

令和 5 年 6 月 9 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：2021～2022

課題番号：21K20958

研究課題名(和文)術後患者における末梢血中への低比重好中球の誘導機構の解明とその臨床的意義

研究課題名(英文)Mechanisms and clinical relevance of egress of low density neutrophils in postoperative patients

研究代表者

熊谷 祐子(Kumagai, Yuko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30625554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：根治切除を施行した176例の大腸癌患者の術後の血中低比重好中球(LDN)の割合は術前と比べて顕著に上昇しており、術後出血、手術時間と正の相関を示した。このLDNは未成熟型の抗原を高発現し、多量の細胞外トラップ(NETs)を産生し、多数のがん細胞を接着させた。術後LDN高値群の患者は低値群と比べて再発が多く、無再発生存期間(RFS)が有意に悪かった。以上のことから、手術侵襲は循環血液中に未熟型LDNを誘導し、再発の進行を助長している可能性があることが示唆された。術後LDNの比率は再発の高リスク群を選択するためのバイオマーカーとして有用性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍免疫における好中球の果たす役割については未知な部分が多い。本研究にて、術後早期の手術ストレスによって多数に未熟型LDNが循環血液中に補充され、標的臓器の血管床でNETsを産生し、循環癌細胞を着床させることを介して再発の進行を助長している可能性があることを新たに指摘することができた。手術後のLDNの比率は治療手術を受けた大腸癌患者において再発の高リスク群を選択するためのバイオマーカーとして有用性があること、とくに術後補助療法の適応を判断する上で重要な情報になることが証明できたという点で臨床的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In 176 patients who underwent radical colectomy, the number of low density neutrophils (LDN) was markedly increased after surgery and their ratio correlated positively with operative time and intraoperative blood loss. The LDN showed immature phenotype and produced high amount of neutrophil extracellular traps (NETs) which efficiently trapped tumor cells in vitro. The ratio of postoperative LDN was significantly higher in 13 patients who developed recurrence. When cut-off value was determined as 4.9%, high ratio of the LDG was a strong and independent prognostic factors for worse relapse free survival (RFS). Adjuvant chemotherapy significantly improved RFS in stage III patients with high ratio of the LDG, but not in low LDG group. Surgical stress recruit many LDN, which may assist the development of recurrence. The ratio of LDN after surgery can be used as a biomarker to select the high risk group of recurrence in patients who underwent curative surgery for colorectal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：低比重好中球 大腸癌 再発 フローサイトメトリー 予後因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好中球は細胞外トラップ(NETs)を放出し、細菌などの病原体の捕捉、殺菌することで感染の拡大を防止するが、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。一方、手術患者においては、侵襲に対する生体反応として、術後に血中の未熟型好中球が増加する事実はよく知られているが、この好中球の機能やがんの病態に及ぼす影響については不明な点が残る。低比重好中球 (low density neutrophils: LDN) は遠心分離で単核球分画に分離される細胞群で、通常の高比重好中球(High density neutrophils : HDN)と異なる機能を有し、がん進行との関連が報告されている。申請者はこれまでの研究で、消化器癌患者の術後末梢血中では、外科的ストレスに反応しこの LDN が増加し、T 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。そこで、本研究では癌患者に術後 LDN が NET を介してがんの再発、患者予後に影響を与えているのではないか? という仮説を設定し、当科にて手術を施行した消化器癌患者の血液検体を用いて検証を行うことにした。

2. 研究の目的

消化器癌患者の術前と術後の末梢血を採取し、そのうちの LDN の割合の変化と術後経過の関連性を検討し、担癌患者の術後再発を予測するマーカーとなるかを明らかにする。また、術後の LDN の NET 産生能を In vitro で測定し、外科的ストレスが LDN を増加させる機序と遠隔転移の成立に及ぼすメカニズムを追求する。

3. 研究の方法

(1) LDN の頻度とフェノタイプの測定

消化器癌で開腹手術を受ける患者から、術前直後の末梢血を手術室にて 3ml 採取し、Ficoll 液で遠心分離し、単核球が存在する中間層を採取し、汎白血球マーカー CD45、および好中球特異的マーカー CD66b に対するモノクロナル抗体で二重染色を行い、CD45(+)/CD66b(+)分画を LDN と規定し、CD45(+)細胞に対する割合を Flow cytometry を用いて定量した。さらに、好中球上の抗原 CD11b、CD16、CXCR2、CD62L に対する抗体を用いて多重染色し、それらの抗原の発現量を HDN と比較定量した。

(2) LDN の機能解析

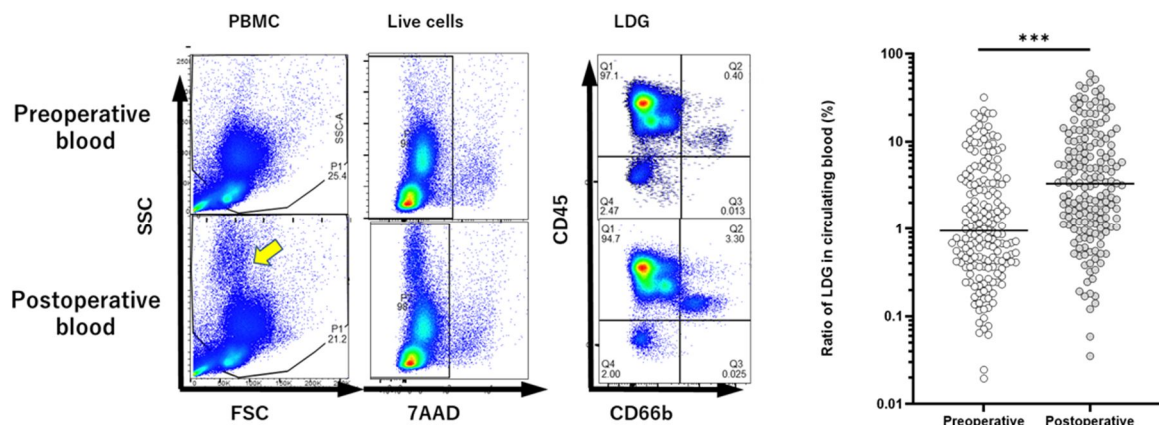
LDN と HDN を分離後 In vitro で培養し、Annexin V と 7-AAD で染色し、アポトーシスの割合を経時的に測定した。また、LPS 10µg/ml の濃度で 30 分刺激後に、洗浄を行い、4 時間培養したのち、SYTOX orange にて NETs の産生状況を蛍光顕微鏡下で検討した。また、蛍光標識した大腸癌細胞 DLD1 を添加し、5 分後に軽く洗浄し、NETs への接着状況を確認した。

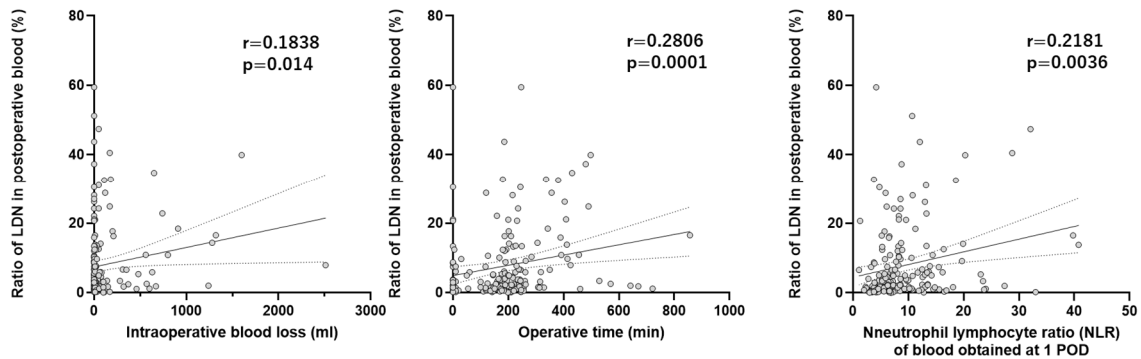
(3) 全症例の中で根治切除を施行した 178 例の大腸癌患者に絞って、術後の CD66b(+)LDN の割合と術後再発、生存率との相関性を前向きに検討し、予後に及ぼす影響を log-rank 法、コックス回帰分析にて検討した。

4. 研究成果

(1) 術後 LDN の頻度と抗原発現

176 名の患者の術前サンプル中の LDN の比率は低く (M=0.95%、0.019%~31.96%)、病理学的要因と有意な相関を示さなかった。しかし、術後の LDN の比率が著しく上昇しており (M=3.3%、0.035% ~ 59.45%、 $p < 0.0001$)。術中出血量 ($r=0.1838$ 、 $p=0.014$)、手術時間 ($r=0.2806$ 、 $p=0.0001$) および好中球リンパ球比率 (NLR) と有意な相関を示した (図 1)。



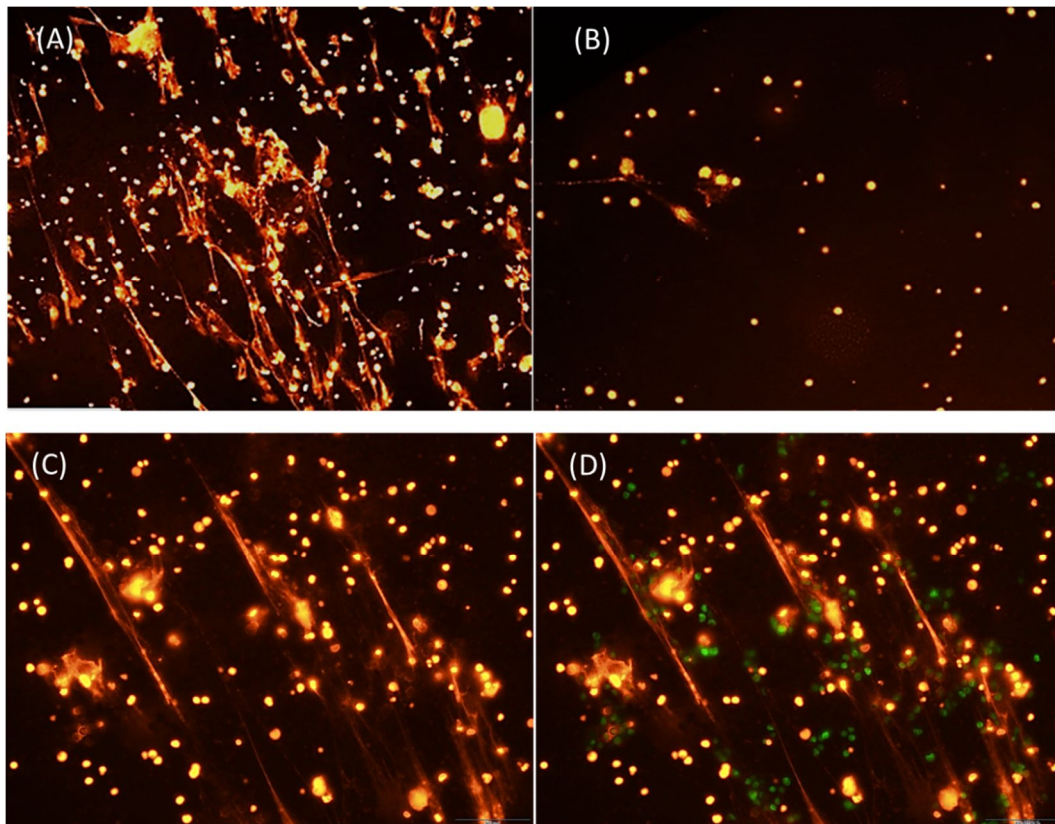


(図 1) The ratios of LDN in preoperative and postoperative blood samples. Y-axis was plotted with log scale, and bars show median values of 176 patients ***:p<0.001 Correlation between the ratios of LDG in postoperative blood and intraoperative blood loss, operative time and neutrophil lymphocyte ratio (NLR) examined in blood taken at admission. R and p-values were calculated with Spearman rank regression analysis.

また、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、より未成熟型の好中球であると考えられた。

(2) 術後 LDN の機能

培養後 8 ~ 24 時間後には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。また、LDN は in vitro の短期培養で HDN と比べて明らかに多量の NETs を産生し、多数の DLD1 細胞を接着させた。(図 2)

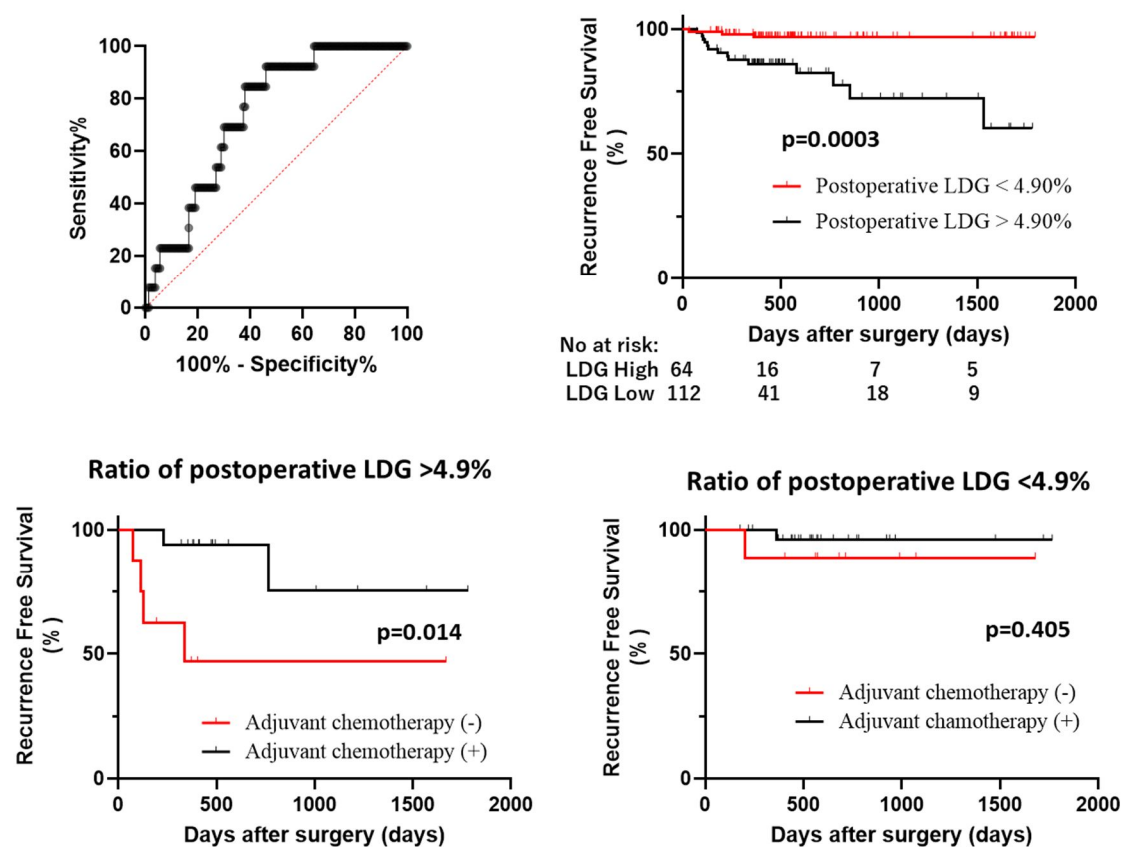


(図 2) LDN(A,C) or HDN(B) were purified from postoperative blood samples using MACS separation kit and cultured on poly-L-lysine coated 6 well plates. After 2 hours, SYTOX orange was added and observed with a fluorescence microscope. DLD-1 stained with PKH-67 were added on (C) and the wells were gently washed after 5 min co-incubation. NETs and attached tumor cells were observed using appropriate wavelength filters for SYTOX orange and PKH67, respectively, and two photos merged.

(3) 術後 LDN と予後との関連

176 人中 13 人に術後再発を認め、それらの患者の術後 LDN は、再発のない患者より有意に高かった ($p=0.004$)。ROC 分析により cut-off 値を 4.9% とした場合、LDN 比が 4.9% を超える患者では無再発生存期間(RFS)が有意に悪かった ($p=0.003$) (図 3 上)。この傾向はすべての病期で認められ (Stage I で $p=0.012$ 、Stage II で $p=0.042$ 、Stage III では $p=0.028$) (図 3)。全生存期間 (OS) も、LDN 高値群では悪い傾向があった ($p=0.099$)。単変量コックス回帰分析により、術後 LDN 高値は RFS 悪化の予後因子であり ($HR=7.267$, $p<0.01$)、病学的 T 期および N 期、高い CEA レベル、および高い NLR を含む多変量解析でも RFS の悪化と独立して関連していた ($HR=5.557$, $p=0.009$)。

さらに、Stage III の CRC 患者 62 人のうち、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 か月間受けたが、17 人の患者は補助療法を受けなかった。このうち、術後 LDN 高値群では補助化学療法は 25 人の患者の RFS を有意に延長していたが ($p<0.05$)、低 LDN 群の患者 37 人のうち再発したのは 2 人のみで、補助療法は転帰に有意な影響を与えなかった ($p=0.405$) (図 3 下)。



(図 3 上) Receiver operating characteristic (ROC) curve for the ratio of postoperative LDN in tumor recurrence. Recurrence free survival (RFS). P values were calculated with log-rank test.

(図 3 下) Recurrence free survival (RFS) of the patients with stage III CRC who received and did not receive adjuvant chemotherapy. P values were calculated with log-rank test.

(4) まとめ

大腸癌患者においては、術後早期の手術ストレスによって多数に未熟型 LDN が循環血液中に補充され、標的臓器の血管床で NETs を産生し、循環癌細胞を着床させることを介して再発の進行を助長している可能性があることが示唆された。手術後の LDN の比率は治癒手術を受けた大腸癌患者において再発の高リスク群を選択するためのバイオマーカーとして有用性があると考えられた。

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 Kono Yoshihiko, Inoue Ryo, Teratani Takumi, Tojo Mineyuki, Kumagai Yuko, Morishima So, Koinuma Koji, Lefor Alan Kawarai, Kitayama Joji, Sata Naohiro, Horie Hisanaga	4. 巻 103
2. 論文標題 The Regional Specificity of Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Distal Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000519487	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 KUMAGAI YUKO, FUTOH YURIE, MIYATO HIDEYO, OHZAWA HIDEYUKI, YAMAGUCHI HIRONORI, SAITO SHIN, KURASHINA KENTARO, HOSOYA YOSHINORI, LEFOR ALAN KAWARAI, SATA NAOHIRO, KITAYAMA JOJI	4. 巻 36
2. 論文標題 Effect of Systemic or Intraperitoneal Administration of Anti-PD-1 Antibody for Peritoneal Metastases from Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1126 ~ 1135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12811	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 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 BJSOpen zrac154
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 -

〔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 風堂 ゆりえ, 北山 丈二, 金子 勇貴, 高橋 和也, 木村 有希, 熊谷 祐子, 太白 健一, 直井 大志, 佐田友 藍, 大澤 英之, 宮戸 秀世, 鯉沼 広治, 堀江 久永, 山口 博紀, 佐田 尚宏
2. 発表標題 大腸がん患者の術直後の血中低比重好中球比率が補助化学療法の再発予測因子となるか
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 風當ゆりえ, 北山丈二, 金子勇貴, 高橋和也, 木村勇希, 太田学, 熊谷祐子, 太白健一, 直井 大志, 佐田友藍, 井上 賢之, 大澤英之, 宮戸秀世, 鯉沼広治, 佐久間康成, 堀江久永, 細谷好則, 佐田尚宏
2. 発表標題 大腸癌患者の術後末梢血中低比重好中球と予後の関連性
3. 学会等名 第77回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷 祐子, 宮戸 秀世, 大澤 英之, 山口 博紀, 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 消化器癌患者の術直後末梢血中の低比重好中球の割合は侵襲度と相関し、術後再発の予測因子となりうる
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
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
---------	---------