

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861413

研究課題名(和文) マクロファージとの相互作用を介した前立腺癌細胞の浸潤・転移促進機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of prostate cancer progression via the macrophage infiltration into prostate cancer microenvironment

研究代表者

泉 浩二 (IZUMI, Kouji)

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：80646787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン受容体シグナルの有無にかかわらず、高転移能を有する前立腺癌細胞はCCL2をより多く産生し、CCL2は前立腺癌細胞の転移能を亢進させるという悪循環が形成されている可能性が示唆された。CCL2はマクロファージの前立腺癌組織への浸潤を誘導し、マクロファージから分泌されるケモカインによってさらに前立腺癌細胞の転移能が亢進する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Human prostate cancer cells with high metastatic ability can secrete more CCL2 than those with low metastatic ability and CCL2 can induce prostate cancer cell migration, regardless of the presence of the suppression of androgen/androgen receptor signal. In addition, CCL2 induce the infiltration of macrophages into prostate cancer tissue, and then chemokines secreted by infiltrated macrophages can induce prostate cancer migration.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 転移 ケモカイン マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 限局性前立腺癌に対しては、手術療法や放射線治療などを行うことにより根治が望める。しかし、遠隔転移が存在するなど、進行前立腺癌にはアンドロゲン除去療法 (androgen-deprivation therapy, ADT) が行われるものの、いずれ去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) となり、根治が難しくなる。この CRPC に対する治療は昨今、残存するアンドロゲン受容体シグナルをターゲットとした新薬や、新規殺細胞性抗癌剤が発売されるなど進歩が認められ、生存期間の延長が報告されている^{1,2}。しかし、未だ根治を望めるものは存在しない。治療抵抗性となる詳細なメカニズムを明らかにし、それらをターゲットとするような新たな根治ができるような治療法が望まれている。

(2) 近年、癌組織に浸潤しているマクロファージ (tumor-associated macrophages, TAM) が各種癌の増悪に寄与していることが明らかになってきた。我々は以前、前立腺癌の増悪 (浸潤・転移) にもこの TAM が強く関与していることを明らかにした³。すなわち、アンドロゲン受容体シグナルがマクロファージの強力な遊走因子である CCL2 を制御しており、ADT の状況下ではこの制御が外れ、TAM の浸潤が促進されていることを報告した。本研究を計画するにあたり、TAM のマーカーとされている CCL17 や CCL22 などのケモカインが癌の増悪因子である可能性があるが、これらのケモカインと前立腺癌の増悪を関連付ける研究はほとんどなされていないことに注目した。

2. 研究の目的

(1) CRPC 患者の病理解剖前立腺標本では浸潤している TAM も増加していると報告されている⁴。しかしながら、CRPC となった癌細胞においては CCL2 が癌細胞の浸潤・転移能を高めていくことが報告されているが、TAM が高発現しているようなサイトカイン・ケモカインがどのような細胞間相互作用を介して癌細胞の浸潤・転移能を高めていくのかは未だ明らかにされていない。TAM マーカーとして様々な分子が報告されているが、分泌ケモカインとしては CCL17、CCL22 などが知られている。本研究ではまず、CCL2 がどのような状況下で産生されるのか、ADT を施行していない時でも前立腺癌の増悪を促進しているのかということと、CCL2 が TAM の CCL17 や CCL22 の分泌を誘導しているのかということを確認したいと考えた。

(2) CCL17、CCL22 などこれまでにほとんど前立腺癌領域において研究されていないケモカインが前立腺癌の増悪にどのように関わっているかは全くの未知である。これらのケモカインが前立腺癌細胞に作用するかどうか、すなわち、どのような前立腺癌細胞にどの程度、ケモカイン受容体が存在するのかを明らかにした上で、前立腺癌のどのような表現型に寄与しているのかを明らかにしたいと考えた。

か、すなわち、どのような前立腺癌細胞にどの程度、ケモカイン受容体が存在するのかを明らかにした上で、前立腺癌のどのような表現型に寄与しているのかを明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) アンドロゲン受容体を有するが去勢抵抗性を示すヒト前立腺癌細胞株 C4-2 を用いて、ADT を使用していない状況、つまり、アンドロゲン受容体シグナルが正常に作用している状況下で、CCL2 が前立腺癌にどのような作用を及ぼすかを遊走能試験にて検討した。そして、その CCL2 の影響のメカニズムを主に浸潤・転移の原因とされる上皮間葉移行に注目して、蛋白発現の変化をウェスタンブロットで検討した。

(2) 続いて、前立腺癌細胞株 C4-2 を用いて、C4-2 の高遊走能細胞と思われる細胞を選別、継代した (mig 細胞とする)。この選別は、遊走能試験を繰り返し、遊走した細胞を採取した。遊走能試験は、24-well transwell plate を用いて行った。前提として高遊走能を有する細胞は高転移能を有する細胞とみなした。この mig が本当に、高転移能を有するかどうか、遊走能試験を行って親細胞 (prt) と比較した。さらに、mig と prt の細胞の形態学的特徴も比較した。

(3) 実際に高転移能を有する mig が prt より CCL2 を分泌しているかどうかをそれぞれの培養上清を用いて、ELISA にて検討した。CCL2 を制御しているアンドロゲン受容体の変化も定量的 PCR 法で検討した。さらに、メカニズムについても主に上皮間葉移行に注目して、蛋白発現の変化をウェスタンブロットで検討した。アンドロゲン受容体の発現変化についてはウェスタンブロットでも行い、PCR と矛盾しないことを確認した。

(4) TAM から分泌されるケモカイン CCL17 と CCL22 の受容体である CCR4 がヒト前立腺癌細胞に発現しているかどうか検討した。アンドロゲン受容体の有無による違いをはっきりとさせるため、用いるヒト前立腺癌細胞株はアンドロゲン受容体を有するアンドロゲン感受性株 LNCaP とアンドロゲン受容体を有しないアンドロゲン非感受性株 PC3、DU145 とした。さらにこれらの細胞を用いて、CCL17 や CCL22 が実際に遊走能を亢進させることができるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) アンドロゲン受容体シグナルが正常に作用している状況下で、CCL2 はヒト前立腺癌細胞株 C4-2 の遊走能を約 2.8 倍促進させた。必要とする CCL2 の濃度は 10 ng/mL で十分であり、30 ng/mL 以上の濃度においても 10 ng/mL と同程度の遊走能の促進をもたらすに

留まった。アンドロゲン受容体シグナルが正常に作用している状況下で、CCL2 を前立腺癌細胞株 C4-2 に加えると、ウェスタンブロットにおいて、全 STAT3 の変化を伴わずにリン酸化された STAT3 の増加、つまり STAT3 の活性化と、上皮間葉移行マーカーである Snail の増加が認められた。逆に上皮マーカーである E-cadherin は低下した。これらのことから、アンドロゲン受容体シグナルが正常に作用している状況下で、CCL2 は前立腺癌細胞に遊走能の亢進をもたらし、そのメカニズムとして、癌細胞の上皮間葉移行を介しているものと考えられた。

(2) 続いて、前立腺癌細胞株 C4-2 を用いて、C4-2 の高遊走能細胞と思われる細胞を選別、継代した(mig 細胞とする)。この選別は、遊走能試験を繰り返したのち遊走した細胞を採取し、高転移能を有すると考えられる細胞を得た(図1)。この mig が本当に、高転移能を有するかどうか、遊走能試験を行って親細胞(prt)と比較したところ有意に mig で遊走能が亢進していた。さらに、mig と prt の細胞の形態学的特徴も比較したところ、上皮間葉移行が誘導されたことに矛盾しない多角形の突起をもつ形となっていた。

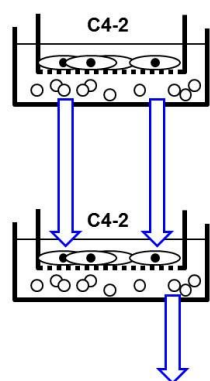


図1 高転移能を有する細胞の選別

(3) 実際に高転移能を有する mig が prt より CCL2 を分泌しているかどうかをそれぞれの培養上清を用いて、ELISA にて検討したところ、有意に mig の培養上清で CCL2 の濃度が高くなっており(約 5 倍)、転移能の高い細胞が CCL2 をより多く分泌していることが明らかとなった。定量的 PCR 法にてアンドロゲン受容体の変化も検討したが mig では prt に比べ約 50%の発現低下が認められた。上皮間葉移行を反映する蛋白の発現変化をウェスタンブロットで検討したところ、上皮間葉移行マーカーである N-cadherin が mig で発現亢進しており、上皮マーカーである E-cadherin が発現低下していた。蛋白レベルでも高転移能を有する細胞では上皮間葉移行がもたらされていることが明らかとなった。アンドロゲン受容体の発現変化についてはウェスタンブロットでも行い、mig で発現低下が認められ、PCR の結果と矛盾しないことが確認された。

(4) ここまでの実験で、高転移能を有する前立腺癌細胞は CCL2 をより多く分泌し、また

CCL2 が前立腺癌細胞に転移能を付与するという悪循環が存在することが明らかとなった。CCL2 は強力なマクロファージ遊走因子であることから、このような高転移能を有する前立腺癌細胞を含んだ組織には TAM がより多く存在し、より多くのケモカイン CCL17 と CCL22 を分泌していると考えられる。そこで TAM から分泌される CCL17 と CCL22 の受容体である CCR4 がヒト前立腺癌細胞に発現しているかどうか検討した。LNCaP、PC-3、DU145 いずれの細胞株でもウェスタンブロットでその発現が確認された。さらに CCR4 は、ヒトマクロファージ様細胞株と共培養することで、発現が亢進した。human recombinant CCL17 および CCL22 を前立腺癌細胞株に投与したところ、有意に前立腺癌細胞の遊走能が亢進した。

(5) これまでの結果をまとめると、高転移能を有する前立腺癌は CCL2 を産生し、より多くの TAM を誘導し、TAM から分泌される CCL17 や CCL22 によってさらに転移能が亢進する可能性が示された。

<引用文献>

Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 2014;371:424-433.

de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 2010;376:1147-1154.

Izumi K, Fang LY, Mizokami A et al. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med* 2013;5:1383-1401.

Shirotake S, Miyajima A, Kosaka T et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer. *Am J Pathol.* 2012;180:1008-1016.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 3 件)

泉浩二 前立腺癌とケモカイン CCL2 第 103 回日本泌尿器科学会総会 2015 年 4 月 19 日 石川県立音楽堂 石川県金沢市

泉浩二 Androgen/AR signaling に関連し

た前立腺癌予後予測マーカー探索 第 15 回
ホルモンと癌研究会 2014 年 7 月 4 日 東北
大学医学部良陵会館 宮城県仙台市

泉浩二 Androgen-deprivation therapy
(ADT)はマクロファージとの相互作用を介し
て前立腺癌の転移を促進する 第 63 回日本泌
尿器科学会中部総会 2013 年 11 月 30 日 愛
知県産業労働センター 愛知県名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 浩二 (IZUMI, Kouji)
金沢大学・医学系・特任助教
研究者番号：80646787