

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861319

研究課題名(和文) 子宮平滑筋肉腫の血行性肺転移に対する新規抗転移薬の開発

研究課題名(英文) Development of anti-metastatic therapy for hematogenous lung metastasis of uterine sarcoma

研究代表者

石兼 真 (Ishikane, Shin)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：40470190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：循環調節ペプチドと血行性癌転移の関連性を明らかにし、癌転移抑制薬の開発に関する研究を行った。C型ナトリウム利尿ペプチドは、子宮筋肉腫細胞の増殖、転移に対して抑制しなかったが、悪性黒色腫転移に対して抑制作用を示し、悪性黒色腫に対する転移抑制薬として有用であることが示唆された。アンジオテンシンII(Ang II)は、肺血管内皮細胞で接着因子の発現を増加させ、血行性癌転移を増悪させることを明らかにした。この増悪化に対し、Ca拮抗薬は抑制せず、Ang II受容体拮抗薬(ARB)で抑制されたことから、高血圧癌患者における転移リスク抑制にはARBが有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop effective treatments for cancer metastasis, we revealed relationship between circulating regulatory peptides and hematogenous cancer metastasis. C-type natriuretic peptide (CNP) did not reduce the growth and metastasis of uterine sarcomas, but reduced the metastasis of melanoma cells. CNP may be a useful inhibitor of the melanoma cell metastasis. Angiotensin II (Ang II) increased the expression of cell adherent molecules in the pulmonary vascular endothelial cells, and exacerbated the hematogenous cancer metastasis. Ang II induced metastasis was not prevented by Ca channel antagonist treatment, but was prevented by Ang II receptor blocker (ARB) treatment. ARB may be a useful for the prevention of cancer metastasis in cancer patients with hypertension.

研究分野：薬理学

キーワード：生理活性ペプチド 血行性癌転移 子宮肉腫 悪性黒色腫 血管内皮細胞 抗転移薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦において、癌は近年の死因一位であり、年々死亡数は増加していることから、癌治療分野では革新的な治療法の開発が極めて難しいことがうかがえる。癌死の大きな要因に、癌の進行に伴う原発巣からの転移がある。転移が形成されてしまうと、異なる臓器微小環境条件下で増殖している転移腫瘍を既存の治療法でコントロールするのは極めて困難になることから、転移は癌治療における最大の障壁と言える。

(2) 子宮平滑筋肉腫(子宮肉腫)は、子宮悪性腫瘍の中でも1-3%のまれな疾患であるが、主な治療法は外科療法による切除術であり、有効な化学療法は確立されていない。また、摘出後に血行性転移による肺での再発が起こりやすく、5年生存率は30%と非常に予後不良な腫瘍であり、子宮関連の癌死亡率の25%を占める。原発巣の治療のみならず、転移巣に対する治療戦略も必要であるが、有用な子宮肉腫転移モデルは確立されていない。

(3) 生活習慣病である高血圧症は、癌患者における最も多い併発症であり、癌を進行させる因子の一つであると報告されている。降圧薬治療による癌の進行抑制効果が検証されているが、患者背景が大きく影響する臨床研究から明確なエビデンスは現在も得られておらず、詳細なメカニズム解明が望まれている。

(4) これまでの検討より、生理活性ペプチドが癌転移に対して調節作用を有することを示唆するデータを得ており、子宮肉腫や高血圧症に関連する転移機構にこれらペプチドが大きく関与している可能性がある。本研究では、生理活性ペプチドに着目し、血行性癌転移に対する新たな治療法開発に向けた基礎的研究を行った。

2. 研究の目的

(1) 子宮肉腫の自然転移モデルを確立する。

(2) 子宮肉腫自然転移に対する循環調節ペプチドの作用を明らかにする。

(3) 血行性癌転移に対する昇圧ペプチドアンジオテンシンII(Ang II)の関連メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 子宮肉腫の自然転移モデルの確立

ヒト子宮筋肉腫細胞(MES-SA細胞)にgreen fluorescent protein(GFP)をPiggyBac Transposon Vector Systemにて導入しGFP発現MES-SA細胞を樹立する。

KSN/Slc 雌性ヌードマウスの皮下にMES-SA/GFP細胞(5×10^6 cells/animal)を移植する。得られた原発巣を摘出後、1mm角にカットした腫瘍片を子宮に移植し、8週間後に蛍光実体顕微鏡にて肺転移したGFP陽性MES-SA細胞を観察する。

(2) 子宮肉腫自然転移に対する循環調節ペプチドの作用

子宮肉腫転移モデルの作製2週間後から、オスモティックポンプを用いてC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)を4週間持続皮下投与し、原発巣の増殖、肺転移抑制効果を評価する。

(3) Ang IIによる血行性癌転移調節機構の解明

雄性C57BL/6マウスに、B16/F10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癌肺転移モデルを作製する。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する。モデル作製3日前に、オ

スモティックポンプを用い、Ang II (0.1–2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) を持続皮下投与する。

Ang II 受容体拮抗薬 (ARB) の valsartan (10–40 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$)、Ca 拮抗薬の amlodipine (5–10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) をメラノーマ転移モデル作製 8 日前から飲水投与し、Ang II 誘導性血行性転移に対する抑制作用、カプランマイヤー法による生存期間への作用を評価する。

血管内皮特異的 Ang II-1 型受容体過剰ノックアウトマウス (AT1R-KO マウス) を用いてメラノーマ血行性癌肺転移モデルを作製し、Ang II による転移コロニー数の変化を評価する。

メラノーマ細胞の肺接着に対する Ang II の作用について、*in vivo* luciferase assay、接着 GFP 陽性細胞の蛍光顕微鏡下でのカウントにより評価する。

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単離し、PCR、リアルタイム PCR にて癌転移関連遺伝子の変化を評価する。

メラノーマ血行性癌肺転移モデルを作製し、Ang II による転移コロニー数の増加に対する E-selectin 中和抗体投与 (2 mg/kg 、メラノーマ *i.v.* の 24 時間、4 時間前に *i.v.*) の抑制作用を評価する。

4. 研究成果

(1) 子宮肉腫の自然転移モデルの確立

GFP 発現 MES-SA 細胞を用いた子宮肉腫自然転移モデルにおいて、90%以上の確立で自然肺転移を形成することを確認した。

原発巣において、Ki-67、Vimentin、 α -smooth muscle actin、CD10 等が発現しており、未分化肉腫であることが確認された。原発巣を新たなマウスの子宮に移植することで、転移能を維持したモデルを維持することに成功した。

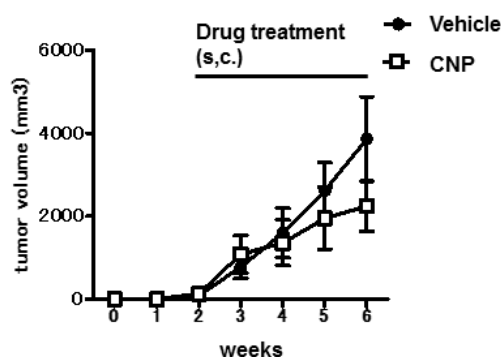
(2) 子宮肉腫自然転移に対する循環調節ペプチドの作用

子宮肉腫転移モデルにおいて、CNP (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) をモデル作製 2 週間後から持続皮下投与を行い、原発巣の体積を経過観察し、モデル作製 6 週間後の肺転移数を評価した。結果、原発巣の増殖は抑制傾向が確認されたが、肺転移は抑制されなかった (図 1)。

B16/F10 マウスメラノーマ細胞の血行性肺転移モデルにおいて、CNP (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) をモデル作製 2 日前から持続皮下投与を行うことにより、肺転移メラノーマコロニー数の有意な減少が確認された (図 2)。

CNP は、悪性黒色腫の血行性転移に対して抑制効果を有しており、新たな転移抑制薬としての有用性が示唆された。

原発巣体積



肺転移数

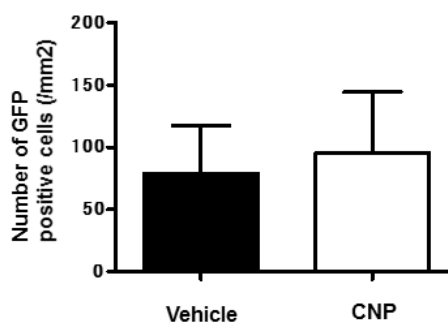


図 1 子宮肉腫転移モデルにおける CNP の作用

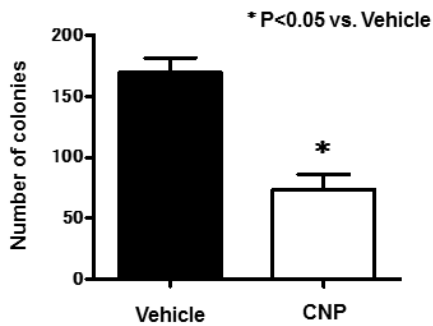


図 2 メラノーマ血行性肺転移モデルにおける CNP の作用

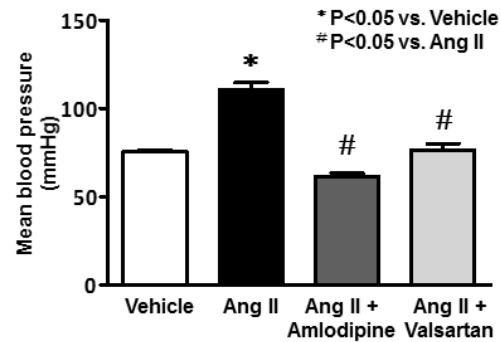
(3) 血行性癌転移に対する昇圧ペプチドアンジオテンシン II (Ang II) の作用

B16/F10 マウスメラノーマ血行性転移モデルにおいて、Ang II は用量依存的に肺転移を増加させ、1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の投与量でプラトーに達することを明らかにした。

Ang II 誘導性の血圧上昇作用に対して、Ca拮抗薬である Amlodipine、ARB である Valsartan は有意な血圧低下作用を示したが、癌転移増加作用に対しては Valsartan のみが有意な抑制効果を示した(図3)。また、Ang II 処置によるメラノーマ血行性癌転移モデルマウスの生存期間の短縮に対し、Valsartan 投与は有意な改善効果を示すことを明らかにした。これらの結果より、Ang II による血行性癌転移の増悪化には血圧は依存しておらず、Ang II シグナルの抑制が重要であることが示唆された。

血管内皮特異的 AT1R-KO マウスにおいて、Ang II 刺激によるメラノーマ細胞の血行性転移の増加作用は、野生型マウス (WT) と比較して有意に減少することが明らかになった。この結果より、Ang II による血行性癌転移の増悪化には血管内皮細胞が関与していることが示唆された(図4)。

平均血圧



肺転移数

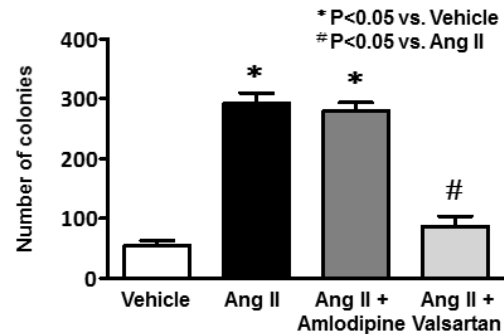


図 3 Ang II による血圧上昇作用、メラノーマ血行性肺転移増加作用に対する降圧薬の作用

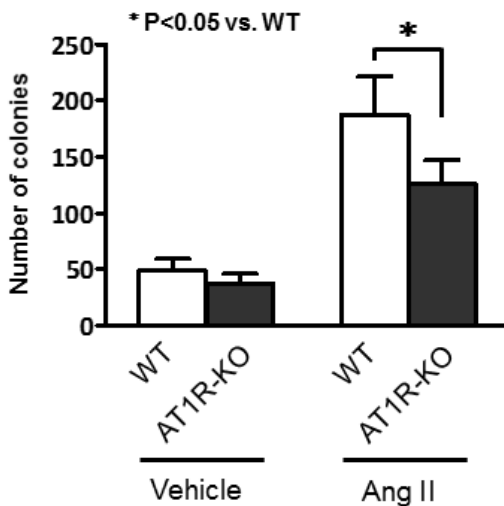


図 4 血管内皮細胞特異的 Ang II-1 型受容体ノックアウトマウスにおけるメラノーマ血行性肺転移の変化

Ang II 処置マウスにおいて、i.v. したメラノーマ細胞の肺接着が増加し、この増加は Valsartan の投与により有意に抑制されるこ

とから、血管内皮細胞における癌細胞接着に Ang II が関与していることが考えられた。

Ang II を処置したマウスの肺血管内皮細胞では、細胞接着因子である E-selectin、P-selectin、ICAM の遺伝子発現が無処理マウスと比較して有意に増加し、Valsartan 投与により E-selectin の発現が有意に減少し、P-selectin、ICAM は減少傾向を示すことを明らかにした。また、E-selectin 中和抗体の投与により、Ang II による血行性癌転移が有意に抑制されることから、Ang II による癌転移の増加作用には、血管内皮細胞における E-selectin の発現増加が大きく関与することが示唆された (図 5)。

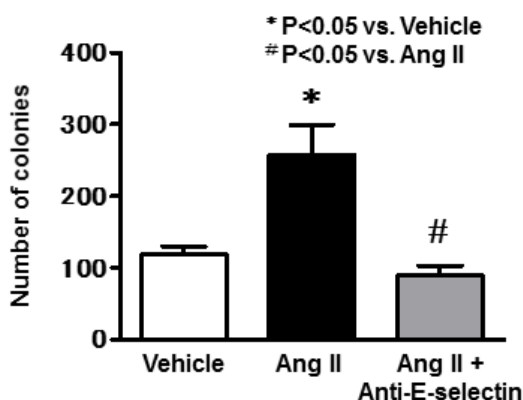


図 5 Ang II によるメラノーマ血行性肺転移増加作用に対する E-selectin 中和抗体の作用

本研究により、CNP は悪性黒色腫の血行性肺転移に対して抑制効果を有しており、新規癌転移抑制薬としての有用性が示唆された。これまでに CNP の癌転移抑制作用に関する報告はなく、新たな癌治療因子として非常に有用であると考えられる。今後は、転移抑制メカニズムを明らかにし、転移抑制療法の開発へと発展させる。

昇圧ペプチドである Ang II は、悪性黒色腫の血行性肺転移に対して促進作用を有しており、ARB による Ang II シグナルのブロックにより転移促進作用が抑制されることが

明らかになった。また、Ang II による転移増悪作用には、血管内皮細胞における細胞接着因子の発現増加が関与しており、特に E-selectin の発現増加が転移調節に大きく関与することが示唆された。レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の亢進が疑われる高血圧癌患者では、癌転移が増加する可能性があるが、降圧薬のなかでも RAS シグナルを抑制できる ARB や ACE 阻害薬を選択的に用いることにより、転移抑制作用による生存期間の延長が期待される。人口の高齢化に伴い、高血圧症を発症している癌患者は増加することが見込まれるが、現在臨床使用されている RAS 抑制薬を癌治療薬としてドラッグ・リポジショニングすることから、早期に臨床応用できる可能性がある。今後は、さらに詳細なメカニズム解析を行うとともに、本研究で樹立した子宮肉腫転移モデルを用いて他癌腫における RAS 抑制薬の癌転移抑制療法の有効性を明らかにし、様々な癌腫における新たな転移抑制療法として臨床応用するべく検討を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Shinya Kawabe, Tetsuya Mizutani, Shin Ishikane, Kenji Kangawa, Kaoru Miyamoto. (他 6 名、3 番目)

“Establishment and characterization of a novel orthotopic mouse model for human uterine sarcoma with different metastatic potentials.” *Cancer Letters* 2015; 366: 182-190. 査読有

DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.018. Epub 2015 Jul 8.

Takashi Nojiri, Hiroshi Hosoda, Takeshi Tokudome, Koichi Miura, Shin Ishikane. (他 23 名、5 番目) “Atrial natriuretic peptide prevents cancer

metastasis through vascular endothelial cells.” *Proceeding of the National Academy of the United States of America*. 2015; 112: 4086-4091. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1417273112.

〔学会発表〕(計 32件)

石兼真, 細田洋司, 野尻崇, 徳留健, 水谷哲也, 李曉佳, 豊平由美子, 宮里幹也, 宮本薫, 柳原延章, 寒川賢治. “アンジオテンシン II による血管内皮細胞を介した血行性癌転移増悪機構の解明” 第90回日本薬理学会年会. 2017年3月15-17日. 「長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール(長崎県・長崎市)」

石兼真, 細田洋司, 野尻崇, 徳留健, 水谷哲也, 河邊真也, 今道力敬, 豊平由美子, 柳原延章, 宮里幹也, 宮本薫, 寒川賢治. “アンジオテンシン II による血管内皮細胞を介した血行性癌転移増悪機構の解明” 第89回日本内分泌学会学術総会. 2016年4月21-23日. 「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

石兼真, 水谷哲也, 細田洋司, 徳留健, 野尻崇, 三浦浩一, 木村亨, 秋武義治, 河邊真也, 今道力敬, 宮里幹也, 寒川賢治, 宮本薫. “心房性ナトリウム利尿ペプチドはアンジオテンシン II により増悪するメラノーマ血行性肺転移を抑制する” 第88回日本薬理学会年会. 2015年3月18-20日. 「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

石兼真, 水谷哲也, 河邊真也, 宮本薫. “ANPは血管内皮細胞における癌細胞の接着制御を介してアンジオテンシン II 誘発メラノーマ肺転移を抑制する” 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25-27日. 「パシフィコ横浜(神奈川県・

横浜市)」

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: 子宮肉腫転移モデル

発明者: 吉田好雄、河邊真也、水谷哲也、宮本薫、石兼真、清野泰

権利者: 国立大学法人福井大学

種類: 特許

番号: 2014-149007

出願年月日: 2014年7月22日

国内外の別: 国内

名称: 腫瘍肉腫と子宮筋腫を鑑別するマーカーの開発

発明者: 水谷哲也、宮本薫、河邊真也、石兼真、吉田好雄、福田真

権利者: 国立大学法人福井大学

種類: 特許

番号: 2015-152893

出願年月日: 2015年7月31日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石兼真 (ISHIKANE, Shin)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40470190