

## 60. リンパ管・リンパ組織の可塑性を制御する生理活性脂質

馬嶋 正隆

北里大学 医学部 薬理学

Key words : prostaglandin, リンパ管, リンパ節, 腫瘍転移, niche

### 緒言

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。これまで報告者らは、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の役割を持っていることを報告してきた<sup>1,2)</sup>。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製し、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- $\beta$  など) や免疫担当細胞 (dendritic cells, regulatory T cells) の動態と役割につき、リンパ節組織における可塑性を解析した<sup>3)</sup>。

### 方法、結果および考察

我々は本研究で、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 依存性に産生された PGE<sub>2</sub> 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 の発現増大が subcapsular region で生じ premetastatic niche を形成すること、さらに、COX-2 陽性の SDF-1 産生細胞は樹状細胞であり、EP3 依存性に TGF- $\beta$  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明らかに出来た。

C56BL/6 マウスを用い、Lewis lung carcinoma (LLC;  $5 \times 10^4/10 \mu\text{L}$ ) 細胞を Matrigel® と混合し、左肺に直接移植することにより、肺癌リンパ節転移モデルを作製した。このモデルでは、通常腫瘍接種後 10 日から 12 日目に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する。転移リンパ節に COX-2 による免疫染色を行うと、腫瘍転移前の早期の段階で subcapsular sinus の部位に経時的に増強する COX-2 の陽性像が確認できた (図 1A)。この COX-2 の役割を解析するため、COX-2 inhibitor (celecoxib) を毎日経口投与し、vehicle 群と比較したところ、接種した原発腫瘍の大きさには特段有意差は認められず、celecoxib 投与群においてリンパ節への転移が有意に抑制された (図 1B)。同様のリンパ節への転移の有意な抑制は、EP3 ノックアウトマウスでも認められ、これらの結果から COX-2 依存性に産生された PGE<sub>2</sub> が EP3 signaling を介してリンパ節転移を増強することがわかった。

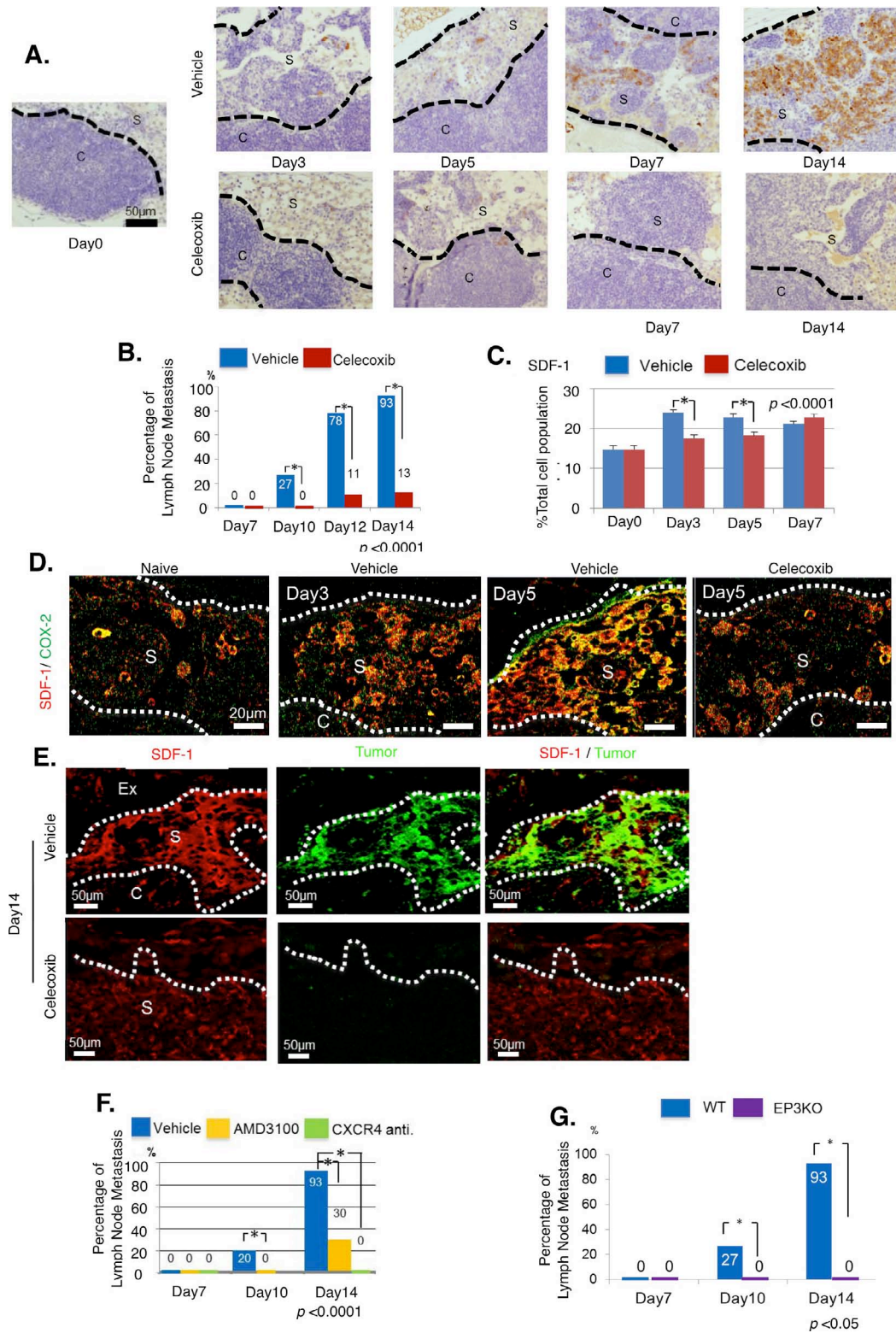


図1. 腫瘍所属リンパ節における COX-2 誘導の経時変化と SDF-1 の発現

(A) vehicle 群と celecoxib 投与群における COX-2 発現、(B) リンパ節転移成立頻度、(C) SDF-1 発現の経時変化、(D) SDF-1/COX-2 陽性部位の推移、(E) 転移成立後の SDF-1 と腫瘍の関係、(F) SDF-1 拮抗薬 (AMD3100) および CXCR4 中和抗投与時のリンパ節転移頻度、(G) EP3 ノックアウトマウスにおけるリンパ節転移頻度。\* $p < 0.05$  (ANOVA)。

我々はこれまでに、腫瘍増殖に伴って形成されるストローマ組織において、PG が形成増強作用を発揮していることを報告している<sup>4)</sup>。多くのケモカイン系とその受容体の評価を行ったところ、中でも SDF-1 がストローマの主要構成骨髄細胞の動員に役割を持つことが判明した。リンパ節に腫瘍細胞が動員、接着することが niche 形成の上で重要であることは想像に難くない。事実、subcapsular 領域におけるケモカイン系の発現を調べると、確かに SDF-1 の発現が腫瘍接種に伴って、ごく早期から高まってきていた。COX-2 および内因性 PG の関与について検討すると、PG receptor 内で EP3 が最も高発現を呈し、マウスに celecoxib 投与した群において vehicle 群と比較し、リンパ節内 subcapsular sinus における前転移状態 (pre-metastatic phase) での SDF-1 発現の低下が確認できた (図 1C、D)。vehicle 群において、リンパ節転移成立後のリンパ節の subcapsular sinus における SDF-1 陽性部分は腫瘍細胞と一致しており、この部位が転移の温床となることが確認され、celecoxib 群では有意に抑制されていることがわかった (図 1E)。

また、SDF-1 antagonist (AMD3100)・CXCR4 中和抗体および EP3 ノックアウトマウスを用いた実験でも、vehicle 群に比べ、リンパ節転移の抑制を確認した (図 1F、G)。この結果から、あらかじめ特定の場所 (premetastatic site) に誘導された COX-2 由来の PGE<sub>2</sub> が EP3 signaling を介して SDF-1/CXCR4 axis の signaling により、premetastatic niche を形成していることが判明した。

さらに、いかなる細胞構成成分が premetastatic niche 形成に関与し、COX-2 や SDF-1 の制御のもとで役割を発揮しているのか検討した。我々が注目してきた腫瘍ストローマ組織のマクロファージや fibroblast に加えて、免疫担当細胞のある種の細胞集団が、がんの増殖や血管新生、加えて転移メカニズムを制御することわかってきた。その中でも DCs や regulatory T cells (Tregs) ががんの増殖や転移に関連していると報告され、その機能の調節に PGs が関わっていることが、明らかにされつつある<sup>5)</sup>。本研究では、われわれはこれらの細胞群に注目し、premetastatic niche を形成に関与するか検討を加えた。

DCs マーカーである CD11c・IDO と COX-2・SDF-1 を用いて免疫染色を用いて解析すると、DCs は COX-2 および SDF-1 陽性であり、vehicle 群に比べると celecoxib、SDF-1 antagonist (AMD3100)、CXCR4 中和抗体処置群のリンパ節内 subcapsular sinus での発現量が有意に低下していた。以上から、腫瘍接種という刺激を受け、premetastatic site に遊走した DCs が SDF-1 を産生し、premetastatic niche を形成することが示唆された。さらに、DCs の遊走に非常に関連しているとされる CCR7 のリンパ節での発現を調べると、vehicle 群に比べ有意に抑制されていた。

事実、PGE<sub>2</sub>-EP3 signaling が DCs を介して SDF-1 を産生促進するかどうか検討してみると、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 DCs を骨髄移植し、腫瘍のリンパ節転への影響を検討すると、EP3KO DCs 移植群で有意なリンパ節転移の抑制が認められた。EP3KO DCs 移植群ではリンパ節内 subcapsular sinus での DCs の集簇の低下および SDF-1 産生の抑制が確認され、EP3/SDF-1 の相互作用により positive feedback loop を形成していることが示唆された。また *in vitro* で、この DCs に EP3 agonist を添付すると野生型マウス由来 DCs からは SDF-1/TGF- $\beta$  の分泌の亢進が確認された。FoxP3 陽性の Treg のリンパ節内 subcapsular sinus への集簇は、COX-2 阻害薬処置マウス、EP3 ノックアウトマウスで有意に抑制された。premetastatic niche formation の結果、転移した腫瘍細胞の免疫寛容に、この COX-2/EP3 依存性の Treg の制御が関与している可能性もあることが判明した。

一旦リンパ節に腫瘍細胞が到達すると、さらなるリンパ管新生を生じることで他臓器への転移を促進すると考えられているが、そこにいかなる因子が関わっているか不明な部分も少なくない。事実、本実験ではリンパ節におけるリンパ管新生因子 (VEGF-C/-D、Type 3 VEGF receptor) の発現の経時的変化および Lyve-1 を用いてリンパ管数を経時的に解析すると、vehicle 群よりも celecoxib 投与群、EP3KO 群でリンパ管新生因子・新生リンパ管数・リンパ管内径面積が有意に抑制された。このことから COX-2 の誘導、PGE<sub>2</sub>-EP3 signaling が premetastatic phase におけるリンパ節内リンパ管新生に役割を持っていることが判明した。

腫瘍所属リンパ節における pre-metastatic niche formation は COX-2 の誘導、PGE<sub>2</sub>-EP3 signaling、SDF-1/CXCR4、TGF- $\beta$  による DCs や Tregs の骨髄からの動員により増強されると考えられた。それゆえ、COX-2 inhibitor や CXCR4 antagonist、EP3 antagonist や DCs を介した免疫療法が今後の肺癌治療の一つの選択肢になりうる。上記機構を制御することで、がん患者の予後改善の可能性がある。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、北里大学医学部薬理学の天野英樹、小川史洋、京都大学大学院医学研究科神経細胞薬理学分野の成宮周教授である。

## 文 献

- 1) Amano HI, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Kobayashi M, Satoh K, Narita M, Sugimoto Y, Murata T, Yoshimura H, Narumiya S, Majima M. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med.* 2003 Jan 20;197(2):221-32. PMID: 12538661.
- 2) Majima M, Amano H, Hayashi I. Prostanoid receptor signaling relevant to tumor growth and angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Oct;24(10):524-9. PMID: 14559404.
- 3) 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.* 2014Nov;124(11):4882-94. doi: 10.1172/JCI73530.
- 4) Katoh H, Hosono K, Ito Y, Suzuki T, Ogawa Y, Kubo H, Kamata H, Mishima T, Tamaki H, Sakagami H, Sugimoto Y, Narumiya S, Watanabe M, Majima M. COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine systems. *Am J Pathol.* 2010 Mar;176(3):1469-83. doi: 10.2353/ajpath.2010.090607.
- 5) Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2375-81. Epub 2005 Jun 9. PMID: 15947091.