

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07596

研究課題名(和文)好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍における癌幹細胞による好中球細胞外トラップ誘導機構

研究課題名(英文)The mechanism by which cancer stem-like cells mediated induction of NETosis in the malignant tumor of the uterus displaying neutrophilia.

研究代表者

馬淵 誠士(Mabuchi, Seiji)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・がん創薬部・婦人科部長

研究者番号：00452441

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):これまでの研究において、我々は、好中球増加を伴う子宮悪性腫瘍モデルにおいて、好中球/MDSC/CSCが増加していること、MDSCは、子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌細胞の癌幹細胞化を促進することを見いだした。またCSCが、Non-CSCに比して抗腫瘍免疫の監視を逃れやすい性質を有していることも明らかにした。さらに、好中球増加を伴う子宮悪性腫瘍のマウスモデルおよび子宮頸がん患者の腫瘍内において、Netosisが誘導されていることを確認した。現在、CSCまたはNon-CSCとMDSCまたは好中球を共培養することによって、両者のNETs誘導能を比較する研究は現在実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は「好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍」というUnmet needを世界に先駆けて報告し、有効な治療法を開発すべく研究を行ってきた。本研究では、好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍のマウスモデルおよび患者検体において、NETosisが誘導されていることを見いだした。これは、「好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍の予後不良のメカニズム」の一端を明らかにするものである。研究期間内に、NETosis誘導のメカニズムを解明するに至らなかったが、今後も研究を継続する。本研究の成果は婦人科悪性腫瘍のみならず、好中球増多を伴う他の悪性腫瘍の新たな治療標的(NETosis誘導機構)を示唆するものであり、医学的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文): In the current study, we first showed that neutrophils, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and cancer stem-like cells (CSCs) are increased in an experimental models of neutrophilia-positive uterine cancers or in cervical cancer patients. We next showed that MDSC enhance the stem-like cell properties of uterine cervical, endometrial and ovarian cancer. We also found that MDSC do not only increase the stemness of ovarian cancer cells, but they also increase tumor PD-L1 expression, indicating that CSCs have higher ability to escape from immune surveillance when compared with non-CSCs. Finally, we showed that NETosis were induced in an experimental models of neutrophilia-positive uterine cancers or in cervical cancer patients. Currently, we are investigating the mechanism by which cancer stem-like cells mediated induction of NETosis.

研究分野：婦人科悪性腫瘍と免疫逃避機構

キーワード：好中球細胞外トラップ 免疫逃避機構 子宮悪性腫瘍 骨髄由来抑制細胞

1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs) は好中球顆粒由来の抗菌物質や好中球エラスターゼを含み、病原体の捕獲除去を介して感染防御に資する一方で、癌細胞の転移・浸潤にも関与する可能性が報告されている (Cedervall J, et al. Cancer Res. 2016;76:4311-5.). 癌幹細胞 (Cancer Stem like cells:以下 CSC) に関する研究は 1990 年代後半より開始され、CSC が抗癌剤や放射線に耐性を示すだけでなく、高い腫瘍形成能を有するため、癌の再発や転移の原因になる可能性が報告されている。

本研究は、腫瘍随伴性好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍という難治性の病態に対する新規治療の開発と、予後不良のメカニズムを解明するために計画されたものである。これまでに我々は、好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍の微小環境には多数の好中球が浸潤していること、腫瘍由来の G-CSF によって誘導された骨髄由来抑制細胞 (MDSC) が PGE2 の産生を介して癌細胞の幹細胞化を引き起こすこと、MDSC が CSC の誘導に関わることを見いだしてきた。しかし、誘導された CSC が周囲の微小環境にどのような影響を及ぼすか、またそれによって転移が促進されるのかは不明であった。

我々は、腫瘍由来の G-CSF は NETs 形成を促進するとの報告 (Demers M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109:13076-81)、好中球と同一起源で形態的にも酷似した MDSC (PMN-MDSC) が Netosis を誘導しうるとする報告 (Kamioka Y, et al. Cancer Sci. 2017 Feb;108(2):226-235.) に着目し、「好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍において、CSC は自身が転移するために PMN-MDSC を刺激し、好中球細胞外トラップ (Netosis) を利用する」という仮説を立て、本研究を計画した。

2. 研究の目的

腫瘍随伴性好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍は、従来の放射線治療や化学療法に耐性を示し、患者の多くは不良な転機をたどる。本研究は、本病態を臨床モデルとして位置づけ、その予後不良のメカニズムの一端を明らかにし、有効な治療法を見いだすことを目的としたものである。特に焦点を当てるのは、癌幹細胞、好中球、好中球細胞外トラップ (Netosis) である。

具体的には、腫瘍随伴性好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍において NETosis が誘導されているか、NETosis における CSC 存在の検討、NETosis の誘導に関わる細胞 (CSC の関与)、CSC が NETosis 誘導に関わるとすればそのメカニズム、NETosis を標的とした子宮悪性腫瘍の治療法の有用性、の 5 つを明らかにすることである。これらは、「CSC 由来の因子による好中球の制御機構」という科学的な新規性に加え、「好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍の予後不良のメカニズムの解明と新規治療法の開発」という臨床的な重要性を併せ持つ内容である。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、以下の研究を計画した。

(1) 研究 1: 腫瘍随伴性好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍において NETosis が誘導されているか同意の下に採取・保管された子宮頸がん患者および健常ボランティアの血液および子宮頸がん検体を用い、MPO-DNA 複合体を標的とした ELISA とシトルリン化ヒストンを指標とした免疫組織染色を実施。

(2) 研究 2: NETosis における CSC 存在の検討

子宮悪性腫瘍の初回治療の際に採取した腫瘍検体を用い、免疫 (蛍光) 染色を行い、腫瘍血管中の NETs の存在および NETs-CSC クラスターの形成を確認。観察された NETosis と癌幹細胞数、MDSC 数を解析。

(3) 研究 3: NETosis の誘導に関わる細胞 (CSC の関与)

健常人末梢血から密度勾配遠心法により好中球を分離。子宮癌の細胞株中の CSC または Non-CSC と好中球を Poly-L-lysine コートディッシュ上で共培養する (PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate の添加・非添加条件下に)。形成される NETs を二群で比較することで、CSC と Non-CSC の NETs 誘導能を評価する。NETs の確認には抗 Histone H3 抗体を用いた免疫染色、Sytox green を用いたフローサイトメトリー法で行う。

(4) 研究 4: CSC が NETosis 誘導に関わるとすればそのメカニズムの検討

CSC 単独または好中球と共培養した後に、CSC および上清を回収。プロテインアレイおよび遺伝

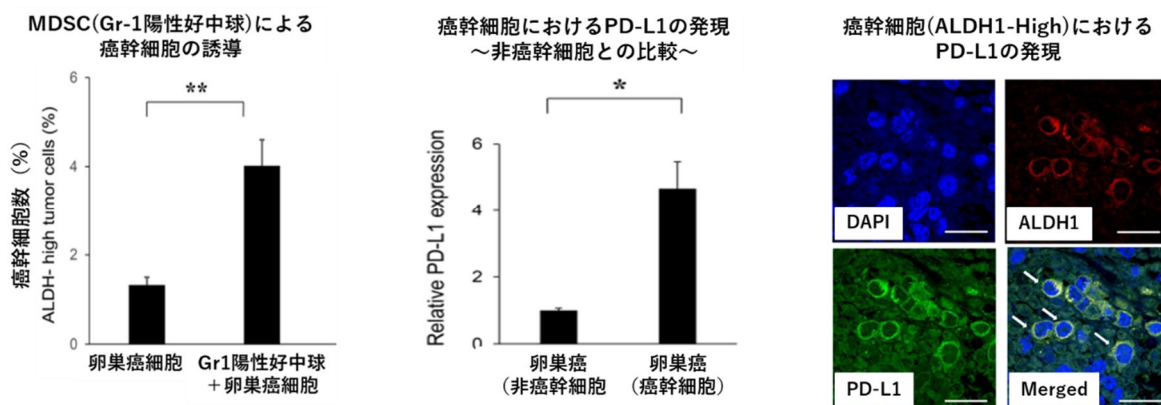
子発現アレイを行い、CSC が NETosis を誘導するために放出する因子 X 候補を同定する。好中球に因子 X 候補を投与し、NETosis が誘導されるかを検討。

(5) 研究 5 : NETosis を標的とした子宮悪性腫瘍の治療法の有用性
腫瘍随伴性好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍のマウスモデルに以下の4種のNETs形成阻害を行い、その転移抑制効果を検証する : a, 好中球の阻害 : Gr-1 中和抗体、b, NETs 形成阻害 : PAD4 阻害薬、c, NETs の分解 : DNase1、 d, 因子 X の阻害。

4 . 研究成果

2020-2022 年度に、我々は、「好中球増多を伴う婦人科悪性腫瘍において、PMN-MDSC によって誘導された CSC は、血管内に侵入した後、循環血液中において何らかの方法で好中球または PMN-MDSC を刺激し、好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps、以下 NETs) を形成させ、CSC は Nets の中に身を置くことで、抗腫瘍免疫の監視を逃れ、自身の血管外進展を有利にする」との仮説を立て、研究を行った。

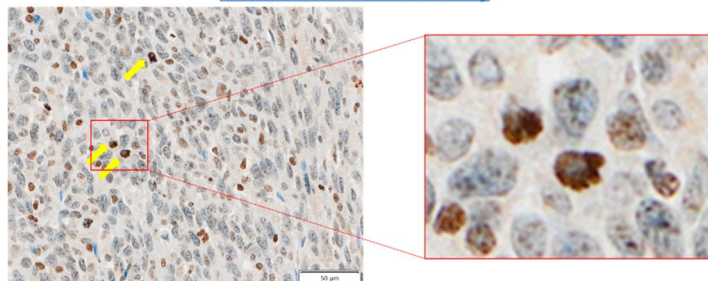
2020-2021 年度の研究により、好中球増多を伴う婦人科悪性腫瘍の動物モデルから抽出した PMN-MDSC を、子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌細胞と共培養することにより、これらのいずれの細胞に対しても癌幹細胞化を促進することを見出した。下図 (左) は卵巣癌細胞と PMN-MDSC の共培養の結果を示しており、PMN-MDSC が卵巣癌の幹細胞化を促進していることを示している。また、CSC が、Non-CSC に比して、programmed death ligand 1 (PD-L1) の発現が強いことも明らかになった。下図 (中) がこれを示すものである。卵巣癌の癌幹細胞 (ALDH-High 細胞) と非幹細胞 (ALDH-Low 細胞) の PD-L1 発現を qRT-PCR で比較したものであるが、癌幹細胞において PD-L1 の発現が強いことが分かる。また、下図 (右) は、卵巣癌の癌幹細胞を使った免疫蛍光染色であるが、癌幹細胞には PD-L1 が強く発現し、これが ALDH1 発現 (幹細胞性を示す) と重なることが分かる。



これらの結果は、PMN-MDSC が婦人科癌の幹細胞化を促進して治療抵抗性に寄与する可能性を示唆するだけでなく、癌幹細胞が PD-L1 の発現亢進を介して、抗腫瘍免疫の監視から逃れやすい性質を有していることを示唆する結果と解釈できる。つまり、これらの経路を抑制するストラテジーが、婦人科癌、特に好中球増多を伴う婦人科癌の新たな治療になり得ることが示唆される (Cancer Immunol Immunother. 2020 Dec;69(12):2477-2499)。

2021-2022 年度は、好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍の腫瘍検体・血液検体において、NETosis が誘導されていることを確認した。右図は、子宮頸がんの手術検体の免疫組織染色 (抗ヒストン H3 抗体) の結果である。腫瘍内に侵入した好中球からヒストンがしみ出していることが見て取れる (NETosis)。

好中球増多を伴う子宮頸がんにおける Netosis の誘導
IHC: Anti-Histone H3 antibody



現在は、好中球増多を伴う子宮悪性腫瘍における NETosis 形成に CSC が関与しているか、CSC が NETosis 内に存在するか、またそのメカニズムについて検討を行っている段階である。現時点では結論は出ておらず、研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mabuchi S, Komura N, Kodama M, Maeda M, Matsumoto Y, Kamiura S.	4. 巻 29
2. 論文標題 Significance of the Number and the Location of Metastatic Lymph Nodes in Locally Recurrent or Persistent Cervical Cancer Patients Treated with Salvage Hysterectomy plus Lymphadenectomy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr Oncol.	6. 最初と最後の頁 4856-4867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curroncol29070385	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mabuchi S, Komura N, Kodama M, Matsuzaki S, Matsumoto Y, Kamiura S, Kimura T.	4. 巻 49
2. 論文標題 Impact of lymphadenectomy in patients with locally recurrent or persistent cervical cancer treated with salvage hysterectomy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 717-724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15495	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mabuchi Seiji, Sasano Tomoyuki, Komura Naoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Ovarian Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 329 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020329	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimura Kotaro, Mabuchi Seiji, Komura Naoko, Yokoi Eriko, Kozasa Katsumi, Sasano Tomoyuki, Kawano Mahiru, Matsumoto Yuri, Watabe Tadashi, Kodama Michiko, Hashimoto Kae, Sawada Kenjiro, Hatazawa Jun, Kimura Tadashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Prognostic significance of bone marrow FDG uptake in patients with gynecological cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2257-2257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81298-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komura Naoko, Mabuchi Seiji, Shimura Kotaro, Yokoi Eriko, Kozasa Katsumi, Kuroda Hiromasa, Takahashi Ryoko, Sasano Tomoyuki, Kawano Mahiru, Matsumoto Yuri, Kodama Michiko, Hashimoto Kae, Sawada Kenjiro, Kimura Tadashi	4. 巻 69
2. 論文標題 The role of myeloid-derived suppressor cells in increasing cancer stem-like cells and promoting PD-L1 expression in epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2477 ~ 2499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02628-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 甲村奈緒子, 馬淵誠士
2. 発表標題 婦人科悪性腫瘍における骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の機能の解明
3. 学会等名 第35回日本生殖免疫学会総会・学術集会 (招待講演)
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	松原 翔 (Matsubara Sho) (20825236)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	R3.2.26 削除
研究分担者	小林 浩 (Kobayashi Hiroshi) (40178330)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	R3.11.5 削除
研究分担者	川口 龍二 (Kawaguchi Ryuji) (50382289)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	R3.11.5 削除

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	竹田 善紀 (Yoshiki Takeda) (50825239)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	R3.11.5 削除
研究分担者	三宅 龍太 (Ryuta Takeda) (20866008)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	R3.2.26追加, R3.11.5削除

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