

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21569

研究課題名(和文)血管およびリンパ管の恒常性制御は、癌転移抑制法となりうるか？

研究課題名(英文) Can the control of vascular and lymphatic homeostasis be a method to inhibit cancer metastasis?

研究代表者

新藤 隆行 (Shindo, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90345215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアドレノメデュリン(AM)と、AMの受容体活性調節タンパクであるRAMP2による血管の恒常性維持機構に注目してきた。AM、RAMP2は、様々な癌においても発現を認める。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。

血管内皮細胞のRAMP2欠損誘導により、転移予定先臓器の血管における慢性炎症が、転移前土壌となり、癌転移を促進させること、さらに内皮間葉系転換(EndMT)による血管構造の不安定化、透過性亢進を生じ、癌転移を促進させ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、癌転移を抑制する治療法への展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、癌の転移を確実に抑制する方法は存在しない。我々は、従来の治療法のように癌細胞だけに注目するのではなく、原発巣と転移巣、そしてそれをつなぐ脈管系を一つの生体システムとして捉えるコンセプトが、癌の転移抑制法につながると考えた。中でも血管の恒常性の破綻や異常増殖は癌の病態に密接に関連していることから、我々は、血管の恒常性制御の観点から、癌転移を抑制する新しいアプローチを考えた。

本研究では、血管内皮細胞のRAMP2欠損誘導により、遠隔臓器への癌転移が亢進することが示された。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。

研究成果の概要(英文)： We have focused on the mechanism of vascular homeostasis by adrenomedullin (AM) and RAMP2, a protein that regulates AM receptor activity. AM and RAMP2 are also expressed in a variety of cancers. In this study, we examined the significance of the AM-RAMP2 system in tumor growth and metastasis.

We found that induction of RAMP2 deficiency in vascular endothelial cells promotes cancer metastasis by inducing chronic inflammation in the vasculature of target organs and destabilizing vascular structure through endothelial-mesenchymal transition (EndMT). Focusing on the mechanism of vascular homeostasis by the AM-RAMP2 system is expected to lead to the development of therapies that inhibit cancer metastasis.

研究分野：内科学一般

キーワード：癌 転移 血管 アドレノメデュリン RAMP2

1. 研究開始当初の背景

現在、癌の転移を確実に抑制する方法は存在しない。我々は、従来の治療法のように癌細胞だけに注目するのではなく、①癌微小環境、②癌の増殖や転移に関わる血管やリンパ管、さらには③転移先となる組織の環境を、一つの生体システムとして捉えるコンセプトが、革新的な癌の転移抑制法開発に繋がると考えた。中でも血管の恒常性の破綻や異常増殖は癌の病態に密接に関与していることから、我々は、血管の恒常性制御の観点から、癌転移を抑制する新しいアプローチを考えた。

2. 研究の目的

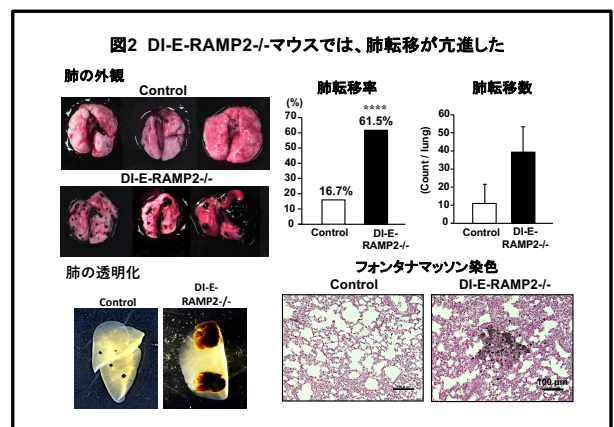
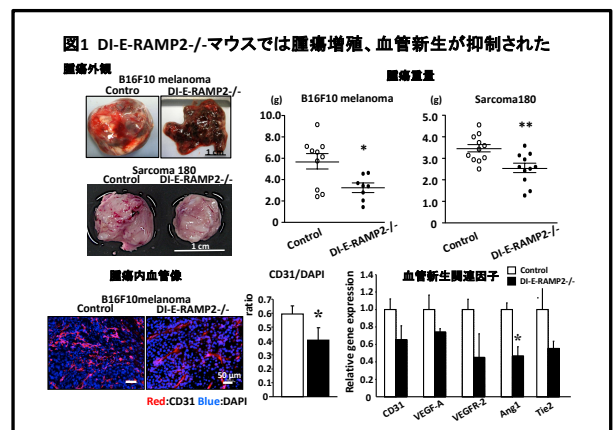
アドレノメデュリン(AM)は、血管をはじめ全身で広く産生され、多彩な生理活性を有する生理活性ペプチドである。我々は AM ノックアウトマウス(AM^{-/-})と、AM 受容体活性調節タンパクである RAMP2(receptor activity-modifying protein 2)のノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})が、共に血管の発生異常により胎生致死となることから、AM-RAMP2 系が、血管新生にも必須であることを報告してきた。一方、AM は、様々な癌においても産生される。本研究では、腫瘍の増殖と転移における AM-RAMP2 系の意義の検討を行った。

3. 研究の方法・研究成果

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、RAMP2^{fllox} マウスを VE カドヘリン MerCreMer マウスと交配することにより、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^{-/-})ラインを樹立し、成体になってから血管の RAMP2 遺伝子欠損を誘導することを試みた。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。

DI-E-RAMP2^{-/-}を用いて、B16F10 メラノーマ細胞や S180 肉腫細胞の皮下移植実験を行なうと、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(図1)。

一方、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(図2)。



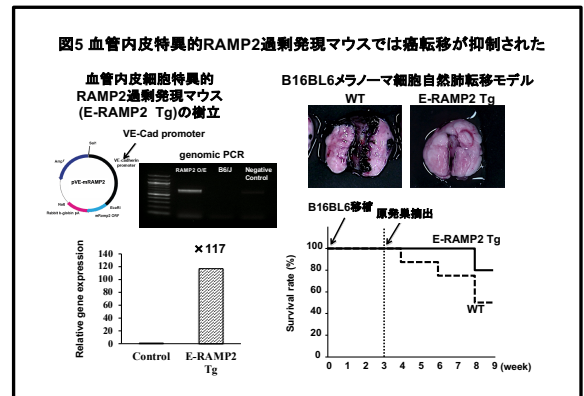
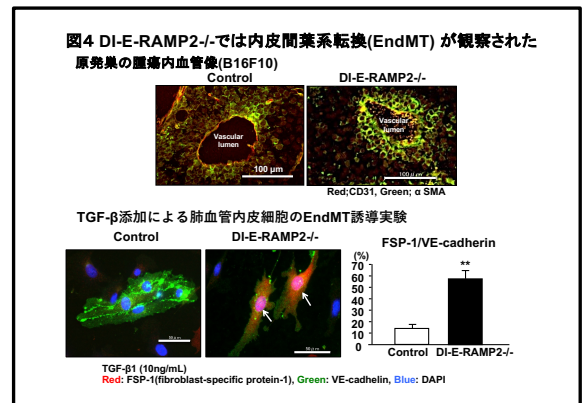
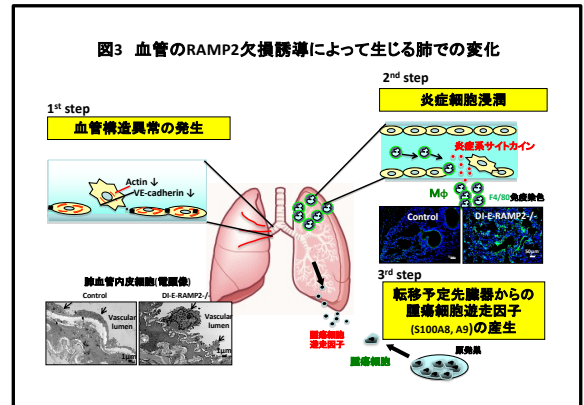
DI-E-RAMP2^{-/-}において腫瘍転移が亢進するメカニズムを解明するため、RAMP2 欠損誘導後に転移予定先臓器である肺に生じる変化を時系列的に観察した。その結果、腫瘍の転移前の早期の段階で、血管壁におけるマクロファージの接着や浸潤、TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現亢進が認められた。炎症は RAMP2 欠損誘導後も持続し、腫瘍の転移がはじまる直前の段階では、腫瘍細胞を転移巣へ誘導するとされる S100A8/A9 とその下流因子である SAA3 の発現亢進が確認された(図 3)。

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 α SMA(間葉系細胞マーカー)陽性細胞が増加していた。このことから、DI-E-RAMP2^{-/-}の腫瘍内血管では、内皮間葉系転換(EndMT)が生じていると推測した。これを検証するため、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 4)。

逆に AM-RAMP2 システムを活性化することで、これらの変化が抑制できるか検討した。RAMP2 を過剰発現させた内皮細胞(RAMP20/E)を樹立し、血管透過性アッセイを行うと RAMP20/E では、血管透過性が抑制されていた。さらに DsRed を導入した B16F10 メラノーマ細胞を用いて、内皮細胞との重層培養法にて接着の評価を行うと、RAMP20/E では腫瘍細胞の接着が抑制されていた。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 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(図 5)。

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。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakurai T, Shindo T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Production of single- and multiple-gene-modified mice via maternal SpCas9-based gene editing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protoc.	6. 最初と最後の頁 100509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wei Y, Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Kakihara S, Zhao Y, Aruga K, Sanjo H, Shindo T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF- β -Smads pathway and differentiation of myofibroblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology.	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endoctr/bqab090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Tanaka M, Wei Y, Kakihara S, Zhao Y, Aruga K, Kawagishi H, Nakada T, Yamada M, Shindo T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 systems regulate cardiac homeostasis during cardiovascular stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endoctr/bqab001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka M, Kakihara S, Hirabayashi K, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Cui N, Wei Y, Zhao Y, Aruga K, Yamauchi A, Murata M, Shindo T.	4. 巻 191
2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in age-related macular degeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 652-668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama T, Kuriyama N, Suzuki Y, Saito S, Tanaka R, Iwao M, Tanaka M, Maki T, Itoh H, Ihara M, Shindo T, Uehara R.	4. 巻 11
2. 論文標題 Mid-regional pro-adrenomedullin is a novel biomarker for arterial stiffness as the criterion for vascular failure in a cross-sectional study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96984-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 新藤隆行	4. 巻 44
2. 論文標題 アドレノメデュリンの機能の多様性を制御する受容体活性調節タンパクRAMPサブアイソフォームとその機能分化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 血管	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dai K, Tanaka M, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakiyama S, Matsui S, Shindo T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene.	6. 最初と最後の頁 1914-1930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-1112-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 新藤隆行
2. 発表標題 アドレノメデュリンとその受容体活性調節システムによる生体内恒常性制御
3. 学会等名 第50回日本心臓血管作動物質学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中愛、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、崔南奇、田中正明、Wei Yangxuan、柿原伸次、Zhao Yunlu、笠原智貴、有賀公亮、新藤隆行
2. 発表標題 AM-RAMP2系の血管恒常性制御による血行性、リンパ行性転移抑制機構の解明
3. 学会等名 第50回日本心臓血管作動物質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中愛、桜井敬之、神吉昭子、市川優佳、河手久香、柿原伸次、Zhao Yunlu、松田順繁、有賀公亮、新藤隆行
2. 発表標題 AM-RAMP2系による高内皮細静脈の機能制御とリンパ行性転移抑制作用
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Hisaka K, Kakihara S, Zhao Y, Matsuda Y, Aruga K, Kasahara T, Shindo T
2. 発表標題 Homeostatic Regulation of High Endothelial Venules and Suppression of Lymphatic Metastasis by Adrenomedullin-RAMP2 System
3. 学会等名 第86回日本循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakihara S, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular endothelial homeostasis, which suppresses hematogenous and lymphogenous metastasis.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Wei Y, Tanaka M, Kakiyoshi S, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 systems regulate cardiac homeostasis during cardiovascular stress.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka M, Kakiyoshi S, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Cui N, Wei Y, Zhao Y, Kasahara T, Aruga K, Shindo T.
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates age-related macular degeneration by suppressing choroidal neovascularization and subretinal fibrosis.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部 循環病態学教室 http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神吉 昭子 (Kamiyoshi Akiko) (10397309)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	桜井 敬之 (Sakurai Takayuki) (80317825)	信州大学・学術研究院医学系・准教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関