

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16543

研究課題名（和文）進行消化器癌患者における低比重好中球の末梢への誘導機構と腫瘍学的意義の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of the egression of low density granulocytes from bone marrow in patients with advancer cancer

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：根治的結腸切除術を受けた患者において、CD45(+)白血球中のCD66b(+)低比重好中球LDNの数は手術直後に顕著に増加し、LDN高値群の無再発生存期間は有意に短く、独立した予後予測因子であった。ステージIIIの患者において、補助化学療法はLDN高値群のRFS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。このLDNは短期間の培養後に大量の好中球細胞外トラップ（NET）を生成し、in vitroで腫瘍細胞を効率的に捕獲した。LDNは大腸癌術後の早期時点で外科的ストレスによって循環血液中に誘導され、NETの産生を介して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

手術前後の末梢血中の低比重好中球（LDN）の表現型を特定し、アポトーシスを起こしにくいという新規知見を得ることができた。また、100例を超える臨床検体を用いて、術後LDNの割合が再発を予測する新たなバイオマーカーとなりうることを示唆する結果が得られた。また、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社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In patients undergoing radical colectomy, the number of CD66b(+) low density neutrophils (LDN) significantly increased in CD45(+) leukocytes immediately after surgery, and recurrence-free survival was significantly shorter in patients with high LDN levels, making them an independent prognostic factor. In patients with stage III disease, adjuvant chemotherapy significantly improved RFS in patients with high LDN levels, but no difference in prognosis was observed in patients with low LDN levels. These LDN produced large amounts of neutrophil extracellular traps (NETs) after short-term culture and efficiently captured tumor cells in vitro. LDN are induced in the circulation by surgical stress early after colorectal cancer surgery and are thought to be associated with recurrence through the production of NETs.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 再発 低比重好中球 好中球細胞外トラップ 無再発生存期間 手術侵襲

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、遠心法で分離される比重の軽い好中球は、低比重好中球 (LDN; Low density neutrophil) と呼ばれ、自己免疫疾患、重症感染症やがん患者の末梢血中で増加しており、獲得免疫を抑制する機能を持つこと、好中球細胞外トラップ (NET; Neutrophil extracellular traps) を起こしやすいことなどが既に報告されている。NET は、刺激を受けた好中球が核内 DNA に酵素群を付着させた網目状の構造物を細胞外に放出する現象で、近傍の病原体を捕捉しまとめて殺菌する生体防御機構と考えられていたが、近年、NET は血小板や癌細胞なども効率的に捕捉し、がん転移を促進する作用を持つことが報告され、がんの病態とも深く関連することが指摘されている。事実、肺癌や乳癌患者の末梢血中には幼弱型 LDN が増加しており、その割合は転移を有する進行症例でより高くなることが既に報告されている。この現象は骨髄での造血亢進に伴う幼弱な好中球の末梢への流出によるものと考えられるが、詳細な機序は不明であり、その臨床的意義も十分には解明されていない。

2. 研究の目的

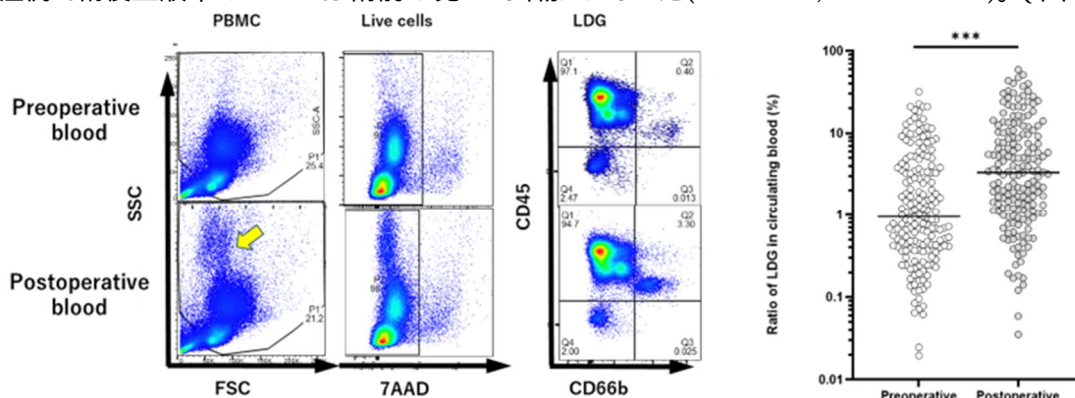
大腸癌患者を例として、がん患者における末梢血中の LDN の頻度と NET 産生能を測定し、がんの病態との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

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ビーズ法を用いて LDN を分離し、In vitro での NET の産生能を検討した。また、単核球中の CD66b(+)LDN の割合を flowcytometry で測定し、再発、患者予後との相関性を検討した。

4. 研究成果

(1)手術患者の術前と術直後に末梢血を採取し、Ficoll 遠心法にて顆粒球と単核球を分離し、CD45(+)CD66b(+)細胞を低比重好中球 (LDN) とし、その割合を測定したところ、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いた (M=3.38%, 0.035-59.5%)。 (図 1)



(図 1)

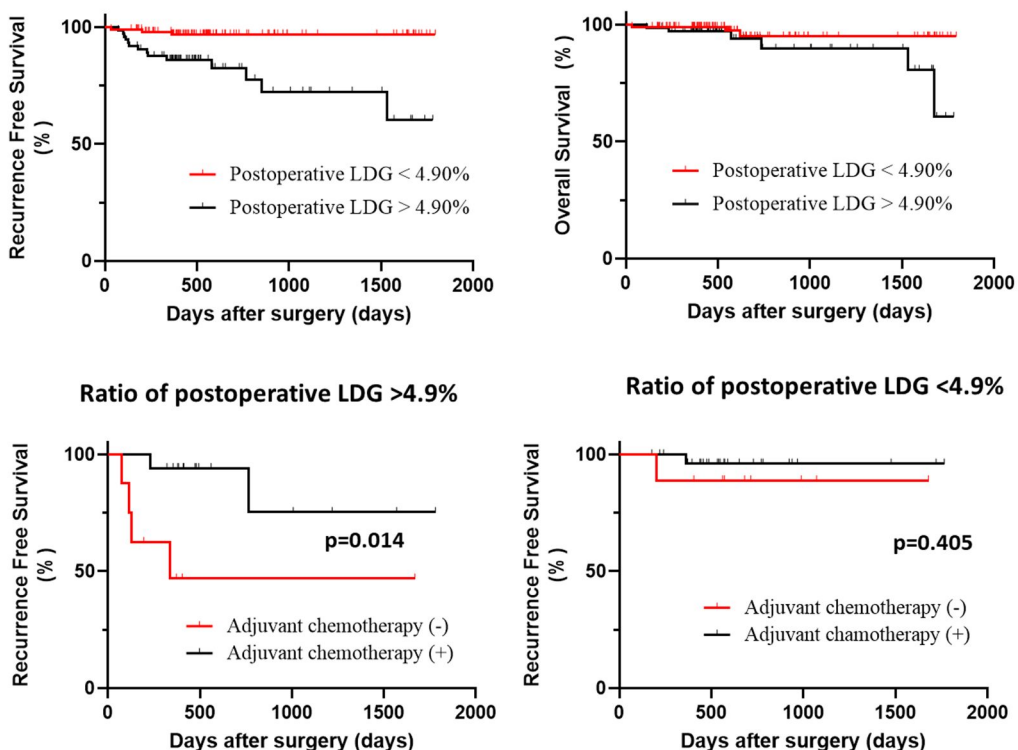
また、抗原発現を Flow cytometer で測定したところ、高比重好中球 (HDN) と比べ、LDN は成熟マーカーの CD11b、CD16、CD66b の発現が低く、未成熟マーカーの CXCR2、CD62L の発現は高く、より未成熟型のフェノタイプであった。また、PD-L1 は LDN ではほとんど発現を認めなかったが、LDN では有意な発現を認めた。

(2) 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。

(3) 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、宿主血管系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。

(4) 当科にて根治切除を施行した 178 例の大腸癌患者の術前 LDN の割合は中央値 (M)=0.97%(0.019-32.0%)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。一方、術直後に採取した血液中の LDN は手術時間、出血量と弱い正相関を示した($r=0.23, 0.16$)。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 ($p=0.0014$) (図 2 上)

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。(図 2 下)



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 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 -

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 2022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 -

〔学会発表〕 計2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 風堂ゆりえ, 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

〔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

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