

京都大学	博士（医学）	氏名	岡本三智夫
論文題目	Neutrophil Extracellular Traps Promote Metastases of Colorectal Cancers through Activation of ERK Signaling by Releasing Neutrophil Elastase (好中球細胞外トラップは好中球エラスターゼによる ERK シグナルの活性化を介して大腸癌の転移を促進する)		
(論文内容の要旨) <p>【背景】好中球は炎症病態や感染性疾患においてヒトの宿主免疫に重要な役割を果たしている。一方で、好中球は腫瘍微小環境において Tumor associated neutrophils (TANs)として癌の進行に寄与することが知られている。好中球の機能の一つである好中球細胞外トラップ (Neutrophil Extracellular Traps; NETs) は、好中球の顆粒内酵素が接着した DNA strand を細胞外へ放出することで病原微生物の補足と消化に寄与することが知られている。そしてこれまでに TANs と同様に NETs も複数の癌の進行に促進的に作用することが報告されている。しかし、大腸癌に対して NETs が及ぼす影響やその機序、臨床的意義は十分に明らかにされていない。</p> <p>【目的】本研究の目的はヒト大腸癌における NETs の形成と予後の関係性を検討し、NETs が大腸癌の悪性度に影響する分子機構を明らかにすることで、NETs の大腸癌の治療標的としての可能性を検討することである。</p> <p>【方法】大腸癌の切除標本 133 例における NETs のマーカーである Citrullinated histon H3 (Cit-H3)の発現と予後の関係を免疫組織化学染色を用いて解析した。次に、大腸癌患者の術前血清サンプル 67 例における NETs のマーカーである MPO-DNA 値と予後の関係を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法を用いて検討した。in vitro の実験ではヒト好中球由来の NETs の調整培地(NET-CM)、好中球顆粒内の酵素である Neutrophil Elastase (NE)および NE 阻害剤 (sivelestat)を用いてヒト大腸癌細胞株 (HCT116, HT29)の増殖能と遊走能に及ぼす影響を観察した。生細胞でシグナル伝達分子である extracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性を観察するため、ERK の Förster resonance energy transfer (FRET)バイオセンサーを導入した HCT116-3560NES を用いて、大腸癌細胞の ERK 活性に与える NETs の影響を検討した。in vivo の実験では HCT116 を NET-CM で培養し nude mice(KSN/slcl)に皮下注射した皮下腫瘍マウスモデル、およびルシフェラーゼを発現した HCT116-Luc と NETs を混合し nude mice(KSN/slcl)の脾臓に注射した脾注肝転移マウスモデルで sivelestat の抗腫瘍効果を確認した。</p> <p>【結果】大腸癌切除標本における Cit-H3 の発現、および術前血清 MPO-DNA</p>			

値は術後無再発生存率と有意な相関を示した(P=0.0087, 0.018)。多変量解析では原発巣の Cit-H3 発現と術前血清 MPO-DNA 値が術後再発の独立した予後予測因子であることがわかった(P=0.013, 0.013)。NET-CM は HCT116 と HT29 の増殖能に影響を与えなかった (P=0.87, 0.78)。NET-CM および NE は HCT116 と HT29 の遊走能亢進に寄与し (HCT116: P<0.01, <0.01), (HT29: P<0.01, <0.01)いずれも sivelestat で抑制されることがわかった。NET-CM と NE が HCT116 の ERK 活性を亢進 (P=0.02, 0.01)させ、sivelestat で抑制されることがわかった。皮下腫瘍モデルでは sivelestat 投与により腫瘍体積に差は認めなかった (P=0.28)が、脾注肝転移マウスモデルでは sivelestat を投与することで NETs を介した肝転移形成が抑制されることがわかった(P<0.01)。

【結語】NETs は大腸癌患者の予後予測因子であり、NE を介して大腸癌細胞の ERK シグナルの活性化と遊走能亢進に寄与している。NETs を標的とした NE の阻害は大腸癌の遠隔転移に対する有効な治療戦略となる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

近年、好中球が腫瘍微小環境として癌を進展させることが注目されている。これまで宿主免疫で重要な役割を担うと考えられてきた Neutrophil Extracellular Traps(NETs)は、様々な癌種で腫瘍進展に貢献すると報告されているが、大腸癌での役割はよく知られていない。本研究は、大腸癌での NETs の臨床的意義を調べるために、大腸癌切除標本と術前血清中の NETs の発現解析を行い、腫瘍内・全身性の NETs 高発現が無再発生存期間の短縮と相関し、独立した予後不良因子である可能性を見出した。次に NETs が大腸癌を進展させる分子機構を調べる為に、大腸癌細胞株に NETs の培養上清を添加すると、癌細胞の増殖能に影響はなく遊走能が亢進することを観察した。これは NETs より放出される好中球エラスターゼ(NE)による癌細胞の ERK の活性化に起因すると推測された。さらにヌードマウスを用いた大腸癌細胞の皮下腫瘍、脾注肝転移モデルで NETs が及ぼす影響と、治療標的としての可能性を検討した。NE 阻害剤は皮下腫瘍の成長に影響を及ぼさなかった。一方、NE 阻害剤は肝転移を減少させたが、形成された転移巣の成長は抑制しなかった。これは NE 阻害による遊走能抑制が、転移の初期段階を抑制する可能性を示唆した。

以上の研究は、NETs が大腸癌に及ぼす影響とその分子機構の解明に貢献し、医学の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 3 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降