

令和 3 年 7 月 12 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06907

研究課題名（和文）レニン・アンジオテンシン系に着眼した癌転移制御機構の解明と新規転移抑制療法の開発

研究課題名（英文）Development of cancer metastasis suppression therapy focusing on the renin-angiotensin system

研究代表者

石兼 真（Ishikane, Shin）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：40470190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血圧調節機構であるレニン・アンジオテンシン系（RAS）において昇圧ペプチドとして作用するangiotensin II（Ang II）に注目し、血行性癌転移モデルマウスにおける転移調節メカニズムについて検討した。Ang IIは、肺血管内皮細胞において細胞接着因子の発現を増加させることで、内皮細胞と癌細胞の接着を増加させ、メラノーマ細胞の血行性肺転移を促進させることが明らかになった。また、Ang IIはがん細胞周辺の線維芽細胞を介して乳がん細胞の増殖や転移を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の高血圧患者は、厚生労働省による平成26年度調査報告では約1100万人とされ、今後も患者数の増加が予測される。癌患者における最も多い併発症は高血圧症であることから、本研究による癌転移抑制療法の適応範囲は広く、高額負担なく、安全な治療法を行うことができることは医療費削減の観点からも非常に有益である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we sought to elucidate the mechanisms by which angiotensin II (Ang II) exacerbates hematogenous metastasis in mouse tumor cells. Ang II exacerbates hematogenous metastasis of melanoma cells by promoting adhesion molecules-mediated adhesion of cancer cells to vascular endothelial cells. Ang II affected the fibroblasts around cancer cells to accelerate the tumor growth and facilitate metastasis formation and suggests the possibility that Ang II modifies tumor microenvironment.

研究分野：循環器疾患

キーワード：アンジオテンシンII 癌転移 悪性黒色腫 乳がん 転移抑制薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 本邦のがん罹患率は高水準で推移しており、今後も患者数の増加が予想される。がんの進行に伴う多臓器転移は治療成績を大幅に低下させるため、がん転移抑制は余命を大幅に改善できる。マクロ転移したがん細胞を切除することは技術的に不可能であることから、転移抑制薬の開発が切望されている。しかし、臨床使用可能な転移抑制薬は現時点ではない。
- (2) がんの進行は、生活習慣病である高血圧が関与すると報告されているが、詳細な関連メカニズムは明らかにされていない。高血圧ががんの進行を促進するとの報告は蓄積されているにもかかわらず、一般的な降圧薬治療では十分な進行抑制効果が得られないケースがある。従って患者の病態によって、治療に適した薬物の選択が必要であると考えられる。このような薬物の選択を行うにあたっては、高血圧によるがん進行メカニズムを明らかにすることが必須である。
- (3) これまでに我々は、高血圧誘導因子であるアンジオテンシン II (Ang II) が血行性癌転移を増悪させることを明らかにしている。しかしながら、Ang II によるがん転移メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では高血圧による癌進行メカニズムの一端を明らかにする目的で、Ang II のがん転移調節メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

高血圧がん患者において、適切な高血圧治療薬の選択は“がん転移予防”として有用である可能性が示唆されるが、高血圧によるがん進行メカニズムの解明など明らかにすべき課題は多い。本研究では、高血圧誘導因子 Ang II に焦点をあて、がん原発巣や血行性転移過程における Ang II の作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) メラノーマ細胞の血行性転移モデルにおける Ang II の作用
雄性 C57BL/6 マウスに、B16/F10 マウスメラノーマ細胞 (3×10^5 cells/animal) を尾静脈投与することにより血行性肺転移モデルを作製した。メラノーマ投与 14 日後、肺に生着しているメラノーマコロニー数をカウントし評価した。モデル作製 3 日前に、オスモティックポンプを用いて Ang II ($1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) を持続皮下投与した。Ang II 受容体拮抗薬 (ARB) の valsartan ($10\text{--}40 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$)、Ca 拮抗薬の amlodipine ($5\text{--}10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$) はメラノーマ転移モデル作製 8 日前から飲水投与した。
メラノーマ細胞の肺接着に対する Ang II の作用について、GFP 発現 B16/F10 マウスメラノーマ細胞 (1×10^6 cells/animal) を尾静脈投与 24 時間後に肺を摘出し、接着 GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡下でカウントして評価した。
Ang II 投与マウス、valsartan 投与マウスの肺を摘出し、磁気ビーズ分離法にて CD31 陽性血管内皮細胞を採取し、リアルタイム PCR にて細胞接着因子の遺伝子発現変化を評価した。
- (2) 乳がん細胞の自然転移モデルにおける Ang II の作用
雌性 BALB/c マウスに、4T1 マウス乳がん細胞 (1×10^4 cells/animal) を乳腺下に注射した。モデル作製 28 日後、肺転移をマイクロ X 線 CT にて評価した。モデル作製 3 日前に、オスモティックポンプを用い、Ang II ($1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) を持続皮下投与した。Ang II 受容体拮抗薬 (ARB) の valsartan ($60 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$) はモデル作製 8 日前から飲水投与した。
マウス線維芽細胞と 4T1 細胞を trans-well で共培養し、4T1 細胞に対する Ang II の線維芽細胞を介した間接的作用について、ウェスタンブロッティングにて評価した。

4. 研究成果

- (1) メラノーマ細胞の血行性転移モデルにおける Ang II の作用
Ang II ($1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) 投与により血圧上昇作用が見られ、Ca 拮抗薬の amlodipine、ARB の valsartan 投与により血圧は低下した (図 1A)。また、Ang II により肺転移したメラノーマコロニー数は増加し、この転移増加に対して valsartan 投与群のみで抑制

作用が確認された (図 1B)。これらの結果より、Ang II による血行性癌転移の増加に血圧は依存していないことが示唆され、Ang II シグナルを抑制可能な valsartan で転移抑制効果が得られたと考えられた。

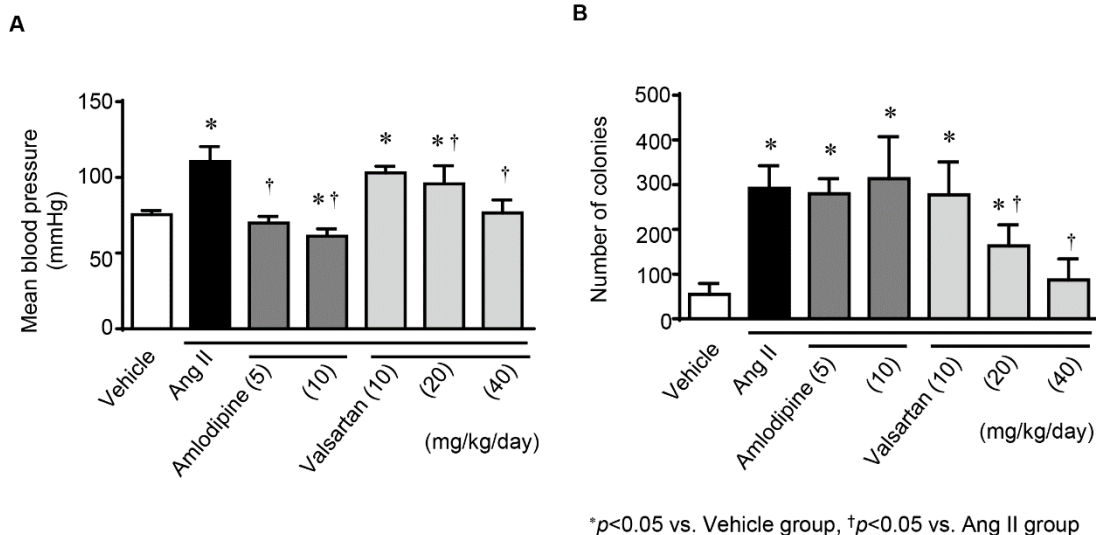
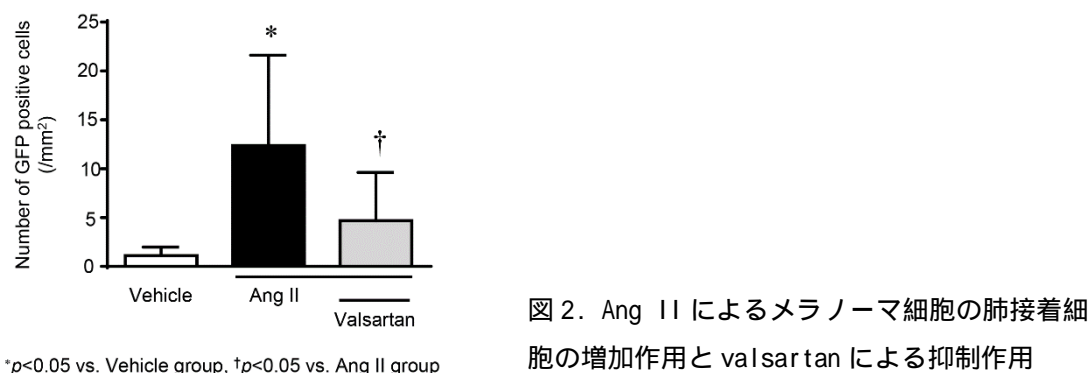
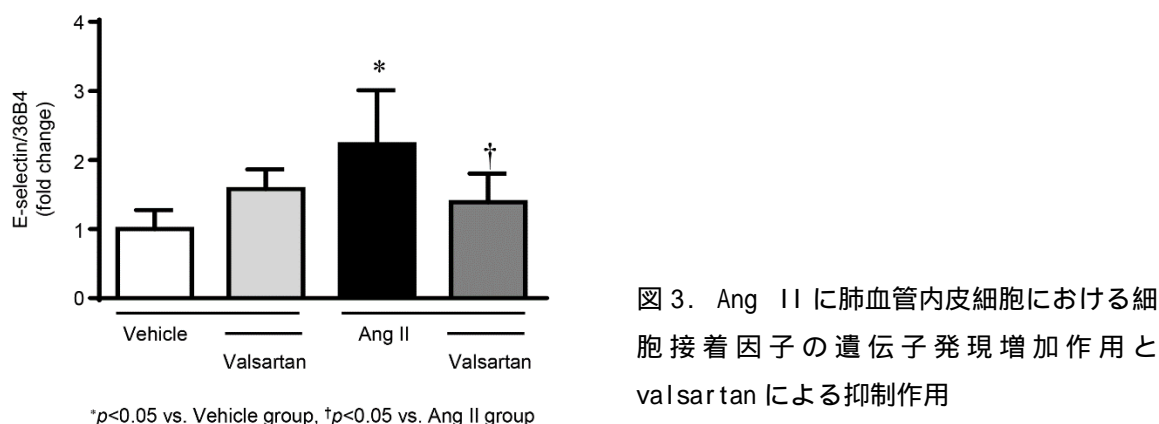


図 1. メラノーマ細胞の血行性転移モデルにおける血圧 (A) と肺転移コロニー数 (B) に対する Ang II の作用と降圧薬による抑制作用

Ang II 投与による肺に接着した GFP 陽性細胞数が増加し、この増加は valsartan 投与により有意に抑制された (図 2)。



Ang II 投与により、CD31 陽性肺血管内皮細胞で E-selectin の遺伝子発現が増加し、この増加は valsartan 投与により有意に抑制された。これらの結果より、Ang II は、肺血管内皮細胞において E-selectin の発現増加を誘導し、メラノーマ細胞の肺接着を増加させることが示唆された (図 3)。



(2) 乳がん細胞の自然転移モデルにおける Ang II の作用
Ang II (1 µg/kg/min) 投与により 4T1 細胞の肺転移数が増加し、この増加は valsartan

投与により抑制された（図 4A）。また、腫瘍原発重量が Ang II により増加し、この増加は Valsartan 投与により抑制傾向が見られた（図 4B）。

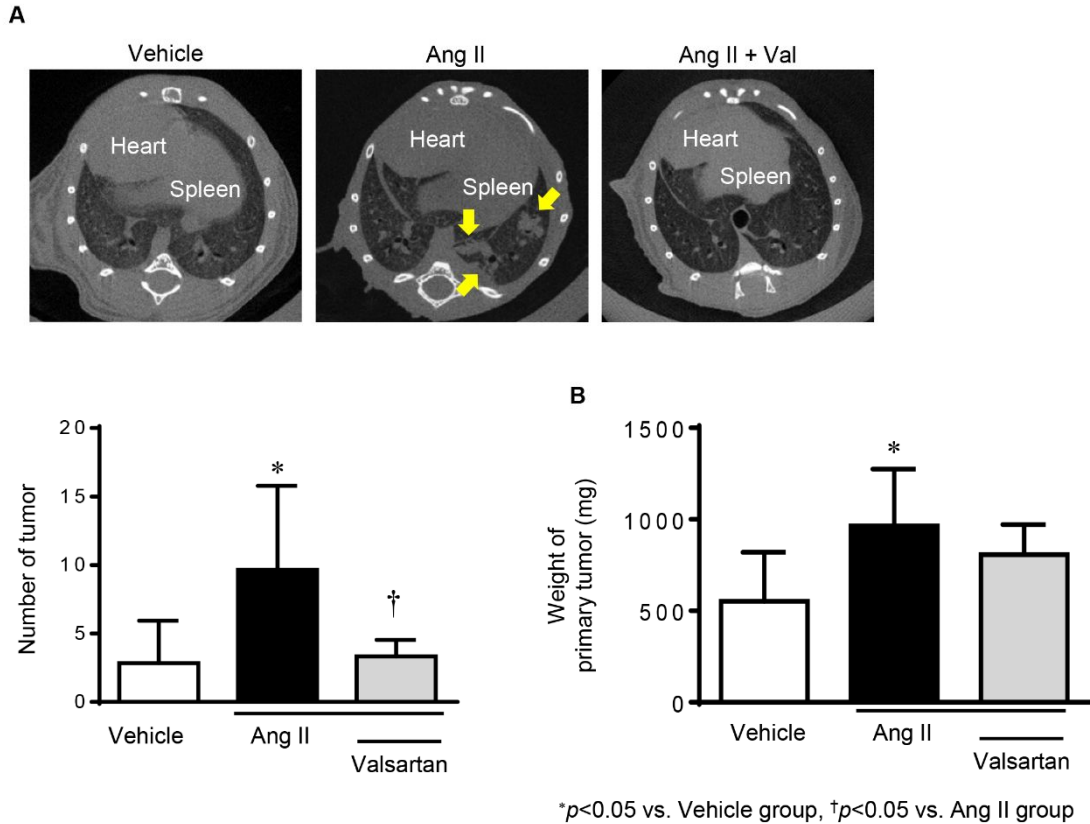


図 4. 4T1 マウス乳がん細胞の血行性自然転移モデルにおける肺転移数 (A) と腫瘍原発巣重量に対する Ang II の作用と降圧薬による抑制作用

4T1 細胞は、Ang II-1 型受容体を発現していたが、細胞増殖、遊走、浸潤に関する *in vitro* 解析において Ang II による直接作用は確認されなかった。一方、線維芽細胞との共培養により上皮間葉転換に関連するタンパク質発現が増加したことから、Ang II は、線維芽細胞などのがん微小環境に作用することで、間接的に乳がん細胞の肺転移を促進することが示唆された（図 5）。

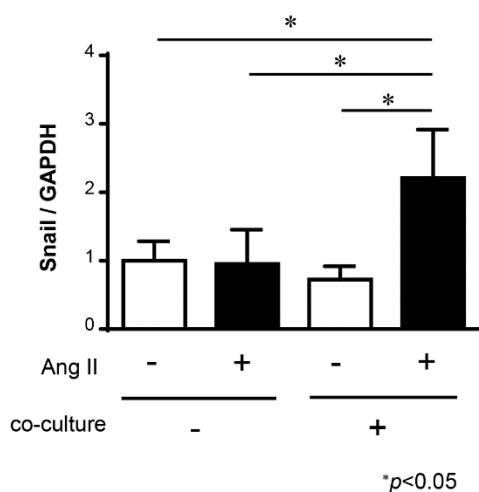


図 5. Ang II の線維芽細胞を介した 4T1 細胞における Snail のタンパク質発現増加作用

考察

本研究により、Ang II は血管内皮細胞や線維芽細胞などのがん微小環境に作用し、悪性黒色腫や乳がんの血行性転移を促進することが明らかになった。Ang II は昇圧ペプチドとして血圧上昇に寄与しており、RAS の亢進が見られる高血圧がん患者では血行性転移が促進される可能性がある。降圧治療の際に、ARB やアンジオテンシン変換酵素阻害薬等の RAS 抑制薬を用いることで遠隔性癌転移を予防することが可能であると考えら、リアルワールドデータを用いた臨床研究

へと展開させるべく研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeno Mitsuo, Mizutani Tetsuya, Tsuyoshi Hideaki, Yamada Shizuka, Ishikane Shin, Kawabe Shinya, Nishimura Kengo, Yamada Masami, Miyamoto Kaoru, Yoshida Yoshio	4. 巻 67
2. 論文標題 Development of a novel and rapid measurement system for growth differentiation factor-15, progrenulin, and osteopontin in uterine sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 91~94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ18-0572	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishikane Shin, Ikushima Eigo, Igawa Kazunobu, Tomooka Katsuhiko, Takahashi-Yanaga Fumi	4. 巻 1868
2. 論文標題 Differentiation-inducing factor-1 potentiates adipogenic differentiation and attenuates the osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118909~118909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2020.118909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morishige S, Takahashi-Yanaga F, Ishikane S, Arioka M, Igawa K, Kuroo A, Tomooka K, Shiose A, Sasaguri T.	4. 巻 168
2. 論文標題 2,5-Dimethylcelecoxib prevents isoprenaline-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast activation by inhibiting Akt-mediated GSK-3 phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 82-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2019.06.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shin Ishikane, Hiroshi Hosoda, Takashi Nojiri, Takeshi Tokudome, Tetsuya Mizutani, Koichi Miura, Yoshiharu Akitake, Toru Kimura, Yoshitaka Imamichi, Shinya Kawabe, Yumiko Toyohira, Nobuyuki Yanagihara, Fumi Takahashi-Yanaga, Mikiya Miyazato, Kaoru Miyamoto, Kenji Kangawa.	4. 巻 154
2. 論文標題 Angiotensin II promotes pulmonary metastasis of melanoma through the activation of adhesion molecules in vascular endothelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 136-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2018.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 瀧口 知浩, 高橋 富美, 石兼 真, 笹栗 俊之
2. 発表標題 Angiotensin II promotes tumor growth and metastatic lesion formation of murine TNBC 4T1 cells through the fibroblasts around cancer cells
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 幾島栄悟, 石兼 真, 岸上 赳大, 松永 洋明, 瀧口 知浩, 豊平 由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 2,5-Dimethylcelecoxib attenuates cardiac remodeling after cryoinjury-induced myocardial infarction by suppressing the fibroblast-myofibroblast transformation
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 石兼 真, 幾島 栄悟, 瀧口 知浩, 松永 洋明, 岸上 赳大, 豊平 由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 accelerates adipogenic differentiation and suppresses the osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 幾島栄悟, 石兼真, 岸上赳大, 松永洋明, 瀧口知浩, 豊平由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 心筋梗塞後心臓リモデリングにおける筋線維芽細胞形質転換に対する ジメチルセレコキシブの作用の検討
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石兼真, 幾島栄悟, 瀧口知浩, 松永洋明, 岸上赳大, 豊平由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1による骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪細胞分化促進・骨芽細胞分化抑制作用
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石兼真, 幾島栄悟, 瀧口知浩, 豊平由美子, 高橋富美
2. 発表標題 Differentiation-including factor-1は骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を促進し、骨芽細胞文化を抑制する
3. 学会等名 第38回産業医科大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧口 知浩, 高橋 富美, 石兼 真, 笹栗 俊之
2. 発表標題 アンギオテンシン は癌周囲環境を変化させることによりトリプルネガティブ乳癌4T1細胞の増殖と転移を促進する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧口知浩, 高橋富美, 石兼真, 笹栗俊之
2. 発表標題 Angiotensin は癌周囲環境を変化させ、乳癌自然肺転移を促進する
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石兼 真, 幾島 栄悟, 瀧口 知浩, 豊平 由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 accelerates bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into adipocyte
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幾島 栄悟, 石兼 真, 瀧口 知浩, 豊平 由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 2,5-Dimethylcelecoxib attenuates cardiac fibrosis after cryoinjury-induced myocardial infarction by suppressing the fibroblast-myofibroblast differentiation
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石兼真, 幾島栄悟, 瀧口知浩, 豊平由美子, 高橋富美
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞に対するdifferentiation-inducing factor-1による分化誘導調節機序の解明
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石兼真, 豊平由美子, 高橋富美
2. 発表標題 Glycogen synthase kinase-3 調整薬による間葉系幹細胞の分化制御機序の解明
3. 学会等名 第37回産業医科大学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin Ishikane, Hiroshi Hosoda, Takashi Nojiri, Takeshi Tokudome, Tetsuya Mizutani, Yumiko Toyohira, Mikiya Miyazato, Kaoru Miyamoto, Kenji Kangawa, Fumi Takahashi-Yanaga.
2. 発表標題 Angiotensin II increase the pulmonary metastasis through the vascular endothelial cell adherent pathway in hematogenous metastasis of melanoma cells.
3. 学会等名 WCP2018- 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin Ishikane, Fumi Takahashi-Yanaga.
2. 発表標題 Angiotensin II promotes hematogenous cancer metastasis through the activation of vascular endothelial adhesion molecules.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 富美 (Takahashi Fumi)		
研究協力者	細田 洋司 (Hosoda Hiroshi)		
研究協力者	森重 翔二 (Morishige Shoji)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	瀧口 知浩 (Takiguchi Tomohiro)		
研究協力者	幾島 栄悟 (Ikushima Eigo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関