

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	田中 愛
論文審査担当者	主 査 菅野 祐幸 副 査 田淵 克彦 ・ 多田 剛
<p>論文題目</p> <p style="text-align: center;">The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumor metastasis (内皮アドレノメデュリン-RAMP2系は血管恒常性を維持し、腫瘍転移を抑制する)</p>	
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>〔背景と目的〕</p> <p>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。</p> <p>〔材料及び方法〕</p> <p>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^{fllox}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。</p> <p>〔結果〕</p> <p>DI-E-RAMP2^{-/-}を用いてSarcoma180肉腫とB16F10メラノーマ細胞の皮下移植実験を行うと、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自然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した。</p> <p>DI-E-RAMP2^{-/-}において転移が亢進するメカニズムを明らかにするため、血管の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。腫瘍の転移前の早期の段階において、血管壁におけるマクロファージの接着や浸潤、それに伴い、TNF-α、IL-6などの炎症性サイトカインが上昇していた。炎症はRAMP2欠損後も持続し、その結果、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。</p> <p>次に、原発巣内の腫瘍血管について検討を進めると、DI-E-RAMP2^{-/-}では、腫瘍内血管内腔にCD31(血管内皮細胞マーカー)陽性細胞が減少し、αSMA(間葉系マーカー)陽性細胞が多数存在していた。このことから、DI-E-RAMP2^{-/-}の腫瘍血管では、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、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)に対し、TGF-βを添加し、EndMT誘導実験を行った。その結果、HUVECに予め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-カドヘリンの発現が亢進し、細胞間接着が強固であることが明らかとなった。そこで、肺血管内皮細胞の初代培養を行い、TGF-β添加によるEndMT誘導実験を行うと、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、有意に増加していた。</p> <p>逆にAM-RAMP2系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(RAMP20/E)を樹立し、血管透過性アッセイを行うとRAMP20/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、内皮細胞と重層培養法にて接着の評価を行うと、RAMP20/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。</p> <p>〔結論〕</p> <p>以上の結果から、血管内皮細胞のRAMP2欠損は、腫瘍血管新生を抑制する一方で、転移を促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。</p>	