

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791581

研究課題名（和文）

肺癌に対する ANP の抗腫瘍及び抗転移作用についての分子機構の解明

研究課題名（英文）

Analysis of ANP-mediated anti-metastatic mechanism against lung cancer

研究代表者

野尻 崇 (NOJIRI TAKASHI) 独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号

50570553

研究成果の概要（和文）：

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)は、現在急性心不全治療薬として使用されており、これまでに我々はハイリスク肺癌手術症例に対して術中より3日間低用量のANPを持続投与することによって、術後心肺合併症を有意に軽減できることを報告している。肺癌は根治手術後であっても術後早期に再発することが多いが、術後早期(2年以内)無再発生存率を調べた結果、ANP投与群では非投与群(手術単独群)と比較して良好な成績を得た(UMIN4880)。本成績は、ANPが癌転移において抑制的に制御する可能性を示唆するものである。本研究の目的は、ANPの抗転移効果について、そのメカニズムを明らかにすることである。

我々はANPの受容体である、グアニル酸シクラーゼA(GC-A)受容体が体内で豊富に発現している血管内皮細胞に注目した。GC-A受容体を持たないマウスメラノーマB16/F10のマウス尾静脈注入による血行性肺転移モデルを作製し、ANP投与群と生理食塩水群に分けて観察したところ、ANP投与群では生食群と比較して肺転移が顕著に少なかった。続いて血管内皮特異的GC-Aノックアウトマウスを作製し、同様の実験を行ったところ、野生型マウスと比較して肺転移が顕著に多く、血管内皮特異的GC-A過剰発現マウスでは、逆に肺転移が顕著に少ない結果を得た。以上よりANPが宿主血管内皮細胞のGC-A受容体を介し、癌転移抑制効果を発揮したと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The objective of the present study was to investigate the mechanism of ANP in the prevention of cancer metastasis.

In the B16/F10 hematogenous metastasis model, administration of ANP notably inhibited metastasis in the lung compared to the control mice. Furthermore, lung metastasis significantly increased in the vascular endothelial cell specific GC-A knock-out mice, and decreased in the vascular endothelial cell specific GC-A overexpression mice compared to the wild-type mice. These studies indicate that ANP/GC-A signaling in the vascular endothelial cells plays crucial roles in the inhibition of cancer metastasis.

We found that ANP inhibits cancer metastasis through GC-A receptor in the vascular endothelial cells. Our data provide novel insights into the prophylactic therapy for various kinds of cancer metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ナトリウム利尿ペプチド、肺癌、がん転移、抗転移療法

1. 研究開始当初の背景

癌患者の死亡原因の多くは“転移”によるものであり、予後の改善には転移の抑制的制御が極めて重要である。しかし、現行の癌治療は、殺細胞効果を発揮する化学療法や、分子標的剤等の原発巣を標的としたものが中心であり、“転移”を標的とした治療法は皆無である。

心房性ナトリウム利尿ペプチド(Atrial natriuretic peptide; ANP) は、研究代表者が所属する国立循環器病研究センター研究所の寒川所長らによって単離同定された心臓ホルモンであり、現在急性心不全治療薬として臨床応用されている。これまでに研究代表者は肺癌手術の際、ハイリスク症例に対して術中より3日間低用量の ANP を持続投与することによって、術後心肺合併症を有意に軽減できることを報告した。

肺癌は、術中散布された遊離癌細胞の血行性転移によって、根治手術後であっても術後早期に再発することが多いが、術後早期（2年以内）無再発生存率を調べた結果、ANP 投与群では非投与群（手術単独群）と比較して有意に良好な成績を得た(UMIN4880)。本成績は、ANP が癌転移において抑制的に作用することを示唆するものであり、本研究を開始する動機となった。

2. 研究の目的

ANP の持つ抗転移・再発抑制効果について、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺癌マウスモデルに対する ANP の抗転移効果

GFP 導入 A549 及び H460 ヒト肺癌細胞株を各 100 万個/匹ずつ、ヌードマウス尾静脈より注入する血行性癌転移モデルにおいて、ANP (0.5 μg/kg/分) もしくは生理食塩水を充填した浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、A549 モデルは 8 週間、H460 モデルは 6 週間観察し、犠牲死後、肺転移個数を蛍光顕微鏡下にカウントした。

(2) マウスメラノーマを用いた血行性肺転移モデルに対する ANP の抗転移効果

C57BL/6 マウスを ANP 投与群と生理食塩水

群の 2 群に分け、ANP の受容体であるグアニル酸シクラーゼ A (GC-A) 受容体を発現していない、マウスメラノーマ (B16/F10) を尾静脈より注入し、2 週間後犠牲死とし、肺転移個数を調べた。

(3) 遺伝子改変マウスを用いた血行性転移モデルの作製

ANP の効果が宿主側のうち、どの臓器・組織に働いているかどうかを調べる為、血管内皮特異的 GC-A ノックアウトマウス及び血管内皮特異的 GC-A 過剰発現マウスを作製し、マウスメラノーマを尾静脈から注入し、2 週間後犠牲死とし、肺転移個数を調べると共に、各群の生存期間を調べ、Kaplan-Meier 法にて評価・解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト肺癌マウスモデルに対する ANP の抗転移効果

A549 肺転移モデルにおいて、ANP 群はコントロール群と比較して、有意に肺転移個数が少なかった (図 1)。また、H460 肺転移モデルマウスにおいても同様に、ANP 群で有意に肺転移個数が少ない結果であった (図 2)。ヒト肺癌細胞株では、癌細胞自体に GC-A 受容体がある程度発現しており、腫瘍細胞への直接効果とその他間接効果の両者の可能性があると考えられた。

図 1

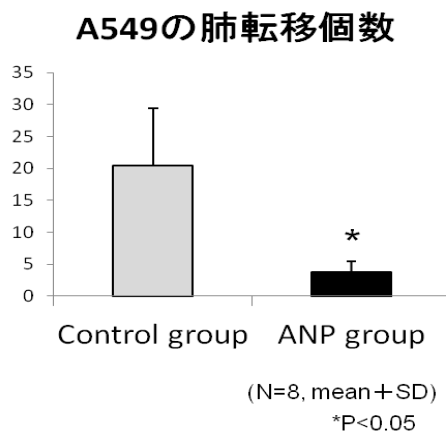
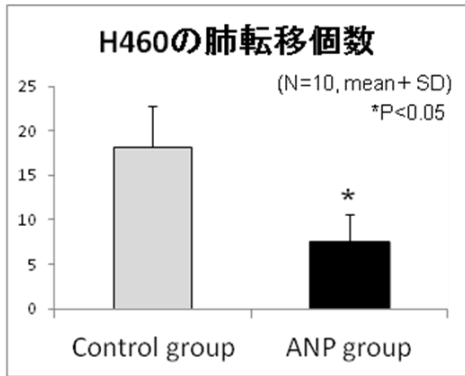


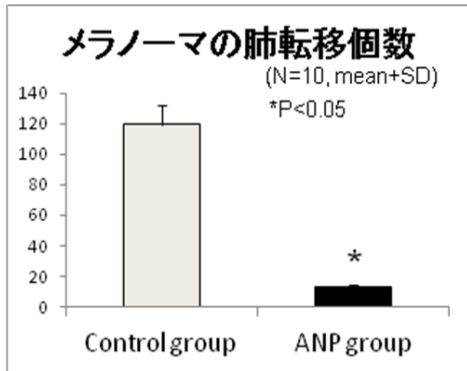
図 2



(2) マウスメラノーマを用いた血行性肺転移モデルに対する ANP の抗転移効果

マウスメラノーマ細胞は GC-A 受容体を全く持たないことがわかっているが、ANP 群ではコントロール群と比較して、有意に肺転移個数が少なかった (図 3)。この結果より、ANP はがん細胞に効いているわけではなく、宿主側に効果を発揮したことが示唆された。

図 3



(3) 遺伝子改変マウスを用いた血行性転移モデルの作製

血管内皮特異的 GC-A ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して肺転移が顕著に多く、生存期間が野生型マウスと比較して有意に短かった (図 4)。さらに血管内皮特異的 GC-A 過剰発現マウスでは、逆に肺転移は顕著に少なく、生存期間は野生型マウスと比較して有意に延長していた (図 5)。

以上の結果より、ANP が血管内皮細胞の GC-A 受容体に対して作用し、癌転移に対して保護的に働いた可能性が示唆された。

図 4

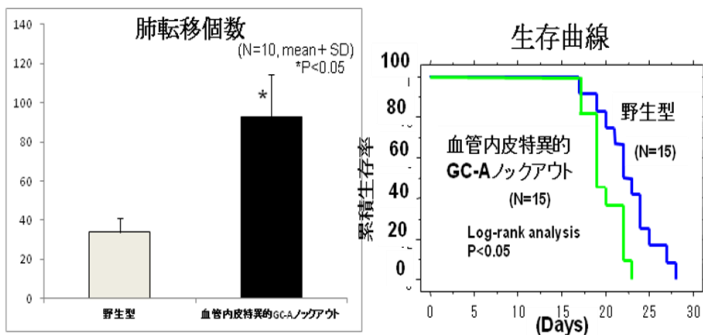
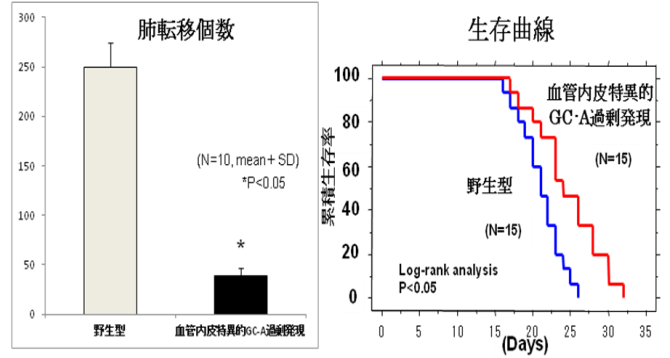


図 5



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Takashi Nojiri, Kazuhiro Yamamoto, Hajime Maeda, Yukiyasu Takeuchi, Yasunobu Funakoshi, Masayoshi Inoue, Meinoshin Okumura. Effect of low-dose human atrial natriuretic peptide on postoperative atrial fibrillation in patients undergoing pulmonary resection for lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012;143:488-94.

② Takashi Nojiri, Masayoshi Inoue, Kazuhiro Yamamoto, Hajime Maeda, Yukiyasu Takeuchi, Yasunobu Funakoshi, Meinoshin Okumura. Effects of low-dose human atrial natriuretic peptide for preventing post-operative cardiopulmonary complications in elderly patients undergoing pulmonary resection for lung cancer. Eur J Cardiothorac Surg. 2012;41:1330-4.

③ Takashi Nojiri, Masayoshi Inoue, Hajime Maeda, Yukiyasu Takeuchi, Noriyoshi Sawabata, Yasushi Shintani, Kazuhiro Yamamoto, Meinoshin Okumura. Low-dose human atrial natriuretic peptide for the prevention of postoperative cardiopulmonary complications in chronic obstructive pulmonary disease patients undergoing lung cancer surgery. Eur J Cardiothorac Surg. 2012 Dec 14. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 9 件)

① Takashi Nojiri, Masayoshi Inoue, Masato Minami, Noriyoshi Sawabata, Yoshihisa Kadota, Yasushi Shintani, Tomoyuki Nakagiri, Kazuhiro Yamamoto, Hajime Maeda, Yukiyasu Takeuchi, Yasunobu Funakoshi, Meinoshin Okumura. Efficacy of low-dose

human atrial natriuretic peptide on postoperative cardiopulmonary complications in elderly patients undergoing pulmonary resection for lung cancer. American Association for Thoracic Surgery 91st Annual Meeting. 2011年5月7-11日, Philadelphia, PA, USA.

② **Takashi Nojiri**, Masayoshi Inoue, Masato Minami, Noriyoshi Sawabata, Yoshihisa Kadota, Yasushi Shintani, Tomoyuki Nakagiri, Kazuhiro Yamamoto, Hajime Maeda, Yukiyasu Takeuchi, Yasunobu Funakoshi, Meinoshin Okumura. 第64回日本胸部外科学会定期学術集会、2011年10月9-12日、名古屋

③ **Takashi Nojiri**, Kazuhiro Yamamoto, Masayoshi Inoue, Yukiyasu Takeuchi, Hajime Maeda, Meinoshin Okumura, Hiroshi Hosoda, Mikiya Miyazato, Kenji Kangawa. Efficacy of low-dose human atrial natriuretic peptide on postoperative cardiopulmonary complications in elderly patients undergoing pulmonary resection for lung cancer. 第15回日本心血管内分代謝学会学術集会、2011年11月25日、大阪

④ **Takashi Nojiri**, Masayoshi Inoue, Hajime Maeda, Yukiyasu Takeuchi, Masato Minami, Noriyoshi Sawabata, Yasushi Shintani, Tomoyuki Nakagiri, Kazuhiro Yamamoto, Meinoshin Okumura. Effects of low-dose human atrial natriuretic peptide for preventing postoperative cardiopulmonary complications in chronic obstructive pulmonary disease patients undergoing lung cancer surgery. 20th European Conference on General Thoracic Surgery. 2012年6月10-13日, Essen, Germany.

⑤ **野尻崇**、木村亨、新谷康、井上匡美、南正人、澤端章好、中桐伴行、舟木壮一郎、竹内幸康、前田元、奥村明之進 肺癌周術期 hANP 投与による術後早期再発抑制効果—機序解明の為の Translational Research—、第65回日本胸部外科学会定期学術集会、2012年10月18日、福岡

⑥ **野尻崇**、細田洋司、徳留健、石兼真、木村亨、新谷康、井上匡美、南正人、澤端章好、中桐伴行、竹内幸康、前田元、宮里幹也、奥村明之進、寒川賢治 ANP の血管保護作用を応用した新しい癌転移抑制効果の発見とメカニズムの解明に向けて、第50回日本癌治療学会学術集会、2012年10月26日、横浜

⑦ **Takashi Nojiri**, Hiroshi Hosoda, Takeshi Tokudome, Toru Kimura, Yasushi Shintani, Masayoshi Inoue, Hajime Maeda, Yukiyasu Takeuchi, Masato Minami, Noriyoshi Sawabata, Tomoyuki Nakagiri, Soichiro Funaki, Mikiya Miyazato, Kenji Kangawa,

Meinoshin Okumura. Effects of low-dose human atrial natriuretic peptide for preventing cancer recurrence or metastasis in lung cancer. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference. 2012年11月27, 28日, Fukuoka, Japan.

⑧ **野尻崇**、細田洋司、三浦浩一、木村亨、井上匡美、新谷康、南正人、澤端章好、中桐伴行、舟木壮一郎、奥村明之進 肺癌周術期炎症の臨床的意義—炎症が肺血管へ与える影響—、第30回日本呼吸器外科学会総会、2013年5月9日、名古屋

⑨ **Takashi Nojiri**, Hiroshi Hosoda, Takeshi Tokudome, Koichi Miura, Shin Ishikane, Toru Kimura, Masayoshi Inoue, Noriyoshi Sawabata, Kenji Kangawa, Meinoshin Okumura. Atrial natriuretic peptide protects against pulmonary inflammation. 21st European Conference on General Thoracic Surgery. 2013年5月27日, Birmingham, UK.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC-A アゴニストを含有する癌転移抑制用医薬組成物

発明者：寒川賢治、細田洋司、野尻崇、奥村明之進

種類：国際特許申請

番号：PCT/JP2012/054841

出願年月日：2012年2月27日

国内外の別：国内外

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース (2012年10月23日)

<http://www.ncvc.go.jp/pr/release/004479.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野尻 崇 (NOJIRI TAKASHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：50570553