

167. 免疫抑制剤による前立腺癌新規治療法の開発

河原 崇司

*横浜市立大学 医学部附属病院 泌尿器科

Key words : 前立腺癌, 免疫抑制剤, NFAT, シクロスポリン, タクロリムス

緒言

我々は、今までの研究から免疫に関わる転写因子の一つである NFATc1 が、膀胱癌・前立腺癌で多く発現しており、独立した予後因子であることを見出している^{1,2)}。また、膀胱癌において、免疫抑制剤により NFATc1 を抑えることで、膀胱癌の進展抑制効果があることを報告している^{2,3)}。本研究では、前立腺癌の発生・進展の抑制機構における NFATc1 の役割を解明するとともに、治療法が確立されていない去勢抵抗性前立腺癌の免疫抑制剤による新規治療法の開発を目指す。

方法

1. NFATc1 発現解析と新規診断予後予測プログラムの開発

免疫組織学的染色を用いて、ヒト前立腺癌組織検体における NFATc1 及び NFAT isoform の発現を検討し、組織病理学的特性や臨床経過を解析した。

2. *In vitro* における NFATc1 の機能解析

前立腺癌細胞を用いて、免疫抑制剤であるシクロスポリン・タクロリムスによる NFATc1 の標的分子発現を PCR 法やウェスタンブロットによって検討した。また、前立腺癌細胞の増殖抑制効果、浸潤抑制効果については分子生物学的に検討した。

3. *In vivo* におけるシクロスポリン・タクロリムス療法の検討

In vitro の結果をもとに、マウス移植片腫瘍モデルを用いてシクロスポリン・タクロリムスによる NFATc1 を介した前立腺癌進展に与える効果を検討した。

結果

1. 前立腺癌細胞株における NFATc1 の発現

正常前立腺・ホルモン感受性前立腺・去勢抵抗性前立腺癌細胞において、NFAT の 5 種の isoform の発現を PCR 法で確認した NFATc1 で悪性度の順に高発現していた。また前立腺癌細胞株での NFATc1 の発現をウェスタンブロット法で確認した。ヒト前立腺癌組織アレイを用いて免疫組織染色で NFATc1 の発現を確認した。正常前立腺に比べて前立腺癌では有意に発現が高かった。また NFATc1 高発現群では有意に Progression Free Survival の不良を認めた(図 1)。多変量解析において、NFATc1 は独立した予後不良因子の一つであった。

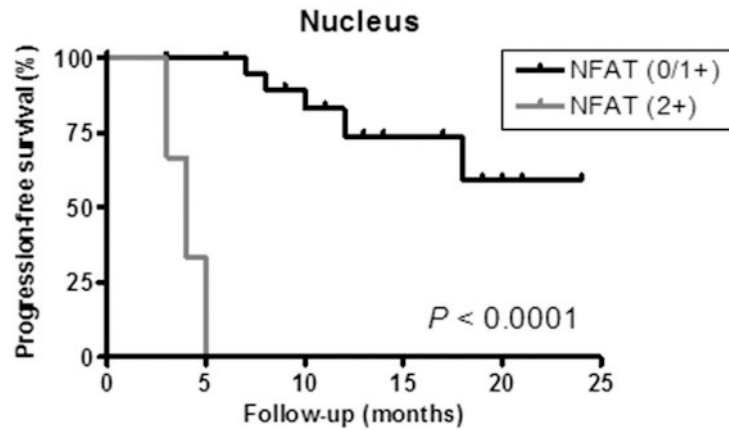


図1. NFATc1 の発現と前立腺癌における Progression Free Survival (LogRank 法での解析)

2. 免疫抑制剤における NFATc1 の抑制

NFATc1 の核内移行を確認するために、免疫蛍光染色を施行した。免疫抑制剤を用いると NFATc1 の核内移行が阻害された。また、ウェスタンブロット染色では、核内における NFATc1 の発現低下を確認した。ルシフェレーズアッセイでは、免疫抑制剤により NFAT のルシフェレーズの発現低下を認めた。NFATc1 を SiRNA を用いてノックダウンした細胞では免疫抑制剤による NFATc1 の低下は認めなかった。NFATc1 の下流遺伝子として cmyc があり、免疫抑制剤を用いることで、下流遺伝子である cmyc の発現低下を認めた。MTT アッセイでは、NFATc1 をノックダウンすると有意に、腫瘍増殖を抑制した。MTT アッセイにおいて、免疫抑制剤は有意に細胞増殖を抑制した。NFATc1 をノックダウンすると、免疫抑制による腫瘍増殖効果は認められなかった。このことから、免疫抑制剤は、NFATc1 を介した腫瘍抑制効果を得ると確認された。

マトリジェルを用いた細胞浸潤能について検討を行った。NFATc1 をノックダウンすると、細胞浸潤能は有意に低下した。免疫抑制剤を用いても、細胞浸潤能は有意に低下した。細胞浸潤能に関して PCR 法で MMP2 および MMP9 の発現を検討したところ、免疫抑制剤で有意に MMP2 および MMP9 の発現低下を認めた。ゼラチンゼイモグラフィーをもちいても同様に MMP2 および MMP9 の活性低下を認めた。NFATc1 をノックダウンした細胞では、免疫抑制剤による細胞浸潤能の低下は確認できなかった。これらのことより、免疫抑制剤は NFATc1 を介した細胞浸潤能の低下を認めた。

migraton アッセイを施行した。NFATc1 をノックダウンした細胞では有意に migration 能の低下を認めた。免疫抑制剤を用いても migration 能の有意な低下を認めた。去勢抵抗性前立腺癌細胞株である C4-2 でも同様に低下を認めた。これらの結果より、免疫抑制剤は去勢抵抗性前立腺癌でも同様の効果が得られると考えられた。TUNEL アッセイを用いたアポトーシスの評価では、免疫抑制剤をもちいると、有意にアポトーシスが促進された。フローサイトメトリーを用いても、同様に免疫抑制剤でアポトーシスの促進を確認した。

3. マウス移植片腫瘍モデルにおける免疫抑制剤の効果

マウス移植片腫瘍モデルを用いてシクロスポリン・タクロリムスを投与した。シクロスポリン・タクロリムスを投与した群では有意に、腫瘍増殖の抑制が確認された。

考 察

NFAT は免疫応答に関わる転写因子として Shaw らにより報告されており⁴⁾、主要な研究は免疫応答への関与についての検討のみである。また、免疫抑制剤であるカルシニューリンインヒビター (シクロスポリン・タクロリムス) は NFAT の核内移行を抑えることで転写活性を阻害し、免疫応答を制御している。NFAT と癌の関連性については、Oum らにより固形癌において NFAT が何らかの重要な役割を果たすことが報告されているが、詳細なメカニズムの解明には至っていない⁵⁾。

我々は本研究で、前立腺癌における NFATc1 の発現を検討し、NFATc1 の高発現群では有意に予後が不良であったことを確認した。また、前立腺癌細胞において、免疫抑制剤であるシクロスポリン・タクロリムスが NFATc1 の核内移行を阻害することで、腫瘍細胞の増殖抑制・アポトーシスの促進をすることを確認した。これらの結果から、前立腺癌において、免疫抑制剤が NFATc1 を介して抗腫瘍効果を得ることを明らかにした。一方で、免疫抑制剤は免疫を抑制することで、腫瘍の増殖効果や感染の助長などの副作用もある。今後、臨床的に使用するには、より NFAT のアイソフォームの一つである c1 を選択的に阻害する薬剤の開発が必要であるとも考えられた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、横浜市立大学附属市民総合医療センター泌尿器腎移植科の上村博司および Departments of Urology and Pathology, Johns Hopkins University Graduate School of Medicine の Hiroshi Miyamoto である。

文 献

- 1) Kawahara T, Kashiwagi E, Li Y, Zheng Y, Miyamoto Y, Netto GJ, Ishiguro H, Miyamoto H. Cyclosporine A and tacrolimus inhibit urothelial tumorigenesis. *Mol Carcinog.* 2016 Feb;55(2):161-9. doi: 10.1002/mc.22265. *Carcinog.* 2016 Feb;55(2):161-9. doi: 10.1002/mc.22265. Epub 2015 Jan 15.
- 2) Kawahara T, Kashiwagi E, Ide H, Li Y, Zheng Y, Ishiguro H, Miyamoto H. The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. *Prostate.* 2015 May;75(6):573-84. doi: 10.1002/pros.22937.
- 3) Kawahara T, Kashiwagi E, Ide H, Li Y, Zheng Y, Miyamoto Y, Netto GJ, Ishiguro H, Miyamoto H. Cyclosporine A and tacrolimus inhibit bladder cancer growth through down-regulation of NFATc1. *Oncotarget.* 2015 Jan 30;6(3):1582-93. PMID: 25638160.
- 4) Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science.* 1988 Jul 8;241(4862):202-5. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science.* 1988 Jul 8;241(4862):202-5. PMID: 3260404.
- 5) Oum JH, Han J, Myung H, Hleb M, Sharma S, Park J. Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF-alpha promoters. *Mol Cells.* 2002 Feb 28;13(1):77-84. PMID: 11911478.