

表 題 迷走神経シグナルが胃癌の腹腔内免疫微小環境に及ぼす影響
についての検討

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 風當 ゆりえ

担当指導教員氏名 佐田 尚宏 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科

専攻 地域医療学系

専攻分野 消化器疾患学

専攻科 消化器外科学

2024年1月10日申請の学位論文

目次

略語一覧	3
1. 序文	6
2. 実験材料と方法	10
2-1. 手術モデルマウスの作成	
2-1-1. マウス、麻酔および縫合糸など使用器材	
2-1-2. 横隔膜下での迷走神経切離および幽門形成術の手術方法	
2-1-3. 術後経過観察	
2-2. 胃癌腹膜播種モデルの作成	
2-2-1. 使用した細胞および培養条件	
2-2-2. 腹膜播種モデルの作成と腹膜播種の評価	
2-3. 腹腔内洗浄液および脾臓、血液中の免疫細胞の検討方法	
2-3-1. 細胞分離の方法	
2-3-2. 試薬と抗体	
2-3-3. 染色方法および解析方法	
2-4. 免疫染色による大網組織の免疫細胞の検討方法	
2-4-1. 大網組織採取、薄切切片作成	
2-4-2. 試薬と抗体	

2-4-3.	免疫組織化学染色および HE 染色法	
2-4-4.	画像解析方法	
2-5.	統計学的解析	
3.	結果	25
3-1.	手術侵襲がマウスに与える影響	
3-1-1.	手術後のマウスの体重の経時的変化	
3-1-2.	手術後のマウスの免疫細胞の評価	
	①腹腔内洗浄液中 ②脾臓内 の免疫細胞の評価	
3-2.	マウスにおける腹膜播種の経時的変化	
3-2-1.	腹膜播種結節の経時的変化	
3-2-2.	腹膜播種の形成過程における免疫細胞の経時的変化	
	①腹腔内洗浄液中 ②脾臓内 の免疫細胞の経時的変化	
3-3.	迷走神経切離術が腹膜播種に与える影響の評価	
3-3-1.	手術後の腹膜播種形成の程度について 2 術式間での比較	
3-3-2.	手術後のマウスの腹膜播種の形成過程の免疫に与える影響につ	
	いて 2 術式間での比較	
	①腹腔内洗浄液中 ②脾臓内 ③血液中 の免疫細胞の評価	
3-3-3.	手術後のマウスの腹膜播種の形成過程の大網組織の腫瘍細胞お	

よび免疫細胞に与える影響について 2 術式間での比較

3-4. 結果の要約

4. 考察	50
5. 結語	58
6. 謝辞	59
7. 参考文献	60

略語一覧

略語	名称
Ach	Acetylcholine
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
APC	Allophycocyanin
α 7nAChR	Alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor
BSA	Bovine serum albumin
BUV	Brilliant Ultraviolet
BV	Brilliant Violet
CAIP	Cholinergic anti-inflammatory pathway
DAB	3,3'-Diaminobenzidine

DBH	Dopamine beta-hydroxylase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxP3	Forkhead box P3
FVS	Fixable Viability Stain
GC	Gastric cancer
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HE stain	Hematoxylin Eosin stain
HIER	Heat-induced epitope retrieval
IHC	Immunohistochemistry
IVC	Inferior vena cava
LPM	Large peritoneal macrophage
MAC	Minimum alveolar concentration
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MNU	N-Methyl-N-nitrosourea
NA	Noradrenaline

NETs	Neutrophil extracellular traps
NT	No treated
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline with Tween 20
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyde
PM	Peritoneal metastasis
PP	Pyloroplasty with Vagus nerve preservation
RBC	Red blood cell
SD	Standard Deviation
SPM	Small peritoneal macrophage
TAM	Tumor associated macrophage
TH	Tyrosine hydroxylase
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
Treg	Regulatory T cell
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VxPP	Vagotomy with pyloroplasty

第1章 序文

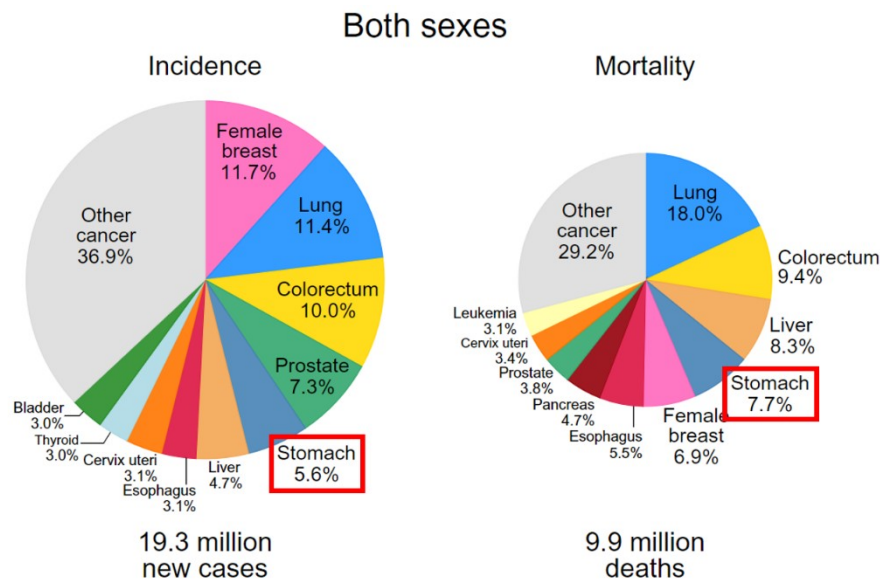


図1. 世界の胃がん罹患数と死亡数（参考文献[1] Figure4A より引用）

胃癌(GC)の発生率は減少傾向にはあるが、国内では罹患数第3位(2019年)死亡数第3位(2021年)である[2,3]。世界でも GLOBOCAN2020 の統計によると36の癌腫のうち新規罹患患者数は5位、癌関連死亡率は4位と依然死亡リスクの高い癌腫である(図1)[1]。そして、胃癌の転移再発形式として最も多いのが、腹膜播種(PM)であり、予後不良な転移再発形式の一つである[4-6]。根治切除手術の際に腹腔内洗浄を行うと T2,3 症例であっても腹腔内に遊離癌細胞を認め[7]、また、漿膜浸潤を伴う T4 の進行胃癌症例においては根治切除術後に一部再発を認め、その約半数の症例が腹膜播種再発をきたす[8-10]。この腹膜播種を制御することを目的として集学的治療を行うことは進行胃癌患者の

予後を改善するために極めて重要であると考えられる。

腹膜播種は原発巣からの腫瘍細胞の遊離、腹膜表面への接着、腹膜中皮下層への浸潤、血管新生による腫瘍の発育などの複数の段階を経て成立するプロセスであると考えられる[11,12]。腹腔内にはその恒常性を維持し、炎症を制御するための様々な免疫細胞が存在し[13,14,15]、腹腔内には体循環とは異なる独自の免疫環境が構築されている[13,16]。そして、胃癌の腹膜播種患者の腹腔内洗浄液中においてこれらの免疫細胞の表現型の変化が報告されており[17]、腹膜播種形成のプロセスにおいてもこれらの免疫細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。

また、大網の脂肪組織内には2次リンパ組織である Milky spot が多数存在する。この Milky spot は B リンパ球を中核としてそれを取り囲むように T リンパ球や骨髄球などが存在しており、免疫細胞の集合体を形成している[18,19]。この Milky spot は腹腔内の感染や炎症の制御に中心的な役割を果たすが[13,16,20]、腹腔内へ遊離した癌細胞が最初に生着する部位としても機能する。このことから、Milky spot 内の免疫細胞は腹膜播種成立に重要な役割を果たしていると考えられる[21-24]。

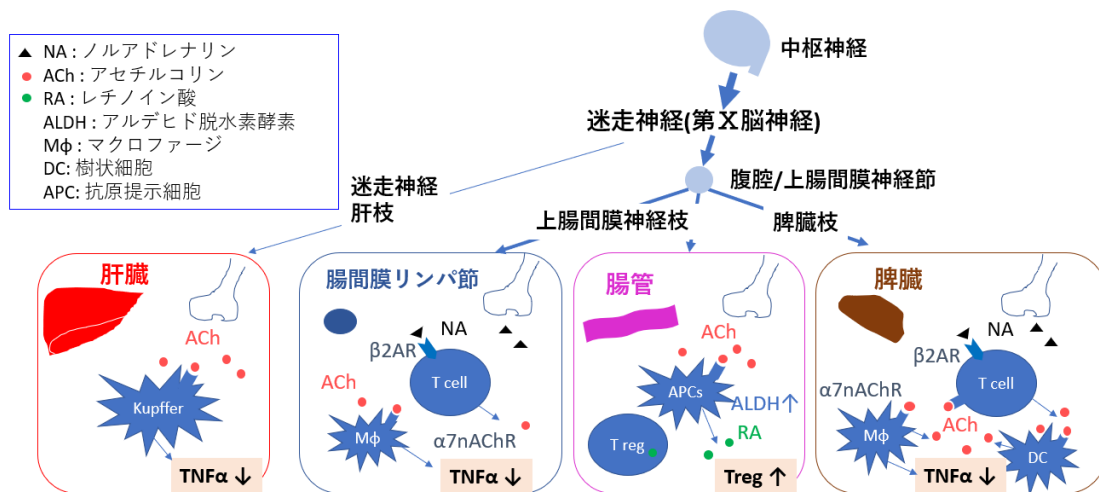


図2. コリン作動性抗炎症経路(Cholinergic anti-inflammatory pathway: CAIP)

迷走神経は第 X 脳神経であり、下部延髄から頸部、心背側、胸部、腹部へと複数の枝を心臓、肺、消化管などの様々な臓器に分岐しながら下降し、これらの臓器の機能を支配している。迷走神経は求心性線維を介して末梢において発生した炎症シグナルを脳へと伝達し、その後、遠心性線維を介して脳からのシグナルを末梢へと伝達することにより、炎症性サイトカインの産生を制御し、抗炎症作用をもたらす。この経路はコリン作動性抗炎症経路 (Cholinergic anti-inflammatory pathway: CAIP) として知られている(図 2)[25-32]。

CAIP の基盤となる分子メカニズムは十分には解明が進んでいないが、迷走神経は複数の神経伝達物質を介して心血管系、神経内分泌系、免疫系に大きな影響を与えることがわかっている[33-36]。

一方で、迷走神経の活動を反映する周術期の心拍数と癌の予後との間に相

関関係があることが疫学調査により示されている[37,38]。このことから、CAIP は癌の進展に大きな影響を与えている可能性がある。また、過去に行われたラットやハムスターを用いた動物実験でも迷走神経切離が胃の腺癌や大腸癌の発癌を促進することが示されている[39-41]。これらのことから、迷走神経切離により迷走神経シグナルを遮断することは、胃癌における腹膜播種の形成にも影響を与える可能性があると考えられる。

胃癌に対する根治的な胃切除術において系統的なリンパ節郭清を行うために、横隔膜下での迷走神経の本幹の切離あるいは部分的な切離が行われることが標準術式となっている。現在、早期胃癌に対する根治的な胃切除術において胆のう結石の発症、術後の下痢、胆汁逆流などの合併症予防や術後の QOL の改善を目的として迷走神経の腹腔枝や肝枝を温存するようになってきた[42-44]。一方で、進行胃癌に対する胃切除術においてはその根治性に対する懸念から一般に迷走神経の温存は検討されておらず、迷走神経切離が胃癌術後の予後に与える影響については、調査があまり進んでいない。

そこで、本研究では、C57BL/6N マウスに迷走神経切離術を施行し、同系胃癌細胞株を腹腔内に投与して腹膜播種を形成させるモデルマウスを用いて、腹腔内免疫に焦点を当てながら、迷走神経切離術が腹膜播種の形成に与える影響を調査した。

第2章 実験材料と方法

2-1. 手術モデルマウスの作成

2-1-1. マウス、麻酔および縫合糸など使用器材

6-9 週齢のメスの C57BL/6N マウスを CLEA 社から購入し、購入後は実験医学センターの飼育室にてゲージ分けし、実験医学センターの温度と湿度が一定に保たれ、12 時間毎の昼と夜が切り替わる環境下にて飼育を行った。7-14 日間の慣らし飼育を行った後に実験に使用した。実験開始時の体重を基準値 1.0 とし、それぞれの時点で測定した体重を基準値にて除した値(ratio of initial body weight)を用いて体重の推移を評価した。自治医科大学動物実験管理委員会によって承認された計画書 (No 20013-02,23022-01)に沿って管理、実験を行った。

2-1-2. 横隔膜下での迷走神経切離および幽門形成術の手術方法

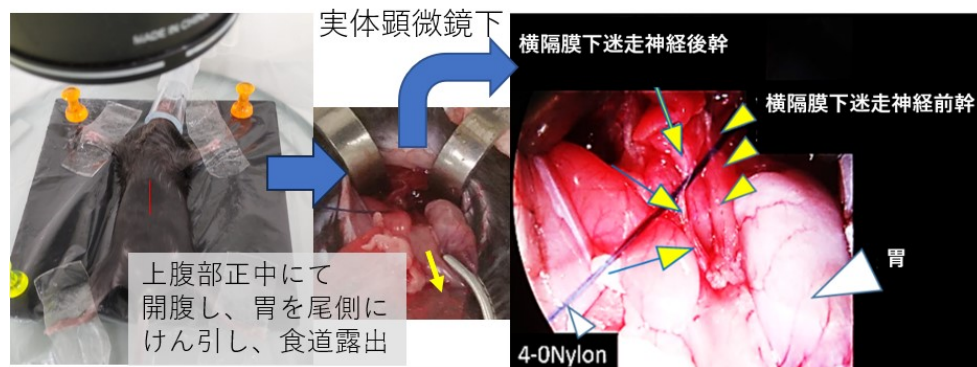


図3. 横隔膜下食道周囲迷走神経の露出

C57BL/6N マウスを 2-3%のイソフルラン(#099-06571, Wako)を充填したボックスに入れることにより、吸入麻酔にて導入麻酔を行った。入眠後、1-2%のイ

ソフルランの吸入による維持麻酔を行いながら実体顕微鏡の上に置いた手術台に仰臥位にして上下肢を固定した。腹部をアルコール消毒後、上腹部正中切開にて開腹し、肝臓および腹壁を挙上した状態に固定した。胃を尾側にけん引し、実体顕微鏡下に食道の前後を走行する迷走神経前幹、後幹、肝枝を露出した(図 3)。迷走神経切離群(VxPP 群)はこれらすべての神経枝を 5 mm程度切離した。その後、迷走神経切離による術後の胃内容停滞を予防するために幽門形成術を行った。具体的には幽門前壁に腸管粘膜を損傷しないようにメス(No.25, アズワン株式会社)で漿膜および幽門筋を長軸方向に切離し、短軸方向に 6-0 ナイロン(AR13 6-0N, 夏目製作所)にて 1 針漿膜筋層を縫合した。迷走神経温存群(PP 群)では、神経枝は露出のみ行い温存し、幽門形成術を VxPP 群と同様に行った。最後に、4-0 ナイロン(A10 4-0N, 夏目製作所)にて腹膜および腹壁をそれぞれ連続縫合することにより閉腹した。VxPP 群では開腹から閉腹まで約 13 分(12-14 分)、麻酔導入から覚醒までは約 18 分(16-20 分)を要した。そのため、PP 群についても VxPP 群と同程度の手術時間、術野展開時間、麻酔時間となるように時間を調整した。

2-1-3. 術後経過観察

手術終了後、覚醒するまで白熱電球にてマウスを加温した。術後 2 日間は通常の半量程度の食事を与え、術後 3 日目以降は食事の制限を解除した。

2-2. 胃癌腹膜播種モデルの作成

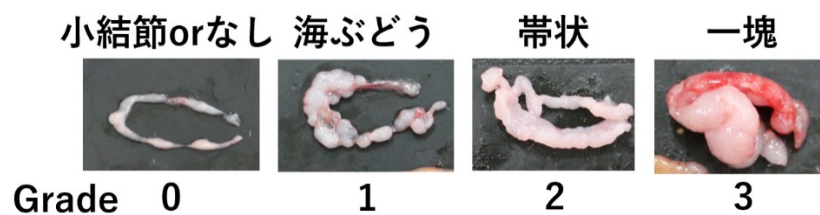
2-2-1. 使用した細胞および培養条件

p53 ヘテロノックアウトマウスに発がん物質 N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) を溶解した飲料水を摂取させると胃癌が発生する[45]。東京大学野村らによってこの胃癌より樹立されたマウス胃癌細胞株 YTN16 を供与していただき、当研究室にて同細胞から in vivo selection 法を用いて腹膜高転移株 YTN16P を作成した[46]。この YTN16P は 1.0×10^6 cells/mouse を腹腔内に投与すると、14 日後にほぼ全例に多数の腹膜播種を形成することを確認しており、この細胞をその後の実験に使用した。37°C、5%CO₂ のインキュベーター内にて 10%FBS、50U/ml ペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、2.5μg/ml プラズモシン、L-グルタミンを添加した DMEM 培地を用い、I 型コラーゲンコーティングディッシュ上で培養を行った。

2-2-2. 腹膜播種モデルの作成と腹膜播種の評価

500μl の HBSS に懸濁した 3.0×10^5 もしくは 1.0×10^6 cells の YTN16P をイソフルランにて麻酔した C57BL/6N マウスの腹腔内に投与した。腹腔内に癌細胞を投与後 16 日もしくは 14 日後に安楽死させ、腸間膜と大網に形成された播種結節の状態を評価した。腸間膜上の播種結節については肉眼的に確認可能な直径 1mm 以上の結節を播種結節として計測した。大網については播種が多くな

ると一塊となり播種数の評価が困難となるため、以下のように 4 段階の Grade にて定義し、播種の程度を評価した。Grade0,1 については播種結節数を測定可能であるが、Grade2,3 については播種数測定困難と判断し、Grade のみにて表記した(図 4)。



Grade0: ひも状、微小結節のみもしくはなし

Grade1: 海ぶどう状に微小結節の集簇を認め、一部組織が肥大している

Grade2: 大網組織全体が帯状に肥厚している

Grade3: 大網組織が一塊となり、omental cakes を形成している

図4. 大網の播種の Grade による評価

2-3. 腹腔内洗浄液および脾臓、血液中の免疫細胞の検討方法

2-3-1. 細胞分離の方法

① 腹腔内洗浄液中の免疫細胞の分離

過量のイソフルランの吸入によりマウスを安楽死させた後、腹部をアルコール消毒し、皮膚を切開、腹壁から皮膚を剥離し、腹壁の筋層を露出させた。その状態で氷冷した PBS を 10ml 注入しておいたシリンジを露出した腹壁に穿

刺し、PBS を 3ml 注入し、軽く腹壁をマッサージした後、勢いよく残りの PBS を 7ml 追加投与した。注入したシリンジにてこの腹腔内洗浄液 10ml を可及的に回収した。回収した洗浄液を 40 μ m のナイロンメッシュにてろ過した後、遠心分離したペレットを PBS に再懸濁し、単細胞化させた。

② 大網の免疫細胞の分離

マウスの脾臓から胃の幽門にかけて胃の大彎側に付着している大網を採取した。大網を 1-2mm 程度に断片化した後、使用マニュアルに従って Tumor Dissociation Kit (#130-096-730; Miltenyi Biotec)による大網組織の Dissociation を行った。回収した細胞懸濁液を 40 μ m のナイロンメッシュにてろ過した後、遠心分離した細胞ペレットを PBS に再懸濁し、単細胞化させた。

③ 脾臓免疫細胞の分離

脾門部の脂肪組織などを除去し、脾臓を採取した。5ml シリンジのシリンダーの先端のゴムの部分を用いて脾臓の被膜から細胞成分をこすり出し、70 μ m のセルストレーナー(#352350, FALCON, Aichi, Japan)にてろ過した後、遠心分離した細胞ペレットを PBS に再懸濁し、単細胞化させた。

④ 血液中の免疫細胞の分離

あらかじめ凝血予防のためにサイトレートを 0.1ml 吸引してあるシリンジを用いて、マウスの下大静脈から血液を採取した。遠心により血漿と血球成分を分

離し、血球成分を PBS に再懸濁した。

⑤ 赤血球処理

①から④の処理により分離した細胞ペレットを RBC Lysis Buffer に懸濁し、4℃ 5 分間静置することにより溶血処理を行った。10 倍量の PBS を用いて希釈中和した後に、遠心分離した細胞ペレットを PBS に再懸濁することで、赤血球成分を除去した。

2-3-2. 試薬と抗体

表 1 フローサイトメトリーで使用した試薬・抗体

N/A: Not Applicable

名称	会社	製品番号
抗体名, clone		
Alexa Fluor® 700 anti-mouse CD3 Antibody, 17A2	Bio Legend	# 100216
FITC anti-mouse CD4 Antibody, GK1.5	Bio Legend	# 100406
Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD4 Antibody, GK1.5	Bio Legend	# 100443
APC anti-mouse CD8a Antibody, 53-6.7	Bio Legend	# 100711
PE anti-mouse CD8a Antibody, 53-6.7	Bio Legend	# 100708
APC anti-mouse/human CD11b Antibody, M1/70	Bio Legend	# 101212
BD Horizon™ BV480 Rat Anti-CD11b, M1/70	BD	# 566117
BD Horizon™ BV711 Rat Anti-CD11b, M1/70	BD	# 563168
PE anti-mouse CD19 Antibody, 6D5	Bio Legend	# 115507
PE anti-mouse CD25 Antibody, PC61	Bio Legend	# 102008
FITC anti-mouse CD45 Antibody, 30-F11	Bio Legend	# 103108
BD Horizon™ BUV395 Rat Anti-Mouse CD45, 30-F11	BD	# 565967
FITC anti-mouse CD49b (pan-NK cells) Antibody, DX5	Bio Legend	# 108906
PE anti-mouse CD86 Antibody, GL-1	Bio Legend	# 105008
BD OptiBuild™ BUV395 Rat Anti-Mouse CD192 (CCR2), 475301	BD	# 747972
BV421™ anti-mouse CD206 (MMR) Antibody, C068C2	Bio Legend	# 141717
APC anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody, 10F.9G2	Bio Legend	# 124312

BV421™ anti-mouse CD279 (PD-1) Antibody, 29F.1A12	Bio Legend	# 135221
APC anti-mouse CD335 (NKp46) Antibody, 29A1.4	Bio Legend	# 137608
PE anti-mouse CX3CR1 Antibody, SA011F11	Bio Legend	# 149006
BD Horizon™ BUV395 Rat Anti-Mouse F4/80, T45-2342	BD	# 565614
BV421™ anti-mouse FOXP3 Antibody, MF-14	Bio Legend	# 126419
GATA-6 XP® Rabbit mAb (PE Conjugate), D61E4	Cell Signaling	# 26452S
APC anti-mouse I-A/I-E Antibody, M5/114.15.2	Bio Legend	# 107614
PE anti-mouse I-A/I-E Antibody, M5/114.15.2	Bio Legend	# 107607
FITC anti-mouse Ly-6C Antibody, HK1.4	Bio Legend	# 128006
PE anti-mouse Ly-6C Antibody, HK1.4	Bio Legend	# 128008
BV421™ anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody, RB6-8C5	Bio Legend	# 108445
PE anti-mouse Tim-4 Antibody, RMT4-54	Bio Legend	# 130006
Rabbit mAb IgG XP® Isotype Control (PE Conjugate), DA1E	Cell Signaling	# 5742S
BV421™ Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody, RTK2758	Bio Legend	# 400549
PE Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody, RTK2758	Bio Legend	# 400508
APC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody, RTK4530	Bio Legend	# 400612
BV421™ Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody, RTK4530	Bio Legend	# 400655
BD Horizon™ BUV395 Rat IgG2b, κ Isotype Control, R35-38	BD	# 563560
PE Rat IgG1, λ Isotype Ctrl Antibody, G0114F7	Bio Legend	# 401906
PE Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody, MOPC-173	Bio Legend	# 400212
BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780	BD	# 565388
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for Phagocytic Cell Labeling	Sigma Aldrich	# PKH26PCL
試薬		
RBC Lysis Buffer(10x)	Bio Legend	# 420301
FcR Blocking Reagent, mouse	Miltenyi Biotec	# 130-092-575
BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer Plus	BD	# 566385
BD Cytfix™ Fixation Buffer	BD	# 554655
BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit	BD	# 554714

2-3-3. 染色方法および解析方法

使用する細胞に FVS780 を室温・15 分間反応させ、死細胞染色を行った。

FACS buffer(FBS を 5%の割合で添加した PBS)にて洗浄(1500rpm 4℃・5 分間遠

心×3 回)後、Fc block で 4°C・10 分間処理し、抗体の非特異的結合のブロックを行った。**表 1** の細胞表面抗原に対する所定の染色抗体を添加し、4°C・30 分間反応させて細胞表面抗原の染色を行った。細胞表面抗原の染色後、FACS buffer にて洗浄(1500rpm 4°C・5 分間遠心×3 回)し、Cytofix™ Fixation Buffer にて 4°C・20 分間固定処理した。洗浄(1500rpm 4°C・5 分間遠心×3 回)後、フローサイトメトリー(BD LSR Fortessa™X-20)を用いて測定を行った。また、細胞内染色を行うものについては細胞表面抗原の染色後、FACS buffer にて洗浄(1500rpm 4°C・5 分間遠心×3 回)し、Cytofix/Cytoperm™ Buffer にて固定・透過処理を行った。その後、再度 Fc block を行い、細胞内染色の抗体を添加し、室温・30-60 分間反応(CD206: 30 分間、GATA6: 50 分間、FoxP3: 60 分間)させて細胞内染色を行った。洗浄(1500rpm 室温・5 分間遠心×3 回)後、フローサイトメトリー (BD LSR Fortessa™X-20) を用いて測定を行った。データは BD Flow Jo™ software (BD Biosciences) を用いて解析、抽出した。

免疫細胞の細胞集団の同定についてはフローサイトメトリーの展開図を各結果に記載する。腹腔内の Macrophage については卵黄嚢由来で組織常在型の大型な Large peritoneal macrophage(LPM)と単球から分化する骨髓由来型の小型な Small peritoneal macrophage(SPM)の 2 つのサブタイプの存在が報告されており[47]、通常、LPM は CD11b^{high}F4/80^{high}MHC-II^{low}、SPM は CD11b^{low}F4/80^{low}MHC-

II^{high} の表現型を呈する。また、血液中の Monocyte については、 $\text{Ly-6C}^{\text{high}}\text{CCR2}^{\text{high}}\text{CX3CR1}^{\text{low}}$ の Inflammatory Monocyte と $\text{Ly-6C}^{\text{low}}\text{CXCR3}^{\text{high}}$ の Patrolling Monocyte の 2 つのサブタイプの存在が報告されており[48,49]、これらのサブタイプについても集団の同定を行った。

免疫細胞の割合(%)は Treg については CD4 陽性 T 細胞に対する割合を、その他の免疫細胞については CD45 陽性細胞に対する割合を用いた。腹腔内洗浄液中の免疫細胞の細胞数(/lavage)はフローサイトメトリーにて gating された生細胞数におけるそれぞれの細胞割合を測定し、その値に腹腔内洗浄液 10ml 中に含まれるトリパンブルーで染色されない生細胞数を乗じた方法で算出した。血液中の免疫細胞の細胞数(/ μL)はフローサイトメトリーにて gating された生細胞数におけるそれぞれの細胞割合を測定し、その値を採取した血液量 1 μL 当たりに含まれるトリパンブルーで染色されない生細胞数を乗じた方法で算出した。

2-4. 免疫染色による大網組織の免疫細胞の検討

2-4-1. 大網組織の採取と組織切片の作成

過量のイソフルランの吸入によりマウスを安楽死させた後、腹部をアルコール消毒し、上腹部正中切開にて開腹し、大網組織を採取した。速やかに氷冷した 4%PFA に入れ、4°Cにて固定後、パラフィン包埋を行った。パラフィンブ

ロック中の組織は 4 μm の厚さに薄切し、スライドガラスに貼り付けて標本を作成した。

2-4-2. 試薬と抗体

表 2 免疫組織化学染色(IHC)および HE 染色で使用した試薬・抗体

名称	会社	製品番号
抗体, clone, Host Isotype		
CD3e Monoclonal Antibody, SP7, Rabbit IgG	Thermofisher	# MA5-14524
CD8a Monoclonal Antibody, 4SM15, Rat IgG2a λ	Invitrogen	# 14-0808-82
AntiCD19 Monoclonal Antibody, EPR23174-145, Rabbit IgG	Abcam	# ab245235
Purified anti-mouse F4/80 Antibody, BM8, Rat IgG2a κ	Bio Legend	# 123102
Ly-6G/Ly-6C Monoclonal Antibody, RB6-8C5, Rat IgG2b κ	Invitrogen	# 14-5931-85
Anti-pan Cytokeratin Monoclonal Antibody, KRT/1877R, Rabbit IgG	Abcam	# ab234297
試薬		
Ethanol	Wako	# 056-09201
Hydrogen peroxide	Kishida chemical	# 000-37655
Methanol	Wako	# 137-01823
Xylene	Wako	# 244-00081
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich	# P7949
Instant citrate buffer	LSI medience	# RM102-C
Blocking one Histo	nacalai tesque	# 06349-64
Carrazzi's Hematoxylin Solution(2x)	Muto Pure Chemicals	# 30022
Eosin Y	Wako	# 058-00062
Mayer's Hematoxylin Solution(1.5x)	Muto Pure Chemicals	# 30002
Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution A	nacalai tesque	# 02373-54
Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution B	nacalai tesque	# 02375-34
Histofine® Simple Stain mouse MAX-PO(R)	Nichireibiosciences	# 414311
Histofine® Simple Stain mouse MAX-PO(Rat)	Nichireibiosciences	# 414341F
ImmPACT® AMEC Red Substrate Kit, Peroxidase	Vector Laboratories	# SK-4285
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, HRP	Dako	# K5007
Marinol 750cps	Muto Pure Chemicals	# 2009-2
MOUNT-QUICK AQUEOUS	Daido Sangyo	# DM-02

2-4-3. 免疫組織化学染色および HE 染色法

免疫組織化学染色(IHC)法：

① 脱パラフィン処理、再水和

組織切片をのせたスライドガラスをベーキング(60℃・20-30 分間)した後、キシレン(5 分間×4 回)に浸漬して脱パラフィンを行い、エタノール(100% 5 分間×2 回)にて脱キシレン、エタノール (90%、80%、70%、50% 各 3 分間)にて再水和を行った。流水にて 10 分間洗浄し、蒸留水に浸漬した。

② 内因性ペルオキシダーゼのブロック

0.3%の過酸化水素/メタノールに組織切片を浸漬し、室温・15 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った。流水にて 5 分間洗浄後、PBS にて 3 分間洗浄した。

③ 熱処理法(HIER)による抗原賦活化

0.01mol/L のクエン酸 Buffer に組織切片を浸漬しながら電子レンジを用いて 95-98℃に加熱、その後も間欠的に加温を繰り返して温度を維持しながら 15 分間反応させ、抗原賦活を行った。室温・10 分間静置し放熱後、PBS-T(Tween20 500μl/PBS 1L)にて 5 分間×2 回洗浄した。

④ ブロッキング

Blocking One Histo(nacalai tesque, Japan)を組織切片上に滴下し、室温・30 分

間反応させ、抗体の非特異的結合のブロックを行った。その後、PBS-T にて 5 分間洗浄した。

⑤ 一次抗体反応

一次抗体による反応は表 2 に記載の抗体および試薬を用いて行った。CD3 (希釈濃度: 1:150)、CD8a (1:100)、Ly-6G/Ly-6C (1:50)、F4/80 (1:100) に対する抗体は Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution A (nacalai tesque) にそれぞれ希釈し、CD19 (1:1000)、pan-Cytokeratin (1:200) に対する抗体は Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution B (nacalai tesque) にそれぞれ希釈し、抗体反応液を作成した。湿潤箱内にて一次抗体を反応(室温・60 分間)後、PBS-T にて 5 分間×2 回洗浄した。

⑥ 二次抗体反応

Rat 由来の抗体である CD8a、Ly-6G/Ly-6C、F4/80 に対してヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO(Rat)を用い、Rabbit 由来の抗体である CD3、CD19、pan-Cytokeratin に対してヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO(R)を用いて湿潤箱内にて二次抗体を反応(室温・30 分間)させ、PBS-T にて 5 分間×3 回洗浄した。

⑦ 発色基質反応

CD3、CD8a、F4/80、CD19、pan-Cytokeratin に対しては DAB、Ly-6G/Ly-6C

に対しては AEC を基質として用い、発色反応を行った。顕微鏡で発色状態を観察しながら発色停止のタイミングを計り、流水にて 10 分間洗浄し発色を停止させた。

⑧ マイヤーのヘマトキシリン染色

マイヤーのヘマトキシリン溶液に室温・1 分間、組織切片を浸漬させ染色後、流水にて 10 分間洗浄した。

⑨ 脱水・透徹、封入

エタノール(50%、70%、80% 各 1 分間、90% 3 分間、100% 3 分間×3 回)にて脱水後、キシレン(5 分間×4 回)にて透徹し、マリノールにて封入した。

AEC を用いて発色した Ly-6G/Ly-6C の切片は脱水透徹を行わず、水溶性封入剤にて封入した。

HE 染色法：

切片は免疫組織化学染色①の脱パラフィン処理・再水和・洗浄後、蒸留水による洗浄後、カラッチのヘマトキシリン液に移して室温・15 分間反応させた。その後、流水にてすすぎ、1%塩酸 70%エタノールにて分別した後、流水にて 10 分間洗浄した。80%エタノールに浸漬させ、エオジン液にて室温・1 分間反応させた。流水にてすすぎ、70%エタノールにて分別した後、脱水・透徹し、封入した。

2-4-4. 画像解析方法

染色後の組織切片は顕微鏡(40×、200×、400×)にて観察し、解析を行った。

CD3、CD8a、CD19、pan-Cytokeratin の切片はランダムに 5 か所の Milky spot を選択し、Milky spot 内の陽性細胞数を計測し、単位面積当たりの細胞数(/mm²)を算出した。F4/80、Ly-6G/Ly-6C はランダムに 5 か所の視野を選択後、大網組織内の陽性細胞数を計測し、単位面積当たりの細胞数(/mm²)を算出した。pan-Cytokeratin 陽性を腫瘍細胞、CD3 陽性を CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性を CD8 陽性 T 細胞、CD19 陽性を B 細胞、F4/80 陽性を F4/80 陽性マクロファージ、Ly-6G/Ly-6C 陽性を好中球と判定し、Milky spot は CD19 染色切片と HE 染色切片を用いて同定した。腫瘍細胞、CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞および B 細胞は Milky spot 内、F4/80 陽性マクロファージおよび好中球は大網組織内の細胞密度(/mm²)にて評価した。大網全体における Milky spot の数を測定し、単位面積当たりの数(/mm²)を算出し、同定した各 Milky spot の面積(μm²)を測定し、その平均値を算出した。

2-5. 統計学的検討

データは GraphPad Prism8 Software(version 8.4.1, GraphPad Software LCC, MA, USA)を用いて解析し、平均値 Mean ± SD もしくは中央値 Median(最小値-最大

値)を表記した。各検定法は結果に個別記載し、 $p < 0.05$ となる場合に統計学的に有意差があると判定した。 $p < 0.05$ の場合に*、 $p < 0.01$ の場合に**の記号を図表に付した。

第3章 結果

3-1. 手術侵襲がマウスに与える影響

3-1-1. 手術後のマウスの体重の経時的変化

rate of initial body weight を用いて、搬入から術後3週間までの体重の経時的変化を調査した(図5)。両群ともに術後1週間は体重増加を認めなかったが、それ以降は緩徐な体重増加を認めた。Mann-Whitney 検定にて2術式間の比較を行ったが、いずれの時点においても有意な差を認めなかった($p > 0.2$, $n=3$)。

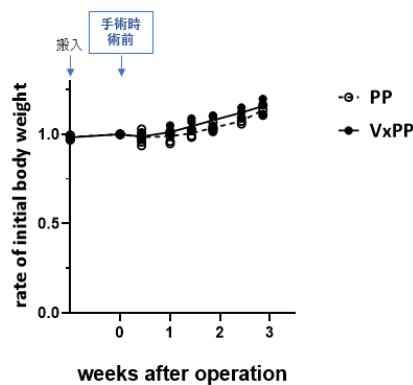


図5. 手術後のマウスの体重の経時的変化

3-1-2. 手術後のマウスの腹腔内洗浄液中および脾臓内免疫細胞の評価

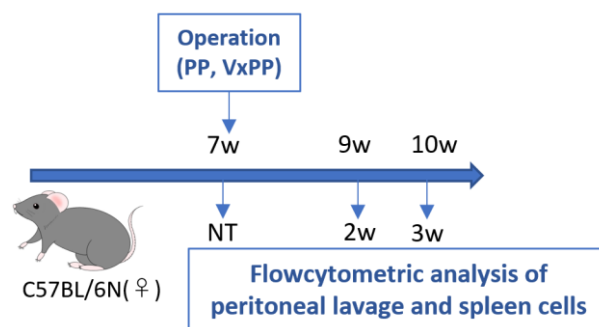


図6. 迷走神経切離が免疫に与える影響を調査

手術時と同一週齢の手術を行っていないマウス(NT)、手術後2週(2w)、および3週(3w)の時点のマウスより腹腔内洗浄液および脾臓の細胞を採取し、腹腔内の免疫の評価として腹腔内洗浄液、全身の免疫の評価として脾臓内のそれぞれの免疫細胞の割合の経時変化についてフローサイトメトリーを用いて調査した(図6)。

① 腹腔内洗浄液中の免疫細胞の評価

腹腔内洗浄液中の免疫細胞の細胞集団の同定は以下の図7の gating に従って行い、それぞれの免疫細胞の割合(%)について迷走神経切離(VxPP)群と温存(PP)群との間で Mann-Whitney 検定にて比較を行った。いずれの時点においても有意な差は認めなかった($p > 0.3$, $n=3$)(図8)。

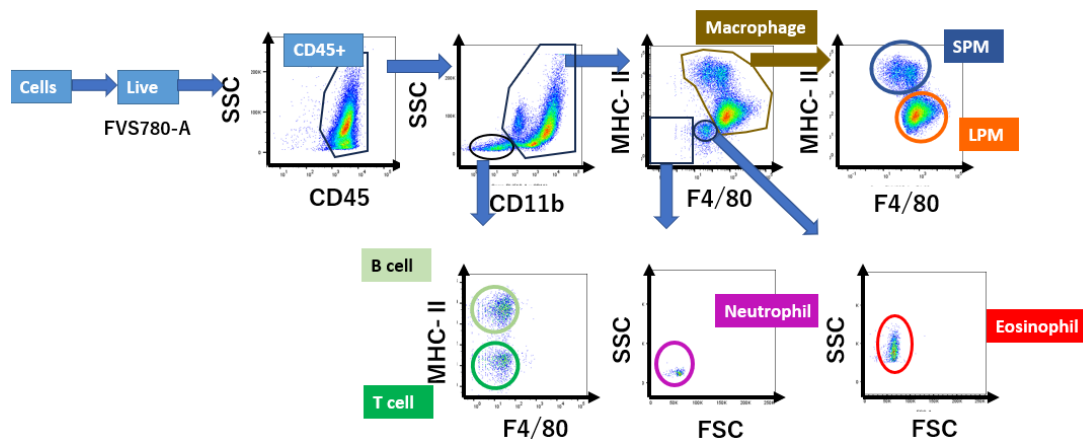


図7. 手術後のマウスの腹腔内洗浄液中の免疫細胞の

フローサイトメトリー展開図

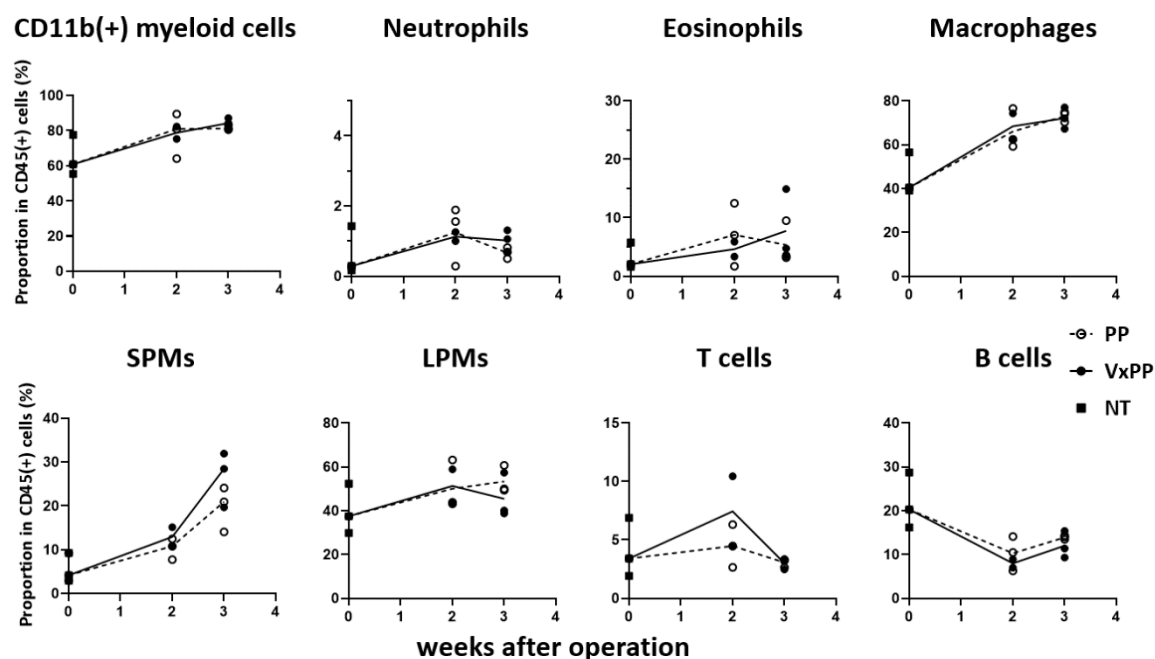


図8. 手術後の腹腔内洗浄液中の免疫細胞の割合の経時的変化

② 脾臓内の免疫細胞の評価

脾臓内の免疫細胞の細胞集団の同定は以下の図9の gating に従って行い、それぞれの免疫細胞の割合(%)について検討を行った。すべての免疫細胞の割合について、Mann-Whitney 検定にて2術式間の比較を行ったが、いずれの時点においても有意な差を認めなかった。NT、2w、3w の3つの時点について Kruskal-Wallis 検定により比較を行うと Treg の割合に有意差を認めた(NT vs 2w vs 3w, $p < 0.0001$, $n=3$)。このため、Treg について2つの時点の間で Mann-Whitney 検定にて比較を行うと NT と比較して、2w で有意に減少し、(NT: $M=6.80(5.32-6.83)\%$ vs 2w: $M=2.78(2.62-3.54)\%$, $p=0.0357$)、3w 時点では回復しており、NT との間に

有意差を認めなかった。(2w vs 3w: $M=4.59(4.25-6.53)\%$, $p=0.0079$, NT vs 3w, $p=0.1429$)(図 10)。

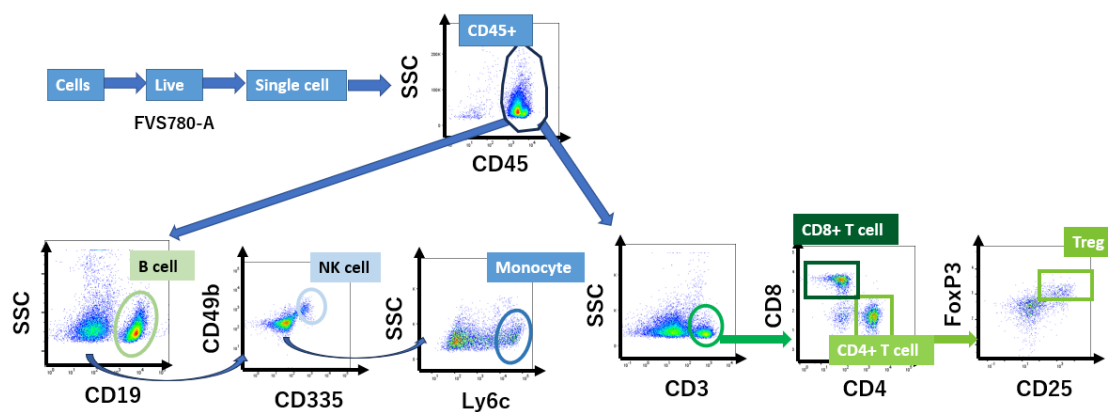


図9. 手術後のマウスの脾臓内の免疫細胞のフローサイトメトリー展開図

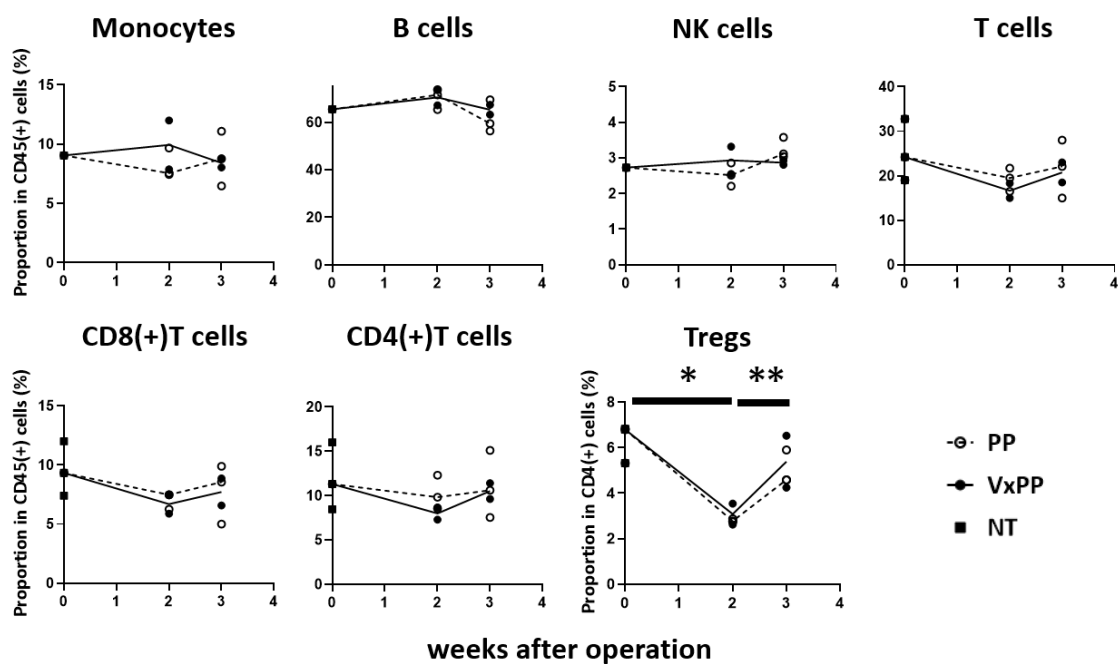


図10. 手術後の脾臓内の免疫細胞の割合の経時的変化

3-2. マウスにおける腹膜播種の経時的変化

3-2-1. 腹膜播種結節の経時的変化

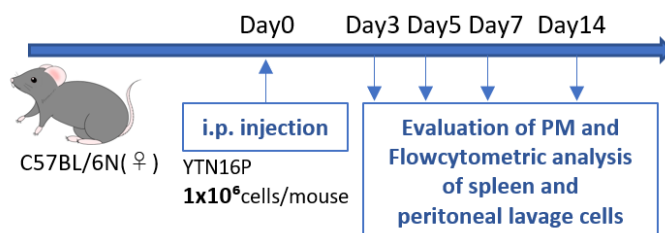


図11. 腹膜播種結節の経時的変化を調査

マウスの胃癌細胞株である YTN16P を 1×10^6 cells/mouse にて腹腔内に投与し、腸間膜の播種数および大網の播種の程度の肉眼的所見の経時的変化 (Day3, Day5, Day7, Day14: n=3) を調査した (図 11)。腸間膜上の腹膜播種は Day5 時点より出現し、その後播種数が経時的に増加した (Day3:0、Day5:0(0-2)、Day7:3(2-15)、Day14: 20(10-25)、図 12)。大網上の腹膜播種は Day5 までは肉眼的には評価できず、Day7 でわずかに結節を認め、Day14 では Grade3 の Omental cake 状であった。(Day3:Grade0, PM0、Day5:Grade0,PM0、Day7:Grade0, PM 2(1-3)、Day14:Grade3(1-3)、図 12)。

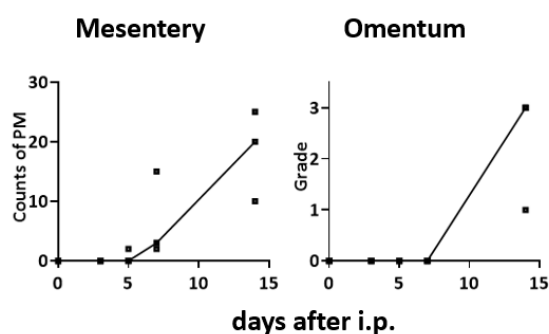


図12. 腹膜播種結節および播種の程度の経時的変化

3-2-2. 腹膜播種の形成過程における免疫細胞の経時的変化

① 腹腔内洗浄液中の免疫細胞の経時的変化

腹腔内洗浄液中の免疫細胞の細胞集団の同定は手術後の評価と同様に以下の図 13 の gating に従って行った。腹膜播種形成過程において腹腔内洗浄液中の免疫細胞はその細胞数が急速に増加し、Day7 には 2.5 倍程度まで増加することから免疫細胞の割合ではなく細胞数にて評価することとし、それぞれの免疫細胞の細胞数(/lavage)の経時的変化(Day0, Day3, Day5, Day7, Day14: n=3)を調査した(図 14)。好酸球、B 細胞は Day3 から Day5 にかけて増加し、その後減少に転じた。好中球、T 細胞、SPM は腫瘍が進行するにつれ緩徐に増加する一方、LPM は Day7 まで軽度増加するがその後減少した。

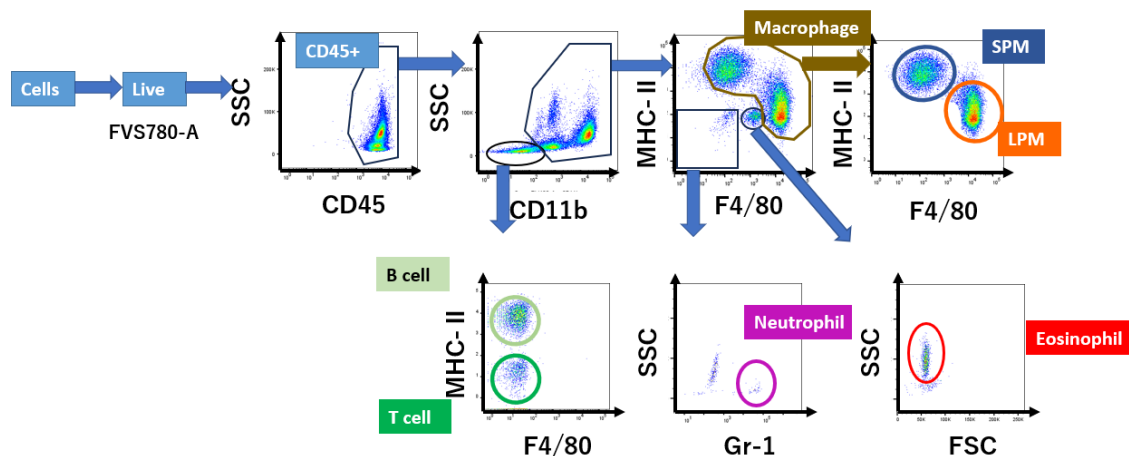


図13. 腹膜播種の形成過程における腹腔内洗浄液中の免疫細胞の

フローサイトメトリー展開図

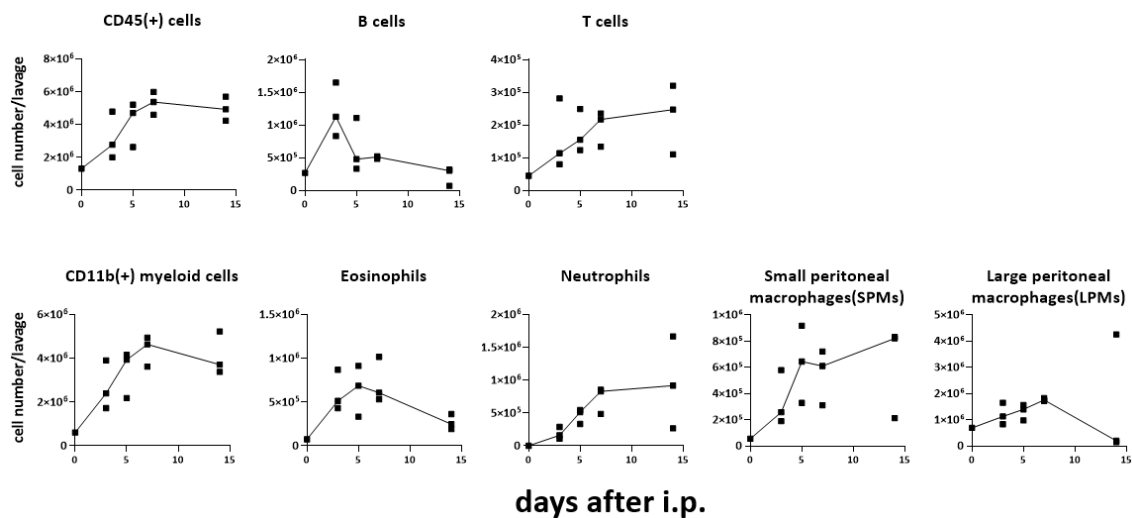


図14. 腹膜播種の形成過程における腹腔内洗浄液中の
免疫細胞の細胞数の経時的変化

② 脾臓内の免疫細胞の経時的変化

脾臓内の免疫細胞の細胞集団の同定は手術後のリンパ球系細胞の評価に加え、骨髄系細胞についても以下の図 15 の gating に従って行い、それぞれの免疫細胞の割合(%)の経時的変化(Day0, Day3, Day7, Day14: n=3)を調査した(図 16)。制御性 T 細胞である Treg が Day3-7 の早期に低下し、その後増加した以外に大きな変化は認めなかった。

3-3. 迷走神経切離術が腹膜播種に与える影響の評価

3-3-1. 手術後の腹膜播種形成の程度について 2 術式間での比較

① 1×10^6 cells/mouse の YTN16P を腹腔内に投与した場合

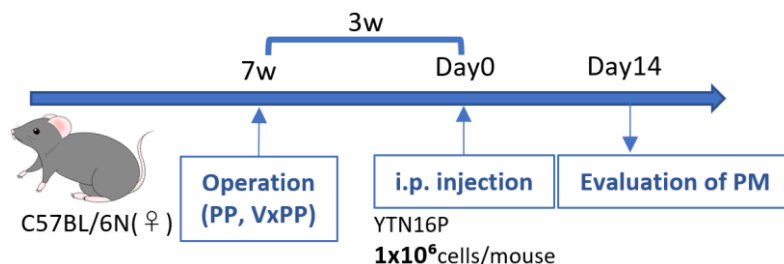


図17. 迷走神経切離術が腹膜播種に与える影響を調査

(1×10^6 cells/mouse 投与の場合)

手術後 3 週間経過した時点で VxPP 群、PP 群いずれにおいても腹腔内の免疫細胞の割合が術前と同程度まで回復することから、この時点で YTN16P を腹腔内に投与することとした。また、大網および腸間膜いずれにおいても肉眼的に腹膜播種が確認できる 1×10^6 cells/mouse の YTN16P を投与し、2 週間後の時点で腹膜播種結節数および程度を評価した(図 17)。Mann-Whitney 検定により 2 群間の比較を行った(PP: n=5, VxPP: n=4, 図 18,19)。腸間膜上の腹膜播種結節数は VxPP 群において多い傾向を認め(PP: M=43(28-78) vs VxPP: M=68.5(57-87), $p=0.1111$)、大網の播種の程度も VxPP 群において高い傾向を認めた(PP: M=2(2-3) vs VxPP: M=3(2-3), $p=0.2063$)。

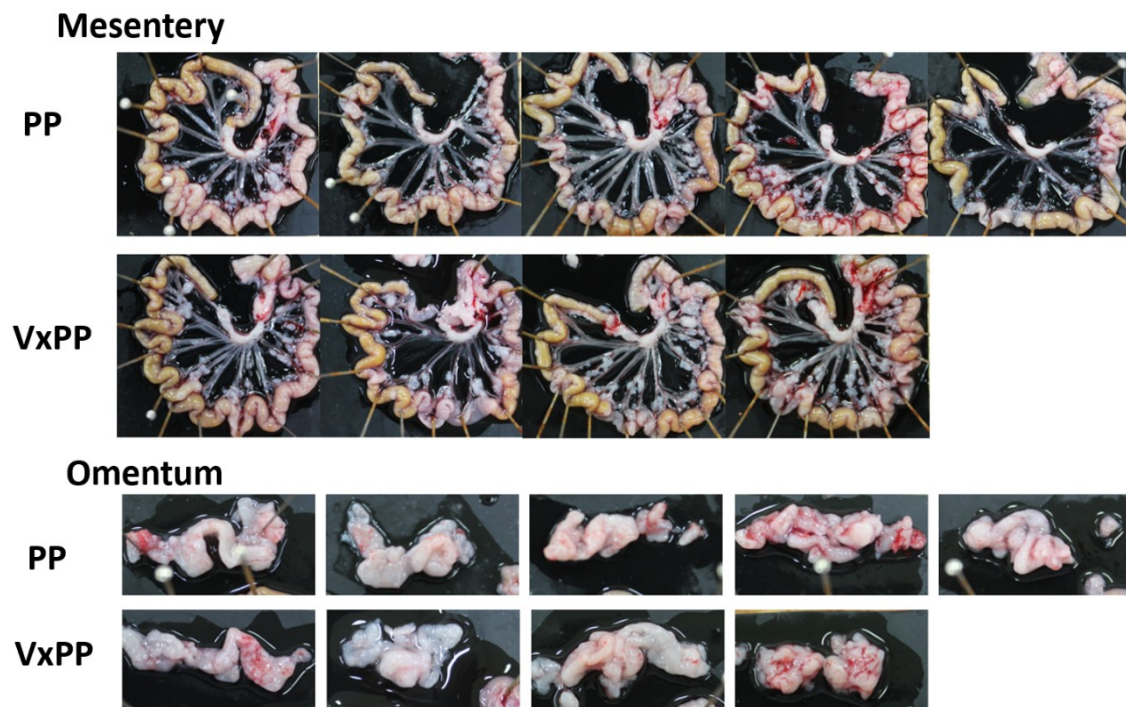


図18. 上段：腸間膜上の腹膜播種、下段：大網の腹膜播種

(1×10^6 cells/mouse 投与の場合)

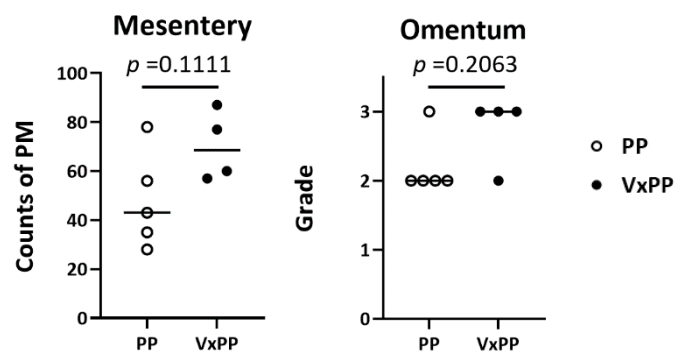


図19. VxPP 群と PP 群の腹膜播種結節数および程度の比較

(1×10^6 cells/mouse 投与の場合)

② 3×10^5 cells/mouse の YTN16P を腹腔内に投与した場合

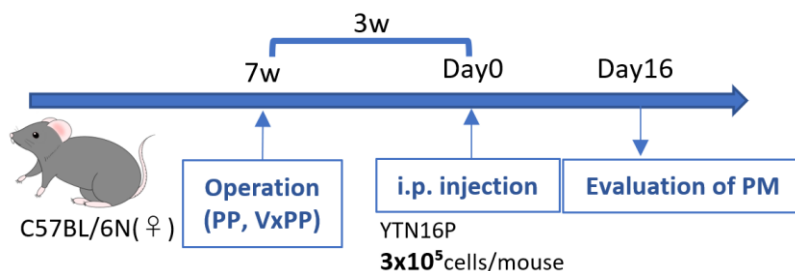


図20. 迷走神経切離術が腹膜播種に与える影響を調査

(3×10^5 cells/mouse 投与の場合)

1×10^6 cells/mouse の YTN16P を投与した場合、腸間膜では VxPP 群において播種が増加する傾向を認めたのに対し、大網では 2 術式間で有意な差を認めなかった。この原因として大網は Day14 の時点で両群ともに Grade2,3 の高度な播種を形成しており、差の検出が困難な状態となった可能性が考えられた。そこで、より少ない細胞数である 3×10^5 cells/mouse の YTN16P を腹腔内に投与することにより、大網にすべてのマウスが高度な播種を形成してしまう前の段階で評価することとした。手術後 3 週間経過した時点で 3×10^5 cells/mouse の YTN16P を腹腔内に投与し、16 日後に腹膜播種結節数および程度を評価し (図 20)、Mann-Whitney 検定により 2 群間の比較を行った($n=5$, 図 21,22)。VxPP 群において腸間膜上の腹膜播種結節数が有意に増加し (PP: $M=35(3-69)$ vs VxPP: $M=90(82-115)$, $p=0.0079$)、大網の腹膜播種の程度は VxPP 群において高い傾向を認めた(PP: $M=2(0-2)$ vs VxPP: $M=2(2-3)$, $p=0.1587$)。

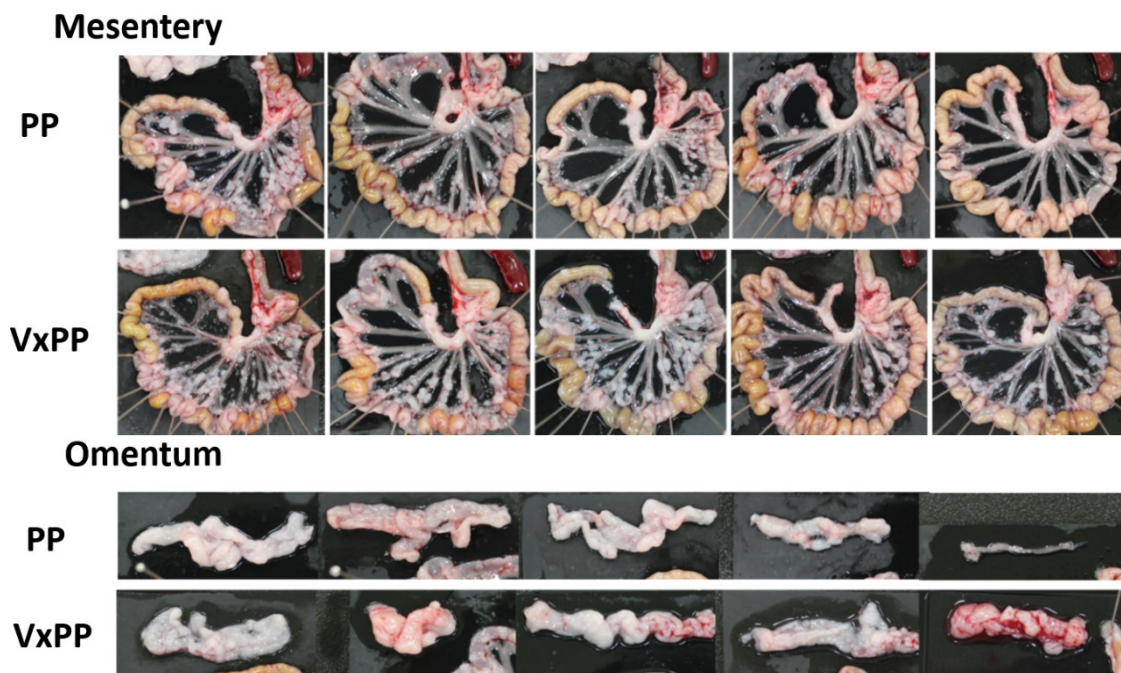


図21. 上段：腸間膜上の腹膜播種、下段：大網の腹膜播種

(3×10^5 cells/mouse 投与の場合)

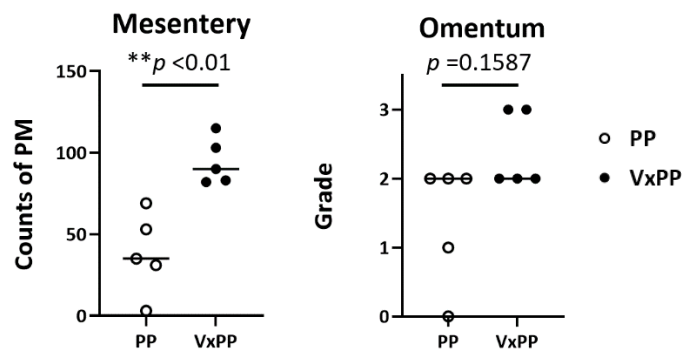


図22. VxPP 群と PP 群の腹膜播種結節数および程度の比較

(3×10^5 cells/mouse 投与の場合)

3-3-2. 手術後のマウスの腹膜播種の形成過程の免疫に与える影響について 2 術式間での比較

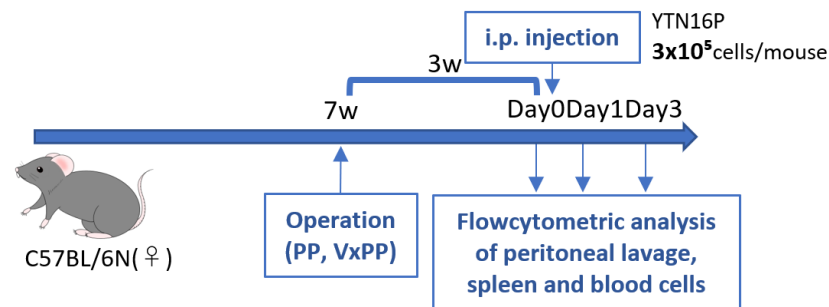


図23. 迷走神経切離が腹膜播種の形成過程における免疫に与える影響を調査
(3×10^5 cells/mouse 投与)

転移は成立初期の過程で宿主免疫が重要な役割を果たしており、腹膜播種形成過程の早期において迷走神経切離が免疫に与える影響が大きくなるとの仮説をたて、VxPP、PP の手術後 3 週間経過した時点(Day0)、 3×10^5 cells/mouse の YTN16P を腹腔内に投与し、微小転移が存在すると考えられる Day1, Day3 の時点の腹腔内洗浄液中、脾臓内および血液中の免疫細胞の経時的変化についてフローサイトメトリーを用いて、調査をした(図 23)。

① 腹腔内洗浄液中の免疫細胞の評価

腹腔内洗浄液中の免疫細胞の細胞集団の同定は以下の図 24 の gating に従って行い、それぞれの免疫細胞数(lavage)の経時的変化を評価した。腹腔内洗浄液中の免疫細胞数について Mann-Whitney 検定にて 2 群間比較を行った(Day1

PP: n=10 VxPP: n=12, 図 25、Day3 n=5)。Day1 の時点では CD45 陽性細胞の数は VxPP 群において多い傾向を認めた(PP: $M=3.39(1.23-3.99) \times 10^6$ vs VxPP: $M=4.04(2.07-6.19) \times 10^6$, $p=0.0692$)。リンパ球系の細胞についてはいずれも 2 群間において有意差は認めなかった(CD3 陽性 T 細胞 $p=0.1802$ 、CD4 陽性 T 細胞 $p=0.1802$ 、CD8 陽性 T 細胞 $p=0.2543$ 、B 細胞 $p=0.2829$)。CD11b 陽性の骨髓系細胞のなかで、好酸球は VxPP 群において増加する傾向を認め(PP: $M=3.81(1.51-10.2) \times 10^5$ vs VxPP: $M=8.03(2.63-11.9) \times 10^5$, $p=0.0503$)、マクロファージは VxPP 群において有意に増加した(PP: $M=1.19(0.73-2.32) \times 10^6$ vs VxPP: $M=2.12(1.04-3.36) \times 10^6$, $p=0.0300$)。また、マクロファージを LPM、SPM に分けて調査すると、ともに VxPP 群において増加する傾向を認めた[LPM (PP: $M=6.46(1.89-14.5) \times 10^5$ vs VxPP: $M=10.3(5.39-19.2) \times 10^5$, $p=0.0591$), SPM (PP: $M=6.53(2.80-10.4) \times 10^5$ vs VxPP: $M=9.28(3.73-14.5) \times 10^5$, $p=0.0591$)]。Day3 の時点では好酸球が VxPP 群において減少する傾向を認めた(PP: $M=10.4(4.63-21.1) \times 10^5$ vs VxPP: $M=4.51(3.19-9.93) \times 10^5$, $p=0.0952$)ほかは、いずれの免疫細胞も 2 群間において有意差を認めなかった(データ非提示)。

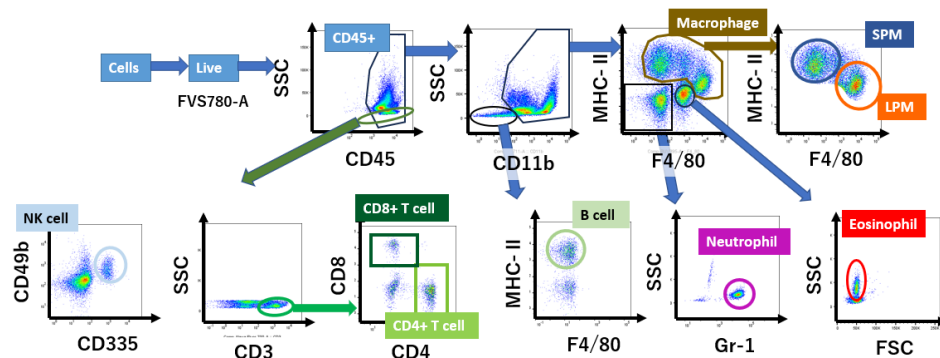


図24. 手術後腫瘍細胞投与後のマウスの腹腔内洗浄液中の免疫細胞の

フローサイトメトリー展開図

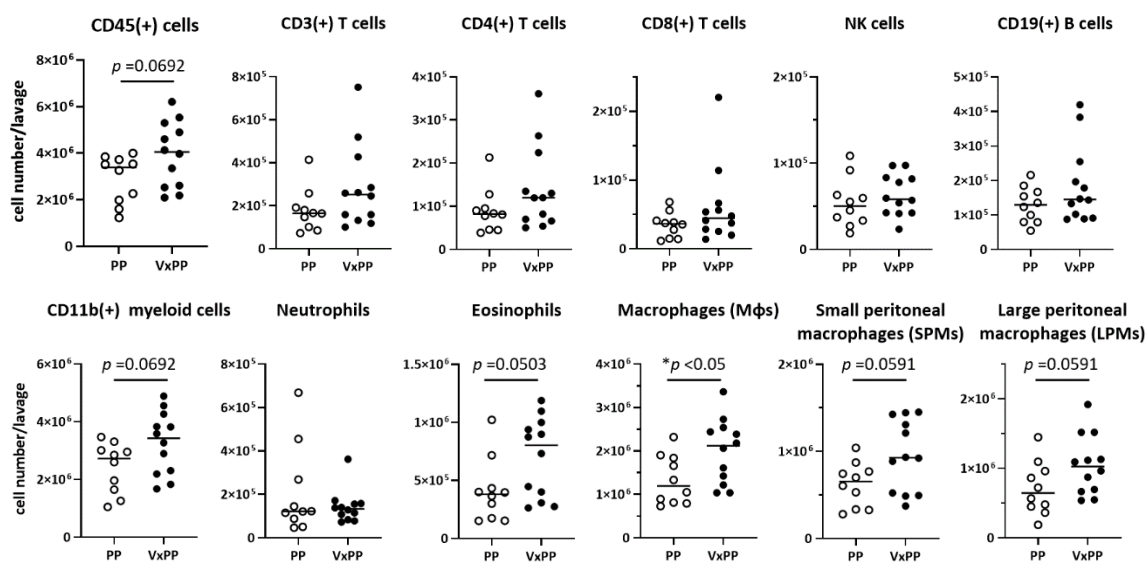


図25. VxPP 群と PP 群の腹腔内洗浄液中の

○ PP
● VxPP

免疫細胞の細胞数の比較 (Day1)

② 脾臓内の免疫細胞の評価

脾臓内の免疫細胞の細胞集団の同定は以下の図 26 の gating に従って行い、それぞれの免疫細胞の割合(%)について Mann-Whitney 検定を用いて 2 群間比較を行った(Day1 PP: n=5, VxPP: n=7, 図 27、Day3 n=5)。Day1 にリンパ球系細胞のなかで CD4 陽性 T 細胞は VxPP 群において有意に減少しており(PP: M=17.0(13.8-18.3) % vs VxPP: M=13.9(10.3-15.3) %, $p=0.0303$)、CD3 陽性 T 細胞全体でも VxPP 群において少ない傾向を認めた(PP: M=34.1(27.0-35.7) % vs VxPP: M=29.3(23.5-32.6) %, $p=0.0732$)。また、F4/80 陽性マクロファージでは VxPP 群において有意に増加していた(PP: M=0.90(0.80-1.13) % vs VxPP: M=1.01(0.98-1.33) %, $p=0.0278$)。一方、Day3 の時点では、いずれの免疫細胞の割合も 2 群間において有意差を認めなかった(データ非提示)。

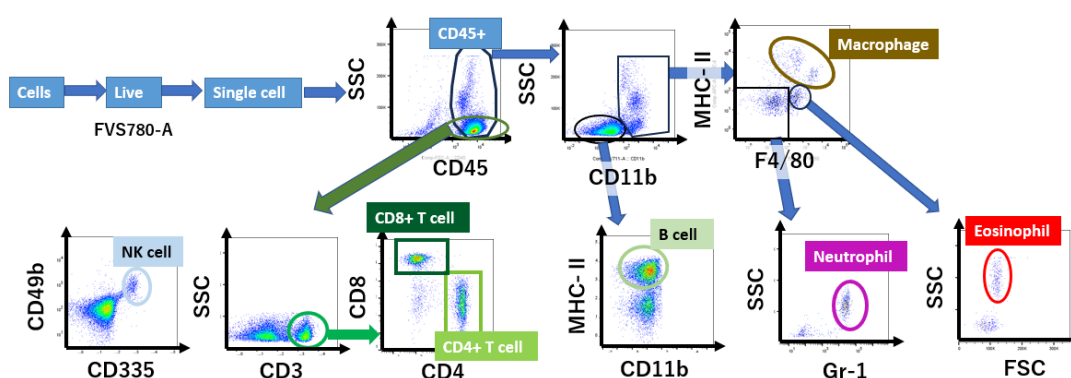


図26. 手術後腫瘍細胞投与後のマウスの脾臓内の免疫細胞の

フローサイトメトリ展開図

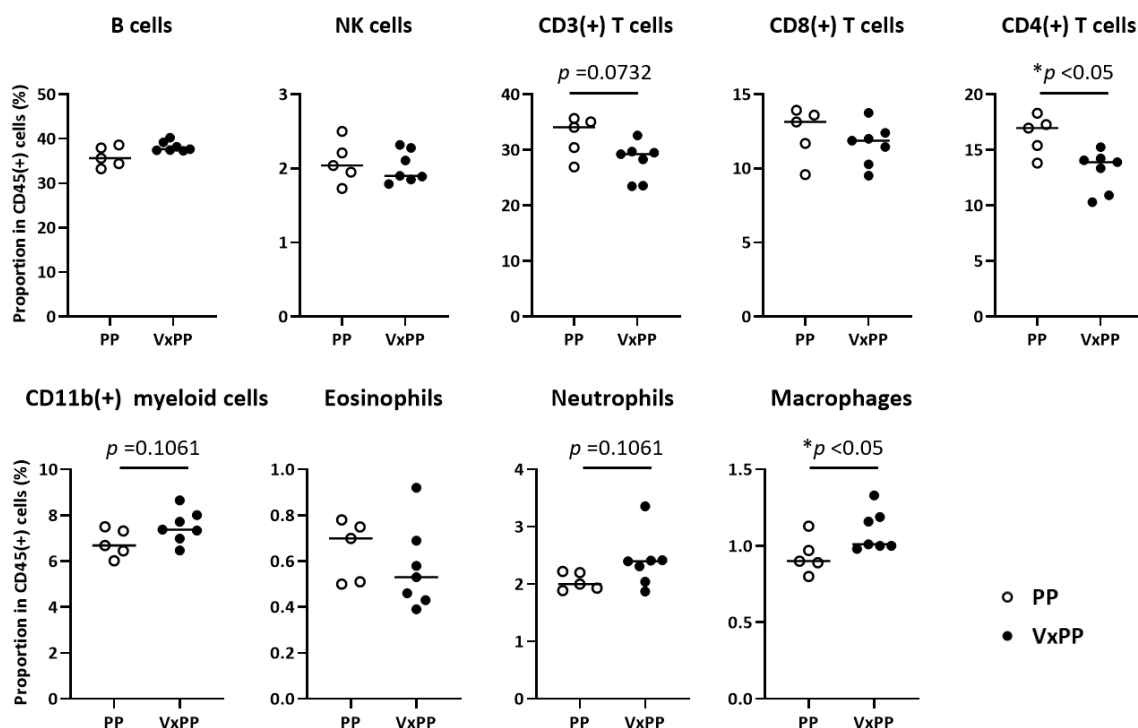


図27. VxPP 群と PP 群の脾臓内の免疫細胞の

CD45 陽性細胞における割合の比較 (Day1)

③ 血液中の免疫細胞の評価

血液中の免疫細胞の細胞集団の同定は以下の図 28 の gating に従って行い、それぞれの免疫細胞の細胞数(/ μ L)について Mann-Whitney 検定にて 2 群間比較を行った(Day1 n=5, 図 29、Day3 n=5)。Day1 の時点で CD45 陽性の免疫細胞数が VxPP 群において有意に増加していた (PP: M=2154(1725-2641) vs VxPP: M=3219(2983-3643), $p=0.0079$)。リンパ球系細胞では CD3 陽性 T 細胞および NK 細胞が VxPP 群において有意に増加し[CD3 陽性 T 細胞 (PP: M=753(645-1111) vs VxPP: M=1193(909-1375), $p=0.0317$)、NK 細胞 (PP: M=84(45-180) vs VxPP:

M=233(139-319), $p=0.0317$)]、CD4 陽性 T 細胞も VxPP 群において増加する傾向を認めた(PP: M=414(379-627) vs VxPP: M=670(462-811), $p=0.0556$)。また、骨髓系細胞では CD11b 陽性細胞全体、好中球、好酸球が VxPP 群において有意に増加し [CD11b 陽性骨髓系細胞(PP: M=507(466-678) vs VxPP: M=809(668-973), $p=0.0159$)、好中球(PP: M=124(108-172) vs VxPP: M=275(234-491), $p=0.0079$)、好酸球(PP: M=4(2-5) vs VxPP: M=7(6-13), $p=0.0079$)]、M-MDSC も VxPP 群において増加する傾向を認めた(PP; M=196(152-255) vs VxPP: M=251(201-284), $p=0.0873$)。一方、Day3 の時点では CD45 陽性細胞およびリンパ球系細胞、いずれの細胞数も 2 群間において有意差を認めなかった(データ非提示)。

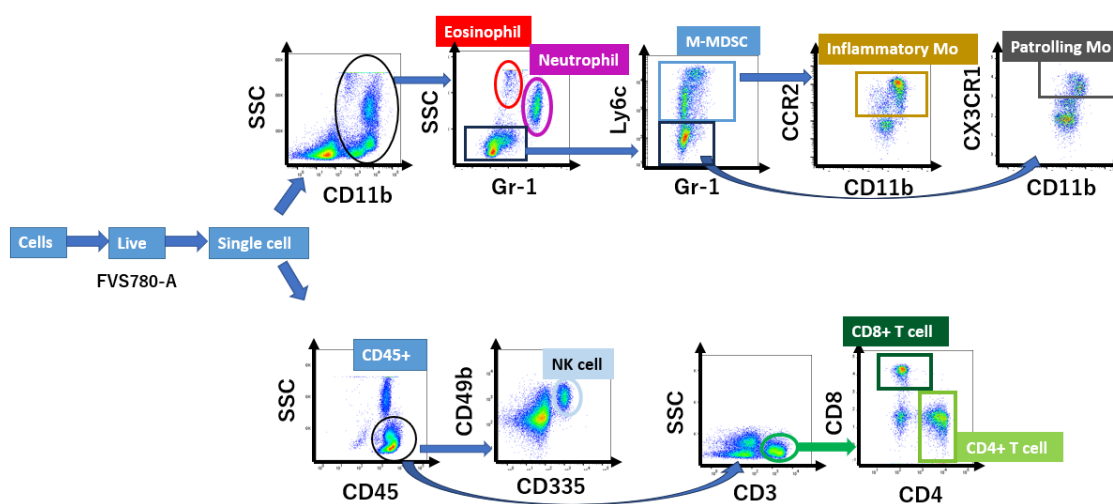


図28. 手術後腫瘍細胞投与後のマウスの血液中の免疫細胞の

フローサイトメトリー展開図

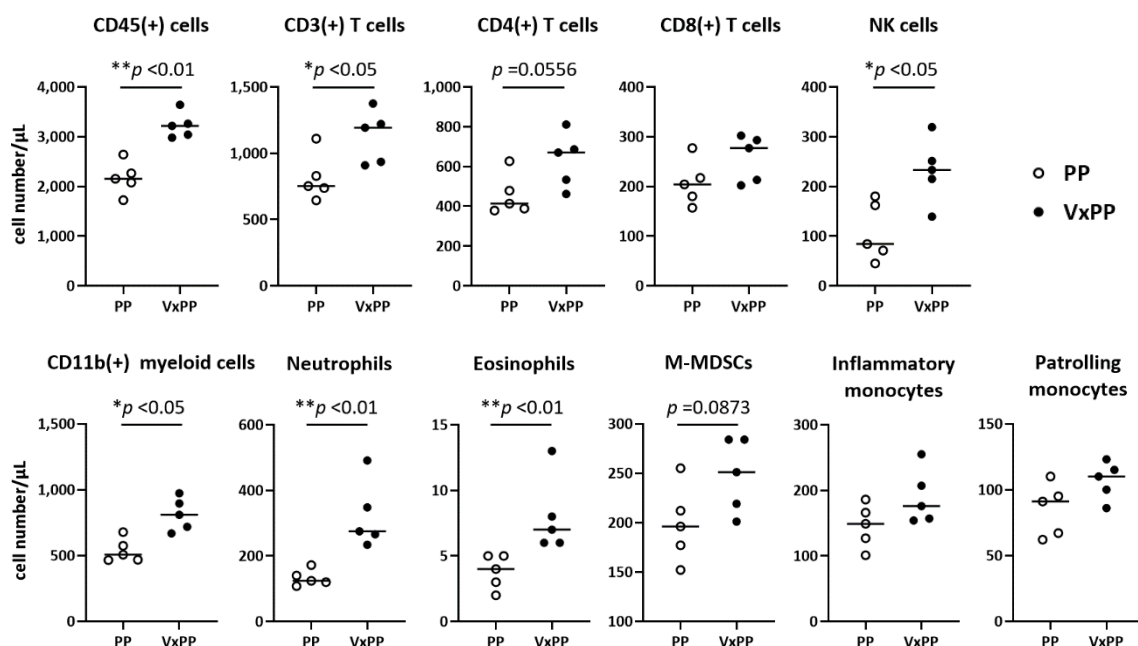


図29. VxPP 群と PP 群の血液中の免疫細胞の細胞数の比較 (Day1)

3-3-3. 手術後のマウスの腹膜播種の形成過程の大網組織の腫瘍細胞および免疫細胞に与える影響について 2 術式間での比較

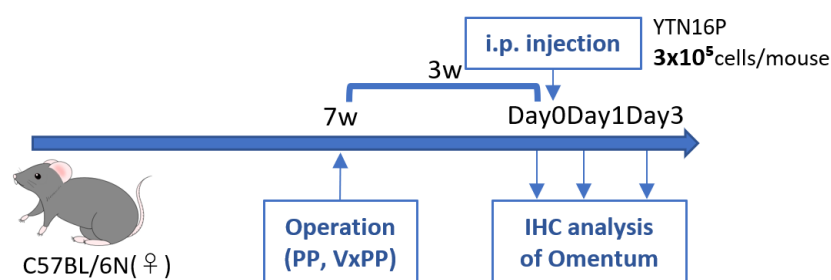


図30. 迷走神経切離が大網の Milky spot への腫瘍細胞の生着および大網の

免疫細胞に与える影響を調査 (3×10^5 cells/mouse 投与の場合)

同様に VxPP、PP の手術後 3 週間経過した時点 (Day 0) で 3×10^5 cells/mouse の YTN16P を腹腔内に投与し、Day 1, Day 3 の大網組織を採取し、大網組織切片の HE

染色および免疫組織化学染色(IHC)を用いて調査した (図 30)。Milky spot の数 (/mm²)および面積(μm²)、腫瘍細胞および免疫細胞の細胞密度(/mm²)について Mann-Whitney 検定にて 2 群間比較を行った(Day1 PP: n=6, VxPP: n=7, 図 31-34、Day3 n=5, 図 31-33,35)。

Milky spot の数は 2 群間で有意な差を認めなかったが (PP: M=2.60(2.28-3.89) /mm² vs VxPP: M=3.16(1.81-4.91) /mm², $p=0.5338$, 図 31,32)、Milky spot の面積は VxPP 群において Day1 の時点からに有意に拡大し、変形を認めた (PP: M=5.38(4.64-6.69) ×10³μm² vs VxPP: M=14.5(6.84-20.9) ×10³μm², $p=0.0012$, 図 31, 32)。

Milky spot 内の腫瘍細胞の細胞密度は Day1 の時点から VxPP 群において有意な増加を認めた (PP: M=321(159-787) /mm² vs VxPP: M=719(394-858) /mm², $p=0.0140$, 図 33)。また、Milky spot 内の CD3 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞も VxPP 群において有意な増加を認めた [CD3 (PP: M=2.54(2.05-3.18) ×10³/mm² vs VxPP: M=3.63(2.96-4.73) ×10³/mm², $p=0.0047$)、CD8 (PP: M=6.91(5.54-12.2) ×10² /mm² vs VxPP: M=15.8(10.9-23.8) ×10²/mm², $p=0.0023$)]。その一方、B 細胞は 2 群間で有意な差を認めなかった (PP: M=13.0(9.09-17.7) ×10³/mm² vs VxPP: M=11.3(9.99-20.2) /mm², $p=0.7308$)。また、Milky spot 周囲の大網組織中に少数の F4/80 陽性マクロファージ、好中球が存在しており、大網組織中の密度を測定す

ると、F4/80 陽性マクロファージは VxPP 群において有意に増加していたが(PP: $M=48.2(27.8-60.8) /\text{mm}^2$ vs VxPP: $M=83.4(71.4-103) /\text{mm}^2$, $p=0.0012$)、好中球は 2 群間で有意な差を認めなかった(図 34)。

そして、Day3 の時点では Milky spot の面積は両群ともに拡大を認めるものの、VxPP 群において有意に拡大していた(PP: $M=9.48(4.01-10.5) \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs VxPP: $M=21.7(13.2-28.5) \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $p=0.0079$, 図 31)。Milky spot 内の腫瘍細胞の細胞密度は VxPP 群において高い傾向を認めた(PP: $M=363(106-838) /\text{mm}^2$ vs VxPP: $M=1733(193-2258) /\text{mm}^2$, $p=0.0556$, 図 33)。また、Milky spot 周囲の大網組織で確認された F4/80 陽性マクロファージの密度も VxPP 群において有意に高かった(PP: $M=22.4(16.6-31.0)$ vs VxPP: $M=59.1(33.4-94.3)$, $p=0.0079$, 図 35)。そして、Day1 では腫瘍細胞が Milky spot の表層に多く認められるのに対して、Day3 では播種の進行に伴い、一部の Milky spot は内部に存在する腫瘍細胞が著明に増加しており、大部分が腫瘍細胞に置換された状態の Milky spot も存在した(図 36)。

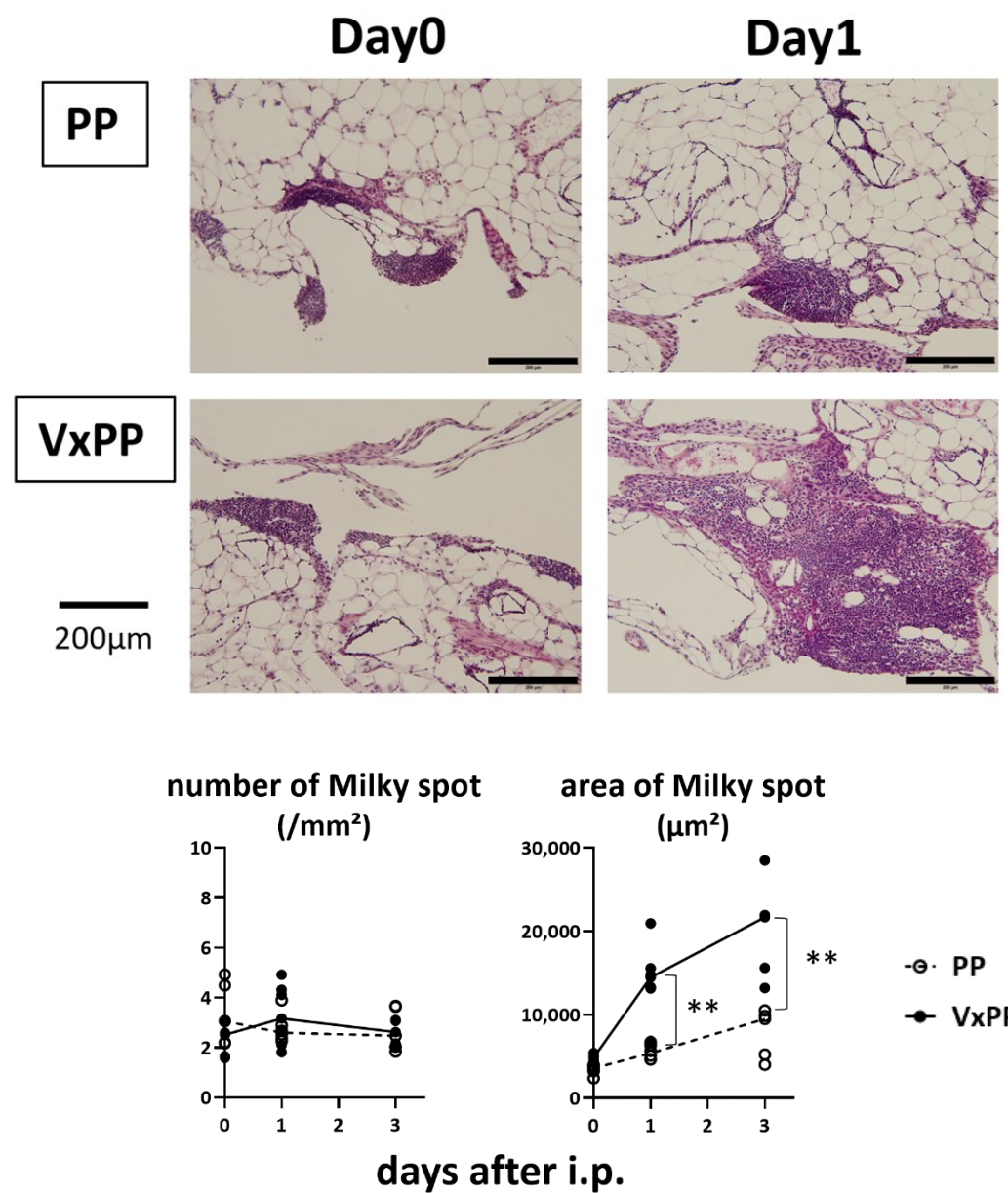


図31. 大網組織の Milky spot の HE 染色像と
Milky spot の数および面積の推移

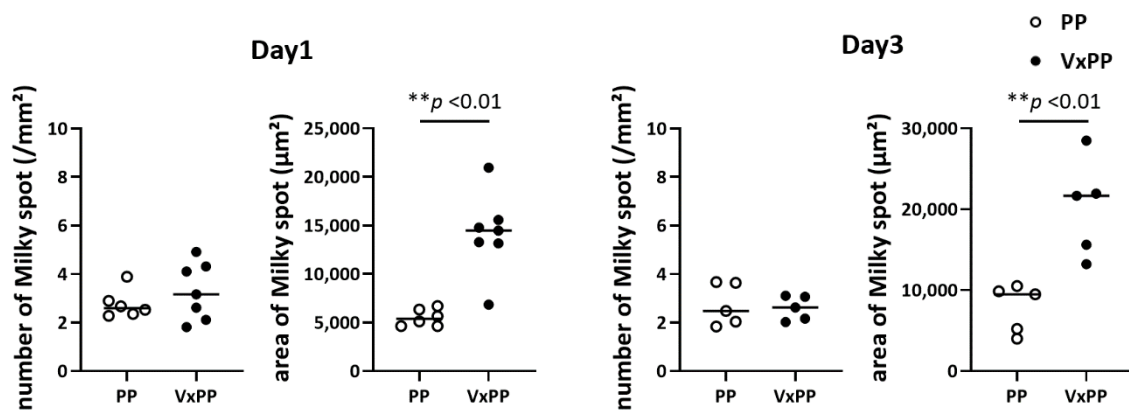


図32. VxPP 群と PP 群の大網組織中の Milky spot の数と面積の比較 (Day1,3)

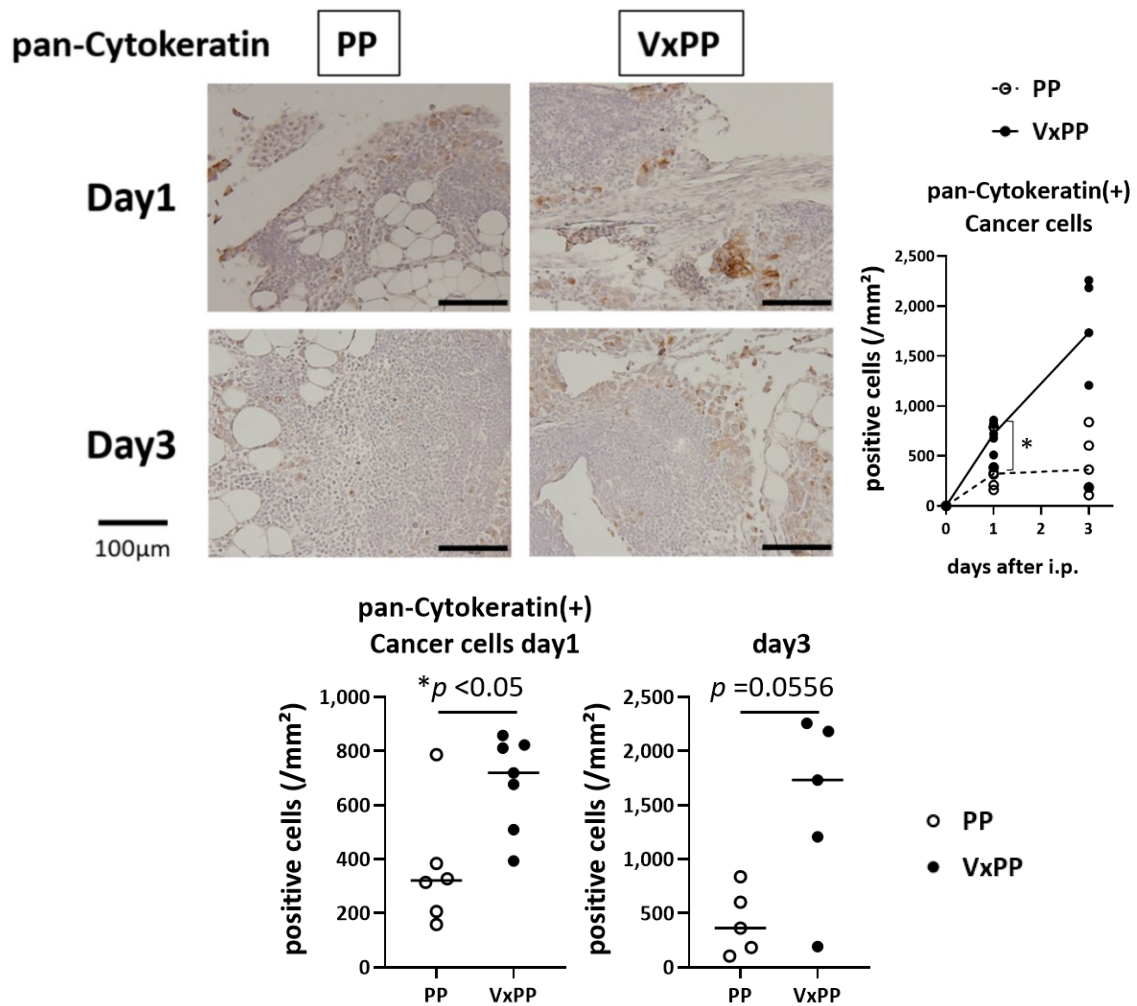


図33. VxPP 群と PP 群の大網組織中の腫瘍細胞(IHC)の比較 (Day1,3)

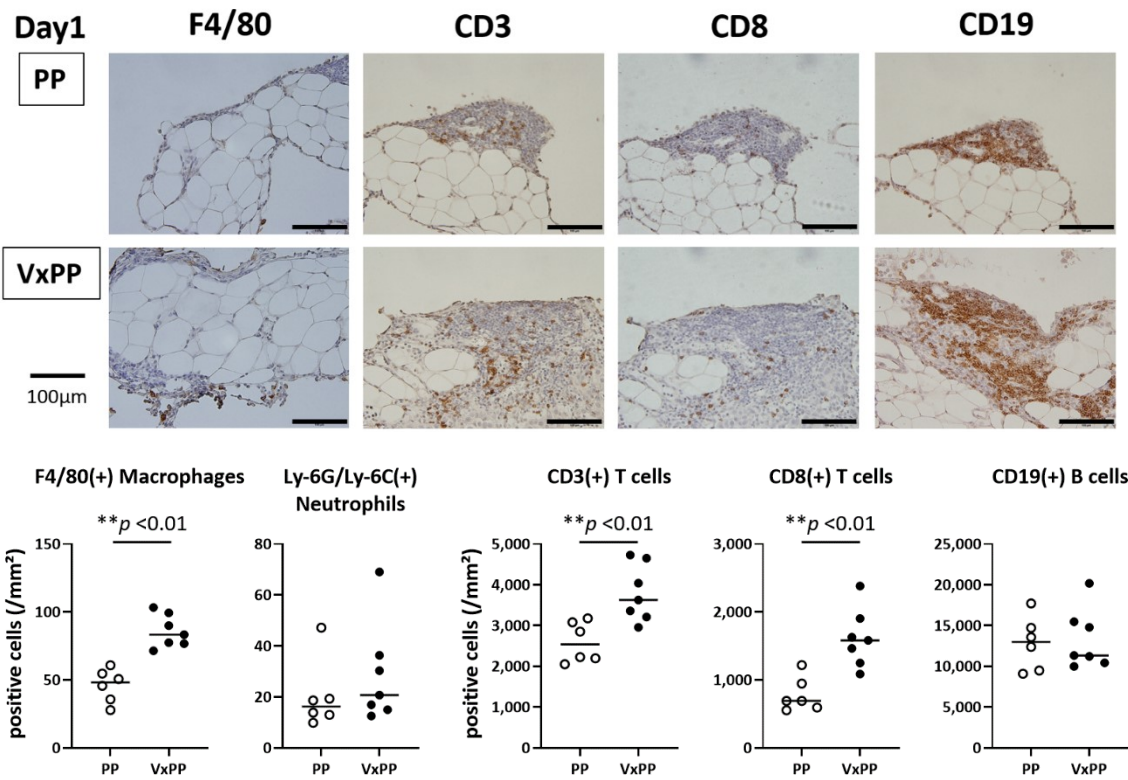


図34. VxPP 群と PP 群の大網組織中の免疫細胞の IHC 染色像と

免疫細胞の細胞密度の比較 (Day1)

○ PP
● VxPP

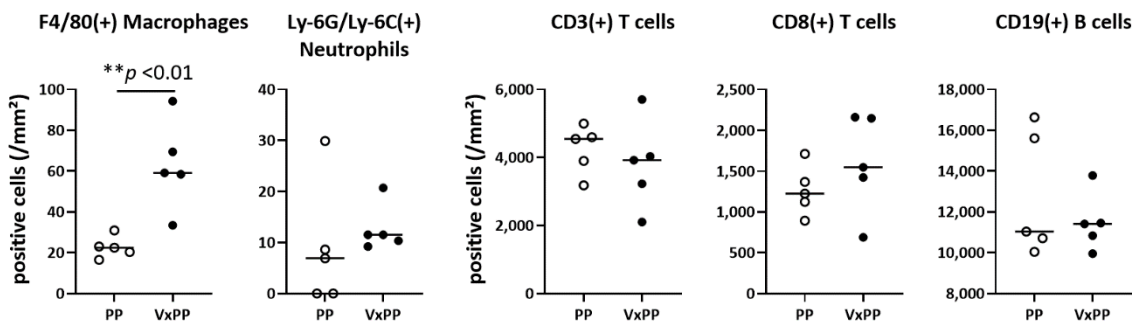


図35. VxPP 群と PP 群の大網組織中の免疫細胞の細胞密度の比較 (Day3)

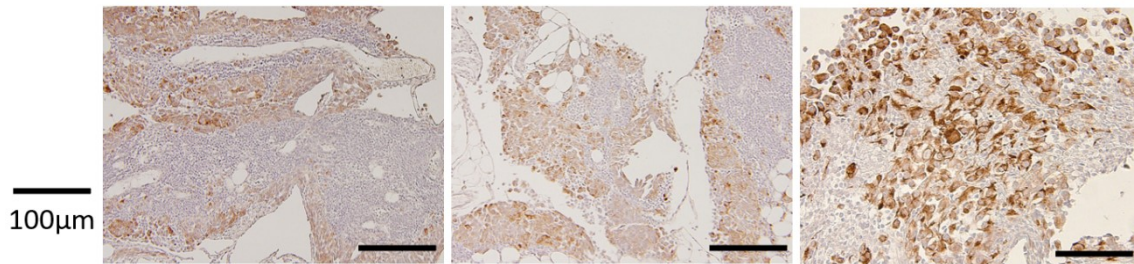


図36. Milky spot 内に増加する腫瘍細胞

3-4. 結果の要約

マウスに迷走神経切離術あるいは温存術を施行後、マウスの腹腔内に癌細胞を投与すると、迷走神経切離群(VxPP 群)では早期(Day1)の時点で大網の Milky spot 内の T 細胞および辺縁の組織でマクロファージが増加するとともに、Milky spot の拡大を認めた。また、迷走神経切離群で癌細胞の Milky spot への生着は亢進し、最終的には Day16 に多数の腹膜播種を形成していた(図 37)。

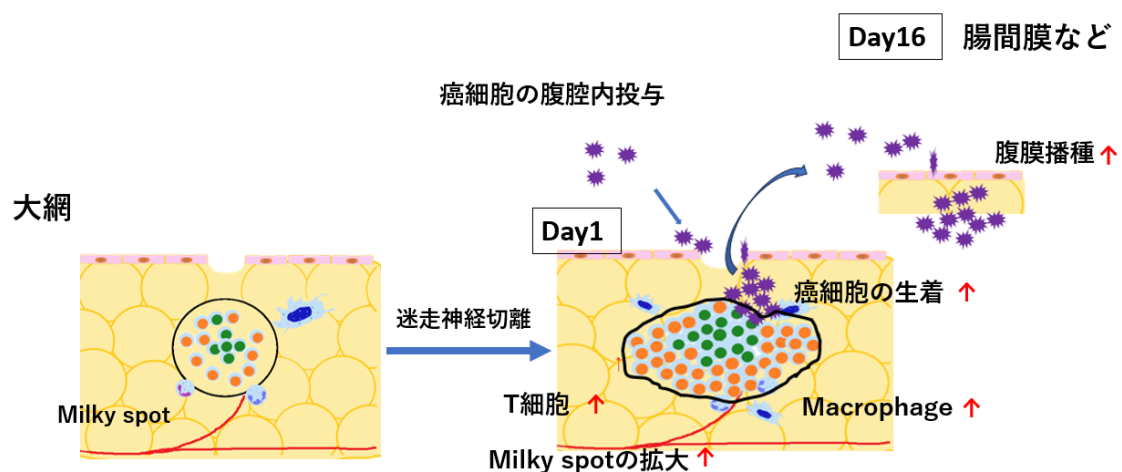


図37. 迷走神経切離により腹膜播種の形成過程に認められた変化

第4章 考察

今回の実験で、迷走神経切離術を行ったマウスに同系マウス胃癌細胞株(YTN16P)を腹腔内に投与すると、腹膜播種が有意に増加することが確認できた。先に述べたように過去の研究ではラットやハムスターの動物実験の結果でも迷走神経切離が胃の腺癌や大腸癌の発癌を促進することが報告されている[39-41]。また、近年の研究では、BALB/cマウスの頸部での片側の迷走神経切離を行うことにより乳がんの肺転移が増加することや迷走神経肝枝の部分切離による結腸癌の肝転移が増加すること[50,51]、横隔膜下での迷走神経切離後、腓癌細胞を同所移植すると、腫瘍内においてTNF α を産生する腫瘍関連マクロファージ(TAM)が増加することで、腓癌の進行を促進させることが報告された[52]。これらの結果は、今回の研究の迷走神経切離(VxPP)群において腹膜播種が増加した結果と一致しており、迷走神経シグナルが腹膜播種形成に対して抑制的に働いている可能性があることが示唆された。

迷走神経は脳から胸腹部臓器への副交感神経シグナルを伝達するための唯一の経路であり、炎症性疾患を制御するコリン作動性抗炎症経路(CAIP)による抗炎症作用を有することが知られている。迷走神経シグナルが免疫応答とくに腹腔内の免疫応答に対して腹膜播種の形成過程の早期に重大な影響を与える可能性があると考えられた。そこで、迷走神経切離(VxPP)あるいは温存(PP)手術の後、

マウスの腹腔内に腫瘍細胞を投与し、微小転移が存在すると考えられる 1 日後 (Day1)および 3 日後(Day3)の腹腔内洗浄液中の免疫細胞、脾臓内の免疫細胞、血液中の免疫細胞と大網の免疫細胞について 2 群間で比較を行った。

大網組織では VxPP 群において Milky spot が増大するとともに pan-Cytokeratin 陽性を示す腫瘍細胞が増加していた。また、PP 群では腫瘍細胞投与前(Day0)と比較して Day1 の時点で Milky spot の面積の増大はわずかであるのに対して、VxPP 群においては顕著に増大した。このことは、VxPP 群では腫瘍細胞の腹腔内への流入が刺激となり、より強い免疫反応が惹起された可能性を示唆する。この所見を支持する形で VxPP 群において Milky spot 内の CD8 陽性 T 細胞とともに大網内のマクロファージおよび腹腔内洗浄液中のマクロファージが増加していた。また、血液中では T 細胞や NK 細胞、好中球、好酸球とともに M-MDSC が増加し、脾臓内でもマクロファージが増加していた。その一方、血中や大網への T 細胞の動員のためか Day1 で脾臓内の T 細胞の割合が減少していた(図 38)。

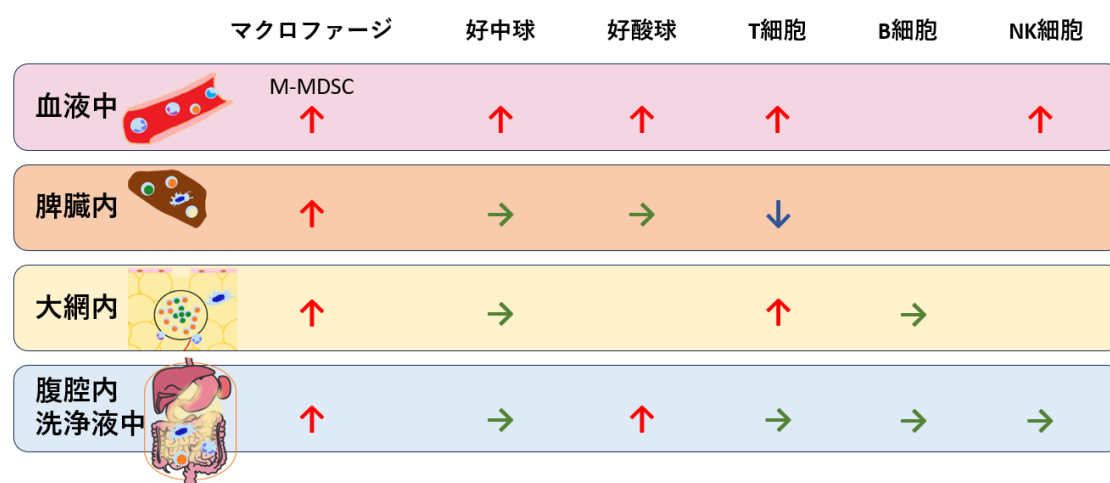


図38. 迷走神経切離後腫瘍投与早期の免疫細胞の変化

過去に、迷走神経は、コリン作動性抗炎症経路(CAIP)を介して神経伝達物質がマクロファージに作用することにより、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を抑制し、炎症反応を調節することが報告されている[52-55]。迷走神経切離により迷走神経シグナルが消失した状態では、大網および腹腔内の免疫細胞がTNF- α を含めた炎症性サイトカインの産生能の抑制の解除など機能的変化をきたしており、腹腔内への腫瘍細胞の流入が刺激となり、免疫反応が強く惹起され、マクロファージなどの免疫細胞の血液中から大網および腹腔内への動員につながった可能性がある。

また、Milky spot は腹膜播種の形成において腫瘍細胞の主な生着部位として知られている[21-24]。その機序としては、播種された腫瘍細胞が腹水の流れに従って受動的に輸送されている可能性が報告されている[21,56,57]。一方で、Milky

spot への腫瘍細胞の生着は脂肪細胞からの IL-8 などのサイトカイン産生[58]や CXCL12 などのケモカイン発現[59,60]や好中球細胞外トラップ(NETs)の放出に起因する可能性があるとして報告されている[61]。また、マクロファージから産生される TNF- α を含めた炎症性サイトカインは腫瘍細胞のインテグリン(integrin)などの接着分子の発現を亢進させることが報告されている[62]。今回の研究では、VxPP 群において Milky spot の増大、Milky spot および腹腔内での免疫細胞の増加といった免疫反応の亢進を認めており、炎症性サイトカインの分泌亢進を介し、腫瘍細胞の接着分子の発現が亢進し、腫瘍細胞の Milky spot への接着が促進された可能性が考えられた(図 39)。ただし、VxPP 群における Milky spot 内の癌細胞の細胞密度は、Day1 と比較して Day3 において上昇しているのに対し、マクロファージの細胞密度は Day1 と比較して Day3 において低下しており、マクロファージは癌細胞の腹腔内への流入刺激により一時的に大網に集積するが、その後腹腔内へと再度遊出するのではないかと考えられた。そして、マクロファージは主に癌細胞の Milky spot への生着や Milky spot から腹腔内への播種の進展に関与するものの、生着後の Milky spot 内での増殖には関与していない可能性が考えられた。

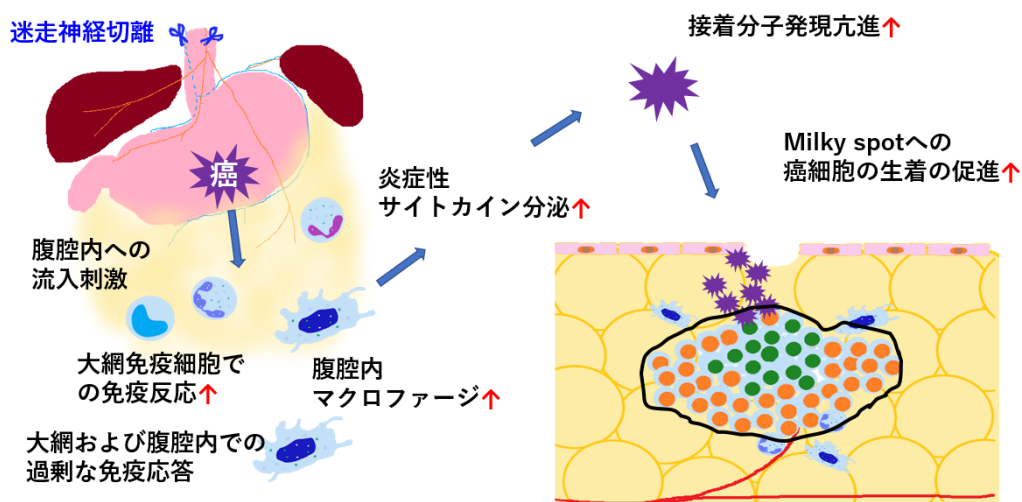


図39. 迷走神経切離後腫瘍細胞が大網 Milky spot へ生着のメカニズム

また、Milky spot に生着した腫瘍細胞は周囲の脂肪細胞からのエネルギー供給を受けて播種能を獲得し、腹腔内への進展を促進することが報告されている[56,57,63]。そして、組織常在マクロファージは Milky spot に生着した癌細胞とのクロストークにより、癌細胞の悪性度を亢進させ、Milky spot から腹腔内への腹膜播種の進展に重要な役割を果たすことが報告されている[64]。このことから、今回の研究でも VxPP 群において大網組織および腹腔内のマクロファージが増加したことが、大網から腹腔内への腫瘍細胞の播種の進展において促進的な役割を果たした可能性が考えられた(図 40)。

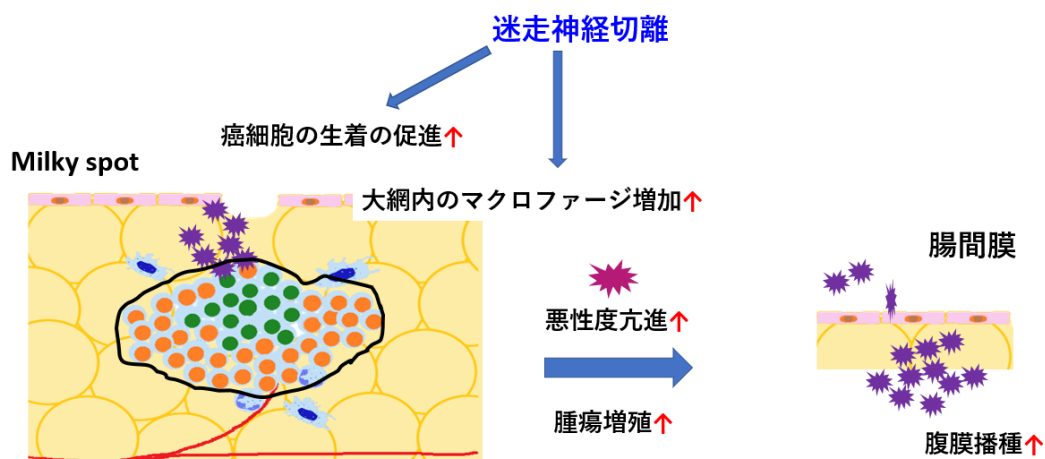


図40. 迷走神経切離後腹膜播種促進のメカニズム

迷走神経シグナルが大網の Milky spot における腫瘍に対する免疫応答を調節する正確な機序やその伝達経路は不明である。コリン作動性抗炎症経路(CAIP)は腹腔内神経節から脾臓へ流入するアドレナリン作動性交感神経の直接的および間接的刺激を含む様々な経路を通じて機能している[25-32]。迷走神経脾臓枝とされる交感神経線維はノルアドレナリン(NA)を放出し、 $\beta 2$ アドレナリン受容体($\beta 2AR$)を発現するアセチルコリン(ACh)産生 CD4 陽性 T 細胞に作用して、ACh を放出させる。この ACh は単球やマクロファージ、リンパ球、その他サイトカイン産生細胞上に発現する $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体($\alpha 7nAChR$)を介して $TNF-\alpha$ を含めた炎症性サイトカインの産生を減少させる[53,65,66]。この迷走神経による交感神経線維からのノルアドレナリンの放出を介した全身の炎症を抑制する作用と同様の機序(CAIP)が腸間膜リンパ節内でも

認められることが報告されている[31]。また、成人の大網組織切片に免疫組織化学染色(IHC)を行い、Milky spot 内にカテコラミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)やドーパミン β 水酸化酵素(DBH)陽性の交感神経線維の流入を確認している報告がある[67]。さらに、迷走神経切離術は腫瘍浸潤マクロファージ(TAM)に対する迷走神経の抗炎症作用を無効にし、炎症誘発性サイトカインの産生を促進することにより肺と脾臓の微小環境を変化させ、腫瘍の進展を促進することが報告されている[50,52]。これらのことを考慮すると、大網の Milky spot へ流入する交感神経線維にも迷走神経からのシグナルが伝達されており、このシグナルが CAIP により大網および腹腔内における炎症反応を収束させ、腹膜播種の成立に対しては抑制的に働いているのではないかと考えられた(図 41)。

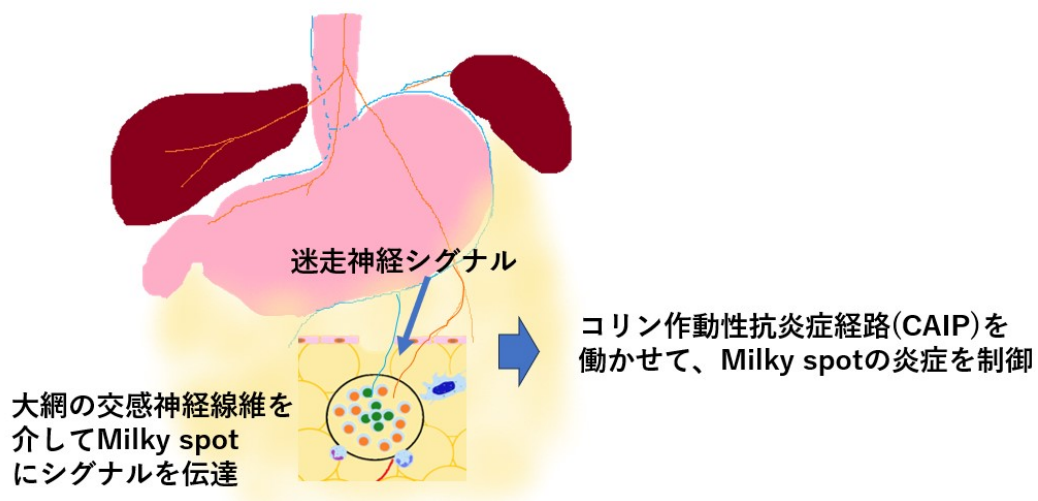


図41. 迷走神経シグナルが大網の免疫を制御するメカニズム

以上の事実から、進行胃癌の根治手術に伴う横隔膜下での迷走神経切離は、CAIP による抑制がなくなることによって大網の Milky spot 内の腫瘍微小環境を変化させ、術後の腹膜播種再発を促進する可能性があることが示唆された。

これまで、腹膜播種に対する迷走神経シグナルの影響についての詳細な検討はなされていなかったが、今回の研究を通して、迷走神経切離により胃癌の腹膜播種が増加する可能性があること、腫瘍成立早期において、大網 Milky spot 内の癌細胞が増加し、免疫応答が亢進することを明らかにすることができた。今後、迷走神経シグナルが播種の進行にどのように関与しているかを分子レベルで検討することによって新たな腹膜播種治療法の開発に繋がることが期待される。

第5章 結語

今回の研究は、腹膜播種に対する迷走神経切離の影響を調査し、迷走神経シグナルが大網の Milky spot の免疫状態にも影響を与えていることを明らかにした初めての研究である。迷走神経切離術を行う胃癌手術後の再発を想定した点で、臨床的に重要な意味を持つ研究と考えられた。

本研究で、横隔膜下での迷走神経切離により腹膜播種は増加していた。その原因として、迷走神経シグナルが遮断されると、大網の Milky spot での免疫反応の変化を介して、Milky spot への癌細胞の生着が促進され、腹膜播種の増加につながった可能性があり、横隔膜下での迷走神経切離は癌細胞の出現に伴う宿主の過剰な免疫応答を誘導し、結果として腹腔内を播種細胞の生育に好都合な環境に変化させていると考えられる。

進行胃癌に対する根治的手術治療において、腹膜播種再発のハイリスク症例に対しては迷走神経の温存により腹膜播種再発リスクを抑制することが、患者予後の改善につながる可能性があることが示唆された。今後、迷走神経シグナルが腹腔内免疫をどのように調節しているのか、その分子機構をより詳細に解析することで、腹膜播種の進展を抑制する新たな治療法の開発につながると考えられた。

第6章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導いただいた自治医科大学大学院消化器外科学教室 佐田尚宏教授、北山丈二教授、宮戸秀世先生、附属病院臨床腫瘍科大澤英之先生には研究の計画、実験方法、データの解釈、研究のまとめ方など多岐にわたり御指導いただき、深く感謝申し上げます。

そして、研究の計画・遂行にあたり、様々な御助言をいただき、日々の研究を支えてくださった自治医科大学消化器一般移植外科の皆様、臨床研究支援センターの早川裕子先生、篠原淳子さん、畠山浩美さん、贅田育子さんに心より御礼申し上げます。

第7章 参考文献

1. H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71(3):209-249,2021. PMID:33538338 doi:10.3322/caac.21660
2. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(全国がん登録)
3. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(厚生労働省人口動態統計)
4. J. Kitayama, H. Ishigami, H. Yamaguchi, Y. Sakuma, H. Horie, Y. Hosoya, A.K. Lefor and N. Sata. Treatment of patients with peritoneal metastases from gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2(2):116-123,2018. PMID: 29863151 doi:10.1002/ags3.12060
5. I. Manzanedo, F. Pereira, A. Serrano and E. Perez-Viejo. Review of management and treatment of peritoneal metastases from gastric cancer origin. *J Gastrointest Oncol.* 12(S1):S20-S29,2021. PMID:33968423 doi:10.21037/jgo-20-232
6. A. Prabhu, D. Mishra, A. Brandl and Y. Yonemura. Gastric Cancer With Peritoneal Metastasis- A Comprehensive Review of Current Intraperitoneal Treatment Modalities. *Front Oncol.* 12:864647,2022. PMID:35719946 doi:10.3389/fonc.2022.864647
7. K. Takebayashi, S. Murata, H. Yamamoto, M. Ishida, T. Yamaguchi, M. Kojima, T. Shimizu, H. Shiomi, H. Sonoda, S. Naka, E. Mekata, H. Okabe and T. Tani. Surgery-induced peritoneal cancer cells in patients who have undergone curative gastrectomy for gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 21(6):1991-1997,2014. PMID:24499832 doi:10.1245/s10434-014-3525-9
8. T. Kus, F. Kose, G. Aktas, U.Y. Arslan, A.M. Sedef, H.Y. Cinkir, M. Dirikoc, G. Akkus and N.Y. Ozdemir. Prediction of Peritoneal Recurrence in Patients with Gastric Cancer: a Multicenter Study. *J Gastrointest Cancer.* 52(2):634-642,2021. PMID:32578034 doi:10.1007/s12029-020-00419-7
9. B.Y. Zhu, S.Q. Yuan, R.C. Nie, S.M. Li, L.R. Yang, J.L. Duan, Y.B. Chen and X.S. Zhang. Prognostic Factors and Recurrence Patterns in T4 Gastric Cancer Patients after Curative Resection. *J Cancer.* 10(5):1181-1188,2019. PMID: 30854127 doi:10.7150/jca.28993
10. L. Xiang, S. Jin, P. Zheng, E.P. Maswikiti, Y. Yu, L. Gao, J. Zhang, Y. Zhang and H. Chen. Risk Assessment and Preventive Treatment for Peritoneal Recurrence Following Radical Resection for Gastric Cancer. *Front Oncol.* 11:778152,2022. PMID:35047394 doi:10.3389/fonc.2021.778152
11. D. Jayne. Molecular biology of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res.* 134:21-33,2007. PMID:17633045 doi:10.1007/978-0-387-48993-3_2
12. K. Ren, X. Xie, T. Min, T. Sun, H. Wang, Y. Zhang, C. Dang and H. Zhang. Development of the Peritoneal Metastasis: A Review of Back-Grounds, Mechanisms, Treatments and Prospects. *J*

- Clin Med.* 12(1):103,2023. PMID:36614904 doi:10.3390/jcm12010103
13. Y. Okabe. Immune Niche Within the Peritoneal Cavity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 434:123-134,2021. PMID:34850285 doi:10.1007/978-3-030-86016-5_6
 14. A.L. Sedlacek, S.A. Gerber, T.D. Randall, N.V. Rooijen, J.G. Frelinger and E.M. Lord. Generation of a dual-functioning antitumor immune response in the peritoneal cavity. *Am J Pathol.* 183(4):1318-1328,2013. PMID:23933065 doi:10.1016/j.ajpath.2013.06.030
 15. M. Liu, A. Silva-Sanchez, T.D. Randall and S. Meza-Perez. Specialized immune responses in the peritoneal cavity and omentum. *J Leukoc Biol.* 109(4):717-729,2021. PMID:32881077 doi:10.1002/JLB.5MIR0720-271RR
 16. P.L. Wagner, C.M. Knotts, V.S. Donneberg, N. Dadgar, C.C. Pico, K. Xiao, A. Zaidi, S.C. Schiffman, C.J. Allen, A.D. Donnenberg and D.L. Bartlett. Characterizing the Immune Environment in Peritoneal Carcinomatosis: Insights for Novel Immunotherapy Strategies. *Ann Surg Oncol.* 2023 PMID:37996643 doi:10.1245/s10434-023-14553-6
 17. K. Takahashi, K. Kurashina, H. Yamaguchi, R. Kanamaru, H. Ohzawa, H. Miyato, S. Saito, Y. Hosoya, A.K. Lefor, N. Sata and J. Kitayama. Altered intraperitoneal immune microenvironment in patients with peritoneal metastases from gastric cancer. *Front Immunol.* 13:969468,2022. PMID:36119051 doi:10.3389/fimmu.2022.969468
 18. M. Shimotsu, M. Kawata, A. Hagiwara and T. Takahashi. Milky spots in the human greater omentum. Macroscopic and histological identification. *Acta Anat (Basel).* 136(3):211-216,1989. PMID:2603633 doi:10.1159/000146888
 19. V.A. Mironov, S.A. Gusev and A.F. Baradi. Mesothelial stomata overlying omental milky spots: scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res.* 201(2):327-330,1979. PMID:315819 doi:10.1007/BF00235068
 20. J. Rangel-Moreno, J.E. Moyron-Quiroz, D.M. Carragher, K. Kusser, L. Hartson, A. Moquin and T.D. Randall. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity.* 30(5):731-743,2009 PMID:19427241 doi:10.1016/j.immuni.2009.03.014
 21. A. Hagiwara, T. Takahashi, K. Sawai, H. Taniguchi, M. Shimotsu, S. Okano, C. Sakakura, H. Tsujimoto, K. Osaki, S. Sasaki, M. Shirasu, T. Sakakibara, T. Ohyama, A. Sakuyama, M. Ohgaki, T. Imanishi and J. Yamasaki. Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res.* 53(3):687-692,1993. PMID:8425204
 22. H. Tsujimoto, T. Takahashi, A. Hagiwara, M. Shimotsu, C. Sakakura, K. Osaki, S. Sasaki, M. Shirasu, T. Sakakibara, T. Ohyama, A. Sakuyama, M. Ohgaki, T. Imanishi and J. Yamasaki. Site-specific implantation in the milky spots of malignant cells in peritoneal dissemination: immunohistochemical observation in mice inoculated intraperitoneally with bromodeoxyuridine-labelled cells. *Br J Cancer.* 71(3):468-472,1995. PMID:7533515

doi:10.1038/bjc.1995.95

23. S.A. Gerber, V.Y. Rybalko, C.E. Bigelow, A.A. Lugade, T.H. Foster, J.G. Frelinger and E.M. Lord. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol.* 169(5):1739-1752,2006. PMID:17071597 doi:10.2353/ajpath.2006.051222
24. J. Liu, X. Geng and Y. Li. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol.* 37(5):5715-5726,2016. PMID:26831659 doi:10.1007/s13277-016-4887-3
25. K.J Tracey. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 9(6):418-428,2009. PMID:19461672 doi:10.1038/nri2566
26. N.V. Alen. The cholinergic anti-inflammatory pathway in humans: State-of-the-art review and future directions. *Neurosci Biobehav Rev.* 136:104622,2022. PMID:35300992 doi:10.1016/j.neubiorev.2022.104622
27. D. Siu. Activity-dependent hepatocyte growth factor expression and its role in organogenesis and cancer growth suppression. *Med Hypotheses.* 63(1):62-70,2004. PMID:15193349 doi:10.1016/j.mehy.2004.01.031
28. T. Nishio, K. Taura, K. Iwaisako, Y. Koyama, K. Tanabe, G. Yamamoto, Y. Okuda, Y. Ikeno, K. Yoshino, Y. Kasai, M. Okuno, S. Seo, T. Sakurai, M. Asagiri, E. Hatano and S. Uemoto. Hepatic vagus nerve regulates Kupffer cell activation via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol.* 52(8):965-976,2017. PMID:28044208 doi:10.1007/s00535-016-1304-z
29. T. Fujii, M. Mashimo, Y. Moriwaki, H. Misawa, S. Ono, K. Horiguchi and K. Kawashima. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol.* 8:1085,2017. PMID:28932225 doi:10.3389/fimmu.2017.01085
30. E. Reijmen, L. Vannucci, M.D. Couck, J.D. Grève and Y. Gidron. Therapeutic potential of the vagus nerve in cancer. *Immunol Lett.* 202:38-43,2018. PMID:30077536 doi:10.1016/j.imlet.2018.07.006
31. K. Murray, M. Barboza, K.M Rude, I. Brust-Mascher and C. Reardon. Functional circuitry of neuro-immune communication in the mesenteric lymph node and spleen. *Brain Behav Immun.* 82:214-223,2019. PMID:31445965 doi:10.1016/j.bbi.2019.08.188
32. T. Teratani, Y. Mikami, N. Nakamoto, T. Suzuki, Y. Harada, K. Okabayashi, Y. Hagihara, N. Taniki, K. Kohno, S. Shibata, K. Miyamoto, H. Ishigame, P.S. Chu, T. Sujino, W. Suda, M. Hattori, M. Matsui, T. Okada, H. Okano, M. Inoue, T. Yada, Y. Kitagawa, A. Yoshimura, M. Tanida, M. Tsuda, Y. Iwasaki and T. Kanai. The liver-brain-gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut. *Nature.* 585(7826):591-596,2020. PMID:32526765 doi:10.1038/s41586-020-2425-3

33. K. Vonck, R. Raedt, J. Naulaerts, F.D. Vogelaere, E. Thiery, D.V. Roost, B. Aldenkamp, M. Miatton and P. Boon. Vagus nerve stimulation...25 years later! What do we know about the effects on cognition? *Neurosci Biobehav Rev.* 45:63-71,2014. PMID:24858008
doi:10.1016/j.neubiorev.2014.05.005
34. M. Feldmann, F.M. Brennan and R.N. Maini. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 14:397-440,1996. PMID:8717520 doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397
35. B. Bonaz, T. Bazin and S. Pellissier. The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Neurosci.* 12:49,2018. PMID:29467611 doi:10.3389/fnins.2018.00049
36. K.J Tracey. The inflammatory reflex. *Nature.* 420(6917):853-859,2002. PMID:12490958
doi:10.1038/nature01321
37. X. Zhou, Z. Ma, L. Zhang, S. Zhou, J. Wang, B. Wang and W. Fu. Heart rate variability in the prediction of survival in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Psychosom Res.* 89:20-25,2016. PMID:27663106 doi:10.1016/j.jpsychores.2016.08.004
38. M.D. Couck, R. Caers, D. Spiegel and Y. Gidron. The Role of the Vagus Nerve in Cancer Prognosis: A Systematic and a Comprehensive Review. *J Oncol.* 2018:1236787,2018. PMID:30057605 doi:10.1155/2018/1236787
39. M. Tatsuta, H. Yamamura, H. Iishi, M. Ichii, S. Noguchi, M. Baba and H. Taniguchi. Promotion by vagotomy of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res.* 45(1):194-197,1985. PMID:3965131
40. R.L. Nelson, S. Briley, O.P. Vaz and H. Abcarian. The effect of vagotomy and pyloroplasty on colorectal tumor induction in the rat. *J Surg Oncol.* 51(4):281-286,1992. PMID:1434662
doi:10.1002/jso.2930510416
41. T. Ogawa, T. Makino, K. Mizumoto and F. Nakayama. Promoting effect of truncal vagotomy on pancreatic carcinogenesis initiated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters. *Carcinogenesis.* 12(7):1227-1230,1991. PMID:2070487
doi:10.1093/carcin/12.7.1227
42. T. Fukagawa, H. Katai, M. Saka, S. Morita, T. Sano and M. Sasako. Gallstone Formation after Gastric Cancer Surgery. *J. Gastrointest Surg.* 13(5):886-889,2009. PMID:19219514
doi:10.1007/s11605-009-0832-8
43. S.M. Kim, J. Cho, D. Kang, S.J. Oh, A.R. Kim, T.S. Sohn, J.H. Noh and S. Kim. A Randomized Controlled Trial of Vagus Nerve-preserving Distal Gastrectomy Versus Conventional Distal Gastrectomy for Postoperative Quality of Life in Early Stage Gastric Cancer Patients. *Ann Surg.* 263(6):1079-1084,2016. PMID:26727095 doi:10.1097/SLA.0000000000001565
44. T. Jin, Z.-H. Chen, P.-P. Liang, Z.-D. Li, F.-J. He, Z.-W. Chen, J.-K. Hu and K. Yang. A Gastrectomy for early-stage gastric cancer patients with or without preserving celiac branches

- of vagus nerves: A meta-analysis. *Surgery*. 173(2):375-382,2023. PMID:36379744
doi:10.1016/j.surg.2022.10.016
45. M. Yamamoto, S. Nomura, A. Hosoi, K. Nagaoka, T. Iino, T. Yasuda, T. Saito, H. Matsushita, E. Uchida, Y. Seto, J.R. Goldenring, K. Kakimi, M. Tatematsu and T. Tsukamoto. Established gastric cancer cell lines transplantable into C57BL/6 mice show fibroblast growth factor receptor 4 promotion of tumor growth. *Cancer Sci*. 109(5):1480-1492,2018. PMID:29532565
doi:10.1111/cas.13569
 46. Y. Kumagai, Y. Futoh, H. Miyato, H. Ohzawa, H. Yamaguchi, S. Saito, K. Kurashina, Y. Hosoya, A.K. Lefor, N. Sata and J. Kitayama. Effect of Systemic or Intraperitoneal Administration of Anti-PD-1 Antibody for Peritoneal Metastases from Gastric Cancer. *In Vivo*. 36(3):1126-1135,2022. PMID:35478147 doi:10.21873/invivo.12811
 47. E.E.B. Ghosn, A.A. Cassado, G.R. Govoni, T. Fukuhara, Y. Yang, D.M. Monack, K.R. Bortoluci, S.R. Almeida, L.A. Herzenberg and L.A. Herzenberg. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(6):2568-2573,2010. PMID:20133793 doi:10.1073/pnas.0915000107
 48. F. Geissmann, S. Jung and D.R. Littman. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19(1):71-82,2003. PMID:12871640
doi:10.1016/s1074-7613(03)00174-2
 49. C.A. Schneider, D.X.F. Velez, R. Azevedo, E.M. Hoover, C.J. Tran, C. Lo, O. Vadpey, S.P. Gandhi and M.B. Lodoen. Imaging the dynamic recruitment of monocytes to the blood-brain barrier and specific brain regions during *Toxoplasma gondii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116(49):24796-24807,2019. PMID:31727842 doi:10.1073/pnas.1915778116
 50. N. Erin, G.A. Barkan, J.F. Harms and G.A. Clawson. Vagotomy enhances experimental metastases of 4THMpc breast cancer cells and alters Substance P level. *Regul Pept*. 151(1-3):35-42,2008. PMID:18499282 doi:10.1016/j.regpep.2008.03.012
 51. T. Hiramoto, K. Yoshihara, Y. Asano and N. Sudo. Protective Role of the Hepatic Vagus Nerve against Liver Metastasis in Mice. *Neuroimmunomodulation*. 24(6):341–347,2018. PMID:29621768 doi:10.1159/000487483
 52. L.I. Partecke, A. Käding, D.N. Trung, S. Diedrich, M. Sendler, F. Weiss, J.-P. Kühn, J. Mayerie, K. Beyer, W. von Bernstorff, C.-D. Heidecke and W. Keßler. Subdiaphragmatic vagotomy promotes tumor growth and reduces survival via TNF α in a murine pancreatic cancer model. *Oncotarget*. 8(14):22501-22512,2017. PMID:28160574 doi:10.18632/oncotarget.15019
 53. L.V. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G.I. Botchkina, L.R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J.W. Eaton and K.J. Tracey. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 405(6785):458-462,2000. PMID:10839541
doi:10.1038/35013070

54. W.J. de Jonge, E.P van der Zanden, F.O. The, M.F. Bijlsma, D.J. van Westerloo, R.J. Bennink, H.-R. Berthoud, S. Uematsu, S. Akira, R.M. van den Wijngaard and G.E. Boeckstaens. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 6:844-851,2005. PMID:16025117 doi:10.1038/ni1229
55. T. Inoue, C. Abe, T. Kohro, S. Tanaka, L. Huang, J. Yao, S. Zheng, H. Ye, R. Inagi, R.L. Stornetta, D.L. Rosin, M. Nangaku, Y. Wada and M.D. Okusa. Non-canonical cholinergic anti-inflammatory pathway-mediated activation of peritoneal macrophages induces Hes1 and blocks ischemia/reperfusion injury in the kidney. *Kidney Int.* 95(3):563-576,2019. PMID:30670317 doi:10.1016/j.kint.2018.09.020
56. S. Mezaz-Perez and T.D Randall. Immunological Functions of the Omentum. *Trends Immunol.* 38(7):526-536,2017. PMID:28579319 doi:10.1016/j.it.2017.03.002
57. J.F. Wijffels, R.J. Hendrickx, J.J. Steenbergen, I.L. Eestermans and R.H. Beelen. Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages. *Res Immunol.* 143(4):401-409,1992. PMID:1518954 doi:10.1016/s0923-2494(05)80072-0.
58. K.M. Nieman, H.A. Kenny, C.V. Penicka, A. Ladanyi, R. Buell-Gutbrod, M.R. Zillhardt, I.L. Romero, M.S. Carey, G.B. Mills, G.S. Hotamisligil, S.D. Yamada, M.E. Peter, K. Gwin and E. Lengyel. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 17(11):1498-1503,2011. PMID:22037646 doi:10.1038/nm.2492
59. L.F. Krist, M. Kerremans, D.M. Broekhuis-Fluitsma, I.L. Eestermans, S. Meyer and R.H. Beelen. Milky spots in the greater omentum are predominant sites of local tumour cell proliferation and accumulation in the peritoneal cavity. *Cancer Immunol Immunother.* 47(4):205-212,1998. PMID:9875673 doi:10.1007/s002620050522
60. Y. Kasagi, Y. Harada, Y. Morodomi, T. Iwai, S. Saito, K. Yoshida, E. Oki, H. Saeki, K. Ohgaki, M. Sugiyama, M. Onimaru, Y. Maehara and Y. Yonemitsu. Peritoneal Dissemination Requires an Sp1-Dependent CXCR4/CXCL12 Signaling Axis and Extracellular Matrix-Directed Spheroid Formation. *Cancer Res.* 76(2):347-357,2016. PMID:26744523 doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1563
61. W. Lee, S.Y. Ko, M.S. Mohamed, H.A. Kenny, E. Lengyel and H. Naora. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *J. Exp Med.* 216(1):176-194,2019. PMID:30567719 doi:10.1084/jem.20181170
62. M-A. Hwang, M. Won, J-Y. Im, M-J. Kang, D-H. Kweon and B-K. Kim. TNF- α Secreted from Macrophages Increases the Expression of Prometastatic Integrin α V in Gastric Cancer. *Int.J.Mol.Sci.* 24(1):376,2022. PMID:36613819 doi:10.3390/ijms24010376
63. R. Clark, V. Krishnan, M. Schoof, I. Rodriguez, B. Theriault, M. Chekmareva and C.Rinker-Schaeffer. Milky Spots Promote Ovarian Cancer Metastatic Colonization of Peritoneal Adipose

- in Experimental Models. *Am J Pathol.* 183(2):576-591,2013. PMID:23885715
doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.023
64. A. Etzerodt, M. Moulin, T.K. Doktor, M. Delfini, N. Mossadegh-Keller, M. Bajenoff, M.H. Sieweke, S.K. Moestrup, N. Auphan-Anezin and T. Lawrence. Tissue-resident macrophages in omentum promote metastatic spread of ovarian cancer. *J. Exp Med.* 217(4):e20191869,2020. PMID:31951251 doi:10.1084/jem.20191869
 65. H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J.H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C.J. Czura and K.J. Tracey. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 421(6921):384-388,2003. PMID:12508119
doi:10.1038/nature01339
 66. M. Rosas-Ballina, P.S. Olofsson, M. Ochani, S.I. Valdés-Ferrer, Y.A. Levine, C. Reardon, M.W. Tusche, V.A. Pavlov, U. Andersson, S. Chavan, T.W. Mak and K.J. Tracey. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science.* 334(6052):98-101,2011. PMID:21921156 doi:10.1126/science.1209985
 67. C.G.J. Cleypool, B. Schurink, D.E.M. van der Horst and R.L.A.W. Bleys. Sympathetic nerve tissue in milky spots of the human greater omentum. *J. Anat.* 236(1):156-164,2020. PMID:31498441 doi:10.1111/joa.13077