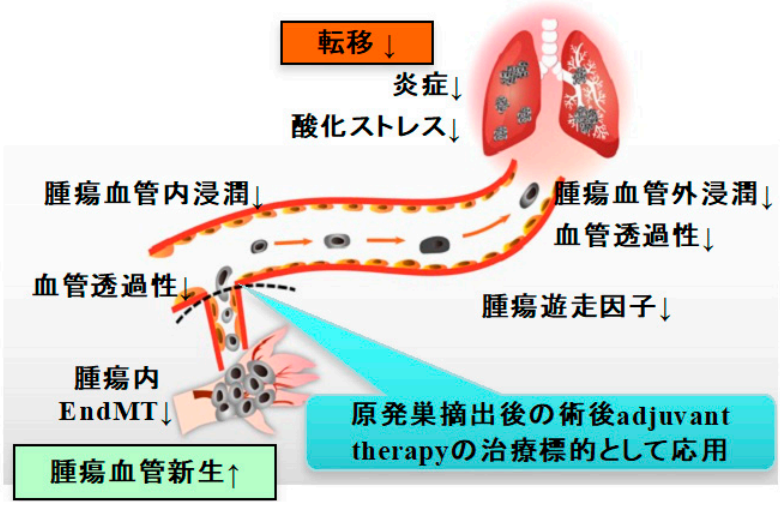
148　血管の恒常性制御に基づく、転移抑制法の開発	田中　愛

【目的】アドレノメデュリン（AM）は、血管をはじめ全身で広く産生され、多彩な作用を有する生理活性ペプチドである。我々は*AM*ノックアウトマウス（AM$^{-/-}$）と、AM 受容体活性調節タンパクである*RAMP2*のノックアウトマウス（RAMP2$^{-/-}$）が、共に血管の発生異常により胎生致死となることから、AM-RAMP2 系が、血管新生にも必須であることを報告してきた。一方、AM は、様々な癌においても産生される。本研究では、腫瘍の増殖と転移における AM-RAMP2 系の意義の検討を行った。

【方法】RAMP2$^{-/-}$は胎生致死のため、成体での解析が不可能である。そこで本研究では、誘導型の血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス（DI-E-RAMP2$^{-/-}$）を樹立し、成体になってから血管の*RAMP2*遺伝子欠損を誘導し、検討を行った。

【結果】DI-E-RAMP2$^{-/-}$を用いて、B16F10 メラノーマ細胞の皮下移植実験を行うと、コントロールマウスに比較して、腫瘍内血管新生は減弱し、腫瘍増殖は抑制された。その一方で、B16BL6 メラノーマ細胞を用いて、原発巣から遠隔臓器への転移モデルの検討を行ったところ、DI-E-RAMP2$^{-/-}$では肺への転移率が亢進するという、一見すると相反する結果となった。DI-E-RAMP2$^{-/-}$において腫瘍転移が亢進するメカニズムを解明するため、RAMP2 欠損誘導後に転移予定先臓器である肺に生じる変化を時系列的に観察した。その結果、腫瘍の転移前の早期の段階で、血管壁への炎症細胞の接着や浸潤、炎症性サイトカインの発現亢進が認められた。炎症は RAMP2 欠損誘導後も持続し、腫瘍の転移がはじまる直前の段階では、腫瘍細胞を転移巣へ誘導するとされる S100A8/A9 や SAA3 の発現亢進が確認された。次に、原発巣の腫瘍内血管について検討を進めた。DI-E-RAMP2$^{-/-}$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αSMA（間葉系細胞マーカー）陽性細胞が増加しており、内皮間葉系転換（EndMT）が生じていることが推測された。一方、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、腫瘍の転移が抑制され、生存率の改善を認めた。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、3. 逆に、血管内皮細胞の RAMP2 を過剰発現させることにより、転移が抑制されること、が明らかとなった。AM-RAMP2 系による血管恒常性維持機構に着目することで、癌転移を抑制する新しい治療法への展開が期待される。

AM-RAMP2 系の腫瘍増殖、転移における病態生理学的意義



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（$AM^{-/-}$）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用している。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、$AM^{-/-}$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（$RAMP2^{-/-}$）マウスを作製した。$RAMP2^{-/-}$マウスは、$AM^{-/-}$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（$RAMP2^{-/-}$）マウスや、血管内皮細胞特異的な *RAMP2* ノックアウト（E-$RAMP2^{-/-}$）マウスを作製し、検討を行ってきた。しかし、$RAMP2^{-/-}$は胎生致死であり、E-$RAMP2^{-/-}$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-$RAMP2^{-/-}$マウス（DI-E-$RAMP2^{-/-}$）を樹立した。DI-E-$RAMP2^{-/-}$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-$RAMP2^{-/-}$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$^{-/-}$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$^{-/-}$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$^{-/-}$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$^{-/-}$では肺への転移率が有意に亢進していた（図 1）。

DI-E-RAMP2$^{-/-}$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-α、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。

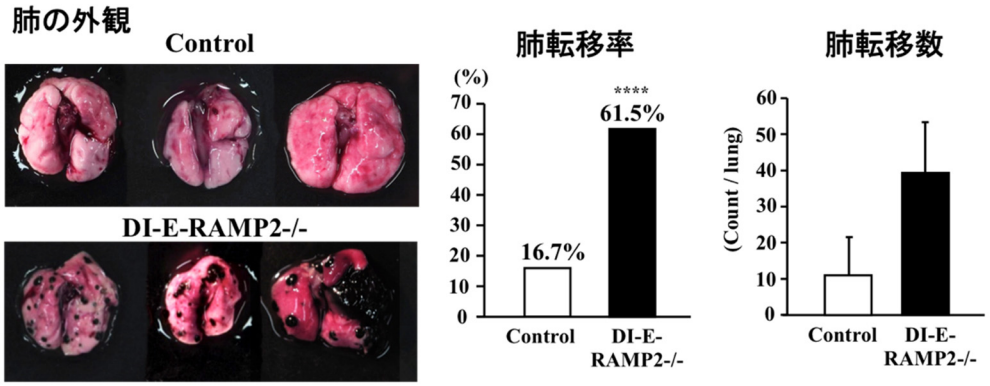


図 1. 自然肺転移モデルの検討
誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウト（DI-E-RAMP2$^{-/-}$）では、コントロールマウスに比べて、肺への転移率が有意に上昇していた（χ^2 test、**** $P<0.0001$）。

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$^{-/-}$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αSMA（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$^{-/-}$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-β 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$^{-/-}$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$^{-/-}$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）。

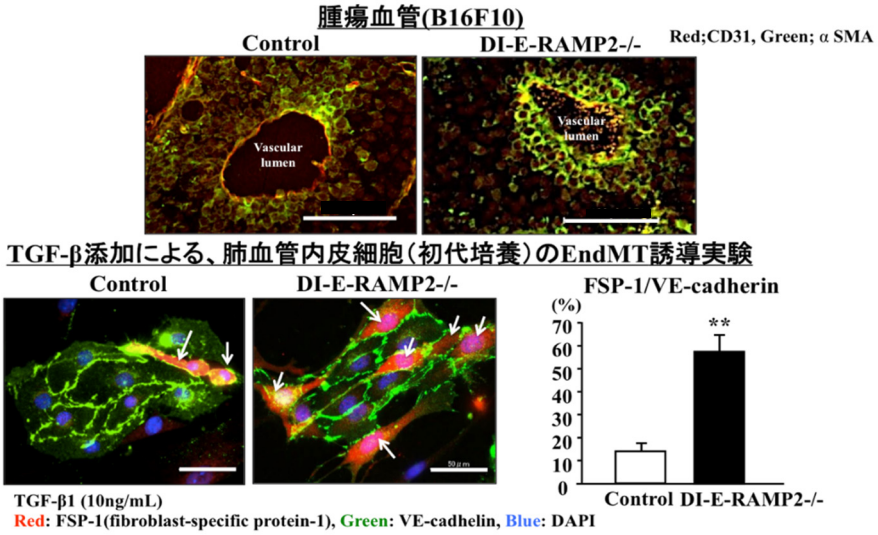


図 2. 腫瘍内血管における EndMT 所見、および肺血管内皮細胞の EndMT 誘導実験

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$^{-/-}$）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＝100μm）。

下）DI-E-RAMP2$^{-/-}$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$^{-/-}$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＝50μm、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