

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08602

研究課題名(和文) エクソソームによる前転移ニッチ形成における好中球細胞外トラップの意義

研究課題名(英文) Significance of neutrophil extracellular traps in the formation of pre-metastatic niches by exosomes

研究代表者

大西 康晴 (Onishi, Yasuharu)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60377257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜播種高転移株YTN16Pの培養上清からエクソソームを分離し、腹腔内滲出好中球に添加すると、親株YTN16由来のエクソソームと比べて好中球細胞外トラップ(NET)の産生が有意に上昇した。また、YTN16Pの腹膜播種結節内には、親株の播種巣と比べCit-H3陽性のNETsの密度が高く、CD8(+)T細胞は少ない傾向を認めた。

根治的大腸切除術を受けた患者の血液中低比重好中球LDNの数は手術直後に顕著に増加し、多量のNETを産生し、癌腫瘍細胞を効率的に捕獲した。また、その割合は患者予後と相関していた。LDNは術後の早期に循環血液中に誘導され、NETを介して癌の再発に関連すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス胃癌細胞から腹膜播種好転移株を作成し、そのエクソソームが好中球細胞外トラップの産生を促進するという新たな事実を見出した。また、大腸癌患者の末梢血中の低比重好中球(LDN)が術直後に増加し、活発にNETを産生するとともに、その割合が大腸癌の術後再発を予測する新たなバイオマーカーとなりうること、特に、ステージIIIの大腸癌患者において、補助化学療法はLDN高値群の予後を有意に改善させたが、LDN低値群では予後に差を認めなかったことから、大腸癌術後の補助化学療法の適応に関する示唆を与えることができた点で臨床的意義がある。

研究成果の概要(英文)：When exosomes were isolated from the culture supernatant of the highly metastatic peritoneal dissemination cell line YTN16P and added to peritoneal exudate neutrophils, the production of neutrophil extracellular traps (NETs) was significantly increased compared to exosomes derived from the parent cell line YTN16. Furthermore, the density of Cit H3(+) NETs was higher and the number of CD8(+) T cells tended to be lower in the peritoneal dissemination nodules of YTN16P compared to the dissemination foci of the parent cell line.

The number of low density neutrophil (LDN) in the blood of patients who underwent radical colectomy increased significantly immediately after surgery, producing a large amount of NETs and efficiently capturing cancer tumor cells. The proportion of LDN correlated with patient prognosis. LDN was induced in the circulating blood early after surgery and was thought to be related to cancer recurrence via NETs.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：好中球細胞外トラップ エクソソーム 肺転移 腹膜播種 好中球

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular traps; NETs)は標的臓器の血管床にて癌細胞や血小板を捕獲し、がんの転移や血栓傾向と深く関与していること、休眠状態(dormant)の癌細胞を「目覚めさせる」ことで転移の成立を可能にすることが報告されている。一般に、がん組織には多数の好中球が浸潤しているが、その一部は NETs をきたしている事実が確認されているが、がん微小環境における NETs とがんの病態については未だに不明な点が多い。しかし、癌細胞由来のエクソソームが顆粒球系細胞の分化にどのような影響を与え、末梢好中球の NETs 産生能、さらには癌転移の成立にどう関与しているのか？については十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

マウス癌細胞を用いて、癌細胞由来のエクソソームががん転移を促進する機序として、骨髄の顆粒球系細胞の分化にどのような影響を与えるのか？それが、好中球の NETs 産生能、さらには癌転移の成立にどう関与しているのか？を明らかにする。また、大腸癌患者を例として、がん患者における末梢血中の LDN の頻度と NET 産生能を測定し、がんの病態との関連性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) マウス胃癌細胞 YTN16 を C57/BL6 マウスの腹腔内に接種することを繰り返し、腹膜播種高転移株 YTN16P を作成した。これらの細胞株の培養上清から超遠心法を用いてエクソソームを分離、抽出し、カゼイン腹腔内投与後に腹腔内に滲出した好中球を分離し、それに添加して細胞膜非透過性核酸検出試薬 SYTOX で染色して NETs 誘導性を測定したところ NETs 誘導性を測定した。

(2) 当科にて根治切除を施行した大腸癌患者において、Ficoll 遠心法にて顆粒球と単核球を分離、単核球中の CD45(+)CD66b(+)細胞を LDN とし、その割合と様々な抗原発現を Flow cytometer で定量的に測定した。また、術後末梢血から磁器ピーズ法を用いて LDN を分離し、In vitro での NET の産生を検討するとともに、がん細胞を添加し静置後洗浄し、NET への癌細胞の接着を検討した。また、単核球中の CD66b(+)LDN の割合を flowcytometry で測定し、再発、患者予後との関連性を検討した。

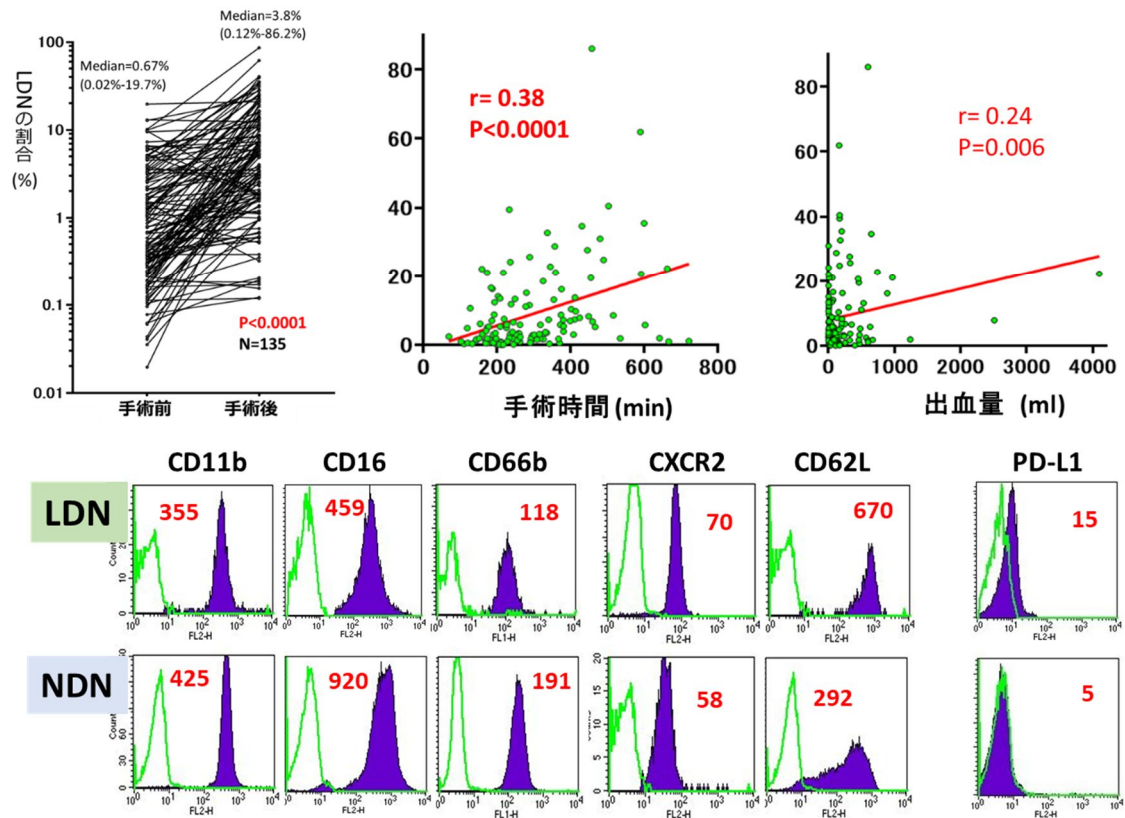
### 4. 研究成果

(1) 腹腔内滲出好中球を分離し、YTN16P 由来のエクソソームを添加すると、親株 YTN16 由来のエクソソームと比べて NETs の産生が有意に上昇した。また、マウス大腿骨から採取した骨髄細胞に添加、4~24 時間培養し、同様の方法で NETs を作成したところ、YTN16P 由来のエクソソーム添加群で NETs の産生が若干上昇する傾向が認められた。YTN16 と亜株 YTN16P をマウスの腹腔内に接種し作成した腹膜播種巣から組織切片を作成し、抗 Gr 1 抗体で好中球を NETs をシトルリン化ヒストン 3 (Cit H3) に対する抗体で免疫染色にて検討したところ、YTN16P にて Gr-1(+)好中球と Cit H3(+)の NETs の密度が多く、CD8(+)T 細胞は少ない傾向を認めた。

(2) 当科にて根治切除を施行した 135 例の大腸癌患者の術前 LDN の割合は中央値 (M)=0.67%(0.02-19.7%)で、ステージによる差はなかったが、好中球リンパ球比 (NLR) と正の相関を示した。しかし、ほとんどの症例で術後血液中の LDN は術前と比べて増加して

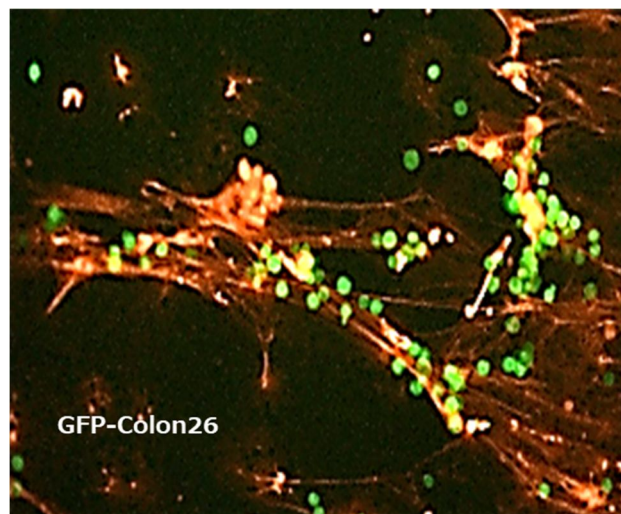
おり (M=3.38%, 0.035-59.5%)、術後 LDN の割合は手術時間、出血量と弱い正相関を示した( $r=0.38, 0.24$ )。

また、抗原発現を Flow cytometer で測定したところ、高比重好中球(HDN)と比べ、LDN は成熟マーカーの CD11b、CD16、CD66b の発現が低く、未成熟マーカーの CXCR2、CD62L の発現は高く、より未成熟型のフェノタイプであった。また、PD-L1 は NDN ではほとんど発現を認めなかったが、LDN では有意な発現を認めた。

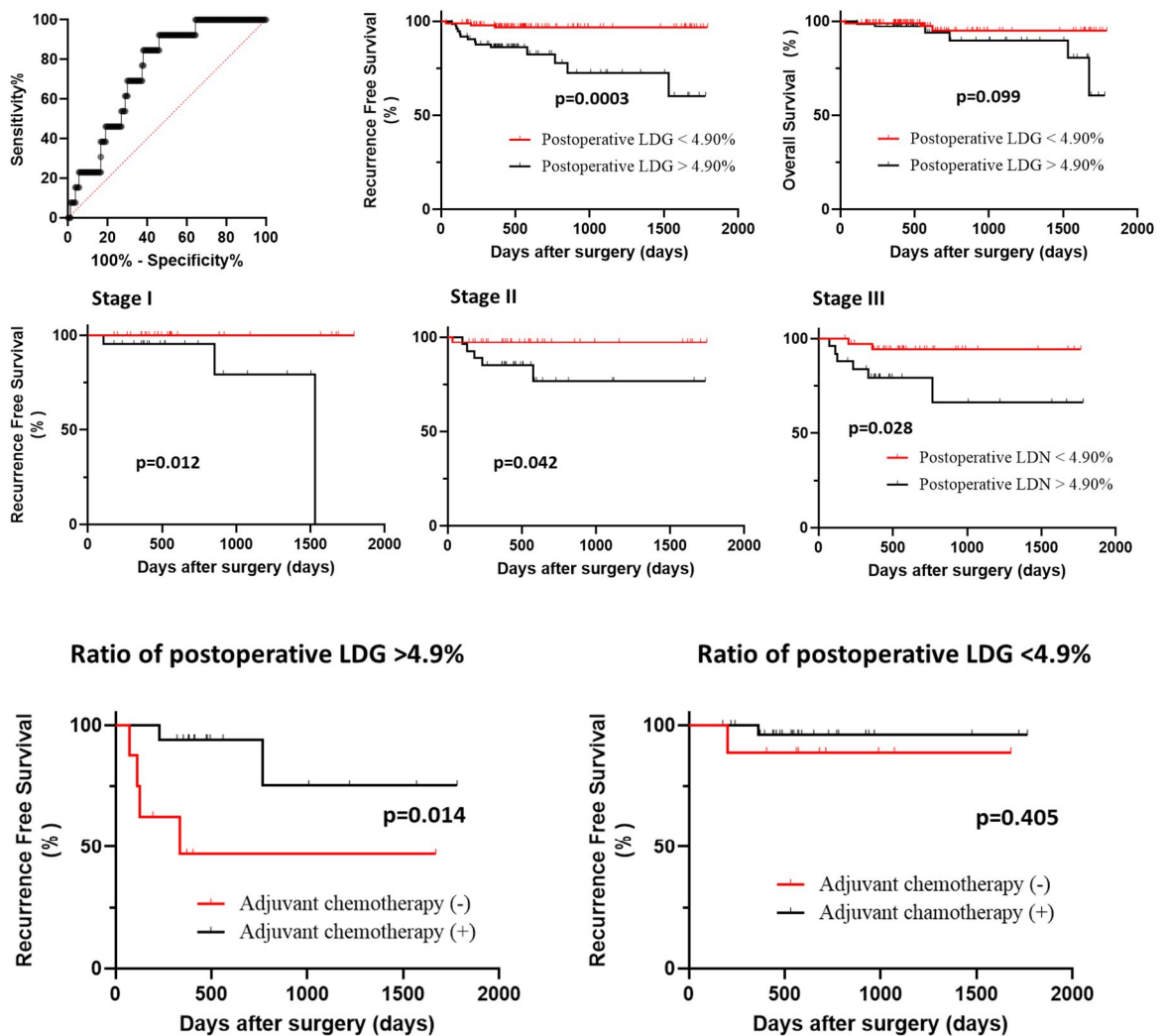


(3) 磁気カラム法で分離した LDN と HDN を 8~24 時間培養後のアポトーシスの割合は LDN で有意に少なく、術後末梢血液中の LDN は HDN と比較しアポトーシスを起こしにくく、長期に生存する細胞集団であると考えられた。

(4) 手術後に採取した血液から LDN を精製し、in vitro で 時間培養した後、刺激なしでも SYTOX 染色により大量の NET が検出された。一方、NET 構造は同じ血液サンプル由来の HDN ではほとんど観察されなかった。ヒト結腸癌細胞である DLD-1 を LDG に添加し、5 分間共インキュベートすると、洗浄後に多数の癌細胞が NET に選択的に付着した。これは、術後に採取された血液中 LDN が活発に NET を産生し、宿主血管内の循環腫瘍細胞を効果的に捕捉し転移を促進する役割をもつことを示唆していると考えられた。



(5) 根治切除を施行した178例の大腸癌患者の予後を検討すると、観察期間中(中央値387日)で、Stage I患者には再発を認めなかったが、Stage II以上129例中12例(9.3%)に再発を認め、それらの症例の術後LDNの割合は非再発症例と比べて有意に高値であった(M=10.1% vs 3.1%,  $p=0.0022$ )。cut off lineを4.9%と設定すると、術後LDN高値群は低値群に比べて有意に無再発生存率(DFS)が悪かった( $p=0.0014$ )。このうち、ステージIIIの患者62人に絞って検討すると、45人の患者はカペシタピンまたはカペシタピン+オキサリプラチン(CapeOX)レジメンによる術後補助化学療法を3~6か月間受けていたが、17人の患者は補助療法を受けなかった。補助化学療法は、LDGの割合が4.9%を超えた25人の患者においてRFSを有意に延長させた( $p<0.05$ )が、LDGの割合が低い37人の患者のうち、再発を発症したのは2人だけであり、補助療法は転帰に有意な影響を与えなかった( $p=0.405$ )。以上の事実から、術後LDNの割合は術後の補助化学療法の適応を決定する上でのバイオマーカーとなることが判明した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rei Takahashi, Hideyuki Ohzawa, Yasuharu Ohnishi, Misaki Matsumiya, Yuki Kaneko, Kohei Tamura, Yurie Futoh, Kazuya Takahashi, Yuki Kimra, Hiedyo Miyato, Naohiro Sata, Joji Kitayama.
2. 発表標題 NETs and peritoneal metastasis in diabetic condition.
3. 学会等名 第21回自治医科大学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohei Tamura, Misaki Matsumiya, Yasuharu Ohnishi, Rei Takahashi, Yuki Kaneko, Yurie Futoh, Kazuya Takahashi, Yuki Kimra, Hiedyo Miyato, Hideyuki Ohzawa, Yasuhi Saga, Yuji Takei, Hiroyuki Fujiwara, Joji Kitayama.
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps(NETs) reduce the effect of doxorubicin which may attenuate its ability to induce apoptosis of ovarian cancer cells.
3. 学会等名 第21回自治医科大学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大西 康晴, 佐久間 康成, 眞田 幸弘, 岡田 憲樹, 平田 雄大, 堀内 俊男, 大豆生田 尚彦, 水田 耕一, 佐田 尚宏.
2. 発表標題 【肝胆膵】消化器移植医療の現状と今後の展望 チーム医療による肝移植の現状と今後の展望
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし

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
研究分担者	佐久間 康成  (Sakuma Yasunaru)  (10296105)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	
研究分担者	金丸 理人  (Kanamru Rihito)  (10625544)	自治医科大学・医学部・助教   (32202)	
研究分担者	北山 丈二  (Kitayama Joji)  (20251308)	自治医科大学・医学部・教授   (32202)	
研究分担者	真田 幸弘  (Sanada Yukihiro)  (60406113)	自治医科大学・医学部・准教授   (32202)	
研究分担者	大澤 英之  (Ohzawa Hideyuki)  (60458271)	自治医科大学・医学部・准教授   (32202)	

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