

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18578

研究課題名(和文) 前立腺癌リンパ節転移内の免疫環境による転移促進機構の解明

研究課題名(英文) The role of immune cells in prostate cancer lymph node metastasis for cancer progression

研究代表者

八重樫 洋 (YAEGASHI, HIROSHI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00835275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の転移で最も多い部位は骨、次いでリンパ節であるが、研究の多くが骨転移に焦点を当ててきた。実は骨転移とリンパ節転移では予後に大きな差が見られない。リンパ節転移研究による転移機構の解明も骨転移同様に急務である。本研究ではマクロファージと前立腺癌細胞のリンパ節内での細胞間相互作用により、CCL2とTGF- β 1のautocrine /paracrine作用を介して、AKTやERKの活性化を誘導し、前立腺癌の遊走能が亢進する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ節転移進展機構は未だ難解であり、全貌の解明が急がれる。本研究の成果から、腫瘍随伴マクロファージをターゲットとした抗ケモカイン治療、あるいはこれらの所謂センチネルリンパ節への到達を目論んでの術中投与などの応用が期待できる。M1a症例に対しては骨盤内リンパ節転移のみならず、その中枢の遠隔リンパ節転移に対するターゲット治療が有効である可能性が考えられる。傍大動脈や縦郭リンパ節であってもその部位で転移を食い止めれば、鎖骨上リンパ節～静脈を経由した転移を阻止できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：As the most frequent metastasis of prostate cancer is bone and lymph node metastasis is second, the basic research for prostate cancer metastasis mainly focus on the mechanism in progression of bone metastasis. However, the actual prognosis of patients with bone and lymph node metastasis are almost equal. The research for lymph node metastasis also is urgently needed as well as bone metastasis. In this study, We clarified that macrophages in lymph node metastasis increase prostate cancer cell migration ability via activation of AKT and ERK mediated by autocrine /paracrine system of CCL2 and TGF- β 1.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 リンパ節転移 腫瘍微小環境 腫瘍随伴マクロファージ ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

日本でも高齢化や生活様式の欧米化とともに、前立腺癌患者は増加しており、男性が罹患する癌の第1位となった。血中の前立腺特異抗原(prostate-specific antigen: PSA)が前立腺癌の腫瘍マーカーとして一般によく知られるようになり、検診においてもPSA検査が取り入れられるなど、PSA検査に暴露される機会が徐々に増えていることも患者数増加の一因であると考えられる。このような状況の中で、多くの前立腺癌患者は転移のない初期(限局癌)の状態で見られるが、残念ながら日常診療では未だに転移を有する状態で発見される患者もしばしば遭遇する。

前立腺癌患者の転移で最も多い部位は骨であり、これまでの前立腺癌の転移研究の多くが骨転移に焦点を当てていた。我々の研究室も同様に前立腺癌骨転移研究を長らく行ってきており、前立腺癌細胞と骨芽細胞や骨間質細胞との細胞間相互作用や、骨転移微小環境における各種分泌蛋白がautocrine/paracrine作用により前立腺癌細胞へ及ぼす影響など、多くの研究成果を発表してきた。骨転移研究における成果は、破骨細胞をターゲットとした各種骨修飾薬の臨床応用や、放射線核種による骨芽細胞をターゲットとした骨転移治療、骨代謝回転亢進を反映した骨転移バイオマーカーの開発など、非常に大きなインパクトを実臨床にもたらした。これらの多くは進行前立腺癌患者の生存期間延長、疼痛緩和、予後予測、治療効果判定など、現在では前立腺癌診療に欠かせないものとなっている。

一方、前立腺癌の転移部位で骨転移に次いで多い部位はリンパ節であるが、リンパ節転移については、骨転移ほど研究が行われていないと言わざるを得ない。その理由としては、疼痛や骨折を生じうる骨転移より症状が乏しいことや、リンパ節転移症例が骨転移症例より生命予後が良好であると認識されていること、リンパ節転移が前立腺癌に特異的な病態ではない(一方で、骨転移については造骨性骨転移と言えば前立腺癌と言われるほどよく知られている)ことなどから、リンパ節転移が骨転移ほど臨床上も研究課題としても重視されてこなかったためであると考えられる。このような背景から、これまで前立腺癌リンパ節転移の研究には骨転移研究より進歩が少なかったと言わざるをえず、リンパ節転移に特異的な治療も未だ保険適応にはなっていない。

ここで、前立腺癌リンパ節転移についてあらためて考察すると、確かにヨーロッパからのデータでは4年生存は骨転移のみで約40%、リンパ節転移のみで約50%とリンパ節転移症例は骨転移よりも予後良好であると報告されている(Eur Urol 2015;68:325-34)。ただし、大きな差があるとは言えない。そして、Japanese Study Group of Prostate Cancer database (J-CaP)のデータから解析した我々の研究室からの発表では、骨転移(M1b)とリンパ節転移(M1a)ではいずれも10年生存率が40%ほどであり、予後に大きな差は認められなかった(World J Urol 2016;34:261-7)。つまり、海外でもリンパ節転移症例は転移部位として考えると決して予後良好な因子ではなく、日本人では骨転移と同程度の予後不良因子であると考えられる。さらに、去勢抵抗性前立腺癌(castration-resistant prostate cancer: CRPC)となった場合のリンパ節転移の頻度は実に50%にも及ぶことが報告されており(N Engl J Med 2014;371:424-33)、リンパ節転移の臨床的重要性をあらためて評価する必要があると考えられる。すなわち、骨転移と同じようにリンパ節転移に特異的なマーカー、リンパ節転移に特異的な診断法、リンパ節転移に特異的な治療の開発は極めて重要であり、喫緊の課題であると認識すべきであると考えられる。

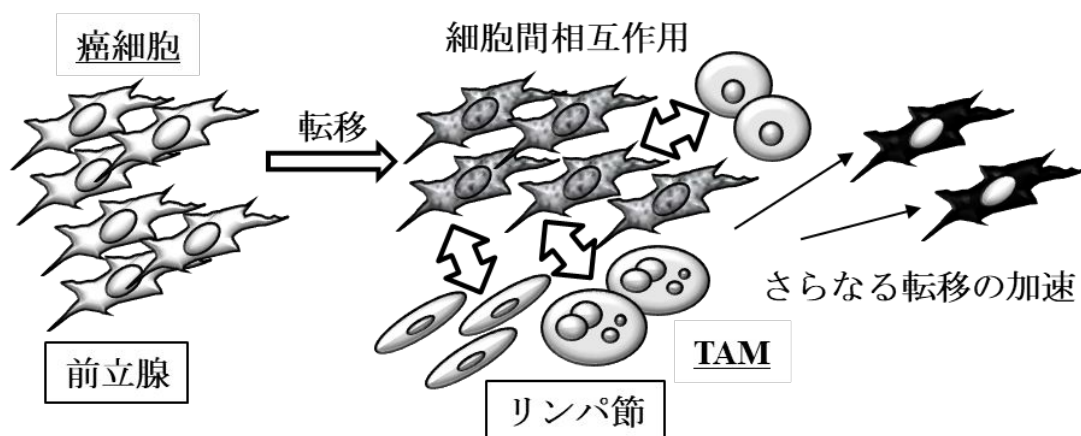
現在、リンパ節転移の進展について行えることは限局癌に対する前立腺全摘除術時のリンパ節廓清(時に範囲を拡大して行う)や、どの部位でも行いうる放射線照射のみであり、すでに転移した前立腺癌リンパ節に対する特化した治療法はない。前立腺癌リンパ節転移は、時に血流障害、下腿浮腫、尿路通過障害、水腎症や腎後性腎不全などの合併症を起こすことがあり、また、進展すれば静脈を介した新たな臓器転移の可能性も生じる。当教室から報告したM1aでも予後が悪いという事実はリンパ節転移がリンパ節転移のみで終結しないということを表している。骨転移において当研究室では骨転移巣からさらなる骨転移の進展を促すケモカインを介する転移促進機構の一端を明らかにした。リンパ節転移でも、所属リンパ節転移から始まる、遠隔リンパ節転移への転移の連鎖機構が存在するはずであるが、未だ不明な点が多く、これらの解明は臨床に直結する重要な課題である。

2. 研究の目的

前立腺癌の進展形式においては、局所浸潤、特に骨転移に帰着する血行性転移、リンパ節転移それぞれにおいて、特有の進展機構が存在すると考えられる。所属リンパ節転移の制御がその後の遠隔リンパ節転移の進展を左右する重要なカギとなると考えている。その理由としては、臨床的には前立腺全摘除術の際に拡大廓清などにより多くのリンパ節転移を切除することによって有意に患者の生命予後が改善し、さらに骨盤内放射線照射によって骨盤内のリンパ節転移の制御を一定程度行うことで、同様に生命予後が改善する可能性が報告されているからである(Eur Urol. 2018;74:134-137)。このような報告は以前から散見され、我々も最初のリンパ節転移においてどのような細胞学的相互作用が生じているかという点について非常に興味を持っていた。

本研究で焦点を当てるリンパ節転移は他の進展形態と異なる点が多く存在する。以前、当研究室ではC-CケモカインであるCCL2が自己分泌作用で前立腺癌細胞の遊走能を高めることを明らかにした(EMBO Mol Med 2013;5:1383-401)。リンパ節内の濾胞および髄質には多くのマクロファージが浸潤している。前立腺癌細胞が分泌するCCL2は強力なマクロファージ走化因子であり、前立腺癌のリンパ節転移微小環境内で教育された腫瘍随伴マクロファージ(tumor-associated macrophage: TAM)を誘導し、前立腺癌細胞自らを活性化させる可能性が考えられる。さらに、リンパ節の構造上最も体積の大きい傍皮質領域で組織の支持基盤を担っている細胞線維芽細胞が分泌するケモカインCCL21に注目した。CCL21の受容体CCR7が低濃度のTNF- α の自己分泌作用により発現が増強すること、さらにはCCL21とTNF- α を同時に前立腺癌細胞に加えることによってCCR7の発現亢進を介して前立腺癌細胞の遊走能が亢進することを明らかにした。このリンパ節傍皮質領域はリンパ節内のT細胞領域であり、様々なT細胞を包含することが報告されている。制御性T細胞(regulatory T cell: Treg)もその一つである。Tregも細胞表面にCCR7を発現し、CCL21によってリンパ節内への取り込みを加速し、かつ免疫制御能を亢進させることが報告されている。

これらのことから、前立腺癌細胞のリンパ節転移ではCCL2やCCL21などのケモカインによってTAMとTregという腫瘍免疫寛容を担う二つの重要な免疫細胞を活性化し、前立腺癌のさらなる活性化を促進している可能性が考えられる。しかし、これらの機序による前立腺癌細胞の活性化およびさらなる中枢への転移の促進については未だ明らかにした研究はない。本研究ではTAMとTregがリンパ節転移微小環境で前立腺癌細胞とどのような相互作用をもたらし、転移促進にはたらいているのかを明らかにすることが目的である。この機構が明らかとなれば、TAMやTregをターゲットとした抗ケモカイン治療、例えばCCL2、CCL21、CCL22中和抗体の開発、あるいはこれらの所謂センチネルリンパ節への到達を目論んでの術中投与などの応用が期待できる。M1a症例に対しては骨盤内リンパ節転移のみならず、その中枢の遠隔リンパ節転移に対するターゲット治療が有効である可能性が考えられる。傍大動脈や縦郭リンパ節であってもその部位で転移を食い止めれば、鎖骨上リンパ節～静脈を經由した転移を阻止できる可能性がある。



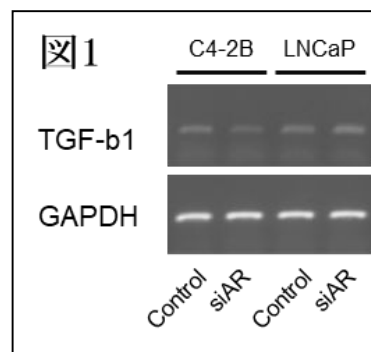
3. 研究の方法

- (1) 前立腺癌細胞がリンパ行性に転移する際に重要な癌細胞のリンパ指向性の程度を確認を行う。リンパ管新生に関わる特異的な受容体 VEGFR-3 のリガンド VEGF-C は TGF- β 1 により誘導されることが報告されていることから、リンパ節転移のカギとなる局所分泌蛋白として TGF- β 1 に着目し、アンドロゲン依存性ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP とマウス去勢下で増殖可能なアンドロゲン依存性ヒト前立腺癌細胞株 C4-2B において TGF- β 1 の発現量を確認する。
- (2) リンパ節内の細胞間相互作用として、とくに TAM に焦点をあてて研究を行うため、ヒト単球様細胞 THP-1 と前立腺癌細胞を共培養し、前立腺癌の表現型の変化を確認する。
- (3) リンパ節内でのマクロファージの役割を明らかにするために、THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理し TAM 様にしたものを用い、ケモカイン分泌の変化を明らかにする。
- (4) リンパ節内でのマクロファージからの刺激を想定し、TAM から分泌されるケモカインの LNCaP や C4-2B に対する影響を明らかにする。
- (5) TGF- β 1 や THP-1(TAM) から分泌されるケモカインの前立腺癌細胞への相加・相乗効果を明らかにする。
- (6) 癌細胞における TGF- β 1 の下流シグナル(Smads)や MAPK あるいは PI3K 経路の活性化の有無について明らかにする。

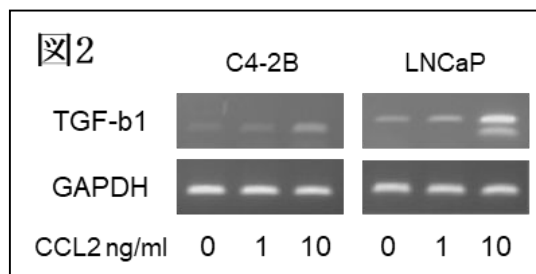
4. 研究成果

リンパ節転移のカギとなる局所分泌蛋白の遺伝子発現について RT-PCR にて検討したところヒト前立腺癌細胞株 LNCaP と C4-2B いずれも TGF- β 1 の発現が認められた。アンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) シグナルの有無による変化を明らかにするため、AR をノックダウン (siAR) したものでも同様に TGF- β 1 の発現を検討したが、AR の状態に関わらず一定程度の発現があることが明らかとなった (図 1)。

THP-1 と前立腺癌細胞を共培養したところ、前立腺癌細胞の増殖にはそれほど変化が認められなかったが、遊走が亢進した。



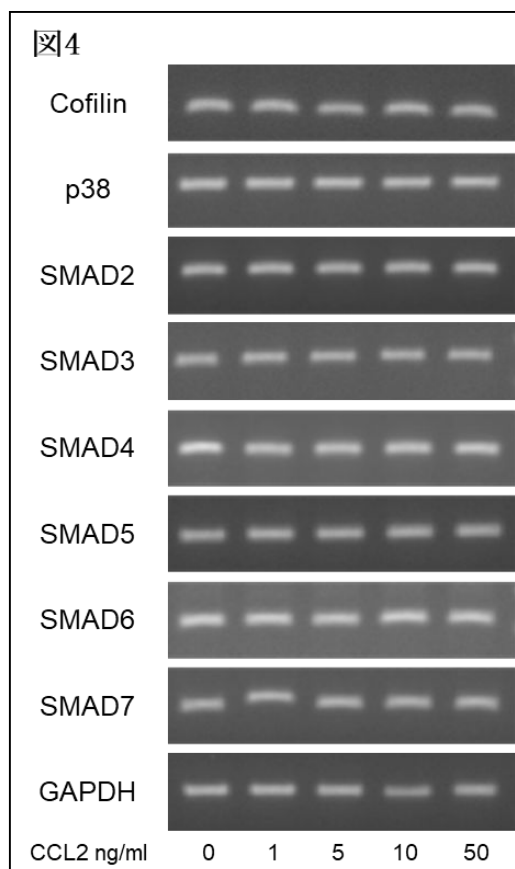
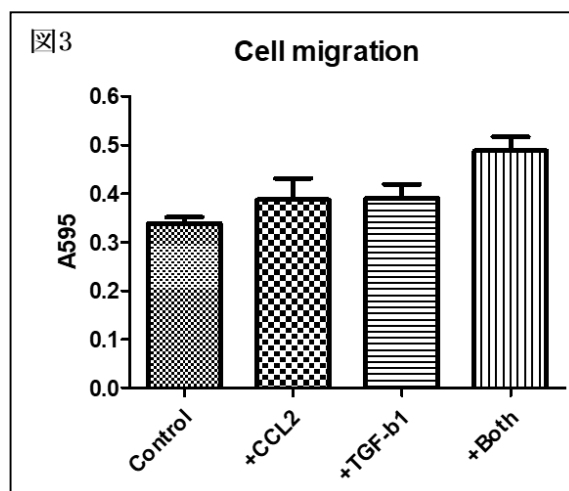
CCL2 はマクロファージ走化因子としてマクロファージからも分泌されることが知られており、さらに、前立腺癌細胞の遊走能も亢進させることが報告されていることから、単球由来の THP-1 の CCL2 の遺伝子発現について検討した。THP-1 そのものは何も処理を行わない場合、CCL2 の発現はごく低いレベルであったが、PMA 処理を行ったところ CCL2 の発現は増加した。単球からマクロファージの性質を帯びた状態に変化したことによるものと考えられた。また、THP-1 にも AR が発現しており、AR が CCL2 の分泌制御を行っていることから、同様に siAR でも CCL2 の発現を検討したが、PCR ではごく軽度の上昇を認める程度だった。



LNCaP および C4-2B に CCL2 を添加したところ、1-10ng/ml の濃度において、TGF- β 1 の遺伝子発現が亢進した (図 2)。

一方で LNCaP および C4-2B に TGF- β 1 を添加しても CCL2 の遺伝子発現に変化は認められなかった。これらのことから、前立腺癌において TGF- β 1 は CCL2 の下流に位置している可能性が示唆された。

C4-2B に CCL2 および TGF- β 1 を添加したところそれぞれ遊走能が軽度亢進したが、併用添加時に最も高い遊走能亢進が認められた (図 3)。



これらの機序の解明のため、TGF- β 1 添加のもと TGF- β 1 の下流の遺伝子 (Smads など) の発現変化を検討したが、明らかな変化は認められなかった (図 4)。

しかし、興味深いことに AKT および ERK の活性を western blotting にて検討したところ、TGF- β 1 添加によりそれぞれ軽度リン酸化が亢進することが明らかとなった。

以上のことから、マクロファージと前立腺癌細胞のリンパ節内での細胞間相互作用により、CCL2 と TGF- β 1 の autocrine / paracrine 作用を介して、AKT や ERK の活性化を誘導し、前立腺癌の遊走能が亢進する可能性が示唆された。詳細な機構にはさらなる研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	泉 浩二 (IZUMI Kouji) (80646787)		

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