

藤田医科大学医学部 脳卒中科  
臨床准教授 橋本 哲也

(共同研究者)

藤田医科大学医学部脳卒中科 教授 松本 省二  
藤田医科大学医学部脳卒中科 講師 高下 純平

## はじめに

急性脳主幹動脈閉塞症は広範な脳梗塞巣をもたらす転帰が不良である。人口の高齢化に伴い本邦の患者数は今後急増すると予想される。2015年以降本症に対して脳血管の閉塞血栓を脳血管内治療で体外に回収する血栓回収療法の有効性が示され、その重要性は増している。急性脳主幹動脈閉塞症に対する血栓回収療法の普及により、閉塞血栓の病理解析が可能となったが、回収血栓の病理解析による脳梗塞の病態解明は未だ不可能である。回収血栓の新たな解析手法の開発により適切な病理学的評価が可能となれば、脳梗塞の原因である閉塞血栓を患者ごとに解析して得られる病理学的知見により脳梗塞の病因・病態評価が可能となり、患者ごとに最適な治療法を選択する個別化治療が可能となると考える。

近年、血管内血栓形成機序において、動脈硬化や血流うっ滞などを誘引とする局所の炎症により好中球より放出される neutrophil extracellular traps (NETs) が血小板や凝固線溶系に作用して重要な役割を担うことが注目される。今回、本調査研究助成を用い、NETs の構成成分中の、citruinated histone H3 (H3Cit)・neutrophil elastase (NE) の細胞外共局在に着目し、それらの一次抗体を用いた免疫染色を行い、NETs を評価可能な実験系を確立した。また、凝固線溶系分子マーカーとして、回収血栓に対する von Willebrand factor (vWF) の免疫染色の実験系も確立した。

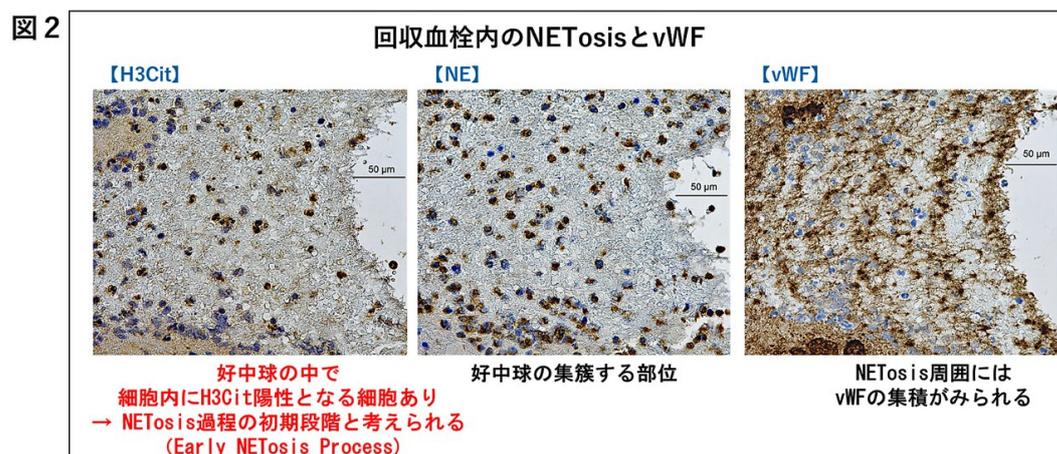
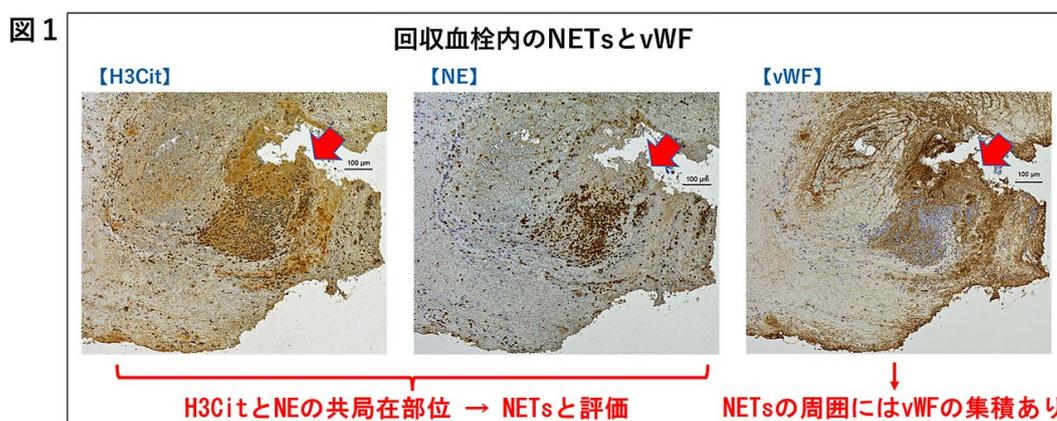
そこで、当院にて2023年1月から2024年3月までに急性脳主幹動脈閉塞症に対して血栓回収療法を施行し、回収血栓の病理標本を作製した連続30症例を対象とし、血栓回収療法の回収血栓におけるNETsの有無を検索した。回収血栓(5 $\mu$ m幅スライスの薄切切片)に対して、NETsの構成成分の中のH3CitとNEに対する一次抗体を用いた免疫染色を行い、両者の細胞外共局在部位をNETsと評価した。一次抗体試薬は、H3Cit: NB100-57135, Anti-Histone H3, rabbit-polyclonal antibody [Novus Biologicals, CO, USA]・30倍希釈、NE: 27642-1-AP, Anti ELA2, rabbit-polyclonal antibody [Proteintech Group, IL, USA]・100倍希釈を用いた。さらに、vWFに対する一次抗体を用いた免疫染色もを行い、回収血栓内でのNETsとの位置関係を評価した。一次抗体試薬は、vWF: AB6994, Anti-

vWF, rabbit-polyclonal antibody[Abcam, Cambridge, UK]・3000倍希釈を用いた。また、病理画像をデジタルデータとして取り込み、AI画像解析ソフト (Orbit Image Analysis) を用いて、回収血栓内のNETsの割合を計測した。そして、回収血栓内のNETs成分の割合と、血栓回収療法治療前の臨床情報・画像情報・血液検査データとの関連、及び血栓回収療法の治療効果との関連について調査した。

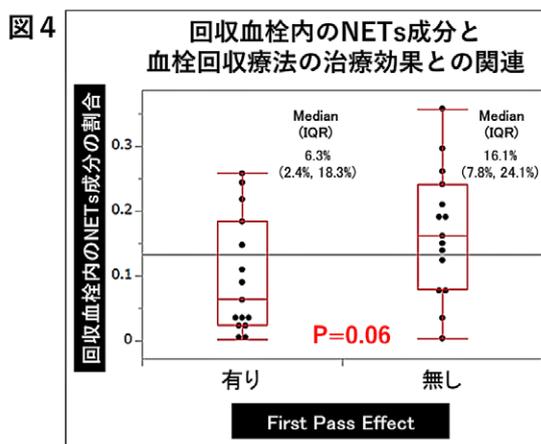
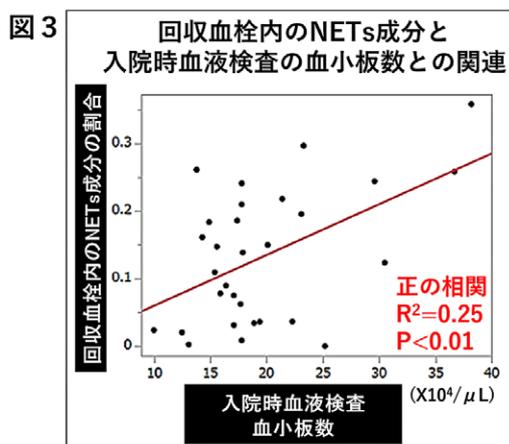
## 結 果

対象患者は女性が12例 (40%)、年齢中央値：77.5 [IQR 74.75-81]歳であり、閉塞血管は頭蓋内ICA閉塞8例 (27%)・M1閉塞16例 (53%)・M2閉塞4例 (13%)・脳底動脈閉塞2例 (7%)であった。脳梗塞の病型は心原性脳塞栓症23例 (77%)・動脈原性脳塞栓症1例 (3%)・塞栓源不明脳塞栓症2例 (7%)・トルソー症候群4例 (13%)であった。血栓回収療法前に12例 (40%)にrt-PA静注療法が施行され、血栓回収療法の病変通過回数は中央値1 [IQR 1-2]回であった。血栓回収療法の治療効果としては、有効再開通eTICI2c-3が21例 (70%)に得られ、1回の手技で完全再開通を得るFirst Pass Effect (FPE)は15例 (50%)に得られた。

回収血栓の病理解析では、閉塞血管や病型によらず、すべての患者の回収血栓においてNETsを同定した(図1)。また、全例に好中球の中で細胞内のH3Cit陽性となる細胞も認め(図2)、NETosis過程の初期段階と考えられた。回収血栓内のNETsの割合は、分布：0.04-35.8%、中央値：13.1 [IQR 3.6-21.2]%, であり、NETsの周囲にはvWFの集積を認めた(図1・図2)。



入院時の血栓回収療法前の臨床情報・画像情報・血液検査データと回収血栓内のNETs成分の割合との関連に関しては、入院時血液検査の血小板数と回収血栓内のNETs成分の割合との間に正の相関関係を認めた ( $R^2=0.25$ ,  $P<0.01$ ) (図3)。また、血栓回収療法の治療効果と回収血栓内のNETs成分との間の関連については、血栓回収療法によるFirst Pass Effectの達成は、NETs成分の少ない血栓において得られやすい傾向があることを見出した (中央値: FPE群 6.3% vs. 非FPE群 16.1%,  $P=0.06$ ) (図4)。本研究成果の一部は、2025年3月6日～3月8日に大阪国際会議場で開催された第50回日本脳卒中学会学術集会、及び2025年5月21日～5月24日に大阪国際会議場で開催された第66回日本神経学会学術大会において発表した。



## 考 察

本研究では、急性脳主幹動脈閉塞症からの回収血栓において脳梗塞病型によらず全例にNETsを認めた。NETsは2004年に細菌補足・殺菌のための好中球の機能形態として初めて報告された<sup>(1)</sup>。その後、無菌免疫と血栓を連関するimmunothrombosis研究の発展に伴い、近年血管内血栓形成機序における注目が高い<sup>(2, 3)</sup>。NETsは、血小板や赤血球の接着・凝集を促進するとともに内因系凝固反応の活性化を促進してフィブリン形成を引き起こす<sup>(4, 5)</sup>。NETsはさらに、vWF・plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)等の凝固線溶系分子に作用して強靱で厚いフィブリン形成を誘導する<sup>(6)</sup>。また、NETsの放出は、好中球のプログラムされた細胞死の過程であることも明らかとなり、新しい細胞死の概念: NETosisが提唱された<sup>(7)</sup>。本研究においても、全例の回収血栓内に、好中球の集簇する部位の中で細胞内にH3Cit陽性となる細胞を認めており、NETosis過程の初期段階 (Early NETosis Process) の好中球の細胞と考えられた。本研究の回収血栓内のNETs及びNETosisの周囲には、血小板凝集と血液凝固カスケードに重要なvWFの集積が認められており、NETsは脳梗塞の血栓形成機序に関与している可能性が推察された。

また、本研究では、入院時血液検査の血小板数と回収血栓内のNETs成分の割合との間

に正の相関関係を認め、血栓回収療法による First Pass Effect の達成は、NETs 成分の少ない血栓において得られやすい傾向があることが判明した。NETs と脳梗塞の臨床情報・背景病態との関連に関しては、心原性脳塞栓症からの回収血栓において NETs が多いという報告があるが<sup>(8)</sup>、NETs と治療前臨床情報との関連に関しては未だ解明されていない。また、NETs と脳梗塞の治療・転帰との関連に関しては、回収血栓の NETs の多さは、その患者の脳梗塞の転帰不良と関連したという報告があるが<sup>(9)</sup>、回収血栓の NETs と血栓回収療法の治療効果との関連に関しては未だ解明されていない。本研究により、閉塞血栓の NETs 割合が治療前の血液検査データより予測され、NETs の多寡が血栓回収療法の治療効果に影響することがわかった。これにより、治療前の血液検査データより閉塞血栓の NETs 割合を予測し、より効果的な血栓回収療法の治療戦略を確立できる可能性がある。

最近の研究では、NETs が脳梗塞の治療標的となる可能性に関して報告されている。ex vivo 実験にて、回収血栓に NETs 阻害薬の DNase I を添加すると rt-PA による血栓溶解が促進された<sup>(8, 10)</sup>。また、NETs 形成は histone H3 をシトルリン化する酵素である peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) により制御されるが、PAD4 欠損マウスでは静脈血栓症の血栓量が減少することが報告される<sup>(11)</sup>。したがって、本研究の発展により、回収血栓の NETs に基づく脳梗塞の病態解明が可能となれば、NETs を標的とする新たな治療薬の開発にもつながる可能性があると考ええる。本研究の発展により、現状の脳梗塞診療を革新して脳梗塞治療の有効性を飛躍的に高めることができれば、脳梗塞の転帰改善と高齢者の健康寿命延伸をもたらし、増え続ける医療費の抑制につながると期待できる。今後も研究を継続し、さらなる症例集積により回収血栓の病理解析研究を進展させていく必要があると考えている。

## 要 約

急性脳主幹動脈閉塞症に対する血栓回収療法の普及により、閉塞血栓の病理解析が可能となったが、回収血栓の病理解析による脳梗塞の病態解明は未だ不可能である。近年、血管内血栓形成機序において、動脈硬化や血流うっ滞などを誘引とする局所の炎症により好中球より放出される NETs が血小板や凝固線溶系に作用して重要な役割を担うことが注目される。今回、急性脳主幹動脈閉塞症に対する血栓回収療法にて回収した血栓における NETs を検索した。

当院にて 2023 年 1 月から 2024 年 3 月までに急性脳主幹動脈閉塞症に対して血栓回収療法を施行し、回収血栓の病理標本を作製した連続 30 症例を対象とした。回収血栓に対して、NETs の構成成分の中の H3Cit と NE に対する一次抗体を用いた免疫染色を行い、両者の細胞外共局在部位を NETs と評価した。さらに、vWF に対する免疫染色も行い、NETs との位置関係を評価した。また、回収血栓内の NETs の割合を計測し、治療前臨床情報及び血栓回収療法の治療効果との関連を調査した。

対象患者は女性が12例(40%)、年齢中央値77.5 [IQR 74.75-81]歳であり、閉塞血管は頭蓋内ICA閉塞8例・M1閉塞16例・M2閉塞4例・脳底動脈閉塞2例であった。脳梗塞の病型は心原性脳塞栓症23例・動脈原性脳塞栓症1例・塞栓源不明脳塞栓症2例・トルソー症候群4例であった。回収血栓の病理解析では、全患者の回収血栓においてNETsを同定した(分布:0.04-35.8%、中央値:13.1 [IQR 3.6-21.2]%)。また、全例に好中球の中で細胞内のH3Cit陽性となる細胞も認めた。NETsの周囲にはvWFの集積を認めた。入院時血液検査の血小板数と回収血栓内のNETs成分の割合との間に正の相関関係を認め、血栓回収療法によるFirst Pass Effectの達成は、NETs成分の少ない血栓において得られやすい傾向があることを見出した。

急性脳主幹動脈閉塞症からの回収血栓において脳梗塞病型によらず全例にNETsを認め、NETosisの初期段階の細胞も認めた。NETs周囲には血小板凝集と血液凝固カスケードに重要なvWFの集積があり、NETsは脳梗塞の血栓形成機序に関与している可能性が推察される。さらに、閉塞血栓のNETs割合が治療前の血液検査データより予測され、NETsが血栓回収療法の治療効果に影響することから、NETsを標的とする治療戦略の開発につながる可能性があり、さらなる症例集積による回収血栓の病理解析研究の発展が必要である。

## 文 献

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303: 1532-1535, 2004.
2. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 15880-15885, 2010
3. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 13: 34-45, 2013.
4. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 16: 887-896, 2010.
5. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 209: 819-835, 2012.
6. Zhang S, Cao Y, Du J, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to tissue plasminogen activator resistance in acute ischemic stroke. *FASEB J*. 35: e21835, 2021.
7. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 176: 231-241, 2007.
8. Laridan E, Denorme F, Desender L, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol*. 82: 223-232, 2017.
9. Novotny J, Oberdieck P, Titova A, et al. Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke

and myocardial infarction. *Neurology*. 94: e2346-e2360, 2020.

10. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 49: 754-757, 2018.
11. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, et al. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110: 8674-8679, 2013.