

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15056

研究課題名(和文)腫瘍リンパ節転移を抑制する新治療戦略：生理活性脂質による前転移ニッチ形成の制御

研究課題名(英文)Prostanoid regulates premetastatic niche formation in lung cancers

研究代表者

馬嶋 正隆 (Majima, Masataka)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70181641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんのリンパ節転移は重要な予後決定因子であるが、その分子メカニズムの解明は遅れている。多くの腫瘍細胞が転移前段階(premetastatic phase)において、特定の器官により転移しやすい傾向があることが知られており、この転移を助長する状況(premetastatic niche)を形成することで転移を促進することが血行性転移の過程で報告されている。内因性のPGがpremetastatic niche形成の増強を介して、がんのセンチネルリンパ節転移を増強していることを明らかに出来た。COX-2阻害やEP3シグナルを遮断することが、がんのリンパ節転移を抑制する標的になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The lymphatic system is an important route for cancer dissemination, and lymph node metastasis (LNM) serves as a critical prognostic determinant in cancer patients. We investigated the contribution of COX-2-derived prostaglandin E2 (PGE2) in the formation of a premetastatic niche and LNM. A murine model of Lewis lung carcinoma (LLC) cell metastasis revealed that COX-2 is expressed in DCs from the early stage in the lymph node subcapsular regions, and COX-2 inhibition markedly suppressed mediastinal LNM. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) was elevated in DCs before LLC cell infiltration to the lymph nodes, and a COX-2 inhibitor, an SDF-1 antagonist, and a CXCR4 neutralizing antibody all reduced LNM. Moreover, LNM was reduced in mice lacking the PGE2 receptor EP3, and stimulation of cultured DCs with an EP3 agonist increased SDF-1 production. These results indicate that DCs induce a premetastatic niche during LNM via COX-2/EP3-dependent induction of SDF-1.

研究分野：薬理学

キーワード：前転移ニッチェ プロスタグランジン EP3受容体 SDF-1 COX-2 樹状細胞 リンパ節 リンパ管新生

## 1. 研究開始当初の背景

がんのリンパ節転移は重要な予後決定因子であり、リンパ管はがんの進展に関わる重要なルートの一つである。血行性転移の分子機構や血管新生による増強メカニズムについては解明されつつあるが、リンパ節転移に関してはその分子メカニズムの解明や治療標的の特定が遅れている。多くの腫瘍細胞が転移前段階(**premetastatic phase**)において何らかの分子機構により、特定の器官により転移しやすい傾向があることが広く知られており、この転移を助長する状況(**premetastatic niche**)を形成することで転移を促進することが血行性転移の過程で報告されている。しかし、リンパ行性転移でのリンパ節における **premetastatic niche** の形成の有無、さらに転移メカニズムについてはまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

そこで、我々は肺がんの所属リンパ節転移モデルを作成し、肺がんリンパ節転移における **premetastatic niche** の形成の有無を検討し、**niche** 形成における COX および PG の役割を解明した。転移が成立するリンパ節微小循環における cytokine (SDF-1/CXCR4、TGF- $\beta$  など)や免疫担当細胞(dendritic cells, regulatory T cells)の動態と役割につき、**premetastatic niche** 形成の有無を検討し、リンパ節転移メカニズムについて解析した。

## 3. 研究の方法

野生型マウス (WT) および PG 受容体ノックアウトマウス (KO) に GPP 発現ルイス肺がん細胞 (GFP-LLC) を肺実質に穿刺・移植し、門部所属リンパ節への GFP-LLC の転移を経時的に蛍光画像、GFP の real time PCR 等で評価する。COX-2 由来の内因性の PG が前転移ニッチ形成に関わっていることが推定され、関与する受容体の特定を行う。肺門部リンパ節を採取、COX-2、mPGES-1 などの PGE<sub>2</sub> 産生系の発現、受容体の発現を調べる。

## 4. 研究成果

我々は、原発巣の増殖に伴い、所属リンパ節でごく早期から COX-2 が誘導され、COX-2 依存性に産生された PGE<sub>2</sub> が EP3 刺激することによりケモカインである stromal cell derived factor (SDF)-1 の発現増大が subcapsular region で生じ **premetastatic**

**niche** を形成すること、さらに、COX-2 陽性の SDF-1 産生は樹状細胞であり、EP3 依存性に TGF- $\beta$  を産生することで regulatory T cell (Tregs)を動員することによって免疫寛容が生じ、腫瘍転移を増強させることを証明した。

Lewis lung carcinoma(LLC) 細胞を Matrigel®と混合し、マウス左肺に直接移植することにより、肺癌リンパ節転移モデルを作成した。このモデルでは、通常腫瘍接種後 10 日から 12 日目に縦隔リンパ節への腫瘍の転移を認め、腫瘍接種後 21 日目にはほぼ全例死亡する。転移リンパ節に COX-2 による免疫染色を行うと、腫瘍転移前の早期の段階で subcapsular sinus の部位に経時的に増強する COX-2 の陽性像が確認できた。この COX-2 の役割を解析するため、COX-2 inhibitor (celecoxib)を毎日経口投与し、vehicle 群と比較したところ、接種した原発腫瘍の大きさには特段有意差は認められず、celecoxib 投与群においてリンパ節への転移が有意に抑制された。同様のリンパ節への転移の有意な抑制は、EP3 ノックアウトマウスでも認められ、これらの結果から COX-2 依存性に産生された PGE<sub>2</sub> が EP3 signaling を介してリンパ節転移を増強することがわかった。

我々はこれまでに、腫瘍増殖に伴って形成されるストローマ組織において、PG が形成増強作用を発揮していることを報告している。多くのケモカイン系とその受容体の評価を行ったところ、中でも SDF-1 がストローマの主要構成骨髄細胞の動員に役割を持つことが判明した。リンパ節に腫瘍細胞が動員、接着することが **niche** 形成の上で重要であることは想像に難くない。事実、subcapsular 領域におけるケモカイン系の発現を調べると、確かに SDF-1 の発現が腫瘍接種に伴って、ごく早期から高まってきていた。COX-2 および内因性 PG の関与について検討すると、PG receptor 内で EP3 が最も高発現を呈し、マウスに celecoxib 投与した群において vehicle 群と比較し、リンパ節内 subcapsular sinus における前転移状態(pre-metastatic phase)での SDF-1 発現の低下が確認できた。vehicle 群において、リンパ節転移成立後のリンパ節の subcapsular sinus における SDF-1 陽性部分は腫瘍細胞と一致しており、この部位が転移の温床となることが確認され、celecoxib 群では有意に抑制されていることがわかった。

また、SDF-1 antagonist (AMD3100)・CXCR4 中和抗体および EP3 ノックアウトマウスを用

いた実験でも、vehicle 群に比べ、リンパ節転移の抑制を確認した。この結果から、あらかじめ特定の場所 (premetastatic site) に誘導された COX-2 由来の PGE<sub>2</sub> が EP3 signaling を介して SDF-1/CXCR4 axis の signaling により、premetastatic niche を形成していることが判明した。

さらに、いかなる細胞構成成分が premetastatic niche 形成に関与し、COX-2 や SDF-1 の制御のもとで役割を發揮しているのか検討した。我々が注目してきた腫瘍ストローマ組織のマクロファージや fibroblast に加えて、免疫担当細胞のある種の細胞集団が、がんの増殖や血管新生、加えて転移メカニズムを制御することわかってきた。その中でも DCs や regulatory T cells (Tregs) が、がんの増殖や転移に関連していると報告され、その機能の調節に PGs が関わっていることが、明らかにされつつある。われわれはこれらの細胞群に注目し、premetastatic niche を形成に関与するか検討を加えた。

DCs マーカーである CD11c・IDO と COX-2・SDF-1 を用いて免疫染色を用いて解析すると、DCs は COX-2 および SDF-1 陽性であり、vehicle 群に比べると celecoxib、SDF-1 antagonist (AMD3100)、CXCR4 中和抗体処置群のリンパ節内 subcapsular sinus での発現量が有意に低下していた。以上から、腫瘍接種という刺激を受け、premetastatic site に遊走した DCs が SDF-1 を産生し、premetastatic niche を形成することが示唆された。さらに、DCs の遊走に非常に関連しているとされる CCR7 のリンパ節での発現を調べると、vehicle 群に比べ有意に抑制されていた。また in vitro で、この DCs に EP3 agonist を添付すると野生型マウス由来 DCs からは SDF-1/TGF-β の分泌の亢進が確認された。FoxP3 陽性の Treg のリンパ節内 subcapsular sinus への集族は、COX-2 阻害薬処置マウス、EP3 ノックアウトマウスで有意に抑制された。

以上のように、COX-2 由来の PGE<sub>2</sub> シグナルにより転移前段階で転移好発部位に樹状細胞が動員され、同樹状細胞が SDF-1 を分泌することで premetastatic niche を形成することが判明した。そこには Treg の動員が認められ、転移した腫瘍細胞の免疫学的寛容に、この COX-2/EP3 依存性の Treg の動員が関与している可能性もある。また、PGE<sub>2</sub>-EP3 signaling が premetastatic phase におけるリンパ節内リンパ管新生に役割を持っていることも判明した。

血管新生とリンパ管新生の研究領域は、現

在もっとも注目されているものの一つである。その理由は、がんをはじめとする重篤な疾患に血管系の新生が深く関与することが明白となったこと、また VEGF を含む血管制御の中心的システムが明らかとなったことによる。血管新生の場合と同様に、リンパ管新生においても、アラキドン酸代謝物の PGs が、VEGF システムとの相互作用を介して、リンパ管新生増強因子として重要であることが判明した。血管系に関してわれわれの知識がさらに豊富になれば、人為的な血管制御によってさまざまな疾患の進行を遅らせ、あるいは治癒させることが可能になると期待される。病態時のリンパ組織においては、神経系のそれと類似した可塑性が認められる。がんのリンパ行性転移の制御においても所属リンパ節の可塑性をコントロールすることは極めて重要である。病態時のリンパ管新生、リンパ組織の可塑性を制御するプロスタノイド研究の成果は、多くの難治性の疾患治療に進展をもたらすことが期待される。

## 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 15 件)

1. Hosono K, Isonaka R, Kawakami T, Narumiya S, Majima M. Signaling of prostaglandin E receptors, EP3 and EP4 facilitates wound healing and lymphangiogenesis with enhanced recruitment of M2 macrophages in mice. *PLoS One*. 2016 Oct 6;11(10):e0162532. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0162532.
2. Kojo K, Ito Y, Eshima K, Nishizawa N, Ohkubo H, Yokomizo T, Shimizu T, Watanabe M, Majima M. BLT1 signalling protects the liver against acetaminophen hepatotoxicity by preventing excessive accumulation of hepatic neutrophils. *Sci Rep*. 11, 29650, (2016). 査読あり doi:10.1038/srep29650.
3. Matsuda H, Hosono K, Tsuru S, Kurashige C, Sekiguchi K, Akira S, Uematsu S, Okamoto H, Majima M. Roles of mPGES-1, an inducible prostaglandin E synthase, in

- enhancement of LPS-induced lymphangiogenesis in a mouse peritonitis model. *Life Sci.* 142, 1-7. (2015). 査読あり doi:10.1016/j.lfs.2015.10.008.
4. Okizaki SI, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Kojo K, Nishizawa N, Shibuya M, Shichiri M, **Majima M**. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Type 1 Signaling Prevents Delayed Wound Healing in Diabetes by Attenuating the Production of IL-1 $\beta$  by Recruited Macrophages. *Am J Pathol.* 186,1481-1498, (2016). 査読あり doi:10.1016/j.ajpath.2016.02.014.
  5. Maehana S, Nakamura M, Ogawa F, Imai R, Murakami R, Kojima F, **Majima M**, Kitasato H. Suppression of lymphangiogenesis by soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in a mouse lung cancer model. *Biomed Pharmacother.* 2016 Dec;84:660-665. 査読あり doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.083.
  6. Amano H, Nakamura M, Ito Y, Kakutani H, Eshima K, Kitasato H, Narumiya S, **Majima M**. Thromboxane A synthase enhances blood flow recovery from hindlimb ischemia. *J Surg Res.* 2016 Jul;204(1):153-63. 査読あり doi: 10.1016/j.jss.2016.04.011.
  7. Park K, Amano H, Ito Y, Kashiwagi S, Yamazaki Y, Takeda A, Shibuya M, Kitasato H, **Majima M**. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) signaling enhances angiogenesis in a surgical sponge model. *Biomed Pharmacother.* 2016 Mar;78:140-9. 査読あり doi:10.1016/j.biopha.2016.01.005.
  8. Fujita T, Soontrapa K, Ito Y, Iwaisako K, Moniaga CS, Asagiri M, **Majima M**, Narumiya S. Hepatic stellate cells relay inflammation signaling from sinusoids to parenchyma in mouse models of immune-mediated hepatitis. *Hepatology.* 2016 Apr;63(4):1325-39. 査読あり doi: 10.1002/hep.28112.
  9. Amano H, Kato S, Ito Y, Eshima K, Ogawa F, Takahashi R, Sekiguchi K, Tamaki H, Sakagami H, Shibuya M, **Majima M**. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Signaling in the Recovery from Ischemia. *PLoS One* 10, e0131445, (2015). 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0131445.
  10. Horikawa S, Ishii Y, Hamashima T, Yamamoto S, Mori H, Fujimori T, Shen J, Inoue R, Nishizono H, Itoh H, **Majima M**, Abraham D, Miyawaki T, Sasahara M. PDGFR $\alpha$  plays a crucial role in connective tissue remodeling. *Sci Rep.* 5, 17948. (2015). 査読あり doi: 10.1038/srep17948.
  11. Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Tamaki H, Ogawa F, Iyoda A, Shibuya M, Kumagai Y, Satoh Y, **Majima M**. The role of vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling in compensatory contralateral lung growth following unilateral pneumonectomy. *Lab Invest.* 95, 456-468, (2015). 査読あり doi: 10.1038/labinvest.2014.159.
  12. Amano H, Ito Y, Eshima K, Kato S, Ogawa F, Hosono K, Oba K, Tamaki H, Sakagami H, Shibuya M, Narumiya S, **Majima M**. Thromboxane A<sub>2</sub> induces blood flow recovery via platelet adhesion to ischaemic regions. *Cardiovasc Res.* 2015 Sep1;107(4):509-21. 査読あり doi: 10.1093/cvr/cvv139.
  13. Minamino T, Ito Y, Ohkubo H, Shimizu Y, Kojo K, Nishizawa N, Amano H, Narumiya S, Koizumi W, **Majima M**. Adhesion of platelets through thromboxane A<sub>2</sub> receptor signaling facilitates liver repair during acute chemical-induced hepatotoxicity. *Life Sci.* 2015 Jul 1;132:85-92. 査読あり doi: 10.1016/j.lfs.2015.03.015.
  14. Kamata M, Hosono K, Fujita T,

Kamata K, **Majima M**. Role of cyclooxygenase-2 in the development of interstitial fibrosis in kidneys following unilateral ureteral obstruction in mice. *Biomed*

*Pharmacother*. 2015 Mar;70:174-80.

査読あり

doi:10.1016/j.biopha.2015.01.010.

15. Okizaki S, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Amano H, Shichiri M, **Majima M**. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- $\beta$ 1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother*. 2015 Mar;70:317-25. 査読あり doi: 10.1016/j.biopha.2014.10.020.

〔学会発表〕（計 1 件）

1. Amano H., Takahashi R., **Majima M**. An inducible mPGES-1 promotes lung metastasis via SDF-1/CXCR4-mediated recruitment of MDSCs. 第 9 0 回 日本薬理学会年会、シンポジウム、長崎、ブリックホール、平成 2 9 年 3 月 1 5 日.

〔図書〕（計 1 件）

1. **馬嶋正隆**、第 4 章生理活性物質ブラジキニン、NEW 薬理学第 7 版、南江堂、2 0 1 7 年 3 月 3 0 日発行、1 9 0 - 1 9 2 ページ.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬嶋 正隆 (MAJIMA, Masataka)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70181641

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )