

学位論文題名

Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth
of human pancreatic cancer cells in SCID mice
by suppressing angiogenesis

(Adrenomedullin antagonist は血管新生抑制を介して
SCID mice におけるヒト膵癌細胞の増殖を抑制する)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

膵癌は難治性癌のひとつであり、摘出手術可能例でも5年生存率は20%前後であり、手術不能症例では化学療法も放射線も効果はなく、1年生存率でさえ5%前後である。このような難治性癌に対する新たな治療法を確立することは旧来の発想や考え方では困難であり、新たな発想にて膵癌の病因・病態に対するより詳細な分子生物学的理解をする必要がある。最近、小林らは膵癌細胞株の大部分(75%)がHIF-1 α 蛋白を恒常的に発現していること、恒常的に発現している膵癌細胞がアポトーシスにより抵抗性であることを報告した。この報告は低酸素適応応答が膵癌細胞の生存にとって重要な働きをしていることを示唆している。さらに、彼らのグループより低酸素下で発現亢進する遺伝子として autocrine motility factor が報告された。この報告のなかで、低酸素誘導遺伝子として同定された38個の遺伝子のひとつが Adrenomedullin (以下 AM) であった。AM は 1993 年に、pheochromocytoma 由来の血管拡張因子として報告され、最近では血管拡張以外にも growth factor・survival factor として働くことが報告されている。これらの報告から、低酸素下で発現亢進する AM が血管拡張や血管新生を増強して膵癌細胞の増殖に有利に働く可能性が予想され、また逆に Adrenomedullin antagonist (以下 AMA) が血管新生阻害や血管拡張阻害を介して膵癌細胞の増殖を抑制する可能性が考えられる。

以上の仮説に基づいて、本研究ではまず膵癌細胞を含めて各種癌細胞株での AM 発現を正常酸素分圧下、低酸素分圧下で検討した。次いで AMA の膵癌細胞の *in vitro* 増殖および *in vivo* 増殖に対する効果について検討した。さらに、AMA の抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにするために AMA 投与後の膵癌腫瘍組織における増殖細胞の比率と腫瘍血管数について検討した。

【方法および結果】

- ①膵癌細胞株を正常酸素分圧下と低酸素分圧下で培養後RNAを抽出し、AM mRNA 発現を Northern blot 法にて検討し、AM receptor(CRLR,RAMP2) mRNA を RT-PCR 法にて検討した。その結果膵癌細胞株全てにおいて低酸素分圧下での AM mRNA 発現の増強を認めた。AM receptor は一部の膵癌細胞株にのみ発現しており、発現量も少ないと判断された。
- ②AM(1-25)と AMA(AM(22-52))の *in vitro* での膵癌細胞増殖に対する効果を比較検討した。AM receptor の発現が認められた膵癌細胞株を用いて MTS assay にて増殖に与

える効果を検討した。その結果 AM と AMA のいずれも、2種類の膵癌細胞株の増殖に対してなんらの効果も与えなかった。

- ③ AM(1-25)と AMA(AM(22-52))の *in vivo* での膵癌細胞増殖に対する効果を比較検討した。膵腫瘍は SCID mice にヒト膵癌細胞株(PCI-43)を皮下移植して作成し、AM と AMA は $50\mu\text{g}/\text{mouse}$ を10日間連続で腫瘍内注入にて投与したところ AMA 投与にて増殖してきた腫瘍の完全退縮を認めた。
- ④ AMA の抗腫瘍効果の機序を明らかにするために、3日おきに4回 AM もしくは AMA を投与する実験系を検討したところ、AMA 投与群で約半分に腫瘍重量が落ちる系を確立できた。AM 投与群・AMA 投与群で、腫瘍重量はそれぞれ $0.0483\pm 0.0089(\text{g})$ と $0.0297\pm 0.0001(\text{g})$ であった。
- ⑤ AM もしくは AMA 投与後の腫瘍組織において anti-PCNA 抗体および anti-CD31 抗体を用いて免疫染色を行い、増殖細胞数(PCNA-labeling index)と CD31 陽性細胞数・腫瘍血管径を比較検討した。PCNA-labeling index は AM 投与群・AMA 投与群でそれぞれ 25.8 ± 3.9 と 6.3 ± 5.2 であった。両群で CD31 陽性細胞数は有意差を認めなかったが、平均腫瘍血管径は AM 投与群・AMA 投与群でそれぞれ $6.454\pm 5.313(\mu\text{m})$ と $2.276\pm 1.120(\mu\text{m})$ であった。

【考案】

本研究において、*in vivo* における AMA の抗腫瘍効果を確認したが、この結果は逆に AM が *in vivo* における膵腫瘍形成に重要であることを示唆する所見である。最近のいくつかの報告で、AM が癌細胞で growth factor として作用することが報告されているため、膵癌細胞株の AM・AM receptor 発現と AMA の膵癌細胞の *in vitro* 増殖抑制効果を検討したところ、AM は低酸素下で強く発現していたが、AM receptor はほとんど発現しておらず、*in vitro* では AMA の膵癌細胞の増殖にたいする AMA 抑制効果は認められなかった。この結果から少なくとも膵癌細胞では AM は autocrine 様に作用しておらず、*in vivo* での増殖抑制効果は AM の間接的効果によることが示唆された。

次に AMA の抗腫瘍効果の機序を調べるために、AM(1-25)投与群と AMA 投与群腫瘍組織の免疫染色にて増殖細胞と腫瘍血管について検討したところ、AMA 投与群は AM 投与群にくらべて有意に増殖細胞数が少なかった。腫瘍血管数に有意差はなかったが、AMA 投与群では AM 投与群にくらべて平均腫瘍血管径は有意に小さかった。これらの結果から AMA の膵癌細胞に対する増殖抑制効果は腫瘍組織内の比較的大きい血管の形成を抑制して栄養・酸素の供給を減少させることによる間接的効果であることが示唆された。

【結語】

AM は *in vivo* での膵癌細胞増殖において重要な役割を果たしており、AMA は膵癌治療に有効である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis

(Adrenomedullin antagonist は血管新生抑制を介して SCID mice におけるヒト膵癌細胞の増殖を抑制する)

難治癌の代表である膵癌の治療法の開発にはその特徴をより明瞭にする必要がある。最近、低酸素適応が膵癌増殖に重要であること、低酸素誘導遺伝子のひとつがadrenomedullin(AM)であること、AMは血管拡張因子・血管新生因子・autocrine growth factorであることが報告された。このためAM antagonist(AMA)は癌細胞増殖を直接抑制する可能性、対血管効果で間接抑制の可能性が考えられる。本研究では最初に膵癌細胞株の低酸素下でのAM発現を確認し、次にin vitroでのAMAの効果を検討し、最後にin vivoでの効果を検討した。

膵癌細胞株の低酸素下でのAM発現をNorthern blotおよび免疫染色にて検討し、AM receptor発現をRT-PCRにて検討した。低酸素下では膵癌細胞株はAM発現が亢進し、receptor発現は一部にのみ発現していた。次に膵癌のin vitro増殖に対するAMAの抑制効果をMTS assayにて検討したが、全く効果がなかった。さらにin vivo増殖に対するAMAの抑制効果を膵癌移植SCIDマウスモデルを用いて検討した結果、AMAは腫瘍増殖を抑制した。機序を解析するためAMA投与でcontrolにくらべて腫瘍重量が半分に落ちる系を確立し、増殖細胞および血管内皮細胞を免疫染色にて検討した結果、AMA投与で増殖細胞数は減少し、血管数は変わらないが内径の太い血管のみが減少していた。AMAは内径の太い血管の新生を阻害することで膵癌のin vivo増殖を抑制していた可能性が示唆された。現在、血管新生は未成熟血管網から複雑なremodeling過程を経て成熟血管網となる経路が考えられるが、その詳細は不明である。本研究ではAMは血管成熟機構の

太い血管形成過程に関与している可能性が示唆された。

公開発表にあたって、副査の加藤教授からin vitroとin vivoでのAMA量の差について、太い血管のみ阻害との考察について、血管収縮作用による抑制効果の可能性、AMA投与時のHIF-1 α 発現の変化について質問があった。これに対し申請者はAMA濃度と作用時間の積で作用強度を考えた方がよいこと、remodeling過程におけるAMAの作用の可能性、AMAの血管拡張阻害効果の持続時間からその可能性が低いこと、AMA投与時のHIF-1 α 発現亢進の可能性について説明した。副査の浅香教授からAMに着目した理由、in vitroとin vivoでの増殖抑制効果の差について、HIF-1 α 発現により嫌気性代謝が亢進して膀胱癌が低酸素適応するという従来の報告との関係、腫瘍縮小効果はnecrosisかapoptosisかについて質問があった。これに対し申請者は低酸素下でAMがより強く発現したこと、AMAが膀胱癌に対しautocrine growth factorとして作用していない可能性があること、膀胱癌の低酸素適応には血管新生が重要であること、縮小効果はapoptosisを考えていることを説明した。主査の小林教授からAMAのAM receptorに対する作用について、in vitroでAMAが分解され失活した可能性、腫瘍内に小さな血管が残存しているのでflowもあるのでとの指摘、大きな癌に対するAMAの効果の有無について質問があった。これに対し申請者はAMAは競合阻害で作用すること、AMAがpeptidaseなどで分解される可能性があること、小さな血管は酸素・栄養の運搬に不十分なこと、大きな癌にもある程度AMAは効く可能性があることについて説明した。会場の守内教授からAMAの静脈内投与の報告の有無、血管病変に対するAMの効果について、他の癌に対するAMAの効果について質問があった。これに対し申請者は静脈内投与の報告の無いこと、血管病変に対しAMは期待できること、他の癌に対してもAMAの効果は期待できることを説明した。

本研究によりAMAが内径の太い血管の新生を阻害することで膀胱癌のin vivo増殖を抑制する可能性を示したことは、AMが血管成熟機構の太い血管形成過程に関与している可能性を示唆するもので、今後の癌治療への応用にも期待される。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、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。