

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861290

研究課題名(和文)膀胱癌微小環境中のCXCL1発現と尿中Exosome内CXCL1検出の臨床応用

研究課題名(英文)CXCL1 signaling is a crucial mediator between cancer cells and tumor-associated macrophages/cancer-associated fibroblasts for tumor invasion and progression in microenvironment of human bladder cancer

研究代表者

三宅 牧人(Miyake, Makito)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80601400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍組織の微小環境において、腫瘍関連マクロファージ(Tumor-associated macrophages, TAM)および癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)の存在が予後不良因子であることが報告されている。

本研究では、尿路上皮癌の増殖、浸潤、転移に関連するケモカイン CXCL1 の微小環境に及ぼす影響とそのメカニズムを解明し、創薬・治療の開発に役立てることを目的とした。また、血中・尿中エクソソームに含まれる CXCL1 を検出し、尿路上皮癌の新たなバイオマーカーとしての可能性を併せて検討した。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated macrophages (TAMs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) are reported to have association with poor prognosis, depending on their tumor-supportive roles. Current knowledge of TAMs and CAFs in tumor microenvironment of urothelial cancer the bladder (UCB) is limited. Here, we focused on the biological behavior of CXCL1 signaling for induction of TAMs/CAFs which support the tumor growth and angiogenesis. In conclusion, CXCL1 signaling in tumor microenvironment may be highly responsible for repeated intravesical recurrence and disease progression through enhanced invasion ability. Breaking the CXCL1 signaling is an attractive therapeutic approach for human UCB in which this chemokine is aberrantly regulated.

研究分野：Bladder cancer

キーワード：Bladder cancer tumor micro environment macrophage fibroblast

1. 研究開始当初の背景

ケモカインの一つである CXCL1 は白血球の遊走をはじめとする炎症関連ケモカインとして知られているが、近年各種悪性腫瘍において、細胞増殖、浸潤、進展に関与することが報告されている(引用文献)。我々はヒト膀胱癌および前立腺癌の検体を用いた免疫組織学的染色を実施し、CXCL1 発現レベルは正常上皮細胞と比較して腫瘍細胞において有意に高いことを示した。またいずれの癌においても、高細胞異型度 (tumor grade/Gleason pattern) および高進展度 (T) と CXCL1 発現レベルは関連しており、腫瘍進展・転移に CXCL1 は重要な役割を担っている可能性が示唆される。さらに、膀胱癌において CXCL1 の発現レベルは予後不良因子となっていた(引用文献)。

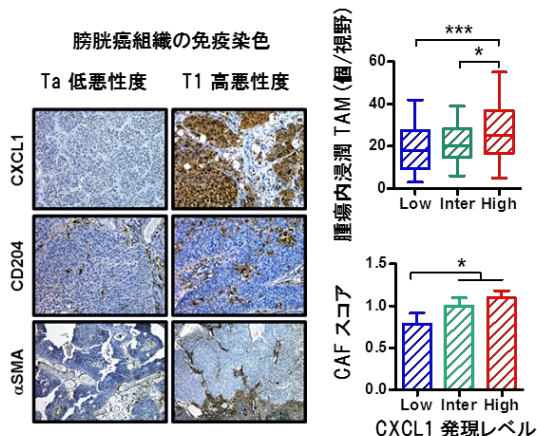
近年、腫瘍細胞そのものだけでなく腫瘍周囲の間質細胞において種々のケモカインの発現亢進が指摘されている。腫瘍関連性繊維芽細胞 (Cancer associated fibroblast, CAF)、腫瘍関連性マクロファージ (Tumor associated macrophage, TAM)、腫瘍関連性血管内皮細胞 (Tumor associated endothelial cell, TEC) などのがん細胞をとりまく間質細胞、免疫細胞のすべてが癌の進行に関与している可能性があり、そのクロストークを担う因子としてケモカインが注目されている。

2. 研究の目的

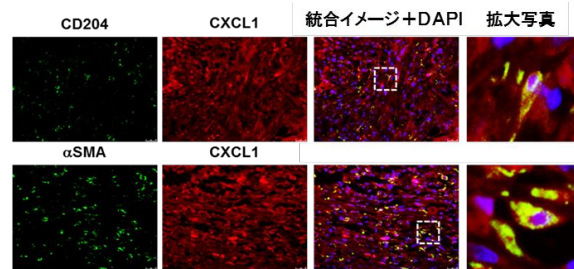
- (1) 尿路上皮癌の増殖、浸潤、転移に関連するケモカイン CXCL1 の微小環境に及ぼす影響とそのメカニズムを解明し、創薬・治療の開発に役立てることを目的とした。
- (2) 血中および尿中エクソソームに含まれる CXCL1 を検出し、尿路上皮癌の新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。

3. 研究の方法

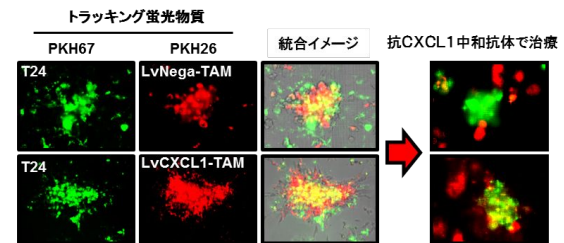
- (1) ヒト膀胱癌組織パラフィン包埋切片を用いた免疫組織学的染色：膀胱癌において発現する CXCL1 は、周囲の TAM および CAF の誘導を促進していた。



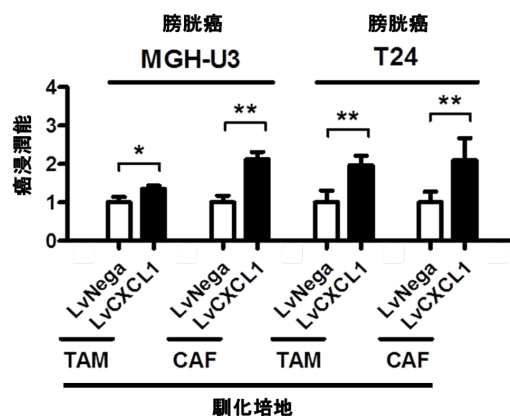
また、蛍光二重染色を行うことで、TAM および CAF の一部は、CXCL1 を発現していることが明らかとなった。



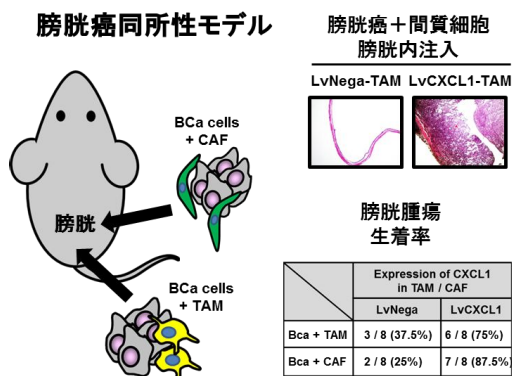
- (2) 3D 培養モデルでの癌細胞と TAM および CAF の干渉作用：癌細胞と間質細胞のスフェロイドを作成し、それぞれの融合形態や細胞機能・形質の変化を評価した。CXCL1 が発現している TAM や CAF (レンチウイルスベクター：LvCXCL1) においては、発現していないもの(コントロールベクター：LvNega)と比較すると、癌細胞との接着・干渉が有意に亢進されていた。



- (3) TAM および CAF の腫瘍細胞への癌細胞浸潤促進効果の検討：LvCXCL1-TAM または LvCXCL1-CAF から採取された腫瘍細胞は、LvNega コントロールと比較して有意に癌浸潤を促進していた。CXCL1 を端とする液性因子の変化が癌細胞へと働きかけ、免疫をもたらずものと考えられた。



(4) 同所性・異所性マウスモデルを用いた TAM, CAF の膀胱癌の生着・増殖の足場機能の解析：同所性モデルとして SCID マウスを用いた膀胱内同所性腫瘍の作成, 異所性モデルとして nude マウスを用いた皮下腫瘍の作成を実施した。TAM および CAF を膀胱癌細胞株と混ぜ合わせ, 膀胱内, 皮下へと注入した。いずれのモデル, いずれの間質細胞においても, LvNega コントロールと比較したとき, Lvcxcl1 発現間質細胞と混注した腫瘍のほうが生着率・増殖能が有意に高いことが示された。間質細胞から産生される CXCL1 が癌微小環境において重要な働きを有することが明らかとなった。

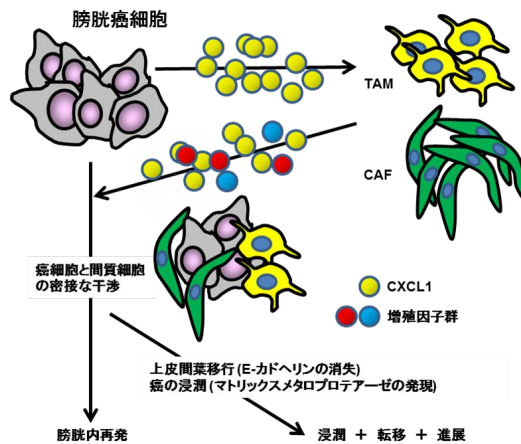


(5) 血中・尿中エクソソーム内 CXCL1 の評価：膀胱癌細胞株の上清および膀胱癌患者の経尿管的腫瘍切除前の尿試液を採取し, エクソソームを抽出した (JSR ライフサイエンス ExoCap キット) を用いた。エクソソーム中の CXCL1 発現を RNA, タンパクレベルで定量したが, CXCL1 の発現は認められず, その後の臨床試液を用いた検討は行っていない。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌治療において最も重要な解決すべき課題のひとつは, 転移性進行尿路上皮癌, 特に既存の化学療法抵抗性の癌であり, 非常に予後不良である。現在のところ有転移性尿路上皮癌の初期化学療法は, Gemcitabine と Cisplatin を併用する GC 療法が標準治療として施行されているが, 早期から抵抗性を示す症例も少なくない。この現状を克服するためには, これまでのように癌細胞や血管内皮細胞 (血管新生) のみをターゲットとした基礎研究には限界があり, 本研究のように腫瘍間質に存在する CAF や TAM など を広く視野にいれた研究が必要と考

えた。実際, 他癌種においては間質細胞と腫瘍抵抗性の密な関連性が明らかとなりつつある。本研究では, 膀胱癌の化学療法抵抗性のメカニズムの解明を目的として, 膀胱癌の微小環境における CXCL1 と腫瘍間質細胞との関連を模索した。要約すると, 膀胱癌細胞は CXCL1 を産生し, macrophage, 線維芽細胞を周囲に誘導し, それらを TAM および CAF へと変換する機能を有している。また, それらの間質細胞は自らも CXCL1 を発現し, 癌細胞へと逆に働きかけ, 癌の浸潤や上皮間葉移行を促進する。



このように, 間質 腫瘍生存経路の主役を担っていることが示唆された CXCL1 を抑制, 破壊することが, 膀胱癌の再発抑制や化学療法耐性化予防に有用であると期待している。

(2) 今回, 血中および尿中エクソソーム中の CXCL1 を解析し, その臨床的有用性の検討を予定した。これまでに同様の報告はなく新たな試みとなったが, CXCL1 mRNA やタンパクは, エクソソーム内で検出されなかった。今後新たなターゲットを模索する。

(3) CXCL1 をはじめとした低分子ケモカインの癌における役割はまだ不明な点が多く, その可能性は大きいと考える。本研究の結果は, 新たなバイオマーカー・治療予測因子の発見と, 抗癌剤抵抗性を克服の一助になると期待される。

<引用文献>

Miyake M, et al.: Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. Lab Invest. 2013, 93: 768-778.

Miyake M, et al.: Chemokine (C-X-C) ligand 1 (CXCL1) protein expression is increased in aggressive bladder cancers. BMC Cancer. 2013, 13:322.

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)

第74回日本癌学会学術総会

2015年10月8 - 10日、名古屋

第7回 Chungbuk-Nara Urological Forum

2015年9月20日、ソウル、韓国

第31回欧州泌尿器学会議 (EAU 2016)

2016年3月11日-15日、ミュンヘン、ドイツ

[その他]

ホームページ等

<https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-26861290/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 牧人 (MIYAKE, Makito)

奈良県立医科大学, 医学部, 助教

研究者番号: 80601400