

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16432

研究課題名(和文)がん免疫療法の奏効に対する好中球細胞外トラップ(NETs)の意義の解明

研究課題名(英文) Effects of neutrophil extracellular traps (NETs) on response to cancer immunotherapy.

研究代表者

金丸 理人 (Kanmaru, 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：In vitro の実験にて、好中球をLPSで刺激し作成したNETsはセリンプロテアーゼを介してCXCL11を効率よく分解し、活性化Tリンパ球の浸潤を抑制した。ヒト卵巣癌切除標本の免疫染色にて、CD66b(+)Cit-H3(+) 細胞をNETsとして同定すると、その密度は進行期でより高く、CD4(+), CD8(+) T細胞の密度と逆相関した。術後の無増悪生存率はNETs高値群で有意に悪く、多変量解析にてNETs高値群は独立した予後予測因子であった。固形腫瘍内のNETsはケモカインを効率よく分解し、活性化Tリンパ球の浸潤を抑制することを介してがんの進行を促進する可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球が固形癌の進行に対して促進的な役割を果たすことは古くから指摘されているが、その機序は十分に解明されていない。本研究で、活性化好中球由来のNETsがケモカインを分解し、活性化Tリンパ球の浸潤を抑制することが判明し、NETsがその一因であることが新たに証明された。また、ヒト卵巣癌切除標本の免疫染色にて、NETsの量が、CD4(+), CD8(+) T細胞の浸潤度、患者予後と逆相関することから、このメカニズムが実際にヒト癌でも存在する可能性があると考えられた。NETsの阻害が新たながん治療に繋がる可能性が得られたことから、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vitro experiments showed that NETs produced by LPS-stimulated neutrophils efficiently cleaved CXCL11 via serine proteases and inhibited the infiltration of T lymphocytes activated with anti-CD3 and rIL-2. NETs were identified as CD66b(+)Cit-H3(+) cells by multicolor immunostaining of 138 resected specimens of high-grade serous ovarian cancer. The density of NETs was higher in advanced stage ($p<0.05$) and inversely correlated with the densities of CD4(+) or CD8(+) T cells ($r=-0.5182$, $p<0.01$; $r=-0.5684$, $p<0.001$, respectively). Postoperative progression-free survival (PFS) was significantly worse in the high NETs group ($p<0.05$), and the high NETs group was an independent predictor for worse PFS in multivariate analysis. It was suggested that NETs in solid tumors may efficiently degrade chemokines, suppress T lymphocyte infiltration, and promote cancer progression. Degradation of NETs may be used as a treatment method for solid cancer.

研究分野：消化器外科学・腫瘍免疫学

キーワード：好中球細胞外トラップ 免疫療法 ケモタキシス 細胞障害性T細胞 CXCL-11 細胞運動 免疫チェックポイント阻害

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好中球はある状況下でクロマチンを放出し、細菌などの病原体を捕捉し、感染の拡大を防止する。この現象は好中球細胞外トラップ(NETs)と呼ばれるが、近年の研究にて NETs はがんの進展にも関わっていることが解ってきた。固形がんの微小環境内には多量の NETs が存在する事実が報告されており、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事実も報告されている。しかし、腫瘍内の NETs が T リンパ球などの抗腫瘍活性を持つ免疫細胞の癌組織への浸潤に及ぼす影響についての情報は少ない。そこで、本研究では NETs ががん微小環境において腫瘍浸潤リンパ球(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、結果として抗腫瘍効果が低下し、がんの進行を促進しているのはいか?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

活性化好中球由来の NETs が TILs に見立てた活性化 T 細胞の走化性を抑制するかを明らかにし、そのメカニズムを追求する。また、ヒト癌の切除検体を用いて免疫組織化学染色 (IHC) を行い NETs と TILs の局在を評価し、NETs の TILs 浸潤に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

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 LPS 10 μ g/ml の濃度で 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

カルセインで染色した活性化 T リンパ球をダブルチャンバーの上層に、下層に **CXCL-11 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も併せて検討した。

(4) 免疫組織染色

2006 年 1 月から 2018 年 3 月まで当院で一次減量手術を受けた高悪性度漿液性卵巣がん (HGSOC) 患者 138 名を対象に、HGSOC 患者の転帰を遡及的に検討した。さらに、HGSOC 患者の組織切片を作成し、好中球のマーカー **CD66b**、NETs のマーカーシトルリン化ヒストン **H3 (Cit-H3)**、および T 細胞のマーカーに対するモノクロナル抗体を用いて多色免疫組織化学を実施し、NET と TIL の密度と患者予後の相関を検討した。

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

好中球を LPS で刺激し作成した **whole NETs** は、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** や好中球エラスターゼ阻害剤(**NEI**)、セリンプロテアーゼ阻害剤(**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 1)。

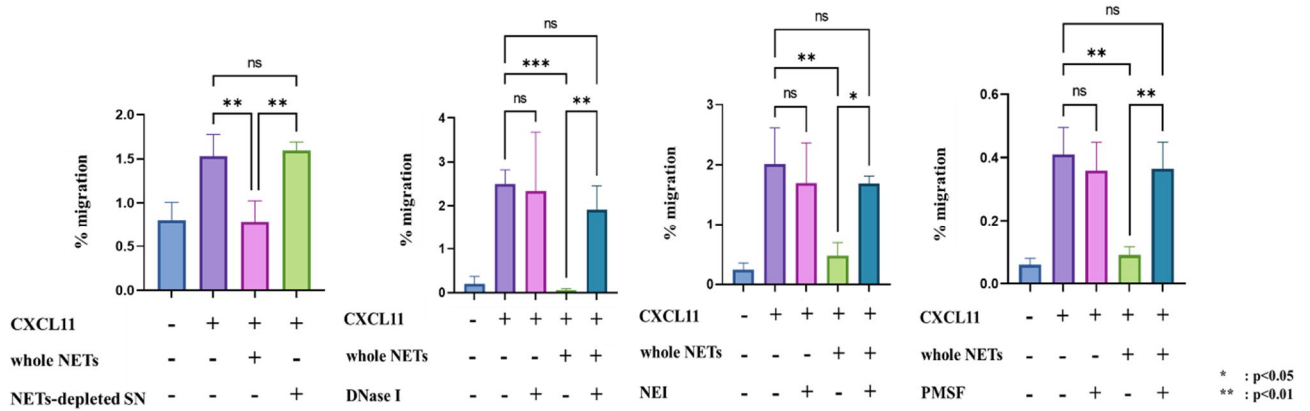


図 1 LPS 刺激好中球による T cell 遊走抑制

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

(2) 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 2)。

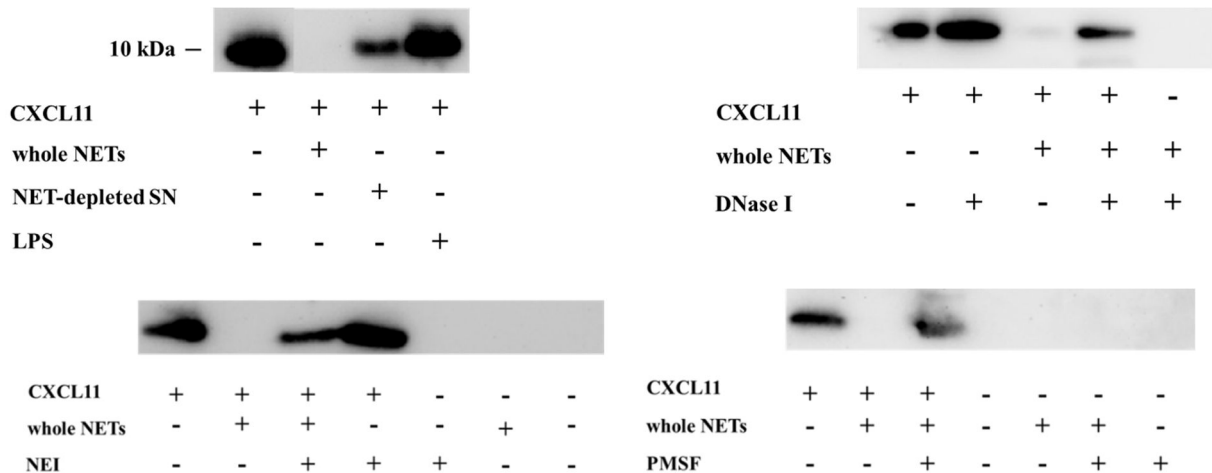


図 2. CXCL11 に対する抗体を用いた western blotting

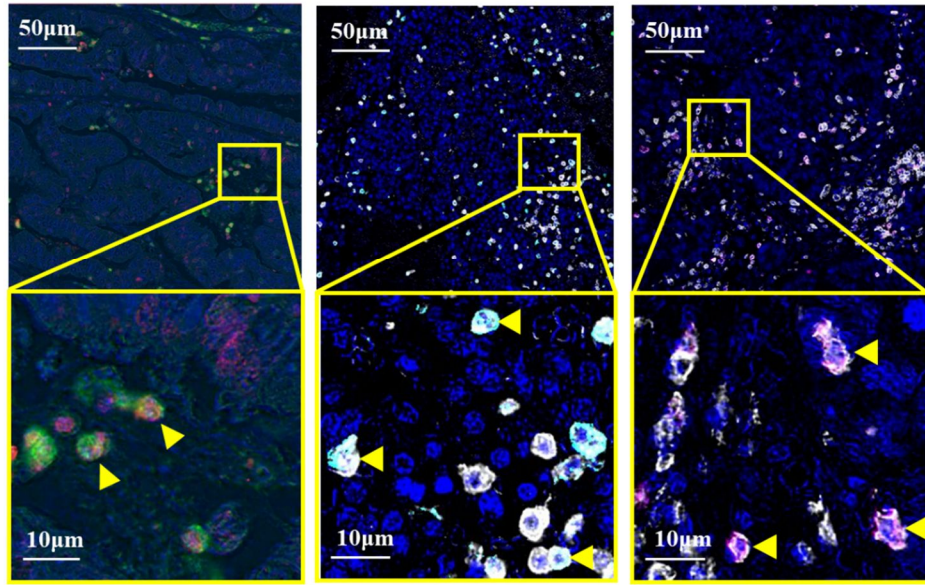
(3) ヒト卵巣癌における NETs と TILs の検討

CD66b(+)Cit-H3(+) 細胞を NETs として同定すると、その密度は進行期でより高く、CD4(+) および CD8(+) T 細胞の密度と逆相関した($r=-0.5182$, $p<0.01$; $r=-0.5684$, $p<0.001$) (図 3A, B)。単変量解析では、術後の無増悪生存率(PFS)は NETs 高群で有意に悪かった($p<0.05$) (図 3C)。他の予後不良因子として、CA125、ステージ、PS、および不完全切除が挙げられたが、これらを含めた多変量解析により、NETs 高群 (HR 5.08, 95%CI: 1.15 ~ 19.4, $p=0.021$) と不完全切除 (HR 2.64, 95%CI: 1.20 ~ 5.78, $p=0.015$) が PFS 不良の独立した予測因子であることが明らかになった。

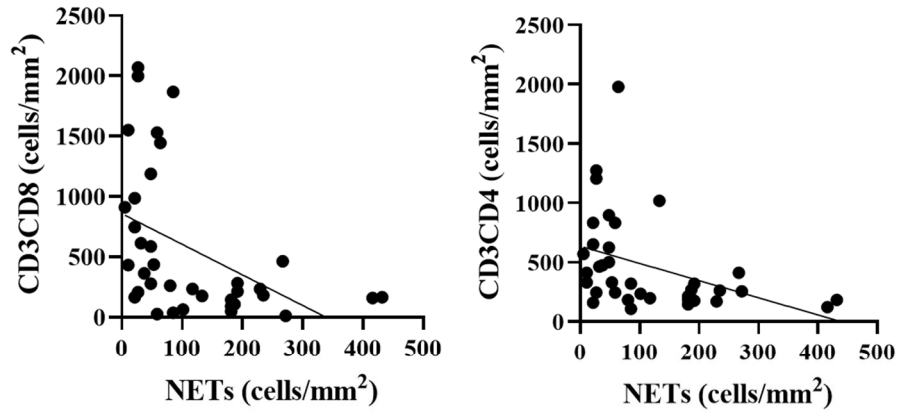
(4)まとめ

固形腫瘍の微小環境における NETs は CXCL11 などのケモカインを効率よく分解し、活性化 T リンパ球の浸潤を抑制し、がんの進行を促進する可能性があることが示唆された。切除標本における NETs の定量は卵巣癌患者の予後マーカーとなると考えられた。

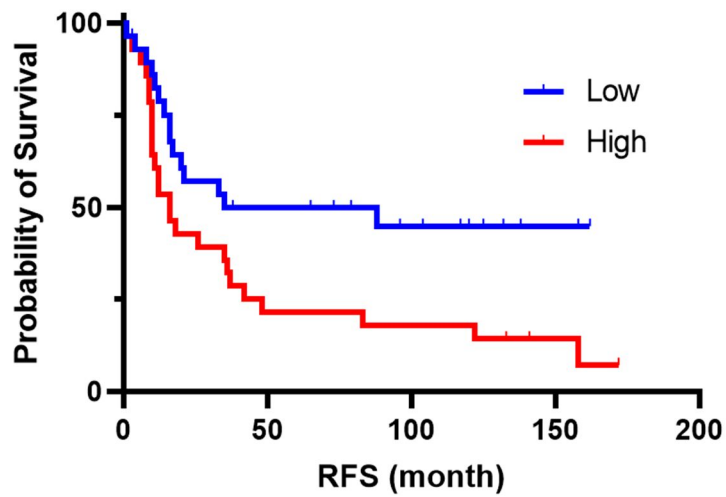
(A)



(B)



(C)



No. at risk						
Low	29	15	14	14	14	14
High	29	7	6	5	4	4

図 3. ヒト卵巣癌組織における NETs と T リンパ球の浸潤様式と患者予後

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 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Kazuya, Kurashina Kentaro, Yamaguchi Hironori, Kanamaru Rihito, Ohzawa Hideyuki, Miyato Hideyo, Saito Shin, Hosoya Yoshinori, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 13
2. 論文標題 Altered intraperitoneal immune microenvironment in patients with peritoneal metastases from gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 01-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.969468	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 Tamura Kohei, Miyato Hideyo, Kanamaru Rihito, Sadatomo Ai, Takahashi Kazuya, Ohzawa Hideyuki, Koyanagi Takahiro, Saga Yasushi, Takei Yuji, Fujiwara Hiroyuki, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 8
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps (NETs) reduce the diffusion of doxorubicin which may attenuate its ability 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 e09730 ~ e09730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e09730	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 金丸 理人, 山口 博紀, 高橋 和也, 金子勇貴, 加賀谷 丈紘, 高木 徹, 松本 志郎, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 細谷 好則, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 IP-PTX+SOX療法に奏功を認めた腹膜播種陽性胃癌症例に対するconversion surgeryの成績
3. 学会等名 第84回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金丸 理人, 山口 博紀, 高橋 和也, 高木 徹, 倉科 憲太郎, 齋藤 心, 大澤 英之, 細谷 好則, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 4型スキルス胃癌・腹膜播種に対するパクリタキセル腹腔内投与 (IP-PTX) 併用SOX療法とConversion Surgery
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

1. 発表者名 高橋 和也, 大澤 英之, 金丸 理人, 松本 志郎, 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 胃癌腹膜播種における腹腔内免疫細胞の解析
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022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, 北山丈二, 佐田尚宏
2. 発表標題 Flow cytometryを用いた胃癌患者腹腔内免疫細胞の解析
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

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 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

〔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