

## 148. 血管の恒常性制御に基づく、転移抑制法の開発

田中 愛

信州大学 医学部 循環病態学教室

Key words : アドレノメデュリン, RAMP, 癌, 転移

### 緒言

アドレノメデュリン (Adrenomedullin : AM) はヒト褐色細胞腫組織から発見された、生理活性ペプチドである。AM は当初、血管拡張作用、降圧作用を中心に注目されてきたが、その後のさまざまな研究により、細胞増殖、分化、遊走、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用など、多様な生理活性を有することが明らかとなった。血中 AM 濃度は、高血圧、心不全、腎不全などの病態において、その重症度に応じて上昇することが報告されており、各々の病態への関与が示されている。我々はこれまでの研究により、AM ノックアウトマウス (AM<sup>-/-</sup>) は、血管の発生、血管の発達が未熟であるとともに、血管壁の構造に異常を認め、胎生致死となることから、AM は成体においては降圧作用、臓器保護作用などを有する一方で、胎児期においては血管の発生に必須であることを明らかとした [1]。

AM は、分子進化的に、カルシトニン、CGRP などの一群の生理活性ペプチドと近縁の関係にある。これらのペプチドは、部分的に受容体システムを共有している。7 回膜貫通 G タンパク共役型受容体である calcitonin receptor-like receptor (CLR) は、受容体活性調節タンパク receptor activity-modifying protein (RAMP) 1、2、3 のいずれかと重合することにより、リガンドである AM やそのファミリー因子との親和性が制御されている。CLR と RAMP2 もしくは RAMP3 の複合体は、AM に対して高い親和性を発揮する。我々は、AM<sup>-/-</sup>マウスが致死となる発生段階において、RAMP サブアイソフォームの中でも特に RAMP2 の発現が高いことに着目し、血管における AM の機能は RAMP2 が規定しているのではないかと考えた。そこで次に RAMP2 ノックアウト (RAMP2<sup>-/-</sup>) マウスを作製した。RAMP2<sup>-/-</sup>マウスは、AM<sup>-/-</sup>マウス同様、胎生中期に致死となり、血管の発達不全とともに、著明な浮腫や出血が認められた [2]。この結果から、RAMP サブアイソフォームの間には機能的な相補性がなく、血管の正常な発生には AM-RAMP2 系が必須であることが明らかとなった。

一方で、ヒトの様々な癌でも、AM とその受容体の高発現を認めることが報告されている [3]。さらに、マウスの腫瘍移植モデルにおいて、AM とその受容体のポリクローナル抗体が、腫瘍血管の成長を阻害し、生存率を上昇させ、一部の腫瘍モデルでは寛解に至ることが報告されている [4]。本研究において我々は、癌と AM-RAMP2 系の関連に注目した。

### 方法

我々はこれまで、全身性の RAMP2 ノックアウト (RAMP2<sup>-/-</sup>) マウスや、血管内皮細胞特異的な RAMP2 ノックアウト (E-RAMP2<sup>-/-</sup>) マウスを作製し、検討を行ってきた。しかし、RAMP2<sup>-/-</sup>は胎生致死であり、E-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスも得られる個体が少ないため、成体期における AM-RAMP2 系の機能解析には限界があった。そこで本研究では、RAMP2 flox マウスと、VE カドヘリン-MerCreMer トランスジェニックマウスを交配することで、マウスが成体になった後、薬剤 (タモキシフェン) 誘導性により、血管内皮細胞の RAMP2 のみを特異的に欠損させることのできる drug inducible-E-RAMP2<sup>-/-</sup>マウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) を樹立した。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、タモキシフェン 5 日間の投与後、2 週間後に血管における RAMP2 発現が 20%以下に低下することが確認された。そこで DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスを用いて、腫瘍細胞移植を行い、AM-RAMP2 系による腫瘍血管新生作用について検討した。

さらに、腫瘍転移モデルを作製し、転移における AM-RAMP2 系の意義を検討した。

## 結 果

### 1. 腫瘍増殖、腫瘍血管新生評価モデル

腫瘍血管新生を評価するために、B16F10 メラノーマ細胞の皮下移植実験の検討を行った。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>ではコントロールマウスと比較して血管新生は減弱し、腫瘍重量は低下した。さらに腫瘍内血管新生の低下により、不安定化した腫瘍組織となり、マクロ像でも腫瘍が自壊する様子が観察された。そこで、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の血管新生評価を行うため、マウスの皮下にマトリゲルを移植すると、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では血管新生の先端部である Tip 細胞の形成が不良であり、Tip 細胞の誘導に関わる VEGF-A/VEGFR-2 や血管安定化に関わる Angiopoietin1/Tie2 の発現は有意に低下していた。

### 2. メラノーマの足底部移植による自然肺転移モデル

次に、別のメラノーマ細胞株を用いて、転移モデルの検討を行った。B16BL6 メラノーマ細胞は足底部に移植することで、肺への転移を引き起こす。足底部の腫瘍が増大してきたところで切除を行い、その後自然肺転移するまで経過観察を行った。その結果、意外なことに、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では肺への転移率が有意に亢進していた (図 1)。

DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、RAMP2 欠損誘導後、肺において血管内皮細胞の接着因子である VE-カドヘリン、細胞骨格形成に関わるアクチンの発現が低下していた。電子顕微鏡で観察すると、血管内皮細胞が基底膜から血管内腔へ突出、剥離するなどの血管構造異常が認められた。さらに時系列変化を検討したところ、早期の段階から、血管壁にマクロファージの集積を認め、それに伴い TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が亢進していた。炎症は RAMP2 欠損誘導後も持続し、その結果、腫瘍細胞を転移巣へと呼び寄せるとされる腫瘍細胞遊走因子 S100A8/A9 とその下流因子である SAA3 の発現亢進が確認された。

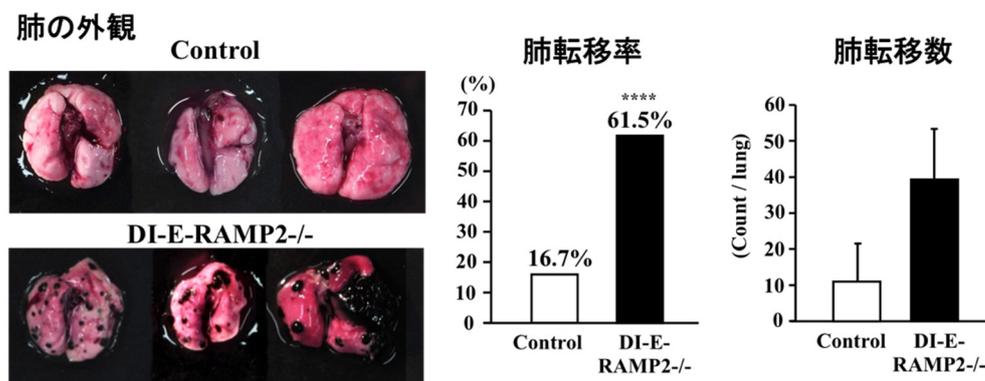


図 1. 自然肺転移モデルの検討

誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウト (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) では、コントロールマウスに比べて、肺への転移率が有意に上昇していた ( $\chi^2$  test, \*\*\*\* P<0.0001)。

### 3. 腫瘍微小環境における内皮間葉系転換

次に、原発巣の腫瘍血管の検討を行った。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、腫瘍内血管の CD31 (血管内皮細胞マーカー) 陽性細胞が減少し、対照的に  $\alpha$ SMA (間葉系細胞マーカー) 陽性細胞が増加していた (図 2 上)。このことから、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の腫瘍内血管では、内皮間葉系転換 (endothelial-mesenchymal transition : EndMT) が生じていると推測した。

これを検証するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対し TGF- $\beta$  を添加し、EndMT の誘導実験を行った。その結果、HUVEC に対し予め AM を投与しておくことで、EndMT 様変化が抑制され、内皮細胞の接着因子である VE-カドヘリンの発現と細胞膜直下のアクチン重合が亢進し、細胞間接着が強固になることが確認された。

次に、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肺血管内皮細胞の初代培養を行い、TGF-β添加による EndMT 誘導実験を行った。その結果、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の内皮細胞では、間葉系マーカーである FSP-1 陽性細胞が、野生型マウスと比較して有意に増加する一方、VE-カドヘリンの発現が低下していることが確認された (図 2 下)。

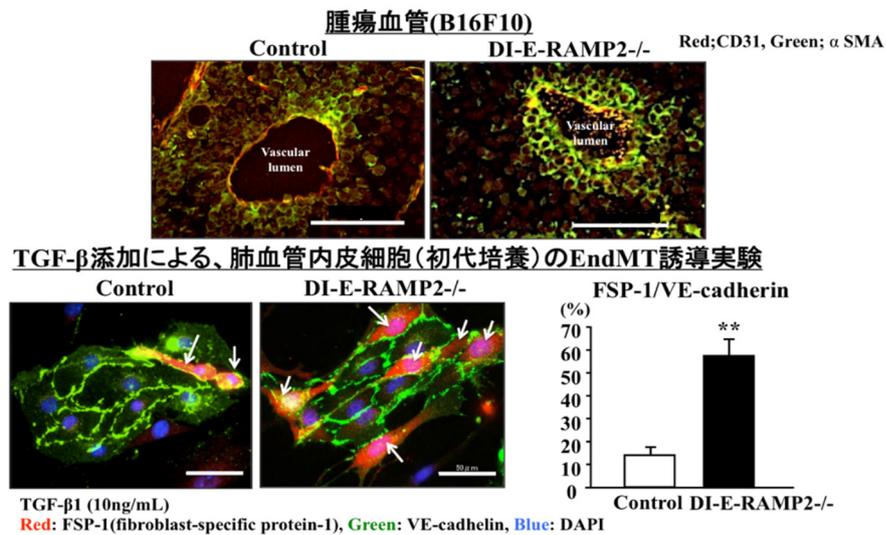


図 2. 腫瘍内血管における EndMT 所見、および肺血管内皮細胞の EndMT 誘導実験

- 上) 腫瘍内の血管を、CD31 (赤)、αSMA (緑) に対する抗体で免疫染色した。誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) では、CD31 陽性細胞が減少し、αSMA 陽性細胞が増加していた (Scale bar=100 μ m)。
- 下) DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肺血管内皮細胞の初代培養において、TGF-β添加による内皮間葉系転換 (EndMT) 誘導実験を行い、FSP-1 (赤)、VE-cadherin (緑) の抗体で免疫染色した。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、VE-cadherin 陽性細胞のうち、FSP-1 陽性細胞の割合が有意に増加していた (Scale bar=50 μ m, Student's *t*test, \*\*P<0.01)。

#### 4. AM-RAMP2 系賦活化による癌転移治療実験

次に、AM-RAMP2 系を活性化することで転移を抑制できるかどうかの検討を行った。蛍光タンパクである DsRed を導入した B16F10 メラノーマ細胞と、RAMP2 を過剰発現させた血管内皮細胞の重層培養を行い、腫瘍細胞の接着を評価した。その結果、コントロールと比べ、RAMP2 過剰発現内皮細胞では腫瘍細胞の接着が抑制され、炎症性接着因子である ICAM-1、VCAM-1 の発現も抑制されていることが確認された。

最後に血管内皮細胞特異的に RAMP2 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (E-RAMP2 Tg) を樹立した。B16BL6 メラノーマ細胞を移植し、自然肺転移を観察したところ、E-RAMP2 Tg では、野生型マウスと比較して、腫瘍の転移が抑制され、生存率の改善を認めた。

### 考 察

以上の結果から、血管内皮細胞の RAMP2 欠損により、1. 転移予定先臓器の血管における慢性炎症が、癌細胞の「転移前土壌」となり、癌の遠隔臓器への転移を促進させること、2. 原発巣の血管では、EndMT による血管構造の不安定化、透過性亢進が生じ、これにより腫瘍細胞の血管内浸潤が亢進すること、が明らかとなった。

AM-RAMP2 系は腫瘍血管新生に働きかける一方で、腫瘍の転移については抑制する作用があることが明らかとなった。したがって、原発巣摘出後のアジュバントセラピーの治療標的などへの応用が考えられる。我々は現在、RAMP サブアイソフォーム特異的に働く低分子化合物の作出を進めており、将来的に治療薬として応用していきたいと考えている。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、信州大学医学部医学科循環病態学教室の新藤隆行、桜井敬之、神吉昭子である。

## 文 献

- 1) Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, et al: Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 2001, 104:1964-1971. PMID: 11602502 DOI: 10.1161/hc4101.097111
- 2) Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, et al: The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2008, 118:29-39. PMID: 18097473 DOI: 10.1172/JCI33022
- 3) Nouguerede E, Berenguer C, Garcia S, Bennani B, Delfino C, Nanni I, Dahan L, Gasmi M, Seitz JF, Martin PM, Ouafik L: Expression of adrenomedullin in human colorectal tumors and its role in cell growth and invasion in vitro and in xenograft growth in vivo. *Cancer Med* 2013, 2:196-207. PMID: 23634287 DOI: 10.1002/cam4.51
- 4) Kaafarani I, Fernandez-Sauze S, Berenguer C, Chinot O, Delfino C, Dussert C, Metellus P, Boudouresque F, Mabrouk K, Grisoli F, et al: Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB J* 2009, 23:3424-3435. PMID: 19546305 DOI: 10.1096/fj.08-127852