

# LPS トレランス誘導マウスの肝臓に おける抗腫瘍活性についての研究

にしかわ まこと  
西川 誠

(外科系プライマリー・ケアー学専攻)

防衛医科大学校

平成 30 年度

## 目次

第1章	緒言 .....	1
第2章	方法 .....	8
第3章	結果 .....	15
第4章	考察 .....	22
第5章	結論 .....	29
謝辞	.....	30
引用文献	.....	31
図表	.....	43

## 第1章 緒言

生体に手術や外傷、熱傷を始めとする侵襲が加わると、局所の炎症に対して貪食細胞では Tumor Necrosis Factor (TNF)、Interleukin (IL)-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が亢進する。さらに高度の侵襲が加わると、全身性の炎症反応が引き起こされるが、過剰に産生される炎症性サイトカインにより本来は活性化されるべき細菌貪食能は逆に低下する状態となる<sup>1)</sup>。このような重篤な病態の惹起により、生体内では炎症性サイトカインの産生亢進から Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)<sup>2)</sup> や臓器障害の増悪を招く一方で、殺菌能の低下から易感染状態の増悪が引き起こされ、結果として患者の予後を相乗的に不良なものとしてしまう<sup>1)</sup>。

Lipopolysaccharide (LPS)はグラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分であり、宿主の細胞に対して様々な免疫学的活性を発揮する<sup>3)</sup>。過量の LPS はエンドトキシンショックと呼ばれる致命的な炎症反応を誘導するが、極微量の LPS によってあらかじめ刺激しておく(priming)、その後の大量の LPS 刺激に対して生体は耐性を生じることが古くから知られており、この現象は LPS トレランスと呼ばれている<sup>4-12)</sup>。LPS トレランスを誘導することにより、その後の致死性 LPS 血症に対しても TNF を始めとする炎症性サイトカインの産生が著明に抑制され、予後が改善することが知られている。当初、この病態は敗血症性ショックの病態

改善に役立つものとして研究が進められていたが、炎症反応が抑制されることで菌の排除能も減弱すると考えられていたため、細菌感染から生じる臨床での敗血症に対して **LPS** トレランスは総合的には不利に働くと懸念されてきた<sup>13)</sup>。

しかし近年になり、**LPS** トレランスを誘導したマウスでは貪食細胞が増加することで菌クリアランスが亢進し、黄色ブドウ球菌感染に対する生存率が向上することが報告された<sup>13)</sup>。また筆者らの研究グループでも、マウスに **LPS** トレランスを誘導することにより、致死的大腸菌感染に対して生存率が劇的に向上することを報告している<sup>14)</sup>。すなわち、**LPS** トレランスでは肝臓での菌クリアランスが顕著に亢進するが、肝固着の組織マクロファージ(**CD68<sup>+</sup>** Kupffer 細胞)の数及び貪食能はほとんど変化しておらず、骨髄由来の遊走マクロファージ(**CD11b<sup>+</sup>** マクロファージ)の殺菌能が著明に増強していた<sup>14)</sup>。これらの知見から、**LPS** トレランスは炎症反応を抑制しながら殺菌活性を増強すると考えられた。そのため **LPS** トレランスの現象は、炎症反応の亢進と菌の貪食不全を伴うような高度侵襲により引き起こされる重篤な病態を改善し得る可能性があると考えられ、重症感染症に対する治療への有用性が期待された<sup>14)</sup>。

**LPS** トレランスが生じる機序については、これまでに数多くの研究がなされており、単球／マクロファージが極めて重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。1997 年に Medzhitov が、マクロファージの細胞表面に存在す

る Toll like receptor (TLR)-4 がグラム陰性菌の細胞壁に存在する LPS を認識し、生体に著明な炎症反応を引き起こすことを示し<sup>15)</sup>、現在では 10 種を超えるヒト TLRs がクローニングされ、それぞれが LPS のみならず多岐にわたる病原関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)を認識する機構が明らかになっている<sup>16-18)</sup>。LPS トレランスを誘導したマウスのマクロファージやヒト単球では、TLR4 の down regulation が起こっているとの報告がある<sup>19,20)</sup>。TLR4 は My88 と TIR domain-containing adapter protein including interferon-beta (TRIF) という二つの異なるアダプター分子を持ち<sup>21-23)</sup>、My88 経路は転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化して核内移行を高め、炎症性サイトカインである TNF や、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 の産生を促す<sup>10)</sup>。LPS トレランスでは、TLR4 が down regulation することにより、下流の My88 経路や mitogen-activated protein kinase (MAPK)、interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-1 が阻害され、結果として炎症性サイトカインの産生が抑制されるとも考えられる<sup>22,24)</sup>。TRIF は TLR3 からのシグナルも受けており、そのシグナルは下流で Interferon (IFN)- $\beta$  産生を誘導する<sup>25)</sup>。LPS トレランスではこの経路も同様に阻害されるが<sup>26)</sup>、TLR3 を阻害するだけでは LPS トレランスは誘導されないことから、LPS トレランスの発現には TLR4/My88 経路が最も重要であると考えられている<sup>10,27,28)</sup>。これらの TLR シグナルを miR146a が調節しているとも報告されている<sup>29)</sup>。最近、リガンド依存性代謝因子である

aryl hydrocarbon receptor (AhR)と、肝臓の酵素で AhR を活性化するリガンドを産生する tryptophan 2,3-dioxygenase を活性化して炎症性サイトカインを抑制する経路も報告された<sup>30)</sup>。LPS トレランスによる炎症性応答の抑制機序はかなり詳細に解明されてきているが、生体防御にとって極めて重要である貪食殺菌能の亢進などに関する機序の解明は未だ十分とは言えない。

LPS トレランスを誘導した単球／マクロファージにおける LPS による再刺激に対する変化をまとめる (Figure 1)<sup>10)</sup>。

- 1) 炎症性サイトカイン産生抑制(TNF、IL-6、IL-12、IL- $\beta$ )<sup>31,32)</sup>
- 2) 抗炎症性サイトカイン産生亢進(IL-10、Transforming growth factor [TGF]- $\beta$ 、IL-1RA)<sup>32-34)</sup>
- 3) 貪食細胞の貪食能亢進<sup>31,33)</sup>
- 4) 抗原提示能の低下(HLA-DR の低発現)<sup>31,33,35)</sup>
- 5) TLR 制御因子の発現(IRAK-M)<sup>36,37)</sup>

これらの反応が生じる結果 LPS トレランスを誘導することにより、生体内では

- 1) 致死的 LPS 血症に対する生存率の改善<sup>9,10,38)</sup>
- 2) グラム陽性菌感染に対する生存率の改善<sup>13,30)</sup>
- 3) グラム陰性菌感染に対する生存率の改善<sup>14)</sup>

- 4) *Candida albicans* に対する食食能亢進<sup>39)</sup>
- 5) クリプトコッカス感染に対する生存率の改善<sup>40)</sup>
- 6) D-ガラクトサミンによる急性肝不全の生存率を改善<sup>41)</sup>
- 7) 腎虚血再灌流障害の軽減<sup>42)</sup>
- 8) 肝虚血再灌流障害の軽減<sup>43)</sup>
- 9) LPS による重症肝障害の予防<sup>44)</sup>
- 10) 中枢神経系の炎症を軽減する<sup>45)</sup>
- 11) 血小板活性化因子による突然死の予防<sup>46)</sup>
- 12) 耐糖能の改善<sup>47)</sup>
- 13) 手術侵襲に対する炎症反応の抑制<sup>48)</sup>

といった効果が見られる。それぞれの詳細な機序は未だ不明な点も多いが、LPS による交叉耐性を生じることにより、LPS の再刺激以外にも様々な侵襲に対して耐性を獲得するものと思われる。

ただし、これらの反応は LPS トランスを誘導した後の侵襲に対する予防或いは軽減効果であり、その応用範囲には限りがある。むしろ悪性疾患に対する待機的外科手術のように、予め計画された侵襲に対して LPS トランスを臨床応用できれば、有用な効果を発揮する可能性があると考えられる。消化器悪性腫瘍に対する手術においては、手術そのものの侵襲や感染症を始めとする各種

術後合併症の存在に加えて、術中の腫瘍散布による経門脈的な新たな肝転移形成が問題であり、これを避けるために様々な術式の工夫がなされてきた。また術後の免疫抑制状態における、循環腫瘍細胞(circulating tumor cells; CTC)による転移形成も問題となっている<sup>49)</sup>。外科周術期に LPS トレランスを誘導することを考えた場合、その強力な抗炎症作用は手術侵襲の軽減に有用と考えられ、また、その殺菌能増強効果は周術期の感染予防に有用と考えられる。一方、臨床での応用を考えると LPS トレランスが生体の抗腫瘍活性にどのような影響を与えるかが極めて重要な問題となってくる。LPS トレランスは炎症反応の抑制といった視点から見れば、LPS などの刺激に対して、いわば anergy の状態となっており、腫瘍に対する反応性も低下しているであろうことが想像される。一方、貪食殺菌能の亢進といった細胞機能の活性化という視点から見れば、抗腫瘍活性が増強することも考えられ、これは周術期管理に極めて有用なものになるであろう。しかしながら、検索しうる限りでは、これまでに LPS トレランスにおける抗腫瘍活性に関する報告はない。また Natural Killer (NK)細胞、NKT 細胞は抗腫瘍活性の一翼を担う細胞群であるが、これまでの LPS トレランスの検討のほとんど全てが単球／マクロファージの機能に関するものであり、NK 細胞及び NKT 細胞の機能について詳細に検討した報告もない。

そこで本研究では、LPS トレランスにおける抗腫瘍活性を検討することを目



的とした。まず **LPS** トレランスを誘導し、消化器悪性腫瘍の経門脈性転移モデルとして、マウスを用いた大腸癌肝転移モデルを作成した。抗腫瘍活性を検討するために、大腸癌肝転移モデルにおける腫瘍の増大速度及び生存期間を検討した。さらに肝における単核球の抗腫瘍活性について、特に **NK** 細胞及び **NKT** 細胞に着目して免疫学的検討を行った。

## 第2章 方法

本研究における動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認（承認番号 17024）を受け、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議 2006 年）に基づいて実施した。

### 1. 動物

8–10 週齢の雄性 BALB/c マウス (Japan SLC Inc. Hamamatsu, Japan) を用いた。

食餌及び水は自由摂取とした。

### 2. モデル作成

#### 1) LPS トレランスモデルの作成

LPS (from *Escherichia coli* O111:B4; Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 µg/kg を生理食塩水 0.5 ml に溶解し、3 日間連続で腹腔内投与することにより、LPS トレランスを誘導した (Figure 2)<sup>14)</sup>。対照群のマウスには、生理食塩水 0.5 ml を腹腔内投与した（各群 n = 5）。LPS トレランスが誘導されたことを確認するために、LPS による priming の 1 日後に致死量の LPS (15 mg/kg) を経静脈的に投与して生存期間を観察した。また、致死量の LPS 投与の 1 時間後にイソフルランによる全身麻酔下に眼窩採血を行い、末梢血を採取した。血

液検体を 400×g、15 分間遠心分離して血清を採取し、-80℃で凍結保存した。

血清中の TNF 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)キット (BD Pharmingen, San Diego, CA)を用いて測定した。

## 2) 大腸癌肝転移モデルの作成と生存期間の観察

高輝度発光蛋白質(Nano-lantern)<sup>50)</sup> を安定発現するマウス大腸癌株 Colon 26 (防衛医科大学校分子生体制御学講座より提供) の門脈内投与により、大腸癌肝転移モデルを作成した<sup>51)</sup>。LPS トランス群、対照群ともにケタミン及びキシラジン腹腔内投与による全身麻酔下に、1 cm の上腹部正中切開で開腹し、十二指腸を授動して門脈を露出させた。Colon 26 細胞  $1.0 \times 10^3$  個を経門脈的に接種し、閉腹した(Figure 3)。処置後は水分、食餌ともに自由摂取とした。

腫瘍の増大速度を観察するために、肝転移モデル作成後 7, 14 日目にルシフェラーゼの発光基質であるセレンテラジン h (富士フィルム和光純薬、東京、日本) 2.5 µg を尾静脈から投与して、IVIS imaging system (Luminar XRMS series III, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)で撮影し、光量を測定した。

Nano-lantern は、ウミシイタケ(Renilla reniformis)由来のルシフェラーゼ (RLuc)から変異体を作成し、蛍光粒子収率が比較的高い黄色蛍光蛋白質

(Venus)と融合させた蛋白質である。これを大腸菌に発現させて発光強度をみたところ、RLuc と比較して発光強度は 10 倍以上であることが確認されている。従来蛍光で検出する場合は、励起光を当てるためにマウスの毛を剃って光の透過性を上げる必要があった。一方、生物発光で検出する場合は、シグナルが弱いため長時間露光する必要があった。Nano-lantern は発光強度が強いために、剃毛することなく無麻酔でも検出が可能である<sup>50)</sup>。

生存期間の観察においては、Colon 26 細胞を門脈内投与した時点を Day 0 として、マウスが腫瘍死に至るまで観察を継続し、この間は連日体重を測定した。

### 3. 肝脾単核球の分離

LPS の priming の 1 日後に肝を摘出後細切し、10 ml 注射器のガスケット部を用いて破碎しつつステンレスメッシュで濾過し、1% FBS 加 RPMI1640 液中に浮遊させた。2 回洗浄を行った後に、ペレットを 20 ml の 1%ヘパリン加 33% Percoll solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に浮遊させ、2,200 rpm で 20 分間遠心した後に上清を除去した。ペレットを 5ml の Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma-Aldrich)に浮遊させ、5 分間静置することで赤血球を除去した。1,500 rpm で 5 分間遠心した後、1% FBS 加 RPMI1640 液で 2 回洗浄し、肝単核球とし

て以下の実験に用いた<sup>52)</sup>。

脾臓は摘出後、同様にメッシュで濾過して 1% FBS 加 RPMI1640 液で 2 回洗淨した後に、Red Blood Cell Lysing Buffer 3ml に浮遊させて赤血球を除去した。さらに 2 回洗淨した後に脾単核球として以下の実験に用いた。

#### 4. フローサイトメトリーによる表面抗原の解析

分離した肝及び脾単核球を 1% FBS 加 RPMI1640 で  $1 \times 10^6$  cells/100 $\mu$ l に調整し、Fc-blocker(CD16, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)にて氷上で 10 分間処理した後、各抗体を添加し、暗所にて 4°C、20 分間のインキュベートを行った。3,000 rpm で 3 分間の遠心後、染色バッファー(20% FBS, 1% NaN<sub>3</sub>, PBS)で 2 回洗淨し、IsoFlow(Beckman Coulter)に浮遊させた。フローサイトメトリー解析には Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA)を用いた。蛍光標識抗体は、FITC 標識抗マウス CD122 抗体(TM-beta1, eBioscience, San Diego, CA, USA)及び PE-Cy5 標識抗マウス  $\alpha\beta$ TCR 抗体(Mik- $\beta$ 2, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)を用いた。抗 CD122 抗体陽性、抗  $\alpha\beta$ TCR 抗体陰性を NK 細胞、抗 CD122 抗体と抗  $\alpha\beta$ TCR 抗体ともに陽性を NKT 細胞とした<sup>53)</sup>。

#### 5. フローサイトメトリーによる細胞内 Perforin、Granzyme B、及び

## Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )の解析

細胞内染色に先立ち、表面抗原解析の場合と同様に分離した肝及び脾単核球の表面抗原を染色した。その後、NK 細胞や NKT 細胞の Perforin、Granzyme B 及び IFN- $\gamma$  の細胞内染色を行った。Perforin 及び Granzyme B の染色に際しては、細胞浮遊液に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) 50 ng/ml を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下に 2 時間インキュベートし、単核球を刺激した。Monensin を含有する BD GolgiStop (BD Biosciences) を 2  $\mu$ l 加えて、産生されるサイトカインを細胞内に蓄積させた。Fixation/Permeabilization solution (BD Biosciences) により処理し、4°C で 30 分間インキュベートした。その後 BD Perm Wash (BD Biosciences) で洗浄し、2 %ホルムアルデヒド加 PBS に浮遊させて解析した。IFN- $\gamma$  の測定に際しては、細胞浮遊液に PMA 50 ng/ml 及び Ionomycin 1  $\mu$ M を加えて単核球を刺激し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下に 6 時間インキュベートした。また、これらの細胞内サイトカインの解析にあたって、ネガティブコントロールとして各々の各種 IgG isotype 群を置いた。Perforin, Granzyme B, IFN- $\gamma$  の発現量は、平均蛍光強度(mean flow intensity [MFI])で定量化した。

なお、本研究では蛍光標識抗体は FITC 標識抗マウス CD122 抗体(TM-beta1, eBioscience)、PE-Cy5 標識抗マウス  $\alpha$  $\beta$ TCR 抗体(Mik- $\beta$ 2, BD Pharmingen)、PE 標識抗マウス perforin 抗体(eBioOMAK-D, eBioscience)、PE 標識抗マウス

granzyme B 抗体(eBR2a, eBioscience)及び PE 標識抗マウス IFN- $\gamma$  抗体(XMG1.2, eBioscience)を使用し、3 色展開法にて解析した。isotype として、Perforin 及び Granzyme B 測定に際しては Rat IgG2a  $\kappa$  Isotype control (eBioscience)を使用し、IFN- $\gamma$  の測定に当たっては Rat IgG1  $\kappa$  Isotype control (eBioscience)を使用した。

## 6. 肝における抗腫瘍活性測定

Target として用いる Colon 26 細胞を蛍光標識するため、以下の操作を行った。まず、10% FBS 加 RPMI1640 培地を用いて細胞浮遊液を作製し、Calcein-AM solution (同仁化学研究所、熊本)を 50  $\mu$ l 添加して 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、1,500 rpm で 5 分間遠心して細胞を回収し、 $2 \times 10^5$  cells/ml に調整した。一方、肝より抽出した Effector 単核球は  $5 \times 10^6$  cells/ml に調整した。細胞傷害活性の測定に際しては、96 穴プレートにエフェクター細胞数 (肝単核球) : 標的細胞数 (腫瘍細胞) の比、すなわち E : T 比として 50 : 1、25 : 1、12.5 : 1、6.25 : 1 の割合で細胞を播種した。標的細胞のみのウェルを作成し、自然遊離値の測定に用いた。プレートを 500 rpm, 2 分間の弱遠心にかけた後、テラスキャン VPC (ミネルヴァテック、東京)を用いて、各ウェルの蛍光強度を前測定として測定した。最大遊離値を期待するウェルには、界面活性剤(NP-40)を添加し、ピペッティングした後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下に

インキュベートした。経時的に再測定を行い、前測定と比較した蛍光強度の減衰をもって細胞傷害活性の指標とし、以下の式で数値化した<sup>54)</sup>。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = ([\text{測定値} - \text{自然遊離値}] / [\text{最大遊離値} - \text{自然遊離値}]) \times 100。$$

## 7. 統計学的解析

得られたデータは平均値 ± 標準誤差で示した。解析は JMP<sup>®</sup> ver. 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。2 群間の比較は Student の t 検定 或いは Mann-Whitney の検定を用いて行った。生存期間の解析には Kaplan-Meier 法を用いた。いずれの検定においても、 $P < 0.05$  をもって統計学的に有意と判定した。



### 第3章 結果

#### 1. LPS トレランスの誘導確認と肝転移モデルの作成

LPS 5 $\mu$ g/kg によりプライミングを行った群（以後トレランス群）は、その後の致死量の LPS 投与(15mg/kg)に対して全例生存したが、対照群は 72 時間以内に全例が死亡し、2 群の生存曲線間に有意な差が見られた( $P < 0.05$ )(Figure 2B)。LPS 投与 1 時間後の血漿中 TNF 値は、トレランス群において対照群と比較して有意に低値であった( $P < 0.01$ )(Figure 2C)。これらの結果から、トレランス群のみにおいて LPS トレランスが誘導されたことが示された。

Colon 26 を門脈内投与後、これらのマウスを 14 日目に犠死せしめて開腹したところ、著明な肝転移巣を認めた。腫瘍は肝臓のみで増殖しており、肉眼的に他の部位への転移を認めなかった。門脈内投与から 7、14 日目に Colon 26 を発光させ、IVIS imaging system で観察したところ、剃毛することなく、発光する様子を撮影することができた(Figure 4A, B)。実際の腫瘍位置と発行部位は互いに一致していた(Figure 4C)。光量を測定すると、門脈内投与後 7、14 日目ともにトレランス群( $n = 5$ )では対照群( $n = 5$ )と比較して有意に光量が低く (Figure 5) (トレランス群 vs. 対照群[以下同順] ; 7 日目 :  $3.4 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$  photons/sec vs.  $2.1 \times 10^6 \pm 7.3 \times 10^5$  photons/sec,  $P < 0.05$ 、14 日目 :  $3.7 \times 10^8$

$\pm 8.6 \times 10^7$  vs.  $1.6 \times 10^9 \pm 4.4 \times 10^8$  photons/sec,  $P < 0.05$ )、腫瘍の増殖抑制が示唆された。また門脈内投与後 14 日目の時点でトレランス群の肝湿重量は  $4.0 \pm 0.2$  g であったのに対し、対照群では  $5.7 \pm 0.4$  g であり、トレランス群において肝転移による肝重量の増加が、対照群に比べ有意に抑制されていた ( $P < 0.01$ )(Figure 6)。

## 2. 生存期間

Colon 26 門脈内投与後の生存期間を比較したところ、生存期間の中央値はトレランス群 26 日 ( $n = 6$ )、対照群 19 日 ( $n = 6$ ) であり、トレランス群で有意に予後が延長していた (log-rank test,  $P < 0.05$ ) (Figure 7A)。また、両群とも門脈内投与直後に体重は減少したが、トレランス群が速やかに回復したのに対し、対照群ではトレランス群のような体重増加が認められなかった (Figure 7B)。

## 3. 肝単核球の細胞分画

腫瘍細胞の門脈内投与時点に相当する、LPS トレランス誘導の 1 日後に肝から分離した単核球の総数をみると、肝単核球数は対照群 ( $n = 4$ ) と比較してトレランス群 ( $n = 4$ ) で有意に増加していた ( $3.9 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^6$  cells vs.  $1.6$

$\times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$  cells,  $P < 0.05$ ) (Figure 8)。フローサイトメトリーを用いて抗腫瘍活性の主体となる NK 細胞、NKT 細胞の分画をみると、トレランス群の肝において NK 細胞の比率が有意に高く ( $35.5 \pm 2.4\%$  vs.  $16.7 \pm 0.6\%$ ,  $P < 0.01$ )、NKT 細胞の比率も有意に上昇していた ( $11.8 \pm 0.5\%$  vs.  $5.4 \pm 0.4\%$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 9A, B)。肝単核球細胞数にこれらの比率をかけて、それぞれの実細胞数を計算したところ、NK 細胞、NKT 細胞ともにトレランス群で有意に増加していた (NK 細胞 ;  $7.0 \times 10^5 \pm 8.1 \times 10^4$  cells vs.  $3.8 \times 10^5 \pm 5.7 \times 10^4$  cells、NKT 細胞 ;  $4.1 \times 10^5 \pm 7.0 \times 10^4$  cells vs.  $1.8 \times 10^5 \pm 3.4 \times 10^4$  cells、ともに  $P < 0.05$ ) (Figure 9B)。Percoll による比重遠心分離法をコラゲナーゼ処理なしで行うと、主にリンパ球成分が分離され、NK 細胞や NKT 細胞の他、T 細胞や B 細胞が主として分離される。NK 細胞、NKT 細胞を除いた肝単核球の細胞数を比較すると、トレランス群で細胞数が多い傾向にあるが、有意差は認めなかった ( $2.0 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$  cells vs.  $1.5 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$  cells) (Figure 8)。そのため、NK 細胞及び NKT 細胞の抗腫瘍活性についてさらなる検討を加えた。

#### 4. 肝単核球の細胞内 Perforin、Granzyme B 及び IFN- $\gamma$

LPS トレランス誘導の 1 日後に、肝から単核球を分離してフローサイトメ

トリーで細胞内の各因子を測定したところ、トレランス群(n = 4)では肝単核球における Perforin の陽性細胞数が増加していた(Figure 10A)。肝単核球のうち NK 細胞及び NKT 細胞分画にゲートをかけ、Perforin の発現をヒストグラムで示したところ、NK 細胞における Perforin の平均蛍光強度(mean flow intensity [MFI])は、対照群(n = 4)と比較して有意に増強していた( $2.7 \pm 0.2$  vs.  $1.7 \pm 0.1$ ,  $P < 0.01$ )(Figure 11A, B)。NKT 細胞においても同様に Perforin の MFI は、対照群と比較して有意に増強していた( $3.6 \pm 0.5$  vs.  $2.0 \pm 0.3$ ,  $P < 0.05$ )(Figure 11A, B)。次いで Granzyme B の発現を検討した。Perforin と同様にトレランス群(n = 4)では肝単核球における Granzyme B の陽性細胞数が増加していた(Figure 10B)。NK 細胞及び NKT 細胞における Granzyme B の発現をヒストグラムで示したところ、NK 細胞、NKT 細胞ともに Granzyme B の MFI は対照群(n = 4)と比較して有意に増強していた(NK 細胞 :  $3.2 \pm 0.4$  vs.  $1.3 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ 、NKT 細胞 :  $4.9 \pm 1.2$  vs.  $2.3 \pm 0.5$ ,  $P < 0.05$ )(Figure 12A, B)。Perforin や Granzyme B が抗腫瘍効果を誘導するのに対し、IFN- $\gamma$  はむしろ炎症誘導に働くことが知られている。IFN- $\gamma$  を測定したところ、興味深いことに、NK 細胞、NKT 細胞ともに Perforin や Granzyme B とは逆の結果となった。すなわち MFI でみた IFN- $\gamma$  の発現強度は、トレランス群(n = 4)では NK 細胞、NKT 細胞といずれにおいても、対照群(n = 4)と比較すると抑制傾向にあり、特に

NK 細胞では有意差をもって発現が抑制されていた(NK 細胞;  $3.0 \pm 0.1$  vs.  $3.9 \pm 0.2$ ,  $P < 0.01$ 、NKT 細胞 ;  $5.5 \pm 0.3$  vs.  $7.6 \pm 1.0$ ) (Figure 13)。

## 5. 脾単核球の細胞分画及び細胞内サイトカイン

脾単核球においても肝単核球と同様の検討を行った。脾臓の単核球数はトレランス群( $n = 4$ )で増加する傾向を示していたものの、対照群( $n = 4$ )との間に有意差は認めなかった( $1.0 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^6$  cells s.  $8.2 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^6$  cells)。脾単核球に占める NK 細胞の比率はトレランス群と対照群でそれぞれ  $6.1 \pm 0.4$  % vs.  $6.7 \pm 0.5$  % と有意差を認めず、NK 細胞の実細胞数も  $6.3 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$  cells vs.  $5.2 \times 10^5 \pm 0.9 \times 10^5$  cells と両群間に差を認めなかった。NKT 細胞の比率についてもトレランス群と対照群でそれぞれ  $3.2 \pm 0.3\%$  vs.  $3.8 \pm 0.4\%$  と有意差を認めず、NKT 細胞の実細胞数も  $8.2 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$  vs.  $9.5 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$  cells と両群間に差を認めなかった(Figure 14B)。また、肝と同様に NK 細胞、NKT 細胞を除いた脾単核球数を比較すると、比率及び実細胞数について、両群間に差を認めなかった。

フローサイトメトリーで細胞内サイトカインを測定したところ、肝単核球と異なり、脾 NK 細胞及び NKT 細胞ともに、PMA 刺激により Perforin の産生が亢進しているものの、Perforin の MFI にはトレランス群( $n = 4$ )と対照

群( $n = 4$ )の間に差を認めなかった(NK 細胞 :  $1.8 \pm 0.1$  vs.  $1.5 \pm 0.1$ 、NKT 細胞 :  $2.1 \pm 0.2$  vs.  $1.9 \pm 0.2$ ) (Figure 15)。Granzyme B 陽性細胞の MFI も両群間 (各群  $n = 4$ ) に有意差を認めなかった(NK 細胞 :  $1.0 \pm 0.2$  vs.  $1.0 \pm 0.4$ 、NKT 細胞 :  $1.6 \pm 0.1$  vs.  $1.8 \pm 0.1$ ) (Figure 16)。IFN- $\gamma$  は NK 細胞、NKT 細胞ともにトレランス群( $n = 4$ )において産生が抑制傾向にあるものの、対照群( $n = 4$ )との間に有意差は認めなかった(NK 細胞 ;  $2.7 \pm 0.5$  vs.  $3.4 \pm 0.8$ 、NKT 細胞 ;  $4.6 \pm 0.7$  vs.  $6.2 \pm 1.5$ ) (Figure 17)。

## 6. 肝における抗腫瘍活性

LPS トレランスモデルを作成後、Colon 26 細胞に対する肝単核球の細胞傷害活性を検討した。Calcein を用いて蛍光標識した Colon 26 細胞は、トレランス群でより高度に傷害されていた(Figure 18)。蛍光強度を測定すると、共培養開始の 4 時間後にはトレランス群と対照群の間に有意差が生じた。エフェクター細胞 (肝単核球) : 標的細胞 (Colon 26)、すなわち E/T 比を 6.25 とすると、共培養 4 時間後のトレランス群( $n = 5$ )の細胞傷害活性は、対照群 ( $n = 5$ )と比較して有意に増強していた ( $22.8 \pm 3.4$  vs.  $5.0 \pm 3.3\%$ ,  $P < 0.01$ )。同様に E/T 比を 12.5、25、50 と変化させても、トレランス群の細胞傷害活性は対照群と比較して有意に増強していた(E/T 比 12.5 :  $31.3 \pm 2.7\%$  vs.  $18.3 \pm$

5.2%,  $P < 0.05$ , E/T 比 25:  $42.3 \pm 2.3\%$  vs.  $31.8 \pm 2.6\%$ ,  $P < 0.05$ , E/T 比 50:  $51.3 \pm 1.9\%$  vs.  $39.5 \pm 1.4\%$ ,  $P < 0.01$ )。共培養 8 時間後、24 時間後も同様の結果が得られた。また、トレランス群の E/T 比を 6.25 とすると 4, 8, 24 時間後の細胞障害活性はそれぞれ  $22.8 \pm 3.4\%$ ,  $44.7 \pm 2.4\%$ ,  $54.1 \pm 2.1\%$  であり、有意差を認めた (4 時間後 vs. 8 時間後:  $P < 0.01$ , 8 時間後 vs. 24 時間後:  $P < 0.05$ )。異なる E/T 比においても同様の結果であった。対照群では各 E/T 比において 4 時間後と 8 時間後の細胞傷害活性には有意差を認めたが、8 時間後と 24 時間後では E/T 比 6.25 の場合のみ有意差を認めた (8 時間後 vs. 24 時間後:  $34.4 \pm 2.3\%$  vs.  $46.2 \pm 2.4\%$ ,  $P < 0.01$ )。これらの結果から、トレランス群の肝単核球における抗腫瘍活性は、濃度依存性及び時間依存性に上昇していることが示された(Figure 19)。

## 第4章 考察

本研究では LPS トレランスを誘導した後に大腸癌肝転移モデルを作成し、特に肝における NK 細胞及び NKT 細胞の抗腫瘍活性について検討した。まず、従来から筆者らの研究グループが用いている方法で LPS トレランスモデルを作成した。動物モデルにおいては、LPS 刺激に対する TNF 産生の著明な抑制がトレランスを誘導できたかどうかの最良のマーカーと考えられている<sup>12)</sup>。本動物モデルにおいても、トレランス群において有意な血漿中 TNF 値の上昇抑制が見られ、適切にトレランスを誘導できていることを確認した。次いで癌の肝転移モデルとして門脈内注入法<sup>51)</sup>を選択した。この方法によって全マウスに肝転移を発生することができ、また肝以外の臓器への転移は認めず、合併症によって死亡したマウスもいなかったことから、本研究の目的に合致する適切なモデルであったと考えられる。大腸癌株である Colon 26 細胞は、BALB/c マウスの直腸内に N-nitroso-N-methyl-urethane を反復投与することによって発生した大腸癌細胞であり、高い肝転移率を示すことが知られている<sup>55)</sup>。

本研究では Colon 26 に高強度発光遺伝子(Nano-lantern)を組み込み、生体内で発光させ、癌の発育増殖を観察した。今回使用した IVIS imaging system では腫瘍体積と光の強さには強い相関関係が認められており、腫瘍体積を光の強さに変換した相対的な値による定量が可能である<sup>56)</sup>。そこで経時的に光量を測定し



たところ、門脈内投与後 7, 14 日目ともに対照群に比してトレランス群で有意に低く、腫瘍の増大が抑制されていることが示唆された。14 日目の肝重量はトレランス群で有意に軽く、腫瘍増大による肝腫大が抑制されており、生存時間解析でも有意に予後が延長することが示された。その機序として、肝単核球の中でも特に抗腫瘍免疫の主体である NK 細胞及び NKT 細胞に注目して免疫細胞分画を測定したところ、NK 細胞、NKT 細胞いずれもが比率、実細胞数ともに増加していた。また NK 細胞、NKT 細胞いずれにおいても Perforin 及び Granzyme B の発現が亢進していることが示された。興味深いことに、これらの細胞において Perforin/Granzyme 系が亢進しているにもかかわらず、IFN- $\gamma$  の産生は亢進しておらず、むしろ抑制されていた。

通常、NK 細胞は特異抗原を認識するのではなく、自己 MHC class I の発現量が低下或いは消失した細胞を傷害する。NK 細胞は標的細胞に直接接着し、細胞傷害性物質として主に Perforin や Granzyme を使用する。NK 細胞が活性化することにより、IFN- $\gamma$  などのサイトカインが産生される<sup>56)</sup>。また、マクロファージが産生した IL-12 により NKT 細胞は活性化する。抗原提示細胞上の CD1d 分子に提示された  $\alpha$ Galcer/CD1d 複合体は、NKT 細胞の  $V\alpha 24^+V\beta 11^+$  抗原受容体によって認識される。活性化された NKT 細胞は、Perforin/Granzyme 系や Fas/FasL 系で直接標的細胞を傷害するほか、大量の IFN- $\gamma$  産生により NK 細胞や cytotoxic

lymphocyte (CTL)を活性化する<sup>58,59)</sup>。このように NK 細胞、NKT 細胞が活性化するうえで、IFN- $\gamma$  は非常に重要な役割を果たす。しかし、本研究では LPS トレランスマウスの NK 細胞、NKT 細胞どちらにおいても IFN- $\gamma$  の産生は亢進していなかった。また、LPS トレランスでは血清中 IFN- $\gamma$  は著明に抑制されること<sup>14)</sup>やマクロファージの IL-12 の産生も抑制されることがわかっており<sup>60)</sup>、通常とは異なるメカニズムにより NK 細胞及び NKT 細胞、さらに Perforin/Granzyme 系が亢進しているものと考えられた。しかし、その詳細については本研究では明らかにすることができなかった。

また、マウス大腸癌株 Colon 26 との共培養の結果からも、LPS トレランスを誘導したマウスの肝単核球において抗腫瘍活性が亢進していることが確認された。LPS トレランスは T 細胞及び B 細胞非依存性であり<sup>61)</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 細胞は増加しないということがわかっている<sup>62)</sup>。今回のデータでも肝、脾のいずれにおいても NK 細胞、NKT 細胞を除いた単核球数については、トレランス群でも増加が見られなかった。これらの知見から、LPS トレランスマウスの肝においては、極微量の LPS 刺激に伴う何らかの機序で NK 細胞及び NKT 細胞が増加し活性化することにより、Perforin/Granzyme 系が亢進した結果、抗腫瘍活性が亢進しているものと考えられる。

興味深いことに、肝で見られたような単核球の反応は脾臓においても見られ

たが、肝ほど顕著ではなかった。なぜこのような差が生じたのかははっきりしないが、肝臓では脾臓に比べて NK 細胞や NKT 細胞が豊富に存在すること、腹腔内に投与した LPS が経門脈的に最初に肝臓に到達することなどが影響しているかもしれない。脾摘後のヒトにおいても LPS トレランスは誘導されたという報告もあり<sup>63)</sup>、トレランスは肝及び末梢血を中心に生じる反応である可能性はある。本研究では肝転移モデルについて検討したが、全身転移に対してどのような影響が生じるのかは、今後の検討課題である。

本研究では、LPS トレランス誘導マウスの肝臓において抗腫瘍活性が亢進していることを示したが、これまでの知見と合わせると、LPS トレランスを計画された侵襲である外科手術の周術期に誘導することが有用であると考えられる。近年腹腔鏡手術の導入など、手術の低侵襲化が進む一方で、化学療法やデバイス等の進化により、血管合併切除など高度な侵襲を伴う手術や高齢者に対する手術も積極的に行われるようになった。こういった高度の侵襲においては、依然として術後合併症が高頻度に見られる。消化器悪性腫瘍に関しては、大腸を始めとして<sup>64)</sup>、胃や食道、さらに肝臓など<sup>65,66)</sup> 様々な臓器において術後の感染性合併症が予後を悪化させると報告されており、周術期合併症の頻度を減少させることは、入院期間の短縮や医療費削減だけではなく、予後の改善の観点からも重要な課題である。Matsumoto らは、盲腸結紮穿刺モデルを用いて、感染性

合併症を発症すると肝 NK 細胞が減少し、細胞傷害活性が低下することにより肝転移形成が促進されることを示した<sup>67)</sup>。手術の悪影響の一つである、いわゆる手術操作による腫瘍の揉み出し、術中散布については多くの癌種で報告があり、血液中の腫瘍細胞数、mRNA、腹水中の細胞診などの測定により、手術中に癌細胞が散布されていることが示されている<sup>68-71)</sup>。また、そのような事実が明らかになる以前から、仮説に基づいて癌病巣からのドレナージ静脈を先行して処理する手技は No-touch isolation 法と呼ばれ、実臨床で定着している<sup>72-74)</sup>。

No-touch isolation 法が予後に与える影響に関しては、1980 年代に大腸癌患者を対象として、従来の腫瘍部位、腸管剥離を先行する方法と比較したランダム化試験が行われており、全生存を延長し、肝再発を減らす傾向が示された<sup>75)</sup>。現在国内でも、大腸癌手術におけるより大規模のランダム化比較試験(JCOG1006)が進行中である。

また、術後早期の炎症反応が遺残癌細胞の増殖を促進している可能性がある。手術による炎症性サイトカインの増殖は通常数日で軽快するため、炎症反応が長期的な癌細胞の増殖や再発に関わっているというよりは、揉み出された浮遊腫瘍細胞の生着、すなわち転移形成の最初の部分に関わっていると言われている<sup>76)</sup>。手術侵襲によって血管内皮の E-セレクトインの発現が増強しており、炎症によって Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、ケモカインレセプターと

いった多くの血管内皮の接着分子は発現増強、もしくは活性化されており、癌細胞が生着しやすい状況になっていると考えられている。さらに Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1)、PD-L2 といった免疫抑制性の分子は炎症反応の増強に伴い発現が増加するが、末梢の免疫抑制が癌細胞の生着を促進している可能性も考えられる。周術期に LPS トレランスを誘導できれば、炎症反応の抑制と亢進した抗腫瘍活性により、新たな転移形成を抑制できる可能性がある。さらに近年、循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cells; CTC)が転移の前段階と考えられ、予後の予測マーカーとして注目を集めているが<sup>77)</sup>、LPS トレランスを誘導させることで、これらを減少させることができるかもしれない。

これまでの知見から、LPS トレランスにおいては炎症反応が抑制され、いわゆる anergy のような状態にありながら、様々な侵襲に対して耐性を持つことに加えて貪食細胞の殺菌活性が増強しており、特に肝で抗腫瘍活性が亢進していると考えられた。しかし一方で、炎症性サイトカインによる細胞間のネットワークは減弱しているとも言える。LPS トレランスでは生体内に進入してきた LPS に対して、過剰なサイトカイン産生によるサイトカインストームやそれによる臓器障害から生体を防御し、代償的に各免疫担当細胞の直接的な細胞傷害活性が亢進しているのではないかと推察された。

一方でさらに検討すべき事項も残されている。LPS トレランスによって NK 細

胞、NKT 細胞が活性化する機序、IFN- $\gamma$  が抑制されるにも関わらず Perforin/Granzyme 系が亢進する機序の詳細については、今後の検討課題である。

また、臨床応用を考えるうえで、すでに担癌状態にあるモデルにおいての LPS トレランスの誘導についても検討する必要がある。ヒトでは LPS に対する感受性がより高いとの報告もあり<sup>14)</sup>、安全性に関する十分な検討も必要と考える。

本研究では、LPS トレランスマウスの肝において NK 細胞、NKT 細胞が増加し活性化することで、Perforin/Granzyme 系の発現を増強して抗腫瘍活性を亢進していることを明らかにした。LPS トレランスにおける NK 細胞、NKT 細胞の機能のみならず抗腫瘍活性についての検討は、これが初めてのものである。健康人ボランティアによるヒト末梢血を用いた研究では、LPS トレランスは少なくとも 5 日間ほど持続し、各免疫細胞の機能は 1 週間以降次第に回復するといことがわかっている<sup>31)</sup>。消化器外科手術は、およそ術後数日から 1 週間が急性期で様々な合併症が起こりうる期間であり、この点からも周術期に LPS トレランスを誘導することは有意義であると考えられる。LPS トレランスが生じるメカニズムの詳細解明にはまだ今後の検討を必要とするが、外科手術の周術期に適切に、安全にトレランスを誘導できれば、手術侵襲の軽減、感染性合併症の予防、さらには新たな転移形成が抑制できる可能性があり、周術期管理への応用が期待される。

## 第5章 結論

LPS トレランスを誘導したマウスでは、特に肝臓において細胞性免疫を担当する単核球が増加しており、中でも NK 細胞及び NKT 細胞は活性化して増加しており、Perforin/Granzyme 系の発現が増加し、抗腫瘍活性が亢進していることを明らかにした。抗腫瘍活性が亢進していることを *in vitro* で示し、さらに *in vivo* で LPS トレランスを誘導すると大腸癌肝転移モデルの予後が延長することを示した。しかし細胞の活性化や炎症の誘導に重要な役割を果たす IFN- $\gamma$  の産生は亢進しておらず、通常 NK 細胞や NKT 細胞が活性化するメカニズムと異なる経路が存在することが示唆された。

LPS トレランスを外科手術の周術期に適切に、安全に誘導することができれば、手術侵襲の軽減、感染性合併症の予防、さらに新たな転移形成を抑制できる可能性がある。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました防衛医科大学校外科学講座の田口眞一教授ならびに元防衛医科大学校外科学講座（現新東京病院副院長）山本順司教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始直接御指導、御教示いただきました防衛医科大学校免疫・微生物学講座の木下学准教授ならびに実験的御指導をいただきました防衛医科大学校分子生体制御学講座の守本祐司教授に深く感謝いたします。また防衛医科大学校研究センター外傷研究部門の齋藤大蔵教授を始め、多岐にわたりご協力をいただきました防衛医科大学校研究センター外傷研究部門及び外科学講座の諸先生方に心より感謝いたします。

本研究の主旨は、第 117 回日本外科学会定期学術集会等において発表した。



## 引用文献

1. Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Seki S. Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J Leukoc Biol.* 2013;93(5):689-98.
2. ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-74.
3. Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest.* 1991;21(6):559-73.
4. Beeson PB. Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946;61:248-50.
5. Greisman SE, Young EJ, Carozza FA Jr. Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. *J Immunol.* 1969;103(6):1223-36.
6. Neter E. Endotoxins and the immune response. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1969;47:82-124.
7. Brooke MS. Conversion of immunological paralysis to immunity by endotoxin.

Nature. 1965;206(984):635-6.

8. Berry LJ, Smythe DS. Some metabolic aspects of tolerance to bacterial endotoxin. *J Bacteriol.* 1965;90(4):970-7.
9. Michael A. West, MD, PhD; Wyrta Heagy, PhD. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med.* 2002;30(1)(Suppl.):s64-73.
10. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 2009;30(10):475-87.
11. López-Collazo E, del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care.* 2013;17(6):242.
12. Cavaillon JM. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon.* 2017;S0041-0101(17):30313-6.
13. Murphey ED, Fang G, Sherwood ER. Endotoxin pretreatment improves bacterial clearance and decreases mortality in mice challenged with *Staphylococcus aureus*. *Shock.* 2008;29(4):512-8.
14. Kinoshita M, Miyazaki H, Nakashima H, Nakashima M, Nishikawa M, Ishikiriyama T, et al. In vivo Lipopolysaccharide tolerance recruits CD11b+ macrophages to the liver with enhanced bactericidal activity and low tumor necrosis factor-releasing capability, resulting in drastic resistance to lethal septicemia. *J Innate*

Immun. 2017;9(5):493-510.

15. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
16. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(1):5-11.
17. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1518(1-2):157-61.
18. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1522-6.
19. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol*. 2000;164(7):3476-9.
20. Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, Golenbock DT, Vogel SN. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol*.

2002;169(9):5209-16.

21. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):353-64.
22. Biswas SK, Tergaonkar V. Myeloid differentiation factor 88-independent Toll-like receptor pathway: Sustaining inflammation or promoting tolerance? *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(9):1582-92.
23. Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. *Immunol Rev.* 2009;227(1):5-8.
24. Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res.* 2004;10(2):71-84.
25. Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, Del Fresno C, Yamamoto M, et al. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol.* 2007;179(6):4083-92.
26. Murphy M, Xiong Y, Pattabiraman G, Qiu F, Medvedev AE. Pellino-1 positively regulates toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 signaling and is suppressed upon induction of endotoxin tolerance. *J Biol Chem.* 2015;290(31):19218-32.
27. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of

the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 2003;100(2):171-94.

28. Hatao F, Muroi M, Hiki N, Ogawa T, Mimura Y, Kaminishi M, et al. Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. *J Leukoc Biol.* 2004;76(4):904-8.
29. Nahid MA, Benso LM, Shin JD, Mehmet H, Hicks A, Ramadas RA. TLR4, TLR7/8 agonist-induced miR-146a promotes macrophage tolerance to MyD88-dependent TLR agonists. *J Leukoc Biol.* 2016 Aug;100(2):339-49.
30. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Matino D, Servillo G, Brunacci C, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature.* 2014;511(7508):184-90.
31. del Fresno C, García-Río F, Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Jurado T, et al. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol.* 2009;182(10):6494-507.
32. Draisma A, Pickkers P, Bouw MP, van der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit Care Med.* 2009(4):1261-7.
33. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohé J, Bienvenu J, et al. The

- anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett.* 2004;95(2):193-8.
34. Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res.* 2005;11(5):311-20.
  35. Wolk K, Döcke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 2000;96(1):218-23.
  36. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(6):446-58.
  37. López-Collazo E, Fuentes-Prior P, Arnalich F, del Fresno C. Pathophysiology of interleukin-1 receptor-associated kinase-M: implications in refractory state. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(3):237-44.
  38. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care.* 2006;10(5):233.
  39. León P, Redmond HP, Shou J, Daly JM. Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Arch Surg.* 1992;127(2):146-51.
  40. Rayhane N, Fitting C, Lortholary O, Dromer F, Cavaillon JM. Administration

of endotoxin associated with lipopolysaccharide tolerance protects mice against fungal infection. *Infect Immun.* 2000;68(6):3748-53.

41. Yang NB, Ni SL, Li SS, Zhang SN, Hu DP, Lu MQ. Endotoxin tolerance alleviates experimental acute liver failure via inhibition of high mobility group box 1. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):9062-71.

42. He K, Xia L, Zhang J. LPS ameliorates renal ischemia/reperfusion injury via Hsp27 up-regulation. *Int Urol Nephrol.* 2018;50(3):571-580.

43. Colletti LM, Remick DG, Campbell DA Jr. LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res.* 1994;57(3):337-43.

44. Nakasone M, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Kitagawa Y, Takahashi T, et al. Preconditioning by low dose LPS prevents subsequent LPS-induced severe liver injury via Nrf2 activation in mice. *Yonago Acta Med.* 2016;59(3):223-231.

45. Liu Y, Xie X, Xia LP, Lv H, Lou F, Ren Y, et al. Peripheral immune tolerance alleviates the intracranial lipopolysaccharide injection-induced neuroinflammation and protects the dopaminergic neurons from neuroinflammation-related neurotoxicity. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):223.

46. Jacob SP, Lakshmikanth CL, Chaithra VH, Kumari TR, Chen CH, McIntyre TM, et al. Lipopolysaccharide cross-tolerance delays platelet-activating factor-induced

sudden death in Swiss albino mice: Involvement of cyclooxygenase in cross-tolerance.

PLoS One. 2016;11(4):e0153282.

47. Stevens JR, McMillan RP, Resendes JT, Lloyd SK, Ali MM, Frisard MI, et al.

Acute low-dose endotoxin treatment results in improved whole-body glucose homeostasis in mice. *Metabolism*. 2017;68:150-162.

48. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A.

Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg*. 2001;92(5):1322-6.

49. Li Y, Wu S, Bai F. Molecular characterization of circulating tumor cells-from

bench to bedside. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;75:88-97.

50. Saito K, Chang YF, Horikawa K, Hatsugai N, Higuchi Y, Hashida M, et al.

Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat Commun*. 2012;3:1262.

51. Nishiyama Y1, Fuchimoto S, Orita K. Preventive and antiproliferative effects

of tumor necrosis factor against experimental hepatic metastases of mouse colon-26 tumor. *Jpn J Cancer Res*. 1989;80(4):366-72.

52. Tsujimoto H, Ono S, Matsumoto A, Kawabata T, Kinoshita M, Majima T, et al.



A critical role of CpG motifs in a murine peritonitis model by their binding to highly expressed toll-like receptor-9 on liver NKT cells. *J Hepatol.* 2006;45(6):836-43.

53. Stenström M, Sköld M, Andersson A, Cardell SL, et al. Natural killer T-cell populations in C57BL/6 and NK1.1 congenic BALB.NK mice-a novel thymic subset defined in BALB.NK mice. *Immunology.* 2005;114(3):336-45.

54. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(6):1131-5.

55. Corbett TH, Griswold DP Jr, Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM Jr. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res.* 1975;35(9):2434-9.

56. Lim E, Modi KD, Kim J. In vivo bioluminescent imaging of mammary tumors using IVIS spectrum. *J Vis Exp.* 2009;26:e1210.

57. Pahl J, Cerwenka A. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology.* 2017;222(1):11-20.

58. Nair S, Dhodapkar MV. Natural killer T cells in cancer immunotherapy. *Front*

Immunol. 2017;22;8:1178.

59. Krijgsman D, Hokland M, Kuppen PJK. The role of natural killer T cells in cancer-a phenotypical and functional approach. *Front Immunol.* 2018 Feb 27;9:367.
60. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol.* 2003;170(1):508-19.
61. Mengozzi M, Ghezzi P. Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. *Eur Cytokine Netw.* 1993;4(2):89-98
62. Ishiyama K, Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Irei T, et al. Induction of endotoxin tolerance inhibits alloimmune responses. *Transpl Immunol.* 2006;16(3-4):158-65.
63. Greisman SE, Hornick RB. The nature of endotoxin tolerance. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1975;86:43-50.
64. Varty PP, Linehan IP, Boulos PB. Intra-abdominal sepsis and survival after surgery for colorectal cancer. *Br J Surg.* 1994;81(6):915-8.
65. Hirai T, Yamashita Y, Mukaida H, Kuwahara M, Inoue H, Toge T. et al. Poor

prognosis in esophageal cancer patients with postoperative complications. Surg Today. 1998;28(6):576-9.

66. Ito H, Are C, Gonen M, D'Angelica M, Dematteo RP, Kemeny NE, et al. Effect of postoperative morbidity on long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. Ann Surg. 2008;247(6):994-1002.

67. Matsumoto Y, Tsujimoto H, Ono S, Shinomiya N, Miyazaki H, Hiraki S, et al. Abdominal infection suppresses the number and activity of intrahepatic natural killer cells and promotes tumor growth in a murine liver metastasis model. Ann Surg Oncol. 2016;23 Suppl 2:S257-65.

68. Engell HC. Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. Acta Chir Scand Suppl. 1955;201:1-70.

69. Moore GE, Sako K. The spread of carcinoma of the colon and rectum: a study of invasion of blood vessels, lymph nodes and the peritoneum by tumors cells. Dis Colon Rectum. 1959;2(1):92-7.

70. Bidard FC, Huguet F, Louvet C, Mineur L, Bouché O, Chibaudel B, et al. Circulating tumor cells in locally advanced pancreatic adenocarcinoma: the ancillary CirCe 07 study to the LAP 07 trial. Ann Oncol. 2013;24(8):2057-61.

71. Hoffmann K, Kerner C, Wilfert W, Mueller M, Thiery J, Hauss J, et al. Detection of disseminated pancreatic cells by amplification of cytokeratin-19 with quantitative RT-PCR in blood, bone marrow and peritoneal lavage of pancreatic carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2007;13(2):257-63.
72. Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg*. 1967;166(3):420-7.
73. Nakao A, Takagi H. Isolated pancreatectomy for pancreatic head carcinoma using catheter bypass of the portal vein. *Hepatogastroenterology*. 1993;40(5):426-9.
74. Barnes JP. Physiologic resection of the right colon. *Surg Gynecol Obstet*. 1952;94(6):722-6.
75. Wiggers T, Jeekel J, Arends JW, Brinkhorst AP, Kluck HM, Luyk CI, et al. No-touch isolation technique in colon cancer: a controlled prospective trial. *Br J Surg*. 1988;75(5):409-15.
76. Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, et al. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(13):4086-91.
77. Yap TA, Lorente D, Omlin A, Olmos D, de Bono JS. Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2553-68.

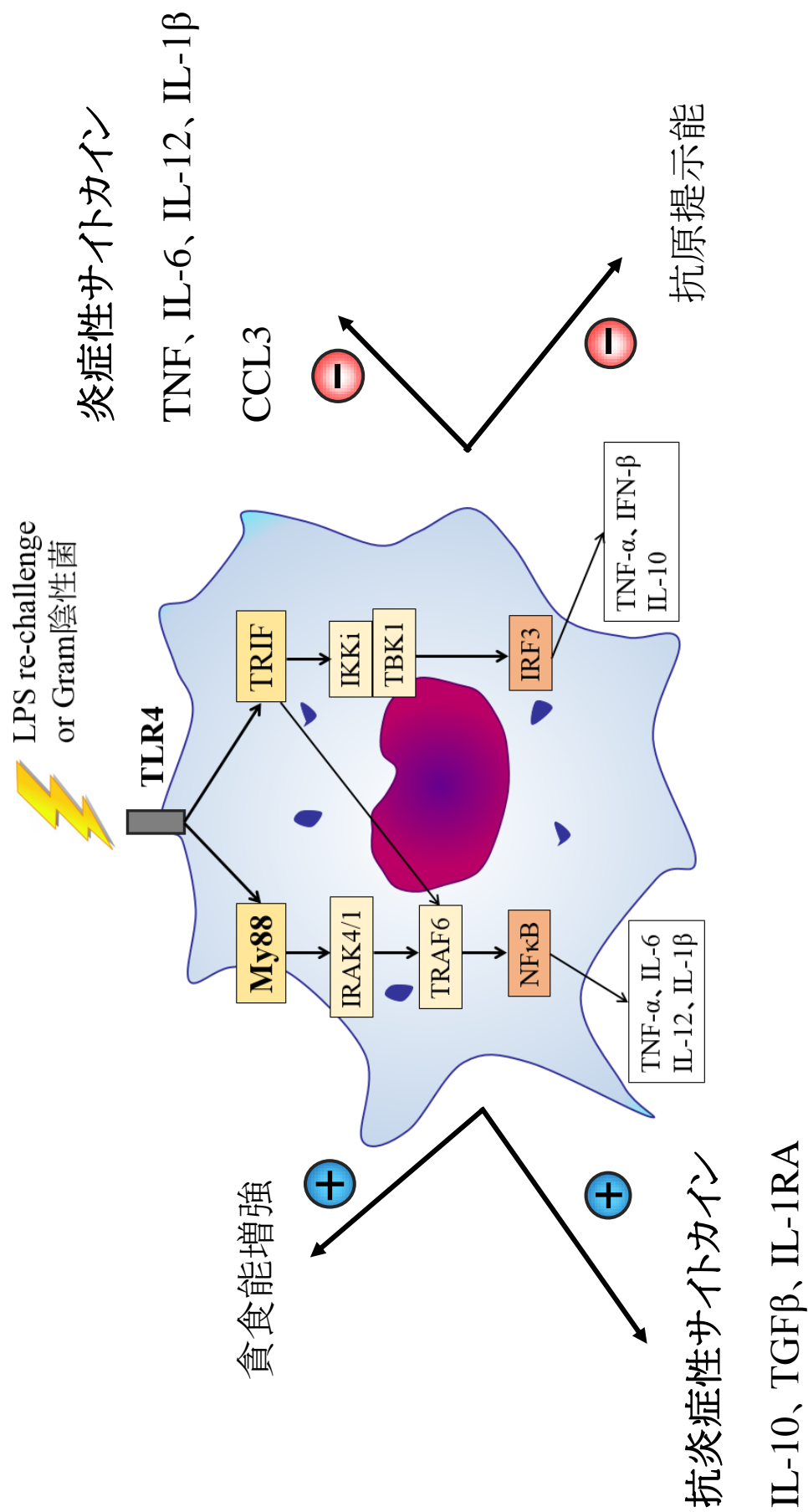
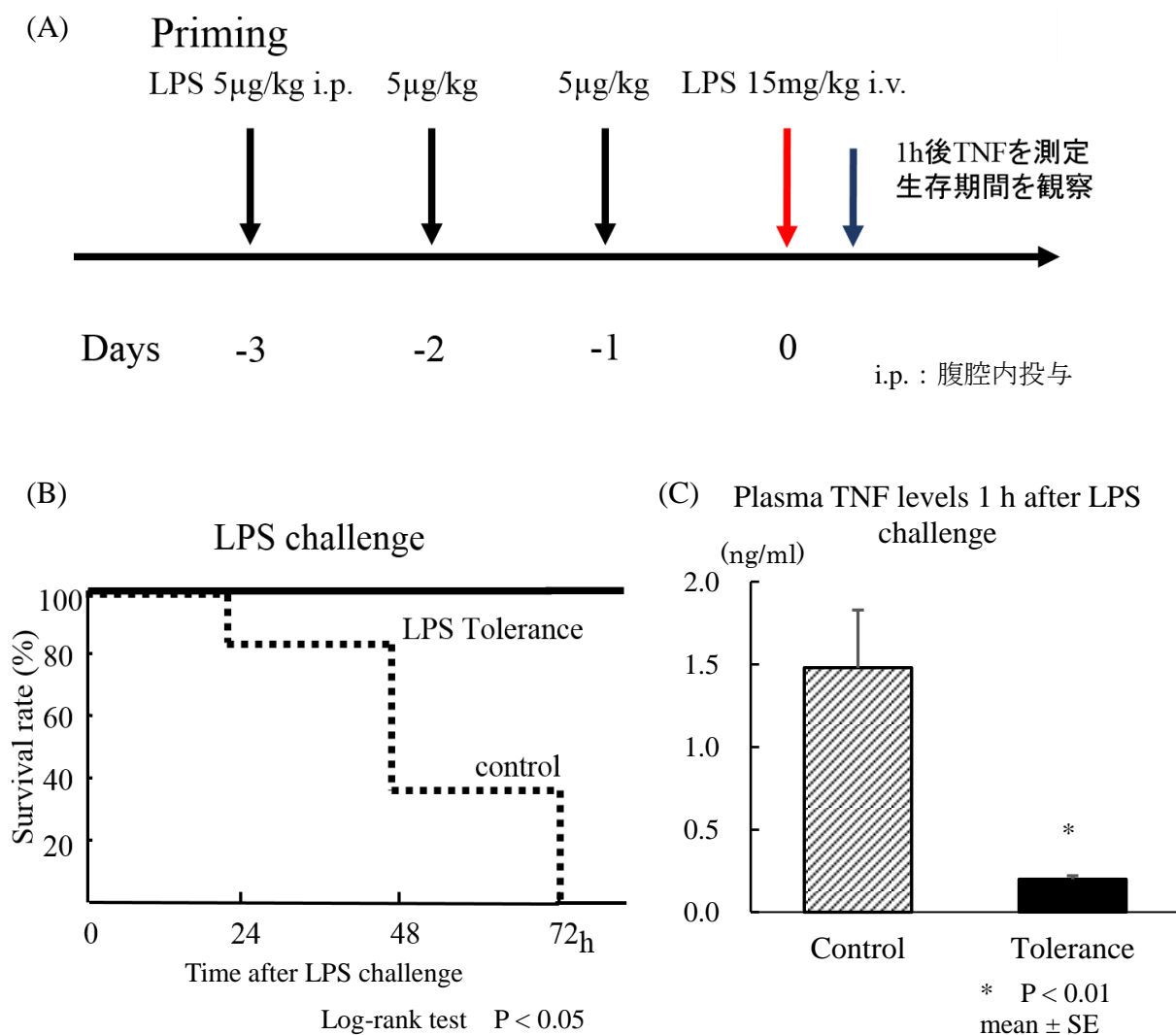
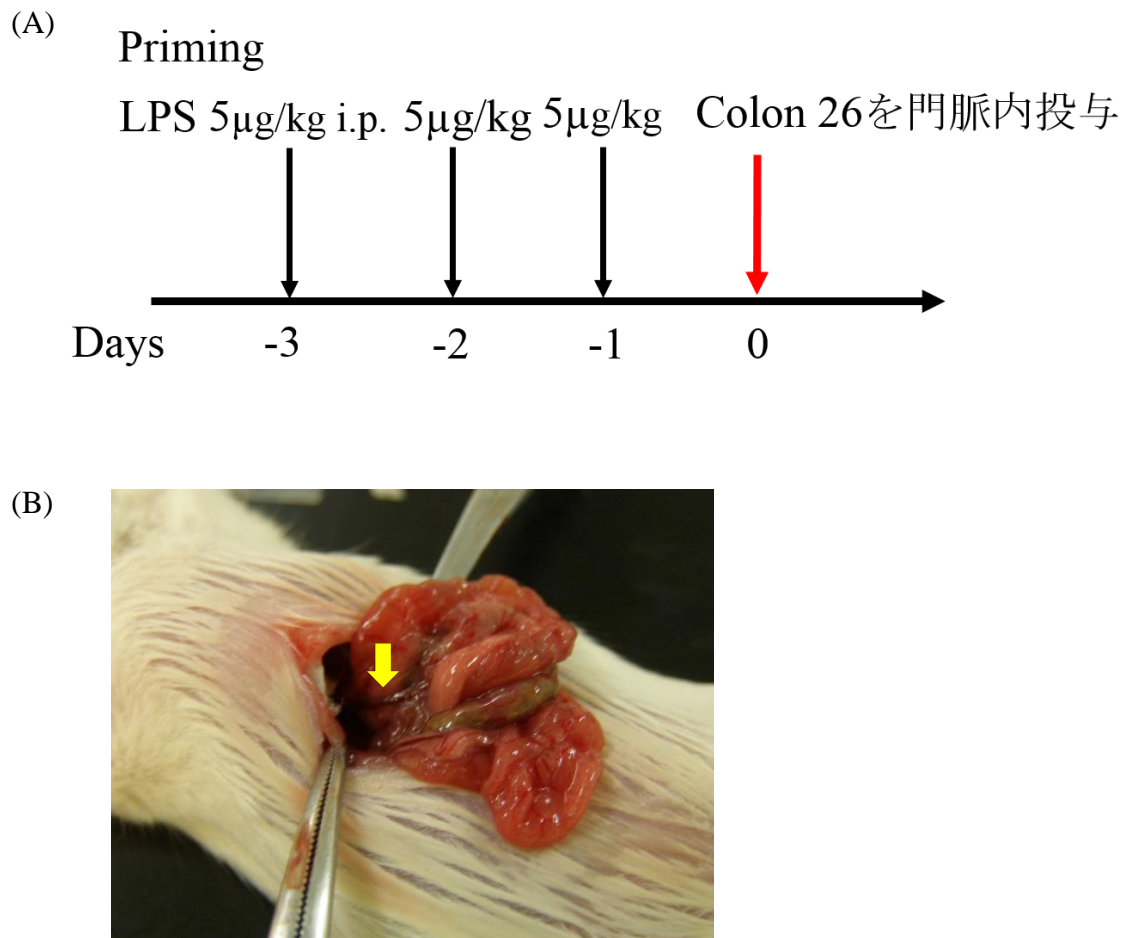


Figure 1 LPS トレランスに対するマクロファージにおける反応



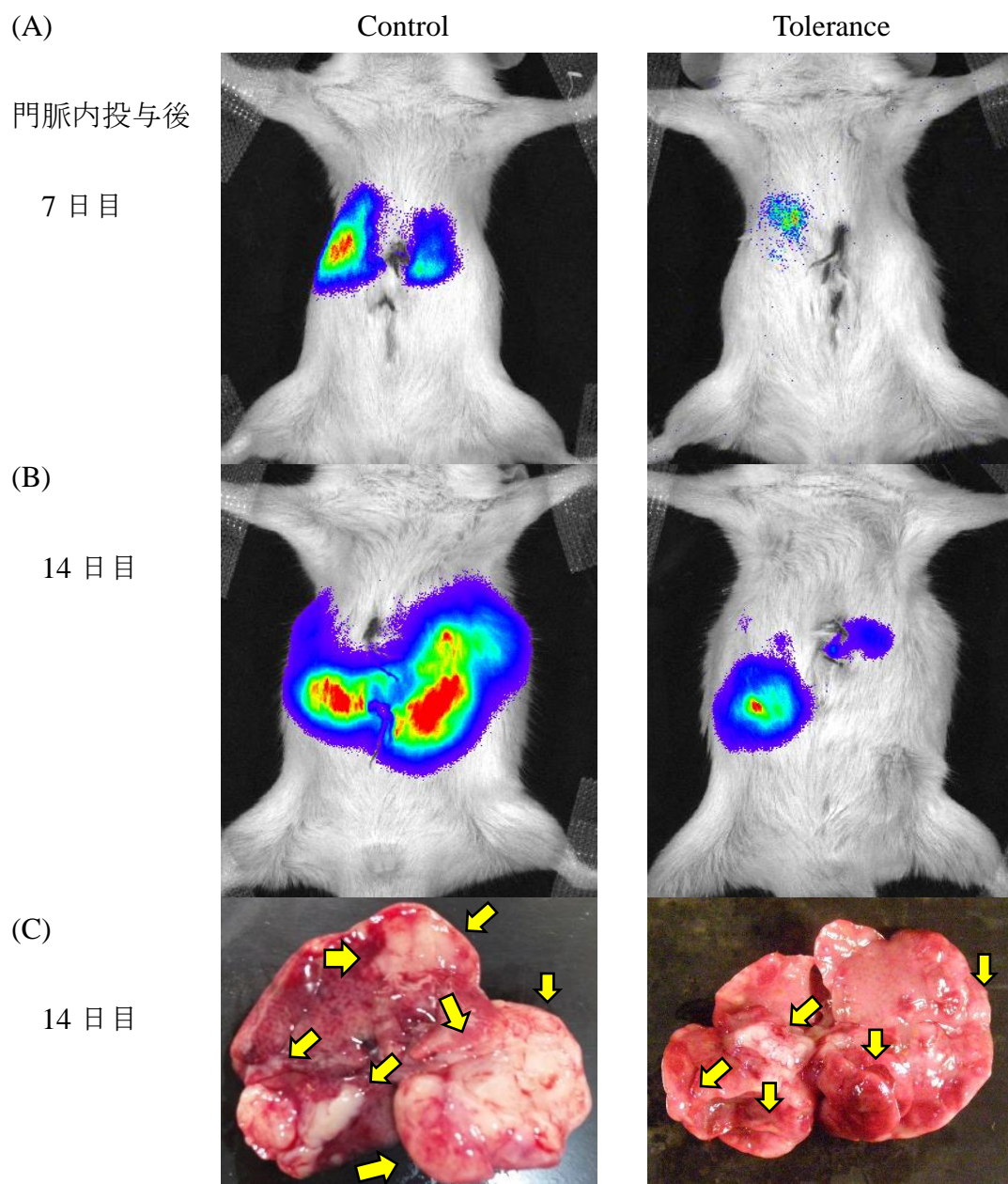
**Figure 2 LPS トランスモデルの作成**

(A) LPS 5 $\mu$ g/kg を 3 日間連続で腹腔内に投与してトランスを誘導した。その 1 日後に致死量の LPS (15 mg/kg) を経静脈的に投与した。(B) LPS トランスを誘導したマウスは致死量の LPS 投与に対して全例生存した (各群 n = 5)。(C) 致死量の LPS 投与 1 時間後の血漿中 TNF 濃度を示す。トランス群で有意に TNF の産生が抑制された (各群 n = 5)。



**Figure 3** 大腸癌肝転移モデルの作成

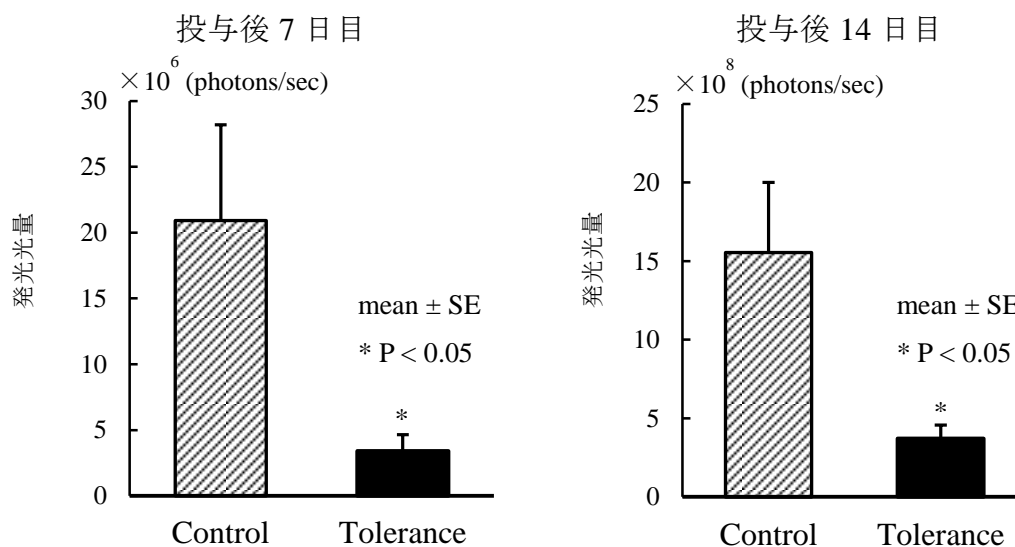
(A) LPS 5  $\mu$ g/kg を 3 日間連続で腹腔内に投与してトレランスを誘導した。大腸癌肝転移モデルは、その 1 日後に Colon 26 細胞  $1.0 \times 10^3$  cells を門脈内投与することにより作成した。(B) マウスに上腹部正中切開を加え、門脈内に Colon 26 を投与した。黄矢印は門脈を示す。



**Figure 4** IVIS imaging system で観察した肝転移形成状況

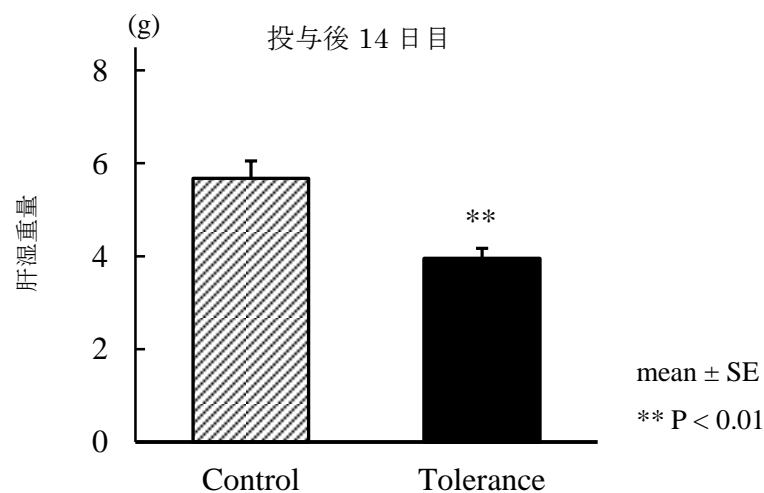
(A)(B)  $1.0 \times 10^3$  個の Colon 26 を門脈注射後 7 日目、14 日目に発光基質セレンテラジンを投与し、Colon 26 を発光させて IVIS で撮影した。トレランス群は発光がより弱い。(C) 14 日目に剖検し肝を摘出し、尾側から観察したところ。対照群では肝はほぼ腫瘍に置換されていた (黄矢印)。





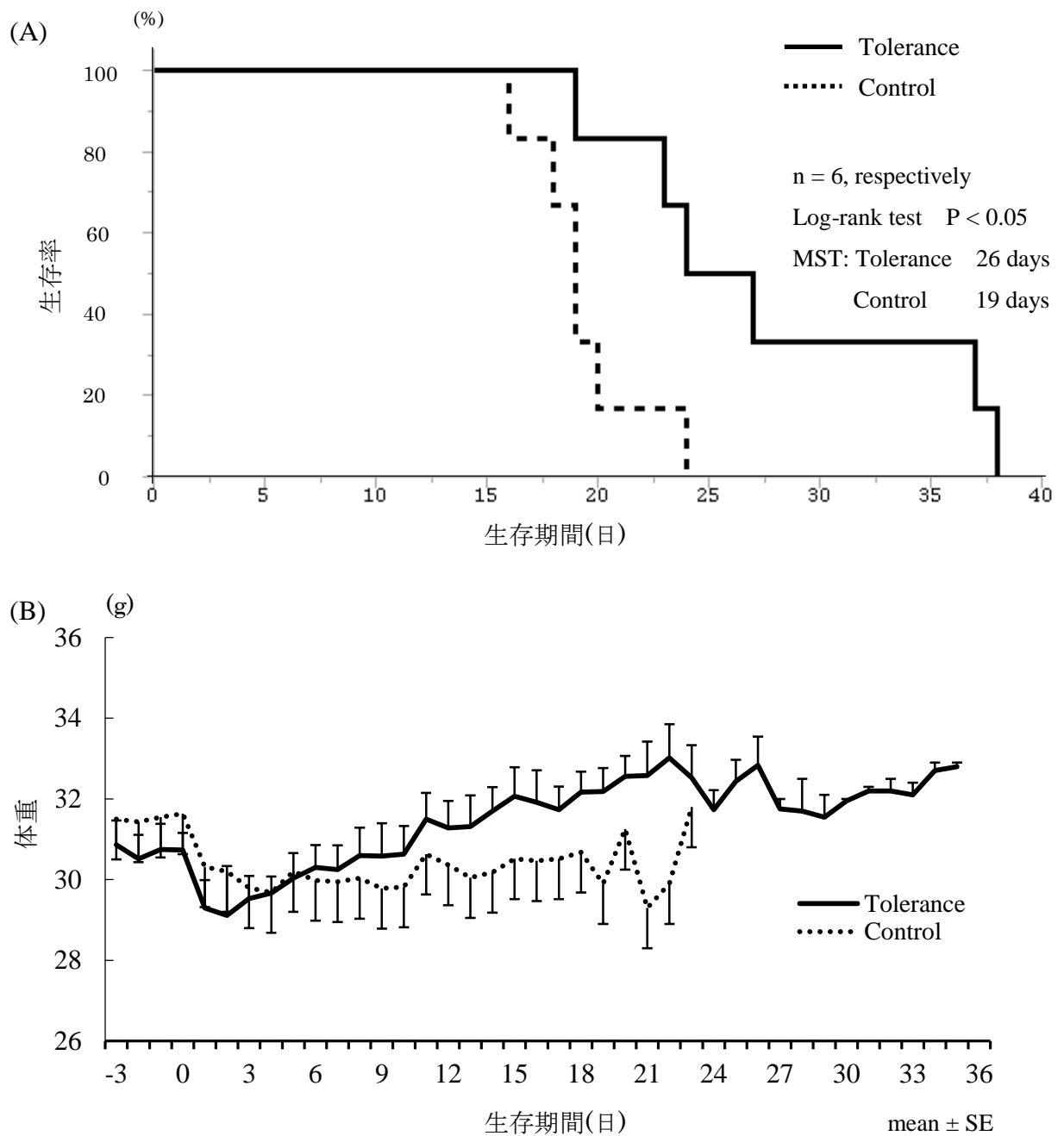
**Figure 5** Colon 26 門脈内投与後の光量の推移

Colon 26 門脈内投与後 7, 14 日目に IVIS imaging system を用いて光量を測定した。発光基質セレンテラジン h を投与後 4 分、露光 1 秒で撮影した。7, 14 日目ともにトレランス群では光量が有意に低値であった（各群  $n = 5$ ）。



**Figure 6** Colon 26 門脈内投与後 14 日目の肝重量

両群（各群  $n = 5$ ）とも腫瘍の増大により肝重量は著明に増加していたが、トレランス群で有意に増加が抑制された。

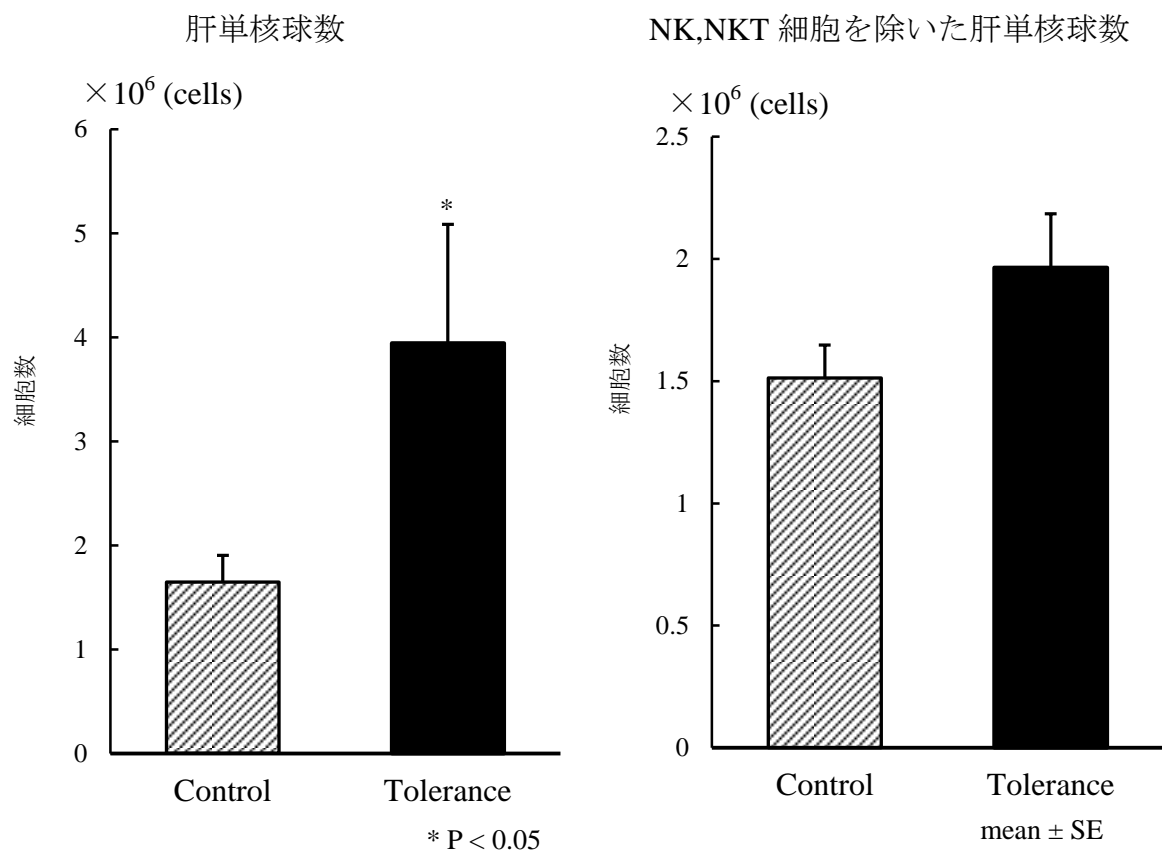


**Figure 7** 大腸癌肝転移モデルマウスの生存曲線

(A) 門脈内投与を 0 日として、トレランス群を実線、対照群を点線で示す。

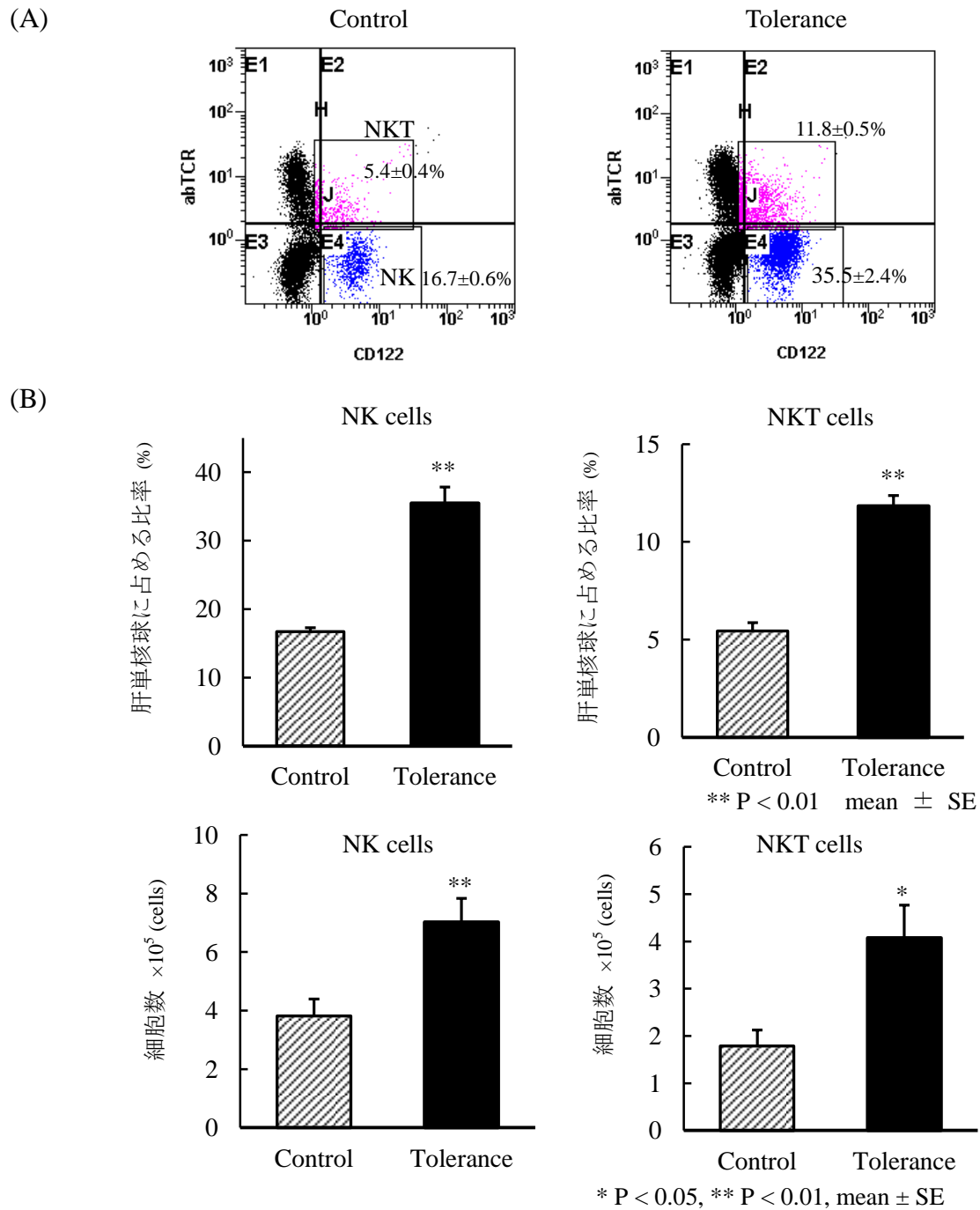
14 日過ぎまで死亡例なし。トレランス群は対照群に比較して有意に予後が延

長した。(B) 対照群では体重の回復なく死に至る例が多く見られた。



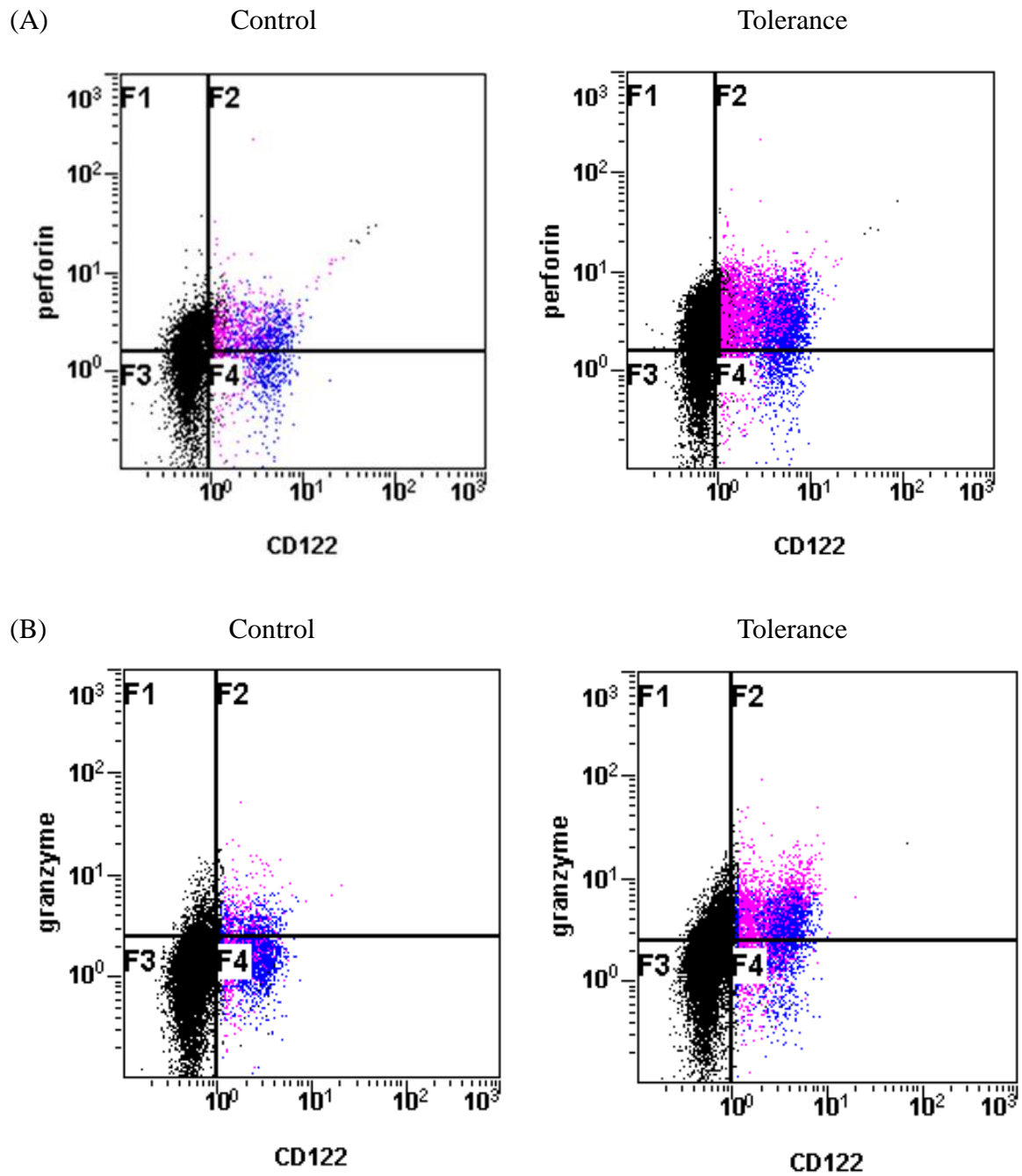
**Figure 8** 肝単核球数

肝単核球数はトレランス群(n = 4)で、対照群(n = 4)に比して有意に増加していた。NK 細胞、NKT 細胞を除く単核球数は両群に有意差を認めなかった。



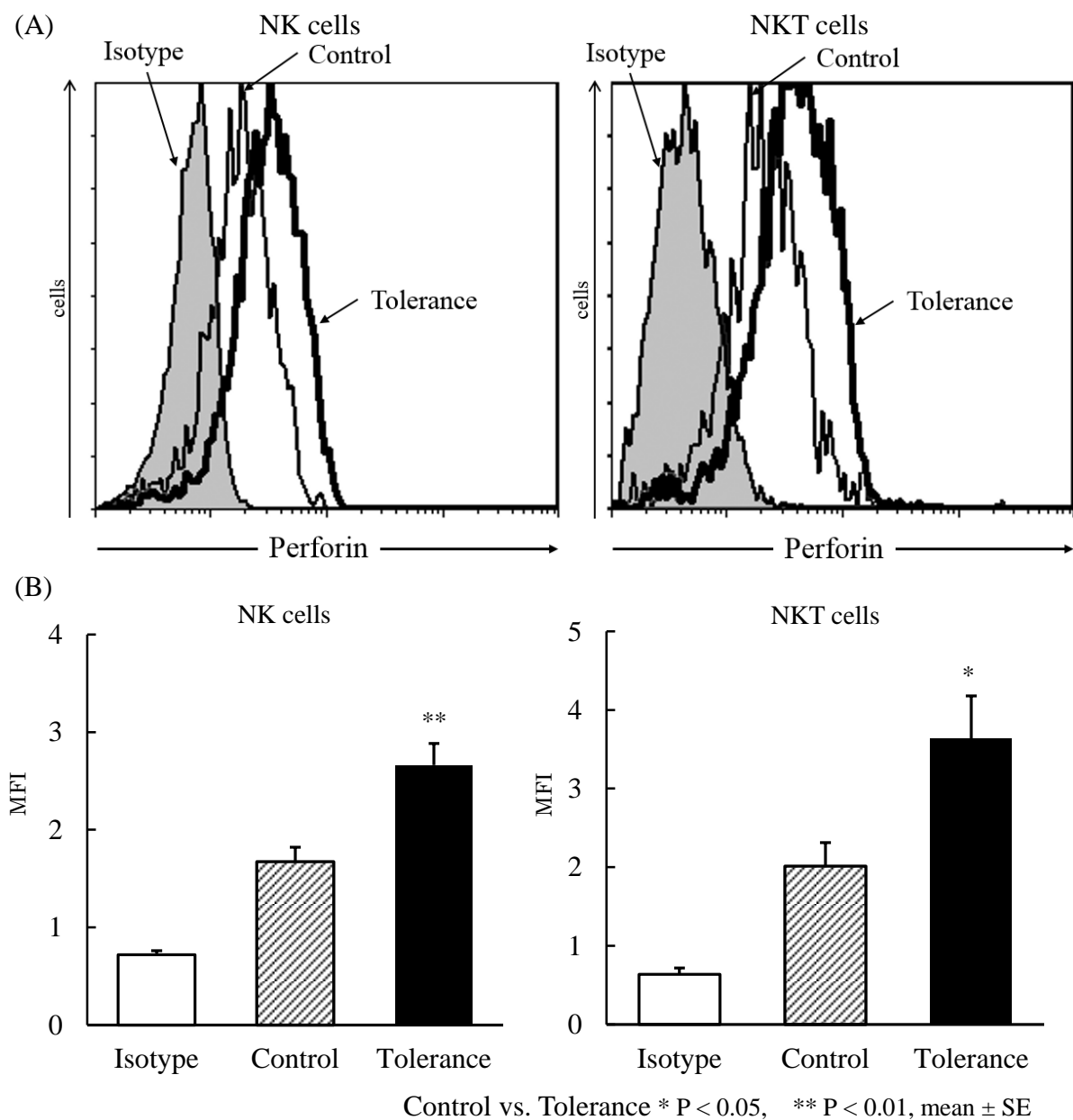
**Figure 9** 肝単核球における NK 細胞、NKT 細胞の分画

(A) 肝単核球の分画。(B)  $CD122^{+}\alpha\beta TCR^{-}$  の NK 細胞はトレランス群(n = 4)で対照群に比し、比率、実数とも有意に増加していた。 $CD122^{int}\alpha\beta TCR^{+}$  の NKT 細胞も同様にトレランス群(n = 4)で有意に増加していた。



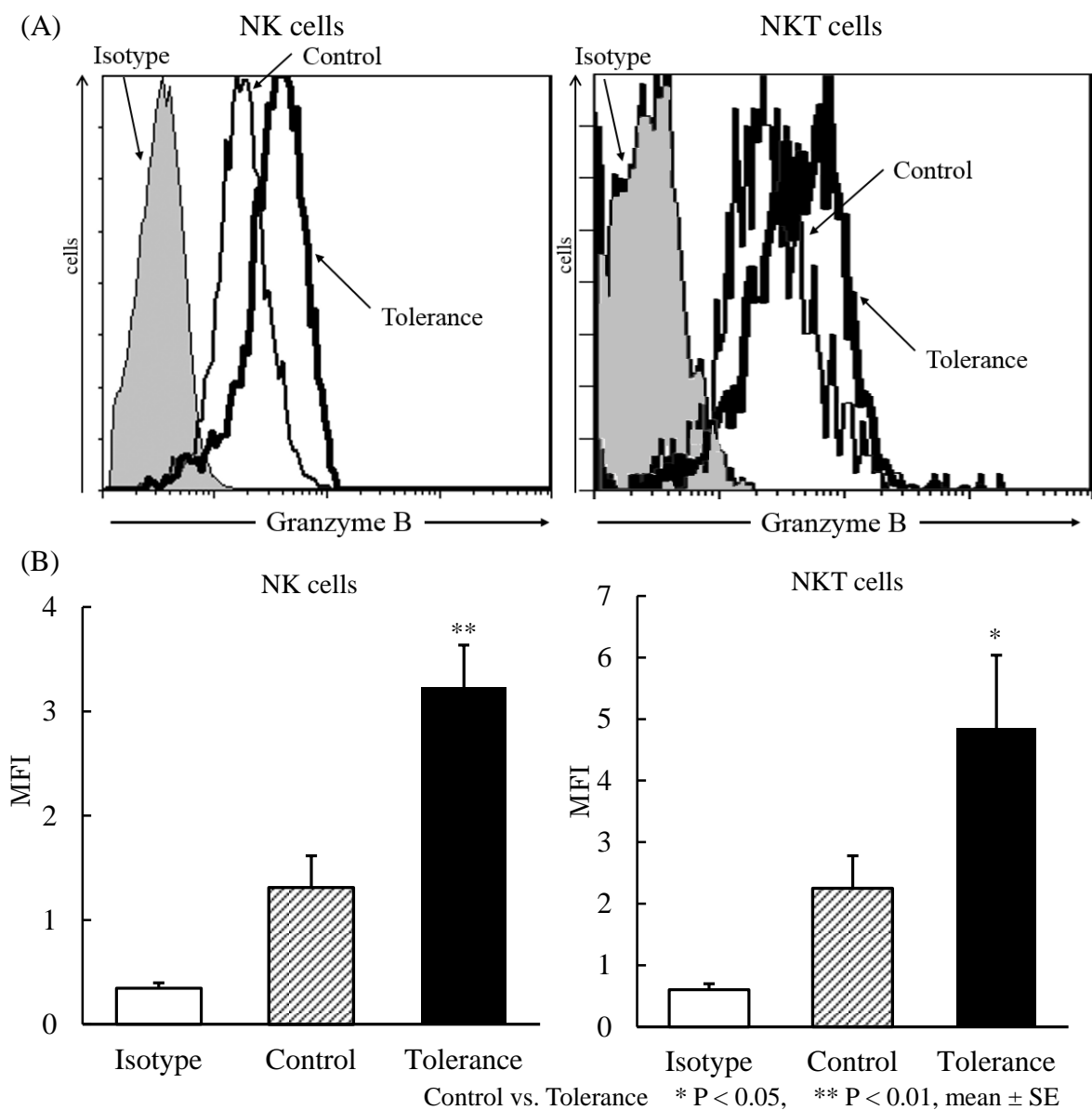
**Figure 10** 肝単核球の Perforin, Granzyme B 陽性細胞数の計測

X 軸に CD122、Y 軸に(A)は Perforin、(B)は Granzyme B を標識した肝単核球のフローサイトメトリーを示す。青が NK 細胞、赤が NKT 細胞の集団を示す。トランス群では Perforin、Granzyme B の発現が亢進している。



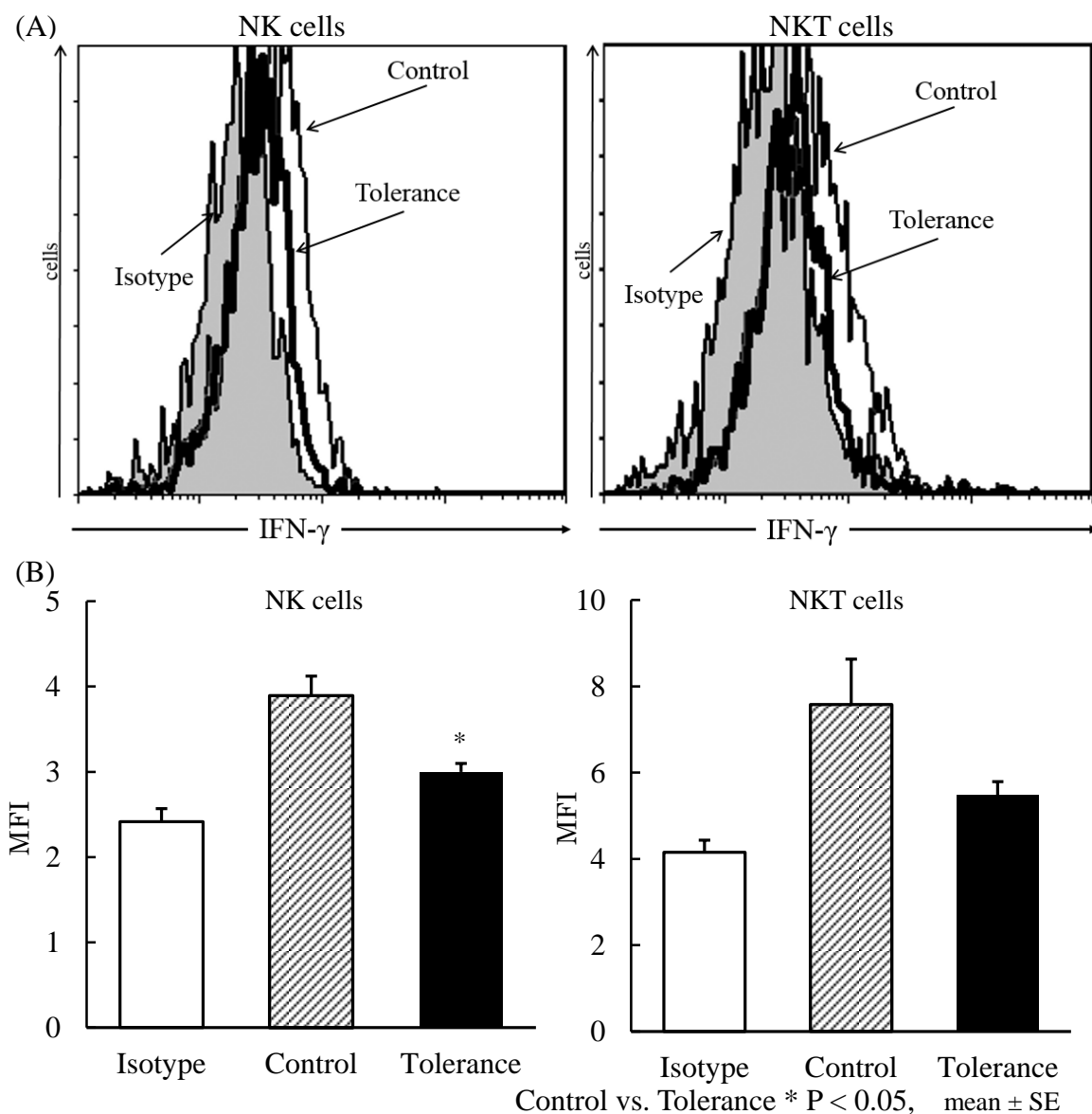
**Figure 11 肝 NK 細胞及び NKT 細胞における Perforin 活性**

(A) LPS トランスを誘導し、肝単核球の NK 細胞、NKT 細胞分画にゲートをかけ、Perforin の発現をヒストグラムで表した。灰色は Isotype、太実線がトランス群、細実線が対照群を示す。(B) Perforin 陽性細胞における MFI を示す。NK、NKT 細胞ともにトランス群は対照群に比して有意に高値を示した(各群  $n = 4$ )。



**Figure 12** 肝 NK 細胞及び NKT 細胞における Granzyme 活性

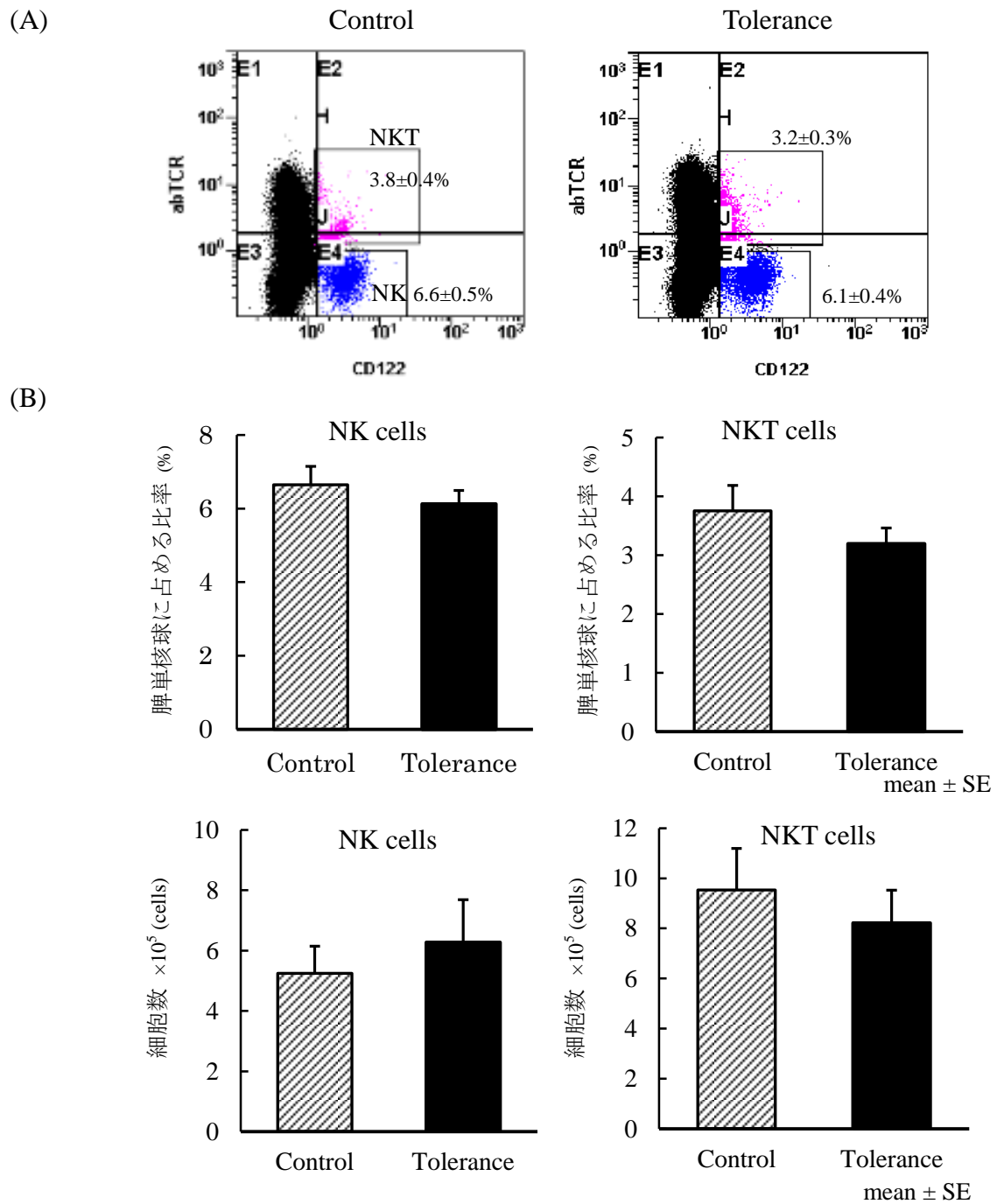
(A) LPS トランスを誘導し、肝単核球の NK 細胞、NKT 細胞分画にゲートをかけ、Granzyme B の発現をヒストグラムで表した。灰色は Isotype、太実線がトランス群を示す。(B) Granzyme B 陽性細胞における MFI を示す。NK、NKT 細胞ともにトランス群は対照群に比して有意に高値を示した (各群  $n = 4$ )。



**Figure 13** 肝 NK 細胞及び NKT 細胞における Interferon-gamma 活性

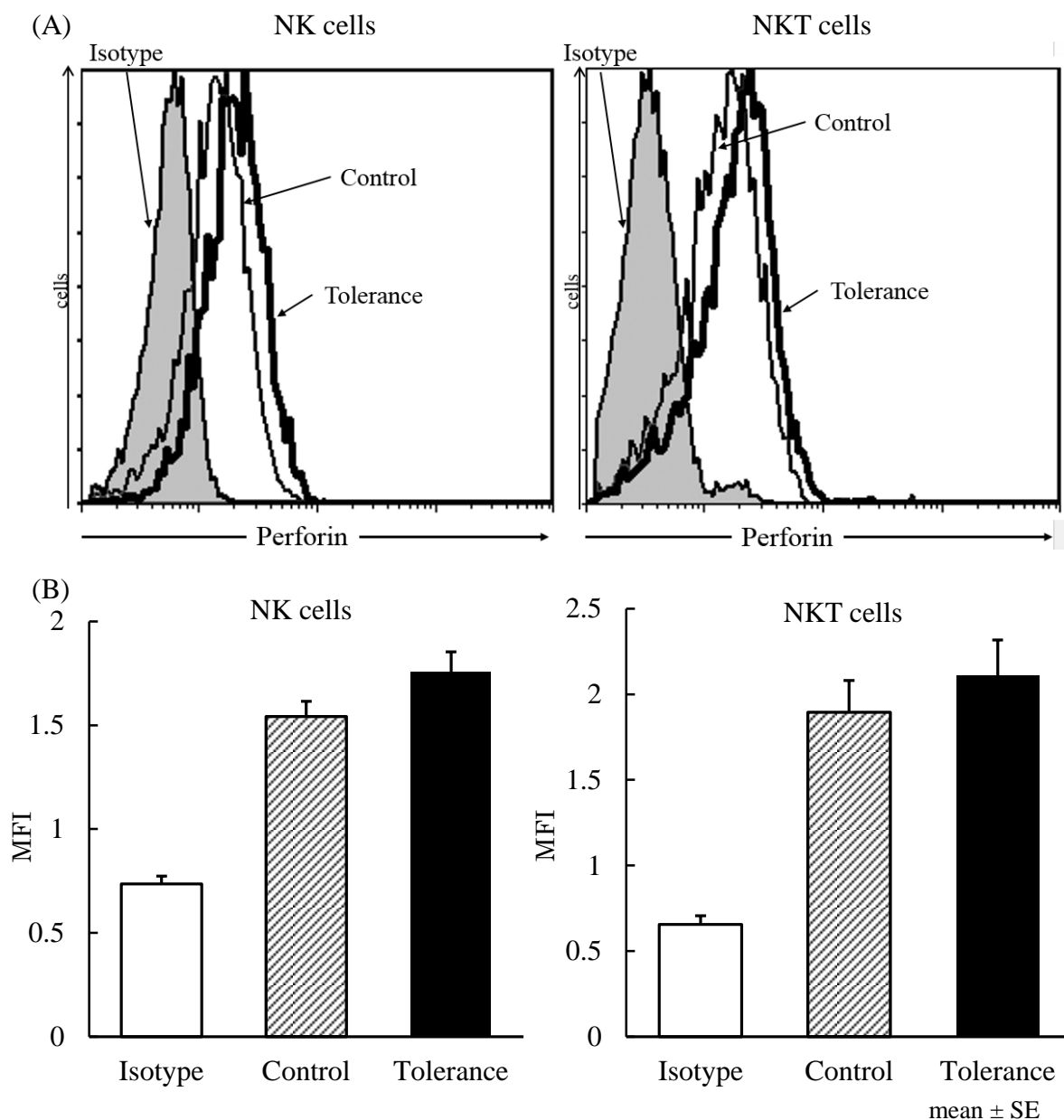
(A) LPS トランスを誘導し、肝単核球の NK 細胞、NKT 細胞分画にゲートをかけ、IFN- $\gamma$  の発現をヒストグラムで表した。灰色は Isotype、太実線がトランス群を示す。(B) IFN- $\gamma$  陽性細胞における MFI を示す。トランス群の NK 細胞では、IFN- $\gamma$  の発現が対照群に比し有意に抑制されていた (各群  $n = 4$ )。





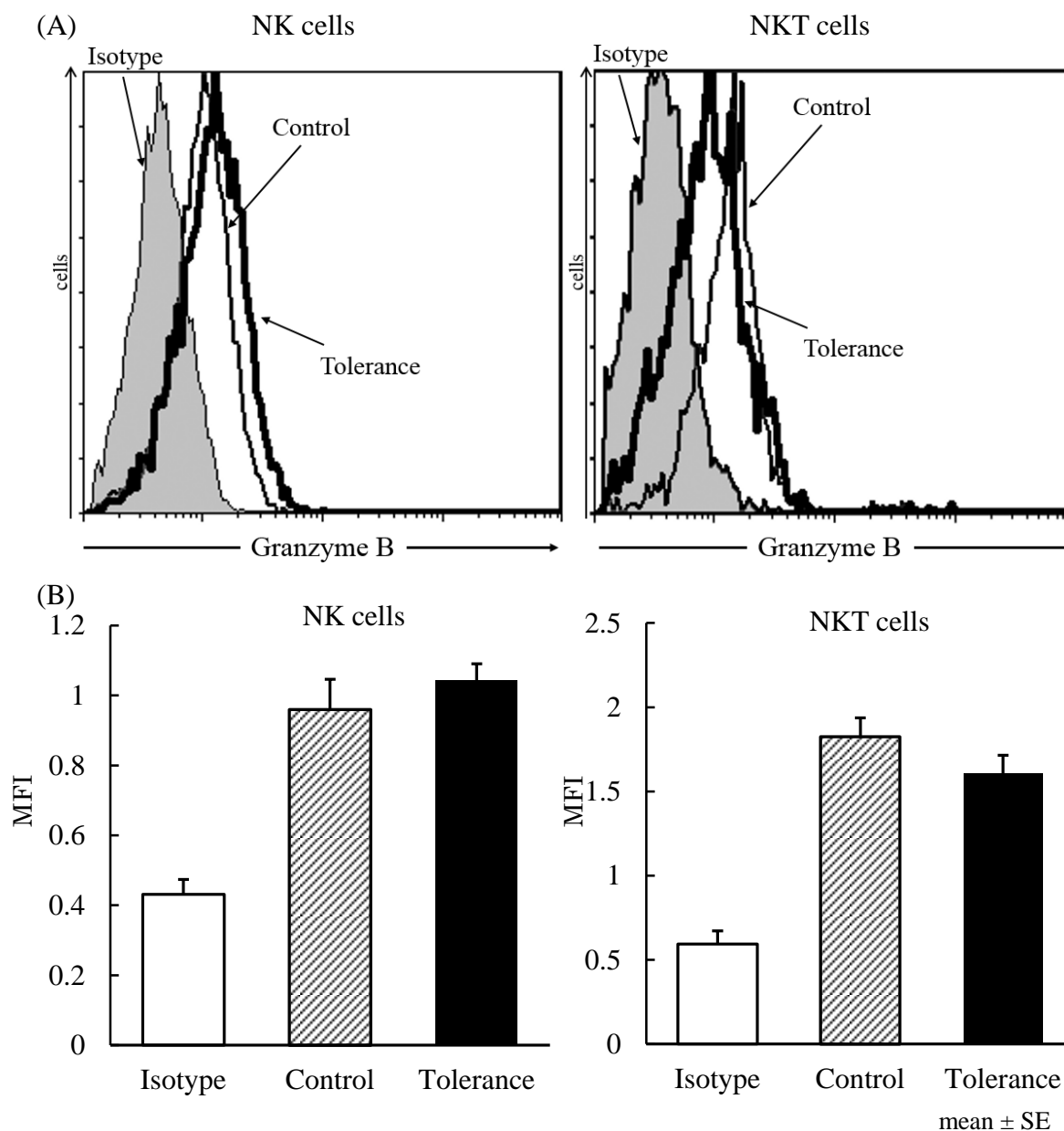
**Figure 14** 脾単核球における NK 細胞、NK 細胞の分画

(A) フローサイトメトリーで脾単核球の分画を測定した。(B)  $CD122^{+}\alpha\beta TCR^{-}$  の NK 細胞と  $CD122^{int}\alpha\beta TCR^{+}$  の NKT 細胞の比率は、両群間(各群 n = 4)に有意差を認めなかった。NK, NKT 細胞の実数にも差を認めなかった。



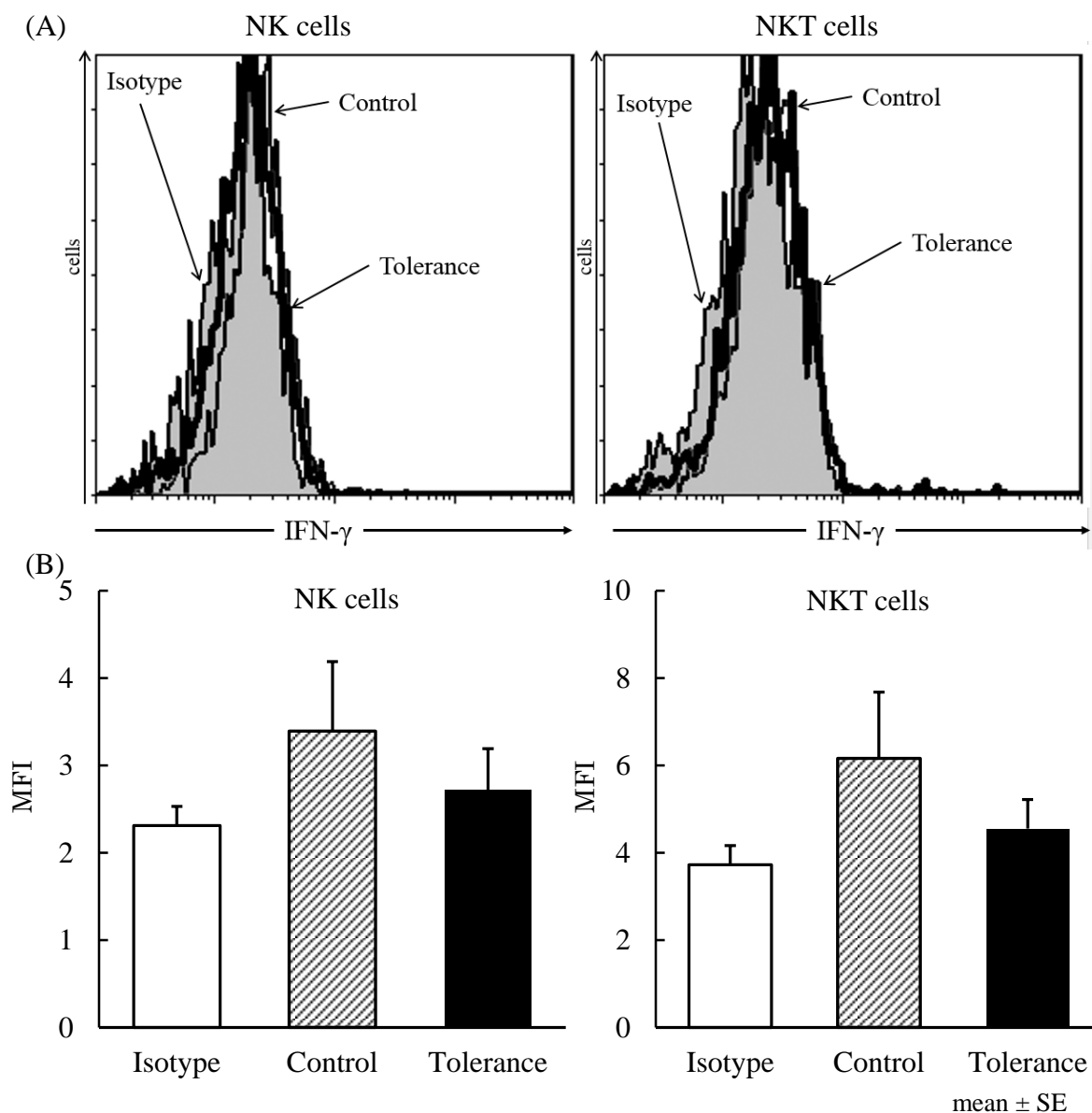
**Figure 15** 脾 NK 細胞及び NKT 細胞における Perforin 活性

(A) LPS トランスを誘導し、脾単核球において NK 細胞、NKT 細胞分画にゲートをかけ、Perforin の発現をヒストグラムで表した。灰色は Isotype、太実線がトランス群、細実線が対照群を示す。(B) Perforin 陽性細胞における MFI を示す。NK、NKT 細胞ともに両群間（各群  $n = 4$ ）に有意差を認めなかった。



**Figure 16** 脾 NK 細胞及び NKT 細胞における Granzyme 活性

(A) LPS トランスを誘導し、脾単核球において NK 細胞、NKT 細胞分画にゲートをかけ、Granzyme B の発現をヒストグラムで表した。灰色は Isotype、太実線がトランス群を示す。(B) Granzyme B 陽性細胞における MFI を示す。NK、NKT 細胞ともに両群間（各群  $n = 4$ ）に有意差を認めなかった。

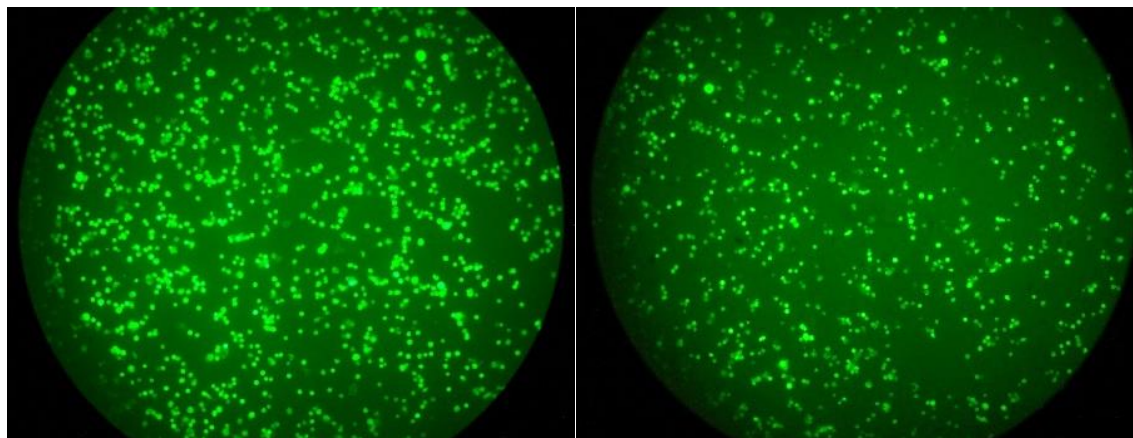


**Figure 17** 脾 NK 細胞及び NKT 細胞における IFN- $\gamma$  活性

(A) LPS トランスを誘導し、脾単核球の NK 細胞、NKT 細胞分画にゲートをかけ、IFN- $\gamma$  の発現をヒストグラムで表した。灰色は Isotype、太実線がトランス群を示す。(B) IFN- $\gamma$  陽性細胞における MFI を示す。トランス群と対照群の間に有意差はなかった (各群  $n = 4$ )。

Control

Tolerance



**Figure 18** 肝単核球の抗腫瘍活性

蛍光標識した Colon 26 細胞と肝単核球を共培養し、8 時間後に撮影した。トランス群では、対照群と比較して細胞傷害活性が亢進している。

