

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出」研究領域

(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 組織修復に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明と制御

(英語) Clarifying and Controlling the Pathology of Lifestyle Diseases Caused by Alteration of Homeostatic Maintenance Based on Tissue Repair

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 教授 尾池 雄一

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Professor Yuichi Oike

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 組織修復及び免疫応答に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明

開発課題名：(英語) Clarifying the pathology of lifestyle diseases caused by alteration of homeostatic maintenance based on tissue repair and immunoresponse

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

組織修復及び免疫応答に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明（尾池グループ）

（1）心不全病態発症・進展における ANGPTL2 の機能解明

心不全は健康長寿社会実現の大きな阻害要因であり、効果的な新規治療戦略の開発が望まれている。尾池グループは、加齢や高血圧などの圧負荷によるストレスによって心筋細胞における ANGPTL2 の発現が増加し、心筋細胞におけるカルシウム濃度調節機能と心筋エネルギー代謝機能の低下を引き起こすことで心不全の発症・進展を促進することを明らかにした（Nat. Commun. 2016）。さらに、心筋に対する感染指向性を持つアデノ随伴ウイルスを用い心筋細胞における ANGPTL2 の発現誘導を抑制する遺伝子治療が、心不全病態に対する新規治療法となることを明らかにした。

（2）腸管組織恒常性維持における ANGPTL2 の機能解明

これまでの研究成果から、ANGPTL2 は組織修復に関わるシグナル経路を活性化するが、過剰な ANGPTL2 シグナルは慢性炎症を惹起し、様々な疾患の発症・進展を促進することを解明した。今回、尾池グループは、腸管組織の恒常性維持における ANGPTL2 の意義を検討したところ、腸管上皮幹細胞ニッチを形成する筋線維芽細胞由来 ANGPTL2 がオートクリン的に BMP の発現を抑制することで、腸管上皮幹細胞における BMP シグナル依存的な β -カテニン分解を抑制し、結果として、 β -カテニンシグナル依存的な腸管上皮幹細胞の維持・増殖促進による腸管組織の恒常性維持および組織の損傷修復を制御していることが明らかとなった（EMBO J. 2017）。

蛋白質科学的アプローチによる ANGPTL 新規受容体の同定および立体構造解析（前仲グループ）

LILRB2 との相互作用に関わる ANGPTL2 の C 末端ドメイン(ANGPTL2FLD)に対して、北海道大学創薬科学研究教育センターの所有する低分子化合物ライブラリーの中から示差走査蛍光測定法により ANGPTL2FLD と有意な結合を示す化合物を見つけた。次に、多量体形成に関わる N 末端ドメインの代わりに量体制御可能な別のコイルドコイルドメインへと入れ替えたキメラ蛋白質の大腸菌発現系を構築した。

地域住民における血中 ANGPTL2 レベルおよびその経時的変化が生活習慣病発症・進展に及ぼす影響の解明：久山町研究（二宮グループ）

（1）追跡調査とデータ整備

2002 年および 2007 年の久山町循環器健診を受診した 40 歳以上の住民からなるコホートを対象に、本年度も健診、アンケート調査、医療機関に対する調査を行い、新規の生活習慣病の発症および死亡について追跡調査を行った。さらに、その調査結果を用いて、統計解析用のデータを更新した。

（2）血清 ANGPTL2 レベルが心血管病発症および死亡に及ぼす影響

本年度は昨年度に引き続き、2002 年の久山町循環器健診を受診した 40 歳以上の住民 3005 人を 2012 年までの 10 年間追跡した成績を用いて、血清 ANGPTL2 濃度と心血管病（虚血性心疾患，脳卒中）発症および総死亡の関連を検討した。その結果、ANGPTL2 濃度が高くなるとともに心血管病の発症リスクは有意に上昇し、この関連はメタボリックシンドロームや高感度 C 反応性蛋白の影響を多変量調整すると減弱した。虚血性心疾患と脳卒中に分けて検討しても、同様の関連を認めた。本年度はこの成果を英文査読誌にて発表した（Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016）。また、ANGPTL2 高値は多変量調整後の総死亡リスクと有意に関連した。以上の成績から、血中 ANGPTL2 は心血管病の発症や死亡を予測するバ

バイオマーカーであることが示唆された。

(3) 血清 ANGPTL2 レベルの経時的変化が心血管病発症に及ぼす影響

昨年度に引き続き、2002年と2007年の2回の久山町循環器健診で血中ANGPTL2濃度を測定した2450名を2012年までの5年間追跡した成績を用いて、血清ANGPTL2レベルの経時的変化が心血管病発症に及ぼす影響について検討した。その結果、2002年と2007年の2回ともANGPTL2の血中濃度が低値であった群を基準とすると、2回とも血中濃度が高値であった群では有意に心血管病発症のリスクが高まっていた。一方、2回のうちいずれか1回のみでANGPTL2の血中濃度が高値であった群では心血管病発症のリスクに明らかな影響はなかった。心血管病を虚血性心疾患に脳卒中に分けて検討しても同様の関連が示唆されたが、統計学的には有意でなかった。以上の結果から、ANGPTL2の血中濃度が持続的に高値を示すことが心血管病発症の危険因子となることが示唆された。

Clarifying the pathology of lifestyle diseases caused by alteration of homeostatic maintenance based on tissue repair and immunoresponse

(1) Roles of ANGPTL2 in development and progression of heart failure

Heart failure prohibits living people from living a healthy life. The number of patients with heart failure is increasing globally as we become an aging society. Therefore, clarification of the mechanisms underlying heart failure development and progression is crucial to develop an effective strategy for treatment. We showed that angiotensin-like protein 2 (ANGPTL2) expression is increased in pathologically stressed heart and that elevated cardiac ANGPTL2 impairs Ca^{2+} handling and mitochondrial energy metabolism in cardiomyocytes, thereby accelerating cardiac dysfunction (Nat. Commun. 2016). In addition we demonstrated that suppression of ANGPTL2 induction in cardiomyocytes using adeno-associated virus vector harboring *Angptl2* shRNA could be a novel therapeutic approach for cardiac dysfunction.

(2) Roles of ANGPTL2 in homeostatic maintenance of intestinal tissues

We previously reported that ANGPTL2 signaling promotes tissue repair, while excess ANGPTL2 signaling plays roles in development and progression of various diseases by causing chronic inflammation. Here, we showed that ANGPTL2 contributes to homeostatic maintenance of intestinal tissues. We found that ANGPTL2 is expressed in intestinal subepithelial myofibroblasts (ISEMFs) that contribute to intestinal stem cell niche formation. Moreover, we demonstrated that ISEMF-derived ANGPTL2 suppress the bone morphogenetic protein (BMP) expression in ISEMFs in an autocrine manner and subsequent the BMP signaling-dependent β -catenin degradation in intestinal stem cells, thereby promoting β -catenin signaling-dependent maintenance and proliferation of intestinal stem cells (EMBO J. 2017). These findings indicate the importance of ANGPTL2 in the intestinal stem cell niche in regulating stemness and epithelial wound healing in the intestine.

Identification and structural analysis of a novel ANGPTL receptor

We performed the differential scanning fluorimetry (DSF) technique to screen chemical library of Center for Research and Education on Drug Discovery of Hokkaido University. We have successfully identified several compound candidates to bind ANGPTL2. Next, we have constructed several

constructs of ANGPTL2 to regulate multimeric forms. These have been expressed in *E. coli* as inclusion bodies and refolded into active multimeric forms.

The association of serum ANGPTL2 levels and their temporal changes with the development of lifestyle diseases: the Hisayama Study

(1) Follow-up surveys and datasets preparation

For the participants (aged 40 years or over) of health examinations in the Hisayama Town in 2002 and in 2007, follow-up surveys for new events of lifestyle diseases and mortality were conducted by means of the annual health examination, questionnaire by mail, and hospital visits. The datasets for statistical analysis were updated using the data from the follow-up surveys.

(2) Associations of serum ANGPTL2 levels with risks of cardiovascular disease (CVD) and mortality

A total of 3005 individuals who aged 40 years or over in 2002 were followed up for 10 years until 2012. The associations of serum ANGPTL2 levels with the development of CVD (coronary heart disease [CHD] and stroke) and all-cause mortality were examined in this cohort. An increased concentration of serum ANGPTL2 was significantly associated with a higher risk of CVD. These associations were diminished after adjustment for metabolic syndrome components and high-sensitivity C-reactive protein levels. Similar findings were observed when CHD and stroke events were analyzed separately. We reported these results in a peer-reviewed journal (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016). In addition, higher levels of ANGPTL2 were significantly associated with an increased risk of all-cause mortality after adjustment for multiple risk factors. These results suggest that serum ANGPTL2 is a biomarker predicting the risks of CVD and death.

(3) Association of the changes in serum ANGPTL2 levels with the risk of CVD

A total of 2450 individuals who had serum ANGPTL2 data in two examinations in 2002 and in 2007 were further followed up for 5 years until 2012. The association of the changes in serum ANGPTL2 levels with the development of CVD was examined in this cohort. The subjects with low ANGPTL2 levels both in the 2002 and the 2007 examinations were used as a reference group. As a result, subjects with high ANGPTL2 levels in both examinations had a significantly higher risk of CVD than those with low ANGPTL2 levels in both examinations. The risk of CVD was not elevated among the subjects with high ANGPTL2 levels only in the 2002 examination or only in the 2007 examination. With regard to CVD subtypes, there were similar findings in the association of the changes in serum ANGPTL2 levels with the risk of CHD and stroke, although the association did not reach to the statistically significant level. These results suggest that sustained elevation of serum ANGPTL2 is associated with the increased risk of CVD.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 9件）

1. Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K, Oike Y. ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. *EMBO Journal*. 2017, 36, 409-24.
2. Kang SG, Yi HS, Choi MJ, Ryu MJ, Jung S, Chung HK, Chang JY, Kim YK, Lee SE, Kim HW, Choi H, Kim DS, Lee JH, Kim KS, Kim HJ, Lee CH, Oike Y, Shong M. ANGPTL6 expression is coupled with mitochondrial OXPHOS function to regulate adipose FGF21. *Journal of Endocrinology*. 2017, 233, 105-18.
3. Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, Tohyama S, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I, Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M, Oike Y. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *Nature Communications*. 2016, 7, 13016.
4. Hirasawa M, Takubo K, Osada H, Miyake S, Toda E, Endo M, Umezawa K, Tsubota K, Oike Y, Ozawa Y. Angiopoietin-like protein 2 is a multiple regulator of inflammatory neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *Journal of Biological Chemistry*. 2016. 291. 7373-85.
5. Hata J, Mukai N, Nagata M, Ohara T, Yoshida D, Kishimoto H, Shibata M, Hirakawa Y, Endo M, Ago T, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y, Ninomiya T. Serum angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) is a novel risk factor for cardiovascular disease in the community: the Hisayama Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016. 36. 1686-91.
6. Yugami M, Odagiri H, Endo M, Tsutsuki H, Fujii S, Kadomatsu T, Masuda T, Miyata K, Terada K, Tanoue H, Ito H, Morinaga J, Horiguchi H, Sugizaki T, Akaike T, Gotoh T, Takai T, Sawa T, Mizuta H, Oike Y. Mice deficient in Angptl2 show increased susceptibility to bacterial infection due to attenuated macrophage activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, 291, 18843-52.
7. Motokawa I, Endo M, Terada K, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Morinaga J, Sugizaki T, Ito T, Araki K, Morioka M, Manabe I, Samukawa T, Watanabe M, Inoue H, Oike Y. Interstitial pneumonia induced by bleomycin treatment is exacerbated in Angptl2-deficient mice. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2016. 311. L704-13.
8. Tanigawa H, Miyata K, Tian Z, Kadomatsu T, Aoi J, Fukushima S, Ogata A, Takeda N, Zhao J, Zhu S, Terada K, Endo M, Morinaga J, Sugizaki T, Sato M, Morioka MS, Manabe I, Mashimo Y, Hata A, Taketomi Y, Yamamoto K, Murakami M, Araki K, Jinnin M, Ihn H, Oike Y. Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis. *Scientific Reports*. 2016. 6. 34690.

9. Amadatsu T, Morinaga J, Kawano T, Terada K, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Kasamo D, Kuratsu JI, Oike Y. Macrophage-Derived Angiopoietin-Like Protein 2 Exacerbates Brain Damage by Accelerating Acute Inflammation after Ischemia-Reperfusion. PLoS One. 2016. 11. e0166285.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 心血管疾患の分子病態, 口頭, 尾池雄一, 第 27 回代謝循環フォーラム, 2017/3/21, 国内.
2. Endurance Exercise-induced miR221/222 Promotes Cardioprotection via ANGPTL2 Suppression, ポスター, 宮田敬士, 第 81 回 日本循環器学会学術集会, 2017/3/17, 国内.
3. ANGPTL2 Activity in Cardiac Pathologies Accelerates Heart Failure by Perturbing Cardiac Function and Energy Metabolism, 口頭, 田哲, 第 81 回 日本循環器学会学術集会, 2017/3/17, 国内.
4. アンジオポエチン様因子 2 と心血管疾患, 口頭, 尾池雄一, 脳心血管抗加齢研究会 2016, 2016/12/18, 国内.
5. 慢性炎症と臓器線維化におけるアンジオポエチン様因子 2 の役割, 口頭, 尾池雄一, CVMW2016 心血管代謝週間, 2016/12/16, 国内.
6. 心血管疾患の分子病態解明～健康寿命延伸への挑戦～, 口頭, 尾池雄一, 第 37 回 KCRC (関西 Cardio - Renal Conference) , 2016/12/9, 国内.
7. Roles of Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) in cardiovascular disease, 口頭, 尾池雄一, 第 24 回日本血管生物医学会学術集会, 2016/12/9, 国内.
8. がん微小環境変化による組織恒常性維持機構の活性化とがん病態進展の分子機構, 口頭, 門松毅, 伊藤 仁, 尾池雄一, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
9. 健康寿命延伸にむけた基盤研究と応用展開, 口頭, 尾池雄一, 10th : Metabolic Research Cutting Edge, 2016/11/12, 国内.
10. 心不全の分子メカニズム解明と治療開発, 口頭, 田哲, Future of Atherosclerosis, Hypertension and Diabetes Mellitus (FAT DM) –The Thirteenth meeting–, 2016/10/20, 国内.
11. The role of Angiopoietin like protein 2 in cancer development 癌進展における ANGPTL2 タンパクの役割, 口頭, 遠藤元誉, 尾池雄一, 第 75 回日本癌学会学術集会総会, 2016/10/7, 国内.
12. 心血管病の分子病態解明と治療戦略～健康長寿延伸に挑む～, 口頭, 尾池雄一, 第 4 回カルデアック リサーチミーティング, 2016/9/15, 国内.
13. 生活習慣病の分子基盤解明と治療応用～健康長寿延伸に挑む～, 口頭, 尾池雄一, Scientific Exchange Meeting in 岡山, 2016/7/6, 国内.
14. 心血管病の分子病態解明と治療戦略～健康寿命延伸に挑む～, 口頭, 尾池雄一, 第 41 回九州 MMC 研究会, 2016/7/2, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 健やかに生きる～健康長寿達成の秘訣～, 尾池雄一, フジテレビ アンチエイジングフェア in 台場, 2016/9/24, 国内.

(4) 特許出願

特願 2016-123165 号

PCT/JP2016/082673

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出」研究領域

(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 組織修復に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明と制御

(英語) Clarifying and Controlling the Pathology of Lifestyle Diseases Caused by Alteration of Homeostatic Maintenance Based on Tissue Repair

研究開発担当者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 蛋白質科学的アプローチによる ANGPTL 新規受容体の同定および立体構造解析

開発課題名： (英語) Identification and structural analysis of a novel ANGPTL receptor

研究開発分担者 (日本語) 北海道大学大学院薬学研究院 教授 前仲勝実

所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,
Professor, Katsumi Maenaka, Ph. D.

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：熊本大学大学院生命科学研究部・教授・尾池雄一 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. アンジオポエチン様因子 *Angptl2* の結晶構造解析および免疫受容体 *LILRB2* との相互作用解析，ポスター，荒牧峻彦，黒木喜美子，門松毅，寺田和豊，尾池雄一，尾瀬農之，前仲勝実，第 16 回日本蛋白質科学会年会，2016/6/7-9，国内
2. アンジオポエチン様因子 *Angptl2* の構造解析，口頭，荒牧峻彦，黒木喜美子，門松毅，寺田和豊，尾池雄一，尾瀬農之，前仲勝実，第 14 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム，B4-2，2016/8/27-28，国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出」
研究領域

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 組織修復に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明と制御

(英語) Clarifying and Controlling the Pathology of Lifestyle Diseases Caused by Alteration of Homeostatic Maintenance Based on Tissue Repair

研究開発担当者 (日本語)

所属 役職 氏名：(英語)

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 地域住民における血中 ANGPTL2 レベルおよびその経時的変化が生活習慣病発症・進展に及ぼす影響の解明：久山町研究

開発課題名：(英語) The association of serum ANGPTL2 levels and their temporal changes with the development of lifestyle diseases: the Hisayama Study

研究開発分担者 (日本語) 九州大学大学院医学研究院衛生・公衆衛生学分野 教授 二宮 利治

所属 役職 氏名：(英語) Toshiharu Ninomiya, Professor, Department of Epidemiology and Public Health, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：熊本大学大学院生命科学研究部・教授・尾池雄一 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 5件）

1. Takae K, Nagata M, Hata J, Mukai N, Hirakawa Y, Yoshida D, Kishimoto H, Tsuruya K, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Serum uric acid as a risk factor for chronic kidney disease in a Japanese community: the Hisayama Study. *Circ J* 2016; 80: 1857-1862.
2. Shibata M, Ninomiya T, Anno K, Kawata H, Iwaki R, Sawamoto R, Kubo C, Kiyohara Y, Sudo N, Hosoi M. Perceived inadequate care and excessive overprotection during childhood are associated with greater risk of sleep disturbance in adulthood: the Hisayama Study. *BMC Psychiatry* 2016; 16: 215, 2016.
3. Hata J, Mukai N, Nagata M, Ohara T, Yoshida D, Kishimoto H, Shibata M, Hirakawa Y, Endo M, Ago T, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y, Ninomiya T. Serum angiopoietin-like protein 2 is a novel risk factor for cardiovascular disease in the community: the Hisayama Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 1686-1691.
4. Hirabayashi N, Hata J, Ohara T, Mukai N, Nagata M, Shibata M, Gotoh S, Furuta Y, Yamashita F, Yoshihara K, Kitazono T, Sudo N, Kiyohara Y, Ninomiya T. Association between diabetes and hippocampal atrophy in elderly Japanese: the Hisayama Study. *Diabetes Care* 2016; 39: 1543-1549.
5. Ikeda F, Shikata K, Hata J, Fukuhara M, Hirakawa Y, Ohara T, Mukai N, Nagata M, Yoshida D, Yonemoto K, Esaki M, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T. Combination of Helicobacter pylori antibody and serum pepsinogen as a good predictive tool of gastric cancer incidence: 20-year prospective data from the Hisayama Study. *J Epidemiol* 2016; 26: 629-636.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 心血管病の新しい危険因子としてのバイオマーカー：久山町研究. 秦 淳, 二宮利治. 第64回日本心臓病学会学術集会, 2016/9/24, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし