

学位論文

Doctoral Thesis

大腸がん細胞の生存におけるアンジオポエチン様因子2の機能解析
(The role of Angiopoietin-like protein 2 in colorectal cancer cell
survival)

堀口 晴紀

Haruki Horiguchi

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子遺伝学

指導教員

尾池 雄一教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子遺伝学

2015年3月

目次

(各項目右の括弧内はページを表す)

1. 要旨 (3)
2. 関連論文 (4)
3. 謝辞 (5)
4. 略語一覧 (6)
5. 研究の背景と目的
 - 5-1. 大腸がん (7)
 - 5-2. ANGPTL2 とがん (7)
 - 5-3. BCL-2 ファミリー (8)
 - 5-4. Syk (9)
 - 5-5. 研究目的 (9)
6. 実験方法
 - 6-1. ANGPTL2 発現株の樹立 (10)
 - 6-2. Syk ノックダウン (10)
 - 6-3. ELISA 法による ANGPTL2 タンパク濃度の測定 (10)
 - 6-4. 細胞増殖アッセイ (10)
 - 6-5. アポトーシス解析 (11)
 - 6-6. リアルタイム定量 PCR (11)
 - 6-7. 免疫ブロット (11)
 - 6-8. 免疫化学染色 (12)
 - 6-9. NF- κ B および PI3K 阻害実験 (12)
 - 6-10. RNA シークエンス (12)
 - 6-11. インテグリン発現解析 (12)
 - 6-12. 細胞接着アッセイ (13)
 - 6-13. 臨床サンプルの解析 (13)
7. 実験結果
 - 7-1. 大腸がん細胞株における ANGPTL2 の発現は抗がん剤により誘導されるアポトーシスを抑制する (16)
 - 7-2. ANGPTL2 は抗アポトーシス作用を持つ BCL-2 ファミリーの発現を上昇させる (20)
 - 7-3. ANGPTL2 は Syk を誘導する (22)
 - 7-4. ANGPTL2 は PI3K-NF- κ B 経路を活性化する (25)

- 7-5. NF- κ B および PI3K インヒビターにより ANGPTL2 発現株における BCL-2 ファミリー遺伝子の発現誘導および生存能の亢進が阻害される (27)
- 7-6. ANGPTL2 による Syk の誘導メカニズム解析 (30)
- 7-7. ANGPTL2 は Syk-NFAT 経路を活性化することで ANGPTL2 自身の発現を誘導する (32)
- 7-8. 大腸がん患者のがん原発巣における ANGPTL2 の発現と抗がん剤に対する奏効率は逆相関を示す (34)
- 8. 考察 (36)
- 9. 結論 (38)
- 10. 参考文献 (40)

1. 要旨

【目的】 アンジオポエチン様因子 2 (ANGPTL2)は、炎症性発がんやがん細胞の浸潤・転移に重要な役割を果たしている。しかしながら、がん細胞の生存に ANGPTL2 が、いかに関与しているかは明らかにされていない。本研究では、ヒト大腸がんにおける ANGPTL2 発現とがん細胞の生存シグナルの関与について検討した。

【方法】 ヒト大腸がん細胞株 SW480 を用い、ANGPTL2 発現株を樹立した。樹立した細胞株に、大腸がんの治療で用いられる様々な抗がん剤を投与し、アポトーシス関連遺伝子の誘導を解析した。また、大腸がん患者の原発腫瘍における ANGPTL2 の発現と抗がん剤に対する奏効率の関連について解析した。

【結果】 ANGPTL2 発現株ではコントロール株と比較して抗がん剤により誘導されるアポトーシスが著しく減少していることを見出した。そのメカニズムとして、ANGPTL2 発現株では、抗アポトーシス作用を有する BCL-2 ファミリー因子の発現が促進していることを明らかにした。また、RNA シークエンス解析の結果より、ANGPTL2 が Syk-PI3K シグナルを介して BCL-2 ファミリー遺伝子の発現を調節していること、Syk-NFAT シグナルによるフィードバックループにより ANGPTL2 自身の発現を調節していることを見出した。また、化学療法を受けている切除不能な大腸がん患者の原発腫瘍における ANGPTL2 の発現と抗がん剤に対する奏効率を解析し、それらに逆相関が見られることを明らかにした。

【考察】 ANGPTL2 は Syk-PI3K シグナルを介して、抗アポトーシス促進因子である BCL-2 および BCL-XL を誘導し、抗がん剤によって惹起される細胞死を抑制していると考えられる。

【結論】 大腸がん治療においては、ANGPTL2 シグナルを減弱させることで、抗がん剤に対する治療抵抗性を改善できる可能性が示唆された。

2. 関連論文

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

Haruki Horiguchi, Motoyoshi Endo, Yuji Miyamoto, Yasuo Sakamoto, Haruki Odagiri, Tetsuro Masuda, Tsuyoshi Kadomatsu, Hironori Tanoue, Ikuyo Motokawa, Kazutoyo Terada, Masaki Suimye Morioka, Ichiro Manabe, Hideo Baba and Yuichi Oike

Angiopoietin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase–phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling
Cancer science 2014 Dec;105(12):1550-9

3. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、数多くのご指導、ご鞭撻を受け賜りました熊本大学分子遺伝学分野の尾池雄一教授に深く感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、大腸がん臨床サンプル収集などにおいてご理解、ご協力を下さいました熊本大学消化器外科の馬場秀夫教授に心から感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、数多くのご助言やサポートをしてくださった熊本大学大学院分子遺伝学分野教室、消化器外科学分野の皆様に心から感謝いたします。

4. 略語一覧

本論文において，以下の略語を用いた。

5-FU	: 5-fluorouracil
7AAD	: 7-amino-actinomycin D
ANGPTL	: angiopoietin-like protein
CDDP	: cisplatin
CPT-11	: irinotecan
EMT	: epithelial-mesenchymal transition
MMC	: mitomycin C
NFAT	: nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	: nuclear factor- κ B
PI3K	: phosphoinositide 3-kinase
Syk	: spleen tyrosine kinase
TGF	: transforming growth factor

5. 研究の背景と目的

5-1. 大腸がん

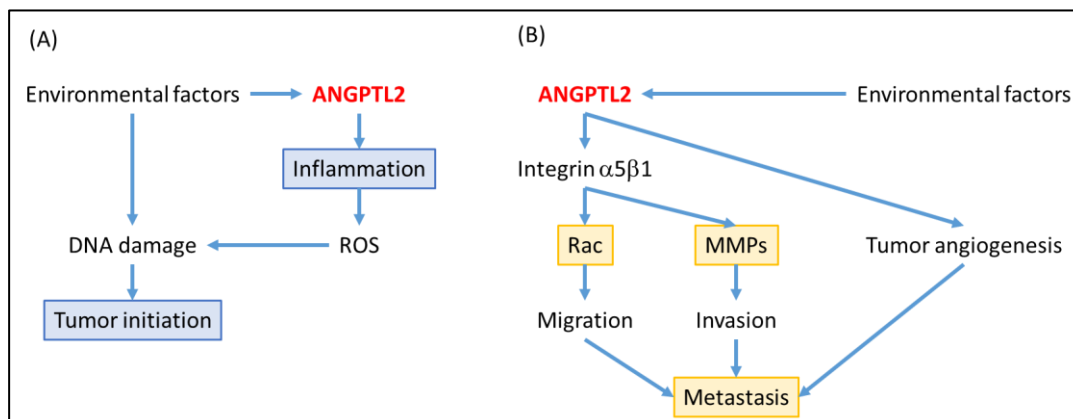
大腸がんは全世界で3番目に多いがんであり、2012年には約130万人が大腸がんとして診断され、全がん種の約10パーセントを占めている(1)。大腸がん患者の一次処置として外科的処置、化学療法または放射線治療が選択されているが(2)、患者の長期生存率は極めて悪く、特に、がん細胞の薬剤耐性獲得は治療の失敗をもたらす結果として患者の死亡に至る(3)。そのため、腫瘍細胞の薬剤耐性獲得メカニズムの解明は極めて重要な課題である。

5-2. ANGPTL2 とがん

アンジオポエチン様因子 (Angiopoietin-like protein; ANGPTL)ファミリーはN端にcoiled-coil domain, C端にfiblinogen-like domainを有し、血管新生因子アンジオポエチンと類似した構造を持つ分泌タンパクとして同定された(38)。ANGPTLファミリータンパクは、ヒトでは現在8種類同定されているが、それぞれアンジオポエチンとは異なった生物学的機能を有しており、現在、血管新生、脂質代謝、エネルギー代謝などの作用が報告されている(38-40)。

一方、炎症は発がんのみならず、がん増殖、がん生存、がん浸潤・転移などに重要な役割を果たしていることが知られている(41)。近年、ANGPTL2は慢性炎症を惹起し、様々ながんの発生・進展に関与することが報告されている(4-6)。化学物質誘発による皮膚扁平上皮発がんマウスモデルにおいて、皮膚組織における持続的なANGPTL2の発現が、炎症を誘導し発がん、がん浸潤・転移を促すことが報告されている(7, 8) (図1A)。また、肺がん、乳がんおよび骨肉腫におけるANGPTL2の発現が腫瘍細胞自身の運動能・浸潤能を促進し、がんの転移を促進させることも報告されている(9) (図1B)。

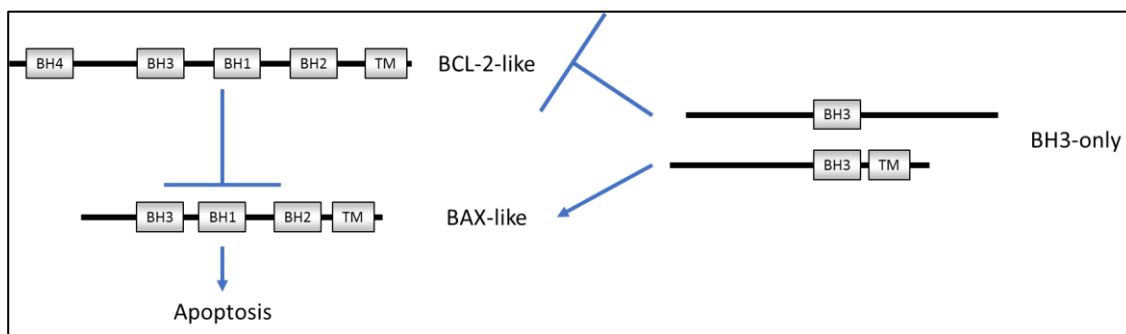
図 1 がんにおける ANGPTL2 の役割



5-3. BCL-2 ファミリー

BCL-2 ファミリーはミトコンドリアでのアポトーシスプログラムを制御し、さらに 3 つのサブファミリーに分けられる。BAX-like メンバー (BAX, BAK) はミトコンドリアに孔を開けることでチトクロム c を放出させ、アポトーシスに導くアポトーシス促進メンバーである。一方、BCL-2-like メンバー (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1) は BAX-like ファミリーに結合し直接的に、あるいは間接的に活性化を防ぐことでアポトーシスを抑制する生存促進メンバーである。さらに、これら BCL-2-like メンバーの機能を中和、抑制解除することで BAX-like ファミリーを直接・間接的に制御するアポトーシス促進メンバー、BH3-only メンバー (BIM, BIK, BAD, NOXA, PUMA など) がある。抗がん剤による腫瘍細胞の死もこれら BCL-2 ファミリーにより制御されている (図 2)。

図 2

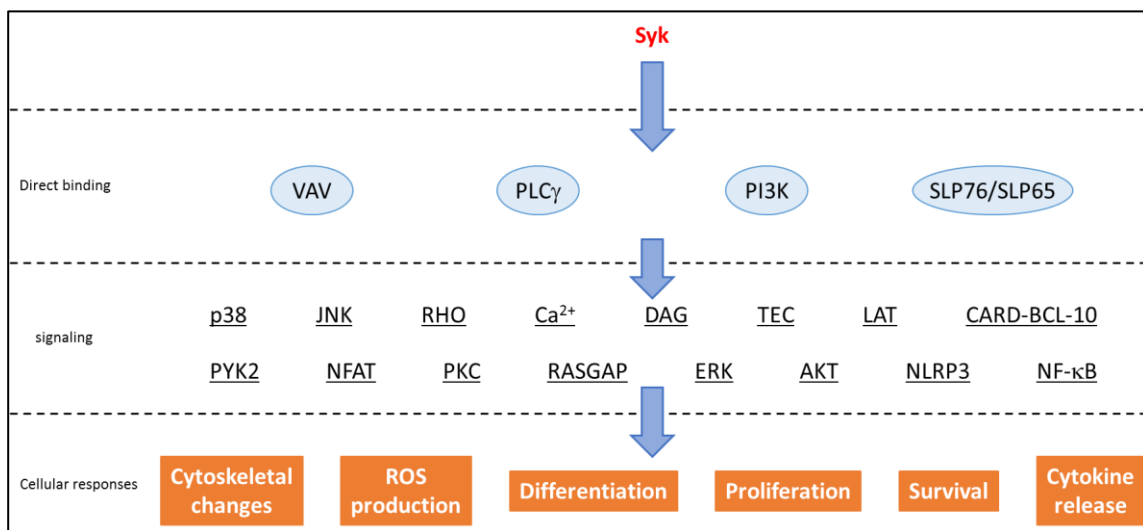


5-3. Syk

Spleen tyrosine kinase (Syk)は 72 kDa の非受容体型チロシンキナーゼの一つで、主に造血細胞に強く発現している(10)。Syk シグナリングは、従来、免疫反応に関係があるとされていた(10)。しかしながら、Syk 欠損マウスではリンパ管の形成不全が見出され、現在では Syk シグナリングが様々な機能を有していると考えられている(10)。

これまでに Syk は細胞生存シグナル、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、nuclear factor- κ B (NF- κ B)、ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase)-MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase)、さらに nuclear factor of activated T cells (NFAT)経路を活性化することが報告されている(10, 12, 13) (図 3)。

図 3 Syk シグナリング



Attila Mocsai et al. *NATURE REVIEWS*, 2010 より一部改変

5-4. 研究目的

これまで、ANGPTL2 は発がんを促進し、がん細胞の浸潤・転移を促進する因子であることが見出されてきたが、がん細胞の生存に ANGPTL2 が、いかに関与しているかは明らかにされていない。本研究では、ヒト大腸がんにおける ANGPTL2 発現とがん細胞の生存シグナルの関与について検討した。

6. 実験方法

6-1. ANGPTL2 発現株の樹立

ヒト大腸がん細胞株 SW480 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入し, 10%FCS を含有した Leibovitz's L15 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて 37°C, 5% CO₂ 下にて培養した。ANGPTL2 発現細胞株とそのコントロール株は, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてヒト *ANGPTL2* 発現ベクター(9)とそのコントロールベクター pcDNA3.1(9) を SW480 細胞株に導入し, 400µg/ml G418 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) により単クローンのセレクションを行った。

6-2. Syk 遺伝子ノックダウン

Syk 遺伝子のノックダウンは siRNA (SYK [ID 6850] Trilencer-27 human siRNA; OriGene, Rockville, MD, USA), コントロールとして Trilencer-27 Universal Scrambled Negative Control (OriGene) を用いて行った。

6-3. ELISA 法による ANGPTL2 タンパク濃度の測定

細胞培養液中の ANGPTL2 タンパク濃度は ANGPTL2 assay kit (IBL, Gunma, Japan) を用いて測定した。2種類の抗 ANGPTL2 モノクローナル抗体によるサンドイッチ法で ANGPTL2 タンパクを検出した。ANGPTL2 マウスモノクローナル抗体が固相されたプレートで, 37°C 一時間反応させ, その後 0.05% Tween-20 含有 PBS (PBST) で洗浄し, horseradish ペルオキシダーゼ標識されたマウスモノクローナル抗体を加えた。4°C にて 1 時間インキュベートし, PBST で洗浄, Tetra Methyl Benzidine を加えて発色させた。30 分後に 1N 硫酸により反応を停止し, 450nm 吸光度で測定した。

6-4. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖アッセイは Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto,

Japan)を用いて行った。96well プレートに細胞数 5000 個/ウェルに調整し、播種後 24, 48, 72 時間後に 10ul の CCK 反応液を加え、37°C で 3 時間培養後、吸光度を 450nm で測定した。増殖抑制アッセイではこれらの方法に加え、5-フルオロウラシル (5-fluorouracil; 5-FU), イリノテカン (irinotecan; CPT-11), シスプラチン (cisplatin; CDDP), マイトマイシン C (mitomycin C; MMC) をそれぞれ 10 μ g/ml の濃度で添加し解析した。

6-5. アポトーシス解析

アポトーシスの解析はフローサイトメトリーにて行った。さまざまな抗がん剤 (5-FU, CPT-11, CDDP, MMC) (各 10 μ g/ml) により処理した細胞は、アクターゼ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて剥離後、Annexin V-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA), 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) の二重染色を行った。FACSCalibur (BD bioscience) を用いて測定し、Flowjo ソフトウェア (Digital Biology) を用いて解析した。アポトーシス細胞の判定は Annexin V 陽性細胞とした。

6-6. リアルタイム定量 PCR

細胞から全 RNA をトリゾール (Invitrogen) を用いて抽出した。RNA を PrimeScript RT reagent Kit (TakaraBio, Ozu, Japan) を用いて逆転写した。CYBR Premix Ex Taq II を用い PCR 産物の発現レベルは Thermal Cycler Dice Real Time System (TakaraBio) を用いて解析した。18s mRNA を内因性コントロールとし、発現量を補正した。各プライマーの配列を表 1 に示す。

6-7. 免疫ブロット

細胞は lysis buffer (20mM HEPES-KOH, pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM NaF, 10mM Na₄P₂O₇, 1mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100) を用いて均質化した。遠心後、上清をサンプルとし、SDS-polyacrylamide を用いて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写後、ECL kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いて検出した。その際には一次抗体として ANGPTL2 (R&D Systems), Hsc70 (Santa

Cruz Biotechnology), Syk, phospho-Syk, BCL-2, BCL-XL (いずれも Cell Signaling Technology), GAPDH (Imgenex)を用いた (1000 倍希釈)。

6-8. 免疫化学染色

培養細胞は 50%アセトンと 50%エタノールで 20 分固定し, 非特異的反応は 2% BSA にてブロッキングした。一次抗体は NF- κ B 抗体および NFATc3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を用い (200 倍希釈), 核は DAPI (Funakoshi, Tokyo, Japan)にて染色した。

6-9. NF- κ B および PI3K 阻害実験

NF- κ B インヒビターである BAY11-7085 (Sigma-Aldrich)を 10 μ M, 無血清培地にて 1 時間反応後, 通常培養を 24 時間行った。PI3K インヒビターの LY2924002 (Sigma-Aldrich)は 50 μ M を通常培養下で 24 時間反応させた。

6-10. RNA シークエンス

SW480/ANGPTL2-1 とそのコントロールとして SW480/Ctrl 細胞株は NEBNext®Ultra RNA Library Prep Kit を用いてサンプル化し, Illumina Genome Analyzer Iix を用いてシークエンス解析を行った。

6-11. インテグリン発現解析

インテグリンの発現解析には, 1 \times 10⁵個の SW480 細胞株を以下に示す抗体とそれぞれ 4 $^{\circ}$ C, 30 分間反応させた (各々 10 μ g/ml の濃度にて反応)。anti- α 5 β 1 (JBS5), anti- α v β 3 (LM609), anti- α v β 5 (P1F6) (MILLIPORE, Temecula, CA), anti- α 4 (2B4), anti- β 2 (R & D Systems)。洗浄後, FITC 標識抗マウス IgGまたは抗ヤギ IgGを 4 $^{\circ}$ C, 30 分間反応させた。死細胞の検出には, 7-AAD を用いた。解析は FACSCalibur (BD) により行った。なお解析には CellQuest (BD) および Flowjo ソフトウェア (Tree Star, inc., Ashland, USA) を用いた。

6-12. 細胞接着アッセイ

96-well flat-bottomed plates (MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Denmark) に ANGPTL2 タンパクを 4°C, overnight でコーティングし, 3% BSA/PBS, 室温, 30 分間ブロッキングを行った。SW480 細胞株は 2×10^5 個に調整し以下のインヒビターと 37°C, 30 分間反応させた。(anti- β 1, anti- α 5 β 1, anti- α v β 5 (MILLIPORE), RGD または RGE ペプチド (Sigma, St. Louis, MO))。これらの細胞は ANGPTL2 コートプレートで 37°C, 2 時間反応させ, 非接着細胞は PBS で洗い流した。接着細胞は 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (4%PFA)にて固定し, 0.5%クリスタル紫/25%メタノールを用いて染色した。色細胞は 1% SDS で可溶化し, 595nm で吸光度を測定した。

6-13. 臨床サンプルの解析

2005 年 4 月から 2013 年 12 月まで熊本大学病院にて化学療法を受けた切除不能大腸がん患者 232 例を対象とし, 本研究で用いた。その内, 92 例のがん原発巣の生検サンプルを用いて ANGPTL2 免疫染色を行った (表 2)。本研究は熊本大学倫理委員会の承認の元に行われ, 全ての患者に文書による説明と同意を得た。

表 1 リアルタイム定量 PCR に用いたプライマー一覧

<i>Gene</i>	Forward primer	Reverse primer
<i>hSYK</i>	TCGCTACCACAGCCCATGAA	TCTTTGTCGATGCGATAGTGCAG
<i>hBCL2</i>	TCGCCCTGTGGATGACTGAG	CAGAGTCTTCAGAGACAGCCAGGA
<i>hBCL-XL</i>	AGCTTGGATGGCCACTTACCTG	TGCTGCATTGTTCCCATAGAGTTC
<i>hBAX</i>	GCGAGTGTCTCAAGCGCATC	CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGAA
<i>hNFATc1</i>	TACCAGGTGCACCGCATCA	TTTCAGGATTCCGGCACAGTC
<i>hNFATc2</i>	AGATGGAAGCCACGGTGGATAA	TTCCGATATTCAGGGATCTCAACAA
<i>hNFATc3</i>	CATCGAGCCATTATGAAACTGAA	CGATCATCTGCTGTCCCAATAAAC
<i>hNFATc4</i>	CCCTGTCTTGATGGCCTACGA	GTGTGTCAGGCTCCAGGTGAAC
<i>hMCL1</i>	CCTGCCCATCTCAGAGCCATA	TTCCACTGGATTTGGCAGACA
<i>hBAD</i>	TGAGTGACGAGTTTGTGGACTCCT	CTGGAGCTTTGCCGCATCT
<i>hANGPTL2</i>	GCCACCAAGTGTGAGCCTCA	TGGACAGTACCAAACATCCAACATC
<i>hRPS18</i>	TTTGCGAGTACTCAACACCAACATC	GAGCATATCTTCGGCCACAC
<i>hIL-1β</i>	GCTGATGGCCCTAAACAGATGAA	TGAAGCCCTTGCTGTAGTGGTG
<i>hTNF-α</i>	GACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTA	CAGCCTTGGCCCTTGAAGA

表 2

臨床サンプル詳細

Variables	ANGPTL2 expression		<i>P</i> value
	Low (n=57)	High (n=35)	
	n (%)	n (%)	
Median Age, years (range)	64 (34-82)	66 (48-81)	0.07
Sex			0.545
Male	33 (58)	18 (51)	
Female	24 (42)	17 (49)	
Timing of metastases			0.777
Simultaneous	47 (82)	30 (86)	
Metachronous	10 (18)	5 (14)	
Site of primary tumor			0.948
Right colon	13 (23)	7 (20)	
Left colon	24 (42)	15 (43)	
Rectum	20 (35)	13 (37)	
Number of metastatic sites			0.993
1	26 (46)	16 (46)	
≥2	31 (54)	19 (54)	
Metastatic sites			0.657
Liver only	18 (32)	10 (29)	
Liver + other	26 (46)	14 (40)	
Liver not affected	13 (23)	11 (31)	
Pretreatment CEA level			0.755
<100	25 (48)	16 (52)	
≥100	27 (52)	15 (48)	
unknown	5	4	
1st line chemotherapy			0.677
L-OHP base	52 (91)	31 (89)	
irinotecan base	5 (9)	4 (11)	
1st line target agent			0.495
anti-VEGF antibody	28 (49)	19 (34)	
anti-EGFR antibody	12 (21)	4 (11)	
not combined	17 (30)	12 (54)	

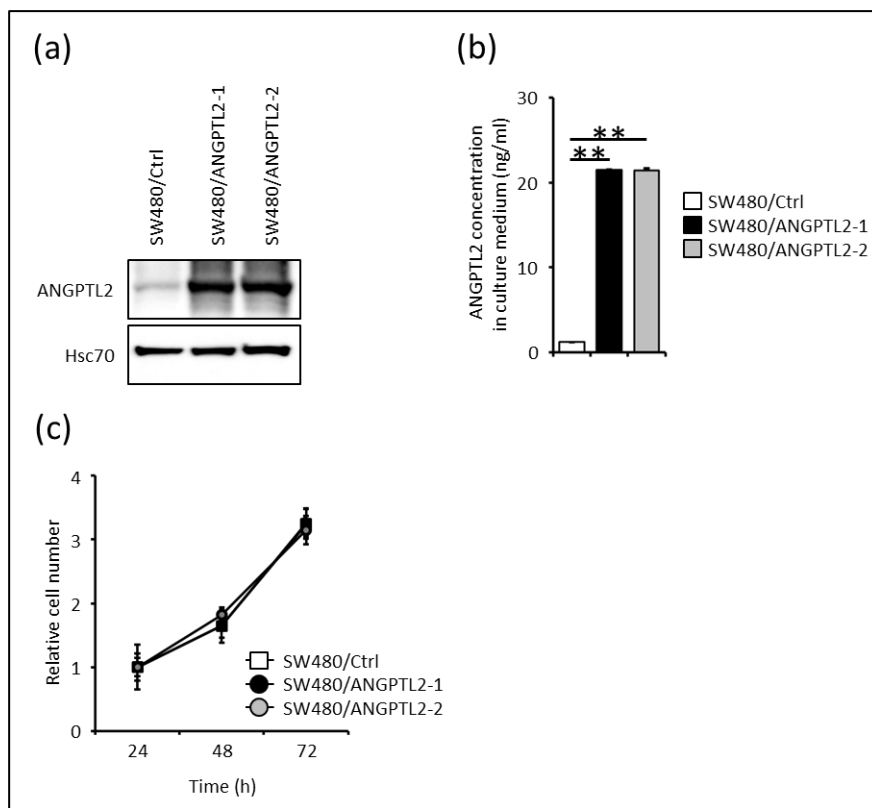
7. 実験結果

7-1. 大腸がん細胞株における ANGPTL2 の発現は抗がん剤により誘導されるアポトーシスを抑制する

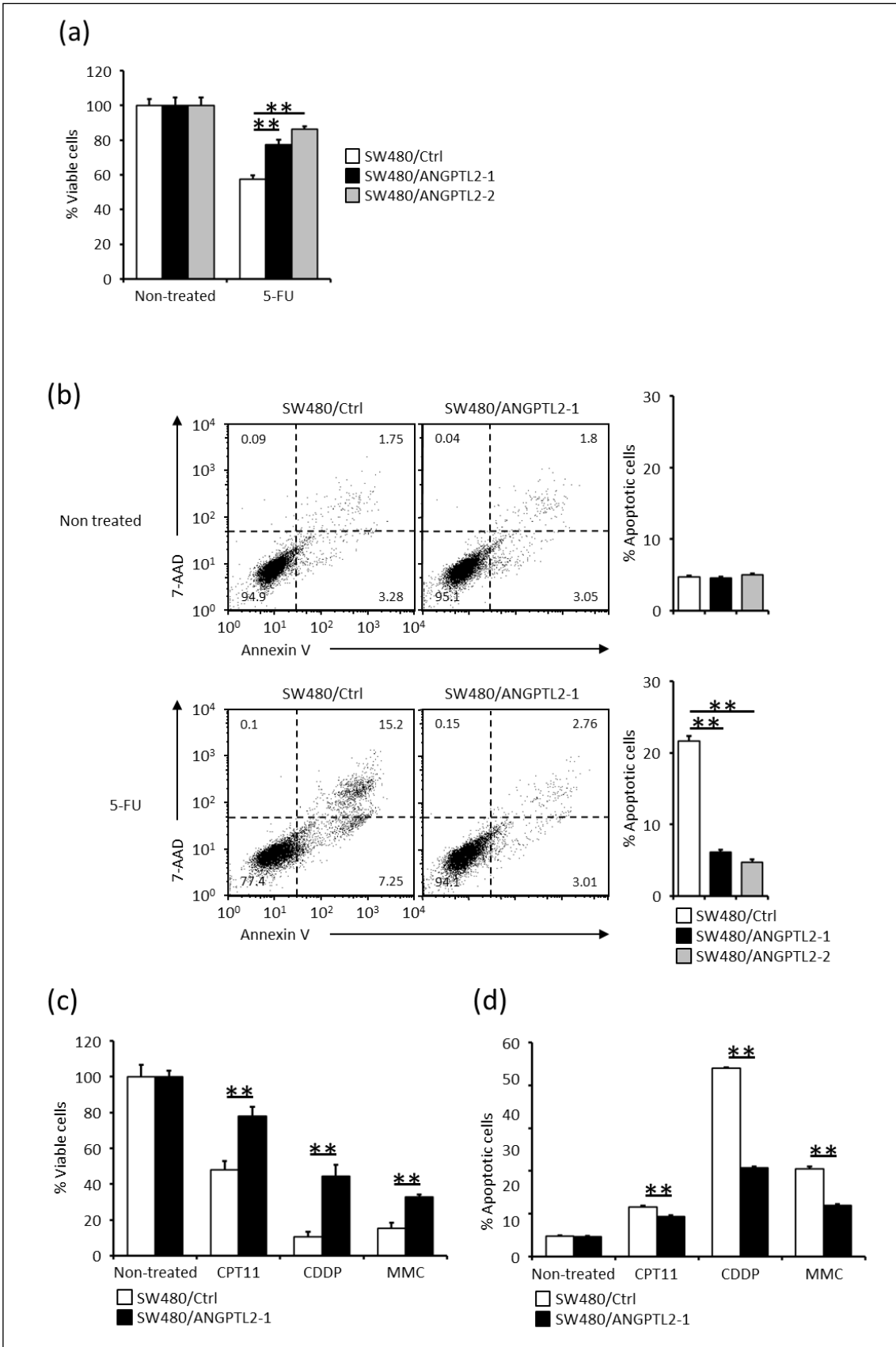
大腸がん細胞の生存における ANGPTL2 の役割を明らかにするために、ヒト大腸がん細胞株 SW480 細胞株において ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, 2), コントロールベクター株 (SW480/Ctrl) を樹立した。ウエスタンブロット法により, ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, 2) では, コントロール株と比較して ANGPTL2 タンパク発現が上昇していることを確認した (図 4a)。同様に, 培養上清中に分泌された ANGPTL2 タンパク濃度を ELISA 法にて測定し, ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, 2) では, コントロール株と比較して培養液中の ANGPTL2 濃度が上昇していることを確認した (図 4b)。一方, 細胞の増殖に関しては, これらの細胞株間には明らかな増殖能の差は認めなかった (図 4c)。以上の結果より, ANGPTL2 の発現は, 大腸がん細胞の増殖に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

次に, これらの大腸がん細胞株に, 大腸がんの抗がん剤として一般的に用いられる 5-FU(17)による処理を行った。5-FU は, チミジル酸合成酵素阻害により DNA を傷害することで, 細胞にアポトーシスを誘導する。5-FU 刺激 24 時間後において CCK-8 を用いて生存細胞の数を比較したところ, ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, 2) ではコントロール株 (SW480/Ctrl) と比較して生存細胞の割合が増加していた (図 5a)。次に, これらの細胞間のアポトーシスが生じる割合に違いがあるか検討するために, Annexin V と 7AAD を用いて解析を行った。フローサイトメトリーを用いた解析より, ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, 2) ではコントロール株 (SW480/Ctrl) と比較して, 5-FU によって誘導されるアポトーシス細胞の割合が著しく減少していた (図 5b)。さらに, 他種の抗がん剤であるイリノテカン, シスプラチン, マイトマイシン C(2, 18)を用いて, 同様の解析を行った。5-FU の結果と同様に ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) では, 生存細胞の増加とアポトーシス細胞の割合が減少した (図 5c, d)。これらの結果より, SW480 細胞株における持続的な ANGPTL2 の発現は, 抗がん剤によって惹起されるアポトーシスが抑制されていることが明らかとなった。

図 4



- (a) コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2)のウエスタンブロット法による ANGPTL2 タンパクの発現解析。インターナルコントロールは Hsc70 を用いた。
- (b) ELISA 法による培養液中の分泌 ANGPTL2 タンパク濃度の測定 (n=3)。
- (c) 培養細胞の増殖能アッセイ。播種後 24 時間の値を 1 とした (n=3)。誤差範囲：標準誤差 ** $P < 0.01$



- (a) コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2)における 5-FU 処理後の生存細胞の割合。未処理における生存細胞数を 100%とした (n=4)。
- (b) フローサイトメトリーによるアポトーシス解析。(上) 未処理, (下) 5-FU 処理。(右) アポトーシス細胞 (Annexin V 陽性細胞数)の割合の定量化 (n=3)。
- (c) コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1)の CPT11, CDDP, MMC 処理後の生存細胞の割合。未処理における生存細胞数を 100%とした (n=4)。
- (d) フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞 (Annexin V 陽性細胞数)の割合の定量化 (n=3)。

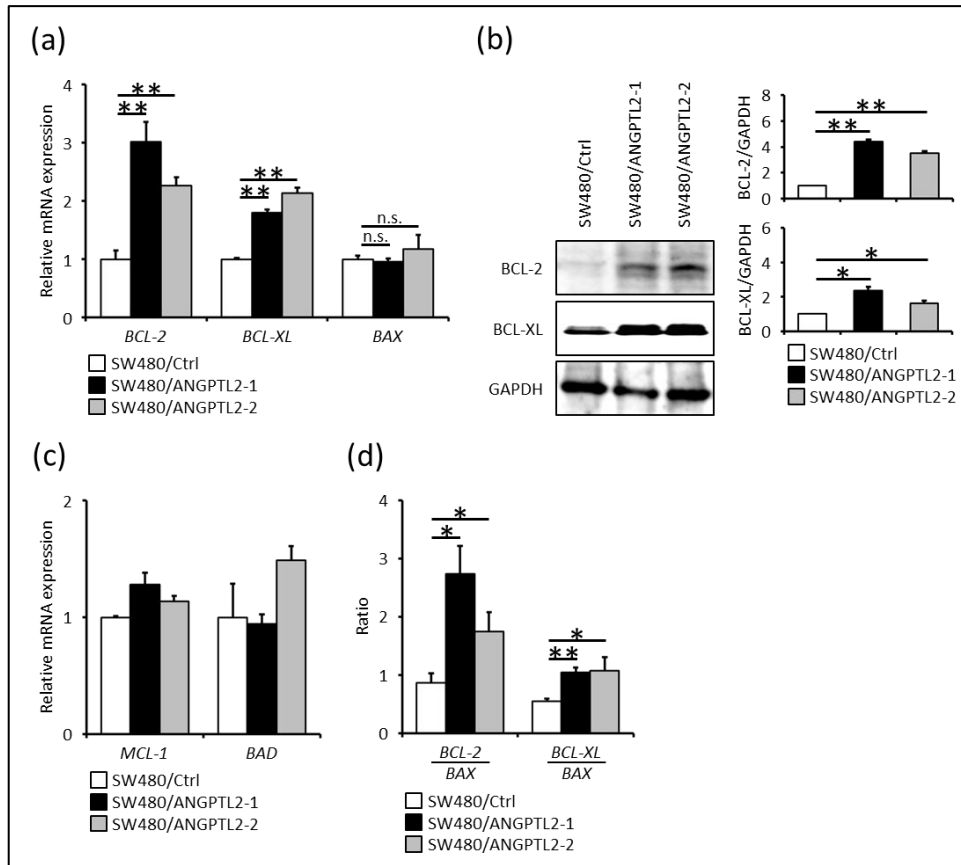
誤差範囲：標準誤差 ** $P < 0.01$

7-2. ANGPTL2は抗アポトーシス作用を持つBCL-2ファミリーの発現を上昇させる

BCL-2ファミリーは細胞死の調節に重要なファミリー遺伝子であり(11)、アポトーシス促進メンバーとアポトーシス抑制メンバーとに分けられる。それらのうち、抗アポトーシス因子であるBCL-2, BCL-XLおよびMCL-1は大腸がん細胞において5-FU誘導性のアポトーシスを阻害することが報告されている(19)。そのため本研究では、ANGPTL2の過剰発現によって大腸がん細胞株におけるBCL-2ファミリーの発現に変化が見られないか検討した。リアルタイム定量PCR法およびウエスタンブロット法の結果、ANGPTL2発現株(SW480/ANGPTL2-1, 2)ではコントロール株(SW480/Ctrl)に比較して抗アポトーシス因子であるBCL-2, BCL-XLの発現がmRNAレベル、タンパクレベルで上昇していることを見出した(図6a, b)。一方、同じアポトーシス抑制メンバーであるMCL-1, またアポトーシス促進メンバーであるBAX, BADの発現はこれらの細胞間では差を認めなかった(図6a, c)。

近年、*BCL-2/BAX*比および*BCL-XL/BAX*比が高いがんが、腫瘍の進展に有利である可能性が報告されている(28)。また、これらの比率が大腸がん患者の予後マーカーになり得ることが示唆されている(19, 20)。ANGPTL2発現株におけるこれらの比率を確認したところ、コントロール株(SW480/Ctrl)に比べ、*BCL-2/BAX*比、*BCL-XL/BAX*比の上昇を認めた(図6d)。以上の結果より、大腸がん細胞株におけるANGPTL2の過剰発現が抗アポトーシス因子であるBCL-2およびBCL-XLの発現を誘導し、また*BCL-2/BAX*比、*BCL-XL/BAX*比を上昇させ、5-FUをはじめとした抗がん剤により誘導されるアポトーシスを抑制していることが示唆された。

図 6

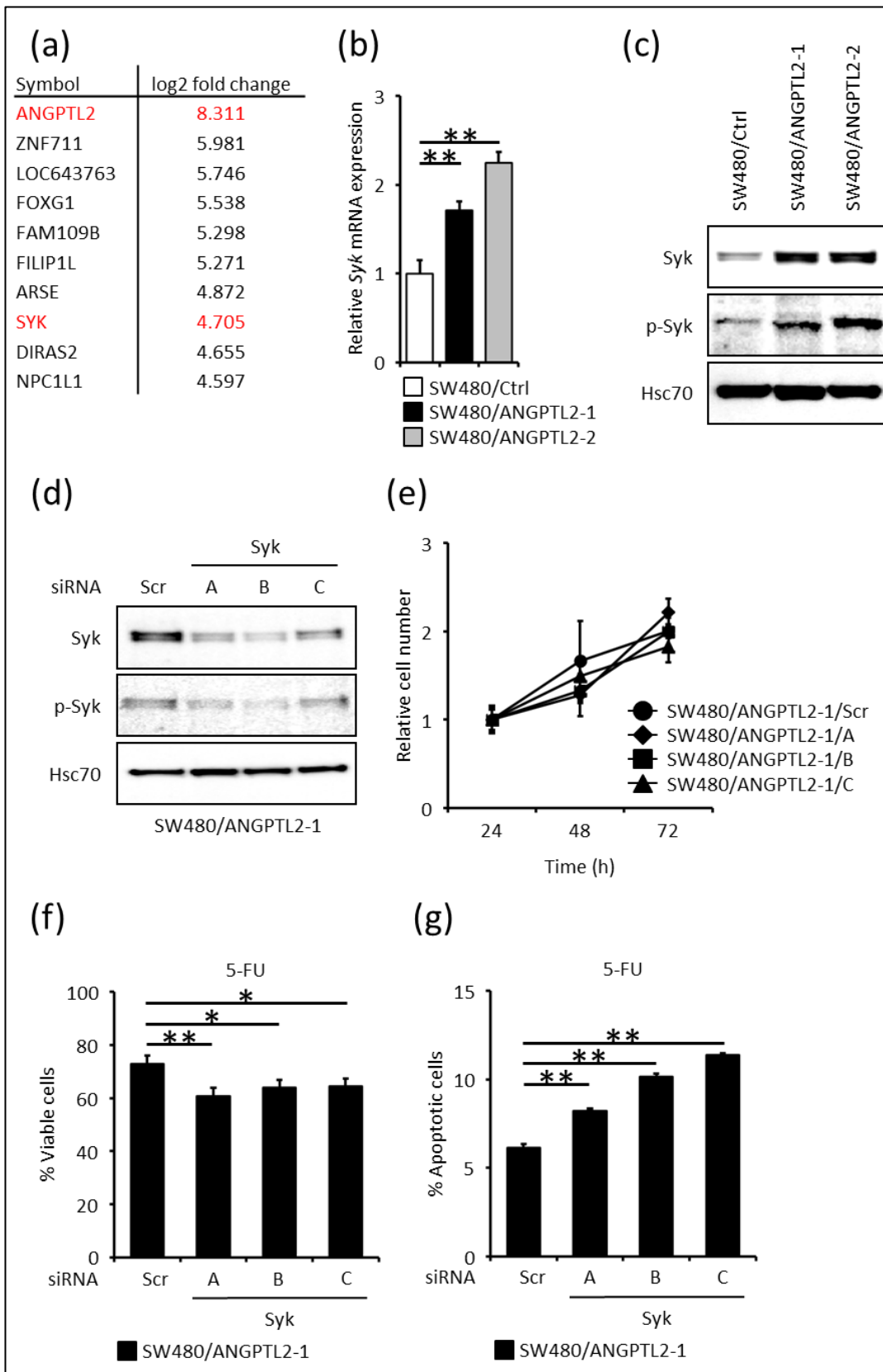


- (a) リアルタイム定量 PCR 法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2) における *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX* の mRNA 発現解析。コントロール株における発現量を 1 とした (n=3)。
- (b) ウェスタンブロット法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2) における *BCL-2*, *BCL-XL* のタンパク発現解析。(右) 定量化。コントロール株における発現量を 1 とした (n=3)。
- (c) リアルタイム定量 PCR 法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2) における *MCL-1*, *BAD* の mRNA 発現解析。コントロール株における発現量を 1 とした (n=3)。
- (d) リアルタイム定量 PCR 法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2) における *BCL-2* mRNA/*BAX* mRNA 比, *BCL-XL* mRNA/*BAX* mRNA 比の解析 (n=3)。誤差範囲: 標準誤差 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. n.s., 有意差なし

7-3. ANGPTL2 は Syk を誘導する

ANGPTL2 の下流シグナル経路を明らかにするために、ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) とコントロール株 (SW480/Ctrl) を RNA シークエンス法にて解析した。その結果、ANGPTL2 を始めとした 10 つの遺伝子が ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) において特に上昇していることを見出した。それらの中から、細胞生存に重要であることが報告されている *Syk*(10, 12, 13) が ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) において上昇していることに注目した (図 7a)。リアルタイム定量 PCR 法およびウエスタンブロット法を用いた解析により、ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, 2) ではコントロール株 (SW480/Ctrl) と比較して *Syk* の発現が上昇していることを確認した (図 7b, c)。一方、*Syk* の活性化にはチロシンリン酸化が重要であることが知られている(21)。*Syk* リン酸化をウエスタンブロット法にて解析したところ、ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, 2) ではコントロール株 (SW480/Ctrl) と比較して *Syk* のリン酸が亢進していた (図 7c)。これらの結果より、ANGPTL2 発現株における細胞生存の促進には *Syk* の誘導・活性亢進によるものである可能性が示唆された。

次に、ANGPTL2 発現株において *Syk* をノックダウンすることで 5-FU 処理により細胞生存が低下し、アポトーシスが誘導されるか検討した。ウエスタンブロット法の結果より、*Syk* ノックダウンによる *Syk* の発現低下とリン酸化の減弱を確認した (図 7d)。一方、通常培養条件下では培養 72 時間までにこれらの細胞株間の増殖に差異は認めなかった (図 7e)。しかしながら、*Syk* ノックダウン細胞株 (SiRNA/A, B および C) の 5-FU 処理後の生存能はコントロール細胞株 (siRNA/Scr) に比べて低下しており、さらに、アポトーシス細胞の割合が明らかに増加していた (図 7f, g)。これらの結果より、大腸がん細胞では、ANGPTL2 発現による *Syk* の誘導・活性亢進が、抗がん剤に対する生存能を促進させている可能性が考えられた。



- (a) RNA シーケンス解析により，ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1)にて発現が上昇していた上位 10 遺伝子。
- (b) リアルタイム定量 PCR 法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2)における *Syk* の mRNA 発現解析。コントロール株 (SW480/Ctrl)における発現量を 1 とした (n=3)。
- (c) ウェスタンブロット法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2)における *Syk*, phospho-*Syk* のタンパク発現解析。
- (d) *Syk* ノックダウン株 (SW480/ANGPTL2-1/siRNA/A, B, C)およびコントロール株 (SW480/ANGPTL2-1/siRNA/Scr)における *Syk*, phospho-*Syk* のタンパク発現解析。
- (e) *Syk* ノックダウン株の増殖能アッセイ。播種後 24 時間を 1 とした (n=4)。
- (f) *Syk* ノックダウン株 (SW480/ANGPTL2-1/siRNA/A, B, C)およびコントロール株 (SW480/ANGPTL2-1/siRNA/Scr)の 5-FU 処理後生存細胞の割合。未処理における生存細胞数を 100%とした (n=4)。
- (g) フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞 (Annexin V 陽性細胞数)の割合の定量化 (n=3)。

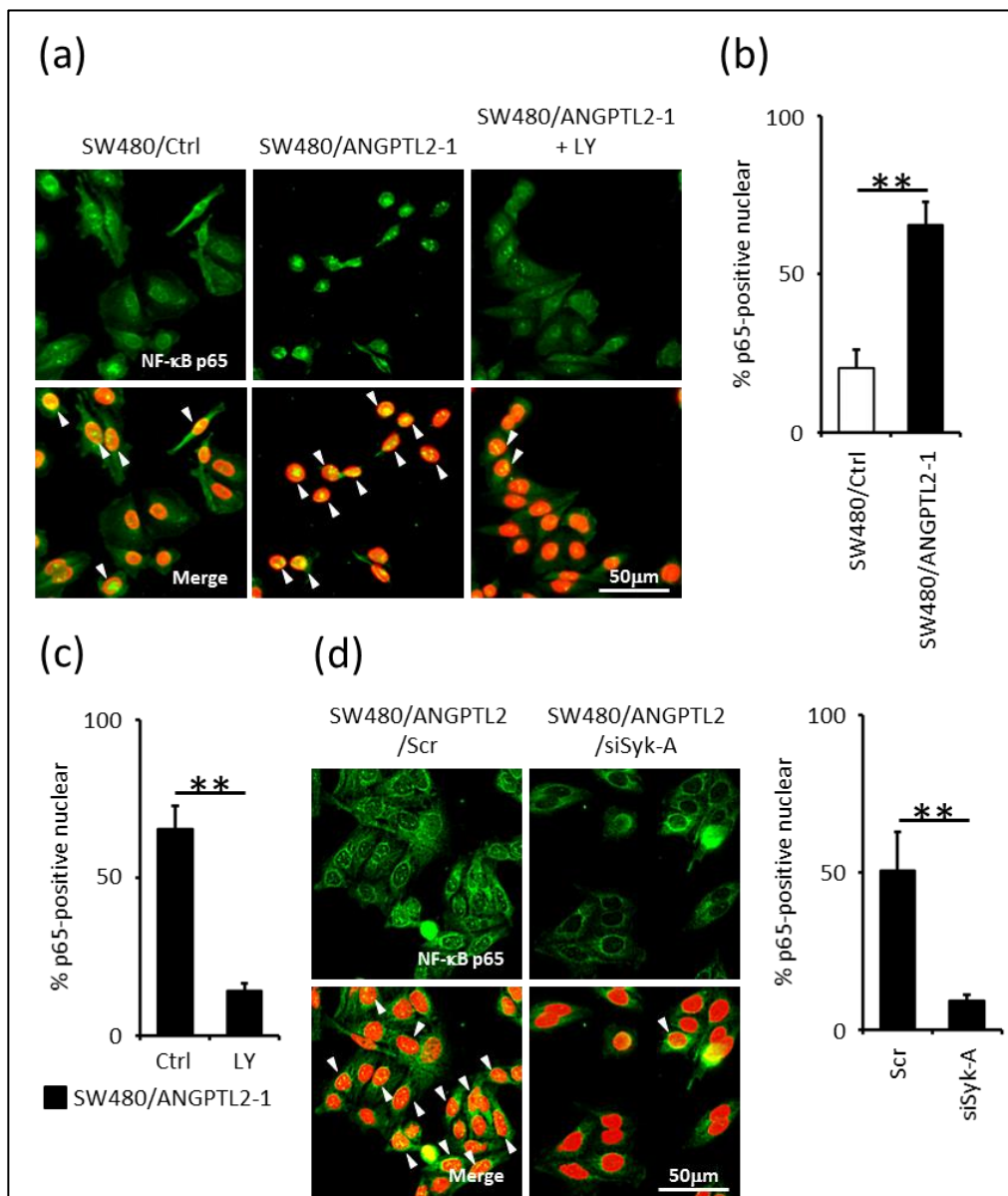
誤差範囲：標準誤差 * $P<0.05$; ** $P<0.01$

7-4. ANGPTL2 は PI3K-NF- κ B 経路を活性化する

NF- κ B は *BCL-2* ファミリー遺伝子の転写因子である(22)。また, Syk シグナルは NF- κ B を活性化することも明らかになっている(10)。ANGPTL2 による抗アポトーシス活性促進に NF- κ B が関与していないかを明らかにするために, コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) の NF- κ B 活性を免疫組織化学(免疫染色)にて解析した。NF- κ B を構成する p65 サブユニットは活性化すると細胞質から核内へと移行する。免疫染色の結果より, コントロール株 (SW480/Ctrl) では p65 は細胞質に多く局在し, 核内移行はほとんど認めなかった。一方, ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) においては, より多くの p65 の核内移行が見られ, ANGPTL2 発現株においては NF- κ B が活性化していることが明らかとなった (図 8a, b)。

Syk の下流シグナルには phosphoinositide 3-kinase (PI3K) シグナルが存在する(10)。PI3K シグナルは NF- κ B 経路を活性化し, 生存シグナルを誘導することが報告されている(23)。ANGPTL2 発現株における NF- κ B の活性化が PI3K シグナルを介するかを明らかにするために, PI3K 阻害剤である LY294002 にて処理し免疫染色にて p65 の局在を確認した。ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) では, LY294002 にて処理することで核内に移行していた p65 は著しく減少し, 細胞質に多くの p65 が局在していることを認めた (図 8a, c)。さらに, ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) の Syk をノックダウンすることで NF- κ B の核内移行が抑制されることを見出した (図 8d)。これらの結果より, 大腸がん細胞株における ANGPTL2 の発現は, Syk-PI3K 経路を介して NF- κ B を活性化している可能性が示唆された。

図 8



(a) コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) および ANGPTL2 発現株+PI3K 阻害剤添加 (SW480/ANGPTL2-1+LY294002) における p65 の免疫染色。核は DAPI にて染色した。矢頭は核内に p65 が移行した細胞を指す。

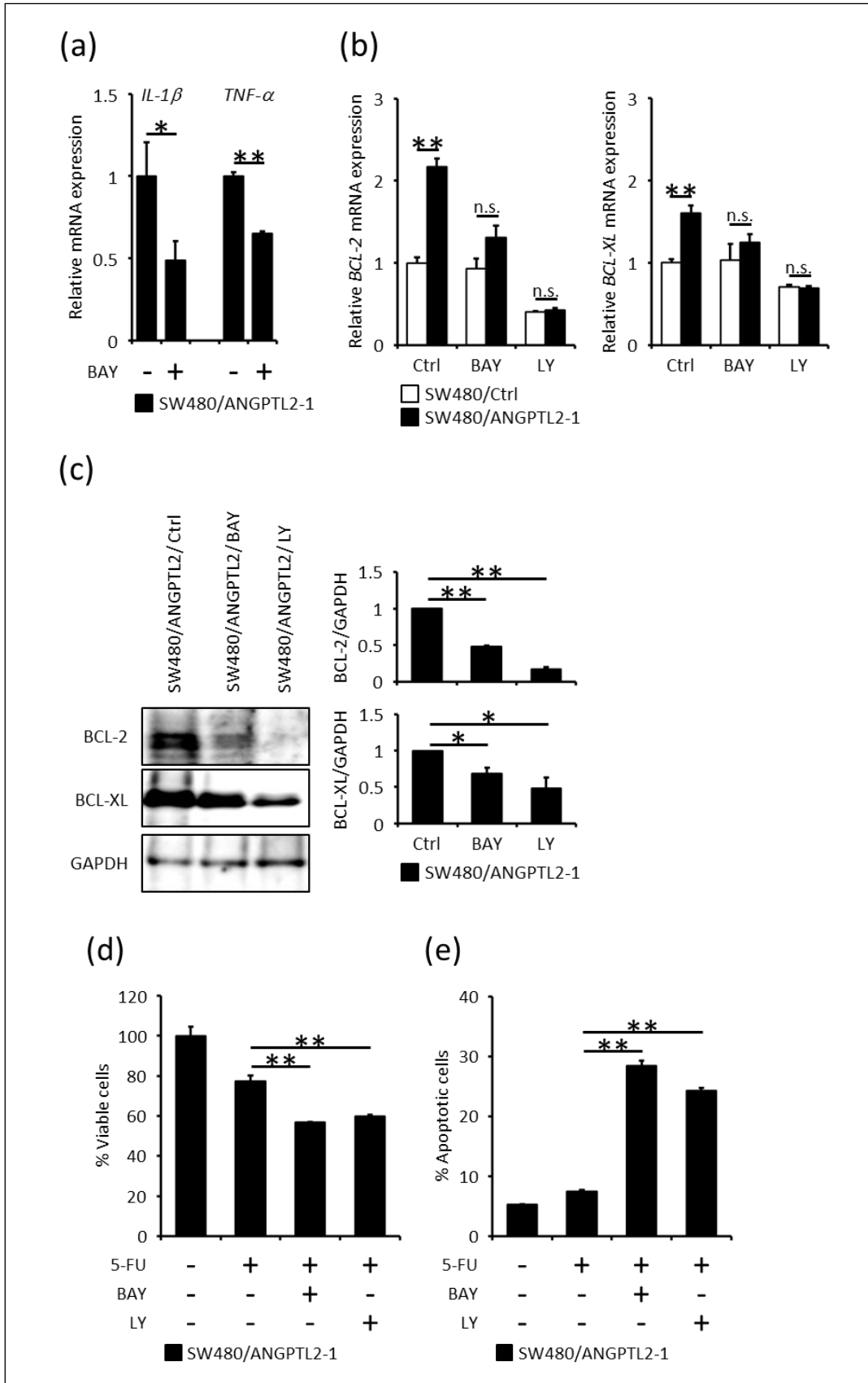
(b, c) (a) における p65 核内陽性細胞の定量化 (n=4)。

(d) (左) Syk ノックダウン株 (SW480/ANGPTL2-1/siRNA/A) およびコントロール株 (SW480/ANGPTL2-1/siRNA/Scr) における p65 の免疫染色。核は DAPI にて染色した。矢頭は核内に p65 が移行した細胞を指す。(右) p65 核内陽性細胞の定量化 (n=4)。

誤差範囲：標準誤差 ** $P < 0.01$ 。

7-5. NF- κ B および PI3K インヒビターにより ANGPTL2 発現株における BCL-2 ファミリー遺伝子の発現誘導および生存能の亢進が阻害される

ANGPTL2 発現株における PI3K -NF- κ B の活性化が抗アポトーシス作用を有する BCL-2 ファミリーの発現誘導とアポトーシス抑制に作用しているのかを解析した。ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) を NF- κ B 阻害剤 (BAY11-7085) あるいは PI3K 阻害剤 (LY294002) にて処理し, BCL-2 ファミリーの発現をリアルタイム定量 PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。BAY11-7085 が実際に NF- κ B シグナルを阻害しているかを確認するために, NF- κ B のターゲット遺伝子である *IL-1 β* および *TNF- α* の発現解析を行った (図 9a)。ANGPTL2 発現株における BCL-2 および BCL-XL の発現誘導は NF- κ B 阻害剤, PI3K 阻害剤により阻害された (図 9b, c)。さらに, これらの阻害剤に加え 5-FU 処理を行うことで, 生存能の低下とアポトーシスの誘導増強が観察された (図 9d, e)。これらの結果より, ANGPTL2 は PI3K/NF- κ B 経路を介して抗アポトーシス作用を有する BCL-2 ファミリー遺伝子 BCL-2 および BCL-XL の発現を誘導し, 高い生存能を獲得させていることが示唆された。



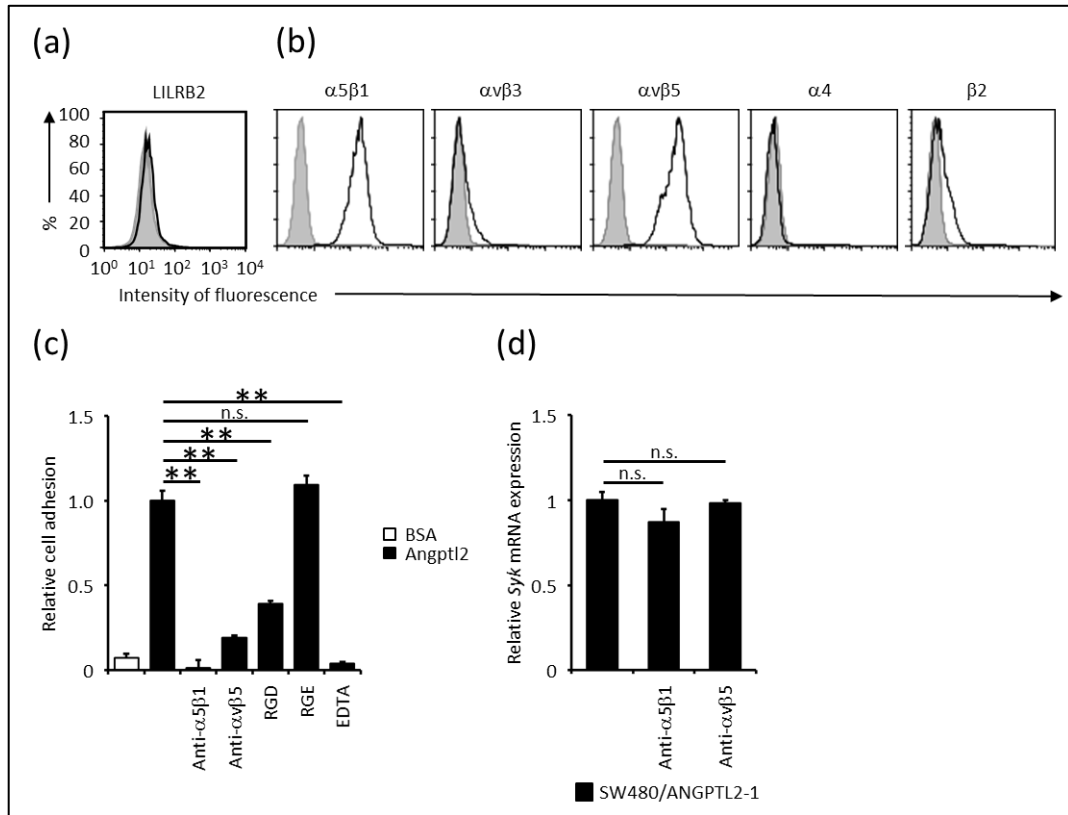
- (a) リアルタイム定量 PCR 法による ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) (BAY(-), BAY(+))における *IL-1 β* および *TNF- α* の mRNA 発現解析。それぞれ BAY(-)における発現量を 1 とした (n=3)。
- (b) コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) (未処理, BAY(+), LY(+))における *BCL-2*, *BCL-XL* の mRNA 発現解析。コントロール株 (SW480/Ctrl) (未処理)における発現量を 1 とした (n=3)。
- (c) コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) (未処理, BAY(+), LY(+))における *BCL-2*, *BCL-XL* のタンパク発現解析。(右) 定量化。コントロール株 (SW480/Ctrl) (未処理)における発現量を 1 とした (n=3)。
- (d) ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) (未処理, BAY(+), LY(+)) の 5-FU 処理後生存細胞の割合。未処理における生存細胞数を 100%とした (n=4)。
- (e) フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞 (Annexin V 陽性細胞数)の割合の定量化 (n=3)。

誤差範囲：標準誤差 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. n.s., 有意差なし

7-6. ANGPTL2 による Syk の誘導メカニズム解析

ANGPTL2 がどのレセプターを介し Syk-PI3K-NF- κ B シグナルを活性化しているのか検討した。これまでに, ANGPTL2 はインテグリン $\alpha 5\beta 1$ (4), Leukocyte Immunoglobulin-like receptor B2 (LILRB2) に結合することが報告されている (24)。そのため, SW480 細胞株において, これらの受容体が発現しているか検討した。フローサイトメトリーを用いた解析により, SW480 細胞株では LILRB2 の発現は認めなかったが (図 10a), インテグリン $\alpha 5\beta 1$ と $\alpha v\beta 5$ の発現を認めた (図 10b)。次に ANGPTL2 が, これらのインテグリンを介して結合するのかを確認するために細胞接着実験を行った。ANGPTL2 をコーティングしたプレートに SW480 細胞株を播種し, インテグリン $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ の中和抗体を添加し, 接着が阻害されるか検討したところ, 両インテグリン ($\alpha 5\beta 1$ および $\alpha v\beta 5$) の中和抗体にて接着が阻害された (図 10c)。これらの結果より, SW480 細胞株はインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と $\alpha v\beta 5$ に結合することが考えられた。次に, これらのインテグリンの中和抗体を用いて, ANGPTL2 による Syk の誘導阻害がみられるかを検討した。ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) にインテグリン中和抗体 (抗 $\alpha 5\beta 1$, 抗 $\alpha v\beta 5$) を添加しても Syk の誘導には変化を認めなかった (図 10d)。以上の結果より, ANGPTL2 による Syk 誘導は, インテグリン $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ を介するものではなく, 他のレセプターを介している可能性が考えられた。

図 10



(a) フローサイトメトリーによる SW480 における LILRB2 の発現解析。

(b) フローサイトメトリーによる SW480 における各インテグリンの発現解析。

(c) インテグリン中和抗体による接着阻害実験 (n=3)。

(d) リアルタイム定量 PCR による ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) (コントロール IgG, anti-α5β1 および anti-αvβ5) における *Syk* の mRNA 発現解析。コントロール IgG 添加における発現量を 1 とした (n=3)。

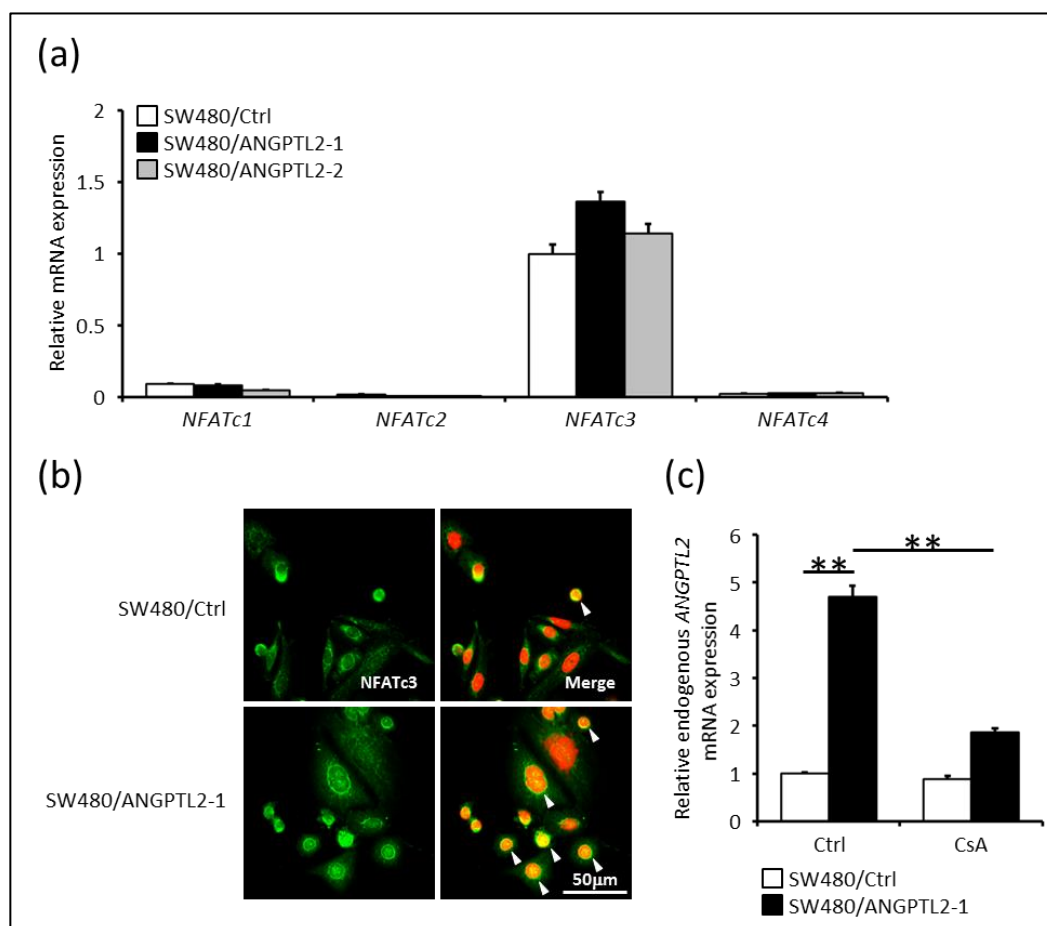
誤差範囲：標準誤差 ** $P < 0.01$. n.s., 有意差なし

7-7. ANGPTL2 は Syk-NFAT 経路を活性化することで ANGPTL2 自身の発現を誘導する

Syk は NFAT シグナルを活性化することが報告されている(25)。一方、NFAT は ANGPTL2 の発現を誘導することが報告されている(10)。したがって、ANGPTL2 は Syk-NFAT シグナルを介して ANGPTL2 自身の発現を制御している可能性が考えられた。まず、SW480 細胞株における NFATc ファミリーの発現をリアルタイム定量 PCR 法にて解析したところ、これらの細胞株では *NFATc3* が発現していることを見出した(図 11a)。非活性型の NFATc は細胞質に存在するが(26)、活性化した NFATc は核内に移行し *ANGPTL2* を含む様々な遺伝子の転写を促進することが知られている(9)。そのため、コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1)の NFATc3 の局在を明らかにするために免疫染色を用いて解析した。ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1)においては NFATc3 が核内に局在しており(図 11b), ANGPTL2 発現株では NFATc3 が活性化していることが示唆された。

次に、ANGPTL2 が自身の発現を制御している可能性について検討した。*ANGPTL2* 発現ベクターには存在しない *ANGPTL2* 3'-UTR 配列を認識するプライマーを用いて、内因性の *ANGPTL2* mRNA の誘導を検討した。リアルタイム定量 PCR 法の結果より、ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1)ではコントロール株 (SW480/Ctrl)と比較して内因性 *ANGPTL2* の明らかな誘導を認めた(図 11c)。また、NFAT 阻害剤であるシクロスポリン A (CsA)により ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1)における *ANGPTL2* の誘導は著しく抑制された(図 11c)。これらの結果より、ANGPTL2 は Syk-NFAT 経路を活性化することで、ANGPTL2 自身の発現を上昇させていることが明らかとなった。

図 11

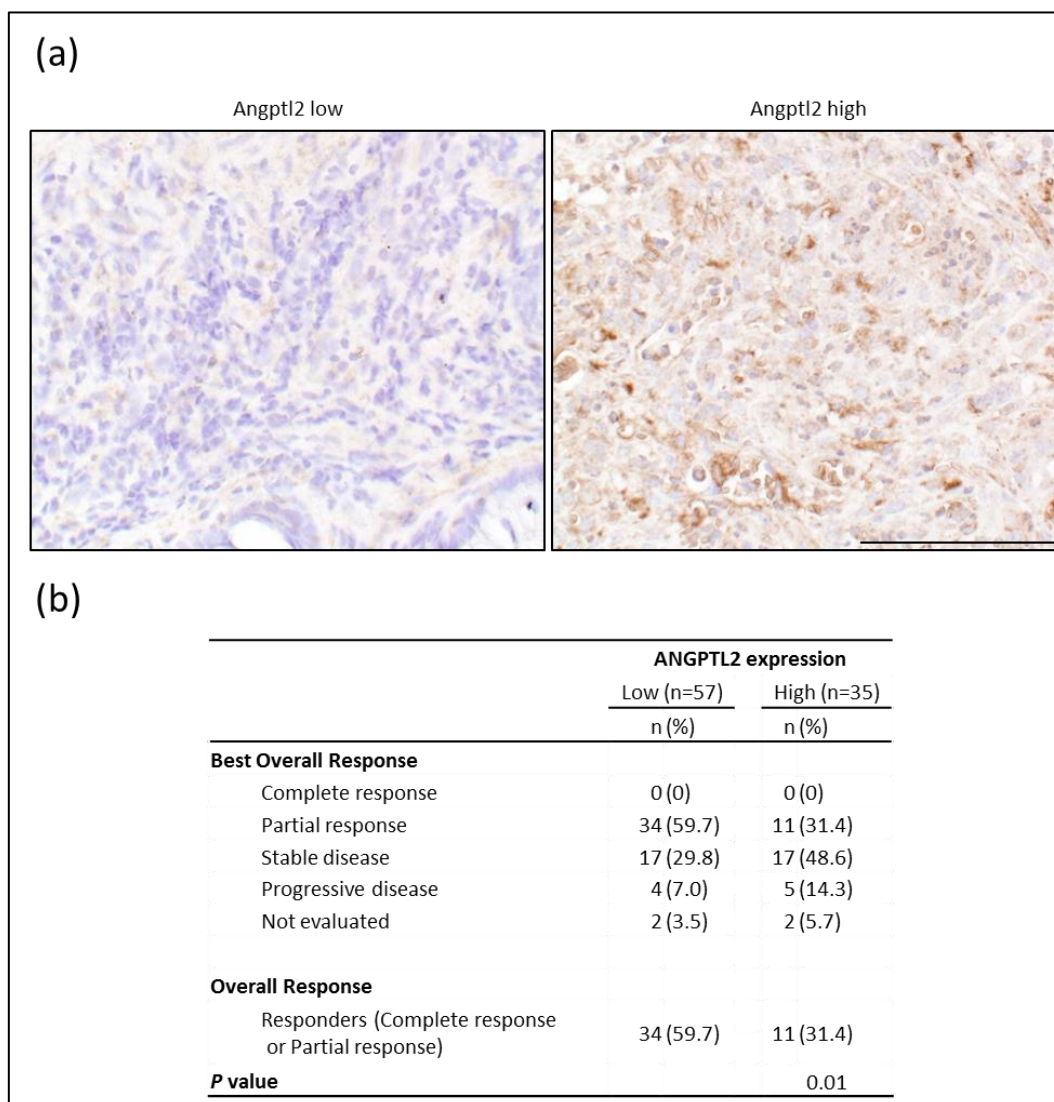


- (a) リアルタイム定量 PCR 法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1, SW480/ANGPTL2-2) における *NFATc1*, *c2*, *c3*, *c4* の mRNA 発現解析。コントロール株 (SW480/Ctrl) における *NFATc3* の発現量を 1 とした (n=3)。
- (b) コントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) における *NFATc3* の免疫染色。核は DAPI にて染色した。矢頭は核内に *NFATc3* が移行した細胞を指す。
- (c) リアルタイム定量 PCR 法によるコントロール株 (SW480/Ctrl), ANGPTL2 発現株 (SW480/ANGPTL2-1) (未処理, CsA) における内因性 *ANGPTL2* の mRNA 発現解析。コントロール株 (SW480/Ctrl) (未処理) における発現量を 1 とした (n=3)。
- 誤差範囲：標準誤差 ** $P < 0.01$.

7-8. 大腸がん患者のがん原発巣における ANGPTL2 の発現と抗がん剤に対する奏効率は逆相関を示す

がん細胞における ANGPTL2 の発現と抗がん剤の奏効率との関連を明らかにするために、切除不能な大腸がん患者 92 例の原発巣の ANGPTL2 免疫染色を行った。免疫染色後、高 ANGPTL2 発現群 (ANGPTL2 陽性細胞が全体の 50%以上)と低 ANGPTL2 発現群 (ANGPTL2 陽性細胞が全体の 50%未満)に分類した。化学療法に感受性を示す患者の割合 (完全寛解+部分寛解) は高 ANGPTL2 発現群では 31.4%、低 ANGPTL2 発現群で 59.7%であり、高 ANGPTL2 発現群では化学療法に感受性を示す患者の割合が有意に低いことを見出した (図 12)。以上の結果より、大腸がん細胞における ANGPTL2 の高発現は、抗がん剤抵抗性を高める可能性が示唆された。

図 12



- (a) 大腸がん患者の原発腫瘍における ANGPTL2 の免疫染色。(左) 低 ANGPTL2 発現群 (ANGPTL2 陽性細胞 50% 未満) (右) 高 ANGPTL2 発現群 (ANGPTL2 陽性細胞 50% 以上)
- (b) 大腸がん患者の原発腫瘍における ANGPTL2 発現と化学療法に対する感受性の関連。Complete response (完全寛解), Partial response (部分寛解), Stable disease (普遍), Progressive disease (進行・増悪), Not evaluated (未評価)

8. 考察

ANGPTL2 はこれまでに、Rac 活性化による細胞運動能亢進の獲得 (7), 単球・マクロファージの集積, 腫瘍血管新生・リンパ管新生などにより腫瘍細胞の浸潤・転移などのがんの悪性度獲得に関与していることが解明されてきた (4, 6)。本研究では、ANGPTL2 が大腸がん細胞において、抗アポトーシス作用を促進させ抗がん剤に対する抵抗性を獲得させること、また大腸がん患者の原発腫瘍における ANGPTL2 の高発現が抗がん剤の奏効率を低下させることを明らかにした。そのメカニズムとして、ANGPTL2 が Syk-PI3K-NF- κ B 経路を介して抗アポトーシス促進因子 BCL-2, BCL-XL の発現を誘導することを明らかにした。以上の結果は、抗がん剤に対する治療抵抗性に ANGPTL2 の発現が関与することを示しており、ANGPTL2 の機能・発現抑制が新たな抗がん治療法開発へとつながる可能性を示している。

抗がん剤の抗腫瘍効果はアポトーシスの促進から始まる (17, 27)。細胞周期を停止させ、またアポトーシスを促進するがん抑制遺伝子 p53 が種々の抗がん剤の分子標的であり、5-FU もまた p53 誘導によりアポトーシスを誘導することが報告されている (27, 28)。一方、抗がん剤の抗腫瘍効果において、p53 非依存的に未知のメカニズムによりアポトーシスが誘導されることも報告されている (29-31)。本研究で用いた SW480 細胞株は p53 に変異が存在するため、p53 非依存的にアポトーシスが生じると考えられ、ANGPTL2 による抗アポトーシス促進機能は p53 非依存的だと考えられる。また上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) が抗がん剤耐性に貢献していることも報告されている (32)。ANGPTL2 は Transforming growth factor (TGF)- β の誘導を介して EMT を促進することが報告されているが (7), SW480 細胞株は TGF 受容体 2 に変異が存在するため (33), TGF- β を介した EMT を生じないとされている。したがって、SW480 細胞株における ANGPTL2 の抗アポトーシス機能は TGF- β シグナル/EMT も関与していないと考えられる。

BCL-2/BAX 比および BCL-XL/BAX 比の上昇は p53 の状態に関わらず 5-FU の感受性に逆相関することが報告されている (28)。実際、ANGPTL2 発現 SW480 細胞株は BCL-2, BCL-XL の誘導が高く、BAX に対するこれらの発現は 5-FU によって誘導されるアポトーシスを抑制できると考えられる。PI3K シグナルは細胞生存には重要な経路であ

るが(34), PI3K阻害剤により BCL-2, BCL-XL の発現誘導が顕著に抑えられたことより, ANGPTL2 が PI3K 経路により BCL-2, BCL-XL を誘導していると考えられる。この結果は, ANGPTL2 が PI3K-Akt 経路を活性化するという過去に報告(35)された内容と一致する。

Syk は PI3K-Akt シグナルを活性化する(36)。本研究では, ANGPTL2 発現細胞株において Syk の発現が上昇しており, その結果細胞生存シグナルが活性化していると考えられる。

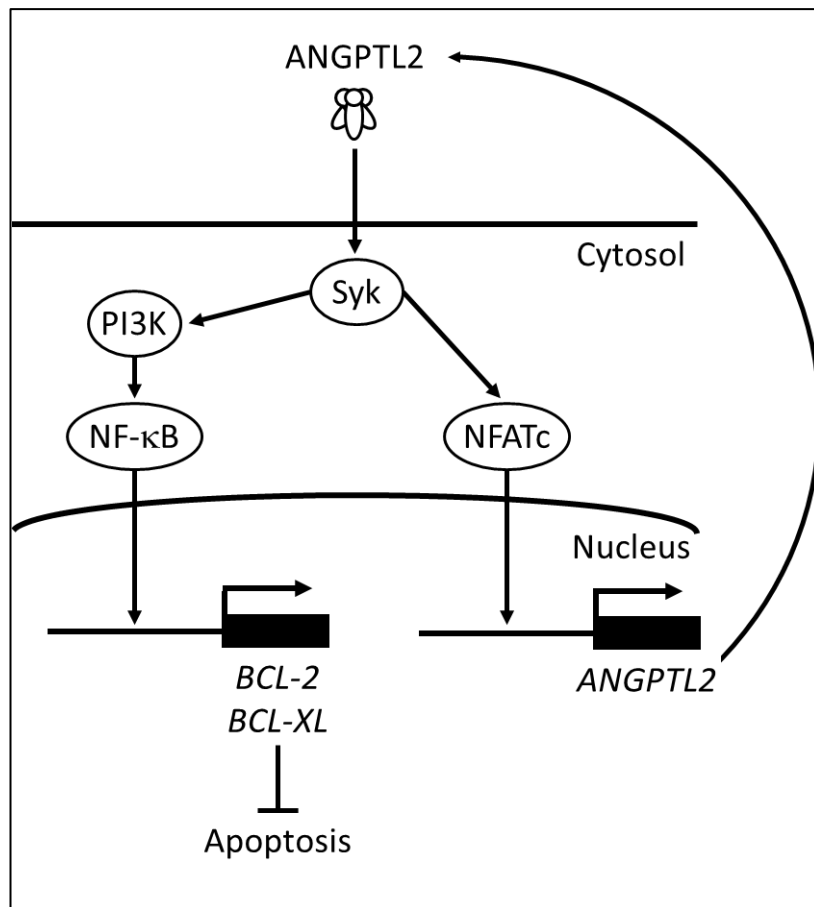
Syk はまた, NFATc を活性化する(10)。これまでに, 肺がん, 乳がん細胞において NFATc が ANGPTL2 の発現を促進することが解明されているが, Syk が ANGPTL2 の発現を促進している可能性も考えられる。本研究では, 大腸がんにおいて ANGPTL2 が Syk-NFATc 経路を介して ANGPTL2 自身の発現を誘導することを明らかにしたが, その他のがん種においても同様の経路が活性化されている可能性も考えられる。

近年, 低酸素や低栄養などのがん微小環境の変化により ANGPTL2 プロモーターが脱メチル化され ANGPTL2 の発現が誘導されることが明らかとなった(37)。これらの微小環境の変化は ANGPTL2 の抗アポトーシス機能による抗がん剤耐性の獲得を促進している可能性も考えられ, さらなる解析が必要と考えられる。

9. 結語

本研究では、大腸がん細胞株における ANGPTL2 の発現は、Syk-PI3K シグナルを介して抗アポトーシス促進性 BCL-2 ファミリーの遺伝子を誘導することで、抗がん剤に対する細胞生存を促進することを明らかにした。また、ANGPTL2 は Syk-NFATc 経路により ANGPTL2 自身の発現を正に制御していることを明らかにした (図 13)。さらに、大腸がん患者の原発腫瘍における ANGPTL2 の発現は化学療法に対する耐性の獲得を促す可能性を示した。以上の結果より ANGPTL2 は、大腸がん細胞の抗がん剤耐性に対する新たな治療標的となる可能性が示唆された。

☒ 13



10. 参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013; Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- [2] Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2343-51.
- [3] Longley D, Allen W, Johnston P. Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 2: 184-96.
- [4] Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*. 2009; 10: 178-88.
- [5] Okada T, Tsukano H, Endo M, et al. Synovocyte-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. 2010; 176: 2309-19.
- [6] Tazume H, Miyata K, Tian Z, et al. Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 1400-9.
- [7] Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, et al. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res*. 2011; 71: 7502-12.
- [8] Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, et al. Angiopoietin-like Protein 2 Accelerates Carcinogenesis by Activating Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *Mol Cancer Res*. 2014; 28: 28.
- [9] Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, et al. Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer Res*. 2012; 72: 1784-94.

- [10] Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz V. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 387-402.
- [11] Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem.* 2001; 130: 177-86.
- [12] Chen C, Martin V, Gorenstein N, Geahlen R, Post C. Two closely spaced tyrosines regulate NFAT signaling in B cells via Syk association with Vav. *Mol Cell Biol.* 2011; 31: 2984-96.
- [13] Trapnell C, Pachter L, Salzberg S. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1105-11.
- [14] Quinlan A, Hall I. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010; 26: 841-2.
- [15] Audic S, Claverie J. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 1997; 7: 986-95.
- [16] Parker W, Cheng Y. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther.* 1990; 48: 381-95.
- [17] Douillard J, Cunningham D, Roth A, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000; 355: 1041-7.
- [18] Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13: 455-65.
- [19] Violette S, Poulain L, Dussaulx E, et al. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer.* 2002; 98: 498-504.
- [20] Zhang L, Yu J, Park B, Kinzler K, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science.* 2000; 290: 989-92.
- [21] de Castro R, Zhang J, Jamur M, Oliver C, Siraganian R. Tyrosines in the carboxyl terminus regulate Syk kinase

- activity and function. *J Biol Chem.* 2010; 285: 26674-84.
- [22] Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 67-74.
- [23] Hoesel B, Schmid J. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013; 12: 1476-4598.
- [24] Zheng J, Umikawa M, Cui C, et al. Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature.* 2012; 485: 656-60.
- [25] Goodridge H, Simmons R, Underhill D. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 2007; 178: 3107-15.
- [26] Pan M, Xiong Y, Chen F. NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr Mol Med.* 2013; 13: 543-54.
- [27] Longley D, Harkin D, Johnston P. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 330-8.
- [28] Nita M, Nagawa H, Tominaga O, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer.* 1998; 78: 986-92.
- [29] Petak I, Tillman D, Houghton J. p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4432-41.
- [30] Backus H, Wouters D, Ferreira C, et al. Thymidylate synthase inhibition triggers apoptosis via caspases-8 and -9 in both wild-type and mutant p53 colon cancer cell lines. *Eur J Cancer.* 2003; 39: 1310-7.
- [31] Bunz F, Hwang P, Torrance C, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest.* 1999; 104: 263-9.
- [32] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010; 29: 4741-51.
- [33] Coffey RJ, Shipley G, Moses H. Production of transforming

- growth factors by human colon cancer lines. *Cancer Res.* 1986; 46: 1164-9.
- [34] Fulda S. Modulation of mitochondrial apoptosis by PI3K inhibitors. *Mitochondrion.* 2013; 13: 195-8.
- [35] Kubota Y, Oike Y, Satoh S, et al. Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 13502-7.
- [36] Chen L, Monti S, Juszczynski P, et al. SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT- dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas. *Cancer Cell.* 2013; 23: 826-38.
- [37] Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, et al. The Secreted Protein ANGPTL2 Promotes Metastasis of Osteosarcoma Cells Through Integrin $\alpha 5 \beta 1$, p38 MAPK, and Matrix Metalloproteinases. *Sci Signal.* 2014; 7: 2004612.
- [38] Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med.* 2008; 18: 6-14.
- [39] Oike Y, Akao M, Yasunaga K, et al. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med.* 2005 Apr; 11: 400-8.
- [40] Kubota Y, Oike Y, Satoh S, et al. Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 20; 102: 13502-7.
- [41] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 24; 454: 436-44.