

Adrenomedullin antagonist のヌードマウス移植腎細胞癌に 対する血管新生抑制を介した増殖抑制効果

—腎細胞癌組織由来腫瘍血管内皮細胞を用いたメカニズム解析—

学位論文内容の要旨

【背景および目的】

腎細胞癌、特にその多くを占める淡明細胞癌は血管新生が盛んな腫瘍として知られている。現在は von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の変異、さらにその異常によりもたらされる hypoxia-inducible factor (HIF) 蛋白の過剰蓄積により、vascular endothelial cell growth factor (VEGF) が活性化することで腫瘍血管の新生が起こると考えられている。この定説に従えば、血管新生が腎細胞癌の進展に大きな役割を果たすと考えられ、これまでに腎細胞癌治療の目的でいくつかの VEGF 阻害剤が開発され、現在臨床的に広く用いられている。しかしながら、それらの治療効果は必ずしも十分とはいえるものではなく、副作用や耐性獲得などの問題点も指摘されており、またそれらの血管新生阻害剤の腫瘍血管に対する抑制効果の機序については依然不明な点が多い。その原因の一つとして、多くの血管新生阻害剤が分離培養の容易な正常血管内皮細胞を用いた創薬研究から生まれており、腫瘍血管内皮細胞に対する特異的効果の検討が少ないことが考えられる。

近年、腫瘍血管の形態が解剖組織学的に正常血管と異なることについての報告はいくつかかなされてきた。しかし腫瘍組織から腫瘍血管内皮細胞を確実に分離、また培養することには様々な難点があったことから、腫瘍血管内皮細胞を用いた研究報告は極めて少ない。しかし最近、樋田らは純度の高いマウス腫瘍血管内皮細胞の分離・培養に成功し、それらが正常血管内皮細胞と比較して様々な異常をもつこと、さらに腫瘍血管内皮細胞が染色体異常も持ちうることを報告し、腫瘍血管内皮細胞を腫瘍における血管新生研究に用いることの重要性を示唆した。

一方、小林らは 2003 年に膀胱癌細胞において低酸素下で発現亢進する Adrenomedullin (AM) に着目し、AM antagonist (AMA) ペプチドの腫瘍内投与によって腫瘍内の太い血管の新生抑制が認められ、膀胱癌細胞株の *in vivo* 腫瘍増殖が抑制されることを報告した。さらに AM antagonist (AMA) 発現ベクターの筋肉内投与によって、腫瘍内の血管密度が減少してヒト膀胱癌細胞株および乳癌細胞株の *in vivo* 腫瘍増殖が抑制されることを報告した。しかしながら、AMA の腫瘍血管新生阻害作用の機序は不明のままであった。

そこで本研究は、ヒト腎癌移植ヌードマウスモデルにおける AMA 発現ベクターの抗腫瘍効果を検討し、さらに腎癌における AMA の腫瘍血管新生阻害作用の機序を探ることを目的に、AMA の腫瘍血管内皮細胞に対する *in vitro* 作用についても解析した。

【方法および結果】

1) ヒト腎癌移植ヌードマウスモデルにおいて AMA 発現ベクター の抗腫瘍効果を検討した。ヌードマウス皮下にヒト腎癌細胞株 OS-RC-2 を移植し、移植後 13 日目に 1 回ベクターを投与し、21 日目に屠殺して腫瘍組織を摘出した。AMA 発現ベクターの投与群においてコントロールベクターの投与群と比較して有意に腫瘍の成長は抑制されていた。

- 2) AMA 発現ベクター投与群の微小血管密度 (MVD) は, Empty ベクター投与群の MVD と比較して約半分に減少していた.
- 3) AM, AMA は OS-RC-2 細胞の増殖能に影響を及ぼさなかった.
- 4) 腎癌, メラノーマ由来の腫瘍血管内皮細胞を分離し AMA による影響を検討した. また, 対照として正常血管内皮細胞を正常皮膚より分離した. 血管内皮細胞の分離・培養は樋田らが報告した方法に準じて行った. AM の投与により腎癌, メラノーマ由来の腫瘍血管内皮細胞において増殖は約 1.5 倍に促進された. AM による増殖の促進作用は AM と同時に AMA を投与することにより阻害された. 一方, 正常血管内皮細胞の増殖に対しては AM と AMA の両者とも増殖能に影響を及ぼさなかった.
- 5) 腫瘍血管内皮細胞の遊走能に対する作用を Boyden chamber を用いて検討した. AM のみで処理した腫瘍血管内皮細胞に比べ, AM+AMA で処理した腫瘍血管内皮細胞の遊走がおよそ半分以上に有意に減少していた. 一方, 正常血管内皮細胞では AM および AMA による遊走能の変化は認められなかった.
- 6) AM 受容体は calcitonin receptor-like receptor (CRLR) と receptor activity-modifying protein (RAMP) 2 ないし 3 が共発現することにより形成されることが報告されている. 腎癌, メラノーマ由来の腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞における発現について PCR を用いて調べた. 腎癌, メラノーマ由来腫瘍血管内皮細胞においては CRLR, RAMP2 が高発現しているのに対し, 正常血管内皮細胞においては, CRLR, RAMP1~3 のいずれにおいても発現は低かった.

【考察】

本研究ではヒト腎癌移植マウスモデルにおいて AMA 発現ベクターが著明に腫瘍の成長を抑えたことを示した. さらに, その作用機序について腫瘍血管内皮細胞を分離, 培養して解析した結果, AMA が腫瘍血管内皮細胞に対し直接的に血管新生阻害作用を持つことが明らかとなった.

腫瘍の血管新生がすでに起きていると考えられる時点での投与によってさえ血管新生を抑制できるということは, 実際のヒト進行癌に対する AMA の治療薬としての有用性を示唆するものと思われる.

今回の *in vivo* 腫瘍治療実験の結果では, AMA 発現ベクター投与群において MVD が低下していたことから AMA が血管新生を抑制していることが示唆された. また, AMA は腫瘍成長を抑制したにもかかわらず, AM, AMA のいずれも OS-RC-2 細胞の *in vitro* 増殖そのものには影響を及ぼさなかった. では, AMA が腫瘍血管内皮細胞を特異的に阻害した結果, 腫瘍の血管新生が抑制されたのだろうか? この仮説を検討するために, 血管内皮細胞を腫瘍から分離, 培養し, それらに対する AMA の作用を解析した. その結果, 腫瘍血管内皮細胞は AM や AMA に対する反応, AM 受容体の発現の点で正常血管内皮細胞と明らかに異なっていた.

腎癌およびメラノーマから分離された腫瘍血管内皮細胞は AM によって増殖が促進され, その増殖は AMA により阻害された. 一方, 正常血管内皮細胞は AM, AMA のどちらにも影響を及ぼされなかった. さらに腫瘍血管内皮細胞において AMA は VEGF に対する遊走能を阻害し, 正常血管内皮細胞では阻害されなかった. この腫瘍と正常血管内皮における増殖能や遊走能への作用の差異は, AM 受容体の発現パターンが違うためと考えられた.

本研究から, AMA が腎癌において腫瘍血管に直接作用することで, 正常血管内皮細胞に影響の少ない, 従来の血管新生阻害剤に比較してより特異的な薬剤として応用可能であることが示唆された.

【結語】

1. AMA 発現ベクターは著明に腫瘍の成長を抑制し, 微小血管密度も減少した.
2. AM による腫瘍血管内皮細胞の増殖や遊走能の促進は AMA により阻害された. 一方, 正常血管内皮細胞には AM, AMA とも影響を及ぼさなかった.
3. 腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞に比べ AM 受容体を高発現していた.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Adrenomedullin antagonist のヌードマウス移植腎細胞癌に 対する血管新生抑制を介した増殖抑制効果

－腎細胞癌組織由来腫瘍血管内皮細胞を用いたメカニズム解析－

本研究は adrenomedullin (AM) を標的とした腎細胞癌治療の可能性を探るために、adrenomedullin antagonist (AMA) 発現ベクターを用いて抗腫瘍効果を検討し、その機序の解析として血管新生、血管内皮細胞への影響を検討したものである。結果は、AMA 発現ベクター投与により著明に腫瘍の成長を抑制し、その機序として AMA が特異的に腫瘍血管内皮細胞に対し阻害作用を持ったことを報告している。

質疑応答では、副査の畠山教授から、AM 受容体として CRLR と RAMP の複合体以外に別の AMR と呼ばれる受容体が存在するのではないかについての質問があった。この質問に対して申請者は、昨年、膵癌細胞株において AMR が認められ、CRLR と RAMP の複合体を介さない経路が存在するのではないかとの報告がされたが、まだその詳細な機序は不明であると回答した。また、AMA が RAMP2 と RAMP3 のどちらに拮抗するか、そして受容体の発現調節メカニズムについての質問があったが、この質問に対して申請者は、AMA が報告されたのは CRLR や RAMP が発見された以前であり、現在もどちらに対し拮抗しているのかは分かっておらず、受容体の発現調節メカニズムに関しても、動物実験モデルにおいて病態によって CRLR、RAMP2、RAMP3 の発現が変化していることは報告されているが、各プロモーター領域の構造は未知でメカニズムも解明されていないと説明した。

ついで、副査の近藤教授から、動物実験では AM antagonist が全身を循環し腫瘍の成長を抑制したとされているが、その機序は確認されているのか、また血中濃度を調べているかどうかについての質問があった。これらの質問に対して申請者は、今回の腎癌モデルでは確認はしていないが、膵癌モデルの腫瘍組織においてベクターに付いている Flag を免疫染色で確認しており、血中濃度は測定していないと返答した。そして、ヒトの腫瘍血管内皮細胞での AM や AM antagonist の作用は検討されているかとの質問に対しては、現在、腎細胞癌の手術検体を用いて腫瘍血管内皮細胞の分離培養を試みている段階で、樹立できれば検

討したいと答えた。

さらに、主査の野々村教授から、AMAの臨床応用を考えたとき、現在臨床で実際に用いられているVEGFRチロシンキナーゼ阻害剤などで血管新生が抑制されていればAMAの臨床的意義は低いのではないかとの質問があった。この質問に対して申請者は、既存の血管新生阻害剤を中心とした分子標的薬は、正常血管内皮細胞によって開発研究されたものであるため重篤な副作用の問題が出現しているが、AMAは腫瘍血管内皮細胞に特異的に阻害作用を持ち、正常血管内皮細胞に影響を及ぼさず副作用が抑えられるため十分臨床的意義があると述べた。最後に、AMAを臨床応用した場合において予想される副作用についての質問があったが、AMは血管拡張、降圧作用を持っているため、最も懸念される副作用は高血圧が考えられると答えた。

本研究は、腫瘍血管内皮細胞を用いた先駆的研究であり、将来の新たな可能性を示しているものとして高く評価され、今後のさらなる発展で腫瘍血管内皮細胞に特異的に作用する血管新生阻害剤の開発が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。