

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16739

研究課題名（和文）リンパ節転移微小環境における癌進展機構に立脚したリンパ節修飾薬の開発

研究課題名（英文）The development of lymph node metastasis-directed therapy based on the microenvironmental factors in lymph node metastasis

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ管新生に関わる受容体VEGFR-3のリガンドVEGF-CはTGF- β 1により誘導されることや、CCL2によってリンパ節転移が増悪することが報告されていることから、TGF- β 1およびCCL2の前立腺癌の転移への影響を調べた。TGF- β 1は転移への影響は少ないと考えられたが、CCL2は前立腺癌の転移に深くかかわる可能性が示唆された。前立腺癌のリンパ節転移誘導に関してはTGF- β 1の関与は限定的であり、ARシグナルの遮断によるmicro RNA-124-3p.2の抑制を介したCCL2-CCR2軸の活性化が大きな役割を果たしている可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってCCL2が臨床的にも前立腺癌患者の予後を悪化させている可能性が明らかにされた。また、ARシグナルの遮断によるmicro RNA-124-3p.2の抑制を介したCCL2-CCR2軸の活性化が、前立腺癌の転移に大きな役割を果たしている可能性が明らかとなった。進行前立腺癌に対しては、アンドロゲン除去療法と同時に、アンドロゲン除去療法によって抑制されたmicro RNA-124-3p.2を活性化させることで、リンパ節をはじめとした前立腺癌の転移を抑制できる可能性が初めて示された。

研究成果の概要（英文）：Since TGF- β 1 has been reported to induce VEGF-C, which is a ligand of lymphangiogenic mediator VEGFR-3 and CCL2 has also been reported to increase lymph node metastasis, TGF- β 1 and CCL2 were focused in this study. Although TGF- β 1 hardly contributes to activation of metastatic potential in prostate cancer, CCL2 could increase prostate cancer metastasis. AR regulated micro RNA, miR-124-3p.2 inhibits CCL2 expression.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 ケモカイン サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

癌の病態として最も臨床上問題となる「転移」は、その存在自体で根治性を無くしてしまうばかりでなく、転移部位に応じた特有の症状をもたらし、患者の苦痛の大きな要因となっている。癌の種類によってその転移指向性が異なっており、例えば前立腺癌では診断時に発見される転移のほとんどが骨転移で、一次治療に不応となった(去勢抵抗性)状態ではリンパ節転移が急増する傾向にある。一方で肝転移は極めて予後が悪い転移部位であるが、初発の段階ではほとんど見られない。尿路上皮癌や大腸癌では肺転移や肝転移が多く、終末期には呼吸困難が大きな問題となることもある。多くの癌で共通して生じる転移部位はリンパ節転移である。頭頸部癌や消化器癌、胚細胞腫瘍など多くの癌でリンパ節転移は治療法や予後を規定する極めて重要な転移部位でもある。

リンパ節転移は、所属リンパ節と所属外リンパ節に分けられ、転移の状況によって治療方針や予後も異なると考えるのが一般的である。しかし、所属外リンパ節転移であっても元々はリンパ行性に所属リンパ節を経由して癌細胞が受動的(あるいは能動的に)転移していると考えられる。乳癌などの一部の癌ではセンチネルリンパ節の概念のもと、手術において原発巣に最も近いリンパ節転移に特定の検査や手技を加えることで予後改善に寄与すると報告されている。初期のリンパ節転移があれば、それ以上のリンパ節転移を生じないような治療を施すことで、予後を改善できる可能性がある。また、所属外リンパ節転移を生じていたとしても、癌細胞のリンパ管・組織から静脈への流入を防ぐことができれば、症状や一定程度の予後の改善が期待できると考えられる。

2000年代に入ってから様々な標的分子に対し分子標的治療薬が登場し、各種癌の生存期間の延長を得た。骨転移に関してはこの10年で様々な骨修飾薬(ゾレドロン酸やデノスマブなど)が臨床応用され、大幅に患者のQOLを改善させた。これらの知見から、各臓器転移特異的な治療法が見出され、生存期間の延長やQOLの改善を期待するのは自然な流れであると考えられる。しかしながら、骨転移以外の臓器・器官転移に対して特異的な薬物治療が未だ存在しないのが現状である。

2. 研究の目的

リンパ節転移巣内での細胞間相互作用による癌細胞活性化機構はほとんど明らかにされていない。本研究では原発巣からリンパ行性転移の最終的な段階である静脈流入までの癌細胞の振舞いと癌微小環境からの癌細胞への種々の修飾過程の一端を明らかにしたいと考えている。原発巣からリンパ行性に転移する場合、まず個々の癌細胞自体の転移能の程度が重要となる。この時点で、すでに局所の組織浸潤能やリンパ管侵襲に関わる活性が相当程度異なっていると考えられることから、高転移能を有する癌細胞と低転移能しか有しない癌細胞を比較することが必要である。

特に本研究においては、リンパ節転移が多い泌尿器癌である前立腺癌に注目して実験を行うこととした。前立腺癌の遠隔転移は骨転移が圧倒的に多く、転移癌の約80%-90%も占めるとされているが、次いで遠隔リンパ節転移が多く約50%とされている。一般的にリンパ節転移は骨転移と比較し予後良好と認識されている(骨転移はM1b、リンパ節転移はM1a)が、我々の大規模なデータベース(JCaP)からの後ろ向き解析では、M1aとM1bでの生命予後には大きな差が見られないことが明らかとなった(Kadono Y, et al. World J Urol. 2016;34:261-7)。前立腺癌のリンパ節転移もまた、骨転移同様に、治療ターゲットとして非常に重要な部位であることを物語っている。

前立腺癌細胞は一般にアンドロゲン受容体(androgen receptor: AR)シグナルが初期の増殖に大きく寄与しているため、ARシグナルを遮断する治療であるアンドロゲン除去療法(androgen-deprivation therapy: ADT)が行われる。しかし、多くの症例でADTが無効な状態である去勢抵抗性前立腺癌(castration-resistant prostate cancer)となることが大きな問題とされる。CRPCではARシグナルを極端に抑制することが、逆に高転移能を有する前立腺癌細胞を生じさせることが明らかにされており、これら高転移能を有する前立腺癌細胞とARシグナルへの依存度の強い低転移能の前立腺癌細胞を比較することで、リンパ節転移機構解明の足掛かりとなると考えられる。

本研究においてはARシグナルへの依存性の強いヒト前立腺癌細胞株LNCaPと、ARシグナルへの依存性を十分に残しつつもCRPCへの傾向を強めたヒト前立腺癌細胞株C4-2Bを用いることとした。これらのARシグナル依存性を種々の方法で低下させて転移能を高めた場合に、リンパ節転移機構にどのような影響があるかを詳細に調べる。特に、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や、CCL2によってリンパ節転移が増悪することが報告されていることから、TGF- β 1およびCCL2に焦点をあて、これらの暴露により前立腺癌細胞のリンパ節への転移能がどのように変化するかを検討する。また、CCL2の臨床的な意義を明らかにするため、前立腺癌患者の血清CCL2値と前立腺癌の転移や予後との関連

も検討する。

3. 研究の方法

(1)リンパ節転移の誘導にも関わる、前立腺癌細胞の転移能や遊走能を亢進させる主要なケモカインシグナルである CCL2-CCR2 軸が、転移や予後にどのような影響を与えているのか、臨床検体を用いて明らかにする。

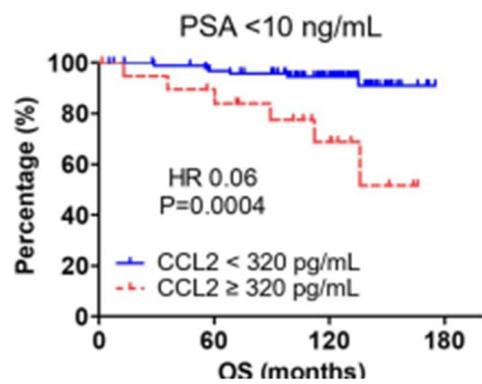
(2)先行研究から AR シグナルと CCL2-CCR2 軸の橋渡的な存在である可能性が高いと考えられる micro RNA-124-3p.2 の振舞いについて精査する。

(3)前立腺癌細胞においては TGF- β 1 で変化する TGF- β 1 の下流と考えられる経路について検証し SMAD2-7 は濃度依存的にも経時的にも RT-PCR では明らかな変化が認められないことも先行研究で確認した。そこで、次に転移能を強力に高める Akt および Erk の活性化の有無について western blotting にて調べることにする。

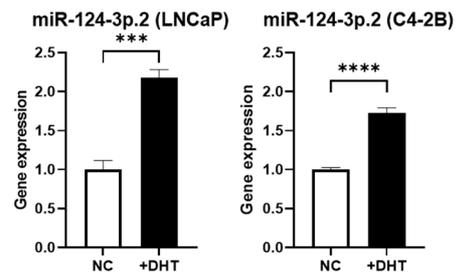
(4)TGF- β 1 は CCL2 の作用を補助的に増強させる役割がある可能性が示唆されることから、これら二つの分泌蛋白による前立腺癌細胞の同時刺激が Akt および Erk を活性化させているかを検討する。

4. 研究成果

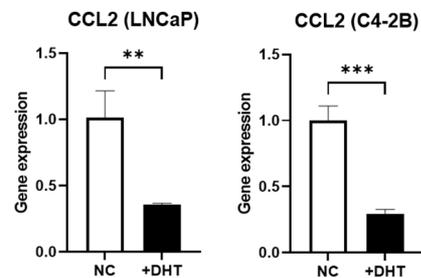
前立腺生検を受けた 379 名のうち癌と診断された 255 名について、診断時の血清 CCL2 値と予後について詳細に調べた。CCL2 が 320pg/mL 以上の症例では 320pg/mL 未満の症例と比べ、有意に全生存・前立腺癌特異的生存が低下した。CCL2 高値は全生存においては多変量解析によっても有意な因子であった。さらに前立腺特異抗原 PSA 値が 10 未満の予後が良好と考えられる症例において、CCL2 が 320pg/mL 以上であった場合は 10 年生存率が約 95%から 65%にまで低下し、有意に生存期間が短縮することが明らかとなった (右図 Jpn J Clin Oncol. 2022;52:1337-44)。



AR シグナルの遮断が前立腺癌細胞の遊走・浸潤・転移を促進することが明らかになっており、CCL2-CCR2 軸はその主な活性化経路である。先行研究において LNCaP と C4-2B を用いて、AR シグナルの下流にあり、かつ CCL2 の上流にある micro RNA の候補を抽出し、それらの中から micro RNA-124-3p.2 が AR シグナルによってコントロールされ、CCL2 の発現に抑制的に働く可能性のあるものとして同定された。micro RNA-124-3p.2 は DHT を添加すると発現が亢進し、それに呼応して CCL2 の発現が低下した (右図)。

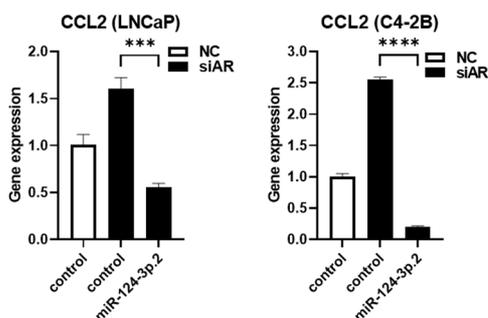


さらに、AR を RNA 干渉にてノックダウンすると CCL2 の発現は亢進するが、micro RNA-124-3p.2 を導入することによって CCL2 の発現が大幅に低下した (下図)。



TGF- β 1 に関しては、TGF- β 1 で変化する TGF- β 1 の下流と考えられる経路について検証し SMAD2-7 は濃度依存的にも経時的にも RT-PCR では明らかな変化が認められないことも先行研究で確認したため、ターゲットを Akt や Erk といった、直接転移能に関わるシグナル

のリン酸化の有無へと変えることとした。



Akt および Erk の活性化の有無について western blotting にて調べたところ、C4-2B では TGF- β 1 の添加でいずれも活性化が認められなかったが、LNCaP では経時的に活性化する傾向が認められた。しかしその変化は劇的なものではなく、TGF- β 1 単独の影響は大きくないと考えられた。これらのことから、TGF- β 1 は CCL2 の作用を補助的に増強させる役割がある可能性が示唆された。そこで、TGF- β 1 と

CCL2 の同時刺激が Erk を活性化させている可能性について検討したが、CCL2 単独の作用と比較し、十分な相加・相乗的な変化が認められなかった。

以上のことから、前立腺癌のリンパ節転移誘導に関しては TGF- β 1 の関与は限定的であり、AR シグナルの遮断による micro RNA-124-3p.2 の抑制を介した CCL2-CCR2 軸の活性化が大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Iwamoto H, Izumi K, Nakagawa R, Toriumi R, Aoyama S, Shimada T, Kano H, Makino T, Kadomoto S, Yaegashi H, Kawaguchi S, Nohara T, Shigehara K, Kadono Y, Mizokami A. | 4. 巻 52 |
| 2. 論文標題 Usefulness of serum CCL2 as prognostic biomarker in prostate cancer: a long-term follow-up study. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol | 6. 最初と最後の頁 1337-1344 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyac102 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Iwamoto H, Izumi K, Nakagawa R, Toriumi R, Aoyama S, Kamijima T, Shimada T, Kano H, Makino T, Naito R, Kadomoto S, Yaegashi H, Kawaguchi S, Nohara T, Shigehara K, Kadono Y, Mizokami A. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Serum CCL2 Is a Prognostic Biomarker for Non-Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biomedicines | 6. 最初と最後の頁 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10102369 | 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 - |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|