

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20008

研究課題名(和文) アンジオポエチン様因子2の切断を標的とする新規がん転移抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic approach targeting the processing of angiopoietin-like protein 2 for suppressing of tumor metastasis

研究代表者

小田切 陽樹 (Odagiri, Haruki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・客員助教

研究者番号：60732740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果として、プロセッシングによるANGPTL2の機能制御においては、ANGPTL2の切断に関わるBMP-1 (bone morphogenic protein-1) / TLD (tolloid) ファミリー分子のなかでもTLL1 (tolloid-like 1) が主要な制御因子であると考えられた。さらに、ANGPTL2がO型糖鎖修飾を受けること、同修飾がTLL1による切断に対して保護的に作用していることを見出し、がん細胞におけるTLL1の活性や発現の亢進に加え、ANGPTL2のO型糖鎖修飾を抑制することが、ANGPTL2シグナルを介したがん転移に対する新規治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here, we show that TLL1 (tolloid-like 1) predominantly contributes to the processing of ANGPTL2 among BMP-1 (bone morphogenic protein-1)/TLD (tolloid) family proteins. In addition, we found that secreted ANGPTL2 proteins are O-glycosylated in the conditioned medium of human tumor cell lines. We also identified an O-glycosylation site of ANGPTL2 protein and showed that ANGPTL2 proteins containing the mutated O-glycosylation site exhibit increased susceptibility to cleavage by TLL1. These results suggest that O-glycosylation of ANGPTL2 protein is important for protection from cleavage by TLL1. Therefore, not only promoting the activity and expression of TLL1, but also suppressing the O-glycosylation of ANGPTL2 protein in tumor cells may be a novel therapeutic approach for ANGPTL2 signaling-mediated tumor metastasis.

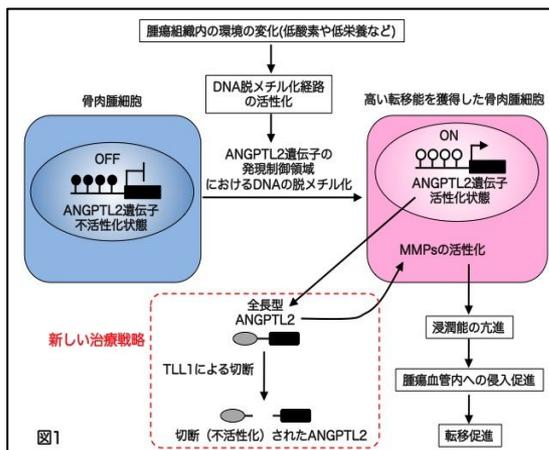
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん ANGPTL2 プロセッシング

1. 研究開始当初の背景

骨の悪性腫瘍のうち最も発症頻度が高い原発性の骨腫瘍である骨肉腫は、その多くが10代から20代にかけて発症する。近年、化学療法の導入により、5年生存率は70%程度まで改善しているが、それ以上の生存率の改善には至っていない。骨肉腫における主な死亡原因は肺転移であることから、いかに肺転移を抑制するかが重要であり、より効果的に肺転移を抑制する手法の開発が課題である。従って、骨肉腫の転移メカニズムを明らかにし、新たな転移抑制法開発に向けた基盤技術の創出が重要である。

我々は、これまでに ANGPTL ファミリー分子の1つである ANGPTL2 が、慢性炎症を基盤病態とする様々な疾患の発症・進展に関与する炎症関連因子であることを明らかにしてきた。慢性炎症は発がんやがんの進展・転移にも関与しており、我々は正常組織における ANGPTL2 の持続的な発現増加が発がんに関与することを明らかにした。さらに、がん細胞においては微小環境の変化により ANGPTL2 発現が誘導され、がん細胞から分泌された ANGPTL2 がオートクリンまたはパラクリン的に作用し、がん細胞の遊走能や浸潤能、腫瘍血管新生を促進することで、高い転移能を示すことを明らかにした。最近、我々は、低酸素や低栄養などの腫瘍微小環境によりがん細胞における ANGPTL2 プロモーター領域の DNA 脱メチル化が誘導され、ANGPTL2 発現が誘導されること、骨肉腫細胞から分泌された ANGPTL2 が腫瘍血管新生や腫瘍細胞の浸潤能を亢進させ、腫瘍細胞の血管内侵入を促進することで、肺転移を促進することを明らかにした(図1)。



また、骨肉腫細胞における ANGPTL2 ノックダウンは肺転移の減少に繋がることから、ANGPTL2 シグナルを抑制することが転移抑制に重要であることが示唆された。さらに、分泌された ANGPTL2 が tolloid-like 1 (TLL1) によって切断されること、切断により ANGPTL2 が不活性化され、がん転移促進作用が消失すること(図1)。さらに、骨肉腫患者の腫瘍組織では、ANGPTL2 の発現レベルが高

いのに対し、TLL1 発現レベルは著しく低下していることを見出しており、TLL1 の発現や活性化を促進することで ANGPTL2 の切断を増強することが、新たながん転移抑制法となる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍細胞における TLL1 発現や活性化を促進する低分子化合物を同定し、TLL1 による ANGPTL2 切断を標的とした新たな骨肉腫の肺転移抑制法の開発を目指す。また、我々は、骨芽細胞より豊富に ANGPTL2 が発現していること、骨微小環境における ANGPTL2 が内軟骨性骨化に関与していること、TLL1 の基質としてコラーゲン前駆体等の骨基質が多く含まれていることが知られていることから、骨形成における TLL1 の意義その作用機構を解明し、骨代謝性疾患の新規予防・治療法開発に向けた基盤研究を併せて行う。

3. 研究の方法

(1) TLL1 発現モニタリング骨肉腫細胞および骨芽細胞特異的 TLL1 トランスジェニックマウスの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって TLL1 プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子をノックインした TLL1 発現モニタリング骨肉腫細胞の樹立するため、ヒト TLL1 遺伝子の 5'側非翻訳領域の直後にホタルルシフェラーゼ遺伝子を相同組換えにより挿入するためのドナーベクターおよび当該領域を標的としたガイド RNA 配列を含む Cas9 発現ベクターを作製した。作製した各ベクターをヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞に導入した。

骨芽細胞特異的に TLL1 を発現するトランスジェニックマウスを作製するため、コラーゲン II (Col2) プロモーター配列直後に TLL1 遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。得られたプラスミドを制限酵素により直鎖化し、精製したものをを用いてトランスジェニックマウスの作製を行った。

(2) BMP-1/TLD ファミリーによる ANGPTL2 のプロセッシング機構解析

ANGPTL2 の切断に関わる TLL1 は、BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) / TLD (tollid) ファミリーに属しており、TLL1 以外のファミリーメンバーとして TLL2 (tollid-like 2) や BMP-1/mTLD (mammalian tollid) が存在する。そこで、TLL1 に加え、TLL2、mTLD の組換え型タンパク質を作製するため CHO-S 細胞に各分子の発現プラスミドを導入し、培養上清中に分泌された BMP-1/TLD ファミリータンパク質の精製を行った。得られた各 BMP-1/TLD ファミリータンパク質と組換え型全長 ANGPTL2 タンパク質を 37 °C で 4 時間反応させ、ウエスタンブロッティングにて ANGPTL2 の切断活性を評価した。

ANGPTL2 を恒常的に高発現するヒト胎児由

来腎細胞株 (HEK293/ANGPTL2) を用いて、各 BMP-1/TLD ファミリー分子および PC (proprotein convertase) である Furin、PC5/6A または PACE4 をともに発現させ、培養上精中における ANGPTL2 の切断活性をウエスタンブロッティングにて評価した。

(3) ANGPTL2 糖鎖修飾と TLL1 によるプロセシングとの関連解析

ANGPTL2 を恒常的に高発現するヒト子宮頸がん細胞株 HeLa-S3 の培養上精より精製した ANGPTL2 タンパク質を PNGase F もしくは Neuramidase と O-glycosidase 存在下にて 37 °C で 1 時間反応させ、ウエスタンブロッティングにて ANGPTL2 の分子量変化を評価した。また、in silico 解析により予測された ANGPTL2 の O 型糖鎖付加部位のセリン残基をアラニン残基に変異させた各変異体を作製し、HeLa-S3 細胞にて発現させた。培養上精より得られた変異体タンパク質を用いてウエスタンブロッティングにてその分子量変化を評価した。野生型の ANGPTL2 および上記変異体タンパク質を恒常的に高発現する HeLa-S3 細胞に TLL1 を一過的に発現させ、その培養上精中における ANGPTL2 の切断感受性をウエスタンブロッティングにて評価した。

4. 研究成果

(1) TLL1 発現モニタリング骨肉腫細胞および骨芽細胞特異的 TLL1 トランスジェニックマウスの作製

TLL1 プロモーター活性に依存するルシフェラーゼ活性を指標に、既存の低分子化合物ライブラリーから TLL1 発現を誘導する低分子化合物の探索を行う目的で、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって TLL1 プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子をノックインした TLL1 発現モニタリング骨肉腫細胞の樹立を目指したが、骨肉腫細胞株に対する遺伝子導入効率の問題などから未だ同細胞の樹立には至っていない。

骨形成における TLL1 の意義を検討する目的で、Col2 プロモーターにより骨芽細胞特異的に TLL1 を発現するトランスジェニックマウスの作出を試みた。しかし、得られたいずれのマウスにおいても Col2-TLL1 遺伝子断片が挿入された個体は得られていない。TLL1 の過剰発現が発生期に影響を及ぼしている可能性も考えられた。

(2) BMP-1/TLD ファミリーによる ANGPTL2 のプロセシング機構

TLL1 以外の BMP-1/TLD ファミリー分子による ANGPTL2 切断の可能性を検討するため、ヒト ANGPTL2 を恒常的に高発現するヒト胎児由来腎細胞株 (HEK293/ANGPTL2) を用いて、各 BMP-1/TLD ファミリー分子を過剰発現させ、ANGPTL2 の切断能を検討した。その結果、TLL1 と同様に他の BMP-1/TLD ファミリー分子も

ANGPTL2 の切断活性を有することが示唆された。次に、各 BMP-1/TLD ファミリー分子を精製し、*in vitro* における ANGPTL2 切断活性の評価を行った。その結果、TLL1 だけが ANGPTL2 に対する切断活性を示した。BMP-1/TLD ファミリー分子は、N 末端側に存在するプロペプチド領域がプロセシングされることで活性化される。他の ANGPTL ファミリーメンバーである ANGPTL3 や ANGPTL4 は PC (proprotein convertase) によってプロセシングされることが報告されているが、ANGPTL2 は PC によって直接プロセシングされない。そこで、PC が BMP-1/TLD ファミリー分子のプロセシングによる活性化を促進することで、ANGPTL2 の切断に参与する可能性を調べるため、PC ファミリー分子と BMP-1/TLD ファミリー分子を HEK293/ANGPTL2 細胞株に共導入した。その結果、PC ファミリー分子による BMP-1/TLD ファミリー分子の ANGPTL2 切断促進効果は認められなかった。

以上の結果から、ANGPTL2 の切断酵素として同定されていた TLL1 に加え、TLL2 や BMP-1/mTLD も ANGPTL2 のプロセシングに関わる可能性が示唆された。しかし、*in vitro* においては BMP-1/TLD ファミリー分子の中でも TLL1 のみが高い ANGPTL2 切断活性を示したことから、プロセシングによる ANGPTL2 の機能制御においては TLL1 が主要な制御因子であると考えられた。今後、TLL1 および他の BMP-1/TLD ファミリー分子も含め、その発現制御機構や活性化機構を明らかにすることがプロセシングによる ANGPTL2 の機能制御法を創出するうえで重要な課題であると考えられる。

(3) ANGPTL2 糖鎖修飾と TLL1 によるプロセシングとの関連

ANGPTL2 は分泌タンパク質であるため、当初より糖鎖修飾が存在することが予想されていた。糖鎖修飾は N 型および O 型糖鎖修飾に分類できるが、N 型糖鎖修飾については、オリゴ糖トランスフェラーゼ (OGT) によって糖鎖修飾が行われることが知られている。OGT は Asn-X-Ser または Asn-X-Thr の Asn 残基に糖鎖を付加することから、ANGPTL2 においても OGT が認識するコンセンサス配列より 2 カ所に N 型糖鎖修飾が付加されることがデータベース上においても明らかとなっていた。実際我々も、ANGPTL2 を恒常的に高発現する培養細胞の培養上精より精製した ANGPTL2 タンパク質を用いて PNGase F で処理した場合、SDS-PAGE にて解析した際に分子量が減少することを確認していた。最近、我々は ANGPTL2 タンパク質が N 型糖鎖修飾に加え、O 型糖鎖修飾を受けることを見出した。Neuramidase と O-glycosidase を用いて精製した ANGPTL2 タンパク質の O 型糖鎖修飾を切断した場合、N 型糖鎖修飾切断時に比べるとわずかながら分子量の減少が認められた。さらに、in silico 解析から、ANGPTL2 の O

型糖鎖修飾部位を予測し、各候補修飾部位に変異を導入した変異体を作製することで、ANGPTL2におけるO型糖鎖修飾部位の同定に成功した。このO型糖鎖修飾部位同定の過程において、培養上精中における当該変異体が、野生型に比べてより多く切断されていることを見出した。ANGPTL2はTLL1によって切断されることから、TLL1による切断感受性を検討したところ、野生型に比べ変異体タンパク質のTLL1による切断感受性が有意に増加していることが明らかとなった。この結果から、ANGPTL2タンパク質のO型糖鎖修飾はTLL1による切断に対して保護的に作用していることが示唆された。以上より、がん細胞におけるANGPTL2のO型糖鎖修飾を抑制することが、ANGPTL2シグナルを介したがん転移に対する新規治療標的となる可能性が示唆された。

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)

Yugami M, Odagiri H, Endo M, Tsutsuki H, Fujii S, Kadomatsu T, Masuda T, Miyata K, Terada K, Tanoue H, Ito H, Morinaga J, Horiguchi H, Sugizaki T, Akaike T, Gotoh T, Takai T, Sawa T, Mizuta H & Oike Y. Mice Deficient in angiopoietin-like protein 2 (*Angptl2*) gene show increased susceptibility to bacterial infection due to attenuated macrophage activity. *J. Biol. Chem.* 査読有り 291, 2016, 18843-18852
DOI: 10.1074/jbc.M116.720870

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://molegene.kumamoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田切 陽樹 (ODAGIRI, Haruki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
客員助教

研究者番号: 60732740