

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18040

研究課題名（和文）術後合併症モデルにおけるNETs形成と腫瘍細胞の転移に関する解析

研究課題名（英文）Analysis of NETs and tumor cell metastasis in animal models of postoperative complications

研究代表者

山下 俊樹（YAMASHITA, Toshiki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：10815179

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：悪性疾患に対する高度な侵襲を伴う治療では周術期においてサイトカインストームや凝固系異常が誘発される。近年、炎症と凝固のクロストークによりneutrophil extracellular traps (NETs)が形成され、腫瘍の進展に関わっていることが示唆されている。本研究は、炎症によるNETs形成と腫瘍細胞の転移との関係について、マウスの血行性肺転移モデルを用いて検証を行ない、炎症により肺転移が亢進することが示唆された。次に、ヒト組換え型トロンボモジュリン(rTM)投与による肺転移抑制効果の検討を行ない、rTM投与によりNETs形成および肺転移が抑制されてい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

本研究では、高度の炎症によって形成されるneutrophil extracellular traps (NETs)および肺転移が亢進する可能性が示唆された。さらにトロンボモジュリン(rTM)投与によってNETs形成および肺転移が抑制されている可能性が示唆された。以上より、NETs形成と転移は密接に関わっている可能性があり、更なる機序の解明が今後の治療戦略の改善につながっていく可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Highly invasive treatments for malignant diseases induce cytokine storms and coagulation abnormalities in the perioperative period. In recent years, neutrophil extracellular traps (NETs) are formed by crosstalk between inflammation and coagulation, and are suggested that they are involved in tumor development. In this study, the relationship between inflammation-induced NETs formation and tumor cell metastasis was examined using a mouse hematogenous lung metastasis model. It was suggested that inflammation promotes lung metastasis. And the effect of suppressing lung metastasis by administration of human recombinant thrombomodulin (rTM) was examined. It was suggested that administration of rTM may suppress NETs formation and lung metastasis.

研究分野：消化器外科

キーワード：炎症 腫瘍転移 NETs トロンボモジュリン

1. 研究開始当初の背景

食道癌術後の肺炎合併および術後の高度炎症は OS(Overall survival)、RFS(Recurrence free survival)両方において予後不良因子であることが報告されている。

近年 CTC(circulating tumor cell)が注目されており、術後に残存した CTC は転移成立の過程で重要な働きを担っている。CTC は原発腫瘍組織または転移腫瘍組織から遊離し、血中へ浸潤した細胞と定義されている。CTC は固形がん患者の末梢血中に微量存在しており、他部位への転移能を有する細胞を含んでいる。周囲の間質に浸潤した腫瘍細胞は血管内に侵入し血液循環に入り血管外に漏出した CTC は他組織・臓器へ浸潤し転移巣を形成する。これまでの報告では、食道癌に対して化学療法もしくは化学放射線療法を施行した症例のうち、治療前の CTC 陰性群は予後が良く、また治療後に CTC が陰性化した群は、治療前 CTC 陰性群と同程度に予後良好であった。治療後 CTC 陽性群は有意に予後不良であり、CTC は独立した予後予測因子とされている。

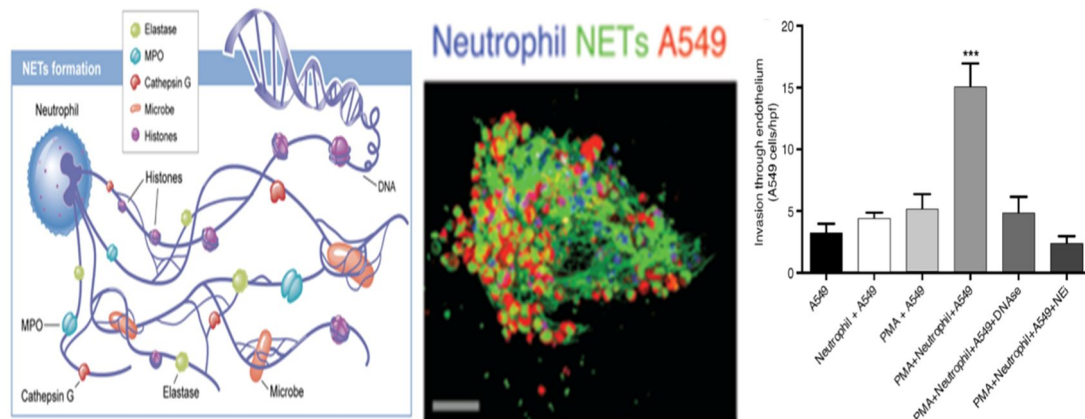


図 1. NETs 形成と腫瘍転移

一方、炎症による NETs(Neutrophil extracellular traps)形成もまた転移における重要な役割を担っている。好中球はサイトカインや血小板の刺激により NETs というヒストンや好中球エラスターゼ、ミエロペルオキシダーゼなどで構成される網状の構造物を形成し、これにより病原体などの全身拡散を防ぐ役割を果たす (immunothrombosis)。しかし、敗血症性 DIC では、過剰な NETs による immunothrombosis の全身への拡散や NETs を構成するヒストンの毒性などによって、多臓器不全へつながるリスクがある。NETs と転移の関連について、既報では、脾注肝転移モデルにおける NETs 形成は、盲腸結紮穿孔法 (Cecal ligation and puncture; CLP) により亢進し、DNA 分解酵素や好中球エラスターゼ阻害薬で抑制された。また、CLP により肝転移は亢進し、DNA 分解酵素や好中球エラスターゼ阻害薬で抑制された。さらに、好中球は PMA 刺激で NETs 形成を亢進させ、図 1 のように腫瘍細胞 (A549) を trap し、血管内皮の通過を促進させた。術後の高度炎症によって生じる NETs は CTC を捕獲し、血管内皮を通過させることで、転移を成立させる一助となる。術後の高度炎症が悪性腫瘍患者の予後を悪化させることが報告されているが、炎症によって生じた NETs 形成がここで重要な役割を果たしていると言える。これら術後転移の一連の経路を、より術後の炎症状態に近く、かつ術後の CTC の状態に近似させたモデルで検証することが必要ではないかと考えた。

2. 研究の目的

食道癌をはじめ高度な手術侵襲を要する消化器系悪性腫瘍疾患では、術後の感染症や合併症に伴う炎症反応が癌細胞の転移に有利な環境を提供し circulating tumor cells(CTC)による転移・再発の引き金となることが危惧されている。

本研究は、癌細胞の転移環境に血管内皮組織の破綻や好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps; NETs)形成が関与すると仮説を立て、術後合併症や感染症モデルを用いて癌転移と NETs の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肺転移モデルの作成と評価

BALB/cAJcl マウス(8~10 週齢/)にマウス由来 sarcoma 細胞株(LM8)の皮下移植を行い、移植 10 日後に腫瘍組織を切除し盲腸結紮穿刺(CLP)を施行した。CLP 施行より3週間後に肺組織を採取し HE 染色による腫瘍結節の評価を行った。

(2) 投薬実験

rTM (3mg/kg/12hr, 100 μ L/回)または生理食塩水(100 μ L/回)でいずれも経皮的腹腔内投与により投与する。CLP を施行し生理食塩水を投与する A 群、CLP を施行し rTM を投与する B 群に分ける。評価項目は、各臓器における転移個数、転移巣の大きさ、微小転移とした。

(3) NETs 形成の評価

各臓器内微小環境における NETs の評価について、組織標本を用いてMPO、H2A.X(好中球、NETs)、CD31(血管内皮)の発現を検証する。また、血中における好中球エラスターゼおよびヒストン・DNA複合体の測定を実施する。

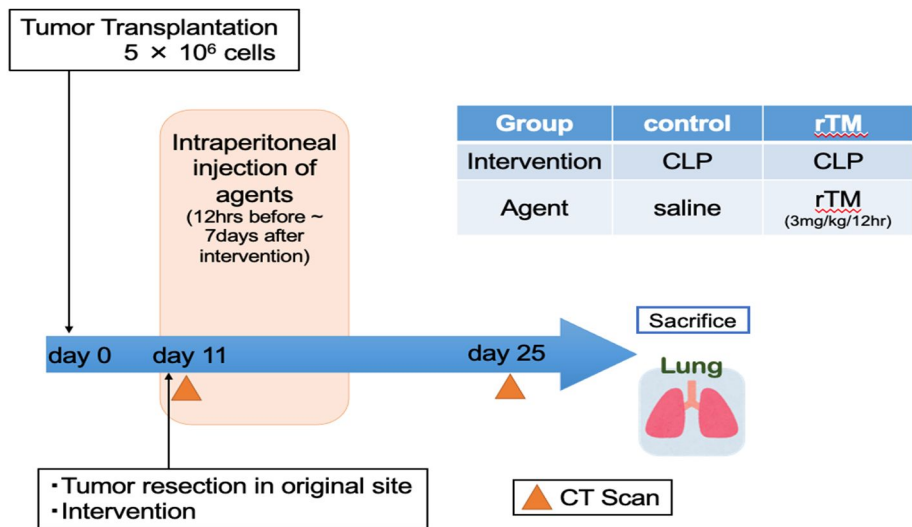


図 2. In vivo 投薬実験

4. 研究成果

悪性疾患に対する高度な侵襲を伴う介入治療では、周術期においてサイトカインストリームや凝固系・内分泌系異常が誘発される。近年、炎症と凝固によるクロストークにより好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs) が形成され、腫瘍の進展に関わっていることが示唆されている。本研究は、炎症による NETs 形成と腫瘍細胞の転移との関係について、血行性肺転移モデルを用いて検証を行なった。さらに、抗凝固作用を有するヒト組換え型トロンボモジュリン(rTM)の投与による転移抑制効果の評価を実施した。C3H/HeNマウスの背部皮下にLM8細胞を移植し腫瘍形成後、切除と同時にCLP(cecal ligation and puncture, 盲腸結紮穿刺)を施行した。肺組織への転移の評価は、CTスキャンおよび病理組織を用いて行なった。CLP非施行群と比べ施行群で、有意に肺組織での転移結節の増加を認め、炎症によって転移が亢進することが示唆された。次に、rTM投与による肺転移抑制効果の検討を行なった。転移の評価は同様にCTおよび病理組織を用いて行

なった。結果としてrTM投与群では、有意に転移が抑制された。また生存個体数についてもrTM投与群で有意に多い結果となった(図3)。

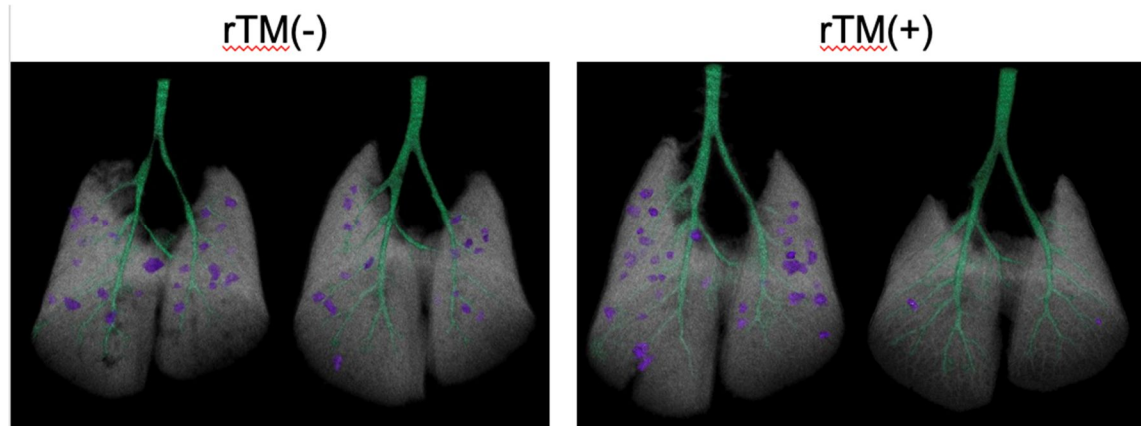


図 3. CT 画像による肺転移抑制効果

NETs構成成分である血中の好中球エラスターゼおよびヒストン・DNA複合体を測定も併施した結果、rTM投与によりこれらが有意に抑制されることが確認された。この結果よりrTM投与によりNETs形成が抑制されている可能性が示唆された。今後、肺組織におけるNETs形成と腫瘍結節について、免疫染色法による評価を実施する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------