

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06378

研究課題名(和文)腫瘍随伴性白血球増多を伴う子宮体癌の予後不良のメカニズムの検討

研究課題名(英文)The role of tumor-associated neutrophils in endometrial cancer displaying tumor-related leukocytosis.

研究代表者

松本 有里(Matsumoto, Yuri)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90756488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：TRLを伴う子宮体癌における予後不良のメカニズムをTANに着目して検討した。子宮体癌の臨床検体を用いてTANの免疫組織染色を行い予後との相関を検討したところ、TANの免疫強度は循環好中球増多と有意な関係があり、また独立予後規定因子となっていた。TRLを伴う子宮体癌のマウスモデルを樹立し、子宮体癌に侵入したTANの機能を検討したところ、TANが子宮体癌の遊走能を亢進させること、また転移予定臓器に好中球が先行動員され前転移ニッチを形成し、それに向かって癌細胞が遊走することが確認され、TANが前癌ニッチの形成を介して癌の転移を促進する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Objective: The aim of this study is to investigate the causative mechanism of poor prognosis in endometrial cancer patients displaying TRL (tumor-related leukocytosis), focusing on TAN (tumor-associated neutrophils). Results and Conclusion: The TAN density of the patient's endometrial cancer was significantly associated with pretreatment peripheral neutrophils and shorter progression-free-survival. In vitro and in vivo experiments revealed that TAN enhanced the invasive capacity and chemotactic activity of endometrial cancer. TAN was infiltrated in the premetastatic lungs and made premetastatic niche, expressing chemoattractant S100a8/9 that attracted the endometrial cancer cells of TRL model. These results indicate that TAN contribute to tumor cell metastases by premetastatic niche formation.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 TRL TAN 浸潤・転移 前転移ニッチ

1. 研究開始当初の背景

腫瘍随伴性白血球増多 (tumor-related leukocytosis:TRL)は固形癌の約 10%に合併し、予後不良因子であるという報告が散見される。我々は、大阪大学にて治療を受けた子宮体癌症例を対象に、TRL の臨床的意義を検討し、TRL を伴う症例は、進行癌で発見される頻度が高く、予後不良であることを見出した。本病態の予後を改善するには、TRL の背景にある分子メカニズムの理解が必要であるが、その詳細は明らかにされていない。最近、好中球が腫瘍の発育・転移に関与することが報告され、好中球は癌の治療標的として注目されている。そこで我々は、好中球の果たす役割に焦点を当て、腫瘍に浸潤した好中球が局所において腫瘍の浸潤能を亢進させるか？ 転移予定臓器において、好中球が原発巣からの癌細胞の転移を促進するか(前転移ニッチをして機能するか)？について検討し、TRL を伴う子宮体癌の背景メカニズムの解明と、好中球を標的とした新規治療の開発を目指した研究を計画した。

2. 研究の目的

腫瘍随伴性白血球増多 (tumor-related leukocytosis:TRL)は固形癌の約 10%に合併し、予後不良因子であるという報告が散見される。我々は、大阪大学にて治療を受けた子宮体癌症例を対象に、TRL の臨床的意義を検討し、TRL を伴う症例は、進行癌で発見される頻度が高く、予後不良であることを見出した。本病態の予後を改善するには、TRL の背景にある分子メカニズムの理解が必要であるが、その詳細は明らかにされていない。最近、好中球が腫瘍の発育・転移に関与することが報告され、好中球は癌の治療標的として注目されている。そこで我々は、好中球の果たす役割に焦点を当て、腫瘍に浸潤した好中球が局所において腫瘍の浸潤能を亢進させるか？ 転移予定臓器において、好中球が原発巣からの癌細胞の転移を促進するか(前転移ニッチをして機能するか)？について検討し、TRL を伴う子宮体癌の背景メカニズムの解明と、好中球を標的とした新規治療の開発を目指した研究を計画した。

3. 研究の方法

研究 1: 子宮体癌に浸潤した好中球 (TAN) の臨床的意義についての検討

子宮体癌の臨床検体を用いて TAN の免疫組織染色を行い、予後との相関を検討する。

研究 2: TRL を伴う子宮体癌の実験モデルの樹立

2-1: 細胞株の樹立 2-2: マウスモデルの樹立

研究 3: 子宮体癌に侵入した好中球 (TAN) の機能についての検討

TAN を子宮体癌細胞株と共培養し、TAN が子宮体癌細胞の浸潤能・遊走能に与える影響を評価する。

研究 4: 転移予定臓器における好中球の機能についての検討

転移予定の臓器に、好中球が浸潤し、前転移ニッチが形成されるか？また好中球阻害により転移が抑制されるか？の検討

上記 4 つの研究を計画した。

4. 研究成果

平成 27 年度は、まず、子宮体癌に浸潤した好中球 (TAN) の臨床的意義についての検討を行った。過去の報告を参考に、CD66b 陽性細胞をヒトにおける TAN と定義し、抗 CD66b 抗体にて免疫組織染色を行い、腫瘍中へ侵入する TAN の染色強度と治療前白血球数、また予後との関係を検討した。TAN の染色強度を weak, medium, high に分類し、治療前白血球数との関係を検討したところ、TAN の染色強度が強い症例では治療前白血球数 $\geq 10,000$ である頻度が有意に高かった ($p < 0,0001$)。また、単変量解析、多変量解析にて TAN の染色強度が強い症例では再発率 ($p < 0,0001$)、生存率 ($p < 0,0001$) が有意に上昇することが確かめられた。また同時に抗 G-CSF 抗体による免疫組織染色を行い、G-CSF の染色強度と腫瘍中に浸潤する TAN の染色強度との相関を検討したところ、有意な相関関係を認めた。次に、TRL を伴う子宮体癌の実験モデルの樹立を行った。二種類の子宮体癌細胞株 (ISHIKAWA 株および HEC1B 株) に G-CSF 発現ベクターまたは MOCK を安定導入 (リポフェクタミン法) し、G-CSF を過剰発現する子宮体癌細胞株およびコントロール株を樹立し、それらをヌードマウスの皮下に移植。G-CSF 産生株の担癌マウスではコントロール株の担癌マウスに比べ白血球数・好中球数が増多し、血中 G-CSF 濃度が高く、腫瘍発育速度が早く、転移が多く、生存期間が短縮

していることを確認し、TRL を伴う子宮体癌のマウスモデルを確立した。

平成 28 年度は、前年度に樹立したマウスモデルを用い、まず、子宮体癌に侵入した好中球 (TAN) の腫瘍局所における機能の検討を行った。マウスの TAN を CD11b⁺Ly6G⁺細胞と定義。移植 4 週間後の G-CSF 産生株由来腫瘍 (TRL モデル) において、コントロール株由来腫瘍 (Non-TRL モデル) に比して TAN が有意に多く誘導されていた。また、TRL モデルで転移が多くみられた。抗 Ly6G 抗体ビーズを用いて、TRL モデルの子宮体癌より TAN、非担癌マウス末梢血より正常好中球の単離を行い、それぞれ子宮体癌細胞株と共培養したところ、TAN が癌細胞の遊走能を亢進させることが確認された。次に転移予定臓器における好中球の機能についての検討を行った。転移前の時期に、両モデルマウスから肝臓・肺・リンパ節・皮膚・脾臓・腫瘍を摘出し、H&E 染色にて各臓器に転移が起こっていないことを確認し、前転移ニッチの形成を免疫組織染色法および Real time RT-PCR にて検証したところ、転移前の臓器に好中球が多数浸潤し、S100A8/9 の発現が亢進していた。細胞動態解析装置を用いて癌細胞の遊走能を検討したところ、S100A8/9 に向かって、TRL モデルの子宮体癌細胞が遊走することが確認された。この結果より転移予定の臓器に、好中球が浸潤し前転移ニッチが形成され、それに向かって癌細胞が遊走していること可能性が示された。

現在、抗 Ly6G 抗体による好中球阻害により子宮体癌の遠隔転移を抑制できるか？を検討中であるが、これらの結果より、TAN が子宮体癌の浸潤能、遊走能を亢進させること、また前癌ニッチの形成を介して癌の転移を促進する可能性が示され、TRL を伴う子宮体癌において好中球が治療ターゲットとなり得ると考えている。

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 4 件)

1. Takahashi, R. Mabuchi, S. Kawano, M. Sasano, T. Matsumoto, Y. Kuroda, H. Hisamatsu, T. Kozasa, K. Sawada, K. Hamasaki, T. Kimura, T. Prognostic significance of systemic neutrophil and leukocyte alterations in surgically treated endometrial cancer patients: a monoinstitutional study. *Gynecol Oncol* 137: 112-118, 2015
2. Takahashi, R. Mabuchi, S. Kawano, M. Sasano, T. Matsumoto, Y. Kuroda, H. Kozasa, K. Hashimoto, K. Sawada, K. Kimura, T. Preclinical investigations of PM01183 (Irbinitectin) as a single agent or in combination with other anticancer agents for clear cell carcinoma of the ovary. *PLoS ONE*. 17;11(3):e0151050
doi: 10.1371/journal.pone 2016
3. Yokoi, E. Mabuchi, S. Takahashi, R. Matsumoto, Y. Kuroda, H. Kozasa, K. Kimura, T. Impact of histological subtype on survival in patients with locally advanced cervical cancer that were treated with definitive radiotherapy:adenocarcinoma/adenosquamous carcinoma versus squamous cell carcinoma. *J Gynecol Oncol*. 28(2):e19
doi: 10.3802/jgo.2017.28.e19. 2017
4. Kuroda, H. Mabuchi, S. Matsumoto, Y. Kozasa, K. Sasano, T. Takahashi, R. Ueda, Y. Tomimatsu, T. Yoshino, K. Kimura, T. The prognosis of high-risk early-stage cervical cancer patients who did not receive standard postoperative concurrent chemoradiotherapy:a monoinstitutional study. *Eur J Gynaecol Oncol*. in press. 2017.

[学会発表](計 3 件)

1. Kuroda, H. Mabuchi, S. Kozasa, K. Sasano, T. Takahashi, R. Matsumoto, Y. Hashimoto, K. Sawada, K. Kimura, T. The role of G-CSF-induced myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the induction of cancer stem-like cells in cervical cancer. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 4.21-24, 2016.
2. Kozasa, K. Mabuchi, S. Kuroda, H. Sasano, T. Takahashi, R. Matsumoto, Y. Hashimoto, K. Sawada, K. Kimura, T. 17 -estradiol

promotes cervical cancer progression by stimulating the production of myeloid derived suppressor cells from hematopoietic stem cells. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 4.21-24, 2016.

横井恵理子 (Yokoi Eriko)
甲村奈緒子 (Komura Naoko)

3. 黒田浩正 馬淵誠士 小笹勝巳 笹野智之 高橋良子 松本有里 橋本香映 澤田健二郎 木村正. 骨髓由来免疫抑制細胞(MDSC)は子宮頸癌組織中の癌幹細胞を増加させる. 第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 米子, 7.8-10, 2016.

〔図書〕(計 4 件)

1. Mabuchi, S. Kawano, M. Takahashi, R. Kuroda, H. Management of Metastatic and Recurrent Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_5-1.
2. Kuroda, H. Mabuchi, S. Kozasa, K. Kimura, T. Fertility-Sparing Treatment for Early-Stage Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_6-1.
3. Mabuchi, S. Kawano, M. Matsumoto, Y. Kimura, T. Cervical Cancer: General Overview. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_36-1.
4. Mabuchi, S. Kawano, M. Sasano, T. Kuroda, H. Management of Early-Stage and Locally Advanced Cervical Cancer. Handbook of Gynecology, Springer 2016. doi:10.1007/978-3-319-17002-2_34-1

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 有里 (Matsumoto Yuri)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 90756488

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし

(4) 研究協力者

黒田浩正 (Kuroda Hiromasa)

小笹勝巳 (Kozasa Katsumi)