

# 心血管系の恒常性制御に基づく癌転移抑制法の開発

所属： 信州大学 医学部医学科 循環病態学教室

助成対象者：新藤隆行

共同研究者：桜井敬之、神吉昭子、田中愛

## 概要

アドレノメデュリン (AM) は、血管の恒常性維持作用を有するペプチドであり、その機能は主として、AM の受容体活性調節タンパク、RAMP2 あるいは RAMP3 によって制御されている。本研究では、AM-RAMP2、3 系と癌転移の関連を検討した。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、転移予定先臓器の血管における炎症が、転移前土壌となること、さらに内皮間葉転換による血管構造の不安定化により、転移が促進する結果となった。一方、RAMP3 ノックアウトマウス (RAMP3<sup>-/-</sup>) では、癌関連線維芽細胞 (CAF) が間葉上皮転換を生じて良性化し、転移が抑制された。AM-RAMP2 系による血管の恒常性制御機構と、AM-RAMP3 系による CAF の制御機構に注目し、選択的に RAMP2 を活性化し、RAMP3 を抑制することが、癌転移の抑制につながると考えられた。

## abstract

Adrenomedullin (AM) is a peptide that plays a role in maintaining vascular homeostasis, and its function is primarily regulated by receptor activity-modifying proteins, RAMP2 or RAMP3. In this study, the relationship between the AM-RAMP2/3 system and cancer metastasis was investigated. In endothelial cell-specific RAMP2 knockout mice (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>), inflammation in the vasculature of organs targeted for metastasis created a pre-metastatic niche, and

metastasis was promoted due to the destabilization of vascular structures via endothelial-to-mesenchymal transition. In contrast, in RAMP3 knockout mice (RAMP3<sup>-/-</sup>), cancer-associated fibroblasts (CAFs) underwent mesenchymal-to-epithelial transition, became benign, and metastasis was suppressed. Focusing on the vascular homeostasis regulation mechanism via the AM-RAMP2 system and the CAF regulation mechanism via the AM-RAMP3 system, it was concluded that selectively activating RAMP2 while inhibiting RAMP3 could contribute to the suppression of cancer metastasis.

## 研究内容

### 【目的】

分子標的薬や癌免疫療法などの新規治療法の登場により、癌治療は大きな進歩を遂げたが、未だ癌の転移を抑制する方法は存在しない。我々は、癌を生体から切り分けて考えるのではなく、癌の原発巣と転移巣を、血管を介した循環制御の観点から捉えることによって、癌転移を抑制する治療法につながる可能性を考え、検討を進めてきた。中でも血管の恒常性の破綻や異常増殖は、癌の病態にも密接に関与していることから、我々は、血管の恒常性制御の観点から、癌転移を抑制する新しいアプローチを考えた。

アドレノメデュリン (AM) は血管をはじめ、全身の様々な組織で広く産生され、血管拡張作用をはじめとした、多彩な生理活性を有するペプチドである。AM の活性は、主として、AM の受容体に結合する受容体活性調節タンパク RAMP2 および RAMP3 により制御されている。我々はこれまで、AM ノックアウトマウス (AM<sup>-/-</sup>) が血管の発生異常により胎生致死となること 1)、RAMP の中でも RAMP2 のノックアウトマウス (RAMP2<sup>-/-</sup>) のみが AM<sup>-/-</sup> と同様の表現型を示して胎生致死となること 2) から、血管の発生および恒常性維持における AM-RAMP2 系の重要性を明らかとしてきた。一方、RAMP3 のノックアウトマウス (RAMP3<sup>-/-</sup>) は血管の発生に異常は認められず、成体が得られる 3)。AM および、RAMP2、RAMP3 は様々な癌においても発現が認められる。本研究では、AM-RAMP2 系、AM-RAMP3 系と、癌転移の関連を、各種遺伝子改変マウスを用いて検討した。

## 【方法】

### (1) AM-RAMP2 系による血管恒常性維持と、癌転移抑制との関連

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>)を用いて、原発巣から転移巣への自然転移モデルを作成した。C57BL/6 マウス系統に移植することができる B16BL6 メラノーマ細胞をマウスの足底部に移植し、肺転移させ、原発巣と転移巣の各々に生じる変化を解析した。

### (2) AM-RAMP3 系による癌関連線維芽細胞の悪性化と、癌転移促進との関連

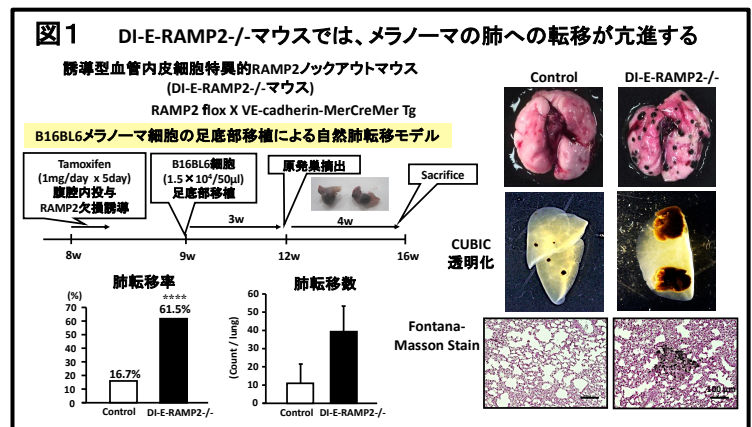
RAMP3 ノックアウトマウス (RAMP3<sup>-/-</sup>)を用いて、C57BL/6 マウス系統に移植することができる Pan02 腺癌細胞を脾臓に移植し、肝転移の検討を行った。特に、癌の悪性化に重要な働きをされると考えられている癌関連線維芽細胞 (CAF)に注目し、AM-RAMP3 系による CAF の制御機構を検討した。

## 【結果】

### (1) AM-RAMP2 系による血管恒常性維持と、癌転移抑制との関連

RAMP2<sup>-/-</sup>は胎生致死のため、成体での解析が不可能である。そこで本研究では、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、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<sup>-/-</sup>)ラインを樹立し、成体になってから血管の RAMP2 遺伝子欠損を誘導することを試みた 4)。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>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。

DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>を用いて、B16F10 メラノーマ細胞や S180 肉腫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。一方、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<sup>-/-</sup>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 1)。



DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>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、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現亢進が認められた。RAMP2 欠損誘導後も炎症は持続し、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<sup>-/-</sup>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  $\alpha$  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<sup>-/-</sup>の腫瘍内血管では、内皮間葉転換(EndMT)が生じていると考えられた。これを検証するため、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肺血管内皮細胞の初代培養を行い、TGF- $\beta$  刺激による EndMT 誘導実験を行なった。その結果、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>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、血管内皮細胞のマーカーである VE-カドヘリンの発現が低下す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 B16F10 メラノーマ細胞を用いて、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。さらに、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 メラノーマ細胞を移植し、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。

## (2) AM-RAMP3 系による癌関連線維芽細胞の悪性化と、癌転移促進との関連

脾癌は予後不良であり、特に術後の肝転移の制御が重要な課題である。我々は DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>と RAMP3<sup>-/-</sup>を用いて、脾癌細胞の臓器間転移における AM-RAMP 系の意義を検討した 5)。Pan02 脾癌細胞を脾臓に移植し、肝転移の検討を行うと、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、メラノーマ細胞の肺転移実験の結果が再現され、転移率が上昇した。ポドプラニン(PDPN)は、リンパ管のマーカーとして知られる一方、癌関連線維芽細胞(CAF)においても発現が認められ、PDPN の発現の高い癌は予後不良であることが報告されている。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>における転移巣の癌周辺領域では、RAMP3 および PDPN の発現が著明に亢進しており、PDPN

陽性の CAF が増加していた。

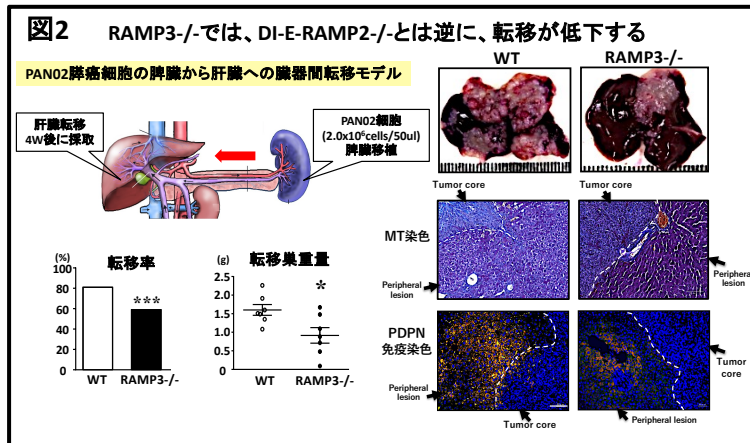
一方、RAMP3<sup>-/-</sup>では、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>とは逆に、肝転移が有意に抑制され、転移巣の癌周辺領域の CAF が減少していた(図 2)。さらに RAMP3<sup>-/-</sup> CAF では、PDPN 発現が低下しており、ストレスファイバーの形成が抑制されている一方で、細胞

膜直下のアクチンリングの形成が亢進しており、間葉上皮転換(MET)を生じていると考えられた。そこで、PDPN が AM-RAMP3 系のシグナル下流に存在することを検証するため、RAMP3 ノックダウン線維芽細胞を樹立した。その結果、RAMP3 発現低下に伴って、PDPN 発現低下が確認された。さらに RAMP3<sup>-/-</sup>の初代培養 CAF では、PDPN 発現制御に関わる p-Src、Cas 活性が低下していた。マイクロアレー解析では、RAMP3<sup>-/-</sup> CAF では、腫瘍増殖因子の発現低下と抑制因子の発現亢進が認められ、悪性度が低下していると考えられた。実際に、共培養系で、RAMP3<sup>-/-</sup>-CAF は Pan02 膵癌細胞の増殖、遊走を抑制すると共に、RAMP3<sup>-/-</sup>-CAF を Pan02 膵癌細胞と混合してマウスに移植すると、癌の増殖および転移は抑制された。このことから、RAMP3<sup>-/-</sup>-CAF は、癌増殖や転移を抑制する、いわば良性の CAF に表現型が変化していると考えられた。

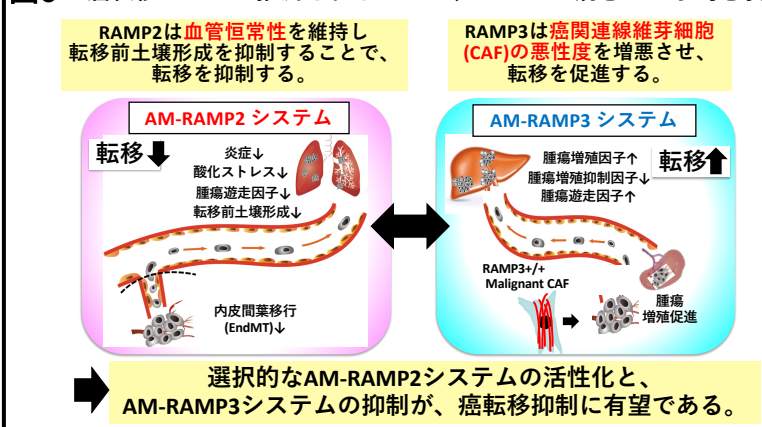
次に RAMP3<sup>-/-</sup>に対して AM を持続投与し、AM-RAMP2 系を選択的に活性化したところ、癌転移は RAMP3<sup>-/-</sup>よりもさらに抑制された。

## 【考察】

以上の結果から、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、転移予定先臓器の血管における慢性炎症が、癌細胞にとっての転移前土壌となること、さらに原発巣の血管では、EndMT による血管構造の不安定化、透過性亢進が生じ、癌細胞の血管内浸潤が亢進することで、転移が促進された



**図3 癌転移において推測されるRAMP2、RAMP3の病態生理学的意義**



ことが明らかとなった。一方、RAMP3<sup>-/-</sup>では、PDPN 発現が抑制され、CAF が MET を生じて良性化すると共に、代償的に AM-RAMP2 系の亢進を生じた結果、癌の転移が抑制されたことが明らかとなった(図 3)。

AM-RAMP2系による血管の恒常性制御機構と、AM-RAMP3系による CAF の制御機構に注目し、選択的に RAMP2 を活性化し、RAMP3 を抑制することが、癌転移の抑制につながると考えられた。

#### 引用文献

- [1] T. Shindo, Y. Kurihara, H. Nishimatsu, N. Moriyama, M. Kakoki, Y. Wang, Y. Imai, A. Ebihara, T. Kuwaki, K.H. Ju, N. Minamino, K. Kangawa, T. Ishikawa, M. Fukuda, Y. Akimoto, H. Kawakami, T. Imai, H. Morita, Y. Yazaki, R. Nagai, Y. Hirata, H. Kurihara, Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene, *Circulation* 104(16) (2001) 1964-71.
- [2] Y. Ichikawa-Shindo, T. Sakurai, A. Kamiyoshi, H. Kawate, N. Iinuma, T. Yoshizawa, T. Koyama, J. Fukuchi, S. Iimuro, N. Moriyama, H. Kawakami, T. Murata, K. Kangawa, R. Nagai, T. Shindo, The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity, *J Clin Invest* 118(1) (2008) 29-39.
- [3] A. Yamauchi, T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, K. Igarashi, Y. Toriyama, M. Tanaka, T. Liu, X. Xian, A. Imai, L. Zhai, S. Owa, T. Arai, T. Shindo, Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system, *J Mol Cell Cardiol* 77 (2014) 73-85.
- [4] M. Tanaka, T. Koyama, T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, T. Liu, X. Xian, A. Imai, L. Zhai, K. Hirabayashi, S. Owa, A. Yamauchi, K. Igarashi, S. Taniguchi, T. Shindo, The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumour metastasis, *Cardiovasc Res* 111(4) (2016) 398-409.

[5] K. Dai, M. Tanaka, A. Kamiyoshi, T. Sakurai, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, N. Cui, Y. Wei, M. Tanaka, S. Kakiyara, S. Matsui, T. Shindo, Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts, *Oncogene* 39(9) (2020) 1914-1930.

本助成に関わる成果物

[口頭発表]

2024年2月9-10日 第53回日本心脈管作動物質学会

アドレノメデュリンの受容体活性調節システムを標的とした癌転移の制御

田中愛、新藤隆行

2024年9月8日 第39回SAM学会学術大会 特別講演

RAMPシステムによる生体内恒常性制御機構の解明と応用展開

新藤隆行

[ポスター発表]

2024年3月8-10日 第88回日本循環器学会

Vascular homeostasis by the AM-RAMP2 system promotes T cell recruitment, prevents cancer cell migration, and suppresses lymph node metastasis.

Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Zhao Y, Matsuda Y, Zhang Y, Guo Q, Li P, Hoshiyama K, Li J, Onishi N, Hayashi M, Kasahara T, Shindo T

2024年12月27日 第28回日本心血管内分泌代謝学会

癌細胞の RAMP3 欠損は、AREG 発現の制御による間葉上皮転換 (MET) を引き起こし、腫瘍増殖を抑制する

甲斐健佑、田中愛、桜井敬之、神吉昭子、Zhang Yan、Guo Qianqian、Li Peixuan、Li Jiake、新藤隆行

2024年12月27日 第28回日本心血管内分泌代謝学会

AM-RAMP2 系は、腫瘍関連高内皮細静脈 (TA-HEV) を誘導し、リンパ節転移を抑制する

田中愛、桜井敬之、神吉昭子、Zhang Yan、Guo Qianqian、Li Peixuan、Li Jiake、甲斐健佑、新藤隆行

2025 年 1 月 31 日-2 月 1 日 第 54 回日本心脈管作動物質学会

AM-RAMP3 系の欠損は、腫瘍微小環境における腫瘍随伴マクロファージ (TAM) を減少させ、癌転移を抑制する

Zhang Yan、田中愛、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、松田順繁、Guo Qianqian、星山健、Li Peixuan、Li Jiake、Duan Jun、林真倫那、新藤隆行