

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461192

研究課題名(和文) 間質性肺炎における新規炎症関連因子Angpt12の機能解明

研究課題名(英文) The role of Angpt12 expression in lung for interstitial pneumonia

研究代表者

遠藤 元誉 (Endo, Motoyoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：40398243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：特発性間質性肺炎の発症機序およびその治療法は未だ確立しておらず、今日大きな問題となっている。本研究では、肺におけるアンジオポエチン様因子ファミリー2 (Angpt12) の発現が肺繊維化抑制に重要な役割を果たしていることを明らかにした。肺組織において、Angpt12は肺胞上皮細胞に主に発現しているが、薬剤刺激により肺線維症を来している肺組織では、線維芽細胞を含むさまざまな細胞でAngpt12の発現が増加していた。一方、Angpt12を欠損したマウスでは野生型マウスと比較して、薬剤刺激による肺線維症が増悪しており、肺におけるAngpt12の発現は肺線維化抑制に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis is defined as progressive interstitial pneumonia with poor prognosis. However, the mechanism of it remains unclear. Angiopoietin-like protein 2 (Angpt12) is a chronic inflammatory mediator, which when deregulated is associated with various pathologies. However, little was known about its potential lung function. To examine the role of Angpt12 for lung function, we generated a rabbit monoclonal antibody that specifically recognizes mouse Angpt12 and then evaluated protein expression in mouse lung tissue. We observed abundant Angpt12 expression in both alveolar epithelial type I and type II cells and in alveolar macrophages under normal conditions. Next, we examined Angpt12 lung function in a mouse interstitial pneumonia model and found that Angpt12 deficiency made fibrosis caused by bleomycin exacerbated fibrosis. Overall, our findings suggest that Angpt12 expression in lung epithelial cells may function in repair of damaged tissue.

研究分野：分子細胞生物学、呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎 Angpt12 プレオマイシン肺臓炎

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎の発症機序については、未だ明らかとはなっていないが、環境的、遺伝的、あるいは他の未知の要因が肺胞上皮細胞を損傷し、持続的かつ異常な間質線維芽細胞および間葉細胞の増殖が原因の一つと考えられている。活性酸素による肺傷害は肺線維化の原因の一つとなっており、間質性肺炎における活性酸素抑制は非常に注目されている。また、TGF- β は肺線維化を促進させるサイトカインとして以前より注目されており、TGF- β などの線維化促進因子の産生抑制剤としてピルフェニドンなどが開発・使用されているが、副作用の問題などもあり未だ決定的な治療法は確立しておらず、新規治療薬開発は急務である。

2. 研究の目的

研究代表者はアンジオポエチン様因子ファミリー (Angpt1 1-6) の同定を行い、その機能を世界に先駆けて解明してきた。Angpt12 は、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカイン、活性酸素の発現を亢進させ慢性的な炎症を惹起するとともに、TGF- β 産生にも関与する因子であることを明らかにしている。また研究代表者は、Angpt12 が間質性肺炎患者の II 型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージにおいて強く発現していることを見出している。本研究では、マウスプレオマイシン肺線維症モデルを用いて、間質性肺炎における Angpt12 の機能役割解明、Angpt12 シグナルネットワークによる慢性炎症と線維化の分子基盤を解明し、特発性間質性肺炎の発症・進展機序の解明、および新規治療法開発への応用を目指した。

3. 研究の方法

研究代表者は Angpt12 が炎症性サイトカイン、活性酸素の産生促進、TGF- β 経路を活性化することを明らかにしているが、間質性肺炎における Angpt12 の役割、その詳細なメカニズムは不明である。間質性肺炎における Angpt12 の役割を明らかにするために、プレオマイシンを用いたマウス肺線維症モデルを作製し、Angpt12 の発現の有無と肺線維症形成との関連解析を行い、肺線維症形成過程における Angpt12 の機能解明を行った。

(1) ウサギ抗 Angpt12 モノクローナル抗体の作成

研究代表者は、マウス Angpt12 を効率よく検出するためにウサギ抗 Angpt12 モノクローナル抗体を作成した。

(2) 無刺激肺における Angpt12 免疫染色

通常肺における Angpt12 発現細胞を明らかにするために、上記(1)で作成した抗体を用いて無刺激マウス肺の免疫染色を行った。

(3) プレオマイシン刺激によるマウス肺線維症モデルを用いた Angpt12 発現解析

プレオマイシンを気管内投与し、マウス肺線維症モデルを作成し、肺胞洗浄液中に分泌

される Angpt12 タンパクの同定を ELISA 法にて解析した。また、線維化亢進部位における Angpt12 の発現を Angpt12 モノクローナル抗体にて検出し、肺線維化形成と Angpt12 発現細胞の関連について解析した。

(4) Angpt12 ノックアウトマウスにおけるプレオマイシン肺臓炎モデルの解析

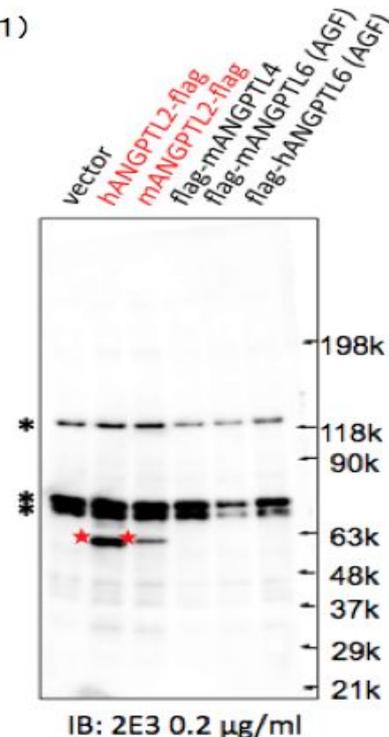
研究代表者は Angpt12 をノックアウトしたマウス (Angpt12 KO mice) を保持している。Angpt12 KO mice を用いてプレオマイシン肺臓炎モデルを作成し、野生型マウスとの線維化の程度を比較し、肺線維症進展における Angpt12 の役割について解析した。

4. 研究成果

(1) ウサギ抗 Angpt12 モノクローナル抗体の作成

研究代表者はマウス Angpt12 に効率よく反応するウサギ抗 Angpt12 モノクローナル抗体 (2E3) を作成した。さまざまな Angpt1 ファミリーリコンビナントタンパクを用いてウエスタンブロット解析を行い、2E3 はマウス Angpt12、ヒト Angpt12 には反応したが、マウス Angpt14、マウス Angpt16、ヒト Angpt16 には反応しなかった (図 1)。また、2E3 は無刺激マウス肺の免疫染色にて Angpt12 と効率よく反応することを確認した。

(図 1)



* は非特異的バンド

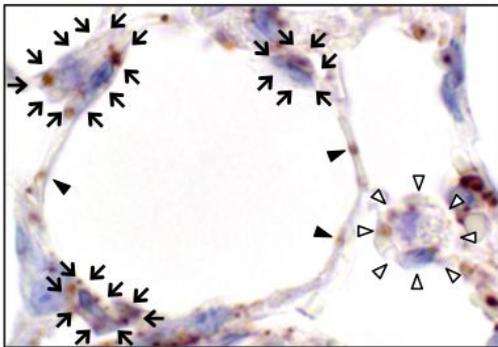
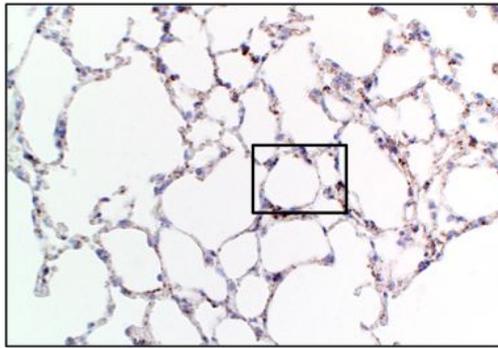
(2) 肺における Angpt12 発現細胞の同定

肺における Angpt12 発現細胞を明らかにするために、2E3 を用いて無刺激マウス (C57BL/6) 肺の免疫染色を行った。

無刺激肺において、Angpt12 は I 型肺胞上皮細胞、II 型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージにて発現していることが明らかとなった

(図2)

(図2)

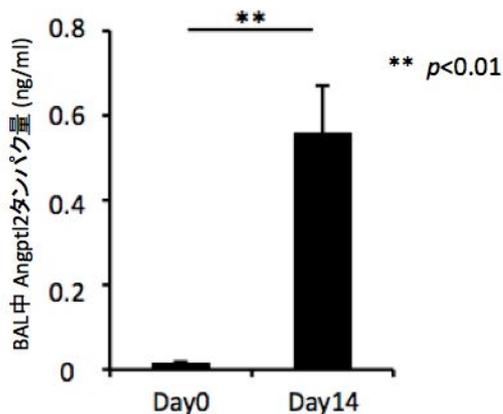


- ▲ I型肺胞上皮細胞
- II型肺胞上皮細胞
- ▽ 肺胞マクロファージ

(3) 肺線維症における Angpt12 の発現細胞の同定

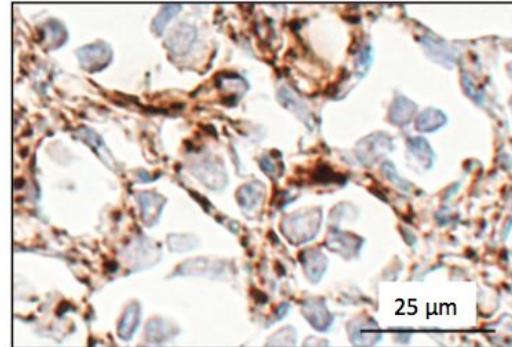
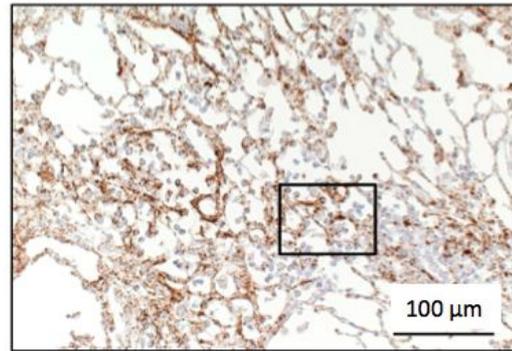
研究代表者は C57BL/6 マウスにプレオマイシン (5mg/kg, 日本化薬) を経気管投与し、投与後 14 日目における気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の Angpt12 タンパク濃度を測定した。プレオマイシン投与後の BAL 中では, Angpt12 タンパク濃度の上昇がみられた (図3)。

(図3) 気管支肺胞洗浄液中のAngpt12タンパク量(ng/ml)



次に、肺線維化部位のどの細胞で Angpt12 が発現しているかを明らかにするために、プレオマイシン投与後 14 日目の肺を用いて 2E3 による免疫染色を行った。プレオマイシン刺激後の肺では、線維化が亢進している部位、特に修復が必要とされる部位に多くの 2E3 陽

(図4) プレオマイシン投与後14日目の Angpt12免疫染色

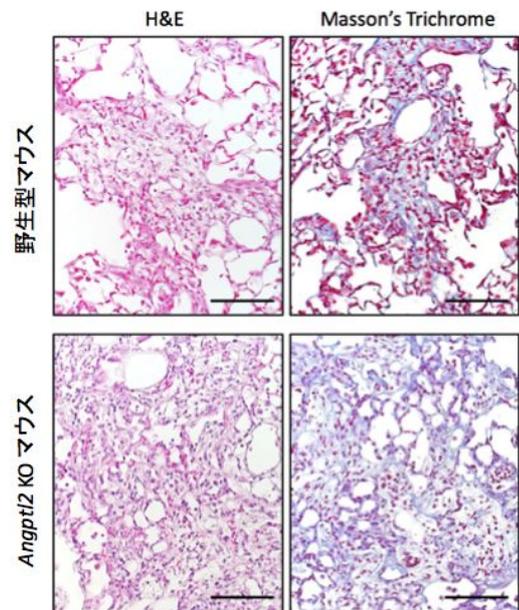


性細胞を認めた (図4)。以上の結果より、肺細胞における Angpt12 の発現は、肺組織修復に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

(4) Angpt12 ノックアウトマウスにおけるプレオマイシン肺臓炎モデルの解析

研究代表者は肺の細胞における Angpt12 の機能解析を明らかにするために、Angpt12 KO マウスを用いてプレオマイシン肺臓炎モデルを作成した。マッソン・トリクローム染色にてプレオマイシン刺激後 14 日目の肺線維化を比較したところ、Angpt12 KO マウスでは、

(図5) プレオマイシン投与後14日目



Scale bars: 100 μm

野生型マウスと比較して多くの膠原繊維を見出した(図5)。

一方、無刺激の *Angpt12* KO マウス肺における肺組織中のコラーゲン量および気管支肺胞洗浄液中の細胞分画の割合などは野生型マウスと違いがなかったことより、肺における *Angpt12* の発現は肺障害時に、より重要な役割を担っている可能性が示唆された。

今後は、肺組織における *Angpt12* の発現が、肺障害時の修復を促進させ、肺線維化抑制に作用するかどうか、さらなる検討が必要であると思われる。

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9件)

Masuda T, Endo M, Yamamoto Y, Odagiri H, Kadomatsu T, Nakamura T, Tanoue H, Ito H, Yugami M, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Iwase H, Mizuta H, Oike Y. (2015), ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. *Sci Rep*. Mar 16;5:9170. doi: 10.1038/srep09170. 査読有り

Nakamura T, Okada T, Endo M, Nakamura T, Oike Y, Mizuta H. (2015), Angiopoietin-like protein 2 promotes inflammatory conditions in the ligamentum flavum in the pathogenesis of lumbar spinal canal stenosis by activating interleukin-6 expression. *Eur Spine J*. 24:2001-2009. doi: 10.1007/s00586-015-3835-z. 査読有り

Horiguchi H, Endo M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Odagiri H, Masuda T, Kadomatsu T, Tanoue H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Baba H, Oike Y. (2014), Angiopoietin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase-phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. *Cancer Sci*. 105:1550-1559. doi: 10.1111/cas.12554. 査読有り

Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y. (2014), Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25:245-254. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.012. 査読有り

Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H, Oike Y. (2014), Serum ANGPTL2 levels reflect clinical features of breast cancer patients: implications for the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Int J Biol Markers*, 29:e239-e245. doi:

10.5301/jbm.5000080. 査読有り

Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, Ninomiya T, Horiguchi H, Endo M, Tabata M, Tazume H, Tian Z, Takahashi O, Terada K, Takeya M, Hao H, Hirose N, Minami T, Suda T, Kiyohara Y, Ogawa H, Kaikita K, Oike Y. (2014), Role of Endothelial Cell-Derived Angpt12 in Vascular Inflammation Leading to Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis Progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34:790-800. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.303116. 査読有り

Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka M, 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. (2014), The Secreted Protein ANGPTL2 Promotes Metastasis of Osteosarcoma Cells Through Integrin 5 1, p38 MAPK, and Matrix Metalloproteinases. *Sci Signal*, Jan 21;7:ra7. doi: 10.1126/scisignal.2004612. 査読有り

Nakamura T, Okada T, Endo M, Kadomatsu T, Taniwaki T, Sei A, Odagiri H, Masuda T, Fujimoto T, Nakamura T, Oike Y, Mizuta H. (2014), Angiopoietin-like protein 2 induced by mechanical stress accelerates degeneration and hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. *PLoS One*, e85542. doi: 10.1371/journal.pone.0085542. 査読有り

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. (2014), Angiopoietin-like protein 2 accelerates carcinogenesis by activating chronic inflammation and oxidative stress. *Mol Cancer Res*, 12:239-249. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0336. 査読有り

[学会発表](計2件)

遠藤元誉、新規炎症関連因子 ANGPTL2 による肺がん浸潤・転移分子機構、第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月20日、東京国際フォーラム(東京)

遠藤元誉、*Angpt12* によって惹起される炎症による発がん制御メカニズム解明、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書](計2件)

遠藤元誉、尾池雄一、メディカルレビュー社、Thyroid Cancer Explore、2016年、Vol. 2 No. 1, p51-p56

遠藤元誉、尾池雄一、診断と治療社、産科と婦人科、2015年、Vol. 82 No. 2, p141-p146

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 元誉 (ENDO, Motoyoshi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：40398243

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

井上 博雅 (INOUE, Hiromasa)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
教授
研究者番号：30264039