

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791785
 研究課題名(和文) 前立腺癌の進展におけるケモカインと腫瘍関連マクロファージの機能解析と発現制御
 研究課題名(英文) The molecular mechanism of chemokines and tumor associated macrophages in the progression of prostate cancer.
 研究代表者
 城武 卓 (SHIROTAKE SUGURU)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10528805

研究成果の概要(和文)：前立腺癌組織内における MCP-1 の発現と腫瘍関連マクロファージの浸潤は癌の悪性度のみならず前立腺癌治療後の PSA 再発に関連することが示された。去勢抵抗性前立腺癌では血管新生の亢進に関連したアンジオテンシン II 1 型受容体(AT1R)が高発現していることが知られている。本研究において、降圧剤である AT1R 阻害剤が MCP-1 の発現やマクロファージの浸潤を抑制し得ることが示され、その中でも PI3K/Akt シグナル伝達系が重要な分子機構のひとつであることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Our study clearly demonstrated that both high MCP-1 expression and high tumor associated macrophage infiltration in prostate cancer specimens correlated with a high PSA recurrence rate, and that angiotensin II type 1 receptor blockade inhibited MCP-1 expression through the PI3K/Akt pathway and also macrophage infiltration in castration resistant prostate cancer which had acquired aggressive angiogenic properties accompanied by up-regulation of AT1R.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：泌尿器癌・微小環境

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は本邦の男性において最も多い悪性腫瘍のひとつである。近年、PSA 検診の普及に伴い、早期発見される症例が増加する一方、局所浸潤や転移症例または PSA 再発症例はいまだ多く、治療に難渋することが問題である。前立腺癌は臓器特異性転移の性質を有し、主に骨転移を起こす。骨痛や病的骨折は患者の QOL や ADL を大きく損ない、骨転移

抑制は臨床上極めて重要な課題である。様々な悪性腫瘍において新規抗癌剤の開発や分子細胞レベルでのシグナル伝達の解明と分子標的治療薬の開発が進む中、去勢抵抗性前立腺癌について効果的な治療法がなく、微小環境に着目した転移・浸潤のメカニズムの解明、新たな治療標的の同定ならびに新たな治療法の開発が必要である。

悪性腫瘍において、微小環境下の腫瘍関連マクロファージおよびケモカインの発現が

腫瘍の進展や臨床的予後と関連すると報告されているが、臨床的に予後予測因子や治療標的因子になり得るのか、その制御機構を含めていまだ検討は不十分である。前立腺癌の進展や骨転移に関して、腫瘍微小環境における MCP-1 の発現が関連するという知見が集積されつつある。しかし、MCP-1 の制御機構に関する検討は不十分であり、いまだ臨床応用にはいたっていない。

2. 研究の目的

MCP-1 を含めた多くのサイトカインやケモカインは、良性の炎症性疾患において、アンギオテンシン II (AngII) 1 型受容体 (AT1R) の制御を受けることが知られており、すでに臨床応用されている。これまで我々は、前立腺癌を含めた泌尿器科癌における AT1R を介した腫瘍血管新生の制御について検討してきた。とくに去勢抵抗性前立腺癌の皮下腫瘍モデルを用いた研究では、降圧剤である AT1R 阻害剤 (ARB) の血管新生抑制作用と腫瘍増殖抑制効果を見出した (Kosaka T. et al, Prostate, 2010)。本研究では、前立腺癌の AT1R 発現の観点から、MCP-1 の発現制御機構について検討した。

3. 研究の方法

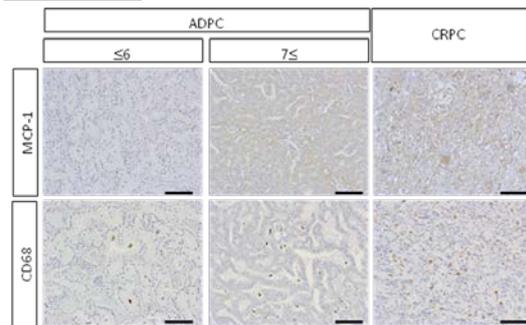
当院で診断、治療された限局性前立腺癌 121 例および去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) による剖検症例 17 例、これら 138 例のパラフィン切片を用いて MCP-1 およびマクロファージの免疫染色を行い、各種臨床的パラメータ (年齢、術前 PSA、Gleason score、pT stage) との関連を検討した。PSA 非再発率は Kaplan-Meier 法により算出し、有意差の検定は Log-rank test を用いた。Cox の比例ハザードモデルを用い多変量解析を行い、独立した危険因子を検討した。In vivo および in vitro の検討では、LNCaP、C4-2、C4-2AT6 という徐々にアンドロゲン非依存性を獲得する 3 種類のヒト前立腺癌細胞株を用いた。AT1R を介した MCP-1 の制御について免疫染色、ウェスタンブロット法、および ELISA 法を用いて検討した。ARB はカンデサルタン (in vivo; TCV116, in vitro; CV11974) を用いた。

4. 研究成果

臨床検体において Gleason score 7 以上、

pT3 以上および CRPC 症例は低悪性度の症例に比べて、腫瘍組織領域における MCP-1 の発現ならびにマクロファージの浸潤が有意に多かった (Figure 1)。各種パラメータを用いた多変量解析の結果、5 年 PSA 再発に関する独立危険因子は術前 PSA 15ng/ml 以上 ($p=0.009$, HR 2.48) と MCP-1 高発現 ($p<0.05$, HR 2.20) であった。

Figure 1



この結果を踏まえ、臨床的に PSA 再発を抑制するうえで、MCP-1 の発現制御機構を見出す必要があると考えた。

In vivo, in vitro の検討では、LNCaP、C4-2、C4-2AT6 という徐々にアンドロゲンの依存性が低下し、高悪性化する 3 種のヒト前立腺癌細胞株を用いた。各種皮下腫瘍モデルを作成し、同腫瘍の AT1R および MCP-1 の発現を検討した。もっとも悪性度の高い C4-2AT6 皮下腫瘍において、ともに最も発現が有意に高かった (Figure 2)。つぎに C4-2AT6 モデルを用いて、ARB による MCP-1 の発現およびマクロファージの浸潤抑制効果を検討した。ARB (TCV116 (10mg/kg)) によって MCP-1 の発現とマクロファージの浸潤を有意に抑制し得た (Figure 3)。

Figure 2

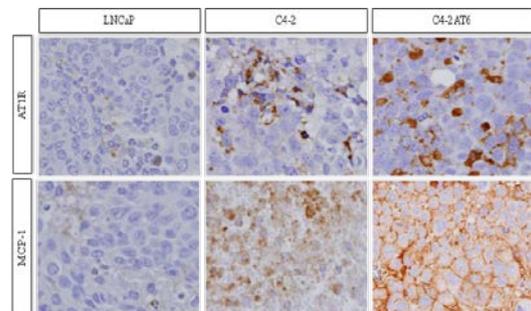
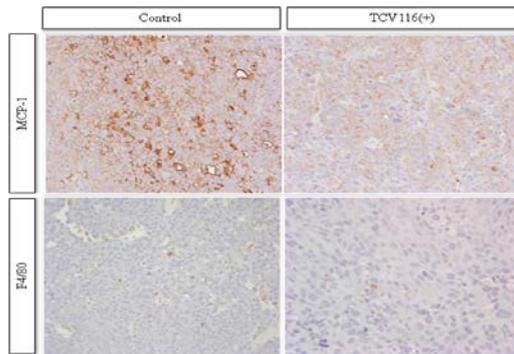


Figure 3



In vitro においても LNCaP、C4-2、C4-2AT6 と徐々に MCP-1 の基礎分泌量が増加していることが分かった。LNCaP 細胞は AngII や ARB(CV11974) の刺激に有意な反応を示さなかった。C4-2 細胞は AngII (10^{-8} M) 刺激によって有意な MCP-1 の発現上昇を認め、ARB (10^{-7} M) による有意な抑制効果を認めた。しかし C4-2AT6 細胞では C4-2 細胞よりもさらに著明な反応を示した(Figure 4)。そこで C4-2AT6 細胞を用いて AT1R を介した MCP-1 発現のシグナル伝達を検討した。Western blot 法により、Stat 系や MAPK 系などの主なシグナル分子のリン酸化レベルを検討し、その中で PI3K/Akt 系の関与が強く示唆された。C4-2AT6 細胞において AngII 刺激によって増大する MCP-1 の発現は PI3K 阻害剤によって有意な抑制効果を示した(Figure 5)。

Figure 4

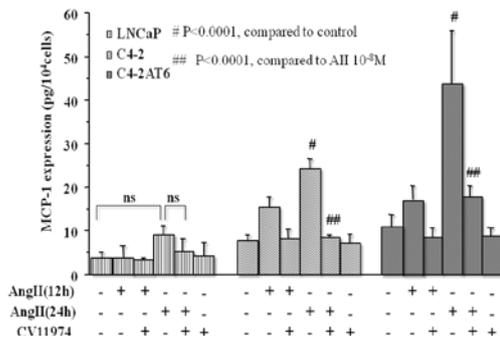
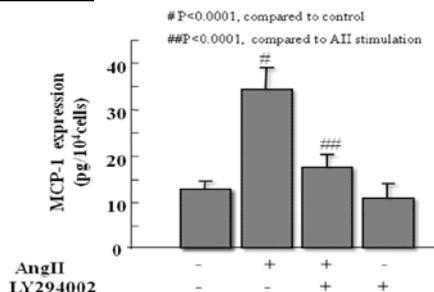


Figure 5



すなわち前立腺癌の高悪性度症例や CRPC 症例において MCP-1 の発現およびマクロファージの浸潤が高く、とくに MCP-1 の高発現は PSA 再発の独立危険因子のひとつであったことから、MCP-1 の制御機構の解明が前立腺癌の進展および骨転移に関する分子機構の解明につながり、さらには治療標的となりうることを示唆された。本検討において、AngII/AT1R-PI3K/Akt pathway が去勢抵抗性前立腺癌における MCP-1 の発現制御機構のひとつであることが示された。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Tanaka N, Kikuchi E, Shirotake S, Kanako K, Matsumoto K, Kobayashi H et al, The predictive value of C-reactive protein for prognosis in patients with upper tract urothelial carcinoma treated with radical nephroureterectomy: a multi-institutional study, Eur Urol, in press, 2012, 査読有

(2) Shirotake S, Miyajima A, Kosaka T, Tanaka N, Kikuchi E, Mikami S, Okada Y, Oya M, Regulation of monocyte - chemoattractant protein-1 through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer, Am J Pathol, 2012;180(3):1008-16, 査読有, doi:

10.1016/j.ajpath.2011.11.027.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 城武卓、宮嶋哲、小坂威雄、菊地栄次、大家基嗣、前立腺癌におけるアンジオテンシン II 1 型受容体を介した MCP-1 の発現制御に関する検討、第 101 回日本泌尿器学会総会、北海道、2013 年 4 月 26 日

(2) 宮嶋哲、城武卓、小坂威雄、菊地栄次、大家基嗣、前立腺癌における MCP-1 の発現制御に関する検討、第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会、京都、2012 年 6 月 28 日

(3) Suguru Shirotake, Akira Miyajima, Takeo Kosaka, Nobuyuki Tanaka, Eiji Kikuchi, Mototsugu Oya The regulation of MCP-1 expression through angiotensin II type 1 receptor in castration-resistant prostate cancer, American urological

association annual meeting 2012, Atlanta,
USA, May 21, 2012

[その他]
ホームページ等
<http://www.keio-urology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城武 卓 (SHIROTAKE SUGURU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10528805