

総説

第49回日本心脈管作動物質学会研究奨励賞受賞論文（総説）

アドレノメデュリン-RAMP3系欠損は、癌関連線維芽細胞のポドプラニン(PDPN)発現を抑制し、臓器間転移を抑制する

戴 昆、田中 愛、神吉 昭子、桜井 敬之、市川 優佳、河手 久香
 崔 南奇、田中 正明、Wei Yangxuan、柿原 伸次、新藤 隆行
 信州大学 医学部 循環病態学教室

1. アドレノメデュリン(AM)と受容体活性調節タンパク(RAMP)

アドレノメデュリン (Adrenomedullin: AM) はヒト褐色細胞腫から発見された52個のアミノ酸からなる生理活性ペプチドであり、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するのが特徴的である^[1]。AMは、血管拡張性物質として発見されたが、その後の研究から、血管拡張作用以外にも、多彩な生理作用を有することが明らかとなってきた^[2]。AMは生体内に広範囲に分布しており、血管においては内皮細胞のアポトーシスの抑制、抗動脈硬化作用、血管新生作用、心臓においては冠血流量増加、心肥大や線維化の抑制、肺においては気管支拡張作用、腎臓においては腎血流量の増加や利尿作用など、様々な作用を有する^[3-5]。近年、炎症性腸疾患患者にAMを投与することで症状が寛解することが報告され、AMの臨床応用も期待されている^[6]。AMは分子進化的にカルシトニン、アミリンなどのペプチドと近接な関係にあると考えられ、これらはカルシトニンスーパーファミリーと呼ばれている。カルシトニンスーパーファミリーに属するペプチドは、部分的にその受容体システムを共有している。7回膜貫通型Gタンパクであるcalcitonin receptor-like receptor (CLR) に対して、受容体活性調節タンパクreceptor activity-modifying protein (RAMP)のサブアイソフォームが1対1で結合することで、これらに対する受容体としてはたらくようになる。中でも、CLRとRAMP1の組み合わせがカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)に対して親和性が高く、CLRとRAMP2またはRAMP3の組み合わせ

がAMに対して親和性が高いことがよく知られている^[7]。

これまで我々は、AMおよびその関連因子の遺伝子改変マウスの病態解析の結果を報告してきた^[2,8]。AMノックアウトマウス (AM^{-/-}) は、胎生期に血管の発達不全により、全身性の出血や浮腫を生じて胎生致死となった。AM^{-/-} が致死となる段階において、RAMPサブアイソフォームの中でも特にRAMP2の発現が亢進していたことから、血管におけるAMの機能制御にはRAMP2が重要ではないかと考えて、次にRAMP2ノックアウトマウス (RAMP2^{-/-}) を樹立したところ、RAMP2^{-/-} はAM^{-/-} と同じ様な血管の発達異常により胎生致死となった (図1)^[8]。AM、RAMP2のノックアウトマウスは共に胎生致死となってしまうため、我々は次に、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^{-/-}) を作成し、成体での解析を行った。その結果、DI-E-RAMP2^{-/-} では、血管内皮細胞の形態異常と全身性の浮腫を生じ、加齢と共に血管の炎症と様々な臓器不全が自然発症した^[9]。これらの所見から、RAMP2は発生段階のみならず、成体の血管の恒常性維持にも必須であることが明らかとなった。

一方、RAMP2^{-/-}とは異なり、RAMP3ノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) は発生に異常は認めず、成体が得られた。成体において片側下肢虚血モデルを用いて血管新生能を評価したところ、RAMP3^{-/-}では野生型マウスと比べて変化を認めないことから、発生段階のみならず成体においても、RAMP3は血管新生には関与していないことが明らかとなった。一方で、術後リンパ浮腫のモデルの検討を行ってみると、RAMP3^{-/-}では、リンパ管新生が抑制され、リンパ管のドレナージ機能も低下していた^[10]。これらの所見から、RAMP2とRAMP3には機能分化が存在することがはじめて明らかとなった。

アドレノメデュリンー RAMP3 系欠損は、癌関連線維芽細胞のポドプラニン (PDPN) 発現を抑制し、臓器間転移を抑制する

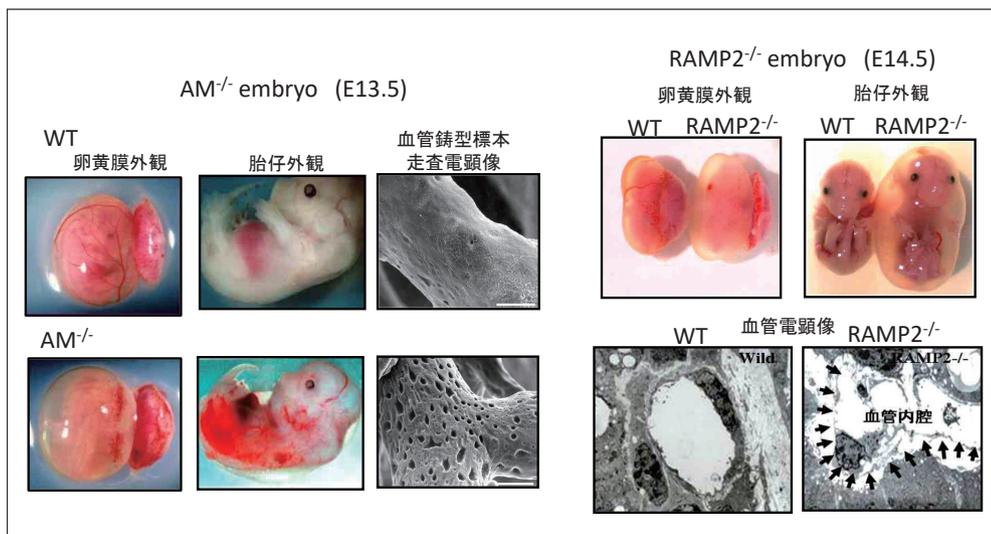


図 1. AM^{-/-} と RAMP2^{-/-} の胎仔の表現型

2. 癌とAM-RAMP系との関連

AMとその受容体の発現は、肺、乳腺、膵臓^[11-13]などの多くの癌で報告されている。我々も、肝癌の血管が豊富に存在する病変部において、AMとRAMP2が高発現していることを見出した。一方、AMとその受容体を阻害することで癌の成長を抑制することも報告されており、AM-RAMP2、3系の癌への関与が示唆される。

我々はこれまで、AM-RAMP2系の癌における病態生理学的意義を調べるため、DI-E-RAMP2^{-/-}を用いた検討を行ってきた。メラノーマ細胞の皮下移植実験において、DI-E-RAMP2^{-/-}では、移植した癌の局所の血管新生が抑制され、癌の重量は低下する一方で、遠隔臓器である肺への転移が亢進するという結果が得られた (図 2 A)^[14]。我々は、DI-E-RAMP2^{-/-}では癌の転移前の段階から、肺において腫瘍細胞遊走因子としてはたらくS100A8/A9^[15, 16]

が発現亢進することを見出した (図 2 B)。この結果から、DI-E-RAMP2^{-/-}では、AM-RAMP2系の欠損により、血管の恒常性が障害されることで、癌が転移しやすい環境 (癌転移前土壌) が形成されると考えられた。

一方で、AM-RAMP3系の癌における意義は不明であった。そこで今回我々は、新規の癌転移モデルを用いて、AM-RAMP2系とAM-RAMP3系の癌転移における病態生理学的意義の検討を進めた。

3. 臓器間転移モデル (DI-E-RAMP2^{-/-} マウスの解析)

まず、DI-E-RAMP2^{-/-}を用いてPAN02膵癌細胞を脾臓に移植し、自然に肝転移が確認される4週間後に解剖を行った。DI-E-RAMP2^{-/-}では、局所の腫瘍のサイズは小さいのに対し、転移は逆に亢進するという結果となり、先のメラノーマ細胞の肺転移の結果の再現性が確認された

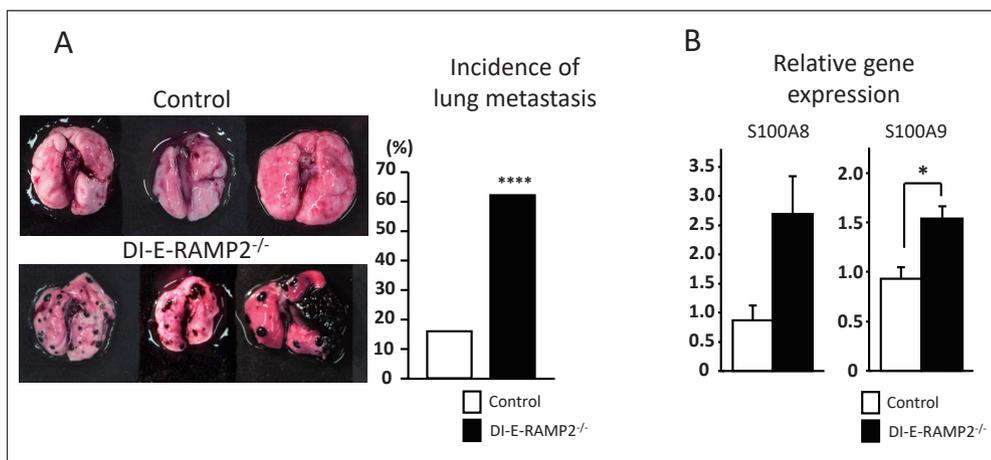


図 2. 自然肺転移モデルの検討
メラノーマ細胞をマウス足底部に移植し、3週間後に原発巣を摘出。さらに4週間後に肺への自然転移を観察した。DI-E-RAMP2^{-/-}では癌転移が亢進し (A)、転移巣でのS100A9の発現が亢進している (B)。

(図3A)。肝臓の転移巣における遺伝子発現変化を検討すると、ポドプラニン(PDPN)が発現亢進していた(図3B)。PDPNは、リンパ管のマーカーとして知られているが、それ以外にも、癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast; CAF)で発現していることが知られている。さらに最近、膵癌においてPDPN陽性のCAFが存在する例は予後不良であることが報告されている^[17]。実際にDI-E-RAMP2^{-/-}における肝臓の転移巣を観察すると、癌周囲の線維化亢進と、筋線維芽細胞のマーカーである α SMA陽性のCAFの増加を認め、これらのCAFはPDPN陽性であった。これらの結果から、DI-E-RAMP2^{-/-}では、癌微小環境におけるPDPN陽性CAFの存在が、癌の悪性度や転移亢進に関連している可能性が考えられた。

4. 臓器間転移モデル (RAMP3^{-/-}マウスの解析)

DI-E-RAMP2^{-/-}では、RAMP2の発現低下と共に、代償性に、RAMP3の発現が亢進していた。そこで次にRAMP3と癌転移の関連を検討するため、RAMP3^{-/-}マウスを用いて、同様の臓器間転移モデルの検討を行った。意外なことに、RAMP3^{-/-}では、DI-E-RAMP2^{-/-}とは反対に、膵癌細胞の肝臓への転移は、野生型マウスに比較して抑制されていた(図4A)。さらに、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、癌周囲のPDPN陽性CAFが減少していた。転移巣の遺伝子発現の検討では、腫瘍細胞遊走因子としてはたらくS100A8/A9の発現が有意に低下していた(図4B)。これらの結果から、RAMP3^{-/-}では、PDPN陽性CAFが減少することにより癌の悪性度が低下し、転移が抑制された可能性が考えられた。

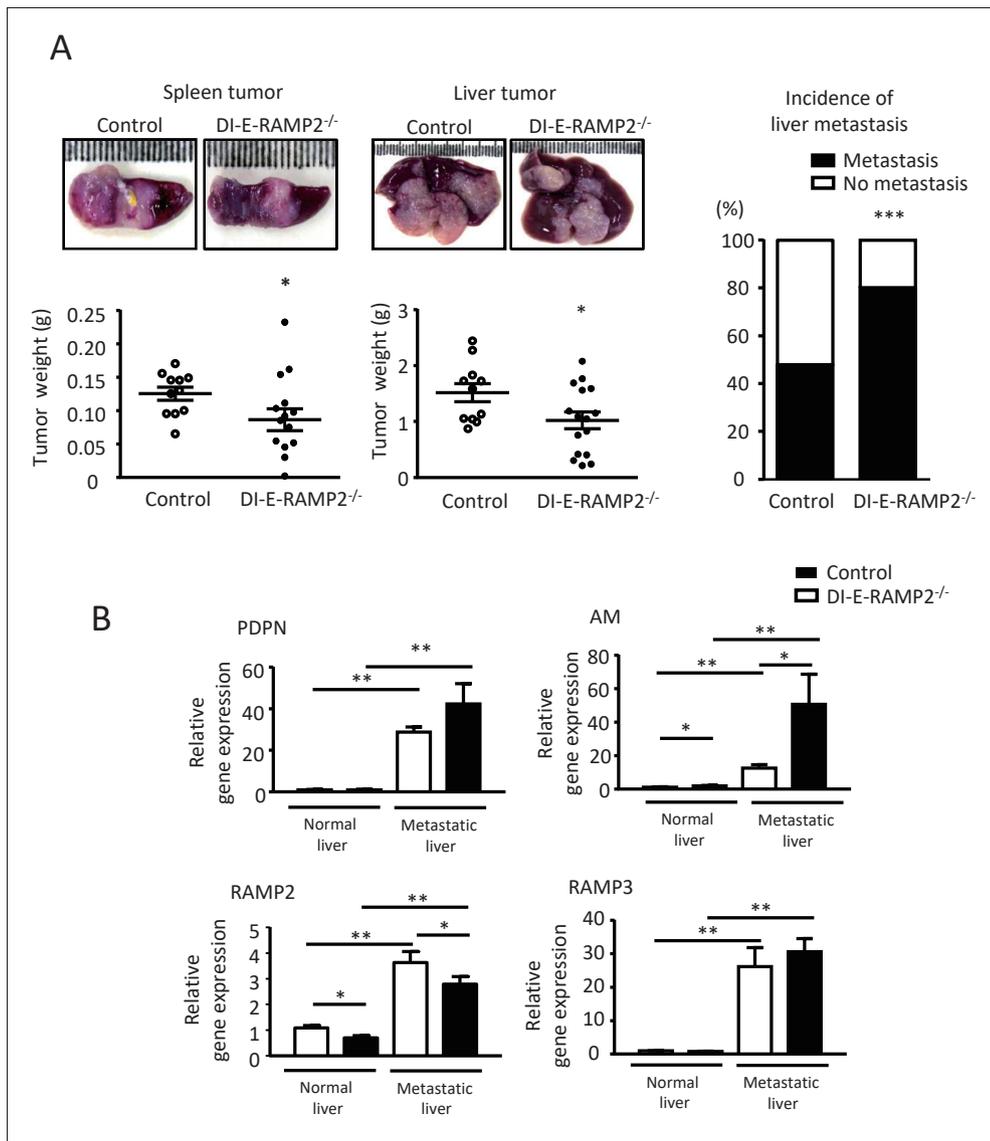


図3. 臓器間転移モデル(誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2^{-/-}))での検討。膵癌細胞を脾臓に移植し、4週間後の肝臓への自然転移を観察した。DI-E-RAMP2^{-/-}では、原発巣、転移巣の重量は低下するが、転移率は上昇する(A)。転移巣では、ポドプラニン(PDPN)およびRAMP3が高発現している(B)。

アドレノメデュリンー RAMP3 系欠損は、癌関連線維芽細胞のポドプラニン (PDPN) 発現を抑制し、臓器間転移を抑制する

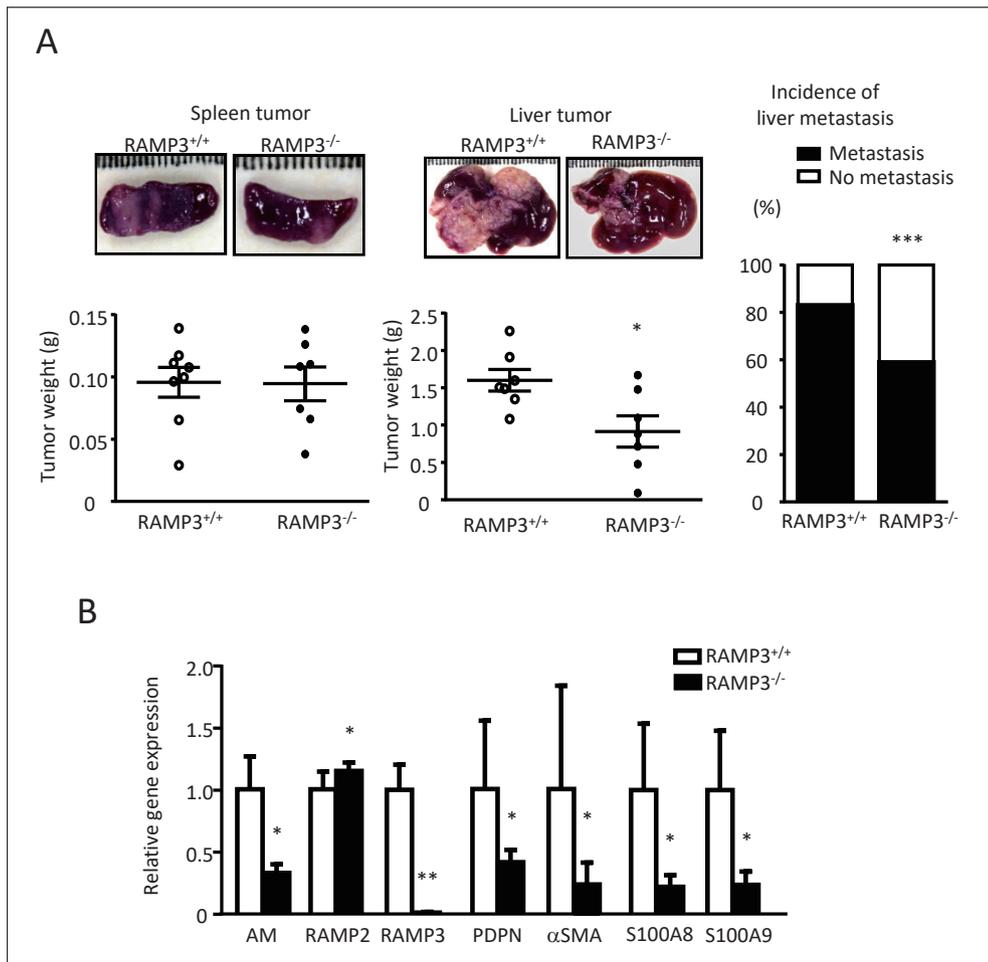


図4. 臓器間転移モデル (RAMP3ノックアウトマウス(RAMP3^{-/-}))での検討
 脾臓癌細胞を脾臓に移植し、4週間後の肝臓への自然転移を観察した。RAMP3^{-/-}では、転移率は低下(A)し、転移巣におけるPDPNやS100A8/A9の発現が低下している(B)。

5. RAMP3^{-/-}の癌関連線維芽細胞(CAF)における間葉上皮転換(MET)

RAMP3^{-/-}においては、PDPN陽性CAFの減少が、癌の悪性度低下につながったのではないかと考え、次に線維芽細胞におけるRAMP3とPDPNの関係の検討を進めた。胎児由来線維芽細胞(MEF)でRAMP3をノックダウンさせると、PDPNの発現も低下することから、RAMP3の下流にPDPNが存在することが確認された。次に、転移巣周辺からCAFを初代培養して検討を進めた。RAMP3^{-/-}由来CAFでは、PDPN発現調節に関わるSrc、Casの発現や活性も低下していた(図5A)。さらにPDPNは低分子量GタンパクであるRhoAの発現調節を介して、細胞骨格を制御しているとされるが、RAMP3^{-/-}では、RhoAの発現低下も確認された。以上から、RAMP3の下流にSrc-Cas-PDPN-RhoA系が存在することが明らかとなった。

さらにRAMP3^{-/-}由来CAFでは、野生型由来のCAFと比較してαSMAの発現低下を認め、細胞質内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形成が亢進しており、間葉上皮移行(MET;

Mesenchymal-Epithelial Transition)を生じていると考えられた。そこで、RAMP3^{-/-}由来CAFとPAN02細胞の共培養を行い、スクラッチアッセイを行ったところ、RAMP3^{-/-}由来CAFでは、細胞の遊走、増殖が抑制されていた(図5B)。さらにゲル収縮アッセイにおいても、RAMP3^{-/-}由来CAFの収縮能の低下が確認された(図5C)。

したがって、AM-RAMP3系は、腫瘍微小環境のCAFにおいて、Src/Cas-PDPN-RhoA系を介して細胞骨格、細胞遊走、細胞増殖を制御し、CAFの悪性度増強と、癌の転移亢進をもたらしているものと考えられた(図5D)。

実際にRAMP3^{-/-}由来CAFとPAN02細胞と混合し、マウスに皮下移植すると、癌の増殖が抑制されることが確認された(図6A)。さらに、RAMP3^{-/-}由来CAFとPAN02細胞と混合して脾臓に移植すると、肝転移も抑制された(図6B)。これらの結果から、RAMP3^{-/-}CAFは、癌増殖や転移を抑制する、いわば善玉のCAF(Benign CAF)となっていると考えられた。

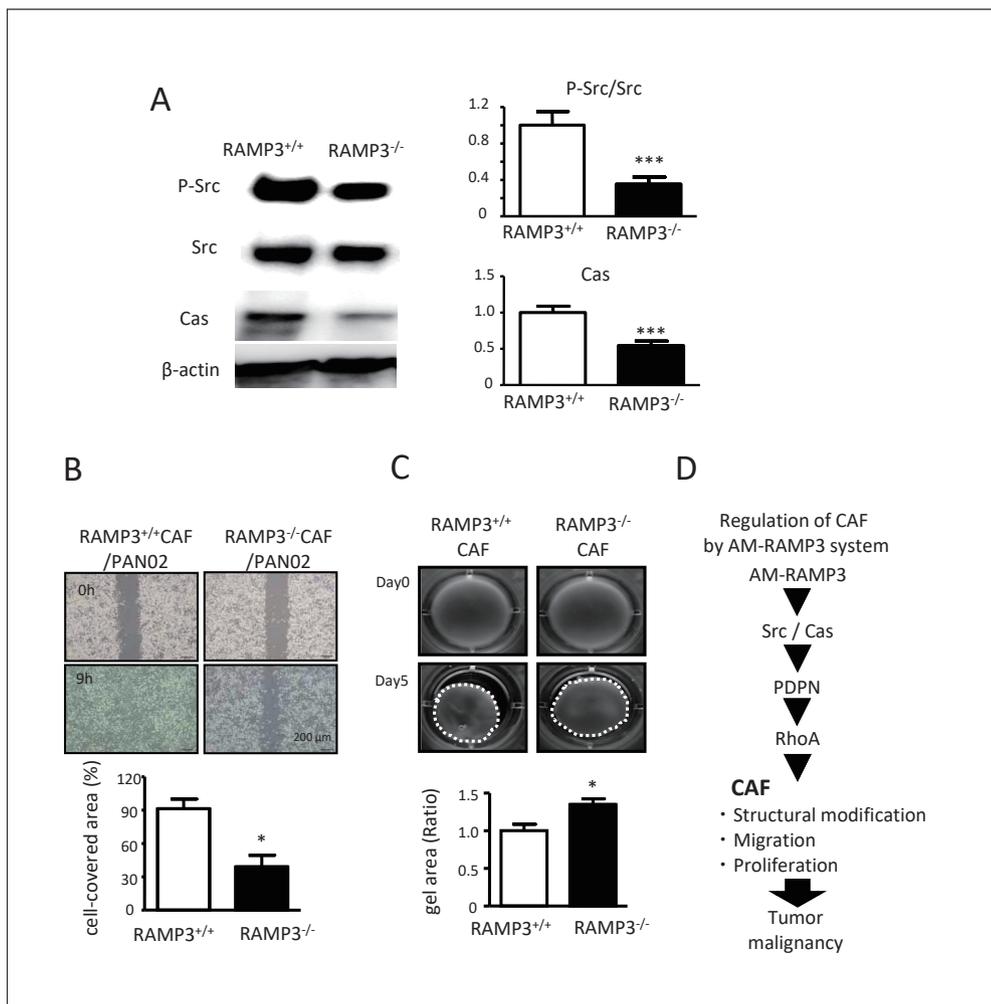


図5. RAMP3^{-/-}由来癌関連線維芽細胞(CAF)の検討
RAMP3^{-/-}由来CAFでは、PDPN発現調節に関わる、Src, Casの発現、活性が低下している(A)。RAMP3^{-/-}由来CAFでは、スクラッチアッセイによる細胞増殖、遊走が低下(B)しており、ゲル収縮アッセイでも収縮能の低下がみられる(C)。AM-RAMP3系は、Src/Cas-PDPN-RhoAを介して、CAFの増殖や遊走を制御し、癌の悪性度を増悪させると考えられる(D)。

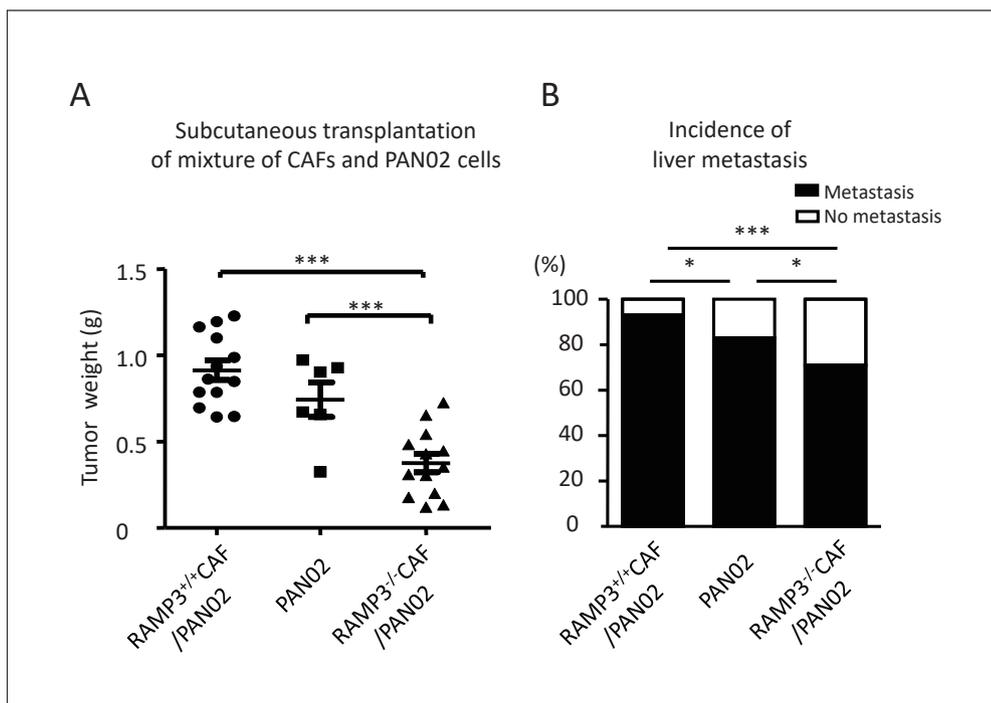


図6. 共培養したCAFと膵癌細胞の移植の検討
RAMP3^{-/-}由来CAFとPan02膵癌細胞を混合して皮下移植すると腫瘍の増殖は抑制され(A)、癌の転移も抑制される(B)。

アドレノメデュリンー RAMP3 系欠損は、癌関連線維芽細胞のポドプラニン (PDPN) 発現を抑制し、臓器間転移を抑制する

6. AM-RAMP2系の選択的活性化による癌転移の抑制

最後に、RAMP3^{-/-} に対してAMをポンプにて持続投与することで、AM-RAMP3系が遮断された状態で、AM-RAMP2系を選択的に活性化した状態において、同様の肝転移モデルを行った (図7A)。その結果、RAMP3^{-/-} にAMを投与した群は、投与しない群と比較して、肝臓の腫瘍重量が有意に低下 (図7B) し、肝臓への転移率も低下した (図7C)。さらに、RAMP3^{-/-} に対してAM投与した群では、PDPNおよびS100A8/9の発現低下を認めた (図7D)。したがって選択的なAM-RAMP2活性化は、癌の悪性度を低下させると考えられた。

総括

以上の結果から、DI-E-RAMP2^{-/-} では、AM-RAMP3系の代償性の亢進とPDPN発現亢進を生じ、癌の悪性度が増強したと考えられた。一方、RAMP3^{-/-} ではPDPN陽性CAFが減少し、AM-RAMP2系の亢進を生じた結果、悪性度が低下したと考えられた。AM-RAMP2系は血管の恒常性を維持し、転移を抑制する。AM-RAMP3系は癌微小環境内のCAFの悪性度を上昇し、転移を亢進させる (図8)。このことから、選択的なRAMP2の活性化とRAMP3の阻害が、臓器間転移抑制の新たな治療法になることが期待される。

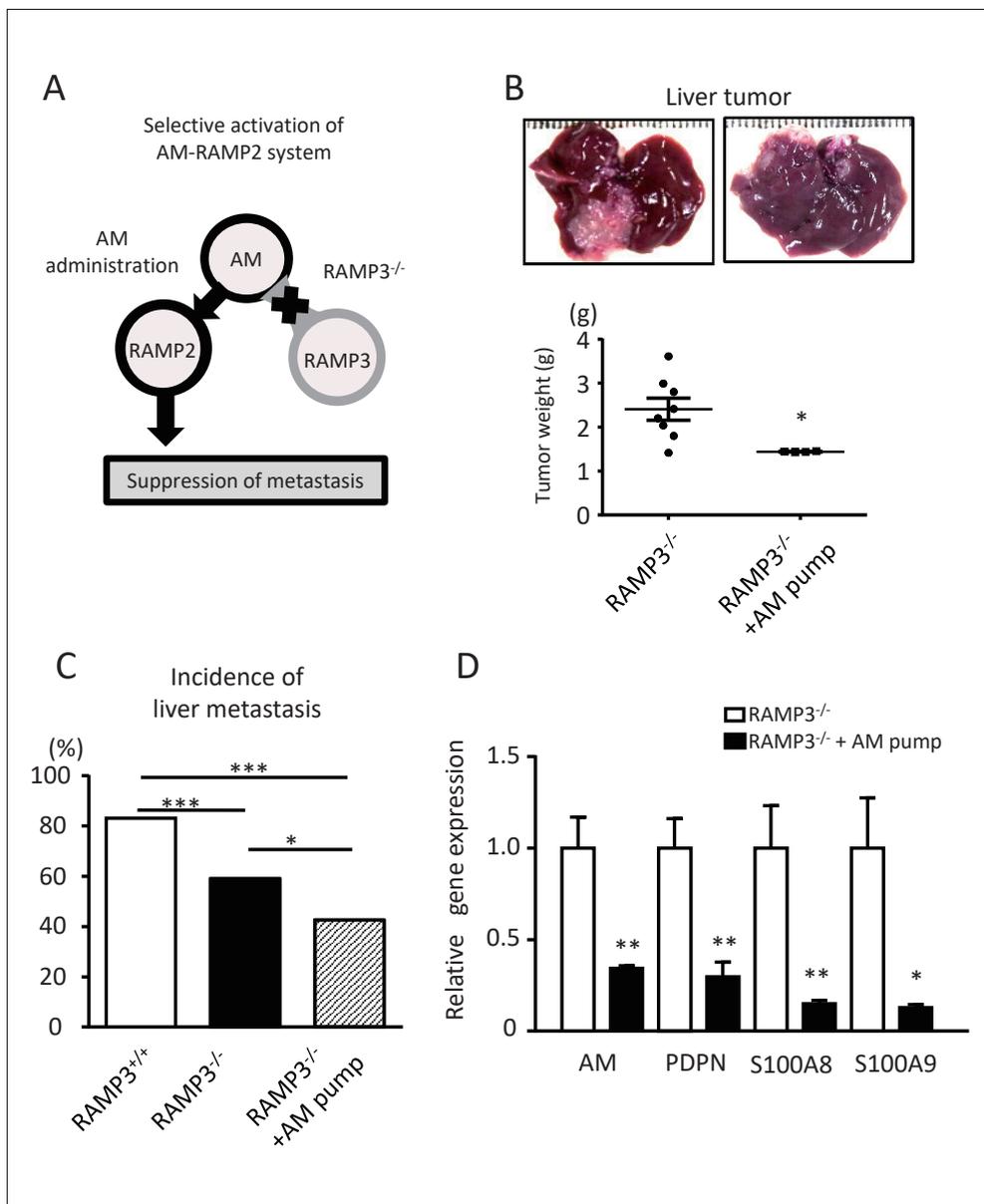


図7. AM-RAMP2系の選択的活性化状態における癌転移の検討
RAMP3^{-/-} に持続的にAMを投与して、AM-RAMP2系のみを選択的に活性化する(A)と、癌転移は抑制される(B, C)。さらに転移巣におけるPDPNやS100A8/A9の発現も低下する(D)。

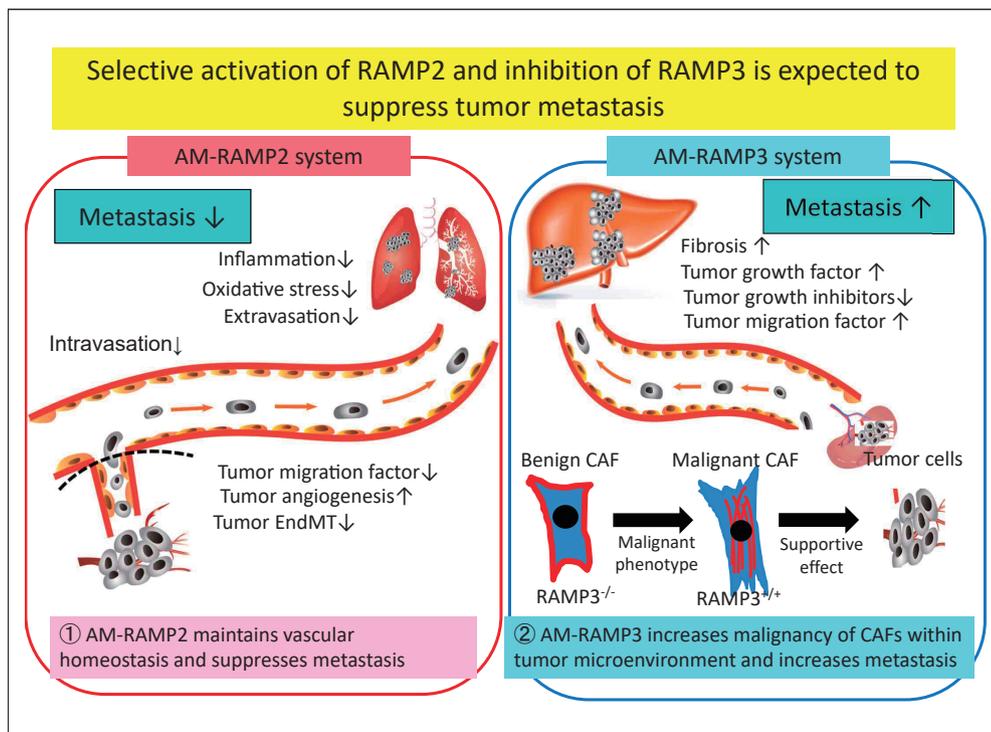


図 8. AM-RAMP2、RAMP3 系の癌転移における病態生理学的意義

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. Kitamura, K., et al., *Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 192(2): p. 553-60.
2. Shindo, T., et al., *Regulation of cardiovascular development and homeostasis by the adrenomedullin-RAMP system*. *Peptides*, 2019. 111: p. 55-61.
3. Kano, H., et al. *Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells*. *J Hypertens*, 1998. 14: 209-213.
4. Miyashita, K., et al., *Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells*. *Hypertens Res*, 2003. 26 Suppl: S93-98.
5. Iwasaki, H., et al., *Adrenomedullin as a novel growth-promoting factor for cultured vascular smooth muscle cells: role of tyrosine kinase-mediated mitogen-activated protein kinase activation*. *Endocrinology*, 1998. 139: 3432-3441.
6. Ashizuka, S., et al., *Adrenomedullin Therapy in Patients with Refractory Ulcerative Colitis: A Case Series*. *Dig Dis Sci*, 2016. 61(3): p.872-880.
7. McLatchie, L.M., et al., *RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor*. *Nature*, 1998. 393(6683): p. 333-9.
8. Ichikawa-Shindo, Y., et al., *The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity*. *J Clin Invest*, 2008. 118:29-39
9. Koyama, T., et al., *Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis*. *Circulation*, 2013. 127(7): p. 842-53.
10. Yamauchi, A., et al. *Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system*. *J Mol Cell Cardiol*. 2014. Dec;77:73-85.
11. Miller, M.J., et al., *Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor*. *J Biol Chem*, 1996.

アドレノメデュリンー RAMP3 系欠損は、癌関連線維芽細胞のポドプラニン (PDPN) 発現を抑制し、臓器間転移を抑制する

271(38): p. 23345-51.

12. Siclari, V.A., et al., *Tumor-expressed adrenomedullin accelerates breast cancer bone metastasis*. Breast Cancer Res, 2014. 16(6): p. 458.
13. Ramachandran, V., et al., *Adrenomedullin is expressed in pancreatic cancer and stimulates cell proliferation and invasion in an autocrine manner via the adrenomedullin receptor, ADMR*. Cancer Res, 2007. 67(6): p. 2666-75.
14. Tanaka, M., et al., *The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumour metastasis*. Cardiovasc Res, 2016. 111(4): p. 398-409.
15. Hiratsuka, S., et al., *The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase*. Nat Cell Biol, 2008. 10(11): p. 1349-55.
16. Hiratsuka, S., et al., *Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis*. Nat Cell Biol, 2006. 8(12): p. 1369-75.
17. Dauer, P., et al., *Inactivation of Cancer-Associated-Fibroblasts Disrupts Oncogenic Signaling in Pancreatic Cancer Cells and Promotes Its Regression*. Cancer Res, 2018. 78(5): p. 1321-1333.