

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09131

研究課題名(和文) 腹膜播種の成立における好中球細胞外トラップの意義 宿主免疫側からの検討

研究課題名(英文) The involvement of Neutrophil extracellular traps (NETs) in the development of peritoneal metastasis in terms of the interaction with host immunity

研究代表者

宮戸 秀世 (Miyato, Hiedeyo)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90813163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：今回、好中球細胞外トラップ(NETs)が腫瘍微小環境において免疫細胞の挙動および抗がん剤の作用に与える影響を調査した。NETsは、末梢血単球のM1マクロファージへの分化を促進する一方、好中球エラスターゼ、セリンプロテアーゼ依存性にCXCL10、CXCL11といったケモカインを分解することにより、リンパ球の遊走を阻害することが判明した。また、NETsは、アドリアマイシン、パクリタキセルといった抗がん剤をトラップすることにより、抗がん剤の拡散および腫瘍内への浸透を阻害して、抗がん剤が誘導する癌細胞のアポトーシスを抑制し、抗腫瘍効果を減弱させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NETsは腫瘍微小環境において、リンパ球の腫瘍内への浸潤を阻害し抗腫瘍免疫を抑制したり、腫瘍内への抗がん剤の浸透を阻害することにより、複合的に腫瘍の進展を促進する作用を有する可能性が示唆された。以上の結果から、DNaseや好中球エラスターゼ阻害剤、セリンプロテアーゼ阻害剤などNETsの作用を阻害する薬剤を使用することにより、リンパ球の腫瘍内への浸潤や抗がん剤の腫瘍内への浸透性を高める新たな治療法の開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of neutrophil extracellular traps (NETs) on migration of immune cells and cytotoxic effect of anti-cancer drugs. NETs induced peripheral blood monocyte to differentiate into M1 macrophage. On the other hand, NETs degraded chemokines such as CXCL10 or CXCL11 which act as chemoattractant of lymphocytes, dependent on neutrophil elastase or serine protease, and inhibited lymphocytes migration toward these chemokines. These results indicated that NETs might induce immunosuppression inhibiting intratumoral invasion of lymphocytes and attenuate anti-tumor immunity. NETs trapped anti-cancer drugs such as doxorubicin or paclitaxel, inhibited cytotoxic effect of these drugs and reduced apoptosis of cancer cells. These effects might be collectively involved in the mechanism of tumor promoting effects of NETs.

研究分野：腫瘍微小環境

キーワード：好中球細胞外トラップ 腹膜播種 免疫 エクソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ (NETs) は、遊離癌細胞を捕捉しがん転移を促進する可能性があることが示唆されている。申請者は、胃癌手術時のヒト腹腔内滲出好中球由来の NETs がヌードマウスにおける腹膜播種の成立を促進し、DNase による NETs の分解で播種再発が予防できる可能性を示唆する結果を得た。

### 2. 研究の目的

本研究では、免疫細胞 (T 細胞とマクロファージ) の機能に対する NETs の作用を In vitro で検討するとともに、免疫能を有するマウスの腹膜播種モデルでも、NETs が同様の播種増強効果が発揮しうるか? を検証する。また、この実験系に癌細胞由来エクソソームを共存させることで、上記の現象に如何なる変化が見られるか? についても検討を加える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 末梢血細胞の分離方法

健康人末梢血を採取したのち FicoII を用いて、好中球分画と末梢血単核球 (PBMC) に分離。単球は PBMC より CD14 抗体を用いた磁気分離法 (MACS) にて分離した。また、活性化 T 細胞は、CD3 抗体にて PBMC を 2 日間刺激ののち、10ng/ml の IL-2 を添加した培養液にて 7-14 日間培養することにより作成した。分離した好中球を 1  $\mu$ M PMA、LPS10  $\mu$ g/mL により刺激し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内でローリングを行うことにより NETs を形成させた。一部の試験では、さらに 300g  $\times$  10min、および 18000g  $\times$  10min の遠心により NETs の上清と NETs 成分に分離し、NETs 上清、NETs stock として実験に用いた。好中球から産生された NETs (あるいは NETs 上清、NETs stock) を単球に添加し、3 日間培養。単球を培養皿から剥離して、M1 マーカーである CD80、M2 マーカーである CD163 に対する蛍光抗体を用いて表面抗原の染色を行い、その発現を flow cytometry を用いて解析した。また、培養上清を採取ののち、Bio-Plex を用いて、単球より産生されるサイトカインの測定を行った。

#### (2) ケモカイン (CXCL10, CXCL11) による活性化 T 細胞の遊走に対する、NETs の与える影響を調査

1  $\mu$ g/mL の CXCL10、あるいは CXCL11 を溶解した培養液に NETs を添加し 6 時間 incubation を行ったのち、トランスウェルチャンバーを用いた細胞遊走実験を行った。

T 細胞を 8  $\mu$ m の pore のあるフィルターの上層に、ケモカインと NETs の混合液をフィルターの下層に添加し、6 時間 incubation ののち、flow cytometry を用いて下層へと遊走したリンパ球数の測定を行った。

また、NETs がケモカインの分解に関与するか調査するために、ケモカインを溶解した培養液に NETs を添加し、一定時間 incubation を行ったのち、CXCL11 に対する抗体を使用して western blotting を行い、ケモカインの分解を調査した。

#### (3) 癌細胞のスフェロイドや腫瘍組織内への抗がん剤の送達に NETs が与える影響を調査

好中球を PMA あるいは LPS にて刺激して NETs を形成し、この培養液中に緑色蛍光色素が結合した Oregon-green 488-conjugated PTX (OG-PTX) あるいは自家蛍光を持つアドリアマイシンを添加し、30min、incubation したのち、ここに SytoxOrange あるいは SytoxGreen を添加して、NETs の蛍光染色を行った。蛍光顕微鏡観察を行い、NETs の局在と抗がん剤の局在が一致するか (抗がん剤が NETs にトラップされるか) を調査した。

##### ・抗がん剤の拡散に NETs が与える影響を調査

3  $\mu$ m の pore の transwell chamber を用いて、抗がん剤の拡散実験を行った。transwell の下層に抗がん剤 (20  $\mu$ M のアドリアマイシン) を溶解した HBSS を添加し、30min の間に transwell の上層へと拡散したアドリアマイシンの濃度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。Transwell の下層にて NETs を形成させ、その培養液中に抗がん剤を添加することにより、抗がん剤の拡散に NETs が与える影響を調査した。

さらに、癌細胞の細胞懸濁液とコラーゲンゲル、バッファーを 1:8:1 の割合で混合したのち、培養皿に混合液 30  $\mu$ L ずつドロップし、ドーム状のコラーゲンゲルの中に包埋された癌細胞の spheroid を作成した。この培養液の中に 15  $\mu$ M の濃度になるようアドリアマイシンを添加し、20 時間培養した。その後、コラーゲンゲルを 0.02% のコラゲナーゼを用いて溶解し、癌細胞の懸濁

液に annexin V, 7-AAD を添加して染色。Flow cytometry を用いてアポトーシスが誘導された細胞の割合を評価した。この抗がん剤によって誘導される癌細胞のアポトーシスが NETs と抗がん剤を混合した場合に抑制されるかを調査した。

・ Ex vivo において播種結節内への抗がん剤の浸透に与える NETs の影響

癌細胞(KOC-2S)を 1 匹あたり  $3 \times 10^6$  個、ヌードマウスの腹腔内に投与し、腹膜播種を形成させた。3 週間後に開腹し、播種結節を採取。抗がん剤を溶解した培養液中で、1 時間、あるいは 3 時間播種結節の培養を行った。その後、播種結節の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いて撮影し、抗がん剤がどの程度腫瘍内へ浸透するか、NETs とアドリアマイシンをあらかじめ混合しておく、播種結節内への抗がん剤の取り込みがどの様に変化するかを調査した。

#### 4 . 研究成果

##### (1) NETs が末梢血単球の分化に与える影響

末梢血好中球を PMA, LPS, LPA のいずれで刺激しても、好中球細胞外トラップ (NETs) の産生が誘導されることが確認された。PMA 刺激により NETs を作成、末梢血中単球と 3 日間混合培養したところ、CD80 (M1 マーカー) の発現が有意に上昇し、CD163 (M2 マーカー) の発現は抑制された。また、上清中の TNF- $\alpha$  の産生が亢進しており、NETs は末梢血単球の M1 への分化を促進することが判明した。

##### (2) transwell チャンバーを用いた、ケモカイン (CXCL10, CXCL11) による活性化 T 細胞の走化性に与える NETs の影響

CXCL10, CXCL11 をケモアトラクタントとして下層に添加し、上層より下層へと遊走を示したリンパ球数を flow cytometry にて評価することにより、遊走能の亢進を確認することができた。PMA 刺激好中球に CXCL11 を添加した場合は、CXCL11 による遊走能の亢進が有意に抑制された。その抑制効果は上清でも認められ、この効果は下層に Catalase を添加すると部分的に解除された。また、タイムラプス動画により活性化リンパ球の random migration を解析すると、PMA 刺激好中球の上清を添加すると直後より migration が抑制された。以上より、CXCL11 によるリンパ球の走化性に対する PMA 刺激好中球の上清の持つ抑制作用には活性酸素の関与が考えられた。LPS 刺激好中球でも同様に、リンパ球の遊走を抑制したが、この効果は上清では認められなかった。さらに、好中球に対し好中球エラスターゼ阻害剤 (NEI)、セリンプロテアーゼ阻害剤 (PMSF) を作用させた状態で LPS 刺激を行うと、リンパ球遊走抑制作用が完全に解除された。また、LPS 刺激好中球により CXCL11 が分解されることが抗 CXCL11 抗体に対する western blotting にて確認され、NEI あるいは PMSF の添加により、CXCL11 の分解は阻害された。以上により、LPS 刺激好中球が産生する NETs がリンパ球の遊走を抑制する機序として、NETs 中に含まれるセリンプロテアーゼ、特に好中球エラスターゼにより CXCL11 が分解されることが関与していると考えられた。

以上の結果から、NETs にはがん組織内へのリンパ球の浸潤による局所免疫応答を阻害することにより腫瘍免疫を抑制する作用を有する可能性が示唆された。

##### (3) PMA 刺激好中球が癌細胞遊走に与える影響

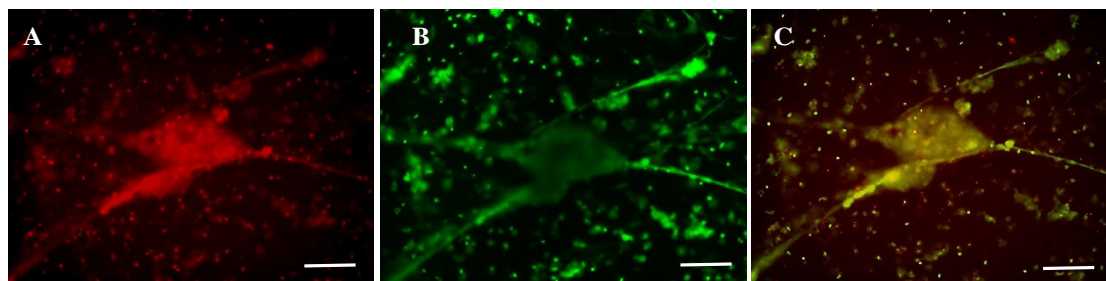
好中球を PMA あるいは LPS で刺激することにより作成した NETs を胃癌細胞 NUGC-4、卵巣癌細胞 Shin-3 に添加すると、共に癌細胞の遊走が促進された。また、PMA 刺激好中球から作成した NETs を遠心により、NETs を含まない上清と NETs 成分だけ分離した (NET stock) 場合、NETs 上清において強い癌細胞遊走作用を認め、NET stock にても遊走は亢進するものの、上清に比較すると弱い作用であった。加熱処理にてタンパク変性を起こさせると、遊走促進作用は完全に抑制された。これらの作用は、カタラーゼあるいは好中球エラスターゼ阻害剤を添加することにより、部分的に抑制されることから、好中球から PMA 刺激により放出される活性酸素および好中球エラスターゼが作用している可能性が示唆された。

LPS により NET を産生させた場合にも、胃癌細胞の遊走を亢進させる作用を有するものの、NETs 上清には遊走を亢進させる作用はなく、LPS は好中球に活性酸素をさせる作用が弱いためと考えられた。

##### (4) 癌細胞のスフェロイドや腫瘍組織内への抗がん剤の送達に NETs が与える影響

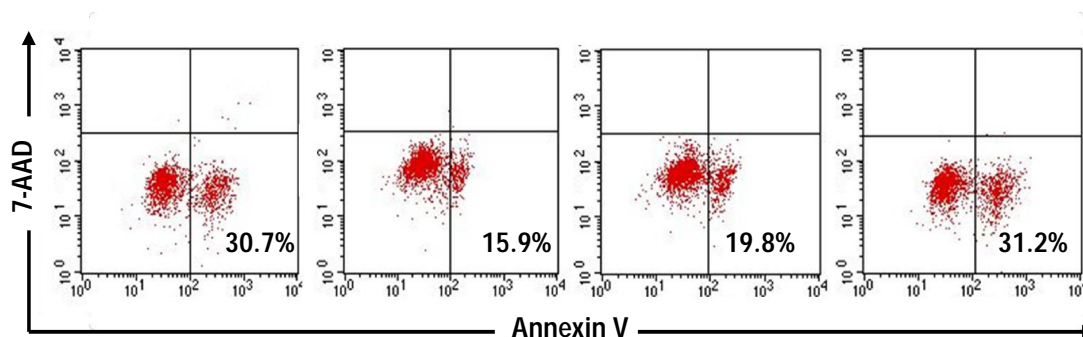
NETs を形成させた培養液に抗癌剤パクリタキセル、アドリアマイシンを添加し、蛍光顕微鏡にて観察を行ったところ NETs と抗がん剤の共局在を認め、抗癌剤が NETs にトラップされたと考えられた。transwell を使用した実験において、下層に添加した抗がん剤の、上層への拡散は、NETs の添加により拡散が抑制されていた。この作用はさらに DNase を添加することにより解除された。

腫瘍細胞をコラーゲンゲルの中に包埋して spheroid 培養を行い、抗癌剤(パクリタキセル、アドリアシン)によるアポトーシスの誘導は、NETs と抗癌剤をあらかじめ混合しておく、アポトーシスが抑制された。さらに、ヌードマウスに形成させた腹膜播種結節を採取し、ex vivo にて抗癌剤の腫瘍内への浸透を調査したところ、NETs と抗癌剤をあらかじめ混合しておく、抗癌剤の浸透が著明に減少し、この作用は DNase により部分的に解除された。以上より、NETs は抗癌剤をトラップすることにより、抗癌剤の拡散を抑制する作用があり、抗癌剤の抗腫瘍効果を減弱させる可能性が示唆された。

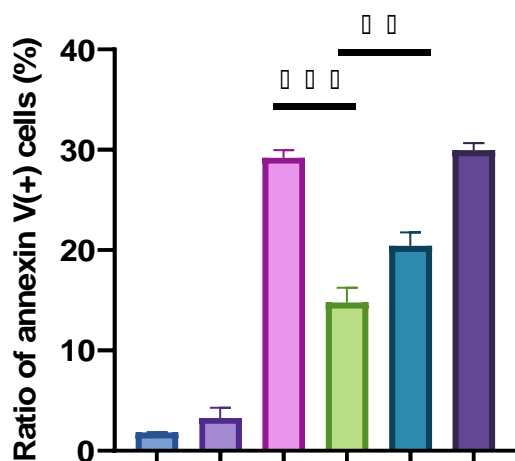


(図 1)A はアドリアマイシンの自家蛍光を TexRed のフィルターにて検出、B は NETs を SYTOX green にて染色し検出。C は、A と B を merge させたもの。NETs とアドリアマイシンの蛍光が部分的に一致しており、NETs によってアドリアマイシンがトラップされたと考えられる。

(A) Apoptosis of KOC-2S in DOX (15mM)

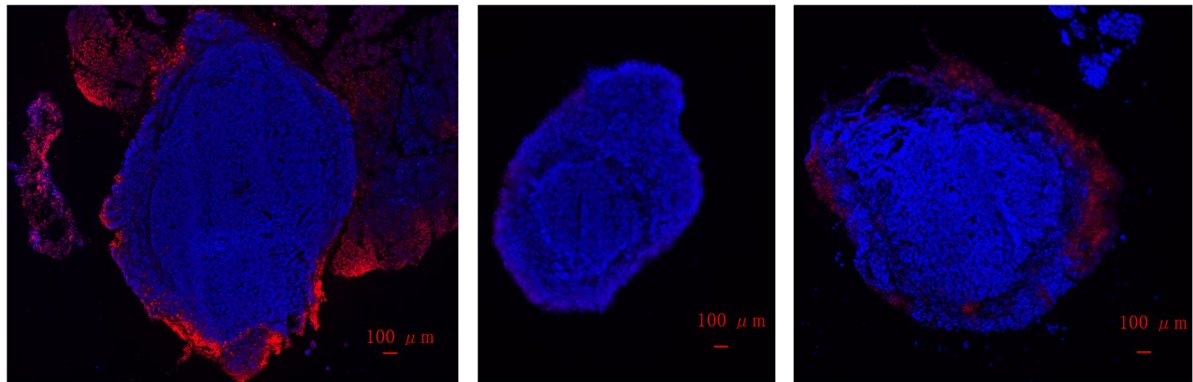


(B) KOC-2S



DOX	-	-	+	+	+	+
NETs	-	+	-	+	+	-
DNase I	-	-	-	-	+	+

(図 2)アドリアマイシンによって誘導される卵巣癌細胞株 KOC-2S のアポトーシス(annexinV 陽性細胞)が、NETs の添加により抑制され、この抑制作用は DNaseI をさらに添加すると、部分的に減弱する。アドリアマイシンに DNaseI を添加しても、有意な変化はみられない(A は flow cytometry の展開図、B は A をグラフ化したもの)。



(図3)ex vivoにおけるアドリアマイシンの播種結節内への浸透に対するNETsの影響  
播種結節内へのアドリアマイシンの浸透(左図)がNETsの添加により抑制され(中央)、NETsとともにDNaseを添加すると結節内への浸透が部分的に回復する(右図)。

免疫能を有するマウスの腹膜播種モデルでも、NETsが同様の播種増強効果が発揮しうるか？この実験系に癌細胞由来エクソソームを共存させることで、上記の現象に如何なる変化が見られるか？の2点に関しては、マウス好中球において、NETs形成を行う必要があったが、マウス好中球におけるNETs形成が困難であったため、これらの実験については計画期間内に進捗させることができず、一部計画を変更して実験を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Y. Kumagai, H. Ohzawa, H. Miyato, H. Horie, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 246
2. 論文標題 Surgical Stress Increases Circulating Low-Density Neutrophils Which May Promote Tumor Recurrence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 52-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2019.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kohei, Tamura. Hideyo, Miyato. Rihito, Kanamaru. Ai, Sadatomo. Kazuya, Takahashi. Hideyuki, Ohzawa. Takahiro, Koyanagi. Yasushi, Saga. Yuji, Takei. Hiroyuki, Fujiwara1. Alan Kawarai, Lefor. Naohiro, Sata. Joji, Kitayama.	4. 巻 -
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps (NETs) reduce the diffusion of doxorubicin which may attenuate its effect to induce apoptosis of ovarian cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田村昂平、金子勇貴、風當ゆりえ、高橋和也、木村有希、齋藤晶、東條峰之、宮戸秀世、大澤英之、嵯峨泰、武井裕二、藤原寛行、北山丈二
2. 発表標題 活性化好中球は複数のメカニズムで活性化T cellの走化性を阻害する
3. 学会等名 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤晶、大澤英之、田村昂平、金子勇貴、風當ゆりえ、高橋和也、木村有希、東條峰之、宮戸秀世、嵯峨泰、佐田尚宏、北山丈二
2. 発表標題 糖尿病治療薬メトホルミンの腫瘍内好中球細胞外トラップ(NETs)に対する影響
3. 学会等名 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 和也, 大澤 英之, 金子 勇貴, 田村 昂平, 木村 有希, 齋藤 晶, 東條 峰之, 金子 理人, 佐田友 藍, 宮戸 秀世, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 PMA刺激好中球が癌細胞の遊走能に与える影響
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 昂平, 金子 勇貴, 風當 ゆりえ, 高橋 和也, 木村 有希, 齋藤 晶, 東條 峰之, 金丸 理人, 佐田友 藍, 宮戸 秀世, 大澤 英之, 嵯峨 泰, 竹井 裕二, 藤原 寛行, 北山 丈二
2. 発表標題 活性化好中球は活性化T細胞の遊走能を抑制する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 和也, 大澤 英之, 木村 有希, 齋藤 晶, 東條 峰之, 熊谷 祐子, 宮戸秀世、北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps promote the invasion of gastric cancer cells in vitro.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北山 丈二  (Kitayama Joji)  (20251308)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	細谷 好則  (Hosoya Yoshinori)  (30275698)	自治医科大学・医学部・教授    (32202)	
研究分担者	大澤 英之  (Ozawa Hideyuki)  (60458271)	自治医科大学・医学部・講師    (32202)	
研究分担者	井上 賢之  (Inoue Yoshiyuki)  (80375279)	自治医科大学・医学部・講師    (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関