

令和元年6月4日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10998

研究課題名(和文) Androgen/ARシグナルの抑制によるCCL20を介した免疫寛容誘導の解明

研究課題名(英文) Induction of immune tolerance via CCL20 during inhibition of androgen/AR signaling

研究代表者

泉 浩二 (IZUMI, Kouji)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：80646787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：進行前立腺癌に対するアンドロゲン除去療法は有効であるが、いずれ無効な状態となる。アンドロゲン受容体シグナルが抑制されることによって、前立腺癌細胞の増殖は抑制されるが、前立腺癌細胞からCCL20が分泌され、癌細胞自身(あるいは近傍の前立腺癌細胞)に作用し、結果的に前立腺癌細胞の転移能を高める可能性が明らかとなった。また転移能が高い前立腺癌細胞からはCCL20が多く分泌されており、CCL20が転移能を高めている可能性が裏付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで前立腺癌におけるCCL20の役割について報告した研究はなく、CCL20が前立腺癌に及ぼす影響は未知であった。CCL20単独で進行前立腺癌の悪化を予測するバイオマーカーとなる可能性があるだけでなく、すでに知られているCCL2や他の分泌蛋白と併用して、優れた血清バイオマーカーとなる可能性が考えられる。現在根治療法の見込めない進行前立腺癌に対する新たな治療のターゲットとして、さらなる研究の促進が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：The curative effects of androgen-deprivation therapy may become severely compromised when the prostate cancer cells develop into a castration-resistant stage. Blockade of androgen-androgen receptor signaling inhibited prostate cancer cell proliferation; however, it could increase metastatic ability of prostate cancer cells via CCL20 by autocrine manner. Prostate cancer cells with high metastatic ability also showed high expression of CCL20, suggesting that CCL20 adds metastatic potential to prostate cancer cells.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 アンドロゲン受容体 ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌に対する androgen/androgen receptor (AR)シグナルをターゲットとした androgen-deprivation therapy (ADT)は、しばらく病勢をコントロールすることができるが、いずれ耐性を獲得した状態の castration-resistant prostate cancer (CRPC)となる。CRPCは未だ根治を望める治療が存在せず、新たな治療法の開発のためにはCRPCのメカニズムの全貌を解明することが必要である。CRPCのメカニズムについては androgen/ARシグナルの活性の有無によって二つに分けられると考えている。一つは androgen/ARシグナルがなお癌細胞を活性化させる状態 (androgenに高感受性あるいは恒常的に活性化した状態など)であり、我々は、副腎性 androgenが前立腺癌の再燃を引き起こすこと (Int J Urol 2010;17:337-45) や、癌微小環境での androgen 生合成に骨由来間質細胞が関与していること (Endocr Relat Cancer 2009;16:1139-55)を明らかにしてきた。もう一方は androgen/ARシグナルの活性化が逆に癌細胞の浸潤・転移活性を抑えている (すなわち、androgen/ARシグナルを抑制すると癌細胞が活性化) 状態で、この二つの病態は相互排他的なものではなく、同一患者においてもモザイク状に細胞群を形成しているものと考えている。近年注目されている癌細胞の不均一性という観点からすると、二つの異なるなるべくとる指向性をもつ細胞群が同時に存在することは癌進展に好都合な環境であり、一つのターゲットに対する治療では根治が難しい臨床の状況とよく合致している。

現在、特に後者のメカニズムの解明に向け研究を重ねており、ADTにより androgen/ARシグナルが抑制されることでケモカイン CCL2の分泌が亢進し、TAMを介して癌細胞に epithelial-mesenchymal transition (EMT)をもたらし、浸潤・転移を促進すること (EMBO Mol Med 2013;5:1383-401)や、enzalutamideに対する耐性獲得機序としても STAT3-CCL2経路を介した TAMの活性化が重要な役割を果たしていること (Cell Death Dis 2013;4:e764)を明らかにした。このように、androgen/ARシグナルを抑制すると免疫環境が大きく変化することが明らかとなってきたが、最近ではCRPC患者においてはMDSCやTregが増加しており、癌の進展に寄与しているとの報告があり、androgen/ARシグナルがこれら免疫寛容の誘導にどのような役割を果たしているのかは非常に興味深いところである。

これまでに、遊走能試験用の有孔トランスウェルを通り抜け、下の槽に接着したヒト前立腺癌細胞株 C4-2(mig)を採取し、元の親細胞(prt)と比較したところ、高い遊走能を有すると考えられる migはAR蛋白の発現が低下しており、その発現低下に反比例するようにEMTを示唆する変化 (N-cadherin 亢進と E-cadherin 低下) が認められることを明らかにした。さらに、migではTGF- $\beta$ 1の発現が亢進していた点と、ケモカインPCRアレイの結果、これまでに我々が報告したCCL2の他にはケモカインの中で唯一CCL20の発現だけがmigで著しく亢進していた点に注目した。TGF- $\beta$ 1はmyeloid-derived suppressor cell (MDSC)を活性化し、MDSCはregulatory T cell (Treg)を活性化する。naïve CD4(+) T cellからTregへの分化にもTGF- $\beta$ 1が必要である。CCL20は癌組織内へTregをリクルートする可能性があることが報告されているが、前立腺癌微小環境において果たす機能は全く明らかにされていない。このように、前立腺癌細胞はandrogen/ARシグナルの活性低下・EMT誘導と同時に、TGF- $\beta$ 1やCCL20などの腫瘍免疫抑制に関わる分子を分泌、免疫寛容を誘導し、さらなる前立腺癌の増悪を引き起こしている可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

いくつかの研究グループから androgen/ARシグナルの抑制が前立腺癌の転移・浸潤を促進する可能性が報告されているが、そのメカニズムの全貌は未だ明らかではない。我々の予備的な実験結果からはC4-2での androgen/ARシグナルの抑制とTGF- $\beta$ 1やCCL20の分泌亢進の関連性が示唆されている。そこでまず、他のヒト前立腺癌細胞株を使用し、多数の細胞株で同様の結果が普遍的に得られることを確認する。遺伝子レベルだけではなく、分泌蛋白としてのこれらの発現レベルを定量的に評価する。本研究で焦点を当てるCCL20は、その誘導経路や機能についてはほとんど明らかにされていないため、androgen/ARシグナルがどのようにCCL20を制御しているのかを解析する。CCL20が前立腺癌細胞に (autocrine的に) 及ぼす作用や免疫寛容に関連する細胞への及ぼす作用を明らかにする。CCL20の受容体であるCCR6の発現は、細胞にCCL20の作用を発揮させるためには必須であり、様々な条件下でCCR6の発現についても解析する。本研究ではCCL20をCRPCにおける前立腺癌細胞活性化因子の一つと考え、癌増悪に関する分子機構を明らかにすることで、CRPCにおける転移・浸潤を制御できるような治療法の開発につなげたいと考えている。

## 3. 研究の方法

- (1) AR陽性ヒト前立腺癌細胞株 LNCaPを用いてCCL20の発現を検討した。コントロールのLNCaP(LNCaP-NC)と、ARをsmall interference RNAにてノックダウンしたLNCaP-siARにおけるCCL20の発現をPCRにて比較した。関連する他のケモカインについてもPCRを行い、比較した。
- (2) 去勢抵抗性モデルであるC4-2BとLNCaPを用いてウェスタンブロットにてARの発現の有無でのCCL20の発現の相違を比較した。また、CCL20の受容体CCR6のタンパクレベルの変化

- も比較した。ELISAにてCCL20の分泌量を定量、比較した。
- (3) ARの有無による上記前立腺癌細胞の表現型の変化を比較した。
  - (4) 遊走能試験用の有孔トランスウェルを通り抜け、下の槽に接着したヒト前立腺癌細胞株(mig)を採取し、元の親細胞(prt)とCCL20の発現レベル、表現型を比較した。
  - (5) 前立腺癌細胞へのCCL20の添加による表現型の変化を比較した。

#### 4. 研究成果

- (1) まず、LNCaPのARをノックダウン(LNCaP-siARの作成)し、PCRとウェスタンブロットにより、ARレベルが抑制されていることを確認した。続いて、メッセージレベルでCCL20やCCL2の発現を比較したところ、LNCaP-siARではLNCaP-NCと比較し明らかに亢進していた。さらに蛋白レベルでもLNCaP-siARではCCL20の発現が亢進していた。一方、CCL20の受容体CCR6に関しては、LNCaP-siARとLNCaP-NCで蛋白レベルにおいてはほとんど変化が認められなかった。C4-2B-siARでもC4-2B-NCと比較しCCL20の蛋白レベルは明らかに亢進していたが、LNCaP同様にCCR6に関しては、C4-2B-siARとC4-2B-NCで蛋白レベルにおいてはほとんど変化が認められなかった。ELISAにおいてもLNCaP-siARとC4-2B-siARは、分泌量自体は少ないものの、CCL20の分泌量が有意に増加していることが示された。
- (2) 次にmigを採取した。C4-2B-migはC4-2B-prtと比較しARの発現が低下していたが、CCR6の発現には変化が見られなかった。LNCaPについても同様にLNCaP-migではARが低下している傾向がみとめられたが、採取されるmigの細胞数が非常に少なく評価は困難であった。ELISAにおいて、LNCaP-prtやC4-2B-prtはほとんどCCL20を分泌していなかったが、C4-2B-migはCCL20を大量に分泌するようになっていた。LNCaP-migもC4-2B-migほどではないがCCL20の分泌量は大幅に増加していた。
- (3) C4-2B-siARおよびLNCaP-siARが、C4-2B-NCおよびLNCaP-NCと比べ増殖能が低下し遊走能が亢進することはすでに明らかにしているが、C4-2B-migはC4-2B-prtと比較し有意な遊走能の亢進が認められた。
- (4) CCL20をC4-2Bに加えると、増殖能に変化は認められなかったが、濃度依存的に遊走能の亢進が認められた。CCL20を加えても、CCR6の発現に変化は認められなかった。
- (5) 腫瘍随伴マクロファージと前立腺癌細胞の相互作用により、CCL2などのケモカインの分泌が亢進することを以前明らかにしたため、ヒトマクロファージ様細胞U937およびTHP-1とC4-2Bを共培養した。しかし、CCL20およびCCR6の発現に変化は認められなかった。THP-1にCCL20を添加しても遊走能の変化は認められなかった。
- (6) 以上のことから、CCL20の分泌はCCL2の分泌とは異なり、ARのみに発現を依存している可能性が考えられた。さらに、CCL20はADT施行中の前立腺癌細胞で発現が亢進し、自己分泌作用によって遊走能を高める可能性が考えられた。また遊走能が高い前立腺癌細胞にはCCL20が高発現しており、CCL20が自己分泌作用で遊走能を高めている可能性が裏付けられた。
- (7) これまで前立腺癌におけるCCL20の役割について報告した論文はない。CCL20単独でCRPCのさらなる増悪のバイオマーカーとなる可能性があるだけでなく、すでに知られているCCL2や他のケモカイン(分泌蛋白)と併用して、優れた血清バイオマーカーとなる可能性が考えられる。現在根治療法の見込めないCRPCに対する新たな治療のターゲットとして、さらなる研究の促進が見込まれる。

#### <引用文献>

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

Izumi K, Mizokami A, Lin HP, Ho HM, Iwamoto H, Maolake A, Natsagdorj A, Kitagawa Y, Kadono Y, Miyamoto H, Huang CK, Namiki M, Lin WJ. Serum chemokine (CC motif) ligand 2 level as a diagnostic, predictive, and prognostic biomarker for prostate cancer. *Oncotarget.* 2016;7:8389-98.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- (1) Natsagdorj A, Izumi K, Hiratsuka K, Machioka K, Iwamoto H, Naito R, Makino T, Kadomoto S, Shigehara K, Kadono Y, Lin WJ, Maolake A, Mizokami A. CCL2 Induces Resistance to the Antiproliferative Effect of Cabazitaxel in Prostate Cancer Cells. *Cancer Sci.* 2019;110:279-288. DOI: 10.1111/cas.13876 査読有
- (2) 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. Coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol synergistically inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells. *Prostate.* 2019;79:468-479. DOI: 10.1002/pros.23753 査読有
- (3) Maolake A, Izumi K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, Makino T, Naito R, Shigehara

K, Kadono Y, Hiratsuka K, Wufuer G, Nastiuk KL, Mizokami A. Tumor necrosis factor- induces prostate cancer cell migration in lymphatic metastasis through CCR7 upregulation. Cancer Sci. 2018;109:1524-1531. DOI: 10.1111/cas.13586 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol synergistically inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells. Iwamoto H, Izumi K, Kadono Y, Mizokami A. 18 March 2019, Barcelona, Spain
- (2) CCL2 induces cabazitaxel resistance in prostate cancer cell line through AKT signaling pathway ナッサグドルジアリウンボルト、泉浩二、岩本大旭、溝上敦、内藤伶奈人、門本卓、牧野友幸、町岡一顕 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、9 月 28 日、2018.
- (3) TNF- は CCR7 を介してリンパ節内の前立腺癌細胞の遊走を亢進する 牧野友幸、泉浩二、ナッサグドルジアリウンボルト、岩本大旭、門本卓、内藤伶奈人、溝上敦 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、9 月 29 日、2018.
- (4) 前立腺癌に対する kahweol と cafestol の抗癌活性 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 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、9 月 27 日、2018.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：溝上 敦

ローマ字氏名：MIZOKAMI, Atsushi

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 50248580

研究分担者氏名：成本 一隆

ローマ字氏名：NARIMOTO, Kazutaka

所属研究機関名：聖路加国際大学

部局名：聖路加国際病院

職名：医幹

研究者番号 ( 8 桁 ): 50645207

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。