

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861136

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による革新的癌治療法の開発

研究課題名(英文)ANP-mediated vasoprotective action against cancer metastasis

## 研究代表者

野尻 崇 (Nojiri, Takashi)

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：50570553

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)：我々はいままで、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)を肺癌周術期に投与することによって、術後様々な心肺合併症を予防できること、さらには術後再発抑制作用を有することを見出した。ANPの癌転移抑制機序について、ANPは血管E-セレクトインの発現を抑制し、癌細胞の血管への接着を防ぐことによって、様々な癌腫に対する抗転移作用を発揮することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that administration of atrial natriuretic peptide (ANP) during the perioperative period reduces inflammatory response and has a prophylactic effect on postoperative cardiopulmonary complications in lung cancer surgery. In addition, we demonstrated that cancer recurrence after curative surgery was significantly lower in ANP-treated patients than in control patients (surgery alone). We showed that ANP prevents cancer metastasis by inhibiting the adhesion of tumor cells to inflamed endothelial cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ナトリウム利尿ペプチド 癌転移 がん再発 抗転移療法 手術療法

## 1. 研究開始当初の背景

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP; Atrial Natriuretic Peptide)は、申請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。これまでに申請者は肺癌手術の際、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、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、本来合併症予防の為投与されていた ANP 群では、非投与群(手術単独群)と比較して良好な成績であった。病理病期等をペアマッチさせた結果も同様であった。本成績は、ANP が癌転移に対して抑制的に作用する可能性を示すものであり、本研究を開始する動機となった。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、肺癌手術周術期に ANP を投与することによって、術後早期再発(2年以内)が有意に少ないことを発見し、さらに研究を進めることによって、ANP の新規作用として、血管内皮細胞に対する癌細胞の接着抑制効果を見出した。ANP の宿主血管保護という、従来とは全く異なるアプローチによって、癌治療成績の飛躍的向上を目指し、基礎研究と臨床研究の橋渡しを図ることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 本臨床研究は、大阪大学医学部附属病院及び国立病院機構刀根山病院の両施設での倫理審査委員会の承認後、大学病院医療情報ネットワーク(UMIN4880)に登録して実施された。対象は、2007~2011年に肺癌根治手術を施行した467症例であり、周術期に ANP 投与を行った群と非投与群(手術単独群)に分け、術後2年無再発生存率について log-rank 検定を行い、比較検討を行った。また、年齢、性別及び病理病期等背景因子を合わせたペアマッチ解析を行った。

(2) ヒト肺癌細胞株(A549及びH460;いずれも $1 \times 10^6$ 個/匹)とマウスメラノーマ(B16/F10; $2-5 \times 10^5$ 個/匹)細胞を用いて、マウス尾静脈投与による肺転移モデルを作製し、ANP投与群 vs. 対照群の肺転移個数について検討した。

(3) 血管内皮特異的 GC-A (ANP の受容体)-KO (ノックアウト) マウス及び血管内皮特異的 GC-A-Tg (トランスジェニック) マウスを作製し、マウスメラノーマ肺転移実験を行い、肺転移個数について対照マウスと比較検討した。また各群における生存率について調べる為、Kaplan-Meier 法による生存曲線について log-rank 検定を行い、検討した。

(4) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)

を用いて ANP (終濃度  $0.1 \mu\text{M}$ ) を添加し、1時間及び6時間後のサンプルを回収し、網羅的遺伝子解析を行い、ANP によって最も大きく変動する遺伝子群を同定した。

(5) ヒト肺動脈血管内皮細胞(HPAEC)に対してリポポリサッカライド(LPS)を加え、E-セレクトリン、VCAM-1、ICAM-1のタンパク発現レベルを調べると共に、confluent に培養した HPAEC に GFP 標識した A549 及び H460 細胞を加え、3時間共培養し、HPAEC に接着した癌細胞数についてカウントした。また、各実験系に対する ANP 前処置(30分前添加、終濃度  $0.1 \mu\text{M}$ ) の効果について検討した。

(6) マウスに LPS ( $1\text{mg}/\text{kg}$ ) 投与した5時間後に、マウスメラノーマ細胞(B16/F10; $2-3 \times 10^5$ 個/匹)の尾静脈投与を行い、14日後の肺転移個数について調べ、本実験系に対する ANP 並びに E-セレクトリン中和抗体の前投与効果について検討した。

(7) 全てのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。生存解析以外について、unpaired Student's t-test または one-way ANOVA を用いて検定し、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

(1) 肺癌周術期 ANP 投与による術後早期再発抑制効果

肺癌周術期において、本来合併症予防目的で ANP を投与した群(手術+ANP群)では、非投与群(手術単独群)と比較して、術後2年無再発生存率は 91% vs. 75% と有意に良好な成績であった。術後合併症予防目的で ANP を投与していた為、ANP 投与群は、非投与群と比較して、併存疾患が多い(高血圧、糖尿病等)・BNP 値が高い(潜在性心不全)等様々な特徴があり、患者背景に大きな偏りが認められた。これを是正する為、癌再発率・予後に関する有意な危険因子として、年齢・性別・病理病期等を両群マッチングさせた上で解析を行ったが、結果は同様であった。本成績によって、ANP が癌転移に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

(2) ANP の作用標的の同定

まず、ANP の受容体である Guanylyl Cyclase-A (GC-A) 受容体は、様々な癌細胞において発現していた為、当初 ANP の癌細胞に対する直接効果の可能性について検討したが、様々な癌細胞に対する直接的な増殖抑制効果は認められなかった。次に、GC-A を発現している、ヒト肺癌細胞株 A549 (腺癌) 及び H460 (大細胞癌) をヌードマウス尾静脈から投与する肺転移モデルを作製し、ANP 投与群 vs. 対照群にて比較検討したところ、ANP 投与によって、肺転移は有意に抑制された。続いて、GC-A を全く発現していない細胞株である、マウスメラノーマ(B16/F10)を用いて、同様の実験を行ったところ、やはり ANP 投与によって肺転移は有意に抑制された。以上より、癌細胞に依らず、ANP 投与によって肺転移抑制効果が認められたことから、癌細

胞以外、即ち宿主側への作用の可能性が示唆された。そこで、体内で GC-A を最も豊富に発現している血管内皮細胞に着目した。血管内皮特異的 GC-A-KO マウスを作製し、同様の実験を行ったところ、対照マウスと比較して肺転移は有意に多く、血管内皮特異的 GC-A-Tg マウスでは、逆に肺転移は有意に少なかった。以上より、ANP は宿主血管内皮細胞に働き、癌転移抑制効果を発揮したと考えられた。さらに、血管内皮特異的 GC-A-KO マウスにおいて、野生型では極めて稀な心臓への転移が一定の割合で認められた。心臓は、癌細胞と最も接する機会の多い臓器の一つであるが、癌転移は極めて稀である。慢性心房細動患者の血栓や、感染性心内膜炎患者の疣贅 (vegetation) 等、心腔内に付着する病態はよく知られているが、GC-A をノックアウトすると初めて、心臓にも癌転移巣が観察されることから、本来 ANP/GC-A 系が心臓において、癌転移に対して何らかの内在性保護機構の役割を果たしている可能性が示唆された。

### (3) ANP の血管内皮細胞に対する作用メカニズム

ANP の血管内皮細胞に対する鍵遺伝子を明らかにする為、HUVEC に対する ANP 添加後、1、6 時間後の遺伝子発現レベルの変動について、網羅的遺伝子解析を行ったところ、*SELE* (E-selectin の遺伝子名) が ANP 添加によって最も強く抑制される遺伝子であることを見出した。実際、周術期炎症の血管内皮細胞への影響について調べる為、HPAEC に対して、LPS 刺激を行うと、E-selectin のタンパク発現が増加し、ヒト肺癌細胞との共培養において、HPAEC に接着する癌細胞が顕著に増加した。本実験系に対して ANP を前投与すると、E-selectin の発現が強力に抑制され、HPAEC に接着する癌細胞数も顕著に減少した。また、GC-A をノックダウンした HPAEC では ANP の E-selectin 抑制効果はキャンセルされた。以上より、ANP は血管内皮細胞の GC-A 受容体を介して、E-selectin の発現を抑制し、癌細胞が血管へ接着・浸潤するのを防ぐことが示された。

### (4) ANP の in vivo における E-selectin 抑制効果

マウスに LPS 刺激後、摘出肺における E-selectin の遺伝子及びタンパク発現は、顕著に増加するが、本実験系に対する ANP 前投与によって、E-selectin 発現は有意に抑制された。また、マウスに LPS 刺激後、メラノマを尾静脈投与すると、肺転移が顕著に増加するが、LPS 刺激前に ANP 投与を開始すると、メラノマの肺転移は有意に抑制された。また、E-selectin 中和抗体を用いても同様に、LPS 刺激に伴うメラノマの肺転移は有意に抑制された。以上より、LPS 刺激によって、血管 E-selectin の発現が亢進し、癌細胞の肺転移は有意に増加するが、ANP 投与によって、血管 E-selectin の発現を抑制し、癌細胞

の血管への接着を防ぐことによって、抗転移作用を発揮する可能性が示された。

本研究により、肺癌周術期 3 日間の ANP 投与による術後再発・転移抑制効果の機序について、次のように考察した。癌手術時に血中に放出される遊離癌細胞は、その多くが 1-2 日以内に細胞死を迎え、消退することが知られている。しかし、手術時の炎症によって惹起された血管 E-selectin の発現亢進によって、血中遊離癌細胞が血管へ接着・浸潤し易くなり、術後早期再発・転移の一因となっていることが、近年報告されている。ANP は周術期炎症によって惹起された血管 E-selectin の発現亢進を抑制することにより、遊離癌細胞が血管へ接着するのを防ぎ、その結果、術後再発・転移抑制効果を発揮したと考えられた。

### 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 5 件)

1. Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue M, Kimura T, Sawabata N, Minami M, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:4086-91. (査読あり)
2. Nojiri T, Hosoda H, Kimura T, Miura K, Ishikane S, Tokudome T, Shintani Y, Inoue M, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;75:123-9. (査読あり)
3. Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Kimura T, Shintani Y, Inoue M, Sawabata N, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;29:24-30. (査読あり)
4. 野尻崇, 徳留健, 細田洋司, 三浦浩一, 宮里幹也, 寒川賢治. 心房性ナトリウム利尿ペプチドの血管保護作用による癌転移予防効果 - 機序解明に向けて - 血管 38 巻 3 号 Page109-114, 2015 (査読あり)
5. 野尻崇, 奥村明之進, 寒川賢治. 肺癌手術における BNP 診断と ANP 治療 - 血管保護作用による癌転移抑制効果の発見 - 呼吸 34 巻 10 号 Page954-959, 2015 (査読あり)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. **野尻崇**、細田洋司、徳留健、三浦浩一、石兼真、井上匡美、新谷康、木村亨、南正人、澤端章好、中桐伴行、舟木壮一郎、竹内幸康、前田元、宮里幹也、望月直樹、寒川賢治、奥村明之進 心房性ナトリウム利尿ペプチドの血管保護作用による新しい癌転移予防戦略 第 114 回日本外科学会定期学術集会(京都) 2014 年 4 月 3 日 口演(プレナリー)
2. **Nojiri T**, Hosoda H, Tokudome T, Miyazato M, Shintani Y, Inoue M, Takeuchi Y, Maeda H, Kangawa K, Okumura M. Clinical significance of atrial natriuretic peptide in cancer metastasis. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会(大阪) 2014 年 4 月 25-27 日 口演
3. **野尻崇**、新谷康、井上匡美、南正人、澤端章好、中桐伴行、舟木壮一郎、大瀬尚子、林明男、竹内幸康、前田元、奥村明之進 肺癌手術に対する術前 BNP 値による段階的リスク評価 第 31 回日本呼吸器外科学会総会(東京) 2014 年 5 月 29-30 日 口演
4. **Nojiri T**, Inoue M, Shintani Y, Takeuchi Y, Maeda H, Minami M, Sawabata N, Okumura M. B-type natriuretic peptide-guided risk assessment for postoperative complications in lung cancer surgery. 22nd European Conference on General Thoracic Surgery (Copenhagen, Denmark) 2014 年 6 月 15-18 日 口演
5. **野尻崇**、細田洋司、徳留健、三浦浩一、木村亨、井上匡美、新谷康、南正人、澤端章好、竹内幸康、前田元、宮里幹也、望月直樹、奥村明之進、寒川賢治 心房性ナトリウム利尿ペプチドの血管保護作用による癌転移予防効果 - 機序解明に向けて - 第 52 回日本癌治療学会学術集会(横浜) 2014 年 8 月 29 日 口演
6. **Nojiri T**, Hosoda H, Tokudome T, Kishimoto I, Miura K, Mochizuki N, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through inhibition of cancer cell adhesion to vascular endothelial cells. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014 (Kyoto) 2014 年 9 月 10-12 日 口演
7. **野尻崇**、竹内幸康、前田元、新谷康、井上匡美、南正人、澤端章好、寒川賢治、奥村明之進 術前化学療法による肺癌周術期合併症リスク - BNP 値測定による重要な知見と考察 - 第 67 回日本胸部外科学会総会(博多) 2014 年 10 月 3 日 口演
8. **野尻崇**、新谷康、木村亨、井上匡美、寒川賢治、奥村明之進 心房性ナトリウム利尿ペプチドの固形癌に対する肺転移抑制効果 - 臨床応用に向けて - 第 55 回日本肺癌学会総会(京都) 2014 年 11 月 14 日 ポスターディスカッション
9. **野尻崇**、細田洋司、徳留健、三浦浩一、

- 石兼真、木村亨、望月直樹、宮里幹也、奥村明之進、寒川賢治 心房性ナトリウム利尿ペプチドの固形癌に対する肺転移抑制効果 第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(横浜) 2014 年 11 月 21-22 日 口演
10. **野尻崇**、徳留健、寒川賢治 心房性ナトリウム利尿ペプチドの血管保護作用による癌転移予防効果 - 機序解明に向けて - 第 44 回日本心脈管作動物質学会(高松) 2015 年 2 月 6-7 日 口演(YIA)
11. **野尻崇**、竹内幸康、前田元、細田洋司、徳留健、新谷康、井上匡美、南正人、宮里幹也、寒川賢治、奥村明之進 術前化学療法による周術期 BNP 値への影響-肺癌術後合併症リスクとの関連- 第 115 回日本外科学会定期学術集会(名古屋) 2015 年 4 月 16-18 日 口演
12. **野尻崇**、新谷康、井上匡美、南正人、別所俊哉、舟木壮一郎、川村知裕、竹内幸康、前田元、奥村明之進 ANP の血管保護作用による新しい癌転移予防戦略 - 前向き多施設臨床研究に向けて - 第 32 回日本呼吸器外科学会総会(高松) 2015 年 5 月 14-15 日 口演
13. **Nojiri T**, Hosoda H, Tokudome T, Kimura T, Okumura M, Kangawa K. Clinical Significance of Atrial Natriuretic Peptide in Cancer Recurrence following Cancer Surgery. 7th International Conference on cGMP (Trier, Germany) 2015 年 6 月 19-21 日 示説
14. **Nojiri T**, Inoue M, Shintani Y, Takeuchi Y, Maeda H, Hamasaki T, Okumura M. Impact of Postoperative Complications on Cancer Recurrence Following Lung Cancer Surgery. 16th World Conference on Lung Cancer (Denver, Colorado, USA) 2015 年 9 月 6-9 日 示説
15. **Nojiri T**, Okumura M. BNP-guided risk assessment and ANP treatment for lung cancer surgery. 第 68 回日本胸部外科学会総会(神戸) 2015 年 10 月 17-20 日 ディスカッション
16. **野尻崇**、細田洋司、徳留健、三浦浩一、新谷康、木村亨、井上匡美、南正人、竹内幸康、前田元、宮里幹也、寒川賢治、奥村明之進 ANP の血管保護作用による術後再発予防効果 - 前向き多施設臨床研究開始に向けて - 第 53 回日本癌治療学会学術集会(京都) 2015 年 10 月 29-31 日 ワークショップ
17. **野尻崇**、新谷康、井上匡美、南正人、寒川賢治、奥村明之進 ANP の血管保護作用による肺癌術後再発予防効果 - 前向き多施設臨床研究(JANP study)開始に向けて - 第 56 回日本肺癌学会総会(横浜) 2015 年 11 月 26-28 日 示説
18. **野尻崇**、奥村明之進、寒川賢治 ANP の血管保護作用による癌転移抑制効果 - 前向き多施設臨床研究(JANP study)開始 - 第 19 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2015

年 12 月 10-12 日 シンポジウム

〔図書〕(計 2 件)

1. **野尻崇**、寒川賢治 ANP のがん転移阻止のトランスレーショナルリサーチ Medical Science Digest 41 巻 13 号 Page500-503, 2015
2. **野尻崇**、奥村明之進、宮里幹也、寒川賢治 ANP の血管保護作用による癌転移抑制効果 - 国循主導世界初の臨床研究に向けて - 循環器病研究の進歩 36 巻 1 号 Page65-73, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：NPR-A アゴニスト及び微小管阻害作用を有する化合物を組み合わせてなる医薬  
発明者：寒川賢治、野尻崇、細田洋司  
権利者：国立循環器病研究センター  
種類：国際特許申請  
番号：特願 2015-222136  
出願年月日：2015 年 11 月 12 日  
国内外の別：国内及び国外

取得状況 (計 1 件)

名称：ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC-A アゴニスト及び GC-B アゴニストを組み合わせてなる悪性腫瘍の増悪防止用医薬組成物  
発明者：寒川賢治、野尻崇、細田洋司  
権利者：国立循環器病研究センター  
種類：国際特許申請  
番号：PCT/JP2012/070932  
出願年月日：2012 年 8 月 17 日  
国内外の別：アメリカでの特許取得

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース 2 件

1. プレスリリース (2015 年 2 月 24 日)  
心臓ホルモンによるがん転移予防効果のメカニズムの解明、並びに多施設臨床研究開始のお知らせ

<http://www.ncvc.go.jp/pr/release/007403.html>

2. プレスリリース (2015 年 6 月 1 日)

心臓ホルモンによるがん転移抑制効果についての多施設臨床研究開始 - 国家戦略特区における保険外併用療養の特例を活用した全国初の案件 -

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野尻 崇 (NOJIRI TAKASHI)

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：50570553