

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592073

研究課題名(和文)肺転移モデルにおけるアンジオテンシンⅠⅠ受容体サブタイプの転移抑制効果機序の解明

研究課題名(英文)Angiotensin II type 1A receptor signaling facilitates tumor metastasis formation through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells.

研究代表者

天野 英樹 (Amano, Hideki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60296481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Angiotensin II(AngII)が腫瘍の増殖、転移に関与している報告があるが、詳細な機序は不明である。我々は以下の実験にてその機序について検討した。WTはAngII投与すると血小板の活性化を促進するが、AT1a<sup>-/-</sup>では認められなかった。P-selectin中和抗体投与群は、WTでは腫瘍の転移形成の抑制を認めたが、AT1a<sup>-/-</sup>では認められなかった。更に、WTでは血小板由来のSDF-1及びVEGFの中和抗体を投与すると腫瘍の転移は抑制されたがAT1a<sup>-/-</sup>では認められなかった。これらの結果より、血小板の活性化によりAT1aシグナルが腫瘍の転移を促進する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Angiotensin II is involved in tumor growth, however, the precise mechanism is not known. B16F1 melanoma cells were intravenously injected into Agtr1a knockout mice (AT1a<sup>-/-</sup>) and wild-type littermates (WT); the AT1a<sup>-/-</sup> mice exhibited a reduction in lung colonies. Angiotensin II induced expression of P-selectin on platelets in WT but not in AT1a<sup>-/-</sup> mice. A selective P-selectin neutralizing antibody decreased lung colony numbers in WT but not in AT1a<sup>-/-</sup> mice. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) receptor in platelets at metastatic locus were lower in AT1a<sup>-/-</sup> mice. Treatment of neutralizing antibodies against VEGF and CXCR4 decreased lung colony numbers in WT but not in AT1a<sup>-/-</sup> mice. In AT1a<sup>-/-</sup> mice. These results suggest that AT1A signaling plays a critical role in tumor metastasis through P-selectin-mediated interactions of platelets with tumor and endothelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：Angiotensin II AT1a receptor platelets

## 1. 研究開始当初の背景

癌の転移・浸潤とは、原発巣から癌細胞が離れ、血流やリンパ流により遠隔の血管内皮細胞へ接着し、やがては血管外に遊走して組織に浸潤し、血管新生により増殖していく一連の過程である。研究代表者はこれまでに腫瘍ストローマの腫瘍血管新生の役割について報告してきた (*Lab Invest* 2003、*J. Exp. Med* 2003)。1998年 Lever は高血圧症の治療でアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE 阻害薬) を内服していた群は他種の降圧薬内服群より有意に癌による死亡率の低下を認めたことを報告した (*Lancet* 1998)。このことから ACE 阻害薬により AngII の産生が抑制され抗腫瘍効果が出現したことが明らかになった。我々は、AngII の受容体である Angiotensin type 1 受容体 (AT1) のサブタイプである AT1a が血管新生促進因子の 1 つである血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor=VEGF) を誘導し、腫瘍血管新生を増強することを報告し (*Carcinogenesis* 2005)、AT1a が癌治療における標的となる可能性を示唆した (図 1)。今回予備実験にて AT1 拮抗薬投与群は対照群と比較し有意に肺表面の腫瘍コロニー数の低下を認めた。これにより AT1a の制御が癌の転移・浸潤に有用な役割を担っている可能性が高まった。

## 2. 研究の目的

AngII の受容体のサブタイプである AT1a は、血小板、血管平滑筋、肝臓、腎臓、副腎皮質、心臓に発現し、近年、血液幹細胞の分化、心血管系のリモデリングに関与している論文も散見されている。最近、癌の浸潤・転移に対する微小環境の役割が注目され、原発巣と同様に癌細胞と転移組織との相互作用の結果、動員された血小板、骨髄細胞が重要な役割を担っていると考えられている。Kaplan らは腫瘍の転移に骨髄由来の VEGF1 型受容体陽性細胞 (VEGFR1 陽性細胞) が転移部位に集積することを報告した (*Nature* 2005)。また我々は、マウスの下肢虚血モデルで血小板由来の血管新生促進因子 (VEGF, Stromal cell derived factor 1 = SDF-1) が、骨髄由来の VEGFR-1 陽性細胞を動員し、血管新生を増強させることを報告した (*Nat Med* 2006)。そこで、本研究代表者は①腫瘍肺転移モデルを用いて AT1a 受容体が血小板産生・機能の活性化を促すことで、腫瘍細胞に血小板が付着し、転移組織に接着する。②接着時に、血小板由来の血管新生促進因子が産生され骨髄組織由来の VEGFR1 陽性細胞を動員し転移形成を促進させる 2 つの仮説を立てた。本研究は筑波大学の深水教授から AT1a 受容体欠損マウス (AT1a<sup>-/-</sup>) の提供を受け、野生型マウス (AT1a<sup>+/+</sup>) と AT1a<sup>-/-</sup> を用いて研究期間内に

①血小板数及び抗がん剤 (5-FU) 投与後の骨髄機能回復能の違いの検討 ②腫瘍肺転移モデルにおける血小板数、腫瘍肺転移数の違いの検討 ③末梢血液及び転移肺組織における骨髄由来の VEGFR1 陽性細胞数の発現の違いの検討 ④ AT1a<sup>-/-</sup> を AT1a<sup>+/+</sup> に骨髄移植する事により腫瘍肺転移数が抑制されるか否か違いの検討について探求することにした。

## 研究の学術的な特色・独創点

AT1a<sup>-/-</sup> や AT1a 受容体拮抗薬を腫瘍接種モデルに用いた解析から、AT1a が癌の浸潤の進行に重要な役割をもつことが明らかにされた。しかしながら、腫瘍肺転移モデルを用いて血小板の活性化および骨髄機能における AT1a シグナリングの観点からの腫瘍肺転移形成の役割についての詳細なメカニズムは不明である。本実験の特色は AT1<sup>-/-</sup>, AT1a<sup>+/+</sup> を用いて血小板の分化・活性化、骨髄機能の違い、つまり骨髄ストローマ刺激因子 (Stem cell factor=SCF, Matrix Metalloproteinase-9 = MMP-9, SDF-1) の発現の違い、VEGFR1 陽性骨髄細胞の動員の違いを明らかにし、腫瘍肺転移形成時の AT1a シグナリングについて解明する点である。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度

### (1) 抗がん剤を用いた骨髄機能の検討

#### ① AT1a<sup>+/+</sup> と AT1a<sup>-/-</sup> との骨髄機能回復能力効果の相違の検討

5-FU を腹腔内注射し骨髄機能の回復能力について比較検討を行う。投与後 1, 3, 7, 14, 21 日に末梢血液中の血小板数と血清中の SCF, pro MMP-9, SDF-1 を ELISA kit を用いて測定した。

#### ②. 免疫組織化学による骨髄組織中の MMP-9 の発現の比較検討

5-FU 投与後 10 日目にマウスに大腿骨を摘出し骨髄組織中の MMP-9 の発現及び巨核球数について比較検討した。

### (2) 腫瘍肺転移モデルを用いた検討

#### ① AT1a<sup>+/+</sup> と AT1a<sup>-/-</sup> との肺表面転移巣の形成効果及び生存率の検討

AT1a<sup>+/+</sup> 及び AT1a<sup>-/-</sup> で  $3.0 \times 10^5$  個/ml の悪性黒色腫細胞 (B16F1) 及び Lewis 肺癌細胞 (LLC) を尾静脈より静脈注射し、腫瘍肺転移モデルを作成する (*Cancer Sci* 2009)。2 週間後、肺を摘出した後、Bouin's 溶液を用いた後、肺表面の腫瘍コロニー数を実態顕微鏡でカウントする。また、生存率も検討した。

#### ② 血小板数、SCF, pro-MMP9, SDF-1 値の経時的変化及び骨髄組織中の MMP-9 の発現の比較検討

腫瘍細胞静注1, 3, 7, 14日に継時的に血小板数と血清中のSCF, pro MMP-9, VEGF, SDF-1をELISA kitを用いて測定した。また7日と14日目に大腿骨を摘出し免疫組織化学による骨髓組織中のMMP-9の発現及び巨核球数について比較検討を行った。

平成24年度

(3) 末梢血液中のsoluble p-selectin濃度の比較検討

腫瘍肺転移モデル作成後1, 3, 5, 7, 14日に採血し、ELISAを用いてsoluble p-selectin濃度について比較検討を行った。

(4) 血小板のp-selectinの発現の比較検討

腫瘍肺転移モデル作成後1, 3, 5, 7, 14日に採血しフローサイトメトリーを用いて活性化された血小板(CD41とCD62P)の発現について比較検討を行った。

(5) 血中のVEGFR1<sup>+</sup>造血前駆細胞の発現の測定

AT1aシグナリングが骨髓組織のストローマ因子を活性化させることにより骨髓組織から、VEGFR1<sup>+</sup>造血前駆細胞の動員を促し転移の形成の増強を促している可能性があると考えられるためBと同様にフローサイトメトリーを用いて末梢血液中のVEGFR1陽性細胞の発現について比較検討した。

平成25年度

今までの実験にてAT1aのシグナルが骨髓組織のストローマに作用することで血小板を活性化し腫瘍肺転移を形成する推測された。血小板にもAT1aが発現している(*Arter Throm Vas Biol* 2006)。そこで、AT1a<sup>-/-</sup>やAT1a<sup>+/+</sup>の骨髓移植の実験にて腫瘍肺転移に差が出るか否か検討した。

(6) 骨髓移植による腫瘍肺転移の検討

あらかじめAT1a<sup>-/-</sup>, AT1a<sup>+/+</sup>に放射線を照射し、骨髓組織の機能を低下させ、同日AT1a<sup>-/-</sup>及びAT1a<sup>+/+</sup>の骨髓細胞(3.0×10<sup>6</sup>個/ml)を静脈注射する。6週間後に腫瘍肺転移モデルを作成し14日後腫瘍肺転移形成能について比較検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 抗がん剤を用いた骨髓機能の検討

① AT1a<sup>+/+</sup>とAT1a<sup>-/-</sup>との骨髓機能回復能力効果の相違の検討

5FU投与後1, 3, 7, 14, 21日に末梢血液中の血小板数と血清中のSCF, pro MMP-9, SDF-1をELISA kitを用いて測定しところ、AT1a<sup>-/-</sup>はAT1a<sup>+/+</sup>と比較し有意にこれらの低下を認めた。

② 免疫組織化学による骨髓組織中のMMP-9の発現の比較検討

5-FU投与後10日目にマウスに大腿骨を摘出し骨髓組織中のMMP-9の発現及び核球数について比較検討したところ、髓組織中のMMP-9の発現の低下をAT1a<sup>-/-</sup>で認めた。

(2) 腫瘍肺転移モデルを用いた検討

① AT1a<sup>+/+</sup>とAT1a<sup>-/-</sup>との肺表面転移巣の形成効果及び生存率の検討

腫瘍肺転移モデルを作成した(*Cancer Sci* 2009)2週間後、肺を摘出し肺表面の腫瘍コロニー数を実態顕微鏡でカウントまた、生存率も検討した。AT1a<sup>-/-</sup>はAT1a<sup>+/+</sup>と比較し有意に肺表面のコロニー数の低下及び生存率の低下を認めた。

② 血小板数、SCF, pro-MMP9, SDF-1値の経時変化及び骨髓組織中のMMP-9の発現の比較検討

AT1a<sup>-/-</sup>はAT1a<sup>+/+</sup>と比較し有意に血小板数と(図1-A)血清中のSCF, pro MMP-9, VEGF, SDF-1の低下を認めた。

(3) 血小板活性化による腫瘍転移の検討

血小板にはVEGFやSDF-1などの血管新生促進因子が含まれ、血小板が活性化されると放出されそれらが腫瘍の転移形成に関与している。また腫瘍転移形成にあたりは血小板の活性化は不可欠であり、その時、血小板でのp-selectinの発現の増強及び末梢血液中のsoluble-p-selectin濃度の上昇を認めた(*Blood* 2000)。今回腫瘍転移巣形成時における血小板の活性化にAT1aが関与しているか否か検討を行った。

① AngII刺激下による血小板活性化の有無  
AT1a<sup>-/-</sup>及びAT1a<sup>+/+</sup>から血小板を抽出後、培養し、次にAngIIを添加すると、AT1a<sup>+/+</sup>の血小板はCD41とCD62P陽性を多く認めるが、AT1a<sup>-/-</sup>では増加を認めなかった(図1-B, C)。

② 末梢血液中のp-selectin陽性血小板の比較検討

腫瘍肺転移モデル作成後1, 3, 5, 7, 14日に採血し、フローサイトメトリーを用いてP-selectin陽性の血小板(CD41とCD62P)について比較検討をした。AT1a<sup>-/-</sup>はAT1a<sup>+/+</sup>と比較し有意にP-selectin陽性の血小板の低下を認めた(図1-B, C)。

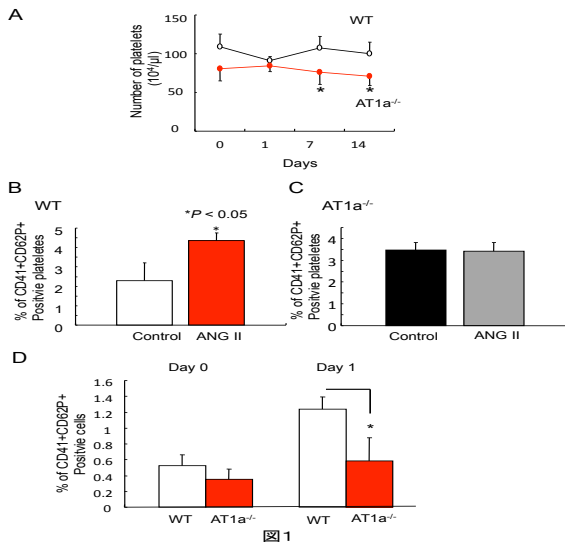


図1

### ③血小板由来のVEGF, SDF-1の発現の検討

VEGF, SDF-1が血小板由来か否か検討するため、肺組織中の免疫科学で血小板でのVEGF, SDF-1の発現を検討した。

AT1a-/-はAT1a+/+と比較し、腫瘍周辺に集積した、血小板でのSDF-1及びVDGFの発現の低下を認めた(図2-A, B)。

### ④VEGF, CXCR4中和抗体による腫瘍肺転移抑制効果の検討

腫瘍肺転移形成が血小板由来のVEGF及びSDF-1に起因するか否か検討するため、腫瘍細胞静脈注射後、これら抗体を投与し、肺表面の腫瘍肺転移数の比較検討を行った。

AT1a+/+ではこれら中和抗体により腫瘍肺転移形成の抑制を認めたが、AT1a-/-では抑制を認めなかった(図2-C, D)。

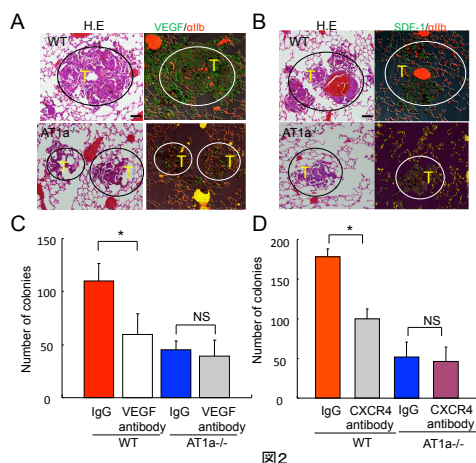


図2

### ⑤血中のVEGFR1<sup>+</sup>造血前駆細胞の発現の測定

AT1aシグナリングが骨髄組織のストローマ因子を活性化させることにより骨髄組織から、VEGFR1<sup>+</sup>造血前駆細胞の動員を促

し転移の形成の増強を促している可能性があると考えられるためBと同様にフローサイトメトリーを用いて末梢血液中のVEGFR1陽性細胞の発現について比較検討した。AT1a-/-はAT1a+/+と比較し有意に末梢血液中のVEGFR1陽性細胞の低下を認めた。更にまたAT1a-/-では転移巣におけるVEGFR1陽性細胞の集積の低下を認めた。

(4)今までの実験にてAT1aのシグナルが骨髄組織のストローマに作用することで血小板を活性化し腫瘍肺転移を形成する推測された。血小板にもAT1aが発現している(*Arter Throm Vas Biol* 2006)。そこで、AT1a-/-やAT1a+/+の骨髄移植の実験にて腫瘍肺転移に差が出るか否か検討した。

#### ①骨髄移植による腫瘍肺転移の検討

あらかじめAT1a-/-, AT1a+/+に放射線を照射し、骨髄組織の機能を低下させ、同日AT1a-/-及びAT1a+/+の骨髄細胞(3.0×10<sup>6</sup>個/ml)の静脈注射を行った。6週間後に腫瘍肺転移モデルを作成し14日後腫瘍肺転移形成能について比較検討を行った。

AT1a-/-→AT1a+/+はAT1a+/+→AT1a+/+と比較し有意に腫瘍肺転移の抑制を認めた。以上の実験結果より、降血圧薬として使用されているアンギオテンシン II の受容体である AT1a が血小板の活性を促進し腫瘍の転移を促進していることを報告した。また AT1a シグナルが転移巣に VEGFR1 陽性細胞を誘導すること明らかにした(*Cancer Sci.* 103(4):700-72012, *Am J Pathol.* 182(2):553-642013 アメリカ胸部疾患学会 ミニシンポジストとして発表 2013 第10回 森村豊明奨励賞受賞 2013)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Significant Involvement of NF-κB-inducing Kinase in Proper Differentiation of αβ and γδ T cells. Eshima K (他 5 名 1 番目) *Immunology*, 41(2):222-32, doi: 10.1111/imm.12186. 2014年 (査読あり)
- ② Vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling facilitates gastric ulcer healing and angiogenesis through the upregulation of epidermal growth factor expression on VEGFR1<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>cells recruited from bone

- marrow. Amano H (他 12 名 2 番目), *J Gastroenterol.* 49(3) 455-469 doi: 10.1007/s00535-013-0869-z. 2014 年(査読あり)
- ③ NSAID, aspirin delays gastric ulcer healing with reduced accumulation of CXCR4<sup>+</sup>VEGFR1<sup>+</sup> cells to the ulcer granulation tissues. Amano H (他 12 名 2 番目) *Biomed Pharmacol.* 67(7)607-613, doi:10.1016/j.biopha.2013.11.006. 2013 年(査読あり)
- ④ Angiotensin II type 1A receptor signaling facilitates tumor metastasis formation through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. Amano H (他 12 名 1 番目) *Am J Pathol.* 182(2):553-64, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.026. 2013 年(査読あり)
- ⑤ Clinicopathological features and the impact of the new TNM classification of malignant tumors in patients with pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Amano H (他 9 名 6 番目) *MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY* 1: 437-443, doi: 10.3892/mco.2013.80. 2013 年(査読あり)
- ⑥ Thromboxane A2 receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. Amano H (他 12 名 2 番目) *Cancer Sci.* 103(4):700-7, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02200.x 2012 年(査読あり)
- ⑦ Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. Eshima K (他 7 名 1 番目) *Immunol Lett.* 44: 7-15, doi: 10.1016/j.imlet.2012.02.013. 2012 年(査読あり)
- ⑧ Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. Eshima K (他 12 名 6 番目) *PLoS One* 7: e30568 doi: 10.1371/journal.pone.0030568. 2012 年(査読あり)
- ⑨ Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. Amano H (他 13 名 8 番目) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300(2):H431-9, doi: 10.1152/ajpheart.00466.2010, 2011 年(査読あり)
- ⑩ Prediction of postoperative exacerbation of interstitial pneumonia in patients with lung cancer and interstitial lung disease. Amano H (他 10 名 3 番目) *Exp Ther Med.* 2(6):1073-1076, doi: 10.3892/etm.2011.342 2011 年(査読あり)
- ⑪ Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma. Amano H (他 8 名 5 番目) *Exp Ther Med.* 2(6):1041-1045 doi: 10.3892/etm.2011.343. 2011 年(査読あり)
- [学会発表] (計 2 件)
- ① Amano H., Ito Y., Ogawa F., Kumagai Y., Majima M. The mechanism of Angiotensin II type 1A receptor signaling facilitates tumor metastasis

formation 第 72 回日本癌学会学術総会  
2013 年 10 月 4 日 横浜 日本

- ② Amano H., Ito Y., Ogawa F., Kumagai Y.,  
Majima M. Angiotensin Type 1a  
Signaling Facilitates Tumor  
Metastasis Formation Through  
P-Selectin-Mediated Interaction Of  
Tumor Cells With Platelets And  
Endothelial Cells American Thoracic S  
2013 年 5 月 19 日 フィラデルフィア ア  
メリカ合衆国

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

天野 英樹 (AMANO, Hideki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60296481

### (2) 研究分担者

江島 耕二 (ESHIMA, Koji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30327324