

血管の恒常性制御は、癌転移抑制法となりうるか？

新藤隆行，桜井敬之，神吉昭子

信州大学医学部医学科 循環病態学教室

【研究の背景】

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。

【目 的】

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-/-)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-/-)のみが AM-/-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-/-)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。

【方法および結果】

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-/-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-/-)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-/-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-/-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-/-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、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-/-では、腫瘍内血管の CD31(血管内皮細胞マーカー

一)陽性細胞が減少し、対照的に α 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 $^{-/-}$ の肺血管内皮細胞の初代培養細胞を行い、TGF- β 刺激による 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、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 $^{-/-}$ と RAMP3 $^{-/-}$ 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 $^{-/-}$ 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 $^{-/-}$ 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。

一方で、RAMP3 $^{-/-}$ では、DI-E-RAMP2 $^{-/-}$ 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。さらに RAMP3 $^{-/-}$ 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 $^{-/-}$ 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。マイクロアレイ解析では、RAMP3 $^{-/-}$ 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 $^{-/-}$ -CAF は Pan02 脾癌細胞の増殖、遊走を抑制すると共に、RAMP3 $^{-/-}$ -CAF を Pan02 脾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 $^{-/-}$ -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 $^{-/-}$ 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 $^{-/-}$ よりもさらに抑制された。

【考 察】

以上の結果から、DI-E-RAMP2 $^{-/-}$ 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、転移が促進されたことが明らかとなった。

一方、RAMP3 $^{-/-}$ 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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

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。

【参考・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. Kakihara, 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.