

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592044

研究課題名（和文） 前立腺発癌課程における慢性炎症の影響と自然免疫細胞の役割に関する研究

研究課題名（英文） The role of chronic inflammation and innate immunity in prostate carcinogenesis

研究代表者

野々村 祝夫 (NONOMURA NORIO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30263263

研究成果の概要（和文）：

F344 ラットに lipopolysaccharide (LPS) を用いて前立腺炎を誘発するモデルを確立し、heterocyclic amine の一つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) を用いて前立腺の発癌誘導を行うと、LPS による炎症を合併したラットの前立腺でより高頻度に前立腺上皮の異常増殖を認めた。また、ヒト前立腺において mast cell や macrophage の浸潤が癌の発生や進展に促進的に働く可能性が生検組織を用いた臨床病理学的研究から分かった。

研究成果の概要（英文）：F344 rat prostatitis model using lipopolysaccharide (LPS) was established. PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine)-induced abnormal proliferation of rat prostate epithelial cells was enhanced by LPS-induced inflammation. Moreover, clinicopathological studies using human prostate biopsy specimens suggest that infiltration of mast cells or macrophages positively correlated with occurrence or progression of prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：前立腺癌、慢性炎症、自然免疫、動物モデル、化学発癌、リポポリサッカライド (LPS)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は食事や炎症など環境因子がその発声野進展に重要な役割を果たしていると考えられている癌であり、現在我が国でも急増している。これまでの臨床病理学的研究により、前立腺癌組織周囲には mast cell や macrophage といった自然免疫細胞の浸潤が見られ、これらの細胞が癌の発声野進展に関与していることも示唆されている。heterocyclic amine の一つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) を雄の F344 ラットに投与し、早期の前立腺組織学的変化を調べると、ヒト前立腺癌の前癌病変である prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) 様病巣が出現し、発癌の初期課程が生じていることが分かる。そして、この PIN 様構造の周囲間質には mast cell や macrophage といった自然免疫細胞の浸潤が目立つ。これらの細胞浸潤は明らかに PhIP を投与したラットに有意に高頻度に見られ、発癌誘発の初期課程で自然免疫細胞の浸潤が生じていることがわかる。また、ヒトの前立腺生検組織の観察から、癌病巣の周囲には macrophage 等の細胞浸潤がみられ、癌の進展などに関与している可能性が示唆されている。他の癌腫においても tumor-associated macrophage (TAM) と呼ばれる macrophage が腫瘍の進展に positive に作用していることが示唆されている。しかし、実際に発癌動物モデルや炎症モデルを用いての、炎症細胞浸潤の発癌や進展に対する影響を直接的に証明した研究はほとんど無い。

2. 研究の目的

前立腺の慢性的炎症が本当に前立腺発癌の原因となるのか或いはその発癌を促進するのかを明らかにし、その発癌過程における自然免疫細胞の重要性を動物実験モデルを用いて証明すること、さらに、heterocyclic amine

である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) によるラット前立腺発癌モデルに、lipopolysaccharide (LPS) による前立腺炎を誘起し、通常の PhIP による前立腺発癌が促進されるかどうかを検討することが本研究の主たる目的である。

3. 研究の方法

(1) LPS による経尿道的ラット前立腺炎モデルの確立

9-12 週齢の F344 雄ラットの前立腺に経尿的に LPS (1 μ g/ml, 600 μ l) をカテーテルを用いて注入し、経時的に前立腺の組織学的変化を観察した。この炎症後のラット前立腺組織を Androgen receptor, p63, MIB-1 等の抗体で染色し、どのような細胞が組織再生課程で残存しているかを調べた。

(2) PhIP 誘導前立腺発癌モデルと LPS による前立腺炎誘発モデルの組み合わせ

2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) 50mg/kg を 20 週間連日投与し、LPS による炎症の有り無しで、前立腺組織の変化を観察した。PhIP による発癌のモデルに対する LPS による前立腺炎の誘発は PhIP 投与開始 10 週目に行った。

(3) c-kit 変異ラットを用いた mast cell の発癌における役割の解析

肥満細胞の前立腺発癌における役割を詳細に検討するため、c-kit 遺伝子の突然変異により肥満細胞を欠損したラット WsRC-Ws/Ws ラットと、その野生型である WsRC-+/+ラットに対して PhIP を投与し、1 年後に前立腺の組織学的変化を観察する。

(4) ヒトの前立腺組織中の自然免疫細胞働きに関する臨床病理学的解析

ヒト前立腺生検検体を用いて、切片中の mast cell や macrophage の浸潤をカウントした。これらの細胞浸潤と前立腺癌の予後との相

関を検討した。その一方で、初回生検で癌が検出されなかったが、2回目以降の生検で癌が検出された症例に限って、初回生検時の組織標本におけるこれらの自然免疫細胞浸潤と、その後の癌の検出率の関係を調べた。

Mast cellは、抗 mast cell-specific tryptase 抗体にて、また tumor-associated macrophage には CD68 抗体にて、さらに macrophage scavenger receptor-positive cell (MSR-positive cell)細胞は、CD204 抗体にて、パラフィン切片用いて免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) LPS によるラット前立腺の逆行性炎症モデルの確立

LPS を経尿道的にラットに投与することで、ラットの前立腺に炎症を誘発できることが分かった。炎症発症後約2週間で前立腺上皮は脱落し、一旦無構造のようになるが、その後再生過程に入って3週間には次第に腺構造を回復する。(図1 a, b)

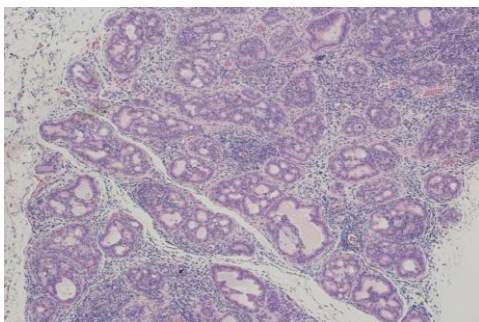
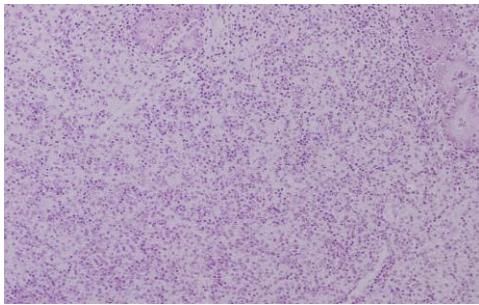


図1 a(上)炎症発症2週間後、b(下)3週間後

炎症発症後2週間での無構造な組織の中には、CK14 を発現する上皮系の細胞が島状に存在し、またこれらの細胞は幹細胞マーカーである CD133 を発現していることが分かった。(図2 a, b)

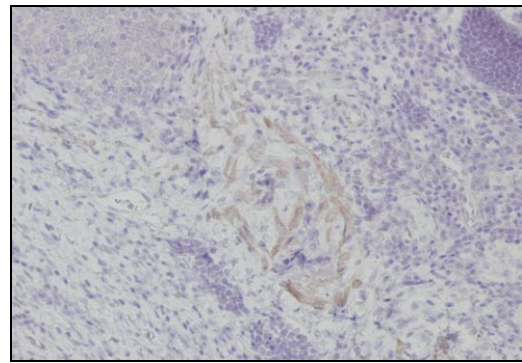
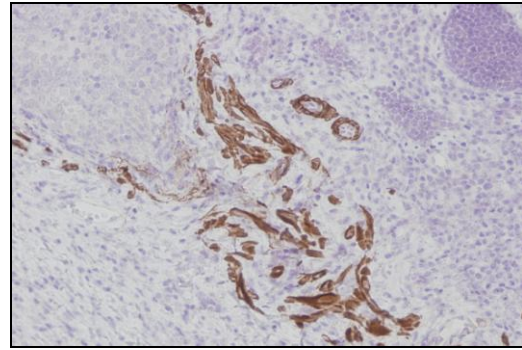


図2 a(上) CK14 染色、b(下) CD133 染色

(2) LPS 炎症モデルと PhIP 誘導性発癌モデルの組み合わせによる検討

LPS 誘発性前立腺炎では炎症による腺管の脱落後、腺管の再生が起こるが、それだけでは腺管の異常増殖は生じない。ところが、これに PhIP を投与することで、PhIP 単独による前立腺腺管上皮の異常増殖はさらに亢進した。すなわち、PhIP+LPS 群 (A 群) における腺管の Ki-67 index は PhIP 単独群 (B 群) よりも亢進しており、PhIP による発癌誘導が炎症により増強されることが明らかになった。増殖性病変における Ki-67 index の値は、A 群 13.5%、B 群 8.1% ($p=0.011$)、また、Ki-67 index 15%以上を示す病変を有する割合は A 群 61.5%、B 群 17.6% ($p=0.013$) であり、

有意差を認めた。(図3)

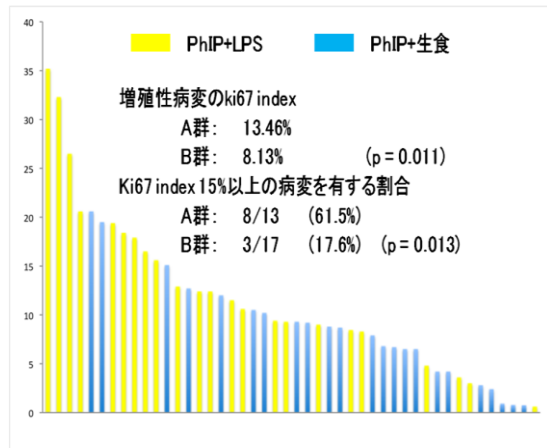


図3 炎症による前立腺腺管の異常増殖促進

(3) c-kit 変異ラットにおける mast cell の役割検討

c-kit 遺伝子の突然変異により肥満細胞を欠損したラット *WsRC-^{-/-}/Ws* ラットと、その野生型である *WsRC-^{+/+}*ラットの前立腺における組織学的違いは現在検討中で、まだはっきりとした結果が出ていない。

(4) ヒト前立腺検体を用いた臨床病理学的検討

ヒトの前立腺生検組織を用いて、mast cell や macrophage の浸潤と、前立腺癌の予後との関係を見ると、mast cell 浸潤や tumor-associated macrophage 浸潤の多い症例で予後不良の傾向が見られた。これらの自然免疫細胞が前立腺癌の進展に対して促進的に作用する可能性が示唆された。一方、初回生検で陰性であったが、2回目以降の生検で癌が検出された症例において、初回生検時の組織標本中のこれらの細胞浸潤とその後の癌検出率との関連を調べたところ、初回生検時の組織標本（ここには癌は見つからない）における MSR-positive cell の浸潤が少ない症例ほど、再生検において癌の見つかる可能性が高くなることが分かった。これらの事実は macrophage にも癌の増殖や進展に対

して positive に作用するものと protective に作用するものがあることを示している。

(5) まとめと考察

以上の結果は、前立腺の発癌過程において mast cell や tumor-associated macrophage が促進的に作用していることを示唆していると思われる。一方で、macrophage の中には、癌の発生過程において protective に働く分画もあるようである。また、mast cell や tumor-associated macrophage などの自然免疫細胞は前立腺癌の発生過程のみならず、癌の進展においても positive に作用しているようである。mast cell の発癌過程における促進的効果を直接的に証明するには、現在、進行中の c-kit 変異ラットにおける研究成果が待たれる。今後は、これらの細胞分画を採取し、in vitro, in vivo における機能解析も必要と考えている。

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6件)

- ① 中井康友, 高山仁志, 野々村祝夫. 前立腺炎後の組織修復過程における骨髄由来細胞 (Bone marrow-derived cells) の役割についての検討
泌尿器外科, 24(8): 1235-1237, 2011.
(査読有)
- ② 中井康友, 辻村晃, 野々村祝夫. 【前立腺癌(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート-】 基礎 前立腺癌のアンドロゲン非依存性進展 副腎ステロイドの役割(解説/特集)
日本臨床, 69 巻増刊 5 前立腺癌: 112-116, 2011. (査読有)
- ③ Nonomura N, Takayama H, Nakayama M, Nakai Y, Kawashima A, Mukai M,

Nagahara A, Aozasa K, Tsujimura A. Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *BJU Int.* 107(12):1918-22, 2011. (査読有)

- ④ Nonomura N, Takayama H, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Nakai Y, Nakayama M, Tsujimura A, Nishimura K, Aozasa K, Okuyama A. Decreased infiltration of macrophage scavenger receptor-positive cells in initial negative biopsy specimens is correlated with positive repeat biopsies of the prostate. *Cancer Sci.* 101(6): 1570-1573, 2010. (査読有)
- ⑤ Takayama H, Nishimura K, Tsujimura A, Nakai Y, Nakayama M, Aozasa K, Okuyama A, Nonomura N. Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation. *J Urol.* 181(4): 1894-1900, 2009. (査読有)
- ⑥ Fujita K, Nakayama M, Nakai Y, Takayama H, Nishimura K, Ujike T, Nishimura K, Aozasa K, Okuyama A, Nonomura N. Vascular endothelial growth factor receptor 1 expression in pelvic lymph nodes predicts the risk of cancer progression after radical prostatectomy. *Cancer Sci.* 100(6):1047-1050. 2009. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Takayama H, Hatano K, Satoh M,

Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Nakai Y, Nonomura N. Increased infiltration of mast cells infiltrating in non-malignant biopsy is associated with detection of prostate cancer. Annual Meeting of the American Urological Association, Washington DC, USA, May 17, 2011.

- ② 中井康友、高山仁志、野々村祝夫. 食餌由来の発癌物質である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) 投与により発生するラット前立腺癌の発癌過程における肥満細胞の役割の検討。第 99 回日本泌尿器科学会総会、名古屋市、2011 年 4 月 24 日
- ③ 高山仁志、波多野浩士、佐藤元孝、河嶋厚成、向井雅俊、永原 啓、植村元秀、岡 大三、中井康友、野々村祝夫. 膀胱上皮内癌(CIS)に対する BCG 膀胱内注入療法の予後予測因子としての肥満細胞出現の有用性の検討。第 99 回日本泌尿器科学会総会、名古屋市、2011 年 4 月 24 日
- ④ 中井康友、中山雅志、高山仁志、野々村祝夫. 前立腺癌における炎症の役割について—動物実験における検討—。第 99 回日本泌尿器科学会総会、名古屋市、2011 年 4 月 21 日
- ⑤ Takayama H, Hatano K, Satoh M, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Nakai Y, Nonomura N. Increased number of mast cells infiltrating in non-malignant biopsy is associated with detection of prostate cancer. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, USA, April 5, 2011.

- ⑥ 高山仁志、佐藤元孝、波多野浩士、河嶋厚成、向井雅俊、永原 啓、植村元秀、岡 大三、中井康友、中山雅志、西村和郎、青笹克之、野々村祝夫。Increased infiltration of mast cells in non-malignant biopsy is associated with detection of prostate cancer. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月 24 日
- ⑦ 中井康友、向井雅俊、鈴木 崇、土屋睦美、房前裕順、永原 啓、中山雅志、高山仁志、辻川和丈、野々村祝夫。Prostatitis promotes prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP). 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市、2010 年 9 月 23 日
- ⑧ 高山仁志、波多野浩士、河嶋厚成、向井雅俊、永原啓、植村元秀、岡 大三、中井康友、中山雅志、野々村祝夫、奥山明彦。前立腺初回生検癌陰性標本における肥満細胞の再生検指標の可能性の検討。第 98 回日本泌尿器科学会総会、盛岡市、2010 年 4 月 29 日
- ⑨ 中井康友、向井雅俊、鈴木崇、房前裕順、波多野浩士、河嶋厚成、永原啓、中山雅志、高山仁志、辻川和丈、野々村祝夫、奥山明彦。前立腺炎は PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine) による前立腺発癌を促進する。第 98 回日本泌尿器科学会総会、盛岡市、2010 年 4 月 27 日
- ⑩ Nakayama M, Fujita K, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Nakai Y, Takayama H, Nishimura H, Aozasa K, Okuyama A, Nonomura N. Vegfr1 expression in pelvic lymph nodes predicts the risk

of biochemical recurrence after radical prostatectomy. Annual Meeting of the American Urological Association, Chicago, USA, April 26, 2009.

- ⑪ 高山仁志、野々村祝夫、河嶋厚成、向井雅俊、永原 啓、芝 政宏、岡 大三、中井康友、中山雅志、井上 均、西村和郎、奥山明彦。初回生検陰性標本における Macrophage Scavenger Receptor (MSR) と Tumor-associated Macrophage (TAM) の再生検指標の可能性の検討。第 97 回日本泌尿器科学会総会、岡山市、2009 年 4 月 19 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野々村祝夫 (NONOMURA NORIO)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30263263

(2) 研究分担者

高山仁志 (TAKAYAMA HITOSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50403051

中井康友 (NAKAI YASUTOMO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20432479

中山雅志 (NAKAYAMA MASASHI)
大阪府立成人病センター・泌尿器科・副部長
研究者番号：40379178

→
平成 23 年度に辞退

(3) 連携研究者

()
研究者番号：