

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06841

研究課題名(和文)血管の恒常性制御による、癌の転移抑制法の開発

研究課題名(英文)Suppression of tumor metastasis based on the vascular homeostasis regulation

研究代表者

田中 愛 (Tanaka, Megumu)

信州大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：90786401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管作動性物質、アドレノメデュリン(AM)と、その受容体活性調節タンパクRAMP2は、癌転移抑制の標的として期待される。本研究では、誘導型血管内皮特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(血管RAMP2<sup>-/-</sup>)、誘導型リンパ管特異的RAMP2ノックアウトマウス(リンパ管RAMP2<sup>-/-</sup>)を樹立し、癌転移におけるAM-RAMP2系の意義を検討した。血管RAMP2<sup>-/-</sup>では、原発巣は縮小するものの、血管恒常性が破綻した結果、肺転移が亢進する結果が得られた。一方、リンパ管RAMP2<sup>-/-</sup>では原発巣の重量が増大し、血管新生が亢進した。現在、足底部への癌移植によるリンパ節転移について検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin, a vasoactive peptide, and its receptor-modulating protein RAMP2 are expected to be therapeutic target for suppressing tumor metastasis. We established vascular endothelial cell-specific RAMP2 knockout mice (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) and lymphatic endothelial cell-specific RAMP2 knockout mice (DI-LE-RAMP2<sup>-/-</sup>), and evaluated the role of AM-RAMP2 system in tumor metastasis.

In DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>, primary tumor growth was suppressed, but lung metastasis was accelerated due to the disruption of vascular homeostasis. On the other hand, in DI-LE-RAMP2<sup>-/-</sup>, primary tumor growth was enhanced with accelerated tumor angiogenesis. We are now analyzing lymph node metastasis by tumor transplantation to the footpad.

研究分野：血管

キーワード：アドレノメデュリン 腫瘍血管新生 血管恒常性 転移前土壌 リンパ節転移

## 1. 研究開始当初の背景

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-/-)が血管の発達異常により胎生致死となることから、AM が血管の発生そのものに必須な物質であることを明らかとした(Circulation 2001)。我々は、AM-/-が致死となる胎生中期の血管において、AM の受容体活性調節タンパク RAMP の中でも、特に RAMP2 の発現が亢進していることに着目し、RAMP2 単独のノックアウトマウス(RAMP2-/-)を樹立した。その結果、RAMP2-/-は、AM-/-と同様の表現型を示し、胎生致死となった(J Clin Invest. 2009)。さらに、血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(E-RAMP2-/-)も著明な浮腫を来とし、周産期にはほとんどの個体が死亡することが確認された(Circulation 2013)。以上の結果から、RAMP2 は、AM の血管機能の規定因子であることが明らかとなった。

最近我々は、VE-カドヘリン MerCreMer トランスジェニックマウスを、RAMP2 遺伝子の flox マウスと交配する事で、薬剤誘導性の血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2-/-)を樹立した。DI-E-RAMP2-/-では、実験に必要な時期に、オン・デマンドに、血管内皮細胞のみ特異的に RAMP2 遺伝子を欠損させることが可能である。

血管の恒常性の破綻や血管の異常増殖は癌の病態と密接に関連している。そこで我々は、DI-E-RAMP2-/-マウスを用いて、成体において血管の RAMP2 遺伝子欠損を誘導後に、メラノーマ細胞(B16F10)の皮下移植実験を行った。その結果 DI-E-RAMP2-/-では、メラノーマ細胞の肺への転移が亢進してしまう結果を得た。

癌の生命予後改善のためには、癌細胞そのものや、原発巣の治療の観点だけではなく、癌の増殖や転移に関わる血管、さらには転移先となる組織の環境 = 癌転移前土壌にも着目することが、新しい治療法の開発につながると考えられる。これまで主として循環調節ホルモンとして捉えられてきた AM とその受容体制御タンパクである RAMP2 が血管の恒常性維持に働いている一方で、AM-RAMP2 システムの破綻が癌の転移促進の原因となる可能性がある。RAMP2 は低分子タンパクであり、我々はその構造解析も終了しているため、新しい創薬ターゲットとしても、将来的に有望である。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌の増殖・浸潤、転移における AM-RAMP2 システムの病態生理学的意義を解明し、その知見を、癌転移を抑制する新たな創薬に展開することを目的とした。本研究では、誘導型 RAMP2 ノックアウトマウスを応用した。このマウスを用いれば、成体において遺伝子欠損誘導後より、原発巣、血管、転移先臓器に起こる変化を経時的に観察し、一連のプロセスの中で癌細胞の増殖、浸潤、転移促進に関わる因子を明らかにすることができる。特に、転移前土壌となりうる血管の構造変化、血管の炎症、癌転移を促進させる腫瘍遊走因子などを検討することで、癌転移抑制のための新しい治療戦略の足掛かりとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、血管あるいはリンパ管の RAMP2 を、成体においてオン・デマンドに欠損誘導することが可能な新規の遺伝子改変マウス、血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2-/-)およびリンパ管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(DI-LE-RAMP2-/-)を用いて、癌細胞の移植実験を行い、癌の増殖、浸潤、血管・リンパ管新生、転移の各局面における AM-RAMP2 システムの病態生理学的意義を検討した。次に、RAMP2 遺伝子欠損誘導後より、原発巣、血管やリンパ管、転移先臓器に生じる変化を時系列追跡し、一連のプロセスの中で癌の増殖、浸潤、転移促進に関わる因子を検討した。

## 4. 研究成果

これまでの検討から、DI-E-RAMP2-/-では、原発巣の血管新生が减弱し、腫瘍重量の増大が抑制される一方で、腫瘍を足底部に移植し、肺への転移実験を行うと、コントロールと比べ、転移が亢進する結果が得られていた。RAMP2 欠損後、転移先となる肺では、内皮細胞の形態異常を認め、S100A8/A9 などの腫瘍細胞遊走因子の発現が亢進し、転移前土壌が形成されることが明らかとなった。

そこで本研究では、AM-RAMP2 系を活性化することで、逆に転移を抑制できるのか検討を行なった。RAMP2 過剰発現内皮細胞では、癌細胞の接着が抑制された。さらに血管内皮細胞特異的 RAMP2 過剰発現マウスでは、癌転移が抑制され、生存率の改善が認められた。

AM-RAMP2 系の転移抑制メカニズムを解明するため、移植した腫瘍内の血管をインドシアニングリーン(ICG)で描出してみると、AM 投与群では、腫瘍内血管が太く、安定化していた。これらのことから、AM-RAMP2 系は腫瘍血管の走行を正常にすることが明らかとなった。また、血管の RAMP2 欠損誘導後、DI-E-RAMP2-/-では著明な体重増加を認めるが、これは血管透過性が亢進した結果と考えられた。そこで、AM の細胞内シグナル cAMP に着目し、その下流シグナルの検討を行うと、AM は Epac-Rap1 シグナルを介して血管内皮細胞の VE-カドヘリン接着を増強していることが示された。血管の AM-RAMP2 系は、細胞間接着を強固にし、癌転移を抑制することが明らかとなった。

一方、癌の転移においては、血行性転移に加え、リンパ行性転移が大きな問題である。そこで、リンパ管における RAMP2 の病態生理学的意義を明らかにするため、リンパ管特異的に発現している Prox-1 遺伝子プロモーターを利用した Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスと RAMP2<sup>flox</sup> マウスを交配し、薬剤誘導型のリンパ管特異的な RAMP2 ノックアウトマウス (DI-LE-RAMP2-/-)を作成し、検討を進めた。DI-LE-RAMP2-/-では、コントロールと比べ、皮下移植モデルにおいて、腫瘍重量が増大する結果となった。腫瘍内の血管評価を行うと、DI-E-RAMP2-/-とは対照的に、血管新生が亢進する所見が認められた。次に、B16F10 メラノーマを足底部に移植し、膝窩リンパ節への転移の検討を行ったところ、コントロールと比較し、DI-LE-RAMP2-/-でリンパ節への転移が抑制されていた。血管特異的 RAMP2-/-とリンパ管特異的 RAMP2-/-では、相反する結果が示唆されたが、メラノーマ細胞のリンパ節転移率が低いため、今後、高率に転移する腫瘍細胞株を用いて、詳細な検討を進める予定である。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Zhai L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Xian X, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Tanimura K, Liu T, Wei Y, Tanaka M, Tomiyama H, Yamauchi A, Igarashi K, Shindo T

Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses ischemic brain injuries and progression of cognitive decline

J Hypertens. 36(4):876-891. 2018

査読有

Xian X, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Tanaka M, Koyama T, Kawate H, Yang L, Liu T, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Igarashi K, Yamauchi A, Shindo T

Vasoprotective activities of the adrenomodullin-RAMP2 system in endothelial cells

Endocrinology. 158(5):1359-1372. 2017

査読有

Liu T, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yang L, Tanaka M, Xian X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Igarashi K, Yamauchi A, Shindo T

Endogenous calcitonin gene-related peptide regulates lipid metabolism and energy homeostasis in male mice

Endocrinology. 158(5):1194-1206. 2017

査読有

Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Hirabayashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Liu T, Xian X, Zhai L, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Yamauchi A, Murata T, Shindo T

Adrenomedullin suppresses vascular endothelial growth factor-induced vascular hyperpermeability and inflammation in retinopathy

Am J Phthol. 187(5):999-1015. 2017

査読有

Tanaka M, Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Liu T, Xian

X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Owa S, Yamauchi A, Igarashi K, Taniguchi S, Shindo T.

The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumour metastasis

Cardiovasc Res. 111(4):398-409. 2016

査読有

〔学会発表〕(計 5件)

2017年12月10日 第21回日本心血管内分泌代謝学会 大阪

アドレノメデュリン-RAMP2系による血管内皮保護機構の解明

田中愛、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、戴昆、崔南奇、魏陽璇、山内啓弘、新藤隆行

2017年12月4-5日  
ERATO/AMED-CREST/PRESTO Joint International Symposium : Organismal and Systems Biology of Inter-Organ Communication - Indra's Net of the Body - 京都

Adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular homeostasis and suppresses tumor metastasis

Megumu Tanaka, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Yuka Ichikawa-Shindo, Hisaka Kawate, Liuyu Zhai, Kazutaka Hirabayashi, Kun Dai, Nanqi Cui, Yangxuan Wei, Masaaki Tanaka, Teng Liu, Keiya Tanimura, Haruka Tomiyama, Shuhei Matsui, Akihiro Yamauchi, Takayuki Shindo

2017年2月10-11日 第46回日本心脈管作動物質学会 沖縄 YIA 最優秀賞

アドレノメデュリン-RAMP2系は、EndMTと転移前土壌形成を抑制し、癌転移を抑制する

田中愛、小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、劉甜、羨鮮、今井章、翟留玉、平林一貴、戴昆、谷村圭哉、劉騰、崔南奇、魏陽璇、山内啓弘、新藤隆行

2016年12月16-17日 Cardiovascular and Metabolic Week 2016/第33回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016) 東京 YIA 受賞

Adrenomedullin-RAMP2 system inhibits the endothelial to mesenchymal transition (EndMT) and formation of

pre-metastatic niche by maintaining vascular integrity

Megumu Tanaka, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Takayuki Shindo

2016年12月8-10日 The 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization/The 14<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 長崎 YIA 受賞

Adrenomedullin-RAMP2 system inhibits the endothelial-mesenchymal transition and formation of pre-metastatic niche by maintaining vascular integrity

Megumu Tanaka, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Yuka Ichikawa-Shindo, Hisaka Kawate, Akira Imai, Liuyu Zhai, Kazutaka Hirabayashi, Kun Dai, Nanqi Cui, Teng Liu, Keiya Tanimura, Yangxuan Wei, Akihiro Yamauchi, Takayuki Shindo

〔図書〕(計 1件)

田中愛、小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、劉甜、羨鮮、今井章、翟留玉、平林一貴、戴昆、谷村圭哉、劉騰、崔南奇、魏陽璇、山内啓弘、新藤隆行

アドレノメデュリン-RAMP2系は、転移前土壌形成を抑制し、癌転移を抑制する  
血管 40(3):121-127. 2017

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
信州大学大学院医学系研究科 循環病態学  
教室ホームページ  
<http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 愛 (Tanaka, Megumu)  
信州大学・医学系研究科・研究員  
研究者番号：90786401

研究者番号：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )