

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462405

研究課題名(和文) 前立腺癌骨転移微小環境におけるCCL2を介した癌細胞増殖・浸潤機構の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of prostate cancer progression in bone metastasis microenvironment through CCL2 signaling

研究代表者

成本 一隆 (NARIMOTO, Kazutaka)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：50645207

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)：以前、腫瘍随伴マクロファージがCCR2を介して前立腺癌の転移を促進することを報告した。乳癌細胞ではCCL17とCCL22の受容体CCR4シグナルを介し、転移が促進されると報告されている。

本研究で初めてヒト前立腺癌細胞株および前立腺癌組織でCCR2とCCR4が発現していることを明らかにした。腫瘍随伴マクロファージは前立腺癌細胞からのCCL2とCCL22の分泌を促進し、さらにそれぞれの受容体の発現も亢進させた。これらのケモカインは前立腺癌細胞の遊走能を亢進させたが、受容体に対する阻害薬で阻害された。ケモカインシグナルの下流にはAKTのリン酸化が促進され、遊走能を亢進させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that tumor-associated macrophages (TAMs) promote prostate cancer metastasis via activation of the CCL2-CCR2 axis. The CCR4 (receptor of CCL17 and CCL22) expression level in breast cancer was reported to be associated with lung metastasis. The aim of this study was to elucidate the role of CCR2 and CCR4 in prostate cancer progression. CCR2 and CCR4 were expressed in human prostate cancer cell lines and prostate cancer tissues. In vitro co-culture of prostate cancer cells and macrophages resulted in increased CCL2 and CCR2 levels in prostate cancer cells. The addition of CCL2 induced CCL22 and CCR4 production in prostate cancer cells. The migration and invasion of prostate cancer cells via enhanced phosphorylation of Akt were promoted by CCL17 and CCL22. CCR4 may be a potential candidate for molecular-targeted therapy.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 癌微小環境 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行前立腺癌に対しては androgen/androgen receptor (AR) シグナルをターゲットとした androgen-deprivation therapy (ADT) が標準的な治療法として確立している。ADT によりしばらくは病勢をコントロールすることができるが、いずれ治療困難な Castration-resistant prostate cancer (CRPC) となる。CRPC には根治を望める治療法は存在せず、どのようなメカニズムで CRPC という病態が引き起こされ、そして増悪するのかということの解明することが、新たな治療法の開発につながると考えられる。

(2) これまで、副腎性 androgen の前立腺癌再燃への関与の可能性や flutamide が副腎性 androgen を減少させる現象を明らかにした^{1, 2}。さらに、骨での癌微小環境に着目し、DHEA から DHT への生合成に骨由来間質細胞が関与し、骨転移の増悪に寄与をしている可能性も明らかにした³。これらのメカニズムは前立腺癌細胞の androgen に対する感受性の亢進が前提と考えられるが、一方で、ADT により、androgen/AR シグナルを抑制することで CCL2 の発現が亢進し、がん細胞の浸潤・転移を促進することも明らかとなっている⁴。さらには、新規ホルモン剤 enzalutamide に対する前立腺癌の耐性獲得機序として CCL2 経路の活性化が重要な役割を果たしていることも明らかになっている⁵。CCL2 は別名マクロファージ遊走因子とも呼ばれ、癌においては腫瘍随伴性マクロファージ (tumor-associated macrophages: TAM) の活性化を介して癌細胞の活性化をもたらす。これらの研究成果は、androgen/AR シグナルがブロックされることで増殖は抑制されるが CCL2 を高発現する癌細胞が epithelial-mesenchymal transition (EMT) を獲得し浸潤・転移するという、paradoxical な環境が形成されている可能性を示唆している。近年注目される癌細胞の不均一性という観点からすると、増殖能・浸潤能という2つの異なるなるベクトル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もあり一つのターゲットでは完治できない現在の臨床の状況と合致していると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、転移促進因子である CCL2 が、前立腺癌細胞と骨由来間質細胞などの相互作用においてどのような役割を果たしているのかを解明する。血球系と起源を同じくする骨髄由来細胞は CCL2 のレセプター CCR2 を発現しており、CCL2 を介して癌細胞と相互作用し癌の増悪 (増殖・浸潤) をもたらしめている可能性が高い。EMT に関連する TGF-beta1 産生亢進も CCL2 を介していることが予想される。二つの性質の前立腺癌細胞に共通の生存に必須なシグナルを特定し、新規

治療の開発につなげたいと考えている。

(2) 続いて(1)で明らかになった増悪シグナルが、前立腺癌細胞をどのように活性化するかを明らかにする。TAM は CCL2 以外にも様々なケモカインを分泌しており、中でも CCL17 や CCL22 は TAM のマーカーとしてよく知られている。本研究では前立腺癌進展において CCL22 等のケモカインシグナルが果たす役割について特に焦点をあてる。

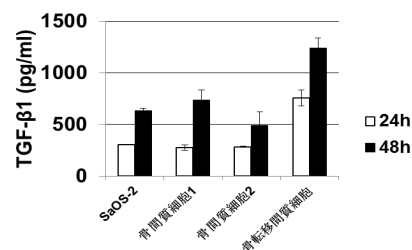
3. 研究の方法

(1) ヒトの骨間質細胞およびヒト骨芽細胞様細胞株 SaOS2 (合わせて骨由来細胞とする) の TGF-beta1 の発現を ELISA 法で経時的に調べた。骨由来細胞と前立腺癌細胞とを共培養し、CCL2、TGF-beta1 の発現変化を検討した。また、CCL2 や TGF-beta1 を添加した前立腺癌細胞でのケモカインの発現変化を分析し、変化のあったケモカインが癌細胞に与える影響を検討した。

(2) ヒト前立腺癌細胞株とヒト単球様細胞株を用いて共培養を行い、CCL2 や CCL22 などのケモカインおよびその受容体の発現や分泌の変化を調べた。遊走能試験や浸潤能試験を行い、ケモカインとの関連を調べた。さらに、ケモカインやその受容体の阻害薬を用いて実際に表現型に影響があるかを調べた。ケモカインシグナルの下流にどのような分子機構が存在するかも解析した。

4. 研究成果

(1) 骨由来細胞と前立腺癌細胞 (LNCaP-SF) とを共培養し、TGF-beta1 の培養上清中の濃度を ELISA にて調べた結果、24 時間後よりも 48 時間後が有意に TGF-beta1 の培養上清中の濃度が上昇していた (図 1)。



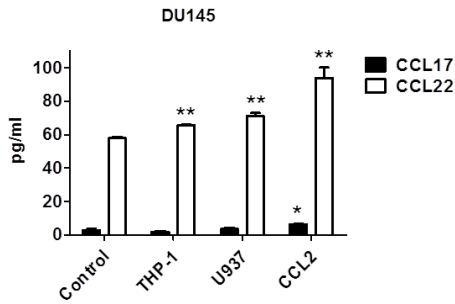
(図 1)

次に、様々な条件で前立腺癌細胞に TGF-beta1 や CCL2 を添加し、その分子細胞学的な変化を観察した。前立腺癌細胞は SaOS2 と共培養すると、TGF-beta1 の発現が亢進したが、CCL2 は変化がなかった。一方、TGF-beta1 を加えると CCL2 の発現が軽度上昇した。TGF-beta1 と SaOS2 それぞれ前立腺癌細胞に加えると、CCL2 の特異的受容体 CCR2 の発現が亢進し、両方同時に加えると相加的に発現が亢進した。

さらに CCL2、TGF-beta1 と SaOS2 を同時に加えると、CCL17 および CCL22 の遺伝子発現が

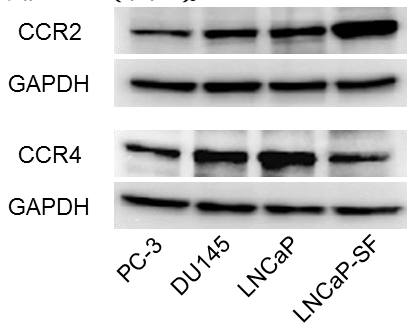
亢進し、その受容体 CCR4 の発現も亢進することが明らかとなった。

(2) ヒト単球細胞株細胞 U937 を PMA で処理するとマクローファージ様細胞へと変化した (U937-M)。U937-M は M1 タイプの性質を有していたが、前立腺癌細胞の培養上清を加えることによって、M2 タイプ、つまり、TAM へと変化した。TAM は CCL2 の分泌を介して前立腺癌細胞の遊走能・浸潤能を亢進させた。CCL2 はさらに前立腺癌細胞からの CCL22 の分泌を亢進させた (図 2)。



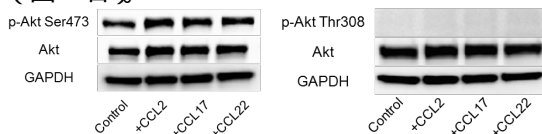
(図 2)

PCR やウェスタンブロット、免疫細胞染色で、ヒト前立腺癌細胞株に CCR2 だけではなく、CCL22 の受容体である CCR4 が発現していることを確認した (図 3)。



(図 3)

CCL22 もまた前立腺癌細胞の遊走能を亢進させた。受容体アンタゴニストを用いて CCL2-CCR2 シグナルと CCL22-CCR4 シグナルをそれぞれ阻害するとどちらも前立腺癌細胞の遊走能が減弱した。CCL2-CCR2 シグナルと CCL22-CCR4 シグナルは Akt のリン酸化を促進した (図 4 左)。このリン酸化は ser473 に特異的であり、Thr308 のリン酸化は CCL2 および CCL22 どちらについても誘導されなかった (図 4 右)。

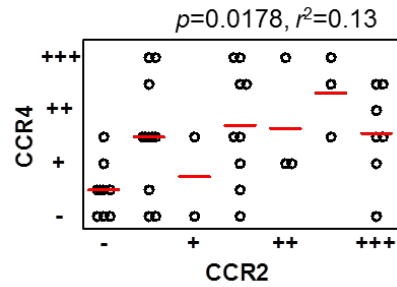


(図 4)

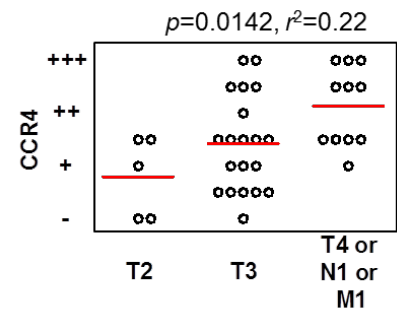
Akt の阻害薬を添加することによって、CCL22 によって亢進した前立腺癌細胞の遊走能は抑制された。CCR4 のアンタゴニストは CCR2 のアンタゴニストより強く Akt のリン酸化を阻害した。前立腺癌細胞の遊走能については CCL22-CCR4 シグナルは CCL2-CCR2 シグナルよ

り重要な役割を果たしていると考えられた。

(3) 前立腺癌組織と正常前立腺組織を含む組織マイクロアレイを用いて、抗 CCR2 および抗 CCR4 抗体による免疫組織染色を行った。正常前立腺組織より前立腺癌組織のほうが CCR2 と CCR4 の発現が有意に強かった。興味深いことに、CCR2 と CCR4 の発現の強さは高い相関が認められた (図 5)。さらに、CCR4 の発現の強さと TNM ステージの進行はよく相関していた (図 6)。



(図 5)



(図 6)

本研究では、前立腺癌組織だけではなく前立腺癌細胞株にも CCR4 が発現しており、CCR4 が前立腺癌細胞の遊走能・浸潤能に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。骨微小環境における骨関連細胞と前立腺癌細胞間の相互作用により、TGF-beta1 を介して CCL2 や CCL22 の発現が亢進する。さらにこれらは TAM との相互作用によりそのシグナルを増幅させる。最終的に前立腺癌細胞において活性化された CCL22-CCR4 シグナルは Akt のリン酸化を介して前立腺癌の転移を促進することが明らかとなった。CCL2-CCR2 系と CCL22-CCR4 系は前立腺癌の新規治療ターゲットやバイオマーカーとして非常に有望であると考えられる。

<引用文献>

Mizokami A, et al. Cancer Res 2004;64:765-71.
 Narimoto K, Mizokami A, Izumi K, et al. Int J Urol 2010;17:337-45.
 Mizokami A, Izumi K, Narimoto K, et al. Endocr Relat Cancer 2009;16:1139-55.
 Izumi K, Mizokami A, et al. EMBO Mol Med 2013;5:1383-401.
 Lin TH, Izumi K, et al. Cell Death Dis

2013;4:e764.

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 1 件)

1. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22-CCR4 axis. Maolake A, Izumi K (2 番目), Narimoto K (9 番目), Mizokami A (13 番目), (9 名略). Oncotarget. 2017;8:9739-9751. (査読あり)
doi: 10.18632/oncotarget.14185.

[学会発表](計 2 件)

1. TGF- β 1 and CCL2 as potential biomarkers and treatment targets for prostate cancer bone metastasis. Izumi K, Iwamoto H, Natsagdorj A, Maolake A, Mizokami A, Namiki M. American Urological Association Annual meeting 2016, May 6-10, San Diego, California, USA.

2. 前立腺癌新規 biomarker としての CCL2 の可能性と既存 biomarker との比較による最適な使用法の検討 泉浩二、武澤雄太、町岡一顕、八重樫洋、モラケアリケン、野原隆弘、成本一隆、上野悟、北川育秀、角野佳史、小中弘之、溝上敦、並木幹夫 第 103 回日本泌尿器科学会総会、金沢、4 月 18 日、2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成本 一隆 (NARIMOTO, Kazutaka)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 50645207

(2) 研究分担者

溝上 敦 (MIZOKAMI, Atsushi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 50248580

泉 浩二 (IZUMI, Kouji)
金沢大学・医学系・特任助教
研究者番号: 80646787