

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461393

研究課題名(和文)心房性ナトリウム利尿ペプチドの血管保護作用を応用した癌細胞転移抑制機構

研究課題名(英文) Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells.

研究代表者

細田 洋司 (HOSODA, HIROSHI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40359807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

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、心不全マーカーとして臨床応用されている。高リスク肺癌手術に対する周術期低用量ANP投与によって、術後早期再発抑制効果を新たに見出した。本研究の目的は、ANPの肺血管内皮細胞制御による癌細胞の血行性肺転移抑制効果とその機序を明らかにすることである。数種類の癌由来細胞株を用いたマウス尾静脈注入による血行性肺転移モデルや癌細胞の同所移植による自然肺転移モデルにおいて、ANPの肺転移抑制作用を認めた。この効果は、血管内皮細胞に発現しているANP受容体を介して、接着分子E-selectinの発現や血管炎症の制御によるものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the mechanism of atrial natriuretic peptide (ANP) in the prevention of cancer metastasis.

We have previously reported that ANP treatment during the perioperative period reduces inflammatory response and has a prophylactic effect on postoperative cardiopulmonary complications in lung cancer surgery.

ANP is known to bind specifically to guanylyl cyclase-A (GC-A) receptor. In mouse models, metastasis of GC-A-nonexpressing tumor cells to the lung was increased in vascular endothelium-specific GC-A knockout mice and decreased in vascular endothelium-specific GC-A transgenic mice compared with control mice. ANP inhibited the adhesion of cancer cells to pulmonary arterial and micro-vascular endothelial cells by suppressing the E-selectin expression that is promoted by inflammation. These results suggest that ANP prevents cancer metastasis by inhibiting the adhesion of tumor cells to inflamed endothelial cells.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：血管内分泌学

1. 研究開始当初の背景

癌患者の死亡原因のほとんどは生命臓器への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重要である。現在の癌治療は、癌細胞そのものを標的とした治療法が中心であり、転移を制御した治療法は見当たらない。主な転移様式である血行性転移は、癌細胞の原発巣からの離脱、血管への浸潤、血管内の移動、転移臓器の血管内皮への接着、血管外への浸潤、転移臓器内での増殖、少なくともこれらの複雑な過程からなる現象である。癌細胞の転移先臓器の血管への定着、血管外浸潤を制御可能となれば、血行性転移の抑制による治療及び予後の改善効果が期待出来る。

心房性利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide, ANP)は、現在急性心不全治療薬、心不全マーカーとして臨床応用されている。ANPの特異的受容体である guanylyl cyclase(GC)-A は血管内皮細胞に高発現している。申請者らは、肺癌切除術周術期に低用量 ANP を投与することによって、術後早期再発が有意に低下することを見出した。予備検討において、肺血管内皮細胞の ANP-GC-A シグナルを介した癌細胞の肺転移抑制効果が認められた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ANPの肺血管内皮細胞制御による癌細胞の血行性肺転移抑制効果とその機序を明らかにすることであり、ANPの新たな生理機能解明の分子基盤構築を目指すものである。

3. 研究の方法

外科手術時及び自然経過による癌細胞の肺転移機序、特に肺血管内皮細胞に着目した癌細胞転移の分子メカニズムの解明と、それに対する ANP-GC-A シグナル活性化による抗肺転移抑制効果の検討を行う。

1. 血行性肺転移モデルの確立と ANP の肺転移抑制効果の検討

・異種移植血行性肺転移モデルにおいて

GFP 導入ヒト肺癌細胞株 A549 及び H460 をヌードマウス尾静注し、6~8 週間後に肺転移個数を蛍光顕微鏡下に調べる。細胞静注前日に ANP(0.5) 充填した浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、肺転移に対する効果を検討する。

・同種移植血行性肺転移モデルにおいて

マウスメラノーマ(B16/F10)細胞は GC-A 受容体を発現していない。このメラノーマ細胞を C57BL/6 マウスに尾静注し、2 週間後に肺転移個数を調べる。前述同様に浸透圧ポンプを用いた ANP 皮下投与群における肺転移に対する効果を検討する。

2. LPS 投与(外科手術侵襲モデル)による癌細胞の肺転移に対する影響と、それに対する ANP の肺転移抑制効果の検討

・LPS 投与と血行性肺転移モデルにおいて

外科手術モデルとして LPS(Lipopolysaccharide, 1 mg/kg) 静脈投与により炎症を惹起した C57BL/6 マウスに対して、メラノーマ細胞を尾静注し、LPS 投与しない対照群と肺転移数を比較。LPS 投与マウスにおける ANP 皮下投与の前処置による肺転移抑制効果を検討する。また、LPS 投与群、ANP 投与群の肺組織または CD31 陽性肺血管内皮細胞を分離し、網羅的に遺伝子発現プロファイルを解析する。

・ヒト肺血管内皮細胞(HPAEC)を用いた LPS 投与の癌細胞転移機序の解明(in vitro)

HPAEC と GFP 発現 A459 の定量的細胞接着解析法を用いる。LPS 刺激血行性肺転移モデルで得られた転移誘導(候補)分子を HPAEC に過剰発現または siRNA にて発現抑制を行い、A459 に対する接着性を検討する。

3. 自然肺転移モデルにおける ANP の抗肺転移効果の検討

・同所移植肺転移における前転移ニッチ形成と肺血管内皮細胞について

GFP 導入 4T1 マウス乳癌細胞及び Colon26 マウス大腸癌細胞を BALB/c マウスに同所移植する。通常癌細胞同所移植では数週間後に微小肺転移が認められる。移植 1~2 週間後から ANP 皮下投与を開始し、その 4 週間後に抗転移効果を観察する。また、これら同所移植後の肺組織を採取し、前転移ニッチ形成の組織学的検討や網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析する。

・HPAEC を用いた自然転移モデルと癌細胞転移機序の解明(in vitro)

同所移植後の肺組織の遺伝子解析から得られた転移誘導(候補)分子を HPAEC に過剰発現または siRNA にて発現抑制を行い、A459 に対する接着性を検討する。

4. 研究成果

1. 血行性肺転移モデルの確立と ANP の肺転移抑制効果の検討

A549 肺転移モデルにおいて、ANP 投与群は対照群と比較して、有意に肺転移数が減少した。H460 肺転移モデルも同様に、ANP 群で有意に肺転移数が抑制された。

メラノーマ肺転移モデルにおいても、ANP 投与群で有意に肺転移数は減少した。この結果より、ANP はがん細胞ではなく宿主側に作用していることが示唆された。

2. LPS 投与(外科手術侵襲モデル)による癌細胞の肺転移に対する影響と、それに対する ANP の肺転移抑制効果の検討

LPS 刺激によってメラノーマ肺転移モデルでの肺転移数は著増し、ANP 前投与によりその転移数は抑制された。定量的細胞接着解析において、LPS 刺激によって HPAEC への A459 の細胞接着能は促進された。

HPAEC を用いた網羅的遺伝子発現解析から、E-selectin 発現亢進や S100A8/A9-SAA-NFκB 及び Rho のシグナル活性化による癌細胞 - 肺血管内皮細胞への接着促進効果が明らかとなり、ANP の肺転移抑制効果の一部はこれらの発現調節を介することが分かった。

3. 自然肺転移モデルにおける ANP の抗肺転移効果の検討

4T1 マウス乳癌細胞及び Colon26 マウス大腸癌細胞の同所移植モデルにおいて、ANP 皮下投与群で両方とも有意に肺転移数が減少した。また、肺組織の組織学的検討から、同所移植モデルでは前転移ニッチ形成と思われる肺胞のマクロファージ浸潤像が認められ、ANP 投与によりその変化は抑制された。

同所移植モデル肺組織において、LPS 刺激同様、接着分子 E-selectin や S100A8/A9-SAA の遺伝子発現亢進が前転移ニッチ形成に関連していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- Zenitani M, Nojiri T, Kimura T, Hosoda H, et al. Myeloprotective effects of C-type natriuretic peptide on cisplatin-induced bone marrow granulocytopenia in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017 79(2):363-368. 査読有
doi: 10.1007/s00280-016-3221-5.
- Okamoto A, Nojiri T, Konishi K, Tokudome T, Miura K, Hosoda H, et al. Atrial natriuretic peptide protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis via vascular endothelial cells in mice: ANP for pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2017 18(1):1. 査読有
doi: 10.1186/s12931-016-0492-7.
- Nojiri T, Hosoda H, et al. Atrial natriuretic peptide protects against cisplatin-induced granulocytopenia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 78(1):191-7. 査読有
doi: 10.1007/s00280-016-3075-x.
- Zenitani M, Nojiri T, Uehara S, Miura K, Hosoda H, et al. C-type natriuretic peptide in combination with sildenafil attenuates proliferation of rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Med.* 2016 5(5):795-805. 査読有
doi: 10.1002/cam4.642.
- Kimura T, Nojiri T, Hosoda H, et al. Protective effects of C-type

natriuretic peptide on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 75(5):1057-63. 査読有
doi: 10.1007/s00280-015-2734-7.

- Kimura T, Nojiri T, Hosoda H, et al. Exacerbation of bleomycin-induced injury by lipopolysaccharide in mice: establishment of a mouse model for acute exacerbation of interstitial lung diseases. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015 48(4):e85-91. 査読有
doi: 10.1093/ejcts/ezv261.
- Kimura T, Nojiri T, Hino J, Hosoda H, et al. C-type natriuretic peptide ameliorates pulmonary fibrosis by acting on lung fibroblasts in mice. *Respir Res.* 2016 17:19. 査読有
doi: 10.1186/s12931-016-0335-6.
- Zenitani M, Nojiri T, Uehara S, Miura K, Hosoda H, et al. C-type natriuretic peptide in combination with sildenafil attenuates proliferation of rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Med.* 2016 5(5):795-805. 査読有
doi: 10.1002/cam4.642.
- Nojiri T, Hosoda H, et al. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 112(13):4086-91. 査読有
doi: 10.1073/pnas.1417273112.

〔学会発表〕(計 1 件)

細田洋司、野尻崇、石兼真、三浦浩一、宮里幹也、寒川賢治. ANP の血管内皮細胞の接着分子制御による癌細胞の転移抑制効果について. 第 88 回日本内分泌学会学術総会 Apr/23-25/2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

国立循環器病研究センター

<http://www.ncvc.go.jp/about/excellence/01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 洋司 (HOSODA HIROSHI)

国立循環器病研究センター研究所・再生医療部・室長

研究者番号: 40359807

(2)連携研究者

寒川 賢治 (KANGAWA KENJI)

国立循環器病研究センター研究所・研究所
長

研究者番号：00112417