

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890019

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップに焦点を当てた新視点からのがん細胞制御の研究

研究課題名(英文)Focus on neutrophil extracellular traps to control tumor cells

## 研究代表者

鴨志田 剛 (Kamoshida, Go)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：40707410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：がんも炎症であり、様々な免疫細胞がその組織に浸潤し、がん細胞の悪性挙動に影響を与えている。我々は、近年発見された、好中球の新たな細胞死であり、生体防御機構でもある好中球細胞外トラップ(NETs)に焦点を当て、がん細胞と好中球の相互作用の検討を行った。

まずはじめに、細菌を用いてNETsを評価する実験系を確立し、投稿論文の形で報告した。次に、確立したNETs評価系を用いて、がん細胞と好中球の相互作用を解析したところ、がん組織に浸潤した好中球がNETs形成を介して、がんの浸潤・転移を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Various immune cells were infiltrated in tumor tissue because tumor is inflammation and affect the malignant behavior of tumor cells. We investigated that interaction of tumor cells and neutrophils focusing on neutrophil extracellular traps (NETs) which is a new cell death and biological defense mechanism of neutrophils.

First, experimental system using bacteria to evaluate the NETs was established and reported. Then, by using the established NETs evaluation system, interaction of tumor cells and neutrophils was analyzed. As a results, it suggested the possibility that neutrophils infiltrating tumor tissue were promoted the invasion and metastasis of tumor via NETs formation.

研究分野：腫瘍学

キーワード：NETs 好中球 細胞外 DNA MMP がん浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

がんは日本で死因第一位を占める疾患である。そのがんも炎症であり、様々な免疫細胞が、がん組織に誘引され浸潤している。近年、腫瘍細胞と近傍の非腫瘍細胞との相互作用によって作り出されるがん微小環境が、がんの進行に重要であると考えられている。

がんの間質に浸潤する免疫細胞の中で、マクロファージの研究が最も進んでおり、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) と呼ばれ、がん細胞の挙動に影響を与えていることが数多く報告されている。TAM は抗腫瘍作用を発揮する一方で、がんの浸潤・転移や血管新生を誘導し、腫瘍進展に対し促進的に働くこともあり、二面的な作用が知られている。我々はこれまで、がん細胞と単球の相互作用の解析を行い、がん細胞が産生する細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) タンパク質が単球の TAM への分化に重要な役割を果たすことを明らかとしている。

また、好中球も通常の炎症病態と同様に、がんにおいても最初に浸潤する免疫細胞である。しかし、好中球の寿命は非常に短く、マクロファージ (TAM) に比べると好中球とがんの関係はあまり解析が進んでいない。近年、好中球が自ら、apoptosis でも necrosis でもない“ETosis”という白血球における新たな細胞死経路で細胞死を引き起こし、核の破壊を伴う細胞死が惹起され、自己の DNA とクロマチン、好中球エラスターゼなどを含む抗菌性タンパク質を成分とする好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs) とよばれる網目状のトラップを形成し、効率よく細菌を補足し、不活化するという機構が明らかになった。NETs は感染防御に有効な機構である一方、本来細胞内に存在する因子が細胞外に放出されることにより、炎症や自己免疫疾患の発症、血栓などを誘発することも指摘され、二面的な作用があることが知られている。しかし、NETs の詳しいメカニズムや働きは、未だ解明されておらず、今後、免疫細胞の働きを理解する上で、非常に重要な課題である。さらに、NETs のがんにおける働きに注目した研究は皆無である。

## 2. 研究の目的

我々は、がん組織に浸潤した好中球が、がん細胞との相互作用により活性化し好中球細胞外トラップ (NETs) を引き起こし、がん浸潤・転移、血管新生に寄与をしている可能性を考えた。本研究では、NETs が、がん細胞や単球など免疫細胞の活性化の場となり、がん浸潤や血管新生を調節し、がん転移に影

響を与えている可能性を検討することを目的とした。

(1) 好中球細胞外トラップ (NETs) の誘導方法や評価系は未だ確立されていない。そこで、NETs の評価系の確立を行うことをまずはじめの目的とした。

(2) 好中球とがん細胞の相互作用により、NETs が誘導されるかどうか、確立した NETs の評価系を用いて解析を行う。また NETs が、がん細胞の悪性挙動に与える影響を検討する。

(3) NETs を含め、単球の TAM への分化に影響を与える因子の同定を行い、その役割を明らかとする。

## 3. 研究の方法

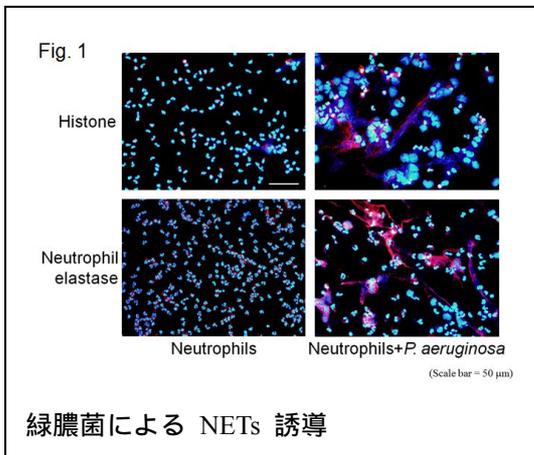
(1) 好中球細胞外トラップ (NETs) を誘導評価する実験系を確立するために、ヒト末梢血より分離した好中球を細菌 (緑膿菌: *P. aeruginosa* や アシネトバクター・バウマニ: *A. baumannii*) と共培養し、蛍光免疫染色などを用い、NETs 形成を評価した。

(2) 好中球にがん細胞の培養上清を加え培養し、NETs の誘導の有無を評価した。次に、好中球の存在下におけるがん細胞の浸潤能をポイデンチャンバーを用いた *in vitro* 浸潤実験系で解析した。

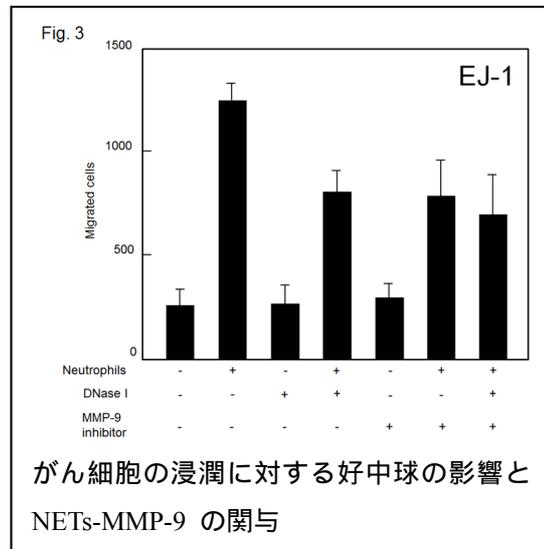
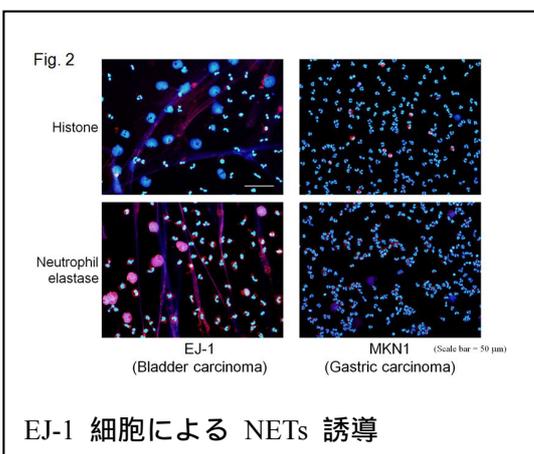
(3) NETs は好中球エラスターゼなどのプロテアーゼを豊富に含んでいるため、微小環境中の ECM タンパク質が修飾を受け、単球の TAM への分化に影響を与えている可能性を考えた。我々はこれまでに、*in vitro* で TAM を誘導し評価する実験系を確立している。そこで上皮基底膜の主要な ECM タンパク質の 1 つであるラミニン-332 (ラミニン-5) の単球分化に対する影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 好中球を *P. aeruginosa* と 1 h 共培養することによって、好中球の核の放出、DNA と共局在するヒストンと好中球エラスターゼが観察された (Fig. 1)。このように、*P. aeruginosa* で好中球を刺激することによって、NETs が形成されることが明らかとなった。しかし一方で、*A. baumannii* での刺激では、NETs 形成は極めて少なかった。本研究を通じて、NETs を誘導、解析、定量する実験系の確立に成功し、投稿論文の形で報告した。



(2) 好中球を膀胱がん細胞株 EJ-1 の培養上清を用い培養することで NETs が誘導された (Fig. 2). またこの時、タンパク分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP)-9 の産生も増強しており、NETs 上に MMP-9 の局在が観察された。しかし、胃がん細胞株 MKN1 の培養上清では NETs 形成は認められなかった。次に、好中球の存在下におけるがん細胞のマトリゲルへの浸潤をボイデンチャンバーを用いた浸潤実験系で評価したところ、EJ-1 細胞の浸潤能は好中球の存在下で有意に増強された。しかし、MKN1 細胞ではそのような浸潤能増強は起こらなかった。さらに、実験系に NETs を分解する DNase I を添加することで、好中球による EJ-1 細胞の浸潤能増強は抑制された。また、DNase I と MMP-9 阻害剤を同時添加したところ、単独添加と同程度の浸潤増強抑制効果が認められた (Fig. 3)。このことから、EJ-1 細胞は NETs-MMP-9 を利用することで高い浸潤能を示すことが考えられた。本研究から、がん細胞の違いにもよるが、腫瘍組織に浸潤した好中球が NETs 形成を介し、がんの浸潤・転移を促進する可能性が示唆された。今後さらに、NETs のがん浸潤・転移における役割を明らかとし、報告したいと考えている。



(3) ECM タンパク質の1つであるラミニン-332 の単球分化への効果を *in vitro* TAM 分化評価系で解析したところ、ラミニン-332 に単球の TAM への分化を促進し、MMP-9 産生を亢進する機能があることが明らかとなった。さらに、 $\gamma 2$  鎖のタンパク分解プロセシングにより、その機能が調節されていることを示し、投稿論文の形で報告した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Go Kamoshida, Takane Kikuchi-Ueda, Shigeru Tansho-Nagakawa, Ryuichi Nakano, Akiyo Nakano, Hirotohi Kikuchi, Tsuneyuki Ubagai and Yasuo Ono

*Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs)

*Journal of Infection and Chemotherapy*

査読有り, 21, (2015) 43-49.

DOI: 10.1016/j.jiac.2014.08.032.

(2) Ryuichi Nakano, Akiyo Nakano, Yoshikazu Ishii, Tsuneyuki Ubagai, Takane Kikuchi-Ueda, Hirotohi Kikuchi, Shigeru Tansho-Nagakawa, Go Kamoshida, Xiaoqin Mu, Yasuo Ono

Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

*Journal of Infection and Chemotherapy*

査読有り, 21, (2015) 202-206.  
DOI: 10.1016/j.jiac.2014.11.010.

(3) Go Kamoshida, Takashi Ogawa, Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Eriko Komiya, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki and Tsutomu Tsuji  
Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5)

*Clinical & Experimental Metastasis*

査読有り, 31, (2014) 285-291.

DOI: 10.1007/s10585-013-9627-0

〔学会発表〕(計 7件)

(1) 鴨志田 剛, 上田 たかね, 永川 茂, 彦坂 建児, 中野 竜一, 祖母井 庸之, 斧 康雄  
好中球を利用したアシネトバクターの新たな細菌移動メカニズムの解析  
第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会  
2014 年 10 月 29 日 ~ 31 日  
東京ドームホテル (東京都・東京)

(2) 鴨志田 剛, 上田 たかね, 永川 茂, 中野 竜一, 祖母井 庸之, 斧 康雄  
好中球細胞外トラップ形成に焦点を当てた好中球のアシネトバクターと緑膿菌に対する応答性の違い  
第 87 回日本生化学会大会  
2014 年 10 月 15 日 ~ 18 日  
国立京都国際会館 (京都府・京都)

(3) 鴨志田 剛  
好中球細胞外トラップを介したがん細胞の浸潤増強  
第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会  
2014 年 7 月 10 日 ~ 11 日  
金沢市文化ホール・金沢ニューグランドホテル (石川県・金沢)

(4) 鴨志田 剛, 祖母井 庸之, 菊地 弘敏, 斧 康雄  
好中球細胞外トラップ形成に注目したアシネトバクターと緑膿菌に対する好中球の応答性の違い  
第 35 回日本炎症・再生医学会  
2014 年 7 月 1 日 ~ 4 日  
万国津梁館 (沖縄県・名護)

(5) 鴨志田 剛, 上田 たかね, 永川 茂, 中野 竜一, 祖母井 庸之, 菊地 弘敏, 斧 康雄  
NETs 形成に着目した好中球のアシネトバク

ターと緑膿菌に対する生体防御反応の差異  
第 88 回日本感染症学会学術演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会  
2014 年 6 月 18 日 ~ 20 日  
ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡)

(6) 鴨志田 剛, 上田 たかね, 永川 茂, 中野 竜一, 祖母井 庸之, 菊地 弘敏, 斧 康雄  
アシネトバクターと緑膿菌に対する好中球の NETs 形成の差異  
第 62 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 第 60 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会  
2013 年 10 月 30 日 ~ 11 月 1 日  
東京ドームホテル (東京都・東京)

(7) 鴨志田 剛, 小川 崇, 小柳 潤, 佐藤 拓輝, 古宮 栄利子, 東 昌市, 宮崎 香, 斧 康雄, 辻 勉  
細胞外マトリックスタンパク質ラミニン-332 による単球からのマトリックスメタロプロテアーゼ-9 産生調節  
第 86 回日本生化学会大会  
2013 年 9 月 11 日 ~ 13 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
鴨志田 剛 (KAMOSHIDA, Go)  
帝京大学・医学部・助手  
研究者番号: 40707410

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：