

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860192

研究課題名(和文)リンパ節premetastatic niche形成を制御するプロスタノイドの役割

研究課題名(英文)Roles of prostanoid during premetastatic niche formation in regional lymph node

研究代表者

細野 加奈子 (Hosono, Kanako)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：80532556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌リンパ節転移モデルでの検討から、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由来のPGE2がEP3を刺激することによりケモカインであるstromal cell derived factor (SDF)-1の発現がsubcapsular regionで増大しpremetastatic nicheを形成することを明らかとした。さらにCOX-2陽性の樹状細胞がSDF-1を産生するとともに、EP3依存性にTGF- β 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。

研究成果の概要(英文)：Lymph node metastasis (LNM) is a critical prognostic factor in cancer patients. Our study revealed that endogenous COX-2-derived PGE2 stimulated the EP3 receptor on DCs, leading to the upregulation of SDF-1 expression in the subcapsular regions in regional lymph nodes following LLC cell injection into the lungs. SDF-1 upregulation facilitated the accumulation of CXCR4+ LLC cells and the formation of the regional lymph node premetastatic niche. We also found that accumulation of Tregs and lymph node lymphangiogenesis, both of which may decide the fate of metastasized tumor cells, were COX-2/EP3-dependent. Taken together, our findings suggest that PGE2 inhibitors, together with SDF-1 receptor antagonists and EP3 antagonists, may be promising agents for the suppression of premetastatic niche formation and LNM.

研究分野：薬理学一般

キーワード：リンパ管新生 プロスタグランジン リンパ節転移 がん 慢性炎症 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

がんのリンパ行性転移は、血行性転移と並んで患者予後の重要な決定因子である。従来、がんのリンパ行性転移は既存のリンパ管に浸潤到達した腫瘍細胞が移行することにより起こるとされてきたが、最近になり血管と同様に間質ストローマさらには腫瘍にリンパ管が新生し、それへ腫瘍細胞が移行するとの見方が重要視されてきている。また、多くの腫瘍微小環境には炎症細胞浸潤を認め、炎症反応ががんの発生および増殖と深く関わっていることが古くから知られている。一方、がんの転移は、がん細胞の原発巣からの離脱、間質内への浸潤、脈管・基底膜の破壊、脈管内皮への定着、脈管外への浸潤、標的臓器での増殖といった多くのステップを経て成立するが、近年、肺などへの血行性転移ではあらかじめマクロファージや一部の骨髄由来細胞が集積、浸潤してがん細胞が転移しやすい環境“premetastatic niche”を構築し、そこにがん細胞が転移巣を形成することが分かってきた。しかしながら、リンパ節において同様のpremetastatic nicheが成立するかについてはほとんど調べられていない。こうした背景から、リンパ節においてpremetastatic niche様の構造が形成されるかどうか、また転移前のリンパ節にどのような細胞の集積が認められるのか、炎症性メディエーターに着目し解明するという発想に至った。

2. 研究の目的

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。我々のグループではこれまでに、腫瘍増殖や腫瘍依存性の血管新生においてcyclooxygenase (COX)-2やprostaglandin (PG)受容体シグナリングが制御因子として役割を持っていることを報告してきた。また、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。

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PGs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- β 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形成を検討し、リンパ節転移メカニズムについて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞の肺移植による縦隔リンパ節転移モデルの作成

雄性C57BL/6マウスをエーテル麻酔下に右側臥位として左肩甲骨下に約5mmの皮膚切開し、Matrigelと混和したLLC細胞(5×10⁴/10 μ L)をマウスの左肺実質に穿刺・移植した。

(2) リンパ管新生の評価

腫瘍原発巣およびリンパ節転移巣を対象に、腫瘍増殖を経時的に調べ、腫瘍及び間質ストローマにおけるリンパ管の新生を経時的空間的に評価した。

(3) premetastatic niche形成に関わる細胞群の評価

転移前のリンパ節に集積する細胞をflow cytometry、免疫組織化学的解析、real time PCR等を行い、premetastatic niche形成に関与している細胞群を評価した。さらに、それら細胞の誘導に関与するケモカインおよびその受容体の解析も併せて行った。

4. 研究成果

LLC肺癌細胞の肺移植による縦隔リンパ節転移モデルを用い、premetastatic niche形成やリンパ節転移におけるCOX-2およびPGE₂受容体シグナリングの役割について解析を行った。

その結果、肺への腫瘍接種後10-12日目には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した。一方、所属リンパ節では肺への腫瘍接種後1-7日目と腫瘍転移前の早期の段階でsubcapsular sinusの部位に経時的にCOX-2の発現上昇が確認できた。リンパ節転移はCOX-2阻害薬の投与やPGE₂の受容体EP3のノックアウトマウス(KO)で有意に抑制されたが、接種した原発腫瘍の大きさには有意差は認められなかった。また、リンパ節内subcapsular領域におけるケモカイン系の発現を調べると前転移状態(premetastatic phase)でSDF-1発現の増加が確認されたが、この発現はCOX-2阻害薬やEP3KOで有意に抑制された。一方、SDF-1の受容体CXCR4拮抗薬やCXCR4中和抗体の投与によりリンパ節転移は有意に抑制された。このことから、COX-2由来のPGE₂がEP3シグナリングを介してSDF-1発現を増強させ、SDF-1/CXCR4 axisのsignaling

により所属リンパ節における premetastatic niche 形成に参与していることが示唆された。

さらに、どのような細胞構成成分が premetastatic niche 形成に参与し、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。その結果、COX-2 および SDF-1 陽性の樹状細胞が subcapsular region に集積していることが明らかとなった。この集積は COX-2 阻害薬や CXCR4 拮抗薬、EP3KO で抑制された。また、野生型と EP3KO マウスからそれぞれ採取した骨髄細胞から分化培養した GFP 陽性樹状細胞を移植後、肺癌リンパ節転移モデルを作成し premetastatic niche への樹状細胞の遊走を調べたところ、EP3KO 樹状細胞移植群で subcapsular region に集積する樹状細胞が有意に抑制されており、さらに SDF-1 産生の抑制およびリンパ節転移の抑制も認められた。このことから、所属リンパ節への樹状細胞の集積には PGE₂-EP3 シグナリングが参与していることが示唆された。さらに未成熟樹状細胞の培養実験から、PGE₂ や EP3 アゴニストの刺激により SDF-1 や TGF- β 産生が有意に増強され、樹状細胞における SDF-1 や TGF- β 産生にも PGE₂-EP3 シグナリングが参与していることが明らかとなった。一方、リンパ節 subcapsular region では FOXP3 陽性の制御性 T 細胞の集積も確認されたが、この集積は COX-2 阻害薬や CXCR4 拮抗薬、EP3KO で抑制された。このことから制御性 T 細胞のリンパ節への集積も PGE₂-EP3 シグナリングや SDF-1/CXCR4 axis 依存性であることが示唆され、premetastatic niche 形成の結果、転移した腫瘍細胞の免疫寛容に参与している可能性が考えられた。加えて、所属リンパ節では LLC 細胞がリンパ節に到達する以前に COX-2/EP3 シグナリング依存性に VEGF-C/D 産生を誘導して所属リンパ節におけるリンパ管新生を増強することが明らかとなった。

これらの結果から、樹状細胞が COX-2 由来 PGE₂-EP3 signaling を介して SDF-1 や TGF- β を分泌することにより所属リンパ節への CXCR4 陽性 LLC 細胞の遊走や pre-metastatic niche 形成を誘導することが示唆された。また、制御性 T 細胞の集積やリンパ節のリンパ管新生もまた COX-2/EP3 シグナリング依存性であり、制御性 T 細胞による免疫寛容によって誘導された腫瘍細胞が所属リンパ節で発達し、さらなる臓器へ転移することが示唆された。

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 3 件)

Ogawa F, Amano H, Eshima K, Ito Y, Matsui Y, Hosono K, Kitasato H, Iyoda A, Iwabuchi K, Kumagai Y, Satoh Y, Narumiya S, Majima M. Prostanoid induces premetastatic niche in regional lymph nodes. **J Clin Invest.** 124(11):4882-94. 2014. doi: 10.1172/JCI173530. 査読有

Ogawa F, Amano H, Matsui Y, Hosono K, Satoh Y, Majima M. Aspirin reduces lung cancer metastasis to regional lymph nodes. **Biomed Pharmacother.** 68(1):79-86. 2014. doi: 10.1016/j.biopha.2013.11.006. 査読有

Kurashige C, Hosono K, Matsuda H, Tsujikawa K, Okamoto H, Majima M. Roles of receptor activity-modifying protein 1 in angiogenesis and lymphangiogenesis during skin wound healing in mice. **FASEB J.** 28(3):1237-47. 2014. doi: 10.1096/fj.13-238998. 査読有

[学会発表](計 8 件)

小川 史洋, 天野 英樹, 細野加奈子, 熊谷 雄治, 成宮 周, 馬嶋 正隆; Pre-metastatic niche 形成における樹状細胞-PGE₂-EP3 signaling, SDF-1/TGF- β の役割. 第 35 回日本炎症・再生医学会. 2014 年 7 月 1-4 日 万国津梁館(沖縄県名護市)

細野 加奈子, 松田 弘美, 朴 圭一, 馬嶋 正隆; 病態時のリンパ管新生を制御するプロスタグランジンの役割. 第 38 回リンパ学会. 2014 年 6 月 20-24 日 北里大学白金キャンパス(東京、港区)

小川 史洋, 天野 英樹, 細野 加奈子, 熊谷 雄治, 馬嶋 正隆; 肺癌リンパ節転移および premetastatic niche 形成におけるプロスタグランジンの役割. 第 38 回リンパ学会. 2014 年 6 月 20-24 日 北里大学白金キャンパス(東京、港区)

Ogawa F., Amano H., Eshima K., Hosono K., Satoh Y., Narumiya S., Kumagai Y. Majima M. Role of Dendritic Cells via COX-2 Derived PGE₂-EP3 Signaling for Pre-metastatic Niche Formation in Lymph Node Metastasis on Lung Cancer. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 19-21 日 東北大学百周年記念会館川内萩ホール、仙台国際センター(宮城県仙台市)

Majima M., Hosono K., Amano H.,
Ogawa F., Park K. Prostanoids as
Regulators of Pathological
Lymphangiogenesis. GRC Molecular
Mechanisms in Lymphatic Function &
Disease. 2014/3/9-14. Lucca (Barga),
Italy.

Ogawa F., Amano H., Hosono K.,
Sato Y., Kumagai Y., Majima M.
Pge2-Ep3 Signaling Induces
Pre-Metastatic Niche Formation In
Mediastinal Lymph Node By
Cxcr4/Sdf-1 Axis. 18th Congress of the
Asian Pacific Society of Respiriology.
2013/11/11-1. Yokohama, Japan.

細野加奈子, 成宮 周, 馬嶋 正隆: 創傷
治癒時のリンパ管新生を制御するプロ
スタグランジン E₂ 受容体シグナリング
の役割. 第 34 回日本炎症・再生医学会.
2013 年 7 月 2-3 日 国立京都国際会
館 (京都府京都市)

Majima M., Hosono K., Suzuki T.,
Amano H., Kato H., Ogawa F., Park K.
Prostanoids regulate tumor stromal
profiles via specific G-protein coupled
receptors. 4th International
conference on tumor-host interaction
and Angiogenesis. 2013/06/2-5. Ascona,
Switzerland.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

北里大学医学部薬理学 大学院医療系研究科分子薬理学

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

細野 加奈子 (HOSONO KANAKO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号 : 8 0 5 3 2 5 5 6