

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790322

研究課題名（和文） 新規慢性炎症関連因子 Angpt12 の発現誘導機構の解明

研究課題名（英文） Analyses of the transcriptional regulatory mechanisms of chronic inflammation-related factor Angpt12

研究代表者

門松 毅 (KADOMATSU TSUYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90555757

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、メタボリックシンドロームやがんなどの慢性炎症を基盤病態とする疾患の発症・進展に関わる Angpt12(アンジオポエチン様因子 2) 遺伝子の発現誘導機構の解析を行った。その成果として、がん細胞では、NFAT、ATF2 および c-Jun といった 3 つの転写因子が協調的に作用し、Angpt12 遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。さらに、生体の様々な組織では、体内時計によって Angpt12 遺伝子の発現が周期的に制御されており、その制御異常が Angpt12 遺伝子の発現リズムの消失に繋がることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the transcriptional regulatory mechanisms of Angpt12 (angiopoietin-like protein 2) that plays roles in the pathogenesis and development of chronic inflammation-related diseases, such as metabolic syndrome or cancers. We showed that Angpt12 expression in cancer cells is synergistically activated by NFAT, ATF2, and c-Jun. Furthermore, we demonstrated that expression periodicity of Angpt12 in various tissues is regulated by a circadian clock and that disruption of this process resulted in the arrhythmic Angpt12 expression.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、病態医科学

キーワード：分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、肥満、インスリン抵抗性、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などが一個体に集積するメタボリックシンドロームやその下流に位置する動脈硬化性疾患などの基盤病態として軽度の慢性炎症が注目されている。

慢性炎症を基盤病態とする疾患において炎症をコントロールすることは、治療だけでなく疾患発症の予防にもつながる可能性を有している。したがって、慢性炎症を生じる分子基盤や治療標的となる新たな候補分子を明らかにすることが重要である。

Angpt1 (angiopoietin-like protein) は、我々の研究室において血管新生因子アンジオポエチンと同様の構造的特徴を持つ分子のクローニングにより同定され、現在までに他の研究グループからの報告も含め7種類が同定されている。Angpt1は、血管新生だけでなく、脂質代謝やエネルギー代謝など多様な作用を有することが明らかとなってきた。最近、我々は、Angpt12が肥満の脂肪組織において局所的な慢性炎症を惹起することで全身のインスリン抵抗性を引き起こすこと、Angpt12の発現上昇が慢性炎症を生じる分子基盤となっていることを明らかにした。また、慢性炎症はがんの発症や進展、転移にも関与していることが知られており、我々は癌患者の血中Angpt12濃度が上昇していることや、Angpt12を高発現するがん細胞株の転移能が亢進していることを見出している。したがって、Angpt12の発現を抑制することが慢性炎症を基盤とする疾患の新たな治療法となる可能性を有しており、未だ解明されていないAngpt12の発現誘導に関与するシグナル伝達および転写調節機構を解明することは重要な課題である。

さらに我々は、マウス脂肪組織におけるAngpt12の発現パターンが、特徴的な24時間周期の日内変動(概日リズム)を示すことを見出している。脂肪組織では、概日リズムを作り出している時計遺伝子(時計調節因子)だけでなく、多くの代謝関連遺伝子の発現にも周期性があることが知られており、肥満マウスではこれらの遺伝子発現の周期性が失われること、さらに時計遺伝子変異マウスはメタボリックシンドロームの特徴である肥満やインスリン抵抗性などを示すことが明らかとなっている。時計調節因子による代謝関連遺伝子の発現調節や時計調節因子とメタボリックシンドロームとの関係が明らかとなってきたが、Angpt12の周期的な発現制御に概日時計機構が関与しているかについては明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

Angpt12の発現誘導は病態発症の基盤となっており、Angpt12はメタボリックシンドロームなどの基盤病態として近年注目されている慢性炎症の成因となる重要な新規鍵因子である。そこで本申請研究では、未だ解明されていないAngpt12の発現誘導に関与するシグナル伝達および転写調節機構を解明することを目的とする。

(1) 我々は、低酸素状態において、がん細胞のAngpt12発現が誘導されること、低酸素刺激によるAngpt12発現誘導がHIF1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )非依存的であることを見出している。そこで、ヒト

Angpt12遺伝子において低酸素刺激などによる発現誘導に必要なゲノム領域(プロモーターやエンハンサー領域)や転写因子を同定することで、Angpt12の転写調節機構を明らかにし、転写誘導に至るまでのシグナル伝達経路についても解析を行う。

(2) 近年、概日時計機構の破綻がメタボリックシンドロームをはじめとする様々な疾患の発症や進展に関与していることが注目されている。申請者は、マウス脂肪組織におけるAngpt12の発現が、約24時間の概日リズムを示すことを見出していることから、Angpt12に関しても時計調節因子による転写制御を受ける可能性を有している。そこで、肥満の脂肪組織におけるAngpt12遺伝子発現の周期性の変化や時計遺伝子との関連性について検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) がん細胞におけるAngpt12発現誘導機構の解析

ヒト肺がん細胞株を用いて、ヒトAngpt12レポーターアッセイを行い、Angpt12の発現に必須の転写調節領域を探索を行った。ヒトAngpt12の発現に必須の転写調節領域に結合する転写因子を明らかにするため、当該領域に存在する転写因子結合配列をin silico解析により探索した。探索の結果、同定された転写因子結合配列に結合することが予想される転写因子の過剰発現によるAngpt12レポーター活性に対する影響を評価し、Angpt12レポーター活性を促進する転写因子について、ゲルシフトアッセイやクロマチン免疫沈降法(ChIPアッセイ)によりAngpt12転写調節領域への結合を確認した。また、ヒト肺がん細胞株や乳がん細胞株を用いて、Angpt12発現誘導に関与する転写因子をノックダウンし、内在性Angpt12発現に対する影響をリアルタイムPCRによって評価した。

### (2) 周期的Angpt12発現と概日時計機構に関する解析

骨肉腫細胞株であるU2OS細胞を高濃度の血清で処理し、各細胞における発現の周期を同調させた後、Angpt12や時計遺伝子の発現をリアルタイムPCRにて解析した。また、A時計遺伝子BMAL1とCLOCKの共発現によりAngpt12プロモーター活性化が促進されるか検討を行った。さらに、ChIPアッセイによるAngpt12プロモーター領域へのCLOCKの結合の確認を行った。生体におけるAngpt12発現の周期性を確認するため、明期:暗期(12時間:12時間)または24時間暗期の条件下で飼育したマウスの各組織におけるAngpt12発現を経時的にリアルタイムPCRおよびウエスタンブロットにより観察した。また、概日時

計機構に必須の時計遺伝子 Cry の欠損マウスを用いて、概日時計機構の破綻が Angpt12 の発現リズムに及ぼす影響をリアルタイム PCR により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) これまで我々は、Angpt12が慢性炎症を基盤病態とする疾患の発症や進展に関与する炎症制御因子であることを明らかにしている。Angpt12の発現誘導は、疾患の発症や進展の分子基盤となっているが、その発現誘導機構の詳細は不明であった。そこで、ヒトAngpt12の発現誘導に必須のプロモーター領域として、転写開始点から上流-168bpの領域を既に見出していたことから、この領域を対象にAngpt12を発現しているヒト肺がん細胞株を用い詳細な解析を行った。その結果、当該領域にはATF/CREBファミリーが結合すると考えられる結合配列が存在し、このATF/CREB結合配列が肺がん細胞におけるAngpt12のプロモーター活性に必須であることが明らかとなった。さらに、Angpt12の発現は、NFAT、ATF2およびc-Junの3因子がAngpt12プロモーター上のATF/CREB結合配列を介して協調的に作用し、活性化されることが明らかとなった。実際に、NFATをノックダウンした肺がん細胞株や乳がん細胞株ではAngpt12の発現が有意に減少することが示された。本研究により、これまで解明されていなかったがん細胞におけるAngpt12の発現調節機構として、NFAT、ATF2、c-Junの関与が明らかとなり、Angpt12発現誘導による病態の分子基盤の解明に繋がる重要な成果であると考え。我々は、がん細胞以外では、肥満の脂肪組織や血管内皮、病巣のマクロファージなどにおいて、Angpt12の発現上昇が認められることを見出している。そこで、今後、本研究によって明らかとなったAngpt12の発現誘導に関与する転写因子が、がん以外の病態におけるAngpt12の発現制御に関与するか検討し、Angpt12発現誘導による病態の分子基盤の解明を目指す。

(2) Angpt12 発現には、24 時間の概日リズムが存在することを既に見出していたことから、Angpt12 発現と概日時計機構との関連性について検討を行った。骨肉腫細胞株である U2OS 細胞を高濃度の血清で処理することで、Angpt12 の発現に時計遺伝子である Per2 と同様の周期性が認められた。また、Angpt12 レポーター活性は、Per2 の発現を誘導することが知られている時計遺伝子 BMAL1 と CLOCK の共発現により促進された。さらに、Angpt12 プロモーター領域への CLOCK の結合も確認された。マウスの各組織における Angpt12 発現を経時的に観察したところ、脂肪組織をはじめ様々な組織において 24 時間の周期性が確認された。また、概日時計機構に必須の時計

遺伝子 Cry 欠損マウスでは、Angpt12 の発現リズムの消失が認められた。以上の結果から、Angpt12 の周期的発現は概日時計機構により制御されており、概日時計機構の破綻が Angpt12 の発現リズムの消失につながることを示唆された。本研究により、新たな Angpt12 の発現調節機構として概日時計機構の関与が明らかとなったことは、Angpt12 発現誘導による病態の分子基盤の解明に繋がる重要な成果であると考え。近年、生活習慣などの環境因子の影響による概日時計機構の破綻が、メタボリックシンドロームやがんなどの慢性炎症を基盤病態とする疾患の発症や進展に関与していることが注目されていることから、実際にこれら病態において Angpt12 の発現リズムの変調や消失が認められるか検討することで、各疾患の病態と Angpt12 の発現リズムとの関連を解明し、概日時計機構の破綻による周期的 Angpt12 発現の異常による病態の発症・進展の分子基盤の解明を目指す。

#### 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 8 件)

- ① Endo, M., Nakano, M., Kadomatsu, T., Fukuhara, S., Kuroda, H., Mikami, S., Hato, T., Aoi, J., Horiguchi, H., Miyata, K., Odagiri, H., Masuda, T., Harada, M., Horio, H., Hishima, T., Nomori, H., Ito, T., Yamamoto, Y., Minami, T., Okada, S., Takahashi, T., Mochizuki, N., Iwase, H., & Oike, Y. Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer Res.* 72: 1784-1794, 2012. (査読有)
- ② Ogata, A., Endo, M., Aoi, J., Takahashi, O., Kadomatsu, T., Miyata, K., Tian, Z., Jinnin, M., Fukushima, S., Ihn, H., & Oike, Y. The role of angiopoietin-like protein 2 in pathogenesis of dermatomyositis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418: 494-499, 2012. (査読有)
- ③ Aoi, J., Endo, M., Kadomatsu, T., Miyata, K., Nakano, M., Horiguchi, H., Ogata, A., Odagiri, H., Yano, M., Araki, K., Jinnin, M., Ito, T., Hirakawa, S., Ihn, H. & Oike, Y. The roles of angiopoietin-like protein 2 in carcinogenesis and tumor cell metastasis. *Cancer Res.* 71: 7502-7512, 2011 (査読有)
- ④ Morita, M., Oike, Y., Nagashima, T., Kadomatsu, T., Tabata, M., Suzuki, T., Nakamura, T., Yoshida, N., Okada, M. & Yamamoto, T. Obesity resistance and

increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3(+/-) mice. *EMBO J.* 30: 4678-4691, 2011 (査読有)

- ⑤ Kadomatsu, T., Tabata, M. & Oike, Y. Angiotensin-like proteins: emerging targets for treatment of obesity and related metabolic diseases. *FEBS J.* 278: 559-564, 2011 (査読有)
- ⑥ Yano, M., Watanabe, K., Yamamoto, T., Ikeda, K., Senokuchi, T., Lu, M., Kadomatsu, T., Tsukano, H., Ikawa, M., Okabe, M., Yamaoka, S., Okazaki, T., Umehara, H., Gotoh, T., Song, WJ, Node, K., Taguchi, R., Yamagata, K. & Oike, Y. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *J. Biol. Chem.* 286: 3992-4002, 2011 (査読有)
- ⑦ Tsukano, H., Gotoh, T., Endo, M., Miyata, K., Tazume, H., Kadomatsu, T., Yano, M., Iwawaki, T., Kohno, K., Araki, K., Mizuta, H. & Oike, Y. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 1925-1932, 2010 (査読有)
- ⑧ Okada, T., Tsukano, H., Endo, M., Tabata, M., Miyata, K., Kadomatsu, T., Miyashita, K., Semba, K., Nakamura, E., Tsukano, M., Mizuta, H. & Oike, Y. Synovial cell-derived angiotensin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* 176: 2309-2319, 2010 (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① 門松毅, 他、Circadian regulation of Angiotensin-like protein 2 expression by a molecular clock.、第34回日本分子生物学会年会、2011.12.15、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ② 門松毅, 他、Clock genes directly regulate the rhythmic Angptl2 expression.、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010.12.7、神戸国際展示場(神戸ポートアイランド・兵庫県)

[図書] (計3件)

- ① 門松毅, 浦上将太, 尾池雄一、羊土社、実験医学増刊、2011、pp108-113
- ② 門松毅, 尾池雄一、メディカルレビュー社、アンチ・エイジング医学、2011、53-

58

- ③ 門松毅, 尾池雄一、羊土社、実験医学、2010、pp1693-1697

[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

門松毅 (KADOMATSU TSUYOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90555757

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：