

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16299

研究課題名(和文) アドレノメデュリン-RAMP2、3系による癌転移制御機構の解明と応用展開

研究課題名(英文) Elucidation of the Regulatory Mechanism of Cancer Metastasis by the Adrenomedullin-RAMP2, 3 System and Development of Its Application

研究代表者

田中 愛 (tanaka, megumu)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：90786401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、血管作動性ペプチドである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のノックアウトマウスが血管異常で胎生致死となることを報告してきた。本研究では、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^{-/-})を用いた。Lewis肺癌細胞を用いた癌転移の検討において、DI-E-RAMP2^{-/-}ではリンパ節転移の亢進が見られた。DI-E-RAMP2^{-/-}では、リンパ節内の高内皮細静脈の構造異常、リンパ節内のT細胞の減少、樹状細胞の分布異常が認められた。以上の結果から、血管恒常性の破綻は、癌細胞のリンパ行性転移亢進につながる事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アドレノメデュリン(AM)は血管拡張ペプチドとして同定されたが、それ以外にも多彩な作用を有することが知られている。様々な病態において、血中AM濃度が上昇することから、AMの臨床応用が期待されている。しかし、AMの血中半減期は短く、慢性疾患における臨床応用には制限がある。我々はAMの受容体活性調節タンパクであるRAMPの研究を行っている。今までの検討から、AM-RAMP2系は血管発生だけでなく、血管恒常性維持に必須であり、それらの破綻が癌転移を促進させる結果を見出した。現在、RAMPに結合する低分子化合物のスクリーニングを進めており、RAMP2の選択的活性化による癌転移抑制薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) was identified as a vasodilating peptide. We have reported that knockout mice of AM and its receptor-modulating protein RAMP2 are embryonic lethal with vascular abnormalities. Therefore, we generated drug-inducible knockout mice of RAMP2 to clarify the pathophysiological roles of vascular endothelial AM-RAMP2 system in adult. In this study, transplantation of Lewis lung carcinoma cells into hindlimb footpads resulted in that spontaneous metastasis to the lymph node being enhanced in DI-E-RAMP2^{-/-}. High endothelial venules (HEV) are blood vessels especially adapted for lymphocyte trafficking found in lymph nodes. DI-E-RAMP2^{-/-} showed deformity of HEV. Furthermore, DI-E-RAMP2^{-/-} showed abnormal distribution of T cells and dendritic cells within the lymph nodes, which may suppress immune system and allow the metastasis.

These findings indicate that disruption of vascular endothelial homeostasis is a promoting factor of tumor metastasis.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：アドレノメデュリン RAMP2 リンパ節転移 高内皮細静脈 血管恒常性

1. 研究開始当初の背景

癌は我が国の死因の 1/3 を占め、30 年以上も日本人の死因一位を独走している。分子標的薬や癌免疫療法の登場により、癌治療は大きな進歩を遂げたが、未だ癌の転移を予防する確実な方法は存在しない。私は、癌転移抑制のためには、癌細胞だけではなく、血管やリンパ管、癌を取り巻く細胞群(癌微小環境)、転移予定先の組織における環境(転移前土壌)などを一つの生体システムとして捉え、そこに関わる因子を明らかにする必要があると考えた。

我々の研究室では、これまで主として循環制御ペプチドと捉えられてきたアドレノメデュリン(AM)が、血管、リンパ管の恒常性維持作用を有することを報告してきた。AM および AM の受容体活性調節タンパクの一つである RAMP2 のノックアウトマウスは、血管の発達異常により、胎生中期に致死となる。私はこれまで、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-/-)を用いた検討により、AM-RAMP2 系が血管恒常性維持作用を有する反面、AM-RAMP2 系の破綻が癌の転移促進要因となる可能性を報告してきた。

2. 研究の目的

AM の生理機能は、RAMP2 に加え、AM のもう一つの受容体活性調節タンパクである RAMP3 によっても制御されている。これまでの私の検討で、血管内皮細胞の AM-RAMP2 系は、メラノーマ細胞の血行性肺転移に抑制的に働くことが明らかとなった。一方、AM-RAMP3 系の癌転移における意義は不明である。また両者のリンパ節転移における意義についても不明である。本研究では、癌の増殖・転移における AM-RAMP2、3 系の病態生理学的意義と、その機能分化や相互作用を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 癌の転移における血管内皮細胞由来の細胞外小胞(エクソソーム)の意義の解明

DI-E-RAMP2-/-の血管内皮細胞を電顕で観察すると、無数の微小突起や細胞外小胞(エクソソーム)が確認される。本研究では、セルソーターによって DI-E-RAMP2-/-の血管内皮細胞が分泌するエクソソームを回収し、その機能について検討した。

(2) 癌の転移における癌関連線維芽細胞(CAF)の意義の解明

DI-E-RAMP2-/-および RAMP3 ノックアウトマウス(RAMP3-/-)において、PAN02 膵癌細胞を脾臓に移植し、肝臓への転移を検討した。転移巣から CAF の単離培養を行い、増殖や遊走性、細胞骨格、増殖因子分泌などを検討した。

(3) リンパ節転移における AM-RAMP 系の意義の解明

DI-E-RAMP2-/-および RAMP3-/-において、ルイス肺癌(LLC)細胞を足底部に移植し、膝窩リンパ節への転移を検討した。

4. 研究成果

(1) DI-E-RAMP2-/-において RAMP2 欠損誘導後の血管内皮細胞を電顕で観察すると、無数の微小突起やエクソソームが確認された。そこで、炎症誘発性サイトカインである TNF-

を用いて、DI-E-RAMP2-/-由来の初代培養血管内皮細胞の刺激実験を行った。フローサイトメーターで解析を行うと、DI-E-RAMP2-/-内皮細胞では Control と比べて、有意にエクソソーム分泌量が増加していた。癌細胞は、他の細胞が分泌するエクソソームを、自身の増殖や転移に巧みに利用していることが示唆されている。そこで次に、培養内皮細胞からエクソソームを回収し、ルイス肺癌 (LLC) 細胞の刺激実験を行った。その結果、DI-E-RAMP2-/-内皮細胞由来エクソソームによって刺激した LLC 細胞にのみ形態変化が生じ、通常よりも細長い、悪性化した形態を取った。さらに、LLC 細胞のスクラッチアッセイを行い、DI-E-RAMP2-/-由来のエクソソームを培養液に加えると、LLC 細胞の遊走能を亢進させ、より悪性度の高い癌細胞へと変化させることが明らかとなった。

(2) DI-E-RAMP2-/-では、原発巣サイズが縮小するのに対し、肝臓への転移は亢進しており、これまでの私の実験結果の再現性が確認された。一方で、RAMP3-/-では、DI-E-RAMP2-/-とは逆に、肝臓への転移が抑制されていた。RAMP3-/-では、癌周囲のポドプラニン(PDPN)陽性 CAF が減少していた。PDPN 陽性 CAF は、癌の悪性化と関係しているとされている。そこで次に転移巣周辺から CAF を初代培養して検討を進めた。PAN02 細胞の培養上清刺激下において、RAMP3-/-由来 CAF では間葉系マーカーである SMA の発現低下を認めた。また RAMP3-/- CAF では、細胞質内ストレスファイバーの形成が抑制されており、間葉上皮移行(MET)を生じていると考えられた。さらに RAMP3-/- CAF では、PAN02 細胞との共培養系において、細胞の遊走、増殖が抑制されていた。これらの結果から、RAMP3-/-では、MET により悪性度の高い PDPN 陽性 CAF が減少した結果、癌転移が抑制されたと考えられた。

(3) ルイス肺癌 (LLC) 細胞を足底部に移植すると、DI-E-RAMP2-/-では、リンパ節内に存在する高内皮細静脈(HEV)の破綻によりリンパ節転移が促進することが明らかとなった。一方で RAMP3-/-ではリンパ節転移が抑制され、DI-E-RAMP2-/-とは逆の結果を示した。RAMP3-/-では癌転移の標的遺伝子となる CXCL12 や CCR7 の発現低下が認められた。さらに、癌細胞遊走因子である S100A8/A9、SAA3 発現の発現低下が認められた。

以上の結果から、AM-RAMP2 系が癌転移の抑制に働く一方、AM-RAMP3 系は癌転移の促進に働くことが明らかとなった。AM-RAMP2、AM-RAMP3 系を選択的に制御することで、癌転移を抑制する新しい治療法に展開することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tanaka Masaaki, Kakahara Shinji, Hirabayashi Kazutaka, Imai Akira, Toriyama Yuichi, Iesato Yasuhiro, Sakurai Takayuki, Kamiyoshi Akiko, Ichikawa-Shindo Yuka, Kawate Hisaka, Tanaka Megumu, Cui Nanqi, Wei Yangxuan, Zhao Yunlu, Aruga Kohsuke, Yamauchi Akihiro, Murata Toshinori, Shindo Takayuki	4. 巻 191
2. 論文標題 Adrenomedullin Receptor Activity-Modifying Protein 2 System Ameliorates Subretinal Fibrosis by Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition in Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	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 Cui Nanqi, Sakurai Takayuki, Kamiyoshi Akiko, Ichikawa-Shindo Yuka, Kawate Hisaka, Tanaka Megumu, Tanaka Masaaki, Wei Yangxuan, Kakahara Shinji, Zhao Yunlu, Aruga Kohsuke, Kawagishi Hiroyuki, Nakada Tsutomu, Yamada Mitsuhiro, Shindo Takayuki	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 ?
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo.2020.01210	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
2. 発表標題 AM-RAMP2システムは血管内皮の恒常性を制御し、血行性およびリンパ行性転移を抑制する
3. 学会等名 第6回血管生物若手会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Megumu Tanaka
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 system regulates high endothelial venules in lymph nodes and suppresses lymphatic metastasis
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Megumu Tanaka
2. 発表標題 Adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular endothelial homeostasis, which suppresses hematogenous and lymphogeneous metastasis
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 循環病態学教室ホームページ 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

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
---------	---------