

## 令和 2 年度研究助成 成果報告書

令和 3 年 3 月 18 日

所属 信州大学医学部 循環病態学教室

氏名 新藤 隆行



アドレノメデュリン(AM)は、血管をはじめ全身で広く産生され、多彩な生理活性を有する生理活性ペプチドである。我々は AM ノックアウトマウス(AM-/-)と、AM 受容体活性調節タンパクである RAMP2(receptor activity-modifying protein 2)のノックアウトマウス(RAMP2-/-)が、共に血管の発生異常により胎生致死となることから、AM-RAMP2 系が、血管新生にも必須であることを報告してきた。一方、AM は、様々な癌においても産生される。本研究では、腫瘍の増殖と転移における AM-RAMP2 系の意義の検討を行った。

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<sup>flox</sup>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。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。その一方で、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、TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現亢進が認められた。炎症は RAMP2 欠損誘導後も持続し、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)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-/-の腫瘍内血管では、内皮間葉系転換 (EndMT)が生じていると推測した。これを検証するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対し TGF- $\beta$  を添加し、EndMT の誘導実験を行なった。その結果、HUVEC に対し予め AM を投与しておくことで、EndMT 様変化が抑制され、内皮細胞の接着因子である VE-カドヘリンの発現と細胞膜直下のアクチン重合が亢進し、細胞間接着が強固になることが確認された。次に、DI-E-RAMP2-/-の肺血管内皮細胞の初代培養を行い、TGF- $\beta$  添加による 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、VE-カドヘリンの発現が低下してい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 DsRed を導入した B16F10 メラノーマ細胞を用いて、内皮細胞との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。最後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 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。

以上の結果から、血管内皮細胞の RAMP2 欠損により、①転移予定先臓器の血管における慢性炎症が、癌細胞の「転移前土壌」となり、癌の遠隔臓器への転移を促進させること、②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、これにより腫瘍細胞の血管内浸潤が亢進することが明らかとなった。

AM-RAMP2 系による血管恒常性維持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展開が期待される。

