

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17629

研究課題名(和文) 消化器がんに対する免疫応答における好中球細胞外トラップの意義の解明

研究課題名(英文) Neutrophil extracellular trap and immune response in gastrointestinal tumor

研究代表者

佐田友 藍 (Sadatomo, Ai)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：40528585

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)：末梢血好中球をLPSで刺激して作成したNETsは単球からM2マクロファージへの分化を阻害し、T細胞の増殖を回復する作用を有していた。一方で、NETsは活性化T細胞のCXCL-11に対する走化性を強く抑制した。ヒト大腸癌組織中のNETsの密度はCD3(+)CD8(+)T細胞の密度と逆相関していた。これらの事実から、固形腫瘍内のNETsはがんを促進する作用と抑制する作用の両方を有しており、固形腫瘍の切除標本におけるNETsの定量は免疫療法に対する感受性や患者予後と相関する可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの進展に対する好中球の役割とその機序は十分に解明されていない。本研究にて、活性化好中球由来のNETsがマクロファージの分化を制御すること、活性化Tリンパ球の浸潤を抑制することが新たに判明した。また、ヒト大腸癌切除標本の免疫染色にて、NETsの量がCD8(+)T細胞の浸潤度と逆相関することから、NETsの定量が免疫チェックポイント阻害療法の感受性と相関する事実が解り、臨床応用への道が開かれたという点で社会的意義も大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：NETs produced by stimulating peripheral blood neutrophils with LPS inhibited the differentiation of monocytes into M2 macrophages and restored the proliferation of T cells stimulated with anti-CD3 mAb. On the other hand, NETs strongly suppressed the chemotaxis of activated T cells to CXCL-11 probably through the degradation of chemokines. The density of NETs in human colon cancer tissues was inversely correlated with the density of CD3(+)CD8(+) T cells, suggesting NETs inhibits the infiltration of T cells in tumor tissue. These facts suggest that NETs in solid tumors have both cancer-promoting and inhibitory effects. However, given that the response to immune checkpoint inhibition therapy is dependent on the accumulation of cytotoxic T cells in tumor stroma, NETs may be negatively associated with patient outcome. Quantification of NETs in resected solid tumor specimens might be a biomarker to predict the sensitivity to immunotherapy.

研究分野：消化器外科学

キーワード：好中球細胞外トラップ マクロファージ T細胞 ケモタキシス CXCL-11 細胞運動 免疫チェックポイント分子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ(NETs)は、細菌などの病原体を捕捉し、感染の拡大を防止する生体防御機構であるが、近年の研究でがんの進展を促進する役割を持つことが解ってきた。固形がんの微小環境内には多量の NETs が存在する事実が報告されており、NETs に高密度に付着したプロテアーゼがケモカインを分解する能力を持つことも報告されている。しかし、腫瘍内の NETs が微小環境内での免疫応答をどのように制御するかはよく解っていない。そこで、本研究では NETs が、腫瘍関連マクロファージ(TAM)の分化および腫瘍浸潤リンパ球(TILs)の性質に如何なる影響を与えるか? について、*in vitro* 実験とヒト検体の免疫染色を用いて検討することにした。

## 2. 研究の目的

活性化好中球由来の NETs が、単球の分化、活性化 T 細胞の走化性に及ぼす影響とその分子メカニズムを追求する。また、ヒト癌の切除検体を用いて免疫組織化学染色を行い NETs と TAM、TILs の密度、局在様式を客観的に評価し、NETs ががん微小環境における免疫応答に与える影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) NETs の産生方法

健康人由来の好中球を密度勾配遠心で分離後に LPS 10 $\mu$ g/ml の濃度で 30 分刺激後に、洗浄を行い、4 時間培養して NETs を誘導した。これを **whole NETs** と定義する。一方で、**whole NETs** を 1500rpm, 18000rpm で 10 分ずつ遠心後に NETs 成分を除いた上清を **NETs-depleted supernatant : NETs-depleted SN** と定義した。

### (2) マクロファージ分化に与える NETs の影響

健康人末梢血から単核細胞 (PBMC) を採取、AutoMACS<sup>®</sup> Pro Separator を使用したポジティブセレクション法により CD14(+)単球(PBMo)を分離し、M-CSF (50 ng/ml)を添加した培地で 5 日間培養する実験系に、NETs を加え、そのフェノタイプを FACS にて検討した。また CFSE にて蛍光染色した PBMC を **CD3** 抗体で刺激し、分裂能を測定する実験系に、これらのマクロファージを添加し、その蛍光量の変化で T 細胞の増殖の変化を検討した。

### (3) T リンパ球の走化性に対する NETs の影響

健康人由来の **PBMC** を密度勾配遠心で分離後、**CD3** 抗体と **IL-2 (10ng/ml)** で 7-14 日間培養を行い、活性化 T 細胞を作成した。この T 細胞をカルセイン染色し、ダブルチャンバーの上層に、下層に **CXCL-11(1 $\mu$ g/ml)** を加え、2 時間後に下層へ遊走したリンパ球をフローサイトメトリーで測定する実験系に **whole NET** や **NETs-depleted SN** を投与し、その変化を検討した。

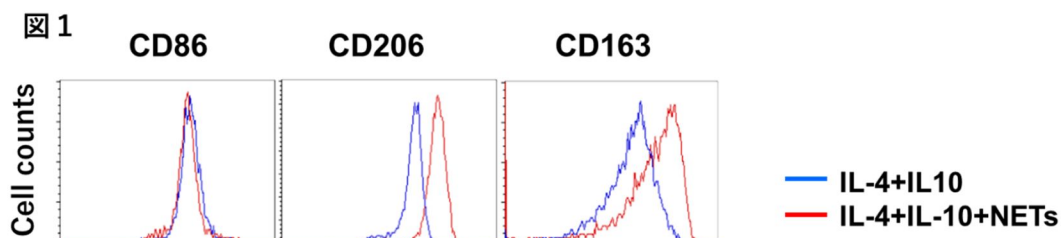
### (4) 免疫組織染色

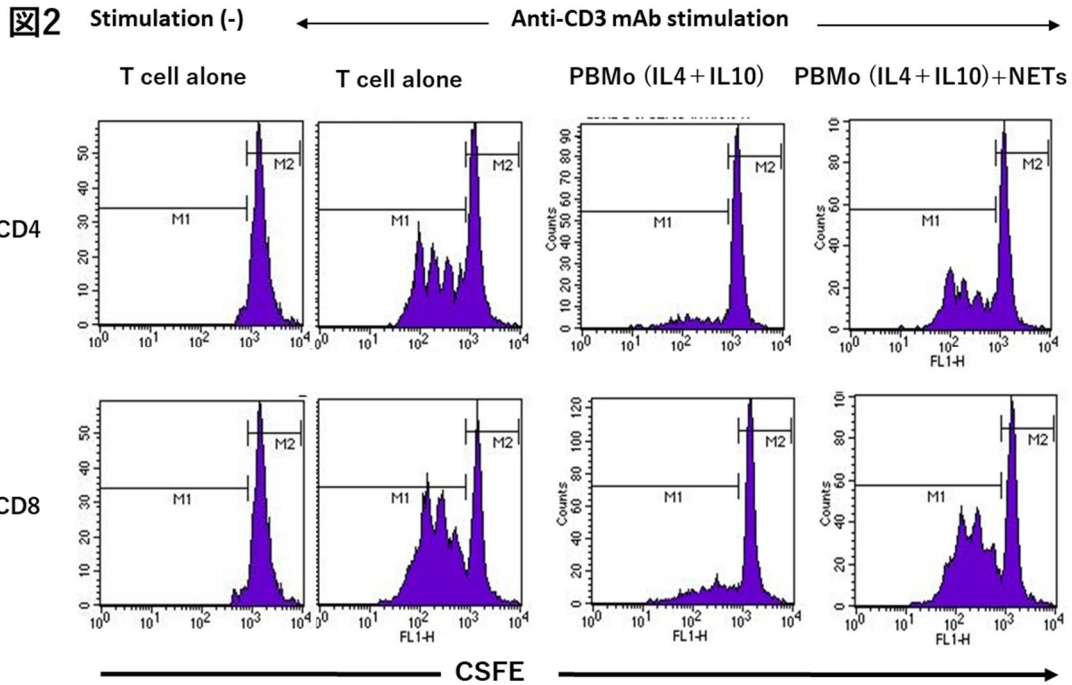
ヒト大腸癌 63 例の手術切除検体を用いて、組織切片を作成、好中球に特異的な **CD66b**、NETs に特異的な **Cit-H3** 抗体を用いて NETs を同定するとともに、好中球、マクロファージ、リンパ球のフェノタイプとその密度を免疫染色にて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) マクロファージ分化に与える NETs の影響

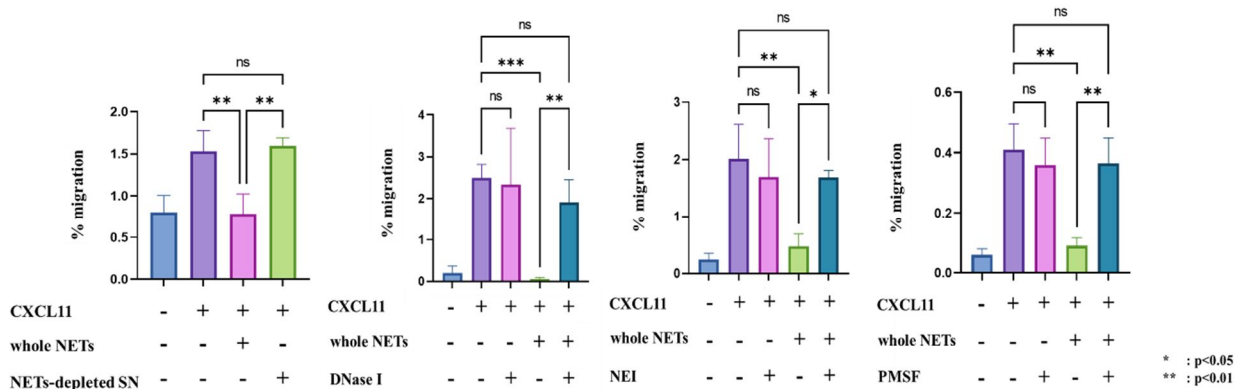
IL-4+IL-10 で培養した PBMo は CD163、CD206 の発現が有意に増強し、M2 型 マクロファージ(M2)への分化を示し、T 細胞の増殖を 50%程度まで低下させた。しかし、分化過程で NETs を添加すると、CD206、CD163 の発現は有意に抑制され、T 細胞の増殖に対する抑制効果は著明に低下した (図 1, 2)。





**(2) NETs が T リンパ球の CXCL11 に対する走化性に与える影響**

好中球を LPS で刺激し作成した **whole NETs** は、T リンパ球の遊走を抑制したが **NETs-depleted SN** では抑制されなかった。また、LPS 刺激により産生した **whole NETs** に **DNase I** や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**)を添加すると T リンパ球の遊走は抑制されなかった(図 3)



**図 3 LPS 刺激好中球による T cell 遊走抑制**

\*:p<0.05, \*\*:p<0.01, \*\*\*:p<0.001

**(3) ヒト大腸癌における NETs と TILs の検討**

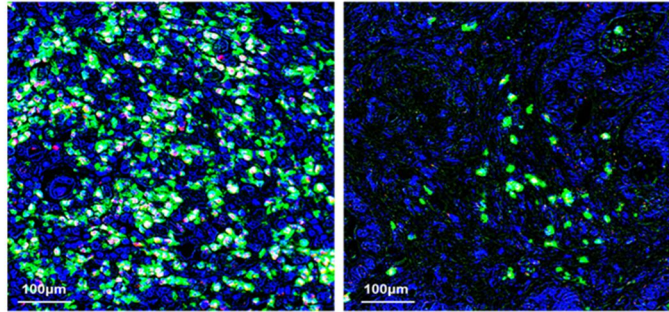
**CD66b(+)**細胞を浸潤好中球 (TAN)、**CD66b(+)**Cit-H3(+) 細胞を **NETs** として同定すると、それらの密度は **CD3(+)****CD8(+)**T 細胞の密度と逆相関していた(TAN:  $r=-0.23$ , NETs: $-0.26$ ,  $p<0.05$ ) (図 4)。

**(4)まとめ**

がん微小環境に存在する **NETs** は **M2** マクロファージへの分化を阻害する一方で、**CXCL11** などのケモカインに対する活性化 T リンパ球の腫瘍内への浸潤を抑制することが示唆された。免疫チェックポイント阻害療法の効果は腫瘍内の T 細胞の浸潤程度と強く相関することから、固形腫瘍の切除標本における **NETs** の定量は免疫療法に対する感受性や患者予後を予測するマーカーとなる可能性があると考えられた。

図 4

Hematoxylin (青)  
CD66b (緑)  
Cit-H3(赤)



Hematoxylin (青)  
CD3 (緑)  
CD8(赤)

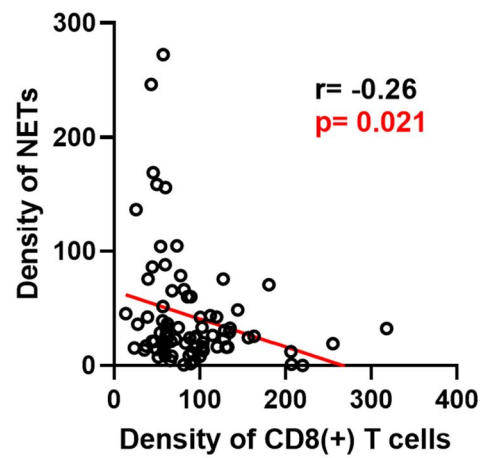
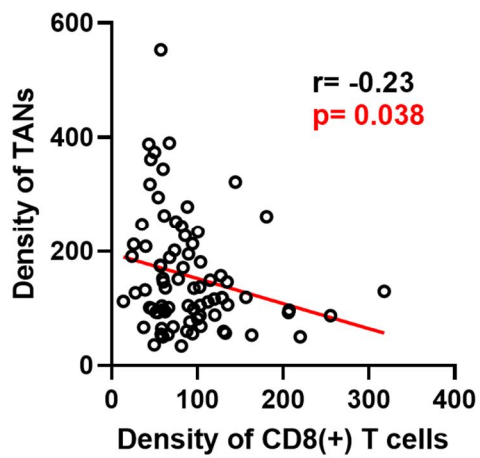
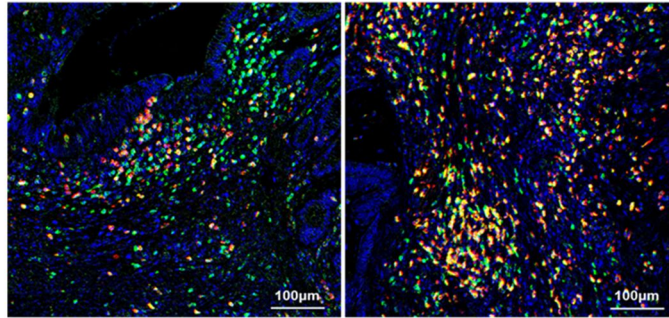


図 4. ヒト大腸癌組織における好中球、NETs と CD8(+) 細胞リンパ球の浸潤様式 (上：代表例、下：相関性)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Futoh Yurie, Kumagai Yuko, Miyato Hideyo, Ozawa Hideyuki, Kanamaru Rihito, Sadatomo Ai, Ohnishi Yasuharu, Koinuma Koji, Horie Hisanaga, Yamaguchi Hironori, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 7
2. 論文標題 Peripheral low-density granulocytes after colorectal cancer surgery in predicting recurrence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BJS Open	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） 10.1093/bjsopen/zrac154	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 Tamura Kohei, Miyato Hideyo, Kanamaru Rihito, Sadatomo Ai, Takahashi Kazuya, Ohzawa Hideyuki, Koyanagi Takahiro, Saga Yasushi, Takei Yuji, Fujiwara Hiroyuki, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 8
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps (NETs) reduce the diffusion of doxorubicin which may attenuate its ability 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 e09730 ~ e09730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e09730	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 H. Ito, H. Kimura, T. Karasawa, S. Hisata, A. Sadatomo, Y. Inoue, N. Yamada, E. Aizawa, E. Hishida, R. Kamata, T. Komada, S. Watanabe, T. Kasahara, T. Suzuki, H. Horie, J. Kitayama, N. Sata, K. Yamaji-Kegan, M. Takahashi.	4. 巻 205(5)
2. 論文標題 NLRP3 Inflammasome Activation in Lung Vascular Endothelial Cells Contributes to Intestinal Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Immunol	6. 最初と最後の頁 1393-1405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2000217	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 風當ゆりえ, 北山丈二, 金子勇貴, 高橋和也, 木村勇希, 太田学, 熊谷祐子, 太白健一, 直井大志, 佐田友藍, 井上賢之, 大澤英之, 宮戸秀世, 鯉沼広治, 佐久間康成, 堀江久永, 細谷好則, 佐田尚宏
2. 発表標題 大腸癌患者の術後末梢血中低比重好中球と予後の関連性
3. 学会等名 第77回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 風當ゆりえ, 北山丈二, 金子勇貴, 高橋和也, 木村有希, 熊谷祐子, 太白健一, 直井大志, 佐田友藍, 大澤英之, 宮戸秀世, 鯉沼広治, 堀江久永, 山口博紀, 佐田尚宏
2. 発表標題 大腸がん患者の術直後の血中低比重好中球比率が補助化学療法の再発予測因子となるか
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
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 巷野 佳彦, 堀江 久永, 津久井 秀則, 本間 祐子, 熊谷 祐子, 東條 峰之, 佐田友 藍, 清水 徹一郎, 直井 大志, 田原 真紀子, 伊藤 誉, 井上 賢之, 鯉沼 広治, 佐久間 康成, 細谷 好則, 味村 俊樹, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 当院における内視鏡摘除後のT1直腸癌追加腸切除適応症例についての検討
3. 学会等名 日本大腸肛門病学会雑誌
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原 真紀子, 堀江 久永, 佐田友 藍, 直井 大志, 巷野 佳彦, 鯉沼 広治, 味村 俊樹, 細谷 好則, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 当科における下部直腸癌に対するtaTMEの導入と短期治療成績
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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