

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08588

研究課題名(和文)血管恒常性制御機構“AM-RAMP2システム”の、病的血管治療への応用

研究課題名(英文) Regulation of vascular homeostasis by AM-RAMP2 system and its therapeutic application for vascular abnormalities.

研究代表者

新藤 優佳 (Shindo, Yuka)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：50507506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、血管作動性ペプチド、アドレノメデュリン(AM)と、AMの受容体活性調節タンパクRAMP2が、血管新生作用や血管恒常性制御作用を有することを報告してきた。一方、AMとRAMP2は様々な癌組織でも発現している。本研究では、薬剤誘導性血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2-/-)を用い、癌の血管新生と転移におけるAM-RAMP2システムの意義を検討した。その結果、DI-E-RAMP2-/-では、移植した腫瘍の原発巣における血管新生が抑制される一方で、自然肺転移が著明に亢進していた。AM-RAMP2系は、癌転移抑制のための新しい治療標的として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病的血管新生は、癌をはじめ、様々な疾患の発症や病態と深く関わっている。今回我々は、アドレノメデュリン(AM)-RAMP2システムが、血管の恒常性維持に関わっている一方で、その破綻によって血管の恒常性が障害され、癌細胞が転移しやすい環境=転移前土壌が形成されることを見出した。AM-RAMP2系による血管恒常性維持作用に介入し、これを制御することは、従来の治療法とは異なり、癌腫を問わない治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We have reported that vasoactive peptide adrenomedullin (AM) and its receptor activity-modifying protein RAMP2 possess angiogenic function and regulate vascular homeostasis. On the other hand, AM and RAMP2 are highly expressed in various cancers. In this study, using drug-inducible endothelial cell-specific RAMP2 knockout mice (DI-E-RAMP2-/-), we analyzed the significance of AM-RAMP2 system in cancer angiogenesis and metastasis. In tumor implantation model, we found that angiogenesis of primary lesion was suppressed, whereas spontaneous lung metastasis was increased. Vascular integrity regulated by the AM-RAMP2 system could thus be a hopeful therapeutic target for suppressing tumor metastasis.

研究分野：循環病態学

キーワード：血管 血管新生 転移

1. 研究開始当初の背景

生理活性因子は全身の様々な部位で産生され、生体内恒常性維持のために、重要な役割を果たしている。アドレノメデュリン(AM)は血管拡張作用を有する生理活性ペプチドとして発見された。その後の研究により、AMは全身の様々な細胞、組織で産生され、抗炎症作用、抗酸化作用など様々な生理機能を持つことも明らかとなった。我々はこれまで、AMホモノックアウトマウス(AM^{-/-})が、血管の発達が未熟で、血管壁の構造に異常を認め、胎生致死となることを報告してきた。AMの受容体は、Gタンパク共役型受容体であるCLRであるが、CLRにはRAMPという受容体活性調節タンパクが結合することで受容体の特性が規定される。RAMPには3つのサブアイソフォームが存在するが、我々はRAMP2ホモノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})のみがAM^{-/-}と同様に血管の異常を生じ、全身性の著明な浮腫により、胎生致死となることを明らかとした。これらの所見から、RAMP2がAMの血管における機能規定因子であり、AM-RAMP2システムが血管の発生に必須であることが明らかとなった。

AMおよびRAMP2は様々な癌において高発現を認めることが報告されており、癌の病態には病的血管新生が関係しているため、AM-RAMP2システムは癌の病態とも密接に関係していることが予想される。一方で、AM^{-/-}、RAMP2^{-/-}は共に胎生致死となってしまうために、成体における解析は困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、アドレノメデュリン(AM)と、RAMP2から構成される、血管の恒常性制御システム「AM-RAMP2システム」に着目し、これに人為的に介入することで、病的血管を制御する新たな治療法に応用展開することを目的とした。成体においてRAMP2遺伝子を欠損誘導することができる、薬剤誘導性血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2^{-/-})を用いることで、癌の血管新生と転移におけるAM-RAMP2システムの意義について検討を行うこととした。

3. 研究の方法

RAMP2^{flox}マウスをVEカドヘリンMerCreMerマウスと交配することにより、薬剤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、成体マウス血管でのRAMP2遺伝子欠損を誘導した。DI-E-RAMP2^{-/-}では、タモキシフェン5日間の投与の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メラノーマ細胞の皮下移植実験を行ない、腫瘍内血管新生を検討した。次に、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。さらに、DI-E-RAMP2^{-/-}の肺血管内皮細胞の初代培養細胞を用いて、内皮間葉系転換(EndMT)の誘導実験を行った。

4. 研究成果

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)。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(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。

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、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対しTGF- β を添加し、EndMTの誘導実験を行なった。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誘導実験を行なった。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。

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。

図1

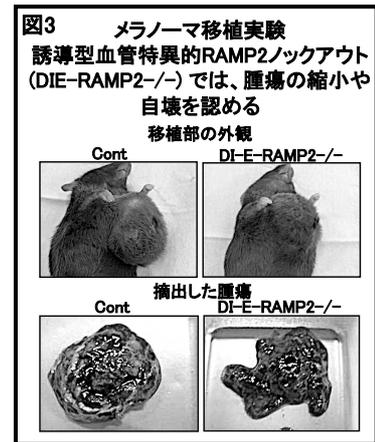
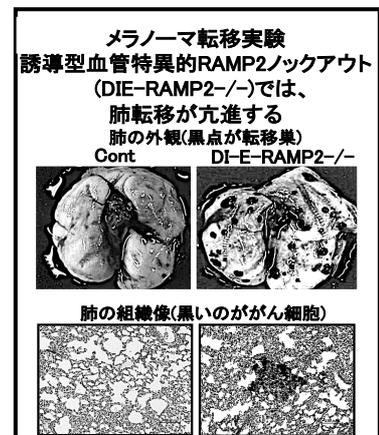


図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 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.	4. 巻 36
2. 論文標題 Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses ischemic brain injuries and progression of cognitive decline.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hypertens.	6. 最初と最後の頁 876-891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000001649.	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 Shindo T, Tanaka M, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yamauchi A, Sakurai T.	4. 巻 111
2. 論文標題 Regulation of cardiovascular development and homeostasis by the adrenomedullin-RAMP system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides.	6. 最初と最後の頁 55-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.04.004.	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 Hirabayashi K, Tanaka M, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Dai K, Cui N, Wei Y, Nakamura K, Iida S, Matsui S, Yamauchi A, Murata T, Shindo T.	4. 巻 189
2. 論文標題 Development of a novel model of central retinal vascular occlusion and the therapeutic potential of the adrenomedullin-RAMP2 system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 449-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.10.006.	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 Liu T, Kamiyoshi A, Tanaka M, Iida S, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Tanaka M, Wei Y, Nakamura K, Matsui S, Yamauchi A, Shindo T.	4. 巻 110
2. 論文標題 RAMP3 deficiency enhances postmenopausal obesity and metabolic disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides.	6. 最初と最後の頁 10-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.10.006.	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 Liu T, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Endogenous calcitonin gene-related peptide regulates lipid metabolism and energy homeostasis in male mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1194-1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2016-1510	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 Xian X, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Vasoprotective activities of the adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1359 - 1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2016-1531.	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 Imai A, Toriyama Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T, et al.	4. 巻 187
2. 論文標題 Adrenomedullin suppresses vascular endothelial growth factor-induced vascular hyperpermeability and Inflammation in retinopathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Phthol.	6. 最初と最後の頁 999-1015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.01.014.	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 田中愛、小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行 他	4. 巻 40
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 血管	6. 最初と最後の頁 101-106
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中愛、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行 他
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第21回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 戴昆、田中愛、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行 他
2. 発表標題 臓器間転移におけるアドレノメデュリン-RAMP系の病態生理学的意義
3. 学会等名 第21回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 戴昆、田中愛、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行 他
2. 発表標題 臓器間転移におけるアドレノメデュリン-RAMP系の病態生理学的意義
3. 学会等名 第47回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/ 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
--	---------------------------	-----------------------	----