

177. ANP の血管制御による革新的癌治療法の開発

野尻 崇

国立循環器病研究センター研究所 生化学部

Key words : 心房性ナトリウム利尿ペプチド, GC-A, 血管保護, 癌転移

緒 言

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP: Atrial natriuretic peptide) は 1984 年本邦の寒川らによって単離同定され、1995 年急性心不全治療薬として臨床応用された心臓ホルモンであり、これまでに様々な心血管・腎保護作用を有することが明らかになっている¹⁻⁵⁾。我々は肺癌手術の際、手術開始直前より 3 日間低用量の ANP を持続投与することによって、様々な術後心肺合併症を予防できることを報告した⁶⁻⁸⁾。ANP 群では、プラセボ群と比較して血行動態に著変を認めず、術後白血球数及び CRP 値は有意に低値であり、術後 ANP 投与は安全に施行できると同時に、強力な抗炎症作用を有する可能性が示された⁶⁻⁹⁾。今回、肺癌手術における ANP 投与に関する臨床試験の追跡調査を行い、ANP が癌転移に対して抑制的に作用する可能性が示された為、ANP の癌転移抑制メカニズムを明らかにすることを目的として本研究を行った¹⁰⁾。現在“血管保護”による新しい臨床試験を開始しており、あわせて本稿として報告する。

方 法

1. 臨床研究

1) 2007 年 8 月～2011 年 12 月までに国立病院機構刀根山病院及び大阪大学医学部附属病院で肺癌手術を施行された 552 例をエントリーし、そのうち早期癌や縮小手術症例を除いた 467 例を最終解析対象とした。術後に 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。

2. 基礎研究

1) C57BL/6 マウスに対して、薬剤投与群では、ANP (0.5 μ g/kg/min) もしくは生食を充填させた皮下浸潤ポンプを埋め込み、翌日に B16/F10 マウスメラノーマ細胞を 20-50 万個マウス尾静脈から注入し、注入後 14 日目に sacrifice とし、肺転移個数をカウントした。

2) Confluent に培養したヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) に、ヒト肺癌細胞 (A549-EGFP, H460-EGFP) を添加し、3 時間共培養した後に、medium を洗い流し、血管内皮細胞に接着した癌細胞のみを可視化し接着細胞数をカウントした。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。

結 果

1. 肺癌術後 ANP 投与による術後早期再発抑制効果

肺癌術後に ANP が投与された群 (手術 + ANP 群) 77 例は、手術単独群 390 例と比較して、2 年無再発生存率が有意に良好な成績であった (図 1A)。年齢、性別や病理病期をマッチングさせた解析においても同様の成績であった (図 1B)。本結果は、ANP が何らかの癌転移抑制作用を持つ可能性を示すものである。

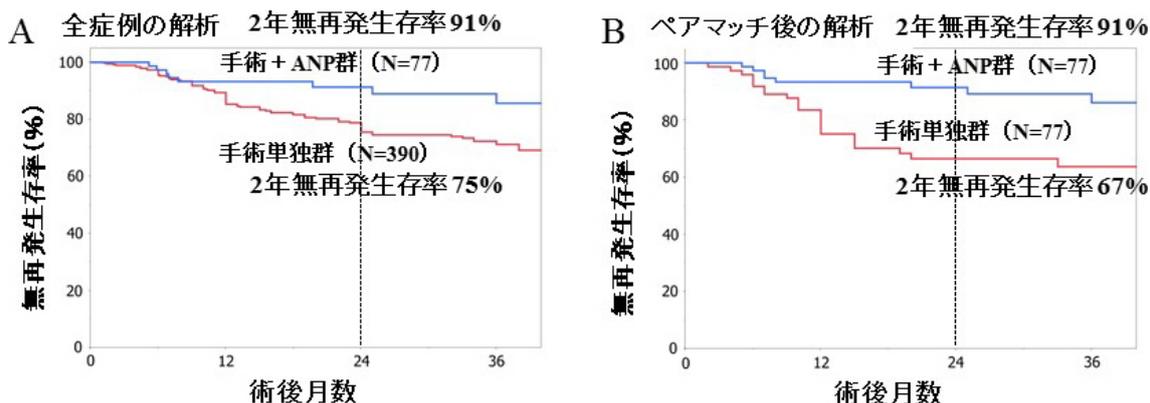


図1. 肺癌術後無再発生存率グラフ

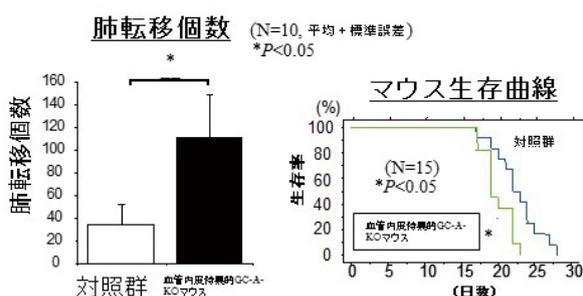
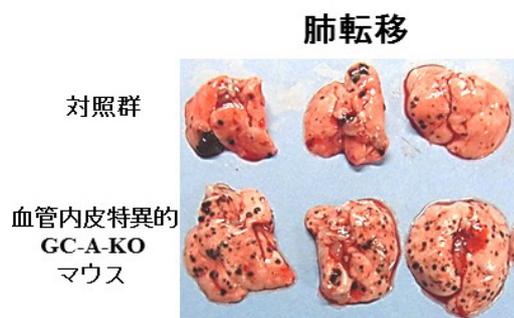
A) 全症例解析において、手術+ ANP 群の術後2年無再発生存率は、手術単独群と比較して、有意に良好であった。(91 % vs. 75 %, P = 0.018)

B) ペアマッチ後の解析においても、手術+ ANP 群の術後2年無再発生存率は、有意に良好であった。(91 % vs. 67 %, P = 0.0013)

2. ANP の作用標的の同定

ANP の受容体である、GC-A を発現していないマウスメラノーマ (B16/F10) を、マウス尾静脈より注入する血行性肺転移モデルにおいて、ANP 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、2週間観察したところ、ANP 群で肺転移が顕著に抑制された。次に我々は、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、本マウスでは野生型マウスと比較して肺転移が有意に多く (図 2A)、血管内皮特異的 GC-A トランスジェニックマウスでは、逆に肺転移が有意に少ない結果を得た (図 2B)。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。

A 血管内皮特異的GC-A-KOマウス



B 血管内皮特異的GC-A-Tgマウス

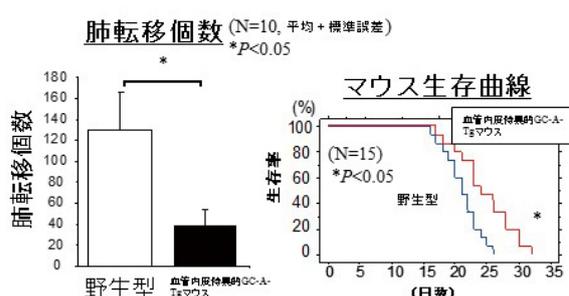


図2. 遺伝子改変マウスを用いたマウスメラノーマ肺転移実験

- A) 血管内皮特異的GC-A-KO マウスではメラノーマ (2×10^5 個/匹) 尾静脈注入2週間後の肺転移は有意に多く、心臓への転移も認められた。また生存期間も有意に短かった。
- B) 血管内皮特異的GC-A-Tg マウスではメラノーマ (5×10^5 個/匹) 尾静脈注入2週間後の肺転移は有意に少なく、また、生存期間も有意に延長した。

3. ANPの血管内皮細胞に対する作用メカニズム

ANPの血管内皮細胞を介した癌転移抑制作用のメカニズムについて明らかにする為に *in vitro* 実験を行った。confluent 状態に培養したHPAECに炎症性刺激としてリポポリサッカライド (LPS) 添加を行うと、様々な癌細胞との共培養後、HPAECに接着する癌細胞が顕著に増加すること、そして本実験系に対してANPを前処置すると、HPAECに接着する癌細胞数が有意に減少することを確認した。

続いて、ANPの血管内皮細胞に対する鍵遺伝子を明らかにする為に、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いてANP投与前後における網羅的遺伝子解析を行ったところ、E-selectinがANP投与によって最も抑制される遺伝子であることを見出した。実際にHPAECに対してLPS刺激を行うと、E-selectinの遺伝子及びタンパク発現が顕著に増加するが、ANP前処置によって、E-selectinの発現が有意に減少した。また、E-selectinをノックダウンしたHPAECでは、ヒト肺癌細胞との共培養において、血管内皮に接着する癌細胞数が有意に減少した。さらに、マウスにLPS刺激を行った後にメラノー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投与を開始することによって、メラノー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刺激に伴うメラノーマの肺転移は抑制された。以上より、ANPは血管E-selectinの発現を抑制することにより、癌細胞の血管内皮への接着を抑制し、その結果、癌転移抑制効果を発揮したと考えられた。

考 察

これまでの研究成果によって、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、次のように考えられた。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が、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可能性がある。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。

本研究成果を基に、ANPの癌転移抑制効果について前向きに検討する為、全国主要10施設を含む多施設共同無作為化比較試験を開始しており、有効性（主要評価項目：術後2年無再発生存率）及び安全性（副次評価項目：術後急性期合併症発生率等）について、検証する予定である。また、本研究では、腫瘍検体に加えて、背景肺や周術期血漿・血清検体を集積・保存し、腫瘍側因子だけでなく、宿主側因子を含めた解析を行う予定であり、ANPの宿主血管保護を応用した世界初の“抗転移薬”の有効性・安全性について、新しい視点で独自の解析を行う。

共同研究者

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました公益財団法人上原記念生命科学財団に、深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Jan 13;118(1):131-9. PMID: 6230082.
- 2) Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K. Natriuretic Peptide Signaling via Guanylyl Cyclase (GC)-A: An Endogenous Protective Mechanism of the Heart. *Curr Cardiol Rev.* 2009 Jan; 5(1):45-51. doi: 10.2174/157340309787048068. PMID: 20066148.
- 3) McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2012 Jul;33(14):1787-847. doi: 10.1093/eurheartj/ehs104. Epub 2012 May 19. PMID: 22611136.
- 4) Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, Seguchi O, Myoishi M, Minamino T, Ohara T, Nagai Y, Nanto S, Watanabe K, Fukuzawa S, Hirayama A, Nakamura N, Kimura K, Fujii K, Ishihara M, Saito Y, Tomoike H, Kitamura S; J-WIND investigators. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet.* 2007 Oct 27;370(9597):1483-93. PMID: 17964349.
- 5) Sezai A, Hata M, Niino T, Yoshitake I, Unosawa S, Wakui S, Fujita K, Takayama T, Kasamaki Y, Hirayama A, Minami K. Continuous low-dose infusion of human atrial natriuretic peptide in patients with left ventricular dysfunction undergoing coronary artery bypass grafting: the NU-HIT (Nihon University working group study of low-dose Human ANP Infusion Therapy during cardiac surgery) for left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Apr 27;55(17):1844-51. doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.085. PMID: 20413036.
- 6) Nojiri T, Yamamoto K, Maeda H, Takeuchi Y, Funakoshi Y, Inoue M, Okumura M. 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 Feb; 143(2):488-94. doi: 10.1016/j.jtcvs.2011.09.003. Epub 2011 Oct 10. PMID: 21992849.
- 7) Nojiri T, Inoue M, Yamamoto K, Maeda H, Takeuchi Y, Funakoshi Y, Okumura M. 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 Jun;41(6):1330-4. doi: 10.1093/ejcts/ezr202. Epub 2012 Jan 18. PMID: 22290883.
- 8) Nojiri T, Inoue M, Maeda H, Takeuchi Y, Sawabata N, Shintani Y, Yamamoto K, Okumura M. 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.* 2013 Jul;44(1):98-103. doi: 10.1093/ejcts/ezs646. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23242980.
- 9) 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 Oct;29(1):24-30. doi: 10.1016/j.pupt.2014.01.003. Epub 2014 Jan 22. PMID: 24462877.
- 10) 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 Mar 31;112(13):4086-91. doi: 10.1073/pnas.1417273112. Epub 2015 Mar 16. PMID: 25775533.