

氏 名	風 當 ゆりえ
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 711 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 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	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 審 査 委 員	(委員長) 教授 眞嶋 浩聡
	(委 員) 教授 武藤 弘行 准教授 宮倉 安幸
	(委 員) 教授 安田 宏

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

迷走神経は腹腔内へ通じる唯一の副交感神経経路であり、脾臓など腹腔内臓器においてコリン作動性抗炎症経路(CAIP)を通じて抗炎症作用をもたらす。胃癌など上部消化管癌の手術ではリンパ節郭清の際に切除されることが多いにも関わらず、迷走神経切離術が胃癌患者の術後転機に与える影響は依然として不明である。また、進行胃癌患者において手術後の腹膜播種再発は最多であり、予後不良因子となる。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(YTN16P)を腹腔内に投与して腹膜播種(PM)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することとした。

### 2 研究方法

C57BL/6N マウスに横隔膜下での迷走神経切離および幽門形成術を施行(VxPP 群)し、その 3 週間後に同系マウス胃がん腹膜高転移株である YTN16P を腹腔内に投与し、腸間膜および大網上の腹膜播種の数および程度を迷走神経温存対照手術(PP 群)マウスと比較した。また、迷走神経切離が腹膜播種形成過程における免疫状態に与える影響について検討するため、同系胃癌細胞 YTN16P 投与後の腹腔内洗浄液、脾臓内、血液中および大網 Milky spot 内、大網組織中における免疫細胞と大網 Milky spot 内の腫瘍細胞をそれぞれフローサイトメトリー、免疫組織化学染色(IHC)を使用して分析した。

### 3 研究成果

YTN16P の腹腔内投与により VxPP 群の腸間膜上の腹膜播種結節数は対照手術(PP)群と比較して有意に増加し(PP:中央値(M)=35(3-69) vs VxPP:中央値(M)=90(82-115),  $p=0.0079$ ,  $n=5$ )、大網の腹膜播種の程度を示す Grade も高い傾向にあった。

YTN16P 投与後 1 日目の腹腔内洗浄液中の免疫細胞数では VxPP 群においてマクロファージが有意に多くみられた(PP:  $M=1.19(0.73-2.32) \times 10^6$  vs VxPP:  $M=2.12(1.04-3.36) \times 10^6$ ,  $p=0.03$ ,  $n=10,12$ )ほかは有意な差はみられなかった。脾臓内の CD45 陽性細胞に対する免疫細胞の割合は

VxPP 群においてリンパ球が減少傾向を示し、マクロファージは有意に増加した(PP:  $M=0.90(0.80-1.13)\%$  vs VxPP:  $M=1.01(0.98-1.33)\%$ ,  $p=0.0278$ ,  $n=5,7$ )。血液中の免疫細胞数( $\mu\text{L}$ )は CD45 陽性の免疫細胞、T 細胞や NK 細胞、好中球、好酸球をはじめとする骨髄系細胞が VxPP 群において有意に増加していた。

YTN16P 投与後 1 日目の大網の Milky spot の領域( $\mu\text{m}^2$ )は VxPP 群において有意に拡大し(PP:  $M=5.38(4.64-6.69) \times 10^3$  vs VxPP:  $M=14.5(6.84-20.9) \times 10^3$ ,  $p=0.0012$ ,  $n=6,7$ )、pan-Cytokeratin 陽性腫瘍細胞の Milky spot への生着( $/\text{mm}^2$ )も有意に多く認めた(PP:  $M=321(159-787)$  vs VxPP:  $M=719(394-858)$ ,  $p=0.014$ ,  $n=6,7$ )。また、Milky spot 辺縁では F4/80 陽性マクロファージの細胞密度( $/\text{mm}^2$ )が VxPP 群において有意に多く存在しており(PP:  $M=48.2(27.8-60.8)$  vs VxPP:  $M=83.4(71.4-103)$ ,  $p=0.0012$ )、Milky spot 内の CD3 陽性および CD8 陽性 T 細胞の細胞密度( $/\text{mm}^2$ )も VxPP 群において有意に高かった[CD3 陽性 T 細胞(PP:  $M=2.54(2.05-3.18) \times 10^3$  vs VxPP:  $M=3.63(2.96-4.73) \times 10^3$ ,  $p=0.0047$ )、CD8 陽性 T 細胞(PP:  $M=6.91(5.54-12.2) \times 10^2$  vs VxPP:  $M=15.8(10.9-23.8) \times 10^2$ ,  $p=0.0023$ )]。

#### 4 考察

同系マウスモデルを用いて、迷走神経切離後 3 週目に腹腔内に癌細胞を投与すると、腹膜播種は増加することが確認できた。この結果は、迷走神経切離は腫瘍の発癌の促進や転移の増加、腫瘍内での  $\text{TNF-}\alpha$  を産生する腫瘍関連マクロファージの増加による腫瘍の進行を促進するという過去の報告と合致し、迷走神経シグナルが腹膜播種の形成に対しても抑制的に働いていることが示唆された。迷走神経シグナルはコリン作動性抗炎症経路(CAIP)を介して、抗炎症効果をもたらす作用が知られている。手術後のマウスにおいて、腫瘍細胞の投与直後から、腹腔内および全身(脾臓内、血液中)において VxPP 群においてマクロファージをはじめとする免疫細胞の増加を認めた。この結果は、迷走神経切離後のマウスは、腫瘍細胞投与の刺激を受けて対照群と比べて過剰な免疫反応が誘発されたと考えられた。

大網の Milky spot は YTN16P 投与 1 日目に VxPP 群において著明に拡大しており、腫瘍細胞の生着を有意に多く認めた。過去の文献において、腹腔内の散布された腫瘍細胞は Milky spot に生着することで、周囲の脂肪組織からエネルギー供給をうけ、転移形成の必要な能力を獲得することが報告されている。本研究でも、大網の Milky spot 周囲には VxPP 群においてより多くの F4/80 陽性マクロファージが認められたことから、これらのマクロファージから産生される  $\text{TNF-}\alpha$  やサイトカインなどの作用により、腫瘍細胞の悪性度がより高まり、播種を増強した可能性が考えられた。したがって、迷走神経切離は、投与後早期の Milky spot における腫瘍細胞の生着を促進することで腹膜播種の増強に寄与している可能性が考えられた。以上の事実から、迷走神経シグナルは腹腔内の局所免疫を介して腹膜播種の成立に抑制的な作用を有しており、進行胃癌の根治手術に伴う横隔膜下での迷走神経切除は術後の播種再発を促進する可能性があることが示唆された。

#### 5 結論

横隔膜下での迷走神経切離術により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、腹膜播種の増加をきたすこと

が考えられる。今回の研究結果から、進行胃癌に対する根治手術において、腹膜播種再発のハイリスク症例に対しては迷走神経を温存することで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。

## 論文審査の結果の要旨

風當氏は、C57BL/6N マウスを用いて、

- ・横隔膜下での迷走神経切離および幽門形成モデル
- ・高率に腹膜播種を起こすモデル（胃癌細胞株（YTK16P））

を作成した。このモデルを用いて、

- ・腹腔内洗浄液および脾臓、血液中の免疫細胞のフローサイトメトリーによる評価
- ・免疫染色による大網組織の免疫細胞の評価

を行い、以下を明らかにした。

- ① 迷走神経切離(VxPP)群において腹膜播種が増加すること、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こと。
- ② VxPP 群において Milky spot（大網の2次リンパ組織）の増大、Milky spot および腹腔内での免疫細胞の増加が生じ、免疫反応が亢進していること。
- ③ 迷走神経切離は、YTK16P 投与後早期の Milky spot における腫瘍細胞の生着を促進することで腹膜播種の進展に寄与している可能性があること。

以上から、迷走神経シグナルは腹腔内の局所免疫を介して腹膜播種の成立に抑制的な作用を有しており、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術後の腹膜播種再発を促進する可能性があることを示した。

これらは新規な知見であり、学術的意義も高く、学位論文として申し分のない内容であった。細かな記載の不備や、統一性を持たせた図への修正を指示した。また、考察が文章のみで構成されていて分かりにくく、プレゼンテーションで使った図を適宜使用して理解しやすい内容に修正するよう指示した。これらは適切に修正された。

審査委員4名で、全員一致で本学学位論文として妥当であると判断した。

## 最終試験の結果の要旨

胃癌の発生率は減少傾向にあるが、国内では未だに部位別癌死亡数の第3位である。胃癌の転移再発形式として最も多いのが腹膜播種である。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切離が標準治療となっている。一方、迷走神経切離が胃癌や大腸癌の発癌を促進するなどの動物実験結果が報告されている。

これらを背景として、風當氏は C57BL/6N マウスを用いて、迷走神経切離モデル、高率に腹膜播種を起こすモデルを作成し、腹腔内洗浄液・脾臓・血液中の免疫細胞の評価、大網組織の免疫細胞の評価を行った。

その結果、①迷走神経切離(VxPP)群において腹膜播種が増加し、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こと、②VxPP 群において Milky spot（大網の2次リンパ組織）の増大、Milky spot および腹腔内での免疫細胞の増加が生じ、免疫反応が亢進していること、③迷走神経切離は、YTK16P 投与後早期の Milky spot における腫瘍細胞の生着を促進することで腹膜播種の進展に寄与している可能性があること、を示した。

以上から、迷走神経シグナルは腹腔内の局所免疫を介して腹膜播種の成立に抑制的な作用を有しており、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術後の腹膜播種再発を促進する可能性があることを示した。

これらの知見は独創性があり、医学的意義が高いと判断できる。プレゼンテーションでは背景、目的、方法、結果、考察、展望までがわかりやすく説明され、研究の成果と学術的意義が明瞭に伝わった。

審査委員4名（うち1名外部審査委員）から質問があったが、適切に回答できた。研究成果については学位論文として妥当であると、全員の意見が一致した。また、審査委員からはマイナーな訂正、加筆、提案があり、この点について学位論文の訂正を行うこととなった。論文は適切に修正された。

以上から、最終試験を合格と判定した。