

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460337

研究課題名(和文) 新しい血管・リンパ管制御システムに基づく、癌の革新的な医薬基盤の構築

研究課題名(英文) A novel approach for cancer treatment based on homeostatic regulation of vascular system

研究代表者

新藤 優佳 (SHINDO, Yuka)

信州大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：50507506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：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(DI-E-RAMP2^{-/-})を樹立し、癌の進展におけるRAMP2の意義を検討した。

DI-E-RAMP2^{-/-}では、皮下移植したメラノーマの血管新生が抑制される一方で、一旦足底部に細胞を移植した後の、自然肺転移が亢進していた。DI-E-RAMP2^{-/-}の肺では、内皮細胞の細胞骨格異常と血管透過性亢進が生じ、炎症細胞の集簇を認めると共に、S100A8/A9、SAA3などの癌細胞遊走因子の高発現を認め、癌細胞が生着しやすい「転移前土壌」が形成されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used inducible vascular endothelial cell-specific RAMP2 knockout mice (DI-E-RAMP2^{-/-}) to clarify the contribution made by the endogenous RAMP2 to tumor angiogenesis and metastasis. Subcutaneously transplanted melanoma cells showed less angiogenesis in DI-E-RAMP2^{-/-} than control mice. On the other hand, after transplantation of melanoma cells into hindlimb footpads, spontaneous metastasis to the lung was enhanced in DI-E-RAMP2^{-/-}. Within the lungs of DI-E-RAMP2^{-/-}, pulmonary endothelial cells were deformed, vascular permeability was enhanced, and inflammatory cells infiltrated the vessel walls and expressed the chemotactic factors S100A8/9 and SAA3, which attract tumor cells and mediate formation of a pre-metastatic niche.

These findings indicate that vascular RAMP2 deletion promotes formation of pre-metastatic niche in distant organs by destabilizing the vascular structure and inducing vascular inflammation.

研究分野：循環病態学

キーワード：血管新生

1. 研究開始当初の背景

癌の生命予後のためには、癌細胞そのものや原発巣の治療だけでなく、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=転移前土壌に着目することが新しい治療法への開発につながると考えられる。血管の恒常性の破綻、血管の異常増殖など、いわゆる「病的血管新生」は癌の病態と密接に関与している。

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り、元々は、血管を拡張させる分子として同定された。AMは、様々な癌組織において産生され、癌の悪性度と関係するという報告もある。

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、従来、血管拡張物質と考えられてきたAMが、血管新生そのものに必須な物質であることをはじめて明らかとした(Circulation 2001)。その後、AMは体液量調節、ホルモン分泌調節、抗炎症作用、抗酸化作用など、多彩な生理活性を有することも明らかとなってきた。

我々は、AMの機能の多様性を生み出しているメカニズムを解明するため、AM受容体システムに着目した。AMは、カルシトニン、CGRP、インターメディン、アミリンなどと共に、スーパーファミリーを形成する。これらの一連の因子は、Gタンパク共役型受容体、CLR (calcitonin receptor like receptor)を共通の受容体として用いている。CLRには、複数存在する受容体活性調節タンパクRAMP(receptor activity-modifying protein)サブアイソフォームのうち、いずれか1つが結合する。我々は、AM^{-/-}が致死となる胎生中期の血管において、RAMPサブアイソフォームの中でも、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)。

我々は、血管におけるRAMP2の病態生理学的意義を明らかにするため、血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス(E-RAMP2^{-/-})を樹立した。E-RAMP2^{-/-}マウスは、全身型のRAMP2^{-/-}マウスと比較して、胎生後期まで発生が進むものの、最終的には全身性の著明な浮腫を来し、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。

AM及び、RAMP2のホモノックアウトマウスは共に、血管の発達不全により胎生致死となるため、成体におけるAM-RAMP2システムの病態生理学的意義の検討には限界があった。そこで最近我々は、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 exon2-4 の両側に loxP 配列を挿入した 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^{-/-}(Drug inducible-Endothelial cell-specific-RAMP2^{-/-})を樹立した。

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^{-/-}では腫瘍血管新生が抑制され、移植した局所での腫瘍の増大が抑えられ、さらに腫瘍が自壊している様子も観察された。

これに対して、DI-E-RAMP2^{-/-}では、メラノーマ細胞の肺への転移は逆に亢進してしまう結果となった。

これらの結果は、同一のシステムであっても、病態のステージや部位によって、その病態的意義が大きく異なることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、癌の増殖、血管・リンパ管新生、転移にかかわる生理活性ペプチド、アドレノメデュリン(AM)と、AMの受容体の活性調節システム=「AM-RAMP2 システム」に着目し、癌に対する新しい医薬基盤を構築することを目的とする。

我々は、AM-RAMP2 システムが、生理的条件下では、血管やリンパ管の恒常性維持に働いているが、一方でその機能の破綻が、癌の増殖や転移の原因となる可能性を見出した。

本研究では、RAMP2 を、成体においてオン・デマンドに遺伝子欠損誘導することが可能な、新規の遺伝子改変マウスを応用して、癌の増殖や転移におけるAM-RAMP2 システムの病態生理学的意義を解明する。

3. 研究の方法

RAMP2 flox マウスと、血管内皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する vascular endothelial (VE)-cadherin Cre トランスジェニックマウスを交配し、Cre-lox P システムにより、血管内皮細胞特異的RAMP2 ノックアウトマウス (E-RAMP2^{-/-}) を作製したが、E-RAMP2^{-/-}は、得られる成体が少ないため、成体期の解析に限界があった。このため、RAMP2 flox マウスと VE-cadherin MerCreMer トランスジェニックマウスを交配し、薬剤誘導性によりオンデマンドに内皮細胞のRAMP2 を欠損させることができる drug induced-E-RAMP2^{-/-} (DI-E-RAMP2^{-/-}) を作成した。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。

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と比較して、腫瘍内血管新生は減弱し、腫瘍増殖は抑制された。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。

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 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。

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(RAMP2O/E)を樹立し、血管透過性アッセイを行うと RAMP2O/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、RAMP2O/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。

以上の結果から、血管内皮細胞の RAMP2 欠損により、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、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

(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8件)

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: 1-13, 2017. 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 adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells. *Endocrinology* 158(4): 1-14, 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 tumor metastasis. *Cardiovasc Res.* 111(4):398-409. 2016. 査読有

Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T. Adrenomedullin-RAMP2 system in vascular endothelial cells *J. Atheroscler. Thromb.* 22(7):647-653. 2015. 査読有

Toriyama Y, Iesato Y, Imai A, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yamauchi A, Igarashi K, Tanaka M, Liu T, Xian X, Zhai L, Owa S, Murata T, Shindo T. Pathophysiological function of endogenous calcitonin gene-related peptide in ocular

vascular diseases

Am J Pathol. 185(6):1783-94. 2015. 査読有

Uetake R, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Yoshizawa T, Koyama T, Yang L, Toriyama Y, Yamauchi A, Igarashi K, Tanaka M, Kuwabara T, Mori K, Yanagita M, Mukoyama M, Shindo T.

Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection
PLoS One. 9(2):e87667, 2014. 査読有

Yamauchi A, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Igarashi K, Toriyama Y, Tanaka M, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Owa S, Arai T, Shindo T.
Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of vascular system

J Mol Cell Cardiol. 77 :73-85. 2014. 査読有

Igarashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yamauchi A, Toriyama Y, Tanaka M, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Owa S, Arai T, Shindo T.
Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia
Peptides.62 21-31.2014. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

2017年2月11日

第46回 日本心臓血管作動物質学会 沖縄
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、載昆、谷村圭哉、劉騰、崔南奇、魏陽璇、山内啓弘、新藤隆行

2016年12月8-10日

The 24th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization/The 14th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 長崎
Adrenomedullin-RAMP2 system inhibits the endothelial-mesenchymal transition and formation of pre-metastatic niche by maintaining vascular integrity
Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Liu T, Tanimura K, Wei Y, Yamauchi A, Shindo T.

2016年3月18日-20日

第80回日本循環器学会 仙台

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

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

2016年2月5日-6日

第45回日本心臓血管作動物質学会 徳島

アドレノメデュリン-RAMP2系は、血管内皮間葉系転換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、大和慎治、載昆、崔南奇、劉騰、五十嵐恭子、山内啓弘、新藤隆行

2015年12月10日-12日

第19回日本心臓血管内分泌代謝学会 神戸

アドレノメデュリン-RAMP2系は、血管恒常性と内皮間葉系転換の制御により、癌転移を抑制する

田中愛、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、劉甜、羨鮮、Zhai Liuyu、大和慎治、新藤隆行

〔その他〕

ホームページ

<http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新藤 優佳 (SHINDO, Yuka)
信州大学・医学系研究科・研究員
研究者番号：50507506

(2) 連携研究者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI, Shun'ichiro)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号：60117166