

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870554

研究課題名(和文)皮膚がんにおけるアンジオポエチン様因子2の機能およびメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the function and mechanisms of Angiopoietin-like protein 2 in the skin carcinogenesis

研究代表者

青井 淳(Aoi, Jun)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60467991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス皮膚化学発がんモデルを用いて検討した。アンジオポエチン様因子2を表皮に過剰発現させたマウス(K14-Angptl2 Tgマウス)では化学発がんが促進され、酸化ストレスが亢進していることを確認した。さらに、アンジオポエチン様因子2ノックアウトマウスでは逆の結果を得た。そこで、抗酸化剤投与による酸化ストレス抑制をおこなったところ、K14-Angptl2 Tgマウスでの過剰な発がんは抑制することが出来た。その機序について検討したところ酸化ストレス亢進によってDNA修復機構のひとつであるMsh2遺伝子のメチル化が亢進しており、遺伝子の不安定性ひいては発がんを促進していると考えた。

研究成果の概要(英文)：Using mouse skin chemical carcinogenesis model, we reported that K14-Angptl2 Tg mice, overexpressing Angptl2 in skin epithelial cells, show enhanced susceptibility of inflammatory carcinogenesis and oxidative stress in the skin. Conversely, Angptl2 KO mice show decreased oxidative stress in skin tissue as well as a lower incidence of SCC compared with wild-type mice. In this model, treatment of K14-Angptl2 Tg mice with the antioxidant reduced oxidative stress in skin tissue and the frequency of SCC development. Interestingly, K14-Angptl2 Tg mice in the model showed significantly increased methylation of the Msh2 promoter in skin tissues. Msh2 expression in skin tissues of Tg mice was increased by antioxidant treatment, as was Msh2 promoter demethylation. Overall, this study suggests that Angptl2 accelerates carcinogenesis through increased oxidative stress and decreased Msh2 expression in skin tissue.

研究分野：皮膚がん

キーワード：発癌 酸化ストレス アンジオポエチン様因子2 遺伝子修復機構

1. 研究開始当初の背景

がんは死亡はいまだ増加傾向で、死亡原因の大きな部分を占め (Chiang and Massague, 2008)、社会的、問題としてその重要性を増している。

近年、明らかな感染の既往がないにも関わらず、生体内に低レベルの持続的な炎症、すなわち慢性炎症が誘導され、様々ながん種の発症・進展の共通の原因となっていることが注目されている (Grivennikov, Greten et al., 2010)。しかし、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。アンジオポエチン様因子 2

(Angiopoietin-like protein2 ; Angptl2)はアンジオポエチン様因子ファミリーに含まれる分泌タンパクであり、重要な慢性炎症の調節因子として、肥満において脂肪組織で局所の炎症を惹起し、全身性のインスリン抵抗性を引き起こすこと (Tabata, Kadamatsu et al., 2009)、慢性関節リウマチの発症・病態形成において重要な役割を担っていること (Okada, Tsukano et al., 2010)などが相次いで報告されている。

申請者は、ヒトの皮膚を含めた様々ながん組織においてアンジオポエチン様因子 2 の発現が正常組織に比べて有意に亢進していることを確認した。皮膚がんは他のがんと同様に高齢者に多くみられ、その好発部位は顔面や耳介、手背などの日光暴露部である。そのような知見から皮膚における発がんの原因の最も重要なものは紫外線であるとされている (Alam M and Ratner D, 2001)。そこで申請者はヒトの正常皮膚におけるアンジオポエチン様因子 2 の発現を日光暴露部と非暴露部について検討した。

その結果、日光暴露部では非暴露部と比較して有意にアンジオポエチン様因子 2 の発現が増加していることも見出した (Aoi J, Endo M. et al., 2011)。さらに申請者は、加齢に伴う正常皮膚におけるアンジオポエチン様因子 2 の発現の変化を検討した。アンジオポエチン様因子 2 の正常皮膚での発現レベルは加齢に相関して上昇することを見出した (Aoi, Endo et al., 2011)。また、申請者はヒト皮膚がん組織についても検討した。その結果、アンジオポエチン様因子 2 の発現は正常皮膚組織に比べて皮膚がん組織、皮膚がんリンパ節転移巣のほうが有意に増加することを明らかにした (Aoi, Endo et al., 2011)。これらのことから、アンジオポエチン様因子 2 が皮膚がんの発症、進展・転移について重要な役割をしていることが考えられた。

申請者は、がんの発症から進展・転移を一連の流れとして評価するためにマウスに対する皮膚化学発がんモデルを用いて検討した。皮膚化学発がんモデルはマウスに開始物質と促進物質からなる 2 種類の化学物質を塗布することで、正常皮膚から腫瘍の発症、転移までを確認出来るモデルである。申請者はアンジオポエチン様因子 2 について 3 段階の発現レベルのマウスを準備した。ケラチン 14 プロモーターを用いて表皮特異的にアンジオポエチン様因子 2 を過剰発現させた K14-Angptl2 トランスジェニック (Tg) マウス、野生型のマウス、アンジオポエチン様因子 2 の発現を無効化した Angptl2 ノックアウト (KO) マウスであり、これら 3 タイプのマウスの皮膚について化学発がんを行った。その結果、

K14-*Angptl2* Tg マウスは、野生型マウスと比較して発がんが亢進し、腫瘍血管新生が促進され、他臓器転移が増加し生存期間は短縮した。一方、*Angptl2* KO マウスは、野生型マウスと比較して発がん及び転移は著明に減少し、生存期間は延長した。また、化学物質誘発がん刺激を行わない K14-*Angptl2* Tg マウスは、皮膚がんを 50 週の長期観察では生じないことより、アンジオポエチン様因子 2 は皮膚がんの感受性を高める因子であると考えた。さらに、申請者はがん細胞によって産生される Ang アンジオポエチン様因子 2 はパラクライン的に作用して血管新生・リンパ管新生を促進すること、がん細胞自身にはオートクライン的に作用して TGF- $\beta$ /Smad 経路を活性化し、間葉系の性質を獲得させ運動能を亢進させることで転移を促進することを見出した (Aoi, Endo et al., 2011)。

## 2. 研究の目的

申請者は、アンジオポエチン様因子 2 が発がん感受性を促進するメカニズムに関しては不明なことが多くその解明が必要であると考えると考えた。

## 3. 研究の方法

申請者は、K14-*Angptl2* Tg マウスでは活性酸素の産生が亢進していることを見出し、そのことがアンジオポエチン様因子 2 が皮膚に引き起こす変化に大きな役割果たしていると推察した (Aoi, Endo et al., 2011)。そこで、活性酸素を抑制することでアンジオポエチン様因子 2 の発現亢進によって引き起こされる腫瘍形成および発がんの促進が抑制可能か否かを検討する必要があると

考えた。実際には、K14-*Angptl2* Tg マウス、野生型マウス、*Angptl2* KO マウスについてマウス皮膚化学発がんを行う過程で N-アセチル-L-システイン (N-acetylcysteine; NAC) を含んだ水 (NAC 水) をマウスに与え活性酸素産生を抑制することで、マウスの発がん感受性がどのように変化するかを組織学的、分子遺伝学的に検討した。併せて、マウス実験から得られた結果をヒトサンプルを用いて検証した。

## 4. 研究成果

(1) 皮膚化学発がんモデルの過程での皮膚組織における酸化ストレスについて評価する目的で皮膚組織における 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) を測定した。その結果、K14-*Angptl2* Tg マウスの皮膚では野生型に比べて有意に活性酸素の産生が亢進しており、反対に *Angptl2* KO マウスでは野生型と比較し有意に減少していたことが確認された。これらの結果はアンジオポエチン様因子 2 が活性酸素の産生を亢進することを示唆する。

(2) NAC 水をマウスに与え活性酸素産生を抑制することで、K14-*Angptl2* Tg マウスで本来亢進している腫瘍発生、発がん感受性が有意に抑制された。また、最終的には NAC 水を与えたマウスについては生存期間の有意な延長が確認された。また、野生型にも同様に NAC 水を与えた結果、本来みられる腫瘍発生、発がん感受性ともに有意な抑制を確認した。

(3) K14-*Angptl2* Tg マウスでは DNA 修復機構の一つであるミスマッチ修復を担う *Msh2* 遺伝子の有意な発現低下が認めら

れた。その原因について検討した結果、K14-Angptl2 Tg マウスでは野生型と比較して *Msh2* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が亢進が亢進していることを確認した。また、そのメチル化は NAC 水投与による活性酸素の抑制で軽快することが確認できた。

(4)以上より、申請者はアンジオポエチン様因子 2 によって活性酸素の産生が亢進され、*Msh2* の発現抑制、遺伝子の不安定性、発がんにつながると考えた。つづいて、マウス化学発がんモデルで得た結果をヒトの正常皮膚、前がん病変である日光角化症、有棘細胞がんの組織を用いて確認した。ヒトの正常皮膚組織では ANGPTL2 の発現は少なく、MSH2 の発現が保たれていた。それと比較して、日光角化症、有棘細胞がんとうがんが進展するに従い ANGPTL2 の発現はより亢進し、MSH2 の発現は抑制された。これにより、マウスの皮膚化学発がんモデルより得られた、アンジオポエチン様因子 2 による発がん感受性亢進のメカニズムがヒトの紫外線による発がんにも当てはめることが出来ると考えられた。

#### 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 2 件)

Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Ogata A, Horiguchi H, Odagiri H, Masuda T, Fukushima S, Jinnin M, Hirakawa S, Sawa T, Akaike T, Ihn H, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 accelerates carcinogenesis by activating chronic inflammation and oxidative stress. *Mol Cancer Res*, 12(2) :239-49,

2014. 査読有り

Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka MS, Fukuhara S, Miyamoto T, Kobayashi E, Miyata K, Aoi J, Horiguchi H, Nishimura N, Terada K, Yakushiji T, Manabe I, Mochizuki N, Mizuta H, Oike Y. The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin  $\alpha 5\beta 1$ , p38 MAPK, and matrix metalloproteinases. *Sci Signal*, 7(309) :ra7, 2014. 査読有り

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

青井 淳 (A01, Jun)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60467991