

# Adrenomedullin antagonist は血管新生抑制を介して SCID における癌細胞の *in vivo* 増殖を抑制する

## 学位論文内容の要旨

### 【背景および目的】

膵癌は難治癌の代表であり、画像診断の進歩がみられた現在でも多くの症例は切除不能な進行癌の状態で見られる。治療切除例でも 5 年生存率は 20 % 以下であり、手術不能例に対しては化学療法や放射線あるいはその併用療法も試みられているが、いずれも有効な治療法とは言い難く、1 年生存率でさえ 5 % 前後である。したがって、膵癌の予後を改善させるためには手術療法のみでは限界があり、新たな治療法の開発および発展が切望されている。そのためには、新たな発想により膵癌の病因・病態に対する詳細な分子生物学的理解をする必要がある。最近、筆者の所属した研究グループは膵癌細胞株の大部分 (75%) が Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 蛋白を恒常的に発現していることを見出し、それゆえ膵癌は低酸素や低栄養によるアポトーシス誘導に抵抗性を示すことを明らかにした。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、彼らのグループに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。この報告の中で、低酸素誘導遺伝子として同定された 38 個の遺伝子の 1 つが HIF-1 依存性に誘導され、血管拡張作用を示す Adrenomedullin (以下 AM) であった。AM は 1993 年にヒト褐色細胞腫より単離された血管拡張因子ペプチドとして報告され、最近では血管拡張作用に加えて癌細胞の growth factor であることや、癌細胞や血管内皮細胞の survival factor として働くことが報告されている。また、AM は低酸素下で HIF-1 依存性に誘導されることが明らかとなっている。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 AM antagonist (以下 AMA) が血管拡張阻害や血管新生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、筆者らはヒト膵癌細胞株を含めた各種癌細胞株の低酸素分圧下での AM mRNA および蛋白の発現亢進を確認し、ヒト膵癌細胞株における AMA ペプチドの *in vivo* 腫瘍増殖抑制効果も見出した。病理組織学的には 8  $\mu$ m 以上の大血管形成が抑制されており、腫瘍増殖抑制効果の機序として毛細血管腔の形成阻害が推測された。近年、ヒト glioblastoma 細胞株に対して抗 AM 抗体を 3 日毎に腫瘍内投与を行うことにより腫瘍の退縮傾向が得られ、病理組織学的にコントロール群と比較して血管内径が有意に細かったことが報告された。この結果は、筆者らの結果を支持する。

本研究では最初に AMA 発現ベクターを作製し、次にその抗腫瘍効果を明らかにするために膀胱および乳癌細胞株の *in vivo* 腫瘍増殖を検討した。

#### 【方法および結果】

- 1) AM の前駆体である Prepro AM (185 アミノ酸) の全長 cDNA は HL-60 細胞を DFX 処理した mRNA より作製し、この cDNA をテンプレートにして AMA 発現ベクターを作製した (塩基配列を確認済み)。
- 2) SCID マウス皮下ヒト膀胱癌移植モデルの腫瘍増殖に対する AMA 発現ベクターの腫瘍内投与の検討をした。膀胱癌モデルは SCID マウスにヒト膀胱癌細胞 (PCI-43) を皮下移植して作成し、AMA 発現ベクターは 1 匹当たり 500  $\mu$ g を腫瘍内投与した。これにより腫瘍はほぼ退縮した。
- 3) 同腫瘍組織において抗 CD31 抗体を用いて免疫染色を行い、血管内皮細胞の検討をした。AMA 発現ベクター腫瘍内投与群で CD31 陽性細胞は認められなかった。
- 4) SCID マウス皮下ヒト膀胱癌移植モデルの腫瘍増殖に対する AMA 発現ベクターの大腿四頭筋肉内投与の検討をした。AMA 発現ベクターは 1 匹当たり 500  $\mu$ g を筋肉内投与した。これにより腫瘍はほぼ退縮した。
- 5) 同腫瘍組織における CD31 陽性細胞の検討をした。AMA 発現ベクター筋肉内投与群で CD31 陽性細胞は認められなかった。
- 6) SCID マウス皮下ヒト乳癌移植モデルの腫瘍増殖に対する AMA 発現ベクターの大腿四頭筋投与の検討をした。乳癌モデルは SCID マウスにヒト乳癌細胞 (MDA-MB-231) を皮下移植して作成し、AMA 発現ベクターは 1 匹当たり 25~500  $\mu$ g を筋肉内投与した。これらにより用量非依存性に腫瘍はほぼ退縮した。
- 7) 同腫瘍組織における CD31 陽性細胞の検討をした。AMA 発現ベクターの投与量に関わらず CD31 陽性細胞は認められなかった。

#### 【考案】

本研究において、AMA 発現ベクターを作製し、その投与によってヒト膀胱癌細胞のみならず乳癌細胞の *in vivo* 腫瘍増殖も抑制した。その機序としては血管内皮細胞の消失が認められたことより、血管新生障害を介して発揮されると考えられた。

この結果は、逆に AM がヒト膀胱癌細胞および乳癌細胞の *in vivo* 腫瘍増殖における重要な血管新生因子であることを示唆する所見である可能性が示唆された。また、AM は管腔形成などの高次構造を司る血管新生因子の 1 つである可能性も示唆された。

なお、AMA 発現ベクターの投与に際しては超音波遺伝子導入装置や超音波遺伝子導入用 microbubble を用いることにより有効投与量が減量可能である可能性が示唆された。

今後 *in vivo* での他の細胞株による検討を含めてさらなる検討が必要であるが、AM は固形癌の *in vivo* の腫瘍増殖にあたっては血管新生に必須の因子であり、その単独障害によって血管新生を抑制できる可能性が示唆された。

#### 【結語】

1. AM antagonist 発現ベクターを作製した。
2. AM antagonist 発現ベクターの筋肉内投与により腫瘍増殖が抑制された。
3. 血管新生障害を介して抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

## Adrenomedullin antagonist は血管新生抑制を介して SCID における癌細胞の *in vivo* 増殖を抑制する

膵癌は hypovascular であるがために常に低酸素・低栄養に曝されている。それにも関わらず旺盛な増殖力を示し、多臓器への浸潤・転移を示す。したがって、既知の血管新生因子と異なる新たな血管新生因子が産生される可能性がある。以上の仮説に基づいて、申請者らの研究グループではヒト膵癌細胞株を用いて低酸素条件下で DNA microarray 法を行い、血管拡張の他に血管新生にも関与する adrenomedullin (AM) の発現亢進を見出した。また、各種癌細胞株の低酸素分圧下での AM mRNA および蛋白の発現亢進を確認し、ヒト膵癌細胞株における AM antagonist ペプチドの *in vivo* 増殖抑制も見出した。今回申請者は AM antagonist 発現ベクターを作製し、その抗腫瘍効果を明らかにするために膵癌および乳癌細胞株の *in vivo* 増殖を検討した。次に各腫瘍組織における血管内皮細胞を抗 CD31 抗体を用いて検討した。AM antagonist 発現ベクターは AM 前駆体である Prepro-AM cDNA を template として作製した。次に、SCID マウス皮下ヒト癌細胞株移植モデルにおける AM antagonist 発現ベクターの抗腫瘍効果を検討した。ヒト膵癌細胞株モデルに対しては 1 匹当たり 500  $\mu$ g を腫瘍内および筋肉内投与としたところ何れも腫瘍は退縮した。病理組織学的に腫瘍内および筋肉内投与群共に CD31 陽性細胞は認められなかった。また、ヒト乳癌細胞株モデルに対しては 25~500  $\mu$ g を超音波遺伝子導入装置および超音波用 microbubble の併用により筋肉内投与を行ったところ用量非依存性に腫瘍は退縮した。病理組織学的に AM antagonist の投与量に関わらず CD31 陽性細胞は認められなかった。これらの結果より、AM antagonist 投与による腫瘍の退縮は血管新生阻害を介して発揮されると考えられた。そのため AM がヒト膵癌細胞および乳癌細胞の *in vivo* 腫瘍増殖における重要な血管新生因子であることを示唆する所見であると考えられた。したがって AM の単独阻害によって腫瘍増殖を抑制できる可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の守内教授より AM antagonist 投与時の循環動態の検討の有無、ヒトに臨床応用する際の用量設定や副作用の可能性、膵癌・乳癌以外の適応症、AM antagonist による治療法の特許の有無についての質問があった。これに対して申請者は、本研究では未検討であるものの、今後、非観血的血圧測定を用いた実験系を

検討予定であること、用量は超音波遺伝子導入装置などを併用することにより漸減可能であること、AM 発現が亢進している癌細胞は何れも適応となること、特許取得済みであることを回答した。次いで副査 近藤教授より AM antagonist 筋肉内投与の際の腫瘍への到達経路、AM antagonist 単独で血管新生を阻害した理由、AM あるいは AM antagonist が生体内に存在するのか否かについての質問があった。これに対して申請者は、血行性経路を推測していること、詳細な機序については不明であるが、追加実験では低酸素・低栄養下では血管内皮細胞はアポトーシスに陥るが、AM 添加により抗アポトーシス作用を示し、逆に AM antagonist 添加によりアポトーシスに陥ることを確認したこと、AM は生体内に存在するものの低濃度であり、生理活性を有しないこと、AM antagonist は生体内に存在しないことを回答した。さらに主査 浅香教授より AM の transgenic/knockout マウスの報告の有無、AM antagonist の血中濃度の測定の可能性について、ウイルスベクターを用いず naked DNA を用いた理由、今後の臨床応用への道筋につき質問があった。これに対し申請者は AM transgenic マウスでは血圧低下、knockout マウスでは胎児水腫や心大血管奇形を起こすこと、血中濃度は使用した発現ベクターでは未検討であるものの、新たに antagonist の C 末端側に直接 Tag を付加したベクターを作製し、血中 Tag 濃度の測定を可能としたこと、naked DNA は導入効率や発現持続期間より安全性を重んじて使用したこと、前臨床試験施行後に pilot study あるいは Phase I/II study によるヒトへの応用を考慮していることを回答した。

本研究はヒト癌細胞株に対する AM antagonist 発現ベクターを用いた遺伝子治療の効果を初めて明らかにしたことで高く評価され、この研究を足掛かりとして今後の癌治療への臨床応用が期待される。

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。