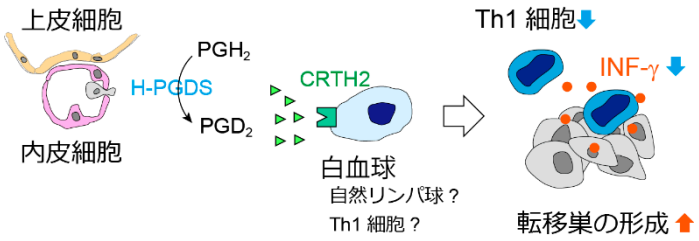
119　PGD_2のがん転移促進機構の解明	小林　幸司

【目的】局所で発生したがんは、全身に転移して様々な臓器の機能不全を引き起こす。しかし、転移のメカニズムは未だに不明な点が多く、有効な治療法も存在しない。プロスタグランジン D_2（PGD_2）は細胞膜のリン脂質に由来するアラキドン酸が酵素による代謝を受けてできる生理活性脂質の一つである。我々は、PGD_2の合成酵素のノックアウト（KO）マウスではがんの転移が抑制されることを発見したが、その詳細はよくわかっていなかった。そこで、本研究ではその機構を詳細に解明するとともに、転移の治療における PGD_2シグナルの阻害薬の有用性を検討することを目的とした。

【方法】マウスのメラノーマ細胞株である B16 細胞を、PGD_2合成酵素や受容体の KO マウスに尾静脈投与し、14 日後に肺にできたコロニー数を計測することで転移を評価した。また、B16 の尾静脈投与 1、3 日後の肺を回収し、免疫細胞の構成をフローサイトメトリーで、サイトカインの mRNA 発現を qRT-PCR によって測定した。

【結果】B16 細胞を PGD_2の合成酵素である *hematopoietic PGD synthase（H-PGDS）*遺伝子 KO マウスに尾静脈投与すると、野生型マウスと比べて転移巣の数が減少した。免疫染色によって H-PGDS はがんを移植したマウスの肺の上皮細胞や血管内皮細胞に発現していることがわかった。また、PGD_2の受容体である *chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells（CRTH2）*受容体遺伝子の KO マウスにおいて、*H-PGDS* KO マウスと同程度の肺転移の減少が見られた。別のがん細胞株（Lewis lung carcinoma）を用いた実験でも、*H-PGDS* KO マウスは転移抑制を示した。次に、野生型マウスに放射線を照射した後に *CRTH2* KO マウスの骨髄を移入して、野生型マウスの骨髄を *CRTH2*KO の骨髄に置換した。このマウスでは B16 の肺転移が抑制されたため、骨髄に由来する免疫細胞に発現している CRTH2 受容体が肺転移を促進することがわかった。B16 投与 1 日後の肺における免疫細胞をフローサイトメトリーで確認したところ、*H-PGDS*KO および *CRTH2* KO マウスの肺では野生型と比べて CD8 陽性 T 細胞の割合が顕著に増加していることがわかった。これらのマウスの肺では、抗がん活性を示すサイトカインである INFγの発現が増加していることも qRT-PCR によって確認した。IFNγの中和抗体の処置は野生型マウスの肺転移に影響を与えなかったが、*CRTH2* KO マウスで見られた肺転移の抑制を解除した。最後に、H-PGDS の阻害薬である HQL-79 や、CRTH2 受容体の阻害薬であるラマトロバンの投与は野生型マウスにおける B16 の肺転移を顕著に抑制した。本研究によって、上皮細胞や内皮細胞の H-PGDS によって産生された PGD_2は、骨髄由来の細胞の CRTH2 受容体を刺激し、CD8 陽性 T 細胞と IFNγの減少を引き起こすことでがんの肺転移を促進することが明らかになった。また、H-PGDS や CRTH2 受容体の阻害薬の処置によって転移が抑制されることも分かった。

PGD_2の転移抑制機構



PGD_2は抗がん免疫を抑制することで転移を促進する

119. PGD_2のがん転移促進機構の解明

小林　幸司

東京大学 大学院農学生命科学研究科 食と動物のシステム学研究室

Key words：がん，転移，プロスタグランジン D_2，脂質メディエーター

緒　言

がんの患者数は年々増加しており、現在では日本人の約二分の一ががんを発症し、約三分の一ががんで死亡する。遺伝子の変異によって際限のない増殖能を得たがん細胞は、単にその場で増殖するのみならず、血管やリンパ管を介して遠隔臓器に転移する［1］。その結果、様々な臓器の機能不全が引き起こされ、患者の死亡の直接の原因になる。がんの研究は盛んにおこなわれており、がんの発生・増殖メカニズムに関しては多くの知見が得られている一方で、転移のメカニズムはそれほど明らかになっておらず、転移を抑制するための治療法の開発も進んでいない。

脂質メディエーターとはプロスタグランジンやロイコトリエン、血小板活性化因子など分子量数百の生理活性を持つ脂質の総称である。脂質メディエーターは様々な生理的・病態生理的な現象、特に炎症反応、免疫反応の制御を行うことが知られている。がんにおいても脂質メディエーターが産生され、がんの増殖、抑制にかかわることがわかっているが［2, 3］、転移における脂質メディエーターの役割は不明である。予備検討において、著者は脂質メディエーターの一つであるプロスタグランジン D_2（PGD_2）の合成酵素のノックアウト（KO）マウスにおいて、がんの肺転移が抑制されることを発見した。本研究では、PGD_2の転移促進機構の詳細を解明すること、また、転移の治療における PGD_2シグナル阻害の有用性を検討することを目的とした。

方　法

1. 動物と細胞

C57BL/6 を遺伝的な背景とする野生型（WT）、*haematopoietic PGD synthase*$^{-/-}$（*H-PGDS*KO）、*lipocalin-type PGD synthase*$^{-/-}$（*L-PGDS* KO）、*chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells*$^{-/-}$（*CRTH2*KO）、および、*D prostanoid receptor*$^{-/-}$ *DP*KO）マウスを用いた。骨髄移植モデルでは、マウスに放射線を照射して骨髄由来細胞を殺滅したのち、別のマウスの大腿骨、上腕骨から回収した骨髄細胞を静脈内投与し、2 か月以上経過してから実験を行った。動物実験は東京大学動物実験委員会の審査を経た後、部局長の承認のもと行った。マウスのメラノーマ細胞（B16）、肺がん細胞（Lewis lung carcinoma：LLC）は理研バイオリソースセンターより購入した。

2. マウス肺転移モデル

2×10^5個の B16、あるいは LLC を 100 μL の生理食塩水に懸濁し、マウスの尾静脈から投与した。14 日後にマウスを安楽死処分して肺を摘出し、肺に形成されたコロニーの数を計測した。ラマトロバン（50 mg/kg）、HQL-79（50 mg/kg）はがん細胞を投与した日から毎日 2 回腹腔内投与した。抗 IFN-γ 中和抗体（200 μg）はがん細胞の投与直後に腹腔内投与した。

3. 免疫染色

摘出した肺を 4%のパラホルムアルデヒドに 1 晩浸漬して固定し、スクロース置換の後に凍結して薄切した。薄切標本に抗 CD45、CD31、E-cadherin、H-PGDS 抗体を処置したのち、適切な二次抗体を処置して、蛍光顕微鏡下で標本の観察を行った。

4. 定量的逆転写 PCR

摘出した肺を液体窒素で凍結して粉砕し、トリゾール-クロロホルム法で RNA を抽出した。インターフェロン γ（INF-γ）、インターロイキン 4（IL-4）、インターロイキン 10（IL-10）のプライマーを使用し、定法に従って定量的逆転写 PCR を行った。ΔΔCt 法によって各 mRNA の発現を定量した。

5. フローサイトメトリー

摘出した肺をコラゲナーゼで消化し、抗 CD4、CD8、CD11b、CD45、Gr-1、NK1.1 抗体を用いて染色した。あるいは、PMA/Ionomycin 処理を行ったのちに固定、脱膜化して抗 INF-γ、IL-4 抗体を用いて細胞内染色を行った。これらのサンプルをフローサイトメトリーによって解析し、各種免疫細胞の存在比を測定した。

6. 統計解析

データはマウスごとのデータ、あるいは平均値±標準誤差で示した。二群間の検定は Student の t 検定を用いて行った。他群間の検定は、one-way ANOVA の後、有意差が認められたものに関して Tukey-Kramer の検定を行った。危険率（p）が 0.05 を下回ったものを有意差ありとした。

結　果

1. 肺の内皮細胞、上皮細胞に発現する H-PGDS はがん細胞の転移を促進した

PGD2 の合成酵素には H-PGDS と L-PGDS の 2 つが知られている。マウスのメラノーマである B16 細胞を WT、*H-PGDS* KO、*L-PGDS* KO マウスの尾静脈に投与し 14 日後の肺転移を観察したところ、WT マウスに比べて *H-PGDS* KO マウスでは転移の有意な減少が観察された（図 1A～C）。*L-PGDS* KO マウスの肺転移は WT マウスと同程度であった。マウスの肺がん細胞（LLC）を用いて同様の実験を行ったところ、H-PGDS の欠損は LLC の転移を抑制することも確認された（図 1D、E）。肺において、H-PGDS は免疫細胞、血管内皮細胞、上皮細胞に広く発現している、どの細胞に発現する H-PGDS ががんの転移に関与するのかを検討するため、WT、*H-PGDS* KO マウス間で骨髄移植を行い、骨髄由来の細胞（donor 由来）とそれ以外の細胞（recipient 由来）で遺伝子型が異なるマウスを作製した。これらのマウスを用いて B16 細胞の肺転移を検討したところ、donor の遺伝子型にかかわらず、recipient の遺伝子型が *H-PGDS* KO であったときにのみ、肺転移が顕著に抑制された（図 1F）。この結果は、骨髄に由来しない上皮細胞や内皮細胞に発現している H-PGDS が肺転移を促進していることを示している。また、免疫染色によって肺の E-cadherin 陽性の上皮細胞や CD31 陽性の内皮細胞に H-PGDS が発現していることを確認した。

2. CRTH2 受容体の刺激ががんの肺転移を促進した

PGD_2の受容体として、DP 受容体と CRTH2 受容体の 2 つが知られている。がんの転移に対するこれらの受容体の関与を検討した。野生型、*DP* KO、および *CRTH2* KO マウスに B16 細胞を静脈内投与し、14 日後の肺転移を計測したところ、*DP* KO マウスの肺転移は WT マウスと同程度だった一方で、*CRTH2* KO マウスの肺転移は有意に減少した（図 2A、B）。B16 細胞を移植したのちに H-PGDS の阻害薬である HQL-79 や CRTH2 受容体の拮抗薬であるラマトロバンを毎日 50 mg/kg の濃度で腹腔内投与すると、B16 の肺転移が有意に抑制された（図 2C）。

3. H-PGDS/CRTH2 シグナルは Th1 細胞を抑制することでがんの肺転移を促進した

フローサイトメトリーによって肺の中の免疫細胞の組成を検討したところ、*H-PGDS* KO、*CRTH2* KO マウスでは INF-γ陽性の Th1 細胞の数が増加していることが分かった。そのほかの細胞種におおきな変化は見られなかった。また、qRT-PCR によってこれらのマウスの肺において INF-γの mRNA の発現が上昇していることも明らかになった。INF-γはがん細胞に対する免疫反応を活性化して、抗がん作用を示すことが知られている。そこで、INF-γの中和抗体を *CRTH2* KO マウスに投与したところ、B16 細胞の肺転移が増加した。

考　察

本研究では、H-PGDS によって産生された PGD_2が CRTH2 受容体を介して抗がん免疫、特に INF-γの産生を抑制して転移を促進すること、また、H-PGDS や CRTH2 受容体の阻害が転移を抑制することを明らかにした。CRTH２受容体は好酸球や Th2 細胞に発現することが知られており、その刺激は Th1 細胞への分化を抑制するとともに Th2 サイトカインの分泌を促進し、アレルギー反応を促進する［4，5］。肺においてもこれらの細胞が CRTH2 を受容し、Th1 細胞の増殖や INF-γ産生を抑制していると考えており、今後それを実験で証明していく予定である。

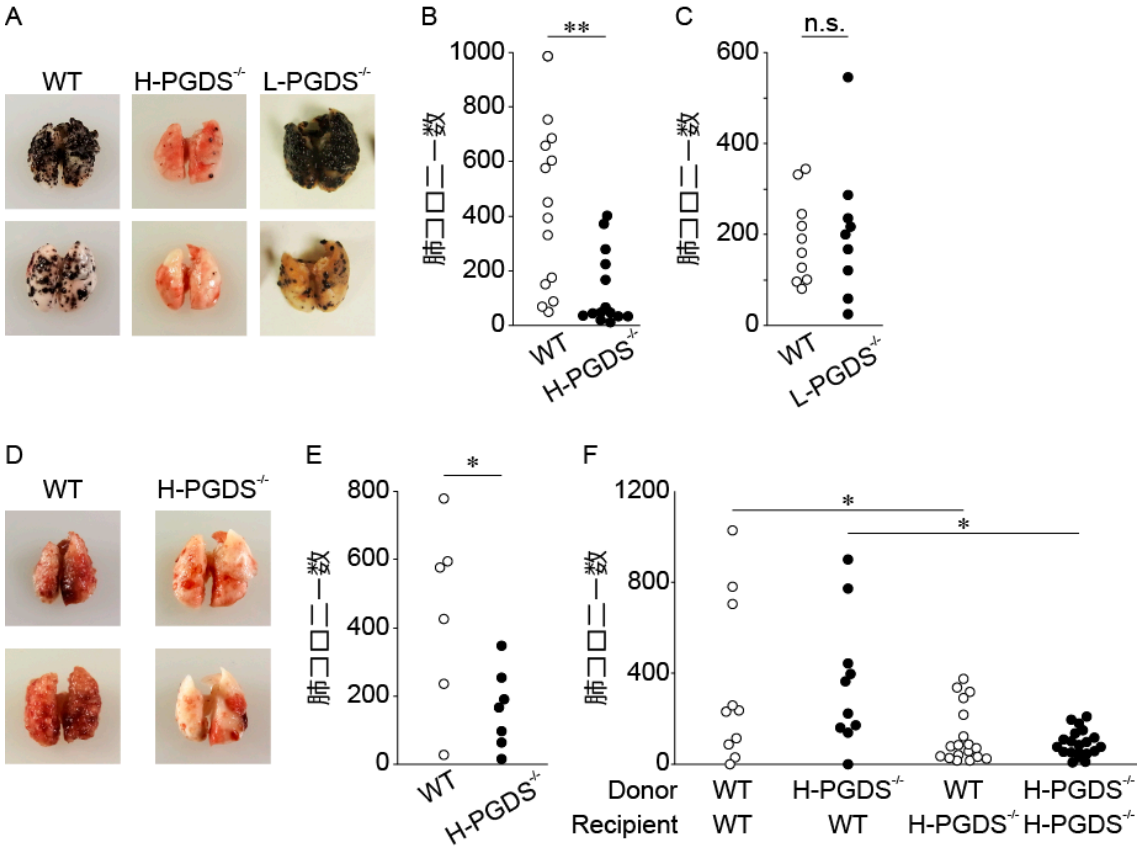


図 1. 非骨髄細胞に発現する H-PGDS ががんの肺転移を促進した

a） B16 細胞をマウスの尾静脈に投与して 14 日後の肺の典型例。

b、c） 肺にできた B16 細胞のコロニー数（**p＜0.01）。

d） LLC 細胞をマウスの尾静脈に投与して 14 日後の肺の典型例。

e） 肺にできた LLC 細胞のコロニー数（*p＜0.05）。

f） 骨髄移植マウスに B16 細胞を尾静脈投与し、14 日後の肺にできたコロニー数（*p＜0.01）。

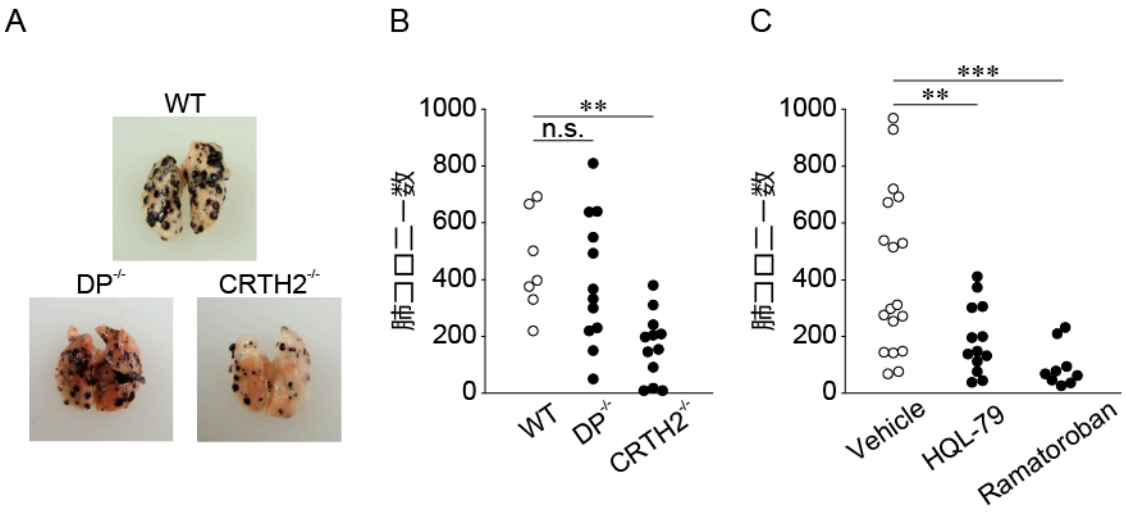


図 2. CRTH2 受容体の刺激ががんの転移を促進した

a) B16 細胞をマウスの尾静脈に投与して 14 日後の肺の典型例。

b) 肺にできた B16 細胞のコロニー数（**p＜0.01）。

c) B16 細胞の移植後、HQL-79、あるいはラマトロバンを 14 日間投与したマウスの肺にできたコロニー数（**p＜0.01、***p＜0.001）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学研究室の村田幸久准教授である。

文　献

1) Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov. 2022 Jan 1;12(1):31–46. PMID: 35022204 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059

2) Murata T, Lin MI, Aritake K, Matsumoto S, Narumiya S, Ozaki H, Urade Y, Hori M, Sessa WC. Role of prostaglandin D2 receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 16;105(50):20009–14. PMID: 19060214, DOI: 10.1073/pnas.0805171105

3) Murata T, Aritake K, Matsumoto S, Kamauchi S, Nakagawa T, Hori M, Momotani E, Urade Y, Ozaki H. Prostagladin D2 is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 6;108(49):19802–7. PMID: 22106279, DOI: 10.1073/pnas.1110011108

4) Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 Selectively Induces Chemotaxis in T Helper Type 2 Cells, Eosinophils, and Basophils via Seven-Transmembrane Receptor Crth2. J Exp Med. 2001 Jan 15;193(2):255–62. PMID: 11208866. DOI: 10.1084/jem.193.2.255

5) Pettipher R. The roles of the prostaglandin D 2 receptors DP 1 and CRTH2 in promoting allergic responses. Br J Pharmacol. 2008 Mar 29. PMID: 17965752. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707488