

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15246

研究課題名（和文）腸管の恒常性変容によるがんの発症・進行メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the molecular mechanism underlying homeostasis against cancer

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん免疫応答におけるアンジオポエチン様因子2(ANGPTL2)の機能解明を行った。がん免疫応答の詳細なメカニズム解明のためにB16-OVA細胞を用いたシンジェニックモデルを用いた。B16-OVAを背部皮下に移植したAngptl2ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、腫瘍の増殖及び生存期間の短縮を示した。ANGPTL2は樹状細胞の成熟を介したT細胞のクロスプライミングを促進することで、がん抑制的に機能していることを明らかにした。ANGPTL2を用いた樹状細胞ワクチンは腫瘍の増大抑制と生存期間の延長を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞の小さな集団が発生しても、効果的な免疫反応を惹起し、腫瘍が退縮する可能性が提唱されてから、これまでがん免疫研究が盛んに行われており、免疫によるがん治療は今世界中で注目されている。しかしながら、免疫とがんの発症・進展の関連は十分には解明されていない。本研究では、がん免疫応答を促進する新たな分子としてANGPTL2の機能を解明した。抗腫瘍免疫の分子メカニズムについて理解することが、がんの予防および新規治療法開発に向けた研究の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：We conducted mechanistic analysis comparing ANGPTL2 function in cancer progression in a murine syngeneic model. ANGPTL2 deficiency accelerated tumor progression, supporting a tumor-suppressing role. Moreover, host ANGPTL2 facilitates CD8+ T-cell cross-priming and enhances anti-tumor immune responses. Importantly, ANGPTL2 activates dendritic cells and enhances tumor vaccine efficacy.

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

腸は「最大の免疫器官」と言われ、大腸の恒常性維持機構に免疫機能が密接に関与している。免疫システムは、病原体に対してだけでなく、毎日発生しているがん細胞を排除している。この免疫能を高め、がんの治療を目指す「がん免疫療法」が世界的に注目されている。しかしながら、この抗腫瘍免疫システムは非常に複雑で、まだ不明な点が多い。また、がん細胞が免疫逃避能力を備えるメカニズムについての研究が進められている。本研究では、腸管組織傷害時の恒常性維持機構の一つである炎症免疫反応が腸炎関連大腸がん(CAC)発症において抗腫瘍免疫として働く分子メカニズムの解明を目標とする。

アンジオポエチンは、構造上 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、血管新生や幹細胞の維持に重要な役割を有する。その後、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 には結合出来ない分子が 8 種類同定され、アンジオポエチン様因子(angiotensin-like protein: ANGPTL)と命名されている。申請者は最近、腸管において ANGPTL2 が、腸組織修復機構・恒常性維持機構に重要な役割を有していることを見出している。

2. 研究の目的

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する。さらに炎症性腸疾患及びこれらを起因とした大腸がんの発症、進展の分子機構を解明することで、臨床を見据えた様々な腸疾患の予防および新規治療法開発に向けた基盤技術の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) CAC 発がんモデルにおける ANGPTL2 の機能解析

CAC の解析にはアズキシメタン(AOM)/デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を用いたマウスモデルにより行う。本マウスモデルは発がん物質である AOM に、大腸粘膜バリアを直接的に破壊する DSS の飲水投与を組み合わせることで、大腸炎により大腸がんを誘発するものである。Angpt12 ノックアウトマウスにおいて、生存、体重変動、内視鏡による観察および組織学的解析など詳細な解析を行うことで、CAC 発がんにおける ANGPTL2 の役割を解明する。

(2) がん免疫における ANGPTL2 の機能解析

当初上記の大腸がん発がんモデルを用いてがん免疫関連の解析を行う予定だったが、本モデルは解析までに長期間の時間を有し、さらにがん抗原が同定されていないモデルのため、がん免疫における研究には不適切であると判断した。より短期間で詳細ながん免疫のメカニズム解明のためにシンジェニックモデルを採用した。

(3) ANGPTL2 の発現解析

シンジェニックモデルにおける ANGPTL2 の発現解析を行う。本マウスモデルにおいて免疫染色および単離した細胞における mRNA 解析を行う。

(4) ANGPTL2 の作用メカニズム解析

ANGPTL2 の作用メカニズム解明に向け、*in vitro*での解析を行った。各マウスプライマリー細胞にリコンビナント ANGPTL2 タンパクにより刺激を行う。

(5) ANGPTL2 をターゲットとしたがん免疫療法開発に向けた基盤研究

4. 研究成果

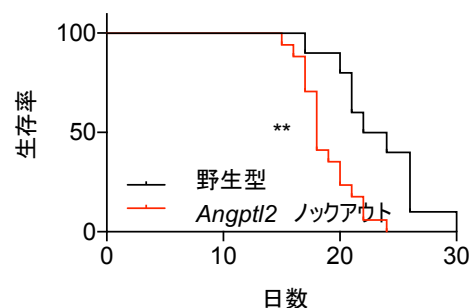
(1) シンジェニックモデルにおける ANGPTL2 の機能解析

① がん抗原として OVA を発現した B16 がん細胞(B16-OVA 細胞)を用いてシンジェニックモデルを作成した。B16-OVA を背部皮下に移植した Angpt12 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、腫瘍の増殖及び生存期間の短縮を示した(図1)。

(2) がん免疫における ANGPTL2 の機能解析

① B16-OVA 細胞はがん抗原として OVA を発現していることから、さらにがん免疫応答について詳細に解析を行った。Angpt12 ノックアウトマウスに移植した腫瘍では野生型マウスに比べ、CD45⁺白血球及び CD8⁺T 細胞の減少を示した。さらに、Angpt12 ノックアウトマ

図1



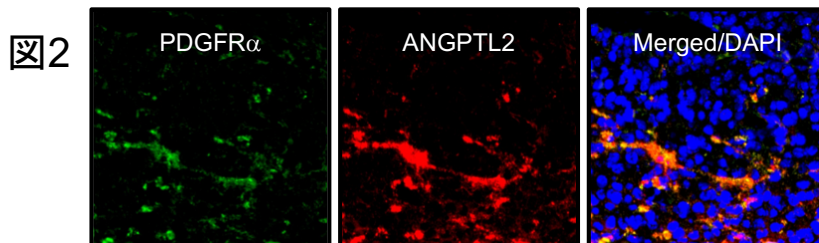
ウスは所属リンパ節において、がん特異的 T 細胞の減少と、T 細胞の活性低下を認めた。

- ② ②の結果より、樹状細胞による T 細胞の活性化（クロスプライミング）が *Angpt12* ノックアウトマウスで抑制されている可能性から、樹状細胞における ANGPTL2 の機能を解析した。ANGPTL2 による刺激は樹状細胞の成熟・活性化を促進し、T 細胞のクロスプライミングを促進することを *in vitro* で証明した。

以上の結果より、ANGPTL2 は樹状細胞の成熟を介した T 細胞のクロスプライミングを促進することで、がん抑制的に機能していることが示唆された。

(3) ANGPT12 の発現解析

- ① シンジェニックモデルにおいては、ANGPTL2 が PDGFR α 線維芽細胞に発現していることを明らかにした（図 2）。



- ② 野生型 (ANGPTL2 発現) PDGFR α 線維芽細胞を *Antpt12* ノックアウトマウスに移植したところ、B16-OVA 腫瘍の増大抑制及び生存期間の延長を認めた。

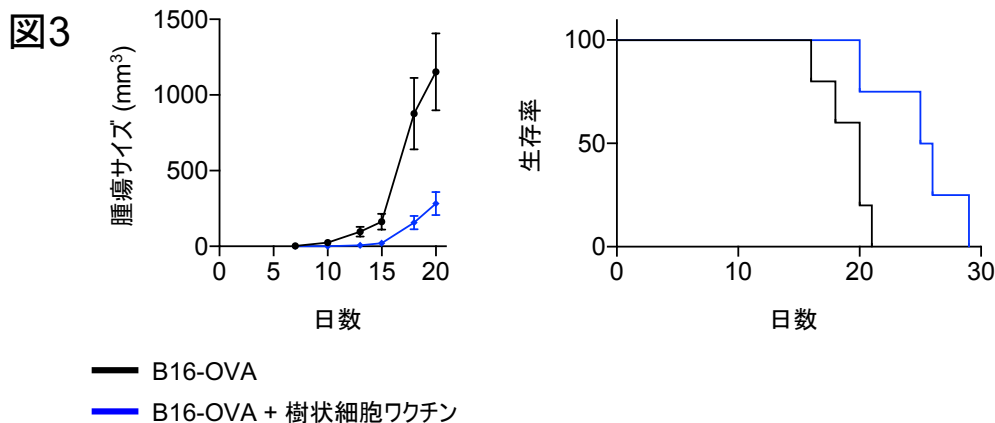
以上の結果より、PDGFR α 線維芽細胞から産生された ANGPTL2 が腫瘍免疫を促進していることが示唆された。

(4) ANGPTL2 の作用メカニズム解析

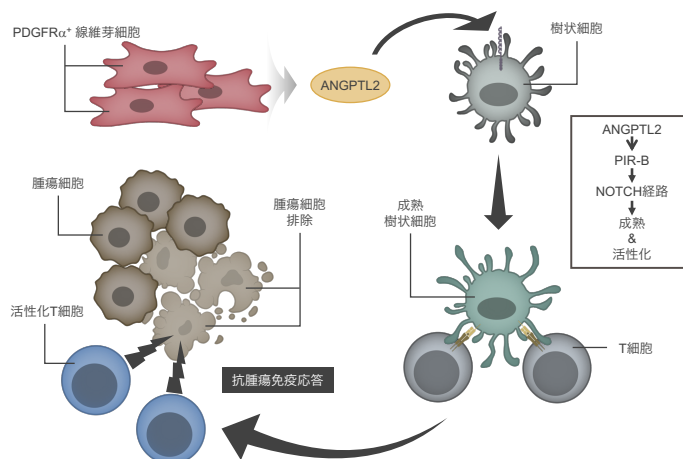
ANGPTL2 は樹状細胞上の paired immuno-globulin-like receptor (PIR-B) を受容体として作用し、NOTCH 経路を介して樹状細胞の成熟・活性化に寄与していることを見出した。

(5) ANGPTL2 をターゲットとしたがん免疫療法開発に向けた基盤研究

ANGPTL2 は樹状細胞の成熟・活性化を介して T 細胞のクロスプライミングを促進することから、ANGPTL2 を用いた樹状細胞ワクチンの効果を検証した。B16-OVA を移植した野生型マウスに ANGPTL2 及び OVA ペプチドで処理した樹状細胞を 2 度皮下移植したところ、腫瘍増大の抑制及び生存期間の延長を認めた。



以上の結果から、PDGFR α 線維芽細胞から産生された ANGPTL2 は樹状細胞上の PIR-B に作用することで、樹状細胞の成熟・活性化を促進する。これらの樹状細胞は所属リンパ節に遊走し、そこで T 細胞のプライミングを行う。この T 細胞は血中を通過して腫瘍部へ移動し腫瘍細胞特異的に腫瘍を攻撃する（右図）。これらの抗腫瘍免疫応答が大腸内で実際に機能しているかは、今後の検証が必要だと考える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Kurahashi Ryoma, Hara Chiaki, Miyata Keishi, Baba Masaya, Osumi Hironobu, Terada Kazutoyo, Araki Kimi, Takai Toshiyuki, Kamba Tomomi, Linehan W. Marston, Moroishi Toshiro, Oike Yuichi	4. 巻 33
2. 論文標題 Dual functions of angiopoietin-like protein 2 signaling in tumor progression and anti-tumor immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.329417.119	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 Osumi Hironobu, Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Tashiro Kyosei, Morinaga Jun, Takahashi Takashi, Ikeda Koei, Ito Takaaki, Suzuki Makoto, Endo Motoyoshi, Oike Yuichi	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumor cell derived angiopoietin like protein 2 establishes a preference for glycolytic metabolism in lung cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14337	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
---------------------------	-----------------------	----