

氏名	かな まる り ひと 金丸理人
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 588 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 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	腹膜播種の成立における好中球細胞外トラップ (NETs ; Neutrophil Extracellular Traps) の役割と好中球 PD-L1 の検討
論文審査委員	(委員長) 教授 藤原 寛行 (委員) 教授 高橋 将文 准教授 松原 大祐

論文内容の要旨

1 研究目的

進行胃癌の術後に腹膜播種再発をきたした患者の予後は不良であるが、その機序は十分に解明されていない。低比重好中球 (LDN; low density neutrophil) は、様々な疾患患者の末梢血中で増加しており、通常的好中球 (NDN; normal density neutrophil) とは異なる性質を持つ。術中出血量が腹膜再発と正の相関を持つという過去の報告から、胃癌術後の腹腔内に滲出した LDN の頻度や性質を解析し、播種再発との関連性を検討した。また、NDN の PD-L1 発現と機能を解析し、T 細胞応答に及ぼす影響について考察した。

2 研究方法

(1) LDN の分離と NETs (Neutrophil Extracellular Traps) の観察

開腹胃切除術を受けた患者において開腹後と閉腹前に腹腔内洗浄液を回収、Ficoll 液を用いて遠心分離後、中間層に含まれる CD66b(+)細胞を LDN と規定し、CD45(+)白血球中の割合を算定するとともに電子顕微鏡でその形態を観察した。この LDN を poly-L-lysine plate 上で 37°C, 5%CO₂ 下で培養後、膜非透過性 DNA 結合性色素 SYTOX Green を投与し、蛍光顕微鏡で観察した。また、磁気分離装置を用いて CD66b(+)LDN を分離し、以下の実験に用いた。

(2) In vitro 接着実験

上記 LDN を 2 時間培養後、PKH26 で赤色蛍光染色したヒト胃癌細胞株 MKN45 を添加、5 分間共培養後、洗浄し、残存癌細胞を蛍光顕微鏡で観察し算定した。また、その後の細胞動態を Timelapse 動画にて解析した。

(3) In vivo 腹膜播種実験

ヌードマウスの腹腔内に MKN45 1×10⁵ を投与した群と、同数の MKN45 に LDN 1×10⁷ 個を混合して投与した群に分け、4 週間後、腸間膜の播種形成能を評価した。また、MKN45+LDN 共投与群に DNase I を終濃度 1000U/ml で腹腔内投与し、播種数への影響を観察した。

(4) ヒト腹膜中皮細胞の傷害実験と大網表面の NETs の観察

胃癌手術時の摘出標本の大網から腹膜中皮細胞を分離培養後、Calcein AM 試薬で染色、閉腹時洗浄腹液由来 NDN と 3 時間共培養し、細胞傷害度を算出した。また、大網の一部に SYTOX

Green を添加し、蛍光実体顕微鏡で観察した。

(5) 末梢血好中球の細胞膜表面と細胞内の PD-L1 発現

抗 PD-L1 抗体を用いて NDN の膜表面および細胞内 PD-L1 発現を Flow Cytometry で解析するとともに、核を DAPI、細胞膜を抗 CD66b 抗体で多重染色後、蛍光顕微鏡でその形態を観察した。また、NDN を 24 時間培養し、抗 PD-L1 抗体に加え Annexin V, 7-AAD で染色し、Apoptosis と膜上 PD-L1 発現の推移を検討した。

(6) NDN 共培養による末梢血リンパ球増殖抑制試験

末梢血 CD3(+) T 細胞を Negative selection し、Cell Trace CFSE で染色、抗 CD3 抗体で刺激後 4 日間培養し、その増殖を Flow Cytometry で評価した。この実験系に、NDN を共培養させ、 T 細胞の増殖に対する影響を検討するとともに、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-1 抗体を添加し、その抑制効果の変化を検討した。

3 研究成果

- (1) 開腹手術を受けた 39 例の胃癌患者において、開腹時の腹腔内 LDN の割合、中央値 (M)=1.14% (0.06%~8.96%) に対し、閉腹時は M=62.6% (18.2%~86.7%) と著明に増加していた ($p < 0.001$)。また、閉腹時 PBMC 層の細胞を培養すると、細胞外に多数の糸状の SYTOX(+) DNA 成分が観察され、CD66b(+) LDN に由来することが解った。この構造体は Myeloperoxidase や Histone を共発現し、DNase I (100U/ml) の投与によりほぼ完全に分解されることから、NETs であることが確認された。また、電子顕微鏡観察でこの LDN は多核で多数の空胞を有し、NETs を放出している像が確認された。
- (2) *In vitro* で培養した LDN には多数の胃癌細胞 MKN45 が接着したが、DNase I 添加により接着細胞数は激減した。(810 \pm 124 個/field vs 98 \pm 21 個/field, $p < 0.001$)。SYTOX Green を添加し蛍光顕微鏡で観察すると、大多数の癌細胞は NETs に捕捉されていた。また、動画解析では、NETs は数時間内に分解され、その後 MKN45 は活発に増殖した。
- (3) MKN45 単独投与群では腹膜播種はほとんど認めなかったが、LDN 共投与群ではすべての個体で播種結節が認められ、その数は有意に増加していた (M=0 (0-1) vs M=46 (14-54), $p < 0.01$)。しかし、DNase I の付加にて、その数は大きく減少した (M=74 (15-85) vs M=0 (0-4), $p < 0.01$)。
- (4) NDN は E/T ratio=20 で 18%程度の中皮細胞傷害能を有していた。また、大網表面に SYTOX Green(+) の NETs 様構造が多数付着しているのが観察された。
- (5) 末梢血 NDN は、細胞膜上に PD-L1 を発現せず、細胞質に PD-L1 を発現していた。NDN は培養早期から apoptosis を起こし、PD-L1 を強く発現する傾向があった。
- (6) T 細胞は CD3 刺激を受け活発に分裂増殖したが、NDN の共存によりその増殖は有意に抑制された。この増殖抑制は抗 PD-L1 抗体により影響を受けなかったが、抗 PD-1 抗体の共存により部分的に解除された。

4 考察

術後腹腔内には多量の LDN が存在し、形態学的特徴から部分的に活性化した成熟型の LDN であると考えられた。この LDN は *in vitro* で多量の NETs を形成し、癌細胞の接着を誘導するが、DNase I 処理によって NETs を分解することで、その接着は強く抑制されることが確認された。

また、動画解析から、NETs に接着した癌細胞は細菌とは異なりその場で増殖することが解った。In vivo でも、LDN の共投与で胃癌細胞による播種形成が増強されたが、DNase I により抑制されたことから、LDN が腹膜表面で NETs を形成することで、腹腔内遊離癌細胞の着床を促進し、播種の成立を促進していることが示唆された。また、NDN により腹膜中皮細胞が傷害されること、開腹術後のヒト大網表面にも NETs 様構造が観察されたことから、ヒトにおいても開腹術後の腹腔内滲出好中球は播種再発を促進している可能性があることが示唆された。

末梢血 NDN は細胞質内に PD-L1 分子を発現しており、Apoptosis に伴い、膜表面に PD-L1 を発現する。また、NDN は抗原刺激を受けた T 細胞の増殖を部分的に抑制することが確認され、がんに対する免疫応答に抑制的な作用を有することが推測された。この抑制機序に好中球上の PD-L1 が寄与していることは証明できなかったが、PD-1 シグナルが関与している可能性が残された。

5 結論

開腹術後の腹腔内には多数の LDN が滲出し、腹膜表面に多量の NETs を形成することが、術後の腹膜再発に重要な役割を果たしており、DNase I による術後の腹腔内洗浄が播種再発を防止する有効な治療法になりうると思われた。

論文審査の結果の要旨

胃癌術後の腹膜播種再発に好中球細胞外トラップ (NETs; Neutrophil extracellular trap) が関与していることを示した論文。胃癌患者の術後腹腔内に NETs を形成しやすい低比重好中球 (LDN; low density neutrophil) が増加していることを示し、蛍光顕微鏡等で実際に NETs が形成されていることを明らかにした。更に胃癌細胞株が選択的に NETs に接着・増殖すること、DNaseI で前処置すると接着が抑制されることも示した。In vivo でも LDN がマウスモデルにおける播種形成に関与する因子であり、これも DNaseI により抑制できることを示した。一次審査で指摘された NETs の時間的経過、LDN の分化・核の分葉状態などにも検証がおこなわれ、NETs が一定時間後にはほぼ消失すること、また電子顕微鏡で LDN が NDN と比較して脱顆粒傾向にあることなどを示した。更に、接着側の腹膜が好中球によって障害を受けることなども明らかにした。これらのデータは術直後に腹腔内を DNaseI を含む生理食塩水で洗浄することが、NETs 形成を防ぎ、腹膜への癌細胞の播種を予防できるという申請者の仮説を支持するものであった。また今後の展開として、好中球と免疫チェックポイント経路との関連を調べる研究も開始している。現時点では、好中球はアポトーシスの過程で膜上に PD-L1 を発現し、T リンパ球の増殖に対して抑制的な作用を有することを見出した。好中球が NETs や PD-1/PD-L1 経路を介して癌腹膜再発に関与するという、本研究が示したメカニズムの解明が更に進めば、新規治療ターゲットの開発につながる研究と言える。

本研究は胃癌の腹膜播種再発に NETs が関与している可能性があるとの発想のもと、これらの事象を各種実験において証明した。実験方法は良くデザインされており、得られた結果も信頼のおけるものである。また考察も飛躍することなく理解しやすい。更に NETs や PD-1/PD-L1 経路をターゲットとした将来の治療法開発につながる可能性も示しており、研究意義及び新規性も認める。

以上の点から、本論文は学位論文に相応しいと判断され、審査委員全員一致で合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

最終審査会では申請者から、本研究の着想に至った背景、仮説、それを証明するための方法、得られた結果及び考察がプレゼンテーションされた。発表は明快でスライドもわかりやすく作成されていた。審査委員からの質問にも的確に回答し、発表内容だけでなく、関連領域に関しても十分な理解と知識があることが確認された。また研究の限界も理解していた。一次審査で指摘された事項にも適切な追加実験がなされていた。更に免疫系との関連を調べる新たな研究も開始しており、今後の展開も期待できる研究と思われた。審査委員からの指摘はいずれも軽微な記載内容の修正であり、適切に回答していた。

以上の観点から、本論文は学位論文として相応しく、また申請者は学位に値する学識が十分に備わっていると判断した。よって審査委員全員一致で合格と判定した。