

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462132

研究課題名(和文) 縦隔リンパ節転移巣を制御するプロスタグランジンE2-EP3シグナリングの解析

研究課題名(英文) The role of Prostanoid in premetastatic niche in regional lymph nodes.

研究代表者

天野 英樹 (Amano, Hideki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60296481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究で野生型及びPGE2のサブタイプであるEP3受容体欠損マウス(EP3KO)と野生型マウス(WT)を用いてLewis肺癌細胞の同所性移植による縦隔リンパ節転移モデルを作成し、リンパ濾胞で産生されたCOX-2由来のPGE2が免疫抑制性樹状細胞のEP3受容体を介し癌細胞がリンパ節に転移する前に免疫抑制性樹状細胞が集積しEP3受容体を介しケモカイン(SDF-1)を産生しTregを活性化することで、更に増殖因子の一つであるTGF- $\beta$ の産生を促すことで一層転移をしやすい土壌いわゆるpre-metastatic nicheを作成し癌細胞の集積を促すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer has remained one of the most deadliest cancers worldwide accounting for 18% of all cancer deaths. We investigated the contribution of COX-2/PGE2 in the formation of a premetastatic niche and LNM. A murine model of LLC cell metastasis revealed that COX-2 is expressed in DCs from the early stage in the lymph node, and COX-2 inhibition suppressed mediastinal LNM. SDF-1 was elevated in DCs before LLC cell infiltration to the lymph nodes, and a COX-2 inhibitor, a SDF-1 antagonist, and a CXCR4 antibody reduced LNM. Moreover, LNM was reduced in EP3 knock out mice and stimulation of cultured DCs with an EP3 agonist increased SDF-1 production. The injection of EP3-KO CD11c+DCs reduced accumulation of SDF-1+CD11c+DCs in regional LNs and LNM in LLC-injected mice. Accumulation of Tregs and lymph node lymphangiogenesis, was also COX-2/EP3-dependent. These results indicate that DCs induce a premetastatic niche during LNM via COX-2/EP3-dependent induction of SDF-1.

研究分野：呼吸器外科、薬理学

キーワード：プロスタグランジンE2 縦隔リンパ節転移 pre-metastatic niche EP3 SDF-1

1. 研究開始当初の背景

肺は血流、リンパが豊富な臓器で一旦肺癌が発生すると他の癌と比較し転移を来しやすい。特にリンパ節転移は、肺癌の病期分類 (TNM 分類 T:原発巣 N:リンパ節転移 M:他臓器転移)にも含まれており、予後と密接な関係を持っている。リンパ節転移は癌細胞がリンパ管に侵入し、リンパ節内で増殖した状態で、その際、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor A=VEGF-A) のファミリーである VEGF-C、VEGF-D を産生し、リンパ管新生を誘導する。**腫瘍組織中の VEGF-A, VEGF-C 及び VEGF-D の発現の程度は予後と相関関係が認められている。**

2. 研究の目的

2011 年の癌の総死亡数は約 35 万人で臓器別で最も多いのが肺癌である。肺癌は肺に発生する肺上皮細胞由来の悪性腫瘍でその治療方法には主に 外科的手術 化学療法 放射線療法がある。しかし、肺癌患者の約 40%が手術的適応で残りの約半数以上の患者は既に縦隔リンパ節の転移を認め手術適応がない。近年分子標的治療薬を始め、様々な治療薬が開発され臨床に使用されているが、満足できる結果を得られていないため、より有効な治療薬の出現に期待がかけられている。そこで申請者は、**プロスタグランジン E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)の受容体サブタイプである EP3 が癌のリンパ節の転移・再発予防に効果があるか否かについて検討する事にした。**

3. 研究の方法

申請者は PGE<sub>2</sub>の受容体であるEP3受容体が腫瘍血管新生腫瘍及び肺転移の形成に関与していることを報告した。本研究の目的は、(1)同所性移植による縦隔リンパ節転移モデルを用いて COX-2 由来の PGE<sub>2</sub>が樹状細胞のEP3 受容体に結合後 SDF-1 の産生を促すことで、CXCR4 陽性腫瘍細胞 がリンパ節内に誘導されるか否かの解明、(2)樹状細胞により活性化

された Treg が腫瘍細胞周囲に 集積し免疫抑制性樹状細胞が更に癌細胞の集積を誘導する状態つまり **pre-metastatic niche** の形成を促すか否かの検討、(3) (1)-(2)の過程に伴いリンパ管新生促進因子が産生され転移形成を促進させるか否かの解明である。このため本研究計画ではWTとEP3KOを用いて(1)縦隔リンパ節での腫瘍細胞の集積、COX-2 及び

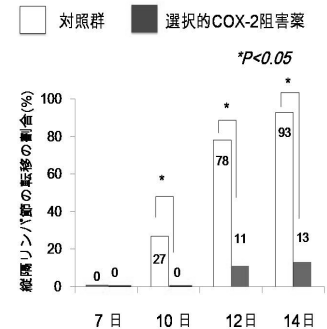
SDF-1 の発現の違いの検討、(2)縦隔リンパ節での樹状細胞の集積、樹状細胞における SDF-1 や TGF-β の産生能の違いの検討、(3)リンパ節内のリンパ管新生促進因子 (VEGF-C, VEGF-D) の発現及びリンパ管新生の差異の検討を行うことにした。

4. 研究成果

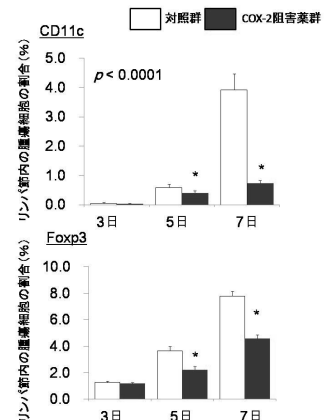
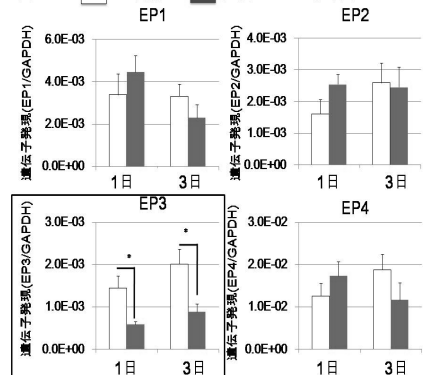
平成 26 年から 28 年度の成果は下記に記した。予備実験とし申請者は縦隔リンパ節転移モデルを作成後 COX-2 阻害薬投与群と対照群でリンパ節内の樹状細胞 (CD11c) と Treg (Foxp3) の発現を免疫組織科学にて検討し、COX-2 阻害薬投与群は対照群と比較し有意に低下を認めた。

前頁で記したが COX-2 阻害薬投与群は対照群と比較し有意にリンパ節転移の抑制かつ EP3 受容体の発現が抑制された事から縦隔リンパ節転移形成時に

図A



図B



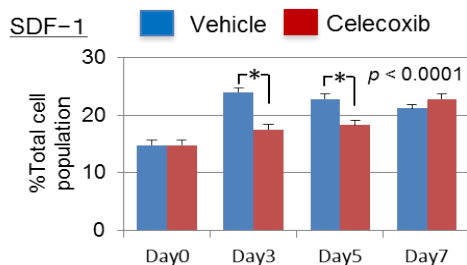
PGE<sub>2</sub>-EP3シグナルが関与しそのシグナルに樹状細胞及び Treg が何らかの関与をしていることが推測された。

縦隔リンパ節における COX-2, SDF-1の発現と腫瘍細胞の転移有無の検討

(1) COX-2投与群と対照群のマウスを用いた実験系

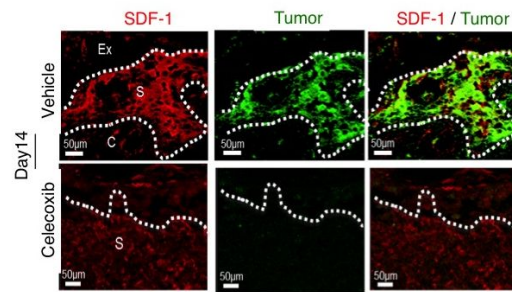
転移縦隔リンパ節におけるCOX-2, SDF-1の発現の検討

マウスの肺にLewis 肺癌細胞を注入し、COX-2 投与群と対照群のマウスの縦隔リンパ節を摘出し経時的に免疫組織科学及び定量的PCR を用いて発現の差があるか否か検討し、COX-2投与群では有意にリンパ節内でのSDF-1の発現低下を認めた(下図)。また Lewis 肺癌細胞でSDF-1のリガンドである CXCR4の発現を認めた。



腫瘍細胞のリンパ節の転移と SDF-1 の発現時期の比較検討

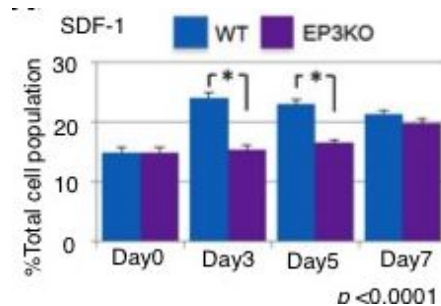
GFP を導入した Lewis 肺癌細胞を用いてリンパ節 転移モデル作成後、COX-2 投与群と対照群のマウスの経時的に縦隔リンパ節を摘出し、蛍光顕微鏡また定量的 PCR にて GFP 陽性癌細胞の転移の有無を検討しリンパ節内でのSDF-1の発現がGFPの発現より早いことを認めた。(右上図)



(2) WTとEP3KOを用いた実験系

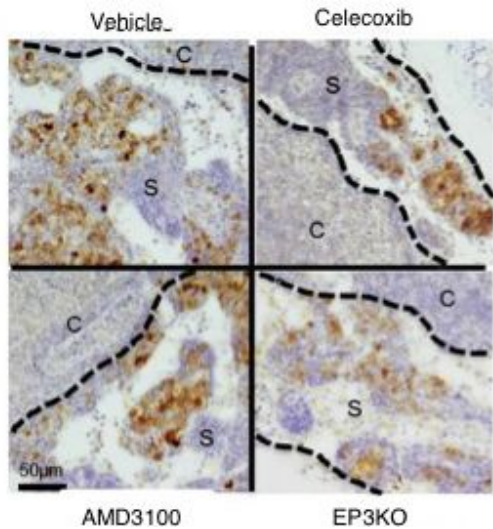
(1)にて施行した実験系をWTとEP3KOで比較検討する。

腫瘍細胞接種後のリンパ節内でのSDF-1の経時的発現変化を検討した。腫瘍接種後、0, 日12時間, 1日, 2日, 3日, 5日, 7日, 10日, 14日に標本を摘出し、3, 5でSDF-1の発現の増強を認めた(下図)。



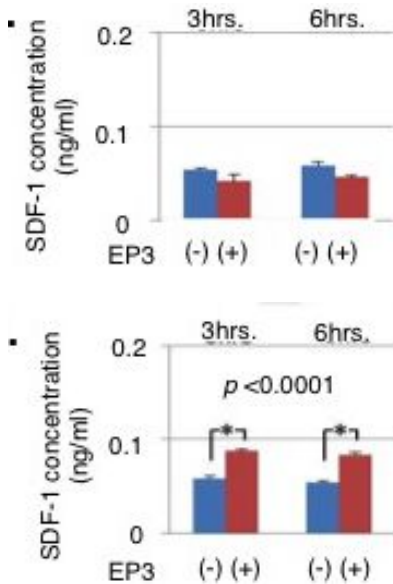
縦隔リンパ節内での樹状細胞及びTregが集積しているか否かの検討

腫瘍細胞接種後、経時的に縦隔リンパ節を摘出し、WTとEP3KOとの 樹状細胞に対しては免疫組織化学にPCRにてCD11c(樹状細胞の表面マーカー)の発現 Tregに対しては免疫組織化学と定量的PCRにてFoxp3 (Tregの特異的マーカー)の発現について比較検討し何もEP3KOはWTと比較し有意に低下を認めた。(次ページ上図)



骨髄由来の樹状細胞の培養(天野、江島が担当)

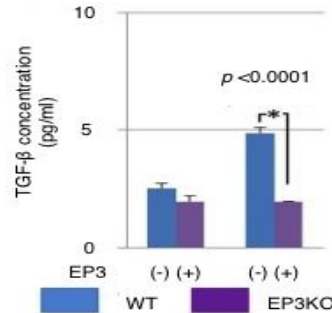
EP3<sup>+/+</sup>とEP3<sup>-/-</sup>の大腿骨から骨髄細胞を抽出。培養液にGM-CSFを添加し、8日目に細胞を回収。フローサイトメトリーにて90%以上CD11cが陽性であることを確認後培養しEP3刺激下で樹状細胞からSDF-1産生されるか否かを検討(*in vitro*)するとEP3刺激下でWTの樹状細胞は培養上清のSDF-1の発現増強を認めましたがEP3KOでは上昇を認めなかった。(下図: 上段EP3KO下段WT)



PGE<sub>2</sub>刺激下で樹状細胞からTGF-β産生されるか否かの検討

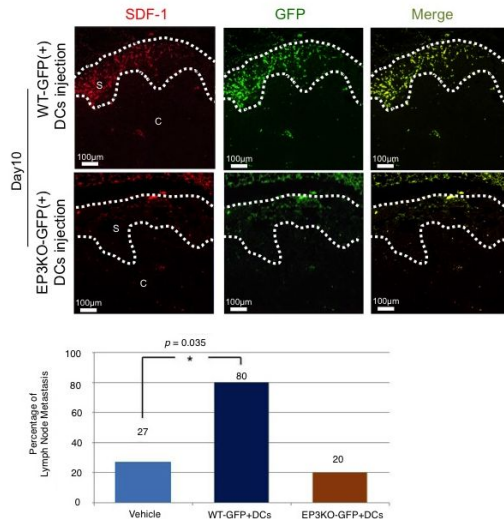
樹状細胞がPGE<sub>2</sub>の刺激でTGF-β産生しTregを誘導させる報告がある。WT及びEP3KOの樹状細胞にEP3アゴニストを添加し、培養上清中

のTGF-βの濃度をELISAで測定し、EP3アゴニストが他のアゴニストよりTGF-βの濃度が増加しているか否かを検討しWTではEP3アゴニストの刺激下でTGF-βの増強を認めましたが、EP3KOでは認められなかった。(下図)



骨髄由来のEP3<sup>+/+</sup>及びEP3<sup>-/-</sup>の樹状細胞のリンパ節転移形成の検討

腫瘍細胞接種後、GFP<sup>+</sup>トランスジェニックマウス由来の樹状細胞をWT<sup>+</sup>とEP3KOに静脈注射し、7, 10, 14日後に縦隔リンパ節に集積した樹状細胞を定量化し、比較検討を行った。



10日目にGFP<sup>+</sup>トランスジェニックマウス由来の樹状細胞をWTとEP3KOに静脈注射するとWTと比較し3KOでGFP<sup>+</sup>の樹状細胞の集積及びSDF-1の発現の低下を認めた(上図)。

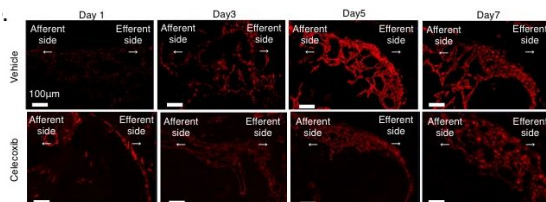
VEGF-CやVEGF-Dを産生する腫瘍細胞は転移したリンパ節でリンパ管新生を誘導することが明らかになり、この現象が更に遠くのリンパ節あるいは全身への転移につながる可能性を示唆している。今回の実験にて腫瘍細胞接

種後EP3<sup>-/-</sup>とEP3<sup>+/+</sup>の縦隔リンパ節でのリンパ管新生促進因子及び形態学的にリンパ管新生が起きているか否か検討を行った。

1)縦隔リンパ節内のリンパ管新生促進因子(VEGF-C, VEGF-D)が発現

WTと比較しEP3KOではリンパ管新生因子の発現の低下を有意に認めた。

2)縦隔リンパ節内及び周辺にリンパ管新生が生じているか否かを検討した。腫瘍細胞接種後、経時的に縦隔リンパ節を摘出し、EP3<sup>+/+</sup>とEP3<sup>-/-</sup>との縦隔リンパ節でリンパ管特異的マーカーであるLYVE-1の免疫組織染色を施行し、リンパ節周辺に形成されたリンパ管数を定量化し比較検討を行いEP3KOはWTと比較し有意にリンパ管新生の抑制を認めた。(下図)



以上より縦隔リンパ節転移は腫瘍がリンパ節に到達する前にSDF-1の発現が増強したリンパ節にCXCR4陽性の樹状細胞集積しEP3受容体を介しSDF-1を発現することで腫瘍細胞を取り込む事で転移が形成され、更にリンパ管新生が生じ転移の増強を認めることが推測された。

## 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 9件)

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. 査読有

doi: 10.1016/j.jss.2016.04.011

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. 査読有

doi: 10.1016/j.biopha.2016.01.005.

Amano H, Kato S, Ito Y, Eshima K, Ogawa F, Takahashi R, et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Signaling in the Recovery from Ischemia. PLoS ONE 2016 10(7): e0131445. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0131445

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. 2014 Nov;124(11):4882-94. 査読有  
doi: 10.1172/JCI73530.

[学会発表] (計 11件)

天野英樹、江島耕二、伊藤義也、審良静男、馬嶋正隆 COX-2/mPGES-1 axis induces blood flow recovery by accumulating Treg. 第41回日本微小循環学会 2016年9月23日~24日 コクヨホール(東京都品川区)

Hideki Amano, Yoshiya Ito, Ryo Takahashi, Koji Eshima, Shizuo Akira, Masataka Majima 第10回国際微小循環学会 2015年9月25日~26日 京都国際会議場(京都府京都市)

小川史洋、天野英樹、江島耕二、馬嶋正  
隆 第35回日本炎症・再生医学会 2014  
年7月1日 万国津梁館（沖縄県名護市）

〔図書〕（計 1件）

馬嶋正隆、天野英樹、細野加奈子 実  
験医学 羊土社 2017 p.4

〔その他〕

ホームページ等

[www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/member.html](http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/member.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

天野 英樹 (AMANO, Hideki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60296481

(2)研究分担者

江島 耕二 (ESHIMA, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30327324