

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22960

研究課題名（和文）消化器癌組織内好中球細胞外トラップが腫瘍浸潤リンパ球の動態に与える影響の解明

研究課題名（英文）Effect of neutrophil extracellular traps on tumor infiltrating lymphocytes in gastrointestinal tumor

研究代表者

金丸 理人（Kanamaru, Rihito）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10625544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：PMAまたはLPS刺激好中球は抗CD3抗体とIL2で活性化したTリンパ球のCXCL11に対する走化性を抑制した。PMA刺激好中球の上清による遊走抑制はカタラーゼにて消失したことから、PMA刺激好中球は多量のreactive oxygen species (ROS)を産生し、アクチン脱重合を阻害することで細胞運動を抑制すると考えられた。一方、LPS刺激好中球はCXCL11を分解したが、DNase IによるNETsの分解やneutrophil elastase InhibitorやPMSFにて抑制され、遊走は改善したことから、NETsに付着したプロテアーゼが走化性の抑制の主な原因であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍浸潤リンパ球が多いと予後良好だが、NETsを含めた腫瘍関連好中球が多いと予後不良であることが様々な癌腫において報告されている。近年NETsが癌の進展に関わっていることが解ってきたが、リンパ球浸潤に与える影響についてはほとんど解っていない。本研究ではNETsを含めた活性化好中球が活性化Tリンパ球のCXCL11に対する走化性を複数のメカニズムで抑制していることを示すことが出来た。好中球による過酸化水素とNETsの放出を抑制、分解することで腫瘍内へのリンパ球浸潤が期待でき、抗腫瘍効果を高め予後改善につながる可能性がある点で今後の癌免疫療法の発展に繋がる重要な示唆が得られた。

研究成果の概要（英文）：The phenomenon that PMA- or LPS-activated neutrophils involving NETs inhibited chemotaxis of T cells activated with anti-CD3 Ab and IL-2 to CXCL11 was confirmed. It is thought that some of the reasons were due to hydrogen peroxide inhibiting depolymerization of actin in PMA-activated neutrophils and degradation of chemokine via protease bound to NETs produce by LPS-activated. Moreover, Adding catalase to hydrolyze hydrogen peroxide restored reduced migration of T cells in PMA-activated neutrophils, while administrating DNase I for destruction of NETs or protease inhibitors such as NEI or PMSF inhibited degradation of CXCL11 by NETs and also restored migration.

研究分野：消化器外科学、産科婦人科、腫瘍免疫学

キーワード：好中球細胞外トラップ 腫瘍浸潤リンパ球 消化器癌 免疫療法 ケモカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NETs は、細菌感染の拡大防止に重要な役割を果たすだけでなく、がんの進展にも関わっていることが指摘されている。がん微小環境内には NETs が多く存在する事実が報告されているが、その病態に与える影響に関する情報は多くない。NETs が TILs に与える影響については NETs が TILs に補足されることや、NETs に付着した PD-L1 が TILs の PD-1 と結合することで抗腫瘍効果を低下させていることが報告されている。一方で、腫瘍分野ではないが、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ということが報告されており、本研究では NETs ががん微小環境において TILs を誘導するサイトカインを分解することで TILs の浸潤と癌細胞との接触が阻害され、抗腫瘍効果を低下させ、がんの進行を促進しているのではないかと、という仮説を設定し、その正当性を *in vitro* 実験とヒト検体の免疫染色を用いて検証する。

2. 研究の目的

NETs を含めた活性化好中球が TILs に見立てた活性化 T 細胞の CXCL11 に対する走化性を抑制するメカニズムを明らかにすることを第一の目的とする。また、卵巣癌検体を用いて免疫組織化学染色 (IHC) を行い NETs と TILs の局在を評価することが第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) NETs の産生方法

健常人由来の好中球を密度勾配遠心で分離後に、PMA 2 μ M もしくは LPS 10 μ g/ml の濃度でそれぞれ 15 分、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。T リンパ球は健常人由来の PBMC を密度勾配遠心で分離後に CD3 抗体と IL-2 10ng/ml で 7-14 日間培養を行い活性化させた。

(2) T リンパ球の走化性に対する NETs の影響

calcein 染色した T リンパ球をダブルチャンバーの上層に、下層に CXCL11 1 μ 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 を投与すると T リンパ球の遊走が変化するか検討した。

(3) LPS で刺激した whole NETs による CXCL11 の分解

LPS で刺激した whole NETs と NETs-depleted SN を CXCL11 と反応させて CXCL11 の分解をウエスタンブロッティングで評価した。また whole NETs に NETs 分解のため DNase I や NETs に付着したプロテアーゼを阻害するため NEI, PMSF を投与することで CXCL11 の分解が変化するか併せて検討した。

4. 研究成果

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

PMA 刺激による whole NETs を添加すると、T 細胞の下層への遊走はほぼ完全に抑制された。同様の現象は NETs-depleted SN でも確認された。上記の結果より液性因子による影響が考えられ、過酸化水素分解酵素であるカタラーゼを添加すると遊走は抑制されなかった(図 1)。

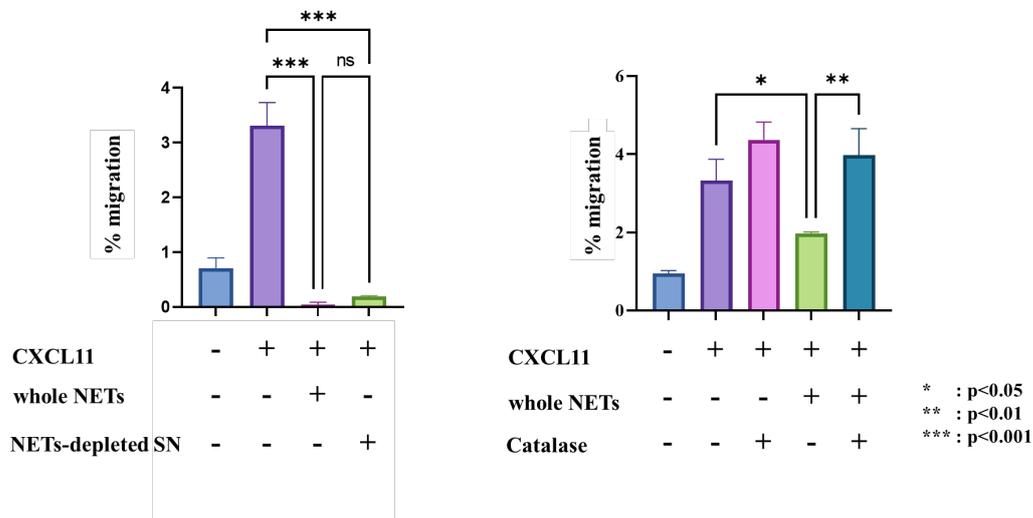


図 1 PMA 刺激好中球による T cell 遊走抑制

(2) 刺激を LPS で行うと whole NETs では PMA と同様に 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 NEI, 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 2)。

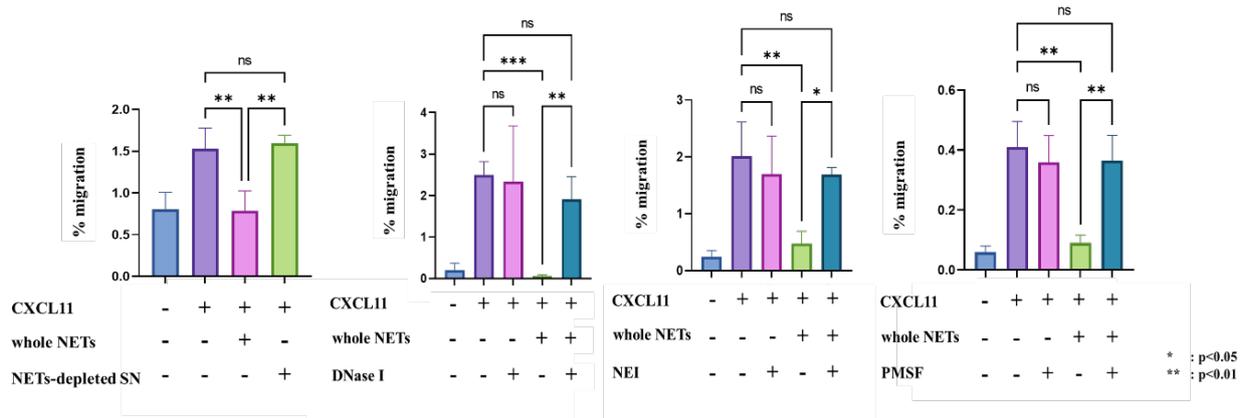


図 2 LPS 刺激好中球による T cell 遊走抑制

(3) LPS で刺激した whole NETs による CXCL11 の分解

LPS で刺激した whole NETs は CXCL11 を完全に分解したのに対して、NETs-depleted supernatant による CXCL11 の分解は不完全でバンドが検出された。また LPS で刺激した whole NETs に DNase I や NEI, PMSF を添加すると CXCL11 の分解は不完全でバンドが検出された(図 3)。

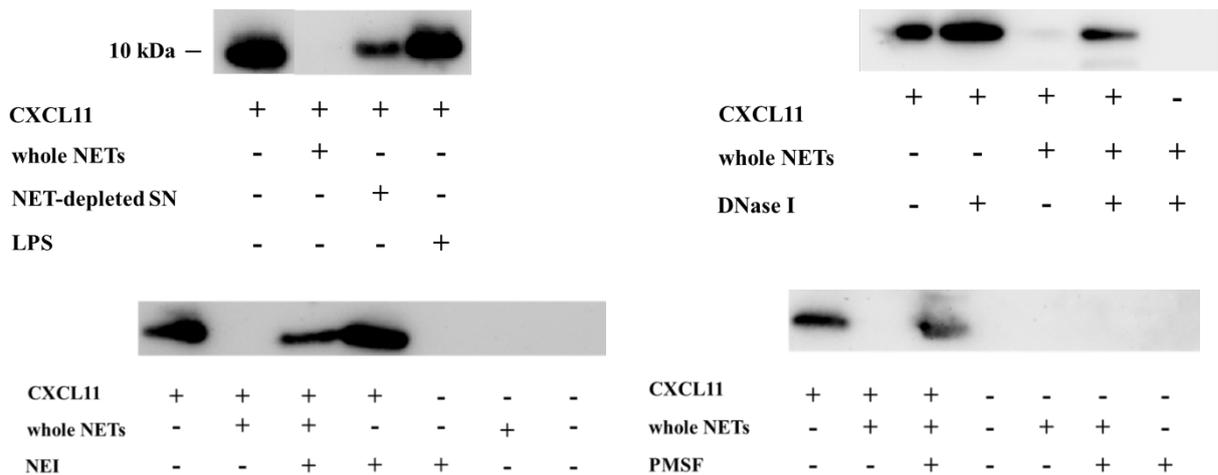


図 3 LPS 刺激好中球による CXCL11 の分解

(3)まとめ

PMA 刺激好中球による活性化 T cell の走化性の抑制は過酸化水素が、LPS 刺激好中球による抑制は NETs に付着したプロテアーゼによる CXCL11 の分解が原因の一つと考えられた。PMA 刺激好中球に対しては過酸化水素分解酵素であるカタラーゼ、LPS 刺激好中球に対しては DNase I による NETs の分解やプロテアーゼインヒビターである NEI、PMSF を添加すると CXCL11 の分解が抑制されることで走化性が改善した。この結果より TAN は TILs に対して同様のメカニズムで抑制的に働いている可能性が考えられた。

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 Y. Meguro, H. Yamaguchi, J. Kitayama, R. Kanamaru, S. Matsumoto, T. Ui, H. Haruta, K. Kurashina, S. Saito, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata.	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Pathological complete response after intraperitoneal paclitaxel and systemic combined chemotherapy in a patient with peritoneal metastases from gastric cancer: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40792-020-00818-9	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 S. Saito, H. Yamaguchi, H. Ohzawa, H. Miyato, R. Kanamaru, K. Kurashina, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 online
2. 論文標題 Intraperitoneal Administration of Paclitaxel Combined with S-1 Plus Oxaliplatin as Induction Therapy for Patients with Advanced Gastric Cancer with Peritoneal Metastases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09388-4	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 Kohei, Tamura. Hideyo, Miyato. Rihito, Kanamaru. Ai, Sadatomo. Kazuya, Takahashi. Hideyuki, Ohzawa. Takahiro, Koyanagi. Yasushi, Saga. Yuji, Takei. Hiroyuki, Fujiwara. Alan Kawarai, Lefor. Naohiro, Sata. Joji, Kitayama.	4. 巻 -
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps (NETs) reduce the diffusion of doxorubicin which may attenuate its effect 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 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 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 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 金丸 理人, 大澤 英之, 高橋 和也, 松本 志郎, 春田 英律, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 山口 博紀, 佐久間 康成, 川平 洋, 堀江 久永, 細谷 好則, 味村 俊樹, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 Flowcytometryを用いた胃癌腹膜播種患者の腹腔内遊離細胞の解析
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金丸 理人, 大澤 英之, 高橋 和也, 松本 志郎, 春田 英律, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 Flowcytometryによる胃癌腹膜播種患者の腹腔内遊離細胞の解析(Analysis of intraperitoneal free cells of gastric cancer peritoneal meatastasis by ow cytometry)
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 和也, 大澤 英之, 金丸 理人, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 Flowcytometryを用いた胃癌患者腹腔内免疫細胞の解析
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 和也, 大澤 英之, 木村 有希, 齋藤 晶, 東條 峰之, 熊谷 祐子, 金丸理人、北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps promote the invasion of gastric cancer cells in vitro.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
---------	---------