

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16302

研究課題名(和文) 癌転移における好中球細胞外トラップ(NETs)の機能解析

研究課題名(英文) The Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Metastasis

研究代表者

岡崎 充善 (Mitsuyoshi, Okazaki)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：50781126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： 消化器癌術後において、感染性合併症により癌転移が促進されるという報告があるが、明確な機序は解明されていない。好中球細胞外トラップ(NETs)にcirculating tumor cellがトラップされ、活性化した血小板がさらに接着することで、血小板由来のMHC class IIによって免疫担当細胞から自己と認識され免疫回避に寄与しているのではないかと考えた。

腹腔内感染症モデルマウスにおいて、膵癌細胞は肝臓内に活性化した血小板接着を伴いcluster形成し、核変形を認めずviableな状態で存在していることを証明し、この機序が癌転移形成におけるfirst stepになると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで NETsの機能として血栓形成や、自己免疫性疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)の発症に重要な働きをしていることが報告されてきた。癌転移形成における働きに関しても報告があるが、NETs形成と血小板凝集による機能解析に関しては、十分に解明されていない。本研究により癌転移形成においてNETs形成・血小板凝集が関与する病態が解明できたため、今後抗血小板作用を有する薬剤の新規作用効果としての発展的な実験を行うことができる。現在PDE3阻害剤(cilostazol)を用いて検討を行っているが、既に抗血小板薬として臨床で使用されており、今後臨床応用も比較的容易に図ることができると考える。

研究成果の概要(英文)：The impacts of postoperative abdominal infectious complications increase hematogenous distant metastasis and result in poor long term survival after curative resection. Even if curative resection can be performed, the presence of circulating tumor cells is affected. The liver, the most common site of metastases, is an important organ in innate immune surveillance. The purpose of this study was to identify the effect of platelets on escape from innate immune surveillance in postoperative abdominal infectious complications. In the infectious model, although epithelial cells without platelet adhesion were in an apoptotic state, mesenchymal cells showed many viable cancer cells surrounded by activated platelets. Mesenchymal cells could escape from immune surveillance by becoming surrounded by adhered activated platelets. We hypothesized that this mechanism would be the first step in cancer metastasis formation.

研究分野：消化器癌

キーワード：好中球細胞外トラップ 血小板凝集 腹腔内感染症 膵癌 がん転移

## 1. 研究開始当初の背景

2004年に Brinkmann らのグループは、好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs) という新たな細胞外殺菌機構を発見した。NETs は、活性化した好中球が自らの二重鎖 DNA に、ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase: MPO) やエラスターゼ (neutrophil elastase: NE) など、30 種類以上の抗菌蛋白を絡ませた網状の構造物を細胞外に放出することによって、病原微生物を捕捉・殺菌する機構であり、アポトーシス、ネクローシスと並ぶ好中球の細胞死 (NETosis) として知られている (図 1)。本来 NETosis は自然免疫を司る重要な防御機構であるが、細胞外では逆に宿主の組織損傷を引き起こす二面性を持った蛋白である damage-associated molecular patterns (DAMPs) が過剰に放出されることにより、種々の障害が生じることが知られている。

NET は傷害活性の強い因子を放出するため、悪性腫瘍の転移における悪影響が考えられる。これまでに膵癌や食道癌、大腸癌肝転移術後において、感染性合併症を予後不良因子とする報告がある。炎症状態の持続や免疫能低下が転移を促進するとされるが、明確な機序は解明されていない。申請者らは膵癌原発巣の間質内に血管外血小板が存在し、この活性化血小板が DAMPs を過剰に放出することで内皮細胞の障害や剥離脱落が起こり、血管外血小板が原発巣 (膵癌細胞) の上皮間葉転換 (EMT) を誘導し、浸潤・転移に深く関与していることを報告した。

## 2. 研究の目的

本研究では免疫正常マウスによる敗血症モデルを作成し、転移促進に関わる分子基盤を、NETs 形成・血小板凝集を基軸とした細胞間相互作用という視点から詳細に解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

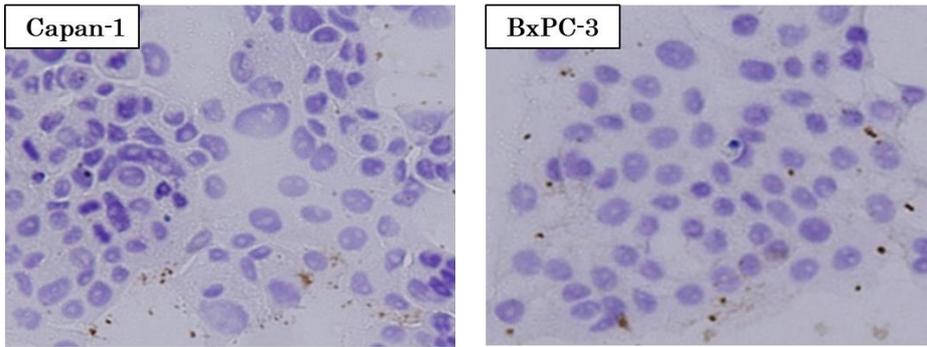
ヒト膵癌細胞 BxPC-3 (Epithelial phenotype)、Panc-1 (Mesenchymal phenotype) と BxPC-3 に TGF- $\beta$  を加え EMT を起こし (Mesenchymal-BxPC-3) を血小板と共培養し接着性を免疫染色にて評価した。2) 腹腔内感染症モデルマウスに上記ヒト膵癌細胞脾注後 60 分で屠殺し、肝臓内における癌細胞と血小板の存在を免疫染色で評価した。

## 4. 研究成果

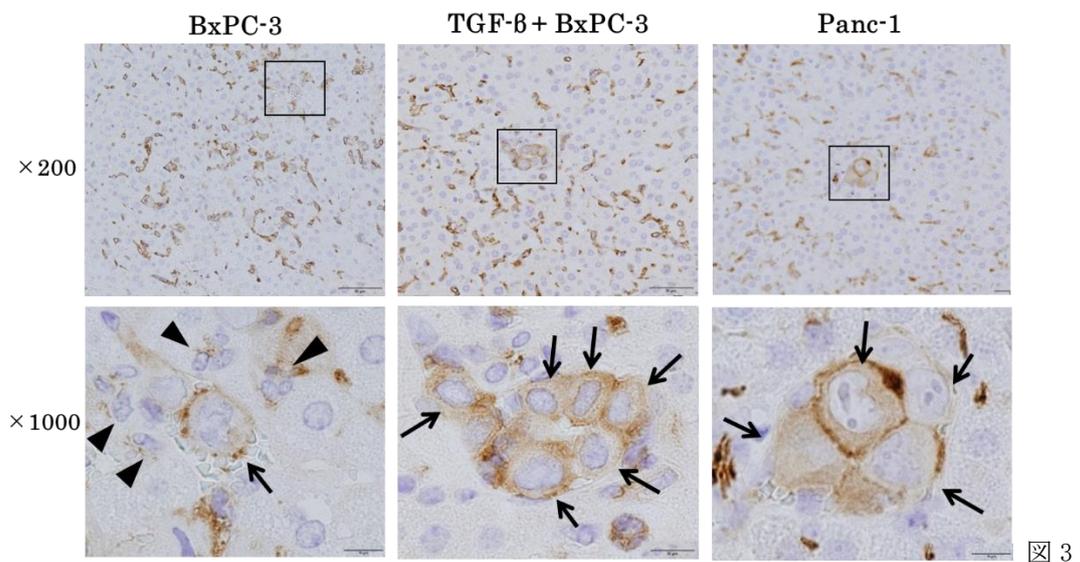
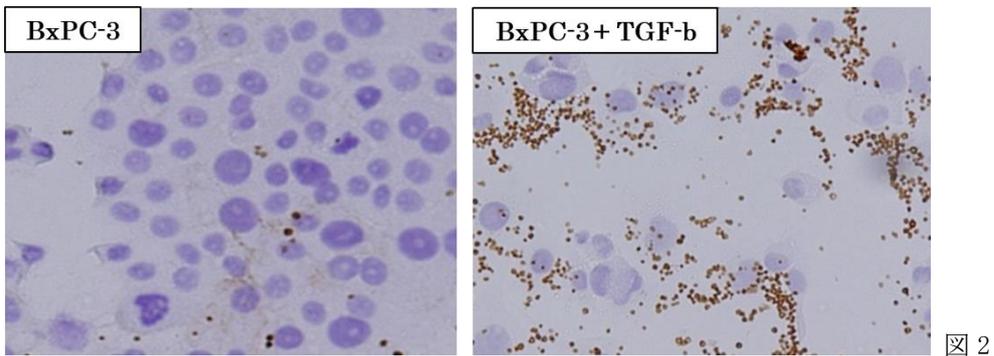
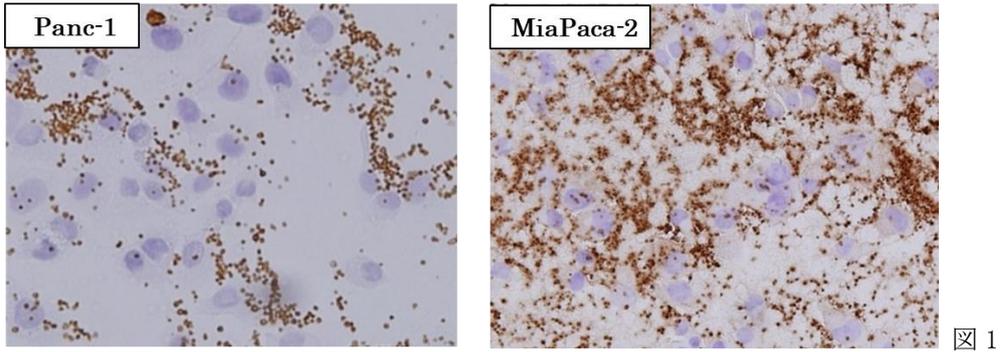
BxPC-3 と比較し Panc-1 は血小板との接着性の亢進を認め、Mesenchymal-BxPC-3 も Panc-1 と同様の結果であった (図 1, 2)。BxPC-3 脾注群では癌細胞は apoptosis 状態であったが、Panc-1 と Mesenchymal-BxPC-3 脾注群は肝類洞内に活性化した血小板接着を伴い cluster 形成しており、核変形を認めず viable な状態で存在していた (図 3)。

通常、免疫正常マウスにヒト癌細胞を投与すれば、異種の異物と認識され免疫担当細胞により排除され生着することができない。しかし、腹腔内感染症モデルマウスにおいて Mesenchymal phenotype の癌細胞は viable な状態で観察され活性化した血小板が接着しており、MHC class I による免疫回避が示唆され、この機序が癌転移形成における first step になると考えた。

### Epithelial phenotype



### Mesenchymal phenotype



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsuyoshi Okazaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Platelet adherence to cancer cells promotes escape from innate immune surveillance in cancer metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 980-988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.5102. Epub 2020 Jul 27.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎充善
2. 発表標題 癌転移形成におけるNETosisにより誘導される血小板の働き
3. 学会等名 第40回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎充善
2. 発表標題 腹腔内感染症による癌転移促進における血小板の働き
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎充善
2. 発表標題 腹腔内感染症による癌転移促進における血小板の働き
3. 学会等名 第26回外科侵襲とサイトカイン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎充善
2. 発表標題 免疫逃避におけるNETosisにより誘導される血小板凝集の働き
3. 学会等名 第39回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎充善
2. 発表標題 腹腔内感染症による膵癌転移形成における血小板の働き
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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