

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：32633

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11126

研究課題名(和文)エクソソームmicro RNA制御性ケモカインによる前立腺癌骨転移増悪機構の解明

研究課題名(英文)Progression of prostate cancer bone metastasis by exosomal micro RNA regulated-chemokine

研究代表者

成本 一隆 (NARIMOTO, Kazutaka)

聖路加国際大学・聖路加国際病院・医幹

研究者番号：50645207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨間質細胞との相互作用によって分泌されたCCL5が前立腺癌細胞の遊走能を亢進させた。組織検体では正常細胞と比較し前立腺癌細胞でCCL5の受容体CCR5の発現が亢進していた。コーヒー含有成分のカーウェオールとカフェストールは前立腺癌細胞の増殖能・遊走能を相乗的作用によって、濃度依存的に低下させた。カーウェオールとカフェストールは前立腺癌細胞のCCR5の発現も抑制した。前立腺癌の骨転移においてはCCL5-CCR5経路が転移能を亢進させている可能性があり、カーウェオールとカフェストールはCCL5-CCR5経路の抑制を介して転移能を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨転移が多い前立腺癌における骨から骨への転移促進機構は未だ未解明であったが、本研究により、骨転移巣でのCCL5-CCR5経路の活性化が、前立腺癌細胞の転移能を亢進させ、さらなる骨転移を誘発する可能性が示唆された。さらに、コーヒーの成分の中で、カーウェオールとカフェストールはCCL5-CCR5経路の抑制を介し、前立腺癌の転移を抑制できる可能性が示唆された。CCL5-CCR5経路が新規治療ターゲットとして明らかにされただけではなく、カーウェオールとカフェストールが前立腺癌治療薬となる潜在性も明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The cell-cell interaction between bone stromal cells and prostate cancer cells produced CCL5 which in turn increased migration ability of prostate cancer cells. Immunohistochemistry revealed CCR5, a receptor of CCL5, expressed in prostate cancer tissue stronger than normal prostate tissue. Coffee ingredients, cafestol and kahweol, synergistically inhibited both proliferation and migration ability of prostate cancer cells in a dose dependent manner. Cafestol and kahweol inhibited the expression of androgen receptor and its nuclear translocation, and also inhibited CCR5 expression in prostate cancer cells. In prostate cancer bone metastasis, CCL5-CCR5 signaling may increase the metastatic ability of prostate cancer cells and cafestol and kahweol have a potential ability to inhibit prostate cancer metastasis via inhibition of CCL5-CCR5 signaling.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌に対するアンドロゲン除去療法 (androgen-deprivation therapy: ADT) は極めて有効な第一選択となる治療法であるが、いずれ多くの症例で無効な状態、すなわち去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) となる。根治療法が存在しない CRPC のメカニズムの解明は新規治療の開発に必要不可欠である。

近年、様々な癌に対し免疫チェックポイント阻害薬が承認されており、腫瘍免疫機構の破綻が癌進展に寄与していることが明らかにされているが、CRPC の機序の一つであるとも考えられている。ケモカインは免疫細胞の活性をコントロールする分泌蛋白であり、ADT 下の癌微小環境では様々なケモカインが分泌されていると報告されている。中でも CCL5 は、骨転移を有する CRPC 患者で血清値が上昇しているという報告があり、前立腺癌の転移あるいは ADT 耐性獲得に関与する可能性が示唆される。しかし、CCL5 の前立腺癌における役割は未だ詳細には明らかにされていない。

我々は、以前から CRPC における癌進展メカニズムの解明に焦点を当て基礎研究を行ってきた。本研究の対象となる前立腺癌骨転移巣においては、癌微小環境では骨由来間質細胞がアンドロゲン代謝に強く関与していることや (Endocr Relat Cancer 2009;16:1139-55)、TGF-beta を介して成長が促進された骨由来間質細胞や骨芽細胞が、前立腺癌細胞の浸潤能を亢進させることを明らかにした (Prostate 2009;69:1222-34)。一方、ケモカインを介した CRPC のメカニズムについても研究を行っており、ADT によってアンドロゲン-アンドロゲン受容体 (androgen receptor: AR) シグナルを抑制することでケモカイン CCL2 の発現が亢進し、自己分泌あるいは傍分泌作用で癌細胞に上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) をもたらし、浸潤・転移を促進することを明らかにした (EMBO Mol Med 2013;5:1383-401)。新しい世代の抗アンドロゲン剤であるエンザルタミドに対する前立腺癌細胞の耐性獲得機序として内因性 STAT3 抑制因子の抑制を介した STAT3-CCL2 経路の活性化が重要な役割を果たしていることも明らかにした (Cell Death Dis 2013;4:e764)。

これらの結果から、骨転移巣での ADT 耐性獲得には骨間質細胞や骨芽細胞と前立腺癌細胞との相互作用が必須であり、その相互作用においては何らかのケモカインが重要な役割を果たしているのではないかという仮説を立てた。CCL5 は制御性 T 細胞の遊走因子として知られているが、前述の通り骨転移を有する CRPC 患者の血清 CCL5 値は上昇していると報告されている。そこで骨間質細胞と前立腺癌細胞との相互作用において CCL5 が果たす役割を解明すべく本研究を計画した。

2. 研究の目的

CRPC に対しては近年、様々な作用機序の薬剤が承認され、生存期間も徐々に延長している。しかし、未だに根治を期待できる治療法は確立されていない。根治を目指しうる革新的治療の開発につながる研究成果が強く求められている。癌免疫抑制系の活性化が様々な癌の進展・増悪に強く関与していることが明らかになってきており、CTLA-4 および PD-1 を標的とした免疫チェックポイント阻害薬が有効であることも明らかにされている。重要な点は、一部の癌では進行癌であるにもかかわらず一定程度の割合で完全奏効を得られているという報告がなされていることである。CRPC のメカニズムとして、AR シグナルに依存しない経路であるケモカインを介する経路の存在が明らかになれば、一部の癌と同様に、既存の薬剤と当該ケモカインシグナルの阻害薬の併用により完全奏効が期待できるかもしれない。

本研究では前立腺癌の遠隔転移のほとんどを占める骨転移の微小環境での前立腺癌細胞と骨由来細胞の相互作用に注目し、細胞間での CCL5 を介した ADT に対する耐性獲得機序を解明し、進行前立腺癌や CRPC に対する新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

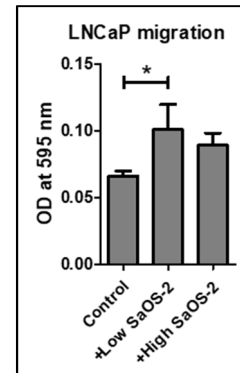
- (1) ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、LNCaP-SF、PC-3、ヒト骨芽細胞様細胞株 SaOS2、骨組織から初期培養した骨間質細胞を使用し、前立腺癌細胞株と骨関連細胞との共培養を行い、癌細胞の遊走能・増殖能の変化を調べた。
- (2) サイトカインアレイにより、共培養下で癌細胞の表現型の変化に影響を与える分泌蛋白を同定した。
- (3) 上記から得られた標的分子である CCL5 の中和抗体でその作用を抑制し、表現型の変化を観察した。
- (4) 抗炎症作用があり、疫学的に前立腺癌進展抑制効果が報告されているコーヒーの成分から、ケモカインを介した抗炎症作用が報告されているものを文献的に検索し、その候補の中から、実際にヒト前立腺癌細胞に作用する物質に焦点をあてた。
- (5) 上記結果から、ヒト前立腺癌細胞 (PC-3、LNCaP、LNCaP-SF、DU145) に対してカーウェオールとカフェストールを投与し遊走能・増殖能の変化を調べた。

- (6) さらにカーウェオールとカフェストール投与によるアポトーシス関連やEMT関連のタンパク質、ARへの作用について評価した。
- (7) カーウェオールとカフェストール投与によるケモカインやケモカイン受容体の変化についても調べた。

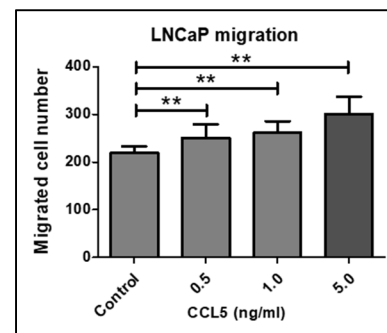
4. 研究成果

進行前立腺癌における転移の大部分は骨転移であるが、ひとたび転移を起こすと根治は困難となる。近年、様々な癌でCCL2などのケモカインが癌の進展・増悪に関わることが報告されているが、前立腺癌におけるケモカインの役割は未だ不明な点が多い。

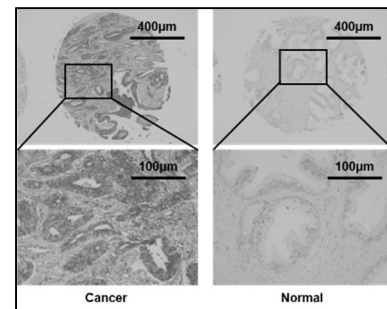
まず、ヒト前立腺癌細胞株LNCaP、LNCaPのアンドロゲン非依存性株LNCaP-SF、PC-3、ヒト骨芽細胞様細胞株SaOS2、正常骨組織および前立腺癌骨転移組織から初期培養した骨間質細胞を使用し、癌細胞と骨関連細胞の共培養を行うことによって、癌細胞の遊走能・増殖能の変化を調べた。骨関連細胞との共培養により、AR陽性の前立腺癌細胞の遊走能が亢進した(右図)。骨転移組織からの骨間質細胞は特に強く前立腺癌細胞の遊走能を亢進させた。しかし、一方で増殖に関してはほとんど影響を与えなかった。



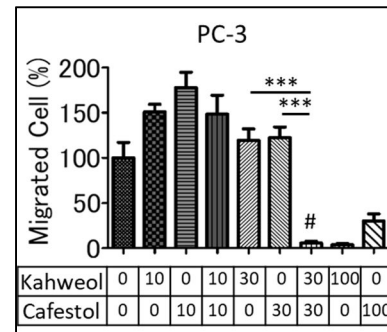
サイトカインアレイの結果から、CCL5が遊走能亢進の原因であると考えられた。CCL5は、骨転移を有するCRPC患者で血清値が上昇するという報告があり、前立腺癌の転移あるいはADT耐性獲得に関与する可能性がある。しかし、CCL5の前立腺癌における役割は未だ詳細には明らかにされていない。CCL5の添加により濃度依存性にLNCaPの遊走能が亢進した(右図)。ARをノックダウンしたLNCaPはコントロールと比べ遊走能が亢進したが、CCL5を加えてもそれ以上の遊走能の亢進は認められず、CCL5はARシグナルの上流に位置すると考えられた。



免疫組織化学染色では、CCL5の受容体であるCCR5は正常前立腺組織より前立腺癌組織で高発現していた(右図)。前立腺癌骨転移巣では骨間質細胞から分泌されるCCL5が前立腺癌細胞の遊走能を亢進させることが明らかとなった。

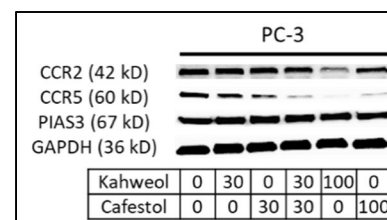


骨転移巣では前立腺癌細胞が癌微小環境で周囲の間質細胞などとの相互作用によりその活性が助長されており、炎症性サイトカインであるケモカインCCL5がそのメディエーターとして働いていることが明らかとなった。このことから、抗炎症作用物質が前立腺癌の進展抑制効果が得られるかを検討することとした。注目したのが、世界で最も一般的な嗜好品飲料コーヒーである。コーヒー成分中のカーウェオールとカフェストールが抗炎症効果(ケモカインの分泌抑制効果)を持つことが報告されている。本研究でもこれらが各種前立腺癌細胞(PC-3、DU145、LNCaP、LNCaP-SF)の増殖能や遊走能を濃度依存性に抑制することを明らかにした(右図)。



カーウェオールとカフェストールはARを有する細胞株では、ARの発現を抑制したにもかかわらず、ARシグナルで抑制がかけられているはずのケモカインの分泌をも抑制することを明らかにした。

一方で、CCL5は、LNCaP、LNCaP-SFともに、カーウェオールとカフェストールで分泌抑制されなかった。興味深いことに、アンドロゲン非依存性株であるLNCaP-SFはアンドロゲン依存性株LNCaPと比較し、ベースラインのCCL5分泌は高かった。カーウェオールとカフェストールはSTAT3のリン酸化を濃度依存的に抑制することも明らかにしたが、内因性のSTAT3インヒビターであるPIAS3は変化することはない。CCL5の受容体であるCCR5の発現は濃度依存的に抑制した(右図)。



また、カーウェオールとカフェストールは AR の発現を濃度依存的に低下させることに加え、AR の核内移行も阻害した。AR シグナルを低下させたにもかかわらず遊走能も低下させていた。カーウェオールとカフェストールのこれらの作用については相乗的な効果が認められた。カーウェオールとカフェストールは CCR5 の発現抑制を介して CCL5-CCR5 シグナルを抑制することで、前立腺癌細胞の遊走能を低下させている可能性が示唆された。

CCL5-CCR5 シグナルは前立腺癌の進展・増悪に寄与することが明らかになった。このシグナルは抗炎症効果のあるコーヒー成分カーウェオールとカフェストールによって抑制できる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Mizokami A, Koh E, Izumi K, Narimoto K, Takeda M, Honma S, Dai J, Keller ET, Namiki M. Prostate cancer stromal cells and LNCaP cells coordinately activate the androgen receptor through synthesis of testosterone and dihydrotestosterone from dehydroepiandrosterone. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Dec;16(4):1139-55.

Izumi K, Mizokami A, Li YQ, Narimoto K, Sugimoto K, Kadono Y, Kitagawa Y, Konaka H, Koh E, Keller ET, Namiki M. Tranilast inhibits hormone refractory prostate cancer cell proliferation and suppresses transforming growth factor beta1-associated osteoblastic changes. *Prostate*. 2009 Aug 1;69(11):1222-34.

Izumi K, Fang LY, Mizokami A, Namiki M, Li L, Lin WJ, Chang C. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med*. 2013 Sep;5(9):1383-401.

Lin TH, Izumi K, Lee SO, Lin WJ, Yeh S, Chang C. Anti-androgen receptor ASC-J9 versus anti-androgens MDV3100 (Enzalutamide) or Casodex (Bicalutamide) leads to opposite effects on prostate cancer metastasis via differential modulation of macrophage infiltration and STAT3-CCL2 signaling. *Cell Death Dis*. 2013 Aug 8;4:e764.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwamoto H, Izumi K, Natsagdorj A, Naito R, Makino T, Kadomoto S, Hiratsuka K, Shigehara K, Kadono Y, Narimoto K, Saito Y, Nakagawa-Goto K, Mizokami A.	4. 巻 79
2. 論文標題 Coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol synergistically inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostate	6. 最初と最後の頁 468-479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pros.23753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Urata S, Izumi K, Hiratsuka K, Maolake A, Natsagdorj A, Shigehara K, Iwamoto H, Kadomoto S, Makino T, Naito R, Kadono Y, Lin WJ, Wufuer G, Narimoto K, Mizokami A	4. 巻 109
2. 論文標題 C-C motif ligand 5 promotes migration of prostate cancer cells in the prostate cancer bone metastasis microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 724-731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13494.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Iwamoto H, Izumi K, Kadono Y, Mizokami A.
2. 発表標題 Coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol synergistically inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells.
3. 学会等名 The 2019 Annual EAU Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本大旭、泉浩二、ナッサグドルジアリウンボルト、牧野友幸、内藤伶奈人、門本卓、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 前立腺癌に対するkahweolとcafestolの抗癌活性
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦田聡子、泉浩二、平塚薫、ナッサグドルジアリウンボルト、牧野友幸、内藤伶奈人、門本卓、岩本大旭、溝上敦
2. 発表標題 前立腺癌骨微小環境におけるCCL5による癌進展機構
3. 学会等名 第27回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦田聡子、泉浩二、平塚薫、MAOLAKE AERKEN、NATSAGDORJ ARIUNBOLD、重原一慶、岩本大旭、門本卓、牧野友幸、内藤伶奈人、角野佳史、溝上敦、LIN WEN-JYE、WUFUER GUZAILINUER、成本一隆
2. 発表標題 前立腺癌骨微小環境におけるCCL5による癌進展機構
3. 学会等名 第69回西日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saoko Urata, Kouji Izumi, Atsushi Mizokami.
2. 発表標題 Prostate cancer progression mechanism via CCL5 within microenvironment of prostate cancer bone metastasis.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究 分担者	溝上 敦 (MIZOKAMI Atsushi) (50248580)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

