

氏名	熊谷祐子
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第628号
学位授与年月日	令和3年3月15日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	消化器癌患者における術後末梢血中の低比重好中球の解析
論文審査委員	(委員長) 布宮伸教授 (委員) 高橋將文教授 松原大祐准教授

論文内容の要旨

1 研究目的

消化器癌で根治手術を施行した患者における遠隔再発は予後を規定する重要な因子である。近年、がんなどの疾患を有する患者の末梢血中には低比重好中球(Low density neutrophil :LDN)が増加し、免疫応答と深く関わっていることが報告されている。一方、手術侵襲により全身の免疫能が一過性に低下し、術後のがん再発に関与している可能性が指摘されているが、その機序は不明である。本研究では、消化器癌で手術を受けた患者の末梢血中 LDN の推移と機能を解析し、術後再発との関連性について検討した。

2 研究方法

- 1) 当科で消化器癌手術を受けた患者の手術開始と終了時に採血し、比重遠心にて単核球分画を採取し、その中に含まれる CD66b(+)細胞を LDN と定義し、CD45(+)全白血球中の LDN の割合を手術前後で算定し、患者・手術因子との関連を検討した。
- 2) 術後末梢血中の LDN と正常好中球(Normal density neutrophil :NDN)を CD66b 標識ビーズを用いて分離し、細胞形態、生存時間、細胞表面の抗原発現、好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular traps :NET)形成能、T リンパ球の増殖分裂とがん細胞障害活性への影響を in vitro で検討した。
- 3) ステージ 2,3 大腸癌で根治手術を施行した患者において、術後 LDN の割合と術後遠隔転移再発・予後との関連性を検討した。

3 研究成果

- 1) 消化器がん患者 177 名の手術開始時の LDN の割合は、中央値(M)=0.77% (0.02%~19.7%) に対し、終了時には M=3.5% (0.12%~86.2%) と著明に増加していた($p < 0.001$)。また手術開始時の LDN の割合は、性別、年齢、進行度や対象臓器で有意差は認めなかったが、終了時の LDN の割合は、手術時間と出血量との間に正の相関を認めた($r=0.41, p < 0.0001, r=0.22, p=0.003$)。
- 2) 手術終了時の LDN を透過型電子顕微鏡で観察すると、LDN は桿状核と豊富な細胞質を有し、分葉した核を持つ NDN と比べると未成熟型の形態を示していた。また Flow cytometer で表

面抗原の発現を解析すると、NDN 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。さらに、免疫チェックポイント分子 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 ($0.41 \pm 0.15\%$ vs $4.84 \pm 2.26\%$, $p < 0.05$)。

- 3) 分離した LDN と NDN を Annexin V 抗体と 7AAD で染色し、Flow cytometer で apoptosis の割合を検討すると、16 時間後の early apoptosis の割合は LDN で有意に少なく ($6.58 \pm 4.2\%$ vs $25.68 \pm 5.2\%$, $p < 0.05$)、24 時間後では early apoptosis と late apoptosis の割合がともに LDN で有意に少なかった (early apoptosis, $18.4 \pm 8.4\%$ vs $47.9 \pm 10.1\%$, late apoptosis $0.92 \pm 0.2\%$ vs $4.03 \pm 1.4\%$, $p < 0.05$)。
- 4) T リンパ球の増殖への影響を CFSE assay で検討した。LDN を共培養すると T 細胞の分離した LDN と NDN を Annexin V 抗体と 7AAD で染色し、Flow cytometer で apoptosis の割合を検討すると、16 時間後の early apoptosis の割合は LDN で有意に少なく ($6.58 \pm 4.2\%$ vs $25.68 \pm 5.2\%$, $p < 0.05$)、24 時間後では early apoptosis と late apoptosis の割合がともに LDN で有意に少なかった (early apoptosis, $18.4 \pm 8.4\%$ vs $47.9 \pm 10.1\%$, late apoptosis $0.92 \pm 0.2\%$ vs $4.03 \pm 1.4\%$, $p < 0.05$)。
- 5) 分裂増殖は CD4、CD8 とともに dose dependent に抑制され、T リンパ球に対して 1/100 の数の LDN が存在するだけで有意な抑制が認められ、1/10 の数では半数以下まで分裂増殖が抑制されていた (no LDN : 1/10 数添加, CD4: $72.3 \pm 2.5\%$ vs $30.2 \pm 5.2\%$, $p < 0.01$, CD8: $48.2 \pm 9.7\%$ vs $10.9 \pm 1.4\%$, $p < 0.03$)。
- 6) 活性化リンパ球によるがん細胞障害活性に対する LDN の影響を、r-IL2 で活性化したリンパ球 (lymphokine-activated killer : LAK 細胞) とヒト胃癌細胞株 OCUM-1 を共培養し、OCUM-1 の apoptosis の割合を Flow cytometer で計測する実験系で検討した。OCUM-1 は単独培養で 5~6% 程度の apoptosis を示したが、LAK 細胞と共培養すると early apoptosis と late apoptosis の割合はそれぞれ $32.5 \pm 0.3\%$ と $24.5 \pm 1.8\%$ と増加した。しかし、LDN を加えて共培養すると、LAK 細胞によるがん細胞障害活性は有意に抑制された (early apoptosis $26.1 \pm 0.3\%$, $p < 0.01$, late apoptosis $17.3 \pm 0.4\%$, $p < 0.01$)。
- 7) 分離した LDN と NDN を poly-L-lysine コート上で 2 時間培養後、SYTOX 試薬を添加すると、LDN は NDN よりも細胞外に多数の糸状構造の DNA 成分が放出されている像が蛍光顕微鏡で観察された。この糸状構造は DNase I でほぼ完全に分解され、NET であることが確認された。また、この NET 上には Colon26、NUGC-4、MKN45 などの癌細胞が多量に接着した。
- 8) ステージ 2-3 の結腸直腸癌 77 名に絞って、手術前後の末梢血 LDN の割合と術後遠隔転移再発との関連を検討した。観察期間中央値 11 か月で、77 名中 8 例に再発を認めた。年齢、部位、pN 分類、分化度、静脈浸潤、リンパ管浸潤、術後補助化学療法の有無は、再発と相関を認めなかったが、術後 LDN の割合は再発患者では非再発患者に比べ有意に高値を示した ($M=13.25\%$, $3.37\%-32.77\%$ vs $M=1.98\%$, $0.035\%-43.72\%$, $p=0.0002$)。術後 LDN の割合の平均値 (6.32%) 以上と未満の症例で 2 群に分けると、LDN 高値群で無再発生存期間 (Relapse Free Survival : RFS) が有意に短かった。また、性別、pT を含めた多変量解析で、術後 LDN の割合は RFS を規定する独立因子であることが判明した。

4 考察

消化器がん患者の術後末梢血中には、形態学的特徴と表面抗原から未成熟型の LDN が多量に存在した。この LDN は、手術時間と出血量に正の相関を示し増加したことから、手術侵襲によって誘導された炎症シグナルにより、緊急時の骨髄での好中球造血が亢進した結果として末梢血中に補充動員された未成熟な好中球であることが推測される。この術後患者の末梢血中 LDN は、抗原刺激に対する T 細胞の分裂増殖を強く抑制するとともに、活性化リンパ球によるがん細胞障害活性をも抑制する効果を有していることから、がんに対する免疫寛容の誘導に寄与していると考えられる。さらに、術後末梢血中の LDN は NET 形成を起こしやすく、効率的に癌細胞を捕捉することが分かった。以上の事実は、肝臓内の NET が循環がん細胞を捕捉し肝転移を増大させることを示したマウスモデルでの報告と一致し、ヒトにおいても LDN 由来の NET が、がん転移を促進している可能性があることが示唆された。最後に、大腸癌ステージ 2, 3 では、術後 LDN の割合が高いことが遠隔再発、予後を規定する因子であった。この臨床データは *in vitro* の解析結果と良く合致しており、大腸癌手術患者において術後に末梢血中へ誘導された LDN が遠隔再発の成立に寄与していることを示唆していると考えられた。

5 結論

腹部手術を受けた消化器がん患者においては、手術侵襲により多量の未成熟な LDN が末梢血中に誘導される。この LDN は、標的臓器内で NETs を産生し循環がん細胞を捕捉し、局所での T 細胞の免疫応答を抑制することで、標的臓器での腫瘍細胞の着床・生存を助長する作用を持つと考えられる。LDN を標的とした新たな術後再発予防法の開発が期待される。

論文審査の結果の要旨

消化器癌に対する根治術後患者の遠隔再発は、予後を規定する重要な因子であるが、その機序は明らかではない。一方、手術侵襲により全身の免疫能が一過性に低下して術後の癌再発に関与している可能性から、本研究は、消化器癌で手術を受けた患者の末梢血低比重好中球 (LDN) に着目し、その推移と機序を解析することで、術後再発との関連性を検討したものである。

その結果、

- 1) 手術後患者の末梢血中には未成熟なLDNが多量に存在し、その割合は手術期間や術中の出血量など、いわゆる手術侵襲の程度と正の相関を示した
- 2) 術後末梢血中LDNはT細胞の増殖抑制、活性化T細胞による癌細胞の障害抑制、NETs形成による多数の癌細胞捕捉などの機能を示した
- 3) 大腸癌stage2/3の患者における追跡調査で、術後LDNの割合が遠隔再発や予後を規定する因子となった

などが明らかとなった。

消化器癌患者の遠隔転移におけるLDNの関与を明らかにするという研究目的は明確で、研究方法の妥当性に問題はなく、むしろ新規性があると認められる。すなわち、特色性・独創性の観点からも大きな期待が持てる研究であり、すでに研究の骨子はJournal of Surgical Research誌に

掲載されている。学位論文本文の記載様式については若干の修正を求めたところではあるが、その修正も適切に行われたことが確認されたため、審査員全員一致で、博士論文に相応しいと評価した。

最終試験の結果の要旨

申請者の研究内容の発表は、具体的かつ論理的であり、審査員からの質問に対しても真摯に対応し、淀みない適切な回答が行われたと評価できる。また、関連の質疑応答から、自身の消化器外科医としてのあり方等についても、一定の見識があることが窺えた。また、論文の修正に対しても迅速に対応した能力も評価に値する。

申請者の研究姿勢、関連領域に対する知識等も総合的に勘案し、審査員一同、申請者は医学博士としての資格に達していると判定した。