

臓器間連携と恒常性を司る、新たな生理活性因子情報制御システムの解明と応用

新藤隆行, 桜井敬之, 神吉昭子

信州大学大学院医学系研究科 循環病態学講座

【研究の背景】

生体は生体内恒常性維持のために、精巧な「情報伝達因子」と「情報制御システム」を有しており、その機能不全や破綻は、様々な疾患の発症につながると考えられる。中でも液性生理活性因子は、全身の様々な細胞・臓器で産生され、生体内の恒常性維持とシステム間の相互連携における情報伝達因子の役割を果たしている。我々は、これまで循環系調節ホルモンとされてきたアドレノメデュリン (AM) が、細胞骨格や細胞間接着の制御、エネルギー代謝や小胞体ストレスの制御などにより、各細胞や臓器の恒常性そのものに必須の因子であることを報告してきた。

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 の受容体側に着目した。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。これらの一連の生理活性ペプチドは、7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体である、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 RAMP (receptor activity-modifying protein) タンパクのうち、いずれか 1 つが結合する。我々はこれらの一連の生理活性ペプチドがもたらした情報が、その受信側の細胞・臓器において、RAMP による生理活性因子の情報制御システム「RAMP システム」によって巧妙に情報処理、翻訳され、アウトプットとしての生理機能の多様性が生み出されていると考えた。

【目 的】

本研究では RAMP システムの応答不全や破綻から生じる病態を解明し、生活習慣病、慢性臓器障害、がんなどに対する新しい医療基盤を創出することを目的とした。

【方法および結果】

1. RAMP2 と RAMP3 の機能分化の解明

CLR に対し、RAMP2 または、RAMP3 のいずれか 1 つが結合すると、CLR は AM と親和性の高い受容体として機能するようになる。しかし、RAMP2 と RAMP3 の機能分化や病態生理学的意義は不明であった。本研究では、RAMP2 と RAMP3 について、胎生期から全身で遺伝子欠損させたマウス、あるいは成体において各組織特異的に遺伝子欠損を誘導できるマウスを樹立し、発生の異常や、成体での遺伝子欠損誘導後の脈管系の変化を検討し、両者の機能分化を検討した。

RAMP2 ノックアウトマウス(-/-)は、胎生期に全身の浮腫や出血により致死となったが、成体での遺伝子欠損誘導後、血管炎や臓器障害が自然発症することから、RAMP2 システムは血管の発生と恒常性維持双方に必須である事が示されたり。

一方、RAMP3 -/- は RAMP2 -/- と異なり正常に出生した。成体における術後リンパ浮腫モデルでは、血管、リンパ管特異的 RAMP2 -/- は共に、野生型マウスと比較して変化を認めなかったが、RAMP3 -/- のみで浮腫の増悪を認めた。RAMP3 -/- では、新生リンパ管数、血管数に変化はないものの、リンパ管の異常拡張、間質浮腫の増悪、炎症細胞浸潤の亢進が認められ、電子顕微鏡では、リンパ管内皮細胞におけるミトコンドリアの空胞変性、繫留フィラメントの形成不全が特徴的に観察された。インドシアニンググリーンを用いた耳介、尾部のリンパ管造影では、RAMP3 -/- においてリンパ管ドレナージ

の不良が認められた。さらに RAMP3^{-/-}では、腸管リンパ管による脂質の吸収遅延、乳糜の輸送障害が認められた²⁾。

以上の結果から、RAMP2 システムが発生段階の血管新生、成体での血管恒常性を制御しているのに対し、RAMP3 システムは成体でのリンパ管機能を制御している事がはじめて明らかとなった。

2. RAMP2 システムによる血管恒常性維持機構と、癌の転移抑制のための治療標的としての展開

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^{-/-})を樹立し、成体において RAMP2 欠損を誘導することで、癌の増殖と転移における RAMP2 システムの意義を検討した。DI-E-RAMP2^{-/-}では、皮下移植したメラノーマや肉腫の原発巣における血管新生と腫瘍増殖が抑制される一方で、足底部にメラノーマ細胞を移植し、一旦それを切除した後に生じる自然肺転移が著明に亢進していた。RAMP2 欠損誘導後の肺では、細胞骨格異常を伴う内皮細胞の構造異常や血管透過性亢進が生じ、傷害を受けた血管壁にマクロファージの集簇を認めた。さらに DI-E-RAMP2^{-/-}の肺では、S100A8/A9 とその下流の SAA3 などの腫瘍細胞遊走因子の高発現を認め、転移予定先臓器における「転移前土壌」が形成されることが明らかとなった。更に、原発巣の腫瘍血管では、血管内皮細胞が間葉系細胞に変化する内皮間葉系転換(EndMT)を伴う血管構造不安定化が確認され、これも癌の転移促進に寄与することが明らかとなった。一方 RAMP2 過剰発現マウスでは、腫瘍細胞の血管内皮への接着や、遠隔臓器への転移が抑制され、生存率が改善し、RAMP2 システムの活性化による癌転移抑制効果が示された³⁾。

以上の結果から、RAMP2 システムの血管恒常性機構に着目することで、原発巣摘出後の転移予防のためのアジュバントセラピーなどに、その応用が期待されると考えられた。

3. RAMP 結合低分子化合物のスクリーニング

RAMP 細胞外ドメインの立体構造解析データを元に、*in silico* スクリーニングにて、東大創薬機構ライブラリーより RAMP に結合する候補低分子化合物 321 個を選定した。当初、抗 cAMP 抗体を用いた *in cell analyzer* での解析を予定し、RAMP2 過剰発現内皮細胞、RAMP2 ノックアウト胎仔線維芽細胞など、数種類の細胞で条件設定を試みたが、cAMP の変動を検出するための S/N 比が低く、ポジティブコントロールとなるフォルスコリン投与による cAMP の上昇幅を検出することも困難であった。そこで cAMP 検出感度に優れる時間分解蛍光(TR-FRET)を利用した LANCE-Ultra cAMP システム(PerkinElmer)を用いたところ、非常に高感度に細胞内の cAMP の上昇を検出できることを見出した。この系を用いることで、現在までに RAMP2 特異的アゴニスト候補 26 種類、アンタゴニスト候補 21 種類を得て、さらなる評価を進めている。

4. RAMP システムのヒト型化マウスの開発

上述の様に、遺伝子改変マウスは有用な研究ツールではあるが、従来の ES 細胞を介した遺伝子改変法では、1 操作、1 遺伝子座、1 カ所の遺伝子改変しかできなかった。最近 CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変法(ゲノム編集法)が報告され、こうした限界を打破する事が期待されている。我々は母性型 Cas9mRNA/タンパク質を含有し、Cas9mRNA を顕微注入する必要がない新規のマウスラインを作製し、多遺伝子同時改変のためのマウス受精卵の開発に成功した。CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変マウスの作製は、Cas9 DNA(あるいは mRNA)と guide RNAs(gRNAs)を、マウス受精卵に注入することによってなされる。本研究で我々は、全身に Cas9 を過剰発現するトランスジェニックマウス(Tg)を作製し、このマウス由来の受精卵における非遺伝性の母性 Cas9(maCas9)を活用した。その結果、Tg/+卵母細胞と+/+精子由来の受精卵に存在する maCas9 タンパク質によって、目的どおりゲノムを編集することができた。さらに maCas9 を保持しているが非 Tg 型(+/+)である受精卵を活用することで、Cas9 導入遺伝子を有さない遺伝子改変マウスを作製することができた。さらに複数の異なる gRNA を注入することで、標的遺伝子座を同時編集することができることを確認した⁴⁾。Cas9 マウス由来の受精卵を利用することで、複数の遺伝子の同時編集が容易となることが期待され、現在我々は RAMP システムを全てヒト型に置き換えたマウス作製に応用している。

【考 察】

本研究において、一連の遺伝子改変マウスの解析から、各 RAMP を標的とした創薬研究を進める上での POC(Proof of

concept)を得る事が出来た。さらに RAMP を標的とした治療法開発に向けて、RAMP2 特異的なアゴニスト、アンタゴニスト作用を有する低分子化合物候補を複数得る事ができた。さらに CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変マウス作製法を改良し、ヒト型化したマウスを用いた治療候補薬の *in vivo* 評価系として応用する体制を整えることができた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

RAMP システムの様な生体内恒常性を制御するシステムを統合的に理解し、人為的に介入、操作することができれば、新しい創薬のパラダイムになると期待される。RAMP システムを足掛かりとして、「生理活性因子の情報制御システム」による生体内恒常性維持機構を明らかとし、新たな治療法開発へと展開することが今後の課題である。

【参考・引用文献】

- [1] Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T: Adrenomedullin-RAMP2 System in Vascular Endothelial Cells. *J Atheroscler Thromb* 2015, 22:647-53.
- [2] 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 the vascular system. *J Mol Cell Cardiol* 2014, 77:73-85.
- [3] 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 tumour metastasis. *Cardiovasc Res* 2016, 111:398-409.
- [4] Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Mori C, Watanabe S, Tanaka M, Uetake R, Sato M, Shindo T: A non-inheritable maternal Cas9-based multiple-gene editing system in mice. *Sci Rep* 2016, 6:20011.