

●ベーシック

第46回 研究奨励賞受賞論文

アドレノメデュリン-RAMP2系は転移前土壤形成
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

信州大学大学院医学系研究科 循環病態学講座

序論

血管新生は、生理的な血管新生と病的な血管新生とに分けられる。前者は、胎児期の発生過程や創傷治癒の過程で生じる秩序だった血管新生であり、血管の内腔に存在する一層の血管内皮細胞に、ペリサイトあるいは血管平滑筋が裏打ちして、構造的に安定が保たれている。一方、病的血管新生はがんや慢性炎症疾患などで生じ、壁細胞の内皮細胞への接着が欠乏しており、血管の走行は乱れ、無秩序の血管構造を示している。

癌治療において腫瘍血管を標的とする考えは、VEGF (vascular endothelial growth factor)-Aに対する抗体ベシズマブをはじめとし、臨床的な効果が示され、癌治療の中心的な役割を担っている。一方で、VEGFをターゲットとした薬剤には限界もあり、抵抗性を示したり、悪性度が増すといった症例も報告されている¹⁾²⁾。これらの薬剤には、軽度の腎障害などの副作用も報告されており、VEGFに代わる他の血管新生調節因子を標的とした治療開発が望まれている。

AMとAMノックアウトマウスの表現型

アドレノメデュリン (Adrenomedullin : AM) はヒト副腎髓質由来の褐色脂肪細胞腫組織から発見された血管拡張作用を有する、52個のアミノ酸からなるペプチドであり、特徴として分子内に6個のアミノ酸よりなるリング構造とC末端にアミド基を有している³⁾⁴⁾。AMは当初、降圧作用を中心に注目されてきたが、その後のさ

まざまな研究により、血圧調整作用以外にも細胞増殖、分化、遊走、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用など、多様な生理活性を有することが明らかとなつた^{5)~8)}。血中AM濃度は、高血圧、心不全、腎不全などの病態において、その重症度に応じて上昇することが報告されており、それぞれの病態への関与が示されている。これまでの研究により、AMノックアウト (AM-/-) マウスは、血管の発生、血管の発達が未熟であるとともに、血管壁の構造に異常を認め、胎生致死となることがわかった (図1左)。もっとも顕著な所見は全身性出血であった。このことからAMは成体においては降圧作用、臓器保護作用などを有するが、胎児期においては血管の発生に必須であることが明らかとなった⁹⁾。

AMの受容体について

AMとそのファミリー因子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide : CGRP) は同一の7回膜貫通G蛋白共役型受容体であるcalcitonin receptor-like receptor (CLR) を共有している¹⁰⁾。CLRはAM受容体活性調節蛋白receptor activity-modifying protein (RAMP) 1, 2, 3のいずれかと重合することにより、リガンドであるAMやCGRPなどのAMファミリー因子との親和性が制御されている。主としてCLR+RAMP1の組み合わせではCGRPの受容体となり、CLR+RAMP2もしくはRAMP3ではAMの受容体として機能する。このような受容体システムの巧妙さがAMの生理機能の多様性を生み出していると考えられる。

*信州大学大学院医学系研究科 循環病態学講座
(〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1)

RAMP2 ノックアウトマウスの表現型

我々は、AM-/-マウスが致死となる発生段階において、RAMPサブアイソフォームの中でも特にRAMP2の発現が高いことに着目し、血管におけるAMの発現にはRAMP2が関与しているのではないかと考えた。そこで、AM-RAMP2系の病態生理学的意義を検討するために、次にRAMP2ノックアウト (RAMP2-/-) マウスを作成した。RAMP2-/-マウスは、AM-/-マウス同様、胎生中期に致死となり、血管の発達不全とともに、著明な浮腫や出血が認められた（図1右）。電顕による観察では卵黄動脈の血管内皮細胞の基底膜からの剥離が認められた^{11) 12)}。さらにRAMP2-/-マウスにおいては代償性のAMの発現亢進を認めたが、CLRや他のRAMPサブアイソフォームの発現には変化を認めなかった。このことからRAMPサブアイソフォームの間には機能的な相補性がなく、血管の正常な発生にはAM-RAMP2系が必須であり、血管機能における中心的な役割を担っていることが示された。

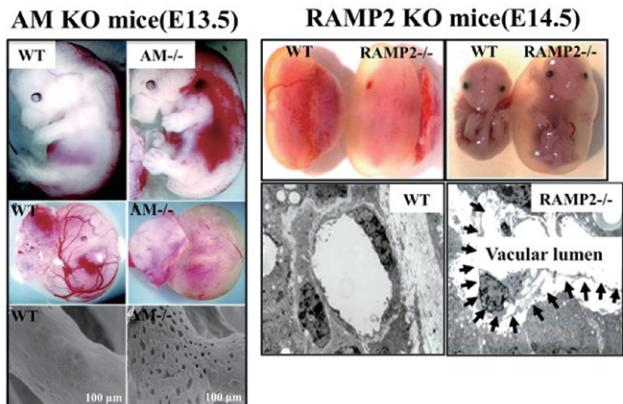


図1 AM-/- と RAMP2-/- の表現型

次に、我々は血管におけるRAMP2の病態生理学的意義を明らかするためにCre-loxPシステムを用いて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 transgenicマウスを交配することで、血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウト (E-RAMP2-/-) マウスを作成した。E-RAMP2-/-マウスはRAMP2-/-マウスと比較して、胎生後期まで発生が進むものの、周産期に全身性の著明な浮腫とそれに伴う体重の増加が認められ、周産期に約95%が死亡することが確認された¹³⁾。E-RAMP2-/-胎児の組織では、腸管の絨毛の毛細血管の構造異常、肺の間質の浮腫、電顕からは血管内皮細胞の空胞化や基底膜からの剥離などが観察された。一部の

E-RAMP2-/-では成体が得られたが、胸部大動脈は内皮細胞のみならず、平滑筋層にも構造異常が見られた。各主要臓器では血管炎様の細胞浸潤が認められた。

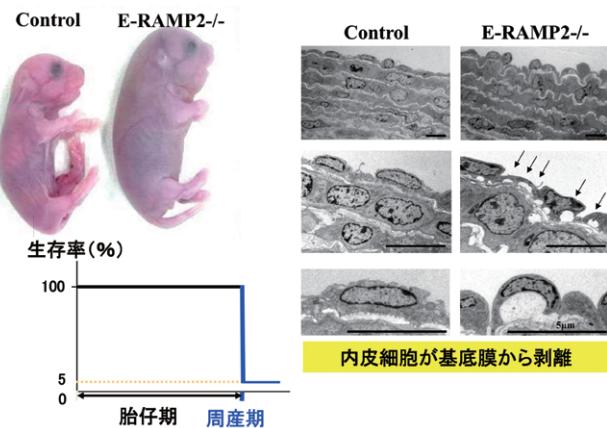


図2 E-RAMP2-/- の表現型

癌とAM

一方で、ヒトの様々な癌病態でも、AMとその受容体の高発現を認めることが多数報告されている¹⁴⁾。また我々の施設でも、肝癌において、特に血管に富む病変では、AMとその受容体の高発現を認めるという知見を得ている。実際にマウスの腫瘍移植モデルにおいて、AMとその受容体のポリクローナル抗体が腫瘍血管の成長を阻害し、生存率を上昇させ、一部の腫瘍モデルでは寛解に至ることが報告されている¹⁵⁾ことから、我々は腫瘍血管新生や腫瘍増殖にAM-RAMP2系が関連しているのではないかと考えた。

方法

我々はこれまで、全身性のRAMP2ノックアウト (RAMP2-/-) マウスや、血管内皮細胞特異的なRAMP2ノックアウト (E-RAMP2-/-) マウスを作成し、検討を行ってきた。しかし、RAMP2-/-は胎生致死であり、E-RAMP2-/-マウスも得られる成体が少ないため、成体期におけるRAMP2の機能解析には限界があった。そこで本研究では、RAMP2 floxマウスと、VEカドヘリン-MerCreMerトランスジェニックマウスを交配することで、マウスが成体になった後、薬剤（タモキシフェン）誘導性により、血管内皮細胞のRAMP2のみを特異的に欠損させることのできるdrug induced-E-RAMP2-/- (DI-E-RAMP2-/-) マウスを樹立した。DI-E-RAMP2-/-マウスを用いてAM-RAMP2系による病的血管新生の役割、

特に腫瘍血管新生について検討した。更に、腫瘍転移モデルを作製し、転移および転移前土壤についても検討を行った。

【腫瘍増殖、腫瘍血管新生評価モデル】

腫瘍血管新生を評価するために、B16F10メラノーマ細胞の皮下移植実験の検討を行った。DI-E-RAMP2^{-/-}ではコントロールマウスと比較して血管新生は減弱し、その結果、腫瘍重量は低下した。さらに腫瘍内血管新生の低下により、不安定化した腫瘍組織となり、マクロ像でも腫瘍が自壊する様子が観察された(図3)。そこで、DI-E-RAMP2^{-/-}の血管新生評価を行うため、マウスの皮下にマトリゲルを移植すると、DI-E-RAMP2^{-/-}では血管新生の先端部である血管先端細胞(Tip細胞)の形成が不良(図4)であり、Tip細胞の誘導に関わるVEGF-A/VEGF R-2や血管安定化に関わるAngiopoietin1/Tie2の発現が有意に低下していた(図3)。したがって、AM-RAMP2系の下流の1つとして、腫瘍血管新生に重要なTip細胞形成に関与するVEGF-A-VEGFR-2シグナルが

存在すると思われる。

【メラノーマの足底部移植による自然肺転移モデル】

次に、別のメラノーマ細胞株を用いて、転移モデルの検討を行った。B16BL6メラノーマ細胞は足底部に移植することで、肺への転移を引き起す。足底部の腫瘍が増大してきたところで、切除を行い、その後自然肺転移するまで経過観察を行った。その結果意外なことに、DI-E-RAMP2^{-/-}では肺への転移率が有意に亢進していた(図5)。また、肺へ転移したメラノーマ細胞のコロニーのカウントにおいてもDI-E-RAMP2^{-/-}はコントロールマウスと比較し、高値を示した。

そこで、DI-E-RAMP2^{-/-}のRAMP2欠損誘導後、肺における遺伝子発現の検討を行うと、血管内皮細胞の接着因子であるVE-カドヘリン、細胞骨格形成に関わるアクチンの発現が低下していた。電子顕微鏡で肺を観察すると、血管内皮細胞が基底膜から血管内腔へ突出、剥離するなどの血管構造異常が認められた。さらに時系列変化を検討したところ、早期の段階から、血管壁にマクロ

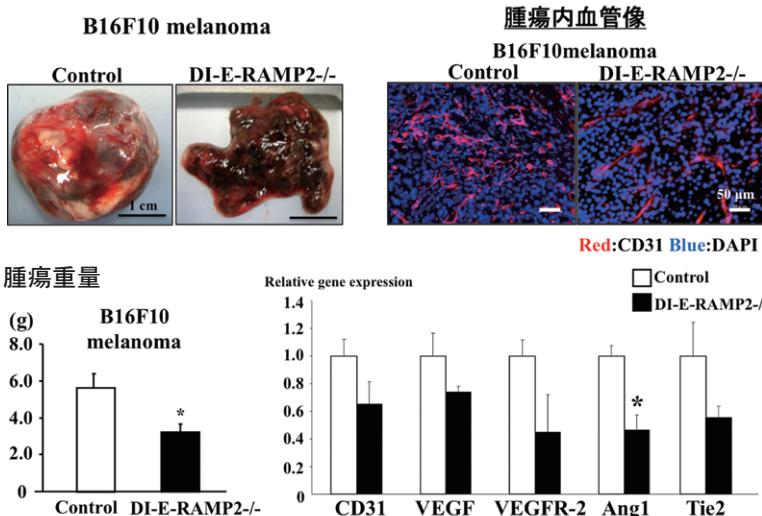


図3 DI-E-RAMP2^{-/-}における腫瘍血管新生の評価

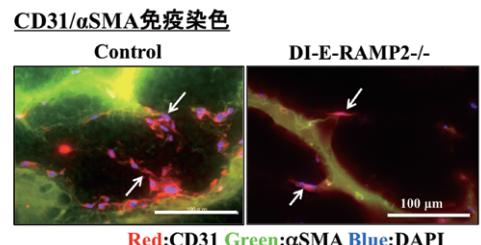


図4 マトリゲル内に浸潤した血管先端部の所見

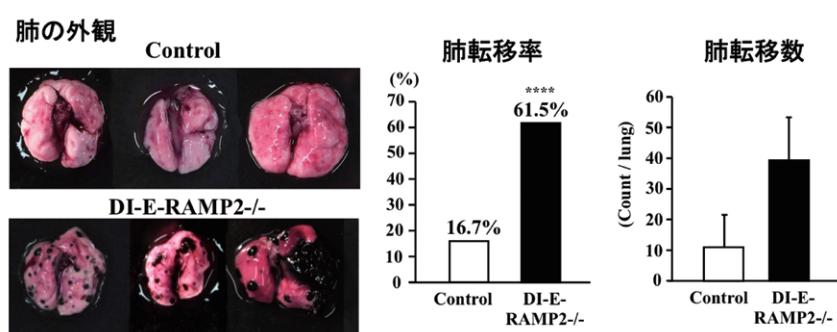


図5 自然肺転移モデルの検討

ファージの集積を認め、それに伴い炎症性サイトカインの発現が亢進していた。炎症はRAMP2欠損誘導後も持続し、その結果、腫瘍細胞を転移巣へと呼び寄せるところである腫瘍細胞遊走因子、S100A8/A9、SAA3の高発現を認めた(図6)。

【腫瘍微小環境における内皮間葉系転換(EndMT)】

次に、原発巣の腫瘍血管に着目し、詳細な検討を行うと、DI-E-RAMP2-/-では血管内皮細胞が間葉系細胞マーカー陽性となっていることが確認された(図7)。細胞間接着が障害され、細胞増殖を認めるなど、内皮間葉系転換(endothelial-mesenchymal transition; EndMT)を引き起こしていることが明らかとなった。それに伴い、

腫瘍血管でも血管構造が不安定化し、腫瘍細胞が漏れだしやすい血管へと変化していた。これも癌の転移促進に寄与すると考えられた。EndMTを生じた血管内皮細胞の一部は、がん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast; CAFs)に形成することが明らかとなっており、癌細胞の浸潤、転移を促進することが報告されている¹⁶⁾。

そこで、DI-E-RAMP2-/-の初代培養した血管内皮細胞に、TGF- β 添加によるEndMT誘導実験を行うと、コントロールマウスと比較し、間葉系マーカー陽性細胞が有意に増加していた(図7)。

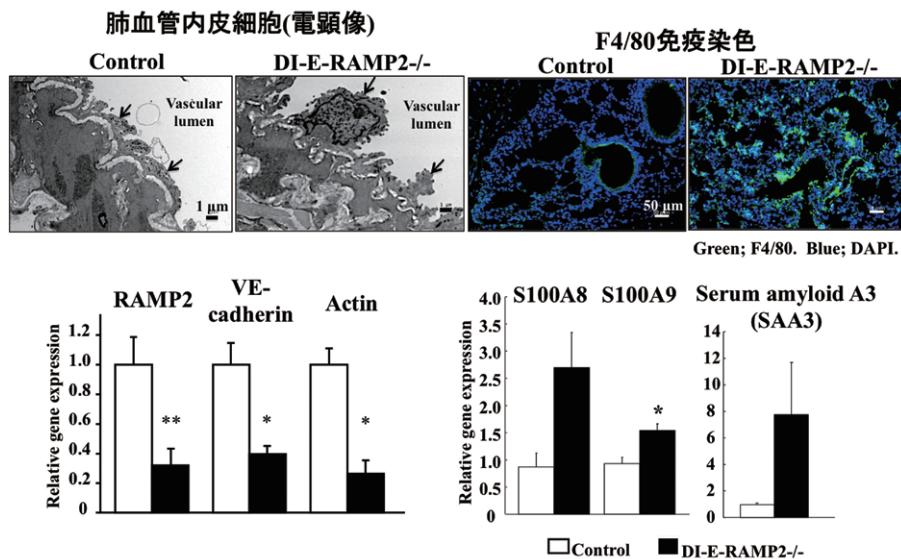


図6 RAMP2欠損誘導後の肺における変化

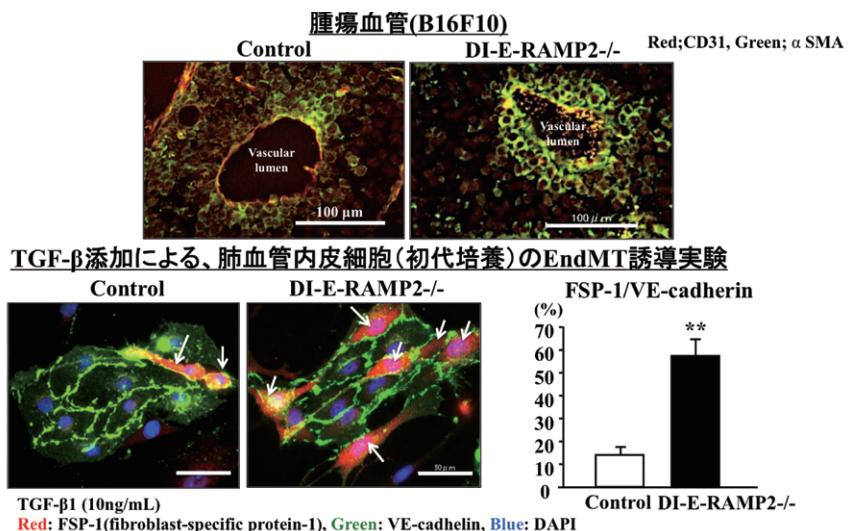
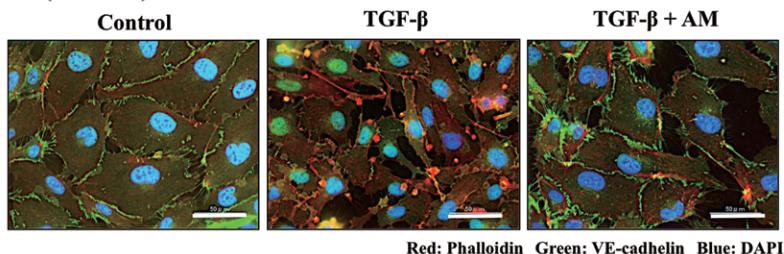


図7 肿瘍内血管におけるEndMT所見

内皮細胞 (HUVEC)



B16BL6メラノーマ細胞自然肺転移モデル B16BL6移植 原発巣摘出

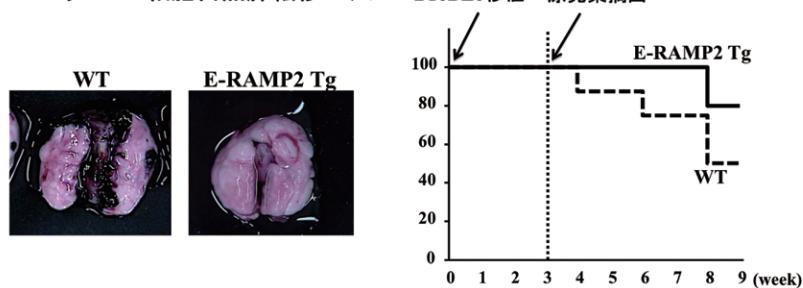


図 8 AM-RAMP2系賦活化実験

【AM-RAMP2系賦活化による癌転移治療実験】

AM-RAMP2系を活性化することで転移を抑制できるかどうかの検討を行った。まず始めに、in vitroにおいてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) にTGF- β 添加によるEndMT誘導実験を行うと、予めAMを投与しておいた群ではEndMT変化を抑制することが明らかとなった(図8上)。さらに、蛍光タンパクであるDsRedを導入したB16F10メラノーマとRAMP2を過剰発現させた血管内皮細胞 (RAMP2O/E EC) を重層培養法で、腫瘍細胞の接着評価を行った。その結果、コントロールと比べ、RAMP2O/E ECでは腫瘍細胞の接着を抑制し、ICAM-1/VCAM-1の発現抑制も確認された。最後に血管内皮細胞特異的RAMP2過剰発現マウス (E-RAMP2 Tg)を作成し、メラノーマの自然肺転移モデルを行うと、E-RAMP2 Tgでは癌の転移を抑制し、生存率の改善を認めた(図8下)。

総括

以上のことから、AM-RAMP2系は腫瘍血管新生に働きかける一方で、腫瘍の転移については抑制する作用があることが明らかとなった。したがって、原発巣摘出後のアジュvantセラピーの治療標的として応用が考えられる。大変興味深いことに、別の心血管ペプチドであるANPが癌転移を抑制することが他のグループからも報告されている¹⁷⁾。このように、心血管ペプチドは、これまで予測されなかった様々な機能を有する可能性があ

り、遺伝子改変マウスを利用した研究は、未だ治療法が開発されていない疾患への新規治療法の重要な手がかりを提供する可能性がある。我々は現在、RAMPサブアイソフォーム特異的に働く低分子化合物の作出を進めており、将来的に治療薬として応用していきたいと考えている。中でも、AM-RAMP2系の血管恒常性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開発が期待される。

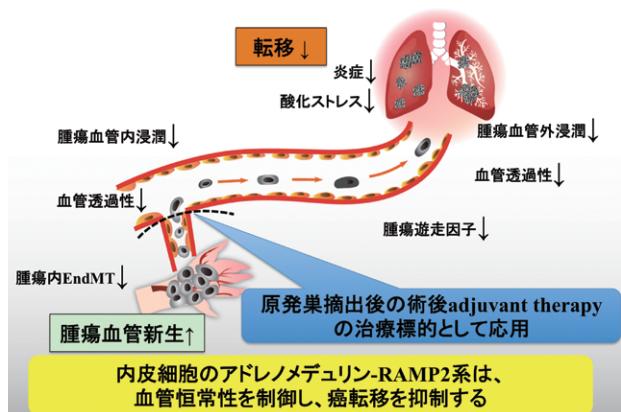


図 9 AM-RAMP2系の腫瘍増殖、転移における病態生物学的意義

謝辞

本稿を執筆する機会を与えて頂いた日本心脈管作動物質学会に深謝致します。

引用文献

1. Bergers G, Hanahan D: Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8:592-603, 2008
2. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10:145-147, 2004
3. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192:553-560, 1993
4. Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S: Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 556:53-58, 2004
5. Imai Y, Shindo T, Maemura K, Sata M, Saito Y, Kurihara Y, Akishita M, Osuga J, Ishibashi S, Tobe K, Morita H, Oh-hashi Y, Suzuki T, Maekawa H, Kangawa K, Minamino N, Yazaki Y, Nagai R, Kurihara H: Resistance to neointimal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1310-1315, 2002
6. Niu P, Shindo T, Iwata H, Ebihara A, Suematsu Y, Zhang Y, Takeda N, Iimuro S, Hirata Y, Nagai R: Accelerated cardiac hypertrophy and renal damage induced by angiotensin II in adrenomedullin knockout mice. *Hypertens Res* 26:731-736, 2003
7. Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R: Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation* 109:1789-1794, 2004
8. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Kuwaki T, Izumida T, Minamino N, Ju KH, Morita H, Oh-hashi Y, Kumada M, Kangawa K, Nagai R, Yazaki Y: Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation* 101: 2309-2316, 2000
9. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H: Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104:1964-1971, 2001
10. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333-339, 1998
11. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM: Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest* 118: 40-50, 2008
12. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T: The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 118:29-39, 2008
13. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, Arai T, Yoshizawa T, Iesato Y, Lei Y, Uetake R, Okimura A, Yamauchi A, Tanaka M, Igarashi K, Toriyama Y, Kawate H, Adams RH, Kawakami H, Mochizuki N, Martínez A, Shindo T. Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation*. 127(7):842-53, 2013
14. Nouguerède E, Berenguer C, Garcia S, Bennani B, Delfino C, Nanni I, Dahan L, Gasmi M, Seitz JF, Martin PM, Ouafik L. Expression of adrenomedullin in human colorectal tumors and its role in cell growth and invasion in vitro and in xenograft growth in vivo. *Cancer Med*. 2(2):196-207, 2013
15. Kaafarani I, Fernandez-Sauze S, Berenguer C, Chinot O, Delfino C, Dussert C, Metellus P, Boudouresque F, Mabrouk K, Grisolí F, Figarella-Branger D, Martin PM,

- Ouafik L: Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Faseb J* 23:3424-3435, 2009
16. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67(21):10123-8, 2007
17. Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue M, Kimura T, Sawabata N, Minami M, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31;112(13):4086-91, 2015