

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15524

研究課題名（和文）AM-RAMP2系による高内皮細静脈の機能制御と癌転移抑制法開発への展開

研究課題名（英文）Functional regulation of high endothelial venules by the AM-RAMP2 system and its application to the development of methods to suppress cancer metastasis

研究代表者

田中 愛（Tanaka, Megumu）

信州大学・医学部・日本学術振興会特別研究員RPD

研究者番号：90786401

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、血管作動性物質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の欠損マウスが血管異常で胎生致死となることを報告した。本研究は、誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2欠損マウス（DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>）を用いた。Lewis肺癌細胞の癌転移実験において、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>ではリンパ節転移が亢進した。一方で、血管内皮細胞特異的RAMP2過剰発現マウス（E-RAMP2 Tg）では、高内皮細静脈（HEV）数が増加し、リンパ球の誘導や接着に關与するケモカインや接着因子の発現が亢進し、T細胞の動員が増加した結果、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>とは逆に、リンパ節転移が抑制された。

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。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が、AMの血中半減期は短く、慢性疾患への適応には制限がある。我々はAMの受容体活性調節タンパク：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、それらの破綻が癌の血行性転移・リンパ節転移・臓器間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) is a vasoactive peptide. We have reported that knockout mice of AM and its receptor-modulating protein RAMP2 are embryonic lethal with vascular abnormalities. Therefore, we established drug-inducible endothelial cell (EC)-specific RAMP2 knockout mice (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>).

In this study, transplantation of Lewis lung carcinoma cells into footpads resulted in that spontaneous metastasis to the lymph node (LN) being enhanced in DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>. DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> contained fewer high endothelial venules (HEVs) than controls, and the HEVs that were present exhibited abnormal structures. In DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>, a significant decrease in T cells was observed, which may suppress the immune system and allow metastasis. Next, we generated mice overexpressing RAMP2 in the EC (E-RAMP2Tg), and contrary to DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>, LN metastasis was suppressed and survival was improved.

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

癌の転移は長らく、血行性転移とリンパ行性転移という2つの枠組みの中で捉えられてきた。一方最近になって、リンパ節転移は、リンパ管ではなく、リンパ節内の血管を介した癌細胞の血行性転移によって引き起こされる可能性が報告された。

私は、生理活性ペプチド：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が、血管内皮細胞の恒常性維持に必須であること、さらに、RAMP2ノックアウトマウスでは、遠隔臓器における血管障害によって、転移前土壌が形成されることから、血管の恒常性維持に基づく癌転移抑制法を提唱してきた。その中で、AM-RAMP2系がリンパ節内に存在する高内皮細静脈(high endothelial venule; HEV)の構造・機能維持にも重要な役割を担っていることを発見した。

## 2. 研究の目的

本研究では、AM-RAMP2系を切り口として、リンパ節におけるHEVと癌転移との関連を明らかにする。本研究によって、「リンパ節転移は血行性転移である」というコンセプトを証明すると共に、AM-RAMP2系によるHEVの恒常性維持機能を選択的に操作することで、癌転移を抑制する新しい治療法に展開する。

## 3. 研究の方法

### (1) 高内皮細静脈(HEV)機能とリンパ節転移におけるAM-RAMP2系の意義の解明

今までの検討から、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<sup>-/-</sup>)ではControlと比較して、リンパ節転移が亢進する結果が得られている。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、癌が転移したリンパ節においてCD3<sup>+</sup>T細胞数の有意な減少が認められた。さらに、リンパ球の誘導や接着に関与するケモカインや接着因子の発現も低下していた。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>におけるHEVの形態、機能を、HEV特異的マーカーであるMECA79の免疫染色や電子顕微鏡によって検討した。

### (2) リンパ節転移における血管、リンパ管の重要性の比較検討

血管特異的、リンパ管特異的RAMP2<sup>-/-</sup>(DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>, DI-LE-RAMP2<sup>-/-</sup>)双方に対して、GFPを発現するルイス肺癌細胞の移植、転移実験を行い、CUBIC法によるリンパ節組織透明化を行った。透明化したリンパ節において、HEV特異的マーカーであるMECA-79とリンパ管特異的マーカーであるProx-1に対する免疫染色を行い、3D組織構築によって、リンパ節内の血管およびリンパ管と、癌細胞との局在を描出し、GFPによって時系列的にトレースし、転移動態を確認した。

### (3) AM-RAMP2系の活性化とTLS形成誘導による癌転移抑制効果の検討

血管内皮細胞特異的RAMP2過剰発現マウス(E-RAMP2 Tg)のリンパ節では、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>とは逆に、CD3<sup>+</sup>T細胞数が有意に増加していた。また、リンパ節内HEV数も増加していた。これらの結果から、AM-RAMP2系を活性化することでHEV新生を促進し、三次リンパ構造(TLS)を誘導できる可能性があると考えた。本研究では、E-RAMP2 Tgに

癌移植を行い、TLS 形成誘導を行った。組織透明化による 3D 組織構築や、フローサイトメトリーを用いて、TLS 内の HEV 新生、CD3+T 細胞数、CD4+/CD8+T 細胞比の検討を行った。

#### (4)AM-RAMP2 系を標的とした癌転移抑制実験

ヒト型 RAMP2 ノックインマウスを樹立し、癌移植を行い、我々が開発した RAMP2 作動薬や抗 RAMP2 抗体投与への応答を検討した。

## 4 . 研究成果

### (1)(2)

血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2-/-)ではリンパ節転移が亢進する結果が得られ、それらは HEV の構造や機能異常によって引き起こされることを明らかとした。そこで、転移したリンパ節を透明化し、HEV と癌細胞の局在を明らかにすることを考えた。透明化処理の工程が多く、リンパ節の透明化条件を設定するまでに時間を要したが、脱脂をしっかりと行うことで染色性も向上した。新たに樹立した GFP 遺伝子導入 LLC 細胞を移植し、転移したリンパ節を透明化し、MECA-79 抗体によって HEV の染色を行うと、DI-E-RAMP2-/-においては、LLC がリンパ管からではなく、HEV の走行に沿ってリンパ節内に侵入し、増殖する様子が観察された。従来、リンパ節転移はリンパ管を介したものと考えられていたが、血行性を介した転移形式も存在することが示唆された。一方で、リンパ管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(DI-LE-RAMP2-/-)では、リンパ節転移に差は認めず、T 細胞の誘導や接着に関わるケモカインや接着因子の遺伝子発現も変化が見られなかった。

### (3)

血管内皮細胞特異的 RAMP2 過剰発現マウス(E-RAMP2 Tg)を作成したところ、DI-E-RAMP2-/-とは逆に、リンパ節転移が抑制され、生存率が上昇した。E-RAMP2 Tg では、MECA-79+の HEV 数が増加し、癌内に存在する HEV 周辺に CD8+T 細胞が局在することが明らかとなった。さらに、E-RAMP2 Tg に対し、抗 PD-1 抗体の投与を行ったところ、T 細胞の動員亢進に伴い、癌免疫療法の治療効果が増強することが確認された。

### (4)

ヒト型 RAMP2 ノックインマウスを樹立することに成功した。一方で、樹立したマウスの生存率が低く、癌細胞の移植実験を行うのに十分な数を準備することができなかった。今後更なる検討を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kasahara Tomoki, Tanaka Megumu, Zhao Yunlu, Kamiyoshi Akiko, Sakurai Takayuki, Ichikawa-Shindo Yuka, Kawate Hisaka, Matsuda Yorishige, Zhang Yan, Guo Qianqian, Li Peixuan, Hoshiyama Ken, Li Jiake, Onishi Naho, Hayashi Marina, Sanjo Hideki, Ishida Kumiko, Tanaka Satoshi, Kawamata Mikito, Shindo Takayuki	4. 巻 171
2. 論文標題 Receptor activity-modifying proteins of adrenomedullin (RAMP2/3): Roles in the pathogenesis of ARDS.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 171118 ~ 171118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2023.171118	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 Kakihara Shinji, Matsuda Yorishige, Hirabayashi Kazutaka, Imai Akira, Iesato Yasuhiro, Sakurai Takayuki, Kamiyoshi Akiko, Tanaka Megumu, Ichikawa-Shindo Yuka, Kawate Hisaka, Zhao Yunlu, Zhang Yan, Guo QianQian, Li Peixuan, Onishi Naho, Murata Toshinori, Shindo Takayuki	4. 巻 103
2. 論文標題 Role of Adrenomedullin 2/Intermedin in the Pathogenesis of Neovascular Age-Related Macular Degeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 100038 ~ 100038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.labinv.2022.100038	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 Takayuki, Tanaka Megumu, Kamiyoshi Akiko, Ichikawa-Shindo Yuka, Kawate Hisaka, Sakurai Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Receptor Activity Modifying Protein RAMP Sub-Isoforms and Their Functional Differentiation, Which Regulates Functional Diversity of Adrenomedullin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 788 ~ 788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology11050788	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中愛
2. 発表標題 アドレノメデュリン-RAMP2、RAMP3システムの機能分化とがん転移の制御への展開
3. 学会等名 第27回日本心血管内分泌代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中愛
2. 発表標題 AM-RAMP2系は、高内皮細静脈(HEV)の恒常性を制御し、リンパ節転移を抑制する
3. 学会等名 第6回日本腫瘍循環器学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中愛
2. 発表標題 Vascular Homeostasis by the AM-RAMP2 System Promotes T cell Recruitment, Prevents Cancer Cell Migration, and Suppresses Lymph Node Metastasis.
3. 学会等名 第88回日本循環器学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田中愛
2. 発表標題 Vascular Homeostatic Function of the AM-RAMP2 System and Its Application to the Regulation of Lymph Node Metastasis
3. 学会等名 第87回日本循環器学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中愛
2. 発表標題 アドレノメデュリン-RAMP2系による、高内皮細静脈を介したリンパ節転移の制御
3. 学会等名 第52回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中愛
2. 発表標題 AM-RAMP2系の血管恒常性制御を介したリンパ節転移抑制作用
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2022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 <a href="http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/">http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/</a>
---

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