

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06508

研究課題名(和文) 組織恒常性維持応答機構におけるアンジオポエチン様因子2の機能解明

研究課題名(英文) ANGPTL2 controls intestinal homeostasis

研究代表者

堀口 晴紀(Horiguchi, Haruki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特定事業研究員

研究者番号：70755454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸疾患における腸組織由来ANGPTL2の組織修復機構に基づく組織恒常性維持機構における役割および分子メカニズムを明らかにした。デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を用いた大腸炎マウスモデルにおいて、Angptl2ノックアウトマウスが組織損傷修復不全により大腸炎の病態が進行した。ANGPTL2の作用メカニズムとして、腸管上皮幹細胞ニッチの一員である筋線維芽細胞から分泌されたANGPTL2はオートクリン作用でインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介しNF- κ Bを活性化することで、腸管上皮幹細胞を負に制御するBMPの発現を抑制し、腸管上皮幹細胞の幹細胞性を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We assessed ANGPTL2 function in intestinal physiology and disease in vivo. Although intestinal development proceeded normally in Angptl2-deficient mice, expression levels of the intestinal stem cell (ISC) marker gene Lgr5 decreased, which was associated with decreased transcriptional activity of β -catenin in Angptl2-deficient mice. Epithelial regeneration after injury was significantly impaired in Angptl2-deficient relative to wild-type mice. ANGPTL2 was expressed and functioned within the mesenchymal compartment cells known as intestinal subepithelial myofibroblasts (ISEMFs). ANGPTL2 derived from ISEMFs maintained the intestinal stem cell niche by modulating levels of competing signaling between bone morphogenetic protein (BMP) and β -catenin. These results support the importance of ANGPTL2 in the stem cell niche in regulating stemness and epithelial wound healing in the intestine.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：潰瘍性大腸炎 アンジオポエチン様2

1. 研究開始当初の背景

近年の生活習慣の多様化により、我々の生体内では様々な内的・外的ストレスに常に暴露されており、各組織では機能的、構造的に微小な損傷が生じている。この組織損傷の修復には、細胞間接着や液性因子を介した相互作用によって生じる組織リモデリングが、生体恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている。腸管内腔は外因性あるいは内因性ストレスを受けやすい部位であり、絶えず修復が行われ組織恒常性が維持されている。しかしながら、重度な炎症性大腸疾患では、腸管上皮の再生が間に合わず腸管機能障害へと進展するため、組織再生医療の開発が期待されている。アンジオポエチン様因子2(ANGPTL2)は、組織リモデリングによる損傷修復を促進し、組織における微小環境の恒常性維持に寄与する因子である。本研究では、大腸におけるANGPTL2の発現と組織恒常性維持機構・再生機構の役割を明らかにし、炎症性大腸疾患の治療法開発の基盤研究を行う。

2. 研究の目的

近年、生体内の損傷を修復し機能的に組織の恒常性を維持する機構として、細胞間接着や液性因子を介した相互作用により誘導される可逆的な組織リモデリングが重要であることが注目されている。また、慢性炎症によって惹起される不可逆的な組織リモデリングは、臓器の機能障害をもたらす、生活習慣病などの様々な疾患発症につながるものが解明されてきている。申請者らは、この恒常性維持機構の過剰応答、破綻に起因する慢性炎症の観点から、さまざまな疾患の分子機構を捉え直し、恒常性維持応答機構の経時的変化と病態との関連を解明してきた。その成果として、申請者らはANGPTL2が腹部大動脈瘤の進展や血管内皮機能不全、動脈硬化の進展を促進する因子であること、加齢や露光によって生じた組織損傷修復のための応答機構として誘導されたANGPTL2発現上昇が、生体の恒常性維持機構の変容を引き起こし、慢性炎症、組織におけるDNA修復機構の変調が惹起され、発がん感受性を高めることを明らかにした。さらに肺がんや乳がん、骨肉腫における腫瘍微小環境の変化がANGPTL2発現の上昇を惹起し、転移を促進することを明らかにした。以上の結果より、ANGPTL2は生体の恒常性維持に重要な鍵因子であり、その変容が疾患の発症・進展に関与していることを見出した。

また、高い組織再生能を持ったモデル生物として知られているゼブラフィッシュを用いた解析においても、ANGPTL2の重要性が報告されている。ゼブラフィッシュの尾ヒレを

切断すると、尾ヒレの再生が活発になる切断後12~48時間の時期にANGPTL2発現が誘導されることが見いだされており、特に脱分化した細胞が集合し再生の起点となる芽体(blastema)においてANGPTL2が発現し、ANGPTL2が組織の損傷修復に関与することが示唆されている。

さらに最近、申請者は大腸がんの抗がん剤抵抗性メカニズムの研究解析において、ANGPTL2が抗アポトーシス制御因子であるBCL-2、BCL-XLを誘導することを見出しており、正常大腸におけるANGPTL2の発現が組織恒常性維持に関与している可能性も十分考えられる。

また最近、ANGPTL2はleukocyte immunoglobulin like receptor (LILR)B2と結合し、幹細胞の増殖を促進するということがNature誌に報告され注目されており、ANGPTL2が免疫系の細胞に作用し免疫機能を調節することで、腸管組織における恒常性維持に関与している可能性も考えられる。以上の結果より、ANGPTL2は腸管組織において、可逆的な組織リモデリングによる組織損傷修復・恒常性維持機構を介して重要な役割を有していると考えられる。

本申請研究では、正常腸管組織におけるANGPTL2の発現解析、腸管組織損傷修復モデルにおけるANGPTL2の機能解析、ANGPTL2の腸管上皮細胞、間質細胞に対する作用機構の解明、ANGPTL2をターゲットとした重度炎症性腸疾患に対する治療法開発の基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1)DSS 腸管組織損傷修復モデル

DSS潰瘍性大腸炎モデルは腸管上皮細胞の組織修復モデルとして確立されており、申請者らは既に野生型マウスを用いてDSSモデルの実験系を立ち上げている。本申請研究では、Angptl2 KOマウスを用いてDSSモデルを作製し、体重減少、下痢、腸管出血、腸の短縮などの腸炎を反映する病態を野生型マウスとの間で比較検討を行い、ANGPTL2の組織損傷における再生機能への関与を評価する。

(2)腸管組織におけるANGPTL2の発現解析

本申請研究の準備的研究により、申請者らはマウス大腸組織においてANGPTL2が腸管上皮幹細胞、吸収上皮細胞、間質細胞に強く発現していることを見出している。本研究では、マウス大腸組織からフローサイトメトリーによるソーティングにより各細胞に分離し、mRNA、タンパク質解析を行い、ANGPTL2がどの細胞から発現をしているか詳細に解析する。

(3)腸管上皮オルガノイド培養システムによ

る解析

腸管上皮の3次元オルガノイド培養は、構造体には機能的な細胞が生体内組織と同様な配置を示しており、腸管組織の恒常性維持機構の解明には有用な手段である。野生型マウス、ANGPTL2 KO マウスの腸管より上皮細胞を分離し、増殖因子存在下のマトリゲル内で培養を行いオルガノイド形成の効率を比較する。また、ANGPTL2 リコンビナントタンパク添加によるオルガノイド形成能を解析することでオルガノイド形成過程におけるANGPTL2 の機能解析を行う。さらに、培養後のオルガノイドに DSS を添加することで DSS マウスモデルの生体内における腸管組織損傷修復機構を *in vitro* のライブイメージングにより明らかにすることができると考えられる。また、ANGPTL2 は腸管上皮幹細胞に発現しているため、野生型、Angpt12 KO マウスからフローサイトメトリーにより上皮幹細胞をソーティングし、単一の上皮幹細胞からのオルガノイド形成能を比較することで、ANGPTL2 の上皮幹細胞における機能を検討する。なお、オルガノイド培養システムは京都産業大学 川根公樹准教授が既に立ち上げており、川根准教授の指導の下で遂行する。

(4)ANGPTL2 による組織修復メカニズム解析

腸管の恒常性維持・組織修復には上皮幹細胞の機能が重要である。野生型、Angpt12 KO マウス (DSS モデル群、コントロール群) から腸管上皮を分離、さらに上皮幹細胞を単離し、遺伝子解析・細胞内シグナル解析を行い、さらに受容体の同定を行う。これらについてはオルガノイドでも同様に行う。

(5)ANGPTL2 の間質細胞への作用機序解明

ANGPTL2 は分泌タンパクであるため、上皮幹細胞から分泌された ANGPTL2 が周囲の幹細胞ニッチを形成する筋線維芽細胞、あるいは免疫細胞に作用し、腸管組織の恒常性維持を担っている可能性が考えられる。特に、筋線維芽細胞は上皮幹細胞の機能維持に重要な役割を有しており、Wnt を始めとした増殖因子シグナルを上皮幹細胞に伝えている。さらに、炎症性腸疾患においてはマクロファージを始めとした免疫細胞の働きが重要であり、ANGPTL2 のこれらの間質細胞に対する作用機序の解明は重要である。野生型、Angpt12 KO マウス (DSS モデル群、コントロール群) から筋線維芽細胞およびマクロファージを単離し、種々の増殖因子、サイトカインの発現を解析することで ANGPTL2 が間質細胞に与える影響を検討する。

(6)ANGPTL2 タンパクを用いた新規腸疾患治療法開発の基盤研究

ANGPTL2 は腸管組織において恒常性維持・組織再生に関与すると考えられる。また、申請者らは ANGPTL2 が細胞のアポトーシスを抑制することを報告しており、ANGPTL2 による腸管疾患治療に繋がる可能性が示唆される。マウス DSS モデルを作製し、ANGPTL2 リコンビナントタンパクを腸管に直接投与することで病態が改善されるか検討する。さらに、ANGPTL2 を過剰発現する腸上皮オルガノイドを樹立し、野生型マウス、Angpt12 KO マウスの腸管に移植し、組織修復が亢進するか検討する。

4. 研究成果

(1) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いた大腸炎マウスモデルにおいて、Angpt12 ノックアウトマウスが組織損傷修復不全により生存率の低下、体重減少、腸管出血、下痢などの大腸炎の病態が進行する。腸管は組織損傷により短くなるが、Angpt12 ノックアウトマウスでは野生型に比べて腸が短縮しており、組織学的初見においても、腸管粘膜上皮細胞の修復不全が認められた (図 1)。これらの結果から、ANGPTL2 は腸組織修復に重要な機能を有していることが示唆された。

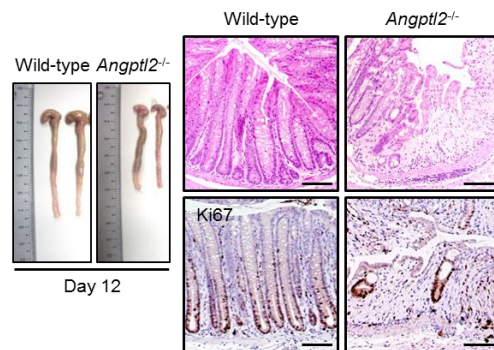


図 1

(2) 免疫染色および mRNA 解析により、大腸において ANGPTL2 は腸管上皮細胞には発現していないが、幹細胞ニッチとして知られる上皮筋線維芽細胞に強く発現していた。Angpt12 KO マウス由来の筋線維芽細胞ではニッチ因子の Bmp2, 7 の発現が上昇していた。BMP は Wnt シグナルに抑制的に働くことで ISC の自己複製を抑制すると考えられており、Angpt12 KO マウスの ISC では実際に Wnt- β -catenin シグナルが減弱していた。

(3) ANGPTL2 の機能的受容体としてこれまでにインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が同定されている。大腸の筋線維芽細胞においてもインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の発現が認められた。そこで、WT マウス由来の筋線維芽細胞に抗インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 中和抗体による阻害実験を行ったところ

Bmp2, 7 の発現が上昇した。さらに、NF- κ B 阻害剤存在下での Bmp 発現を検討した結果、Bmp 2, 7 の発現が大幅に上昇したことから、ANGPTL2 はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ -NF- κ B シグナルを介して Bmp2, 7 の発現を抑制していることが示唆された。

(4) Angpt12 KO マウスにおける組織修復不全が筋線維芽細胞由来 BMP に依存的であるか検討するために、オルガノイド・筋線維芽細胞共培養を行った。BMP 阻害剤である Noggin の存在下では、WT および Angpt12 KO マウス由来筋線維芽細胞と共培養した腸上皮細胞はいずれも完全なオルガノイド形成を認めた。一方、Noggin 非存在下では Angpt12 KO マウス由来筋線維芽細胞との共培養ではオルガノイド形成が低下した。これらの結果から、Angpt12 KO マウスにおける組織修復不全が BMP の高発現によるものであると考えられた。

(5) 申請者は、腸管上皮幹細胞ニッチの一員である筋線維芽細胞から分泌された ANGPTL2 はオートクリン作用でインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介し NF- κ B を活性化することで、腸管上皮幹細胞を負に制御する BMP の発現を抑制し、腸管上皮幹細胞の幹細胞性を制御していることを見出した (図 2)。ANGPTL2 は、幹細胞ニッチを適切に整えることで組織リモデリングによる損傷修復を促進し腸管における恒常性維持に寄与していると考えられる。

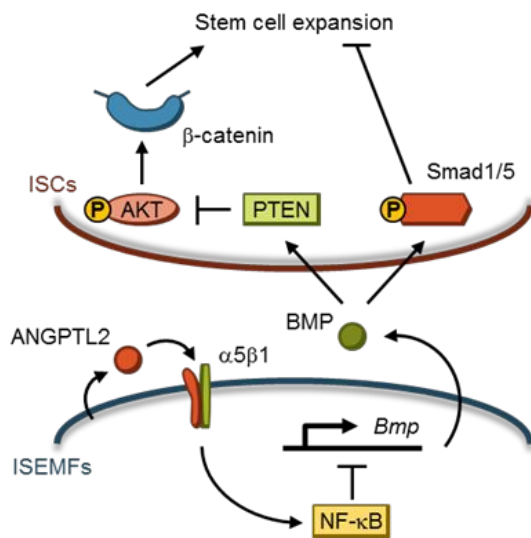


図 2

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K, Oike Y. ANGPTL2

expression in intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. The EMBO Journal. 2017 Feb 15;36(4):409-424.

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口晴紀 (HORIGUCHI, Haruki)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・
特定事業研究員
研究者番号：70755454

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()