

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	戴 昆
論文審査担当者	主 査 菅野 祐 幸 副 査 多田 剛 ・ 田 淵 克 彦
論文題目	Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through modification of cancer-associated fibroblasts (アドレノメデュリン (AM) -RAMP3 系の欠損は、癌関連線維芽細胞の性質を変化させ、臓器間転移を抑制する)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景】アドレノメデュリン(AM)は全身で広く産生され、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、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すことから、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、AM は様々な癌においても産生されている。我々は成体において、血管内皮細胞の RAMP2 を欠損誘導できるマウス(DI-E-RAMP2^{-/-})を樹立し、B16F10 メラノーマ細胞の皮下移植実験を行った。DI-E-RAMP2^{-/-}ではコントロールマウスと比較して、皮下移植した原発巣のサイズが縮小するのに対し、原発巣摘出後の肺への転移が亢進することを見出し、AM-RAMP2 系による血管恒常性維持作用が、癌の転移を抑制することを報告した(Cardiovasc Res, 2016)。一方で膵癌は予後不良で、術後肝転移しやすいことが重要な問題点である。また、ヒト膵癌サンプルでは RAMP3 の発現が上昇していることも報告されている。本研究では DI-E-RAMP2^{-/-}と RAMP3^{-/-}マウスを用いて、臓器間転移における AM-RAMP2、3 系の意義を検討した。</p> <p>【方法と結果】PAN02 膵癌細胞を脾臓に移植し、3 および 4 週間後、肝臓への転移を検討した。DI-E-RAMP2^{-/-}では、原発巣サイズが縮小するのに対し、肝臓への転移は亢進しており、先の実験結果の再現性が確認された。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、α SMA 陽性の癌関連線維芽細胞(CAF)の増加を認め、これらの CAF はポドプラニン(PDPN)陽性であった。臨床上、PDPN 陽性 CAF が存在する癌は、予後不良であること報告されている。一方、DI-E-RAMP2^{-/-}では、RAMP2 発現低下と共に RAMP3 発現が代償性に亢進していた。そこで次に、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。RAMP3^{-/-}マウスは、RAMP2^{-/-}と異なり正常に生まれ、成体が得られた。RAMP3^{-/-}を用いて癌転移実験を行うと、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、肝臓への転移が抑制されていた。さらに、DI-E-RAMP2^{-/-}とは異なり、癌周囲の PDPN 陽性 CAF が減少していた。そこで、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 の発現も低下した。さらに PAN02 細胞の細胞上清で刺激した RAMP3^{-/-}の MEF では、PDPN 発現調節に関わる Src、Cas の活性も低下していたことから、RAMP3 の下流に Src-Cas-PDPN 系が存在することが明らかとなった。</p> <p>次に、転移巣周辺から CAF を初代培養して検討を進めた。PAN02 細胞の培養上清刺激下において、RAMP3^{-/-}由来 CAF では α SMA の発現低下を認めた。また RAMP3^{-/-} CAF では、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)を生じていると考えられた。さらに RAMP3^{-/-} CAF では、PAN02 細胞との共培養系において、細胞の遊走、増殖が抑制されていた。アレー解析において、RAMP3^{-/-} CAF では癌増殖因子の発現低下と共に、抑制因子の発現亢進を認めた。そこで、RAMP3^{-/-} CAF の細胞上清を PAN02 細胞に添加すると、間葉系マーカーである Vimentin の発現低下が認められ、PAN02 細胞の増殖、遊走も抑制された。実際に RAMP3^{-/-} CAF と PAN02 細胞を混合してマウスに移植すると、癌のサイズは抑制され、肝転移も減少したことから、RAMP3^{-/-} CAF は癌増殖や転移を抑制する、いわば良性の CAF となっていると考えられた。最後に、RAMP3^{-/-}に対して AM を持続投与し、AM-RAMP3 系を阻害した状態で、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。</p> <p>【結論】以上から、DI-E-RAMP2^{-/-}では、AM-RAMP3 系の代償性亢進が、PDPN の発現亢進を生じ、癌の悪性度が増強したと考えられた。一方、RAMP3^{-/-}では悪性度の高い PDPN 陽性 CAF が減少した結果、癌転移が抑制されたと考えられた。選択的な RAMP2 活性化と RAMP3 阻害が癌転移抑制の新たな治療法になることが期待される。</p>

