

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22591765
 研究課題名（和文） 前立腺ラテント癌から顕在癌までの癌浸潤マクロファージの解析
 研究課題名（英文） Analysis of the macrophage invaded in latent to occult prostate cancer

 研究代表者
 広川 佳史（HIROKAWA YOSHIFUMI）
 三重大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号： 30322738

研究成果の概要（和文）：臨床検体を用いたラテント癌での腫瘍関連マクロファージの関与は予想に反して少ないことが判明した。代替りの実験として癌細胞とマクロファージの微小環境における相互作用について培養系での研究が進展した。すなわち TGF β の作用により前立腺癌細胞は炎症細胞の機能を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the clinical cancer specimen, tumor associated macrophage showed little involvement to latent prostate cancer. Alternative experiment has been developed that is in vitro experiment of cancer and macrophage interaction mimicking the microenvironment. Suppressive mechanism of prostate cancer was suggested against inflammatory cell under TGF β stimulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：腫瘍病理学

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：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

癌細胞で活性化される炎症メディエーターは、種々の白血球、特に骨髄単球系の細胞を腫瘍組織にリクルートする。癌組織に誘導されるマクロファージは腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage, TAM）

と呼ばれ、癌の増殖や浸潤にも促進的に働く。また抗腫瘍免疫を抑制する作用があることもわかっている。腫瘍内のマクロファージの量と不良な予後に相関があるが、前立腺ラテント癌から微小癌をへて、顕在癌に至る過程で炎症、特にマクロファージとの関係を調べ

た研究は見当たらない。病理解剖で発見された前立腺ラテント癌には種々の程度に炎症細胞が浸潤していることを確認している。

2. 研究の目的

マクロファージがラテント癌や微小癌にどの程度含まれているか、それが癌細胞にとって有利あるいは不利に働いているのか、癌の悪性度とマクロファージの量との相関など臨床病理的事項を明らかにする。臨床癌手術標本（顕在癌）を用いて同様のことを行い、微小癌との違いを明らかにする。また癌の微小環境における癌細胞とマクロファージの相互関係を培養条件で検討する。

3. 研究の方法

(1) 病理解剖で得られた、ラテント癌、微小癌約300例を連続切片で薄切する。癌内部のマクロファージを抗CD68抗体で同定した後、抗NOS2抗体、抗Arginase-1抗体、抗MHC-II抗体、抗Scavenger receptor A抗体で免疫染色を行う。免疫染色はベンタナ社の自動免疫染色装置を用いる。

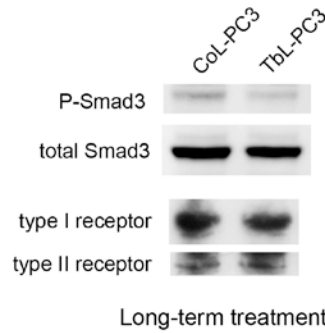
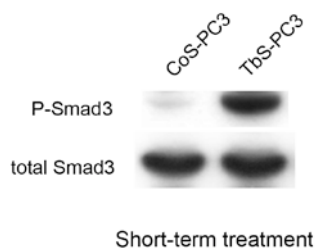
(2) 前立腺癌細胞 PC3 に TGF β を長期処理し微小環境における癌細胞とし、この PC3 細胞とマクロファージのモデルである、THP-1・マクロファージ様細胞を共培養することで微小環境の一端を再現した。その後 THP-1・マクロファージ様細胞からのサイトカイン産生変化を調べ、癌細胞が及ぼす影響を見た。

4. 研究成果

(1) ラテント癌に浸潤する炎症細胞のうちマクロファージの割合は、免疫染色 (CD68) を行ったところ非常に少ないことが判明した。そこで臨床検体を用いた研究を一旦中断し、前立腺癌細胞とマクロファージ様細胞の共培養の実験を進めることとした。

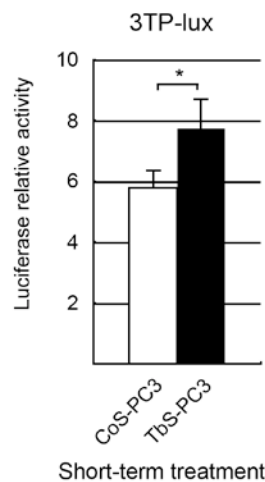
(2)

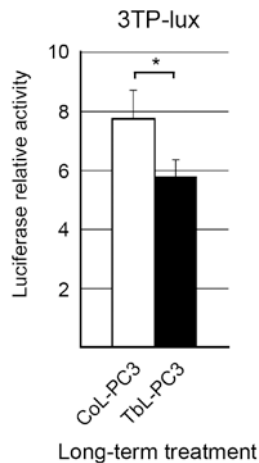
図 1



PC3 細胞を TGF β に短期処理 (Short-term treatment)、長期処理 (Long-term treatment) 下の場合の TGF β により活性化される Smad3 のリン酸化を検出した。CoS-PC3 は短期コントロール処理細胞、Tbs-PC3 は短期 TGF β 処理細胞。PC3 細胞は RPMI1640 の培地 (10%牛胎児血清) で培養した。TGF β 1 は最終濃度 10 ng/ml の濃度で培地に加えた。長期処理の PC3 細胞は 7 日ごとに継代した。TGF β 1 または溶媒を培地に継代と同時に加え、次の継代まで維持された。継代は 10 回繰り返した。短期処理の PC3 細胞は TGF β 1 または溶媒を培地に加えて一晩処理し、翌日に培地を TGF β 1 または溶媒を含まないものに換えた。CoL-PC3 は長期コントロール処理細胞、Tbl-PC3 は長期 TGF β 処理細胞。短期 TGF β 処理では強い Smad3 のリン酸化が見られるが、長期 TGF β 処理では Smad3 のリン酸化は減少している (図 1)。

図 2





TGF β のターゲット遺伝子である 3TP-lux を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。p3TP-Lux プラスミドは Dr. Joan Massague から供給していただいた。ルシフェラーゼレポーターアッセイは PC3 細胞に発現ベクターおよびレポータープラスミドを Lipofectamine を用いてトランスフェクションした。24 時間後細胞を溶液に溶かした。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System にて測定した。Renilla ルシフェラーゼ活性 (Renilla プラスミドを用いて) を内在性コントロールとして測定した。短期 TGF β 処理では強いルシフェラーゼ活性の上昇が見られるが、長期 TGF β 処理ではルシフェラーゼ活性はコントロールに比べて低下している (図 2)。

次に腫瘍微小環境のモデルとしての共培養実験を行った。微小環境の細胞としてマクロファージの代わりに単球性白血病由来の THP-1 細胞を用いた。THP-1 細胞は phorbol 12-myristate 13-acetate の処理によりマクロファージ様の細胞 (THP-1 マクロファージ) に変化することが知られている。TGF β 1 または溶媒で短期あるいは長期処理した PC3 細胞をチャンバーインサートに入れ、プレートに撒いた THP-1 マクロファージと共培養した。その後 THP-1 マクロファージから RNA を抽出し、cDNA 合成、Real time PCR を IL-6、TNF α 、IL-10 について発現比較を行った。結果は短期 TGF β 処理の PC3 細胞と共培養した THP-1 マクロファージはコントロール (溶媒) 処理のものと比較して、IL-6、TNF α 、IL-10 産生に優位な差は見られなかった。長期 TGF β 処理の PC3 細胞と共培養した THP-1 マクロファージはコントロール (溶媒) 処理のものと比較して、IL-6 産生が優位に低

下し、TNF α 産生は低下傾向にあり、IL-10 産生には差が見られなかった。

次に THP-1 マクロファージから IL-6 産生が低下した機序を検討した。IL-6 は Prostaglandin E2 (PGE2) により誘導される。また PGE2 は Cyclooxygenase-2 (COX2) により産生される。そこでまず COX2 タンパクの発現をウェスタンブロットにて検討した。COX2 タンパクの発現は長期 TGF β 処理の PC3 細胞で低下していた。短期 TGF β 処理では差が見られなかった。次に PGE2 の産生能を検討した。各細胞に PGE2 の基質であるアラキドン酸を加え、培養上清中の PGE2 を ELISA にて検出した。長期 TGF β 処理の PC3 細胞では PGE2 産生がコントロールに比べて低下していた。短期 TGF β 処理では差が見られなかった。

まとめ
癌細胞の増殖、浸潤、転移に関わるとされる IL-6、TNF α の THP-1 マクロファージからの産生が、TGF β 長期処理 PC3 細胞との共培養で低下した。その機序として、PC3 細胞からの COX2 産生低下、プロスタグランジン E2 の産生能低下によることが考えられた。TGF β は一般に炎症を促進、悪化させる作用があるが条件によっては炎症性細胞の抑制に働く場合があ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)
① α -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. Kokubo Y, Hirokawa Y, Shiraishi T, . (他 8 名、7 番目、査読あり) J Neuropathol Exp Neurol. 71, 625-630, 2012 .

② Cardiac ¹²⁵I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy and lewy body pathology in a patient with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Kii, Japan. Kokubo Y, Hirokawa Y, Shiraishi T, . (他 5 名、4 番目、査読あり) Mov Disord. 26, 2300-2301, 2011.

③ RhoB enhances migration and MMP1

expression of prostate cancer DU145.、
Yoneda M, Hirokawa YS, Shiraishi T.、(他
6名、2番目、査読あり)、Exp Mol Pathol.、
88、90-95、2010

〔学会発表〕(計4件)

①広川佳史、石井健一郎他、TGF- β により前立腺
癌細胞が腫瘍微小環境に及ぼす影響とその病理学
的検討、第71回日本癌学会学術総会、平成24年
9月21日、札幌市

②宮崎祐子、広川佳史他、TGF- β 長期刺激が扁平
上皮癌に及ぼす影響と放射線感受性の変化につい
て、第101回日本病理学会総会、平成24年4月
28日、東京都

③広川佳史、石井健一郎他、TGF- β 長期刺激が前
立腺癌細胞株に及ぼす影響とTHP-1分化マクロ
ファージ様細胞に対する作用、第70回日本癌学会
学術総会、平成23年10月4日、名古屋市

④広川佳史、林昭伸、藤原雅也他、TGF- β 長期刺
激が前立腺癌に及ぼす影響について、第100回日
本病理学会総会、平成23年4月28日、横浜市

〔その他〕

ホームページ等

<http://hpl.medic.mie-u.ac.jp/oncopath/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広川 佳史 (HIROKAWA YOSHIFUMI)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号： 30322738

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

白石 泰三 (SIRAISHI TAIZOU)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 30162762