

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06443

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップによる抗腫瘍活性の解明

研究課題名(英文)Analyze the antitumor activity of neutrophils extracellular traps

研究代表者

中西 祐輔 (NAKANISHI, Yusuke)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：20579411

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)：腫瘍微小環境を構成する免疫細胞の中で、マクロファージが腫瘍促進作用を示す傾向があるのに対し、好中球は抗腫瘍活性と腫瘍促進活性両方の作用が報告されている。しかし、どのような条件下で好中球がそれらの能力を獲得するかについては明らかになっていない。マウス乳がん細胞4T1で誘導した腫瘍内には多量の好中球が浸潤し、細胞外トラップ(Nets)を放出することが明らかとなっている。よって、本課題では、Netsの腫瘍に対する効果を評価した。Netsの放出に必須の酵素PAD4の阻害剤および遺伝子欠損マウスを用いた解析から、腫瘍内で放出されるNetsは直接的にがん細胞の成長には影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤は、多くのがん患者を救うことに貢献している。しかし、本治療法は全てのがん患者に適応できるわけではない。このことから、チェックポイント阻害剤の効果を高める方法および事前に効果を予測するバイオマーカーの探索が進められている。本課題では、腫瘍微小環境に浸潤している好中球が放出するNetsの阻害剤を投与すると、乳がんの成長がわずかに抑制されることを明らかにした。4T1細胞はチェックポイント阻害剤不応答の細胞株であることが知られており、免疫チェックポイント阻害剤と併用療法を検討することにより、チェックポイント不応答の腫瘍に対する新たな選択肢を示す可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Among the immune cells that composing the tumor microenvironment, macrophages tend to exhibit pro-tumor effects, whereas neutrophils have been reported to have both anti-tumor and pro-tumor activity. It has been clarified that a large amount of neutrophils infiltrate into the tumor induced by mouse breast cancer cells 4T1 and release extracellular traps (Nets). Therefore, in this task, we evaluated the effect of Nets released by neutrophils on intellectual tumors. Analysis using an inhibitor of PAD4, an enzyme essential for Nets release, and gene-deficient mice revealed that Nets released in tumors do not directly affect the growth of cancer cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：好中球 細胞外トラップ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤は第4の「がん治療法」として確立しており、多くのがん患者を救うことに貢献している。しかし、本治療法は全てのがん患者に適応できるわけではない。このことから、チェックポイント阻害剤の効果を高める方法および事前に効果を予測するバイオマーカーの探索が進められている。一方、腫瘍の中には、繊維芽細胞、血管内皮細胞さらには免疫細胞といった正常細胞が局在しており、これらの細胞および環境を総称して腫瘍微小環境と呼んでいる。腫瘍微小環境を構成する細胞はがん細胞と情報交換することによって腫瘍の成長を促進したり、抗腫瘍免疫を抑制したりしていると考えられている。このように、腫瘍微小環境を構成する細胞の腫瘍促進効果という視点からの研究が進む一方で、腫瘍微小環境を構成する細胞の抗腫瘍活性に着目した検討はほとんどなされていない。

### 2. 研究の目的

腫瘍微小環境を構成する免疫細胞の中でマクロファージは比較的研究が進んでいる。腫瘍関連マクロファージ (TAM) は、腫瘍組織に浸潤・集積しているマクロファージである。これらの細胞は、免疫系を抑制する因子である IL-10、TGF- $\beta$  を産生することおよび PD-1 を発現することによって、キラーT細胞およびNK細胞による抗腫瘍活性から免疫逃避機構の確立に寄与している。これらの報告に基づき、マクロファージの分化に必須の CSF1R に対する抗体あるいはアンタゴニストを投与して TAM を枯渇する試みが進められている。

一方、腫瘍中には他のミエロイド系細胞である好中球も浸潤しており腫瘍関連好中球 (TAN) と呼ばれている。TAM が腫瘍促進活性を持つ報告がほとんどであるのに対し、TAN は抗腫瘍活性を有するものも多数報告されている。しかし、TAN がどのような条件で腫瘍促進活性あるいは抗腫瘍活性を獲得するかについてはその詳細なメカニズムが明らかになっていない。予備実験において、がん種の違いが腫瘍微小環境を形成する過程において、好中球に異なる機能を与えているという仮説を立て、大腸がん細胞株 (CMT-93) と肺がん細胞株 (3LL) をマウスに皮下移植するモデルを用いて検証した。その結果、CMT-93 で誘導した腫瘍内には多量の好中球が浸潤していることが明らかとなった。また、それらの好中球を精製して、ギムザ染色による形態観察から、これらの細胞は細胞外トラップ (Neutrophils extracellular traps: Nets) を産生していることが明らかとなった。CMT-93 で誘導した腫瘍は比較的にネクロシスを起こしている領域が広いことから、Nets を放出している TAN は抗腫瘍活性を有すると推察された。よって本課題においては、TAN が産生する Nets の抗腫瘍活効果とその誘導メカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) TAN が産生する Nets の抗腫瘍活性の評価

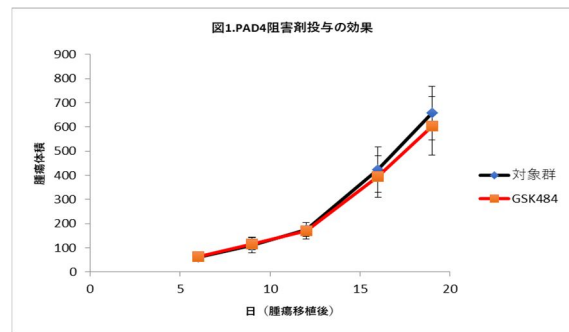
上記で使用した CMT-93 細胞株にトラブルが生じたため、BALB/c 由来乳がん細胞株 (4T1) および大腸がん細胞株 (CT-26) で検討したところ、4T1 細胞株で誘導した腫瘍内に多量の好中球および Nets の形成が確認された。よって、4T1 細胞株を使用して以降の検討を行った。TAN が放出する Nets が腫瘍形成に与える影響を検討するため、Nets の形成に必須の酵素 PAD4 の遺伝子を欠損したマウス (Padi4<sup>-/-</sup>) に 4T1 細胞株を移植して、腫瘍形成を評価した。また、PAD4 の阻害剤 (GSK484) を 4T1 担癌マウスに投与して同様の検討を行った。

## (2)がん細胞由来 Nets 誘導因子の同定

4T1 細胞の培養上清と骨髄由来好中球を共培養する実験において、4T1 細胞の培養上清には Nets を誘導する因子が含まれていることが明らかになった。よって、詳細な誘導因子の同定のため、限外濾過法を用いて誘導因子の分子量の同定を試みた。

### 4. 研究成果

(1) TAN が放出する Nets が腫瘍形成に及ぼす影響を検討するため、PAD4 の選択的阻害剤である GSK484 を 4T1 担癌マウスに腹腔内投与した。経時的な腫瘍サイズを計測したところ、GSK484 の投与によって、腫瘍の成長がわずかに抑制する傾向が認められたが、有意な差は得られなかった(図1)。また、PAD4 の遺伝子欠損マウスを用いた検討においても同様の傾向が認められた。蛍光免疫染色の結果から、好中球から放出される Nets の放出は抑制されていたことから、TAN が放出する Nets は直接的には、がん細胞に対する影響は少ないと考えられた。今後、チェックポイント阻害剤との併用などの効果を検討する必要性があると考えられた。



(2) がん細胞から産生される Nets の誘導因子を同定するため 4T1 細胞の培養上清を限外濾過にかけ、分子量の推定を行った。その結果、3kDa 以下の低分子量画分に Nets を強く誘導する因子が含まれていることが明らかとなった。更なる詳細な検討の結果、ポリアミンの 1 つであるスペルミジンが候補物質であることが明らかとなった。実際、PMA で活性化した骨髄由来好中球を試薬グレードのスペルミジンで刺激したところ、PMA のみの刺激と比較して、より強い Nets 誘導が観察された。近年、生理的な細胞死が炎症を誘導しない機構を解析した論文において、スペルミジンが細胞死から放出され、免疫応答を負に制御することが示されている(参考文献)。よって、がん細胞においても、細胞死を通して免疫回避を誘導する新たな分子機構が推測され、今後の研究課題として取り組む予定である。

参考文献：Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature*. 2020

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