

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15508

研究課題名（和文）がん微小環境におけるANGPTL2を介した細胞間相互作用制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of cell-cell interactions mediated by ANGPTL2 in the tumor microenvironment

研究代表者

堀口 晴紀（Horiguchi, Haruki）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教

研究者番号：70755454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：がん微小環境の多様性のがんの治療法開発を困難にしている最大の障害であり、がん微小環境の全容を理解することはがんの革新的治療法開発には必要不可欠である。近年、ANGPTL2は発現細胞及び標的細胞に依存してがん促進とがん抑制の二面性を有していることが明らかとなった。本研究課題では、がん細胞由来ANGPTL2と線維芽細胞由来ANGPTGL2では糖鎖修飾が異なっており、この違いががん促進効果とがん抑制効果を決定していることが示唆された。また、発がん背景の違いによりがん細胞由来ANGPTL2によるがん促進効果と間質由来ANGPTL2のがん抑制効果の優先性が決定していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの知見は、これまで明らかにされてこなかったがん微小環境の細胞間ネットワーク構築を担う分子群の理解に新たな視点を与えることが期待でき、一人ひとりの遺伝子発現、細胞構成に合わせたがん治療戦略の確立への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The diversity of the cancer microenvironment is the greatest obstacle to the development of cancer therapies, and a complete understanding of the cancer microenvironment is essential for the development of innovative cancer therapies. Recently, it has been reported that ANGPTL2 has dual roles of cancer promotion and suppression, depending on the expressing and target cells. In this study, it was suggested that cancer cell-derived ANGPTL2 and fibroblast-derived ANGPTGL2 have different glycosylation, and that this difference determines the cancer-promoting and cancer-suppressing effects of ANGPTL2. In addition, it was suggested that the difference in carcinogenic context determined the priority of the cancer-promoting effect of cancer cell-derived ANGPTL2 and the cancer-suppressing effect of stroma-derived ANGPTL2.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん微小環境はがん細胞と免疫細胞や線維芽細胞などの間質細胞の相互作用により構成され、様々なサイトカインや成長因子などのリガンドと、細胞表面の受容体による情報伝達によって構築されているが、その全容は未だ完全に把握されていない。がん微小環境における細胞間ネットワークの構築を担う新たな分子の探索とその理解は、様々ながんに対する治療戦略の開発につながると期待される。

アンジオポエチンは、N末端側にコイルドコイルドメインとC末端側にフィブリノーゲン様ドメインを有する分泌タンパク質で、血管新生や幹細胞維持に重要な役割を有する。構造上アンジオポエチンに類似するが、アンジオポエチンの特異的受容体 Tie2 には結合しない分子が8種類同定され、アンジオポエチン様因子 (ANGPTL) と命名された。近年、ANGPTL2 は発現細胞及び標的細胞に依存してがん促進とがん抑制の二面性を有していることが明らかとなり、ANGPTL2 のがん病態における二面性制御機構の解明は様々ながんに対する個別化がん治療戦略を確立する上で必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究課題では、(1) がん促進効果とがん抑制効果を決定する ANGPTL2 の分子メカニズムを解明した。また、(2) ANGPTL2 によるがん促進/抑制を動機づけるがん微小環境の解明を行った。これらの課題の遂行により、がん進行における ANGPTL2 の二面性制御機構の理解に挑んだ。本研究課題において、ANGPTL2 の二面性制御機構を解明することで、これまで明らかにされてこなかったがん微小環境の細胞間ネットワーク構築を担う分子群の理解に新たな視点を与えることが期待でき、一人ひとりの遺伝子発現、細胞構成に合わせたがん治療戦略の確立につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) がん促進効果とがん抑制効果を決定する ANGPTL2 の分子メカニズムの解明

マウス腎がんモデルの解析により、がん細胞由来の ANGPTL2 だけを特異的に欠失させるとがんの進行は抑制され、一方、間質を含めた全身の ANGPTL2 欠損マウスはがんの進行が促進することを報告した。この結果から、ANGPTL2 は発現細胞に依存してがん進展に対して二面性を有していることが示唆された。ANGPTL2 は糖鎖付加などの翻訳後修飾部位を持つことが知られており、がん細胞と間質細胞における ANGPTL2 の翻訳後修飾の違いが ANGPTL2 の作用を決定していると考えられる。本研究課題では、がん細胞由来の ANGPTL2 タンパク質をグリコシダーゼやホスファターゼなどの酵素によって処理し、がん細胞由来 ANGPTL2 タンパク質の細胞内翻訳後修飾を同定した。

(2) ANGPTL2 によるがん促進/抑制を動機づけるがん微小環境の解明

マウス大腸発がんモデルの解析から、がんの特徴の違いが ANGPTL2 によるがん促進/抑制の決定に重要な役割を担っていることが示唆された。デキストラン硫酸ナトリウムの飲水投与によって潰瘍性大腸炎を誘導する炎症性大腸発がんモデルでは ANGPTL2 欠損マウスにおいてがんの進行を認めるが、遺伝子変異物質であるアゾキシメタンによってβ-カテニンの変異を引き起こす炎症を伴わない散発性大腸発がんモデルでは ANGPTL2 欠損マウスにおいてがんの進行は抑制されることを予備的研究において見出している。本研究課題では、両モデルにおける ANGPTL2 の機能を解明し、ANGPTL2 によるがん促進/抑制を動機づけるがんの特徴を明らかにした。

4. 研究成果

(1) がん促進効果とがん抑制効果を決定する ANGPTL2 の分子メカニズムの解明

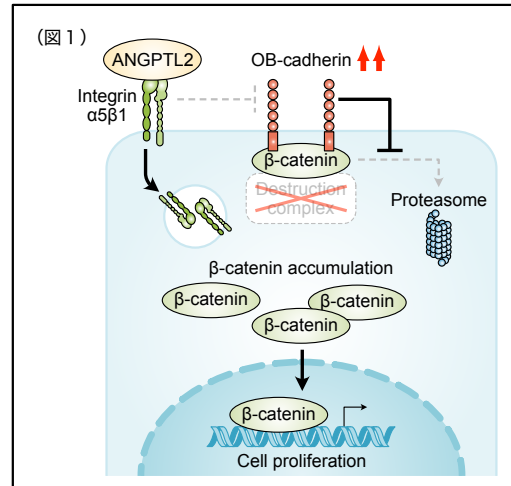
本研究課題では、腎がん細胞由来の ANGPTL2 と腎線維芽細胞由来の ANGPTL2 ではタンパク質の質に違いがあることを見出した。腎がん細胞由来の ANGPTL2 と線維芽細胞由来の ANGPTL2 では翻訳後修飾が異なっていた。それぞれのサンプルを O 型糖鎖修飾の分解酵素である O-グリコシダーゼ+ノイラミニダーゼ、N 型糖鎖修飾の分解酵素である PNGase F、リン酸化の分解酵素であるλプロテインホスファターゼにより処理を行ったところ、O-グリコシダーゼ+ノイラミニダーゼで処理をすることによりがん細胞由来 ANGPTL2 と線維芽細胞由来 ANGPTL2 タンパク質の翻訳後修飾の差がなくなった。このことから、がん細胞由来 ANGPTL2 と線維芽細胞由来 ANGPTL2 では O 型糖鎖修飾が異なっており、この違いが標的細胞の受容体の親和性を制御しており、がん促進効果とがん抑制効果を決定していることが示唆された。なお、O 型糖鎖の修飾部位に変異を組み込んだ ANGPTL2 変異タンパク質を発現する細胞を樹立し、現在受容体との親和性に影響を与えるかを継続して解析を進めている。

(2) ANGPTL2 によるがん促進/抑制を動機づけるがん微小環境の解明

マウス散発性大腸発がんモデルであるアゾキシメタン (AOM) モデルにおける ANGPTL2 の機能を解明した。大腸がん患者サンプル及び AOM モデルマウスサンプルによる検証により、ANGPTL2 は正常腸管上皮細胞では ANGPTL2 はほとんど発現しておらず、がん細胞

胞において ANGPTL2 が高発現していることを見出した。散発性大腸がんの最大の特徴は、APC または CTNNB1 遺伝子変異による β -カテニンシグナルの増強であるので、がん細胞由来の ANGPTL2 の機能を明らかにするために APC 変異を持つ SW480 ヒト大腸がん細胞を用いた。

SW480 細胞株において ANGPTL2 発現欠損細胞は増殖能の低下、 β -カテニンシグナルの低下を示した。また、ANGPTL2 を過剰発現させた細胞は増殖能の亢進及び β -カテニンシグナルの増強を示した。メカニズムとして、がん細胞から分泌された ANGPTL2 は ANGPTL2 の受容体であるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のエンドサイトーシスを介して OB-カドヘリンの発現を誘導する。OB-カドヘリンは細胞内で β -カテニンと結合し、プロテアソームによる β -カテニンの分解を阻止することで β -カテニンの蓄積及び β -カテニンによって制御されている増殖シグナル因子の転写を誘導することを見出した (図 1)。

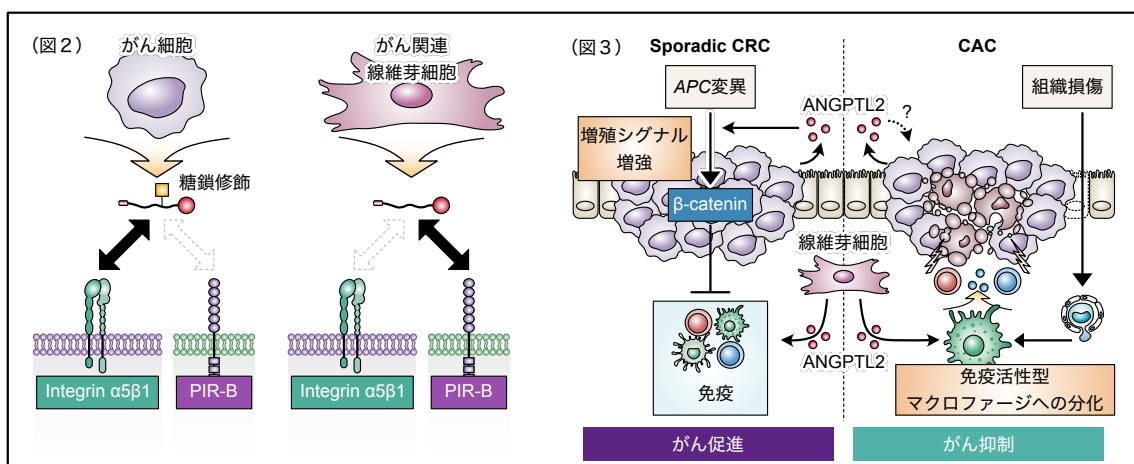


(3) まとめ・考察

ANGPTL2 はアンジオポエチンに類似した分子として申請者の所属する研究室によって同定されその機能が解明されてきたが、現在では世界中で研究が進められている。特に、様々ながんの患者血中において ANGPTL2 濃度が上昇していることが国内外から数多く報告されており、がん病態において ANGPTL2 は重要な機能を有していることが示唆されている。ANGPTL2 のがん進展促進作用については以前から数多くの報告がされており、ANGPTL2 シグナルを抑制することはがんの進展を抑制できるものだと考えられてきた。しかし、最近申請者が間質の ANGPTL2 ががん免疫を誘導することでがんの進行を抑制することを報告したことで、ANGPTL2 を標的としたがん治療戦略は単純なものではなくなった。

本研究課題の成果として、がん細胞由来の ANGPTL2 タンパクとがん関連線維芽細胞由来の ANGPTL2 タンパクでは O 型糖鎖修飾が異なっており、ANGPTL2 タンパクの翻訳後修飾の違いががん促進効果とがん抑制効果を決定していることが示唆された。また、ANGPTL2 ががん促進に機能する際はがん細胞のインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ に作用し、がん抑制に機能する際は樹状細胞の PIR-B (ヒトでは LILRB2) に作用することが報告されており、ANGPTL2 タンパクの翻訳後修飾の違いにより受容体との親和性が異なっている可能性が示唆された (図 2)。

また、散発性大腸発がん (sporadic CRC) モデルにおいて、がん細胞由来 ANGPTL2 は APC 変異による β -カテニンシグナルを増強することを見出した。これまでの知見から、線維芽細胞由来の ANGPTL2 が抗腫瘍免疫応答を促進することが想定できるが、 β -カテニンシグナルは免疫系を抑制することが知られており、APC 変異のある散発性大腸発がんでは間質由来の ANGPTL2 のがん抑制作用は制限されているのではないかと考えられる。一方で、炎症性大腸発がんにおいて、間質由来の ANGPTL2 はマクロファージの分化を制御することで抗腫瘍免疫応答を誘導することを以前報告している。炎症性大腸発がんにおけるがん細胞由来の ANGPTL2 ががん進展にどのように寄与しているかは未だ不明であるが、APC 変異を起因としない本がんモデルにおいては ANGPTL2 による β -カテニンシグナルの増強は見込めないので間質由来の ANGPTL2 のがん抑制作用は十分に発揮されていると考えられる。また、炎症性大腸発がんの起因となる組織損傷により免疫系がより活性化しており、ANGPTL2 によるがん促進/抑制のバランスが抑制に向いていると考える。以上より、発がん機構の違いによりがん細胞由来 ANGPTL2 によるがん促進効果と間質由来 ANGPTL2 のがん抑制効果の優先性が決定していることが示唆された (図 3)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Michio, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Warren Junco S., Tian Zhe, Zhu Shunshun, Horiguchi Haruki, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 The lncRNA Caren antagonizes heart failure by inactivating DNA damage response and activating mitochondrial biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22735-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukami Hirota, Morinaga Jun, Nakagami Hironori, Hayashi Hiroki, Okadome Yusuke, Matsunaga Eiji, Kadomatsu Tsuyoshi, Horiguchi Haruki, Sato Michio, Sugizaki Taichi, Kuwabara Takashige, Miyata Keishi, Mukoyama Masashi, Morishita Ryuichi, Oike Yuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Vaccine targeting ANGPTL3 ameliorates dyslipidemia and associated diseases in mouse models of obese dyslipidemia and familial hypercholesterolemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 100446 ~ 100446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xcrm.2021.100446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Yumoto Shinsei, Masuda Takeshi, Miyata Keishi, Yamamura Shuji, Sato Michio, Morinaga Jun, Ohtsuki Sumio, Baba Hideo, Moroishi Toshiro, Oike Yuichi	4. 巻 41
2. 論文標題 Tumor cell-derived ANGPTL2 promotes -catenin-driven intestinal tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4028 ~ 4041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-022-02405-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okadome Yusuke, Morinaga Jun, Yamanouchi Yoshinori, Matsunaga Eiji, Fukami Hirota, Kadomatsu Tsuyoshi, Horiguchi Haruki, et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Increased numbers of pre-operative circulating monocytes predict risk of developing cardiac surgery-associated acute kidney injury in conditions requiring cardio pulmonary bypass	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-022-02313-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Yoshitaka, Wei Fan-Yan, Kawamura Yoshimi, Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Miura Kyoko, Oike Yuichi, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu, Tomizawa Kazuhito, Chujo Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 NSUN3-mediated mitochondrial tRNA 5-formylcytidine modification is essential for embryonic development and respiratory complexes in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04680-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------