

平成 27 年 5 月 19 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：25870543

研究課題名(和文) 癌や生活習慣病の発症・進展に関するANGPTL2発現のエピゲノム制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of ANGPTL2 expression in cancer and lifestyle disease

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 癌組織内の低酸素や低栄養といった環境変化により骨肉腫細胞におけるDNA脱メチル化関連酵素の発現が亢進し、ANGPTL2プロモーター領域のDNA脱メチル化が促進されることで、ANGPTL2の発現が誘導されることを見出した。ANGPTL2発現上昇に伴い骨肉腫細胞から分泌されたANGPTL2タンパク質は、骨肉腫細胞自身の浸潤能や腫瘍血管内侵入を亢進することで転移を促進することが明らかとなった。さらに、ANGPTL2がTLL1によって切断され、その転移促進能が不活性化されることが明らかとなり、TLL1によるANGPTL2の切断を促進することが、癌転移に対する新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We showed that the tumor microenvironment, such as hypoxia and nutrient starvation, increased ANGPTL2 expression levels in osteosarcoma cells and decreased DNA methylation levels of its promoter. In addition, the tumor microenvironment induced expression of DNA demethylation-related enzymes in osteosarcoma cells. These results suggest that the tumor microenvironment induces ANGPTL2 expression in tumor cells by inducing DNA demethylation of its promoter. We also showed that tumor cell-derived ANGPTL2 enhanced tumor metastasis through promoting invasive activity of tumor cells and tumor cell intravasation. Furthermore, We found that full-length ANGPTL2 protein was extracellularly cleaved by TLL1 into an inactive form lacking the capacity to enhance tumor aggressiveness. Thus, strategies to promote cleavage of full-length ANGPTL2 by TLL1 could block metastasis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：癌 生活習慣病 エピゲノム 発現制御 ANGPTL2

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病、癌、および神経変性疾患などの疾患の多くは、ゲノム情報の遺伝子および生育環境・生活習慣などの環境因子が相互作用する多因子疾患であり、原因遺伝子の同定だけでは疾患の発症・進展の分子基盤解明や予防法・介入法の確立に十分に至っていないのが現状である。近年、エピジェネティックな遺伝子発現制御が発生・分化およびリプログラミングといった多彩な生命現象の分子基盤であることが強く認識され、環境因子がエピゲノムの状態に影響し、その結果としてエピゲノムが変化し記憶されることで、癌をはじめ従来エピゲノムの関与があまり議論されてこなかった代謝性疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患などの様々な疾患の発症・進展に寄与していることが注目されている。

研究代表者は、アンジオポエチン様因子 (ANGPTL) ファミリーの一つである ANGPTL2 が慢性炎症を基盤病態とする種々の疾患の発症・進展を促進することを明らかにしてきた。慢性炎症は発癌や癌の進展・転移にも関与しており、我々は正常組織における ANGPTL2 の持続的な発現増加が発癌に関与することを明らかにした。さらに、癌細胞においては微小環境の変化により ANGPTL2 発現が誘導され、ANGPTL2 を高発現するようになった癌細胞が高い転移能を示すことを明らかにした。また、研究代表者は、癌細胞における ANGPTL2 の発現誘導機構として、NFAT、ATF2 および c-Jun の 3 因子が ANGPTL2 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、癌細胞における ANGPTL2 発現を活性化することを明らかにした。ANGPTL2 の発現誘導が慢性炎症を基盤とする疾患の発症・進展に寄与しており、ANGPTL2 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いる。

2. 研究の目的

エピゲノムの状態が生活習慣病や癌などの疾患の発症・進展に寄与することが注目されており、これらの疾患の分子基盤を解明するうえで疾患関連遺伝子の発現制御に関わるエピゲノム変化とその意義を明らかにすることは重要である。これまで ANGPTL2 遺伝子が本来生理的にどのようなエピゲノム状態を維持し、それがどのような分子機構によって変化することで ANGPTL2 発現が誘導され、各疾患の発症や進展に寄与しているか明らかとなっていない。したがって、これまでに研究代表者が明らかにした癌や生活習慣病の発症・進展に関わる ANGPTL2 の発現調節機構に加え、ANGPTL2 発現調節に関与するエピゲノム制御機構を解明することは重要な課題である。本研究の準備研究として、ANGPTL2 を高発現し転移能が高い癌細胞株に比べ、ANGPTL2 の発現レベルが低く転移能が低い癌細胞株の ANGPTL2 プロモーター領域における DNA メチル化が亢進していることを既に見出

しており、ANGPTL2 プロモーター領域の DNA メチル化レベルが癌の浸潤・転移と関連する可能性が示唆された。そこで、本研究では、癌細胞において ANGPTL2 発現調節に関与するエピゲノム制御機構に焦点し、その制御機構および ANGPTL2 発現に関わるエピゲノム変化と癌細胞の浸潤や転移との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

様々なヒト癌細胞株を用いて、リアルタイム PCR による ANGPTL2 の発現レベル解析および Bisulfite-PCR または Bisulfite sequence 法による ANGPTL2 プロモーター領域の DNA メチル化レベルを解析した。癌微小環境による ANGPTL2 発現制御に関わるエピゲノムの状態を解析するため、ANGPTL2 レベルが低くプロモーター領域の DNA メチル化レベルが高いヒト骨肉腫細胞株を免疫不全マウスの脛骨移植し、移植後、経時的に腫瘍組織を摘出し、得られた移植後の骨肉腫細胞における ANGPTL2 や DNA 脱メチル化関連酵素の発現レベルおよび DNA メチル化レベルの解析を行った。さらに、ANGPTL2 による骨肉腫の肺転移促進メカニズムを解析する目的で、ANGPTL2 を高発現するヒト骨肉腫細胞株を用いて ANGPTL2 ノックダウン細胞株を樹立した。得られたノックダウン細胞とコントロール細胞を用い、移植実験を行い、ANGPTL2 ノックダウンによる肺転移や生存期間への影響を評価した。また、これらの細胞を用いて RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析、ウエスタンブロッティングによる細胞内シグナル伝達分子の解析、細胞増殖実験を行い、ANGPTL2 ノックダウンの影響を評価した。

ANGPTL2 を恒常的に高発現する HEK293 細胞株の培養上清では、全長型に加えて切断型 ANGPTL2 タンパクが存在することを見出した。そこで、ANGPTL2 の切断部位を同定するため、切断型 ANGPTL2 タンパクを精製し、得られた切断型 ANGPTL2 タンパクの N 末端アミノ酸シーケンスを行った。同定された ANGPTL2 切断部位の配列をもとに、*in silico* 解析によって ANGPTL2 切断に関わる酵素の同定を行った。また、切断型 ANGPTL2 を恒常的に高発現する骨肉腫細胞株を樹立し、移植実験を行うことで、癌転移における ANGPTL2 切断の意義を検討した。

4. 研究成果

我々は、ヒト骨肉腫細胞株を免疫不全マウスの脛骨に移植し、同所性の移植モデルを作製したところ、移植前に比べ移植後の骨肉腫細胞株における ANGPTL2 発現が経時的に上昇すること、移植前の骨肉腫細胞株では、ANGPTL2 プロモーター領域は高度にメチル化されているが、移植後、ANGPTL2 プロモーター領域の DNA メチル化レベルが経時的に減少することを見出した。さらに、移植後の骨肉腫細胞株では、DNA 脱メチル化関連遺伝子の

発現が上昇すること、癌の微小環境で認められる低酸素や低栄養環境下で骨肉腫細胞株を培養すると、移植モデルと同様に DNA 脱メチル化関連遺伝子の発現上昇を認めた。以上より、低酸素や低栄養などの癌微小環境の変化によって ANGPTL2 プロモーター領域の DNA 脱メチル化が引き起こされ、ANGPTL2 発現が誘導されることが示唆された。さらに、骨肉腫細胞株における ANGPTL2 プロモーター領域の DNA メチル化レベルと ANGPTL2 発現レベルおよび癌細胞の転移能に相関が認められた。ANGPTL2 による癌転移能促進メカニズムを解析したところ、ANGPTL2 はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ -p38 MAPK-MMP (matrix metalloproteinase) 経路を介して癌細胞の浸潤能を亢進し、腫瘍血管新生とこれに伴う血管内への癌細胞の侵入を促進することが明らかとなった (図 1)。

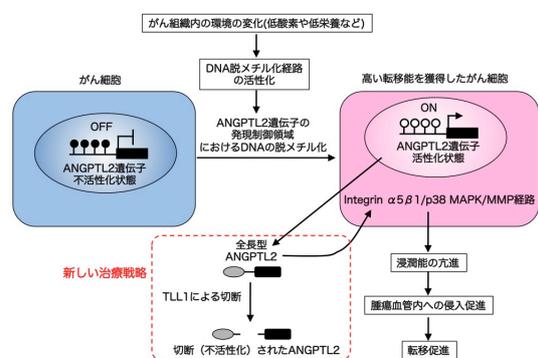


図1 癌微小環境によるANGPTL2シグナルを介した癌転移促進機構と新たな癌転移の治療標的

我々は、細胞外に分泌された ANGPTL2 が切断されることを見出した。興味深いことに、全長型 ANGPTL2 を過剰発現させた骨肉腫細胞株を移植したマウスではコントロールの骨肉腫細胞株を移植したマウスに比べ生存期間の短縮が認められるが、切断型 ANGPTL2 を過剰発現した骨肉腫細胞株では、生存期間の短縮を認めないことから、全長型 ANGPTL2 が、がんの進展促進に重要であることが明らかとなった。さらに、我々は ANGPTL2 の切断に関わるプロテアーゼとして tollloid-like 1 (TLL1) を同定し、骨肉腫患者のサンプルでは ANGPTL2 が高発現しているのに対し、TLL1 の発現レベルが低いことも明らかとなった。以上より、TLL1 による ANGPTL2 の切断を促進することが、新たな癌転移に対する治療標的となる可能性が考えられた (図 1)。

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 6 件)

①Masuda 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 M.S., Manabe I., Iwase H., Mizuta H., & Oike Y. ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. *Sci. Rep.* 5: 9170, 2015. (査読有) DOI: 10.1038/srep09170.

②Horiguchi H., Endo M., Miyamoto Y., Sakamoto Y., Odagiri H., Masuda T., Kadomatsu T., Tanoue H., Motokawa I., Terada K., Morioka M.S., Manabe I., Baba H., & Oike Y. 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, 2014. (査読有) DOI: 10.1111/cas.12554.

③Yoshizawa T., Karim M.F., Sato Y., Senokuchi T., Miyata K., Fukuda T., Go C., Tasaki M., Uchimura K., Kadomatsu T., Tian Z., Smolka C., Sawa T., Takeya M., Tomizawa K., Ando Y., Araki E., Akaike T., Braun T., Oike Y., Bober E., & Yamagata K. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab.* 19: 712-721, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.cmet.2014.03.006

④Horio 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. The role of endothelial cell-derived ANGPTL2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34: 790-800, 2014. (査読有) DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.303116.

⑤Kadomatsu T., Endo M., Miyata K., & Oike Y. Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends Endocrinol. Metab.* 25: 245-254, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.tem.2014.03.012. Odagiri H.*,

⑥ Kadomatsu T.*, Endo M., Masuda T., Morioka M.S., 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. *These authors contributed equally to this work. The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin $\alpha 5 \beta 1$, p38 MAPK, and matrix metalloproteinases. *Sci. Signal.* 7: ra7, 2014. (査読有) DOI: 10.1126/scisignal.2004612.

[学会発表] (計 3 件)

①門松 毅、小田切 陽樹、遠藤 元誉、尾池 雄一、生活習慣病・がんの共通分子機構とアンジオポエチン様因子 2 シグナル、第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館（京都）、2014 年 10 月 18 日

②門松 毅、小田切 陽樹、遠藤 元誉、舛田 哲朗、森岡 勝樹、福原 茂朋、宮本 健史、小林 英介、宮田 敬士、青井 淳、堀口 晴紀、西村 尚剛、寺田 和豊、薬師寺 俊剛、真鍋 一郎、望月 直樹、水田 博志、尾池 雄一、がん微小環境はエピジェネティックな ANGPTL2 の発現誘導を介してがんの浸潤・転移を促進する、第 10 回宮崎サイエンスキャンプ、シーガイアコンベンションセンター（宮崎）、2014 年 2 月 14 日

③門松 毅、小田切 陽樹、遠藤 元誉、舛田 哲朗、森岡 勝樹、宮田 敬士、青井 淳、堀口 晴紀、西村 尚剛、寺田 和豊、薬師寺 俊剛、真鍋 一郎、水田 博志、尾池 雄一、The Tumor Microenvironment Accelerates Tumor Cell Invasivity and Metastasis through Epigenetic Regulation of *ANGPTL2*、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド（神戸）、2013 年 12 月 3 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://molgene.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