

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06964

研究課題名(和文)腸管上皮完全性維持及び病態におけるプロテアーゼ活性制御の意義に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of membrane-anchored serine protease activities and its significance in epithelial pathophysiology

研究代表者

川口 真紀子 (Kawaguchi, Makiko)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90405598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HAI-2 コンディショナルKOマウスを作製したところ、先天性ナトリウム下痢症と類似した表現型を呈した。HAI-2欠損オルガノイドではEpcamの分解とClaudin-7の不安定化がみられ、この現象は、HAI-2の標的プロテアーゼであるprostasinの同時欠損あるいはmatriptaseの特異的低分子阻害剤添加で回避できた。一方で、マウスを用いた生体における検討では、prostasinを同時に欠損してもHAI-2 KOマウスの致死性を回避することはできず、生体内ではmatriptaseがprostasinを介さずに活性化される可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、HAI-2コンディショナルKOマウスを作製し、HAI-2をコードするSPINT2遺伝子の変異が原因であるヒトの先天性ナトリウム下痢症と類似の表現型を呈することを明らかにした。また、HAI-2 KOマウスやマウスから樹立したHAI-2欠損オルガノイドは、この疾患の病態の解明や新たな治療法開発やスクリーニングのツールとしても有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated conditional Spint2 knockout mouse model based on the Cre recombinase and LoxP system. We found that spint2 knockout mouse showed severe epithelial damage in the whole intestinal tracts. The intestinal epithelium showed enhanced exfoliation, villous atrophy, enterocyte tufts and elongated crypts. Organoid crypt culture indicated that Spint2 ablation induced Epcam cleavage with decreased claudin-7 levels and resulted in organoid rupture. These organoid changes could be rescued by addition of serine protease inhibitors and matriptase selective inhibitor as well as by co-deletion of prostasin. These results indicate that HAI-2 is an essential cellular inhibitor for maintaining intestinal epithelium architecture.

研究分野：実験病理学

キーワード：HAI-2 matriptase prostasin EpCAM

## 1. 研究開始当初の背景

Hepatocyte growth factor activator inhibitor (HAI) は細胞膜結合クニッツ型セリンプロテアーゼインヒビターで、現在のところ HAI-1 と HAI-2 の 2 種類が同定されている。HAI-1 は全身の様々な上皮組織に、HAI-2 は非上皮組織を含む全身組織に発現している。細胞内局在については、HAI-1 については上皮細胞の細胞膜上に局在することが分かっているが、HAI-2 については細胞質内と考えられているものの、詳細はまだ明らかではない。HAI の主な標的酵素として、分泌型セリンプロテアーゼとして HGF activator や tissue kallikrein が、細胞膜結合型セリンプロテアーゼとしては matriptase、hepsin、TMPRSS13、TMPRSS4 および prostasin などが報告されている。細胞膜結合型セリンプロテアーゼはこの他にも約 20 種類同定されており、様々な上皮組織に特異的に発現している。これらの多くは、生体内機能と活性調節機構が不明のままであるが、matriptase、prostasin、については、皮膚、腸管上皮の恒常性維持に関連することが分かってきた。申請者はこれまで、遺伝子改変マウスを用いた解析から、HAI-1 が胎盤形成に必須であること、皮膚においては、表皮の正常角化、バリア機能維持、毛小皮形成に必須であること、さらに、腸管特異的 HAI-1 KO マウスでは腸上皮バリア機能の低下や炎症に対する感受性亢進がみられ、腸管においても HAI-1 が正常上皮機能維持に必須であることを明らかにした。また、その後の研究から、これらの表現型はいずれも、HAI-1 欠失によって生じる標的酵素である matriptase の活性異常によるものであることが明らかとなった。さらに、HAI-1KO マウスでは腫瘍形成が亢進しており、HAI-1 が腸管において発癌抑制機能を有することを見出した。

一方、HAI-2 に関しては HAI-2KO マウスは胎生致死であり、その生体内機能はほとんど分かっていないが、HAI-1 KO マウスにおいて HAI-2 発現に異常はみられないことから、*in vitro* における標的酵素は共通しているものの、生体内では HAI-2 は HAI-1 の機能を代償できず、組織によって制御する酵素が異なる可能性が示唆される。あるいはその細胞内局在の相違 (HAI-1 は細胞膜上、HAI-2 は細胞質に局在) や、HAI-2 は非上皮組織にも発現していることから、生体内では HAI-2 は HAI-1 とは全く異なった機能 (例えば標的酵素の小胞体から細胞膜上への輸送制御など) を有している可能性も示唆される。近年、HAI-2 をコードする SPINT2 の遺伝子変異がヒトの先天性ナトリウム下痢症 (congenital sodium diarrhea; CSD)、先天性腸上皮異型成症 (congenital tufting enteropathy; CTE) の原因となることが報告された。この事実は、HAI-2 が腸管上皮に重要な役割を有していることを示しているが、HAI-2 機能不全により疾患が引き起こされるメカニズムなどの詳細は未だ不明である。CTE の原因遺伝子としては SPINT2 以外にも、上皮細胞接着因子である EpCAM の遺伝子変異も報告されている。近年、培養腸上皮細胞を用いた研究で、HAI-1 や HAI-2 の標的酵素である matriptase が EpCAM を分解し、この分解は HAI-2 によって抑制されるとの報告があり、ヒトの CTE においては HAI-2/SPINT2 遺伝子変異により matriptase 活性制御が破綻し、EpCAM が分解することにより疾患が引き起こされる可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は次の 2 項目である。(1) HAI-2 の生体内機能について、酵素活性調節機能を持つならばその腸管における標的酵素を同定する。また酵素活性調節以外の機能を有するかを検証する。(2) HAI-2/SPINT2 変異による HAI-2 機能不全と先天性ナトリウム下痢症や CTE の病態との関連について新たな知見を得る。

HAI-2 KO マウスは胎生致死であり、HAI-2 の成体における機能解析に用いることができない。本研究では、Cre/loxP システムを用いて HAI-2 のコンディショナル KO マウスを作製し、これまで解析できなかった成体における HAI-2 の生体内機能、特に HAI-2 が重要な役割を有していると考えられる腸管における機能を解明することを目的としている。現在のところ先天性ナトリウム下痢症や CTE はまだ有効な治療法がないが、HAI-2 変異により疾患が引き起こされることから、HAI-2 KO マウスはこれらの疾患を模倣することが示唆されるため、HAI-2 KO マウスを用いてプロテアーゼ阻害剤など、新たな治療法を検討できるようになることも期待できる。さらに、HAI-2 KO マウスの表現型解析を通して、これまでの *in vitro* の実験から予想される酵素活性制御以外の新たな機能を見出すことができる可能性もある。

## 3. 研究の方法

(1) すでに維持している HAI-2 floxed マウスと腸管特異的に Cre を発現する Villin-Cre マウスを交配し、腸管特異的 HAI-2KO マウスを作製し、表現型の解析を行った。さらに、タモキシフェン投与によって Cre 発現を誘導し、時期特異的に HAI-2 を欠失させることができる ROSA<sup>Cre-ERT2</sup> マウスを用い、成体マウスにおいて全身で HAI-2 を欠失させ、HAI-2KO マウスが SPINT2 遺伝子変異によって引き起こされるヒトの CSD や CTE の病態を模倣するかに着目し、解析を行った。

(2) タモキシフェン誘導性の HAI-2 KO マウスの小腸、大腸組織を用いて、オルガノイド培養の技術を確立し、in vitro において腸上皮における HAI-2 欠失による影響を解析した。

(3) 作製したオルガノイド培養系を用いて HAI-2 KO マウスの表現型が標的酵素の活性異常によるものなのか検討を行った。HAI-2 の標的酵素である matriptase の基質である EpCAM と、EpCAM と複合体を形成する Claudin7 の発現、分解の有無を免疫染色及びウェスタンブロットにより確認した。

(4) HAI-2 KO マウスに汎用セリンプロテアーゼインヒビターを投与、あるいは標的酵素である prostaticin や matriptase を同時に欠損するダブル KO マウスを作製し、表現型が回避されるか検討した。さらに、オルガノイドの培養上清に HAI-2 の標的酵素の特異的阻害剤あるいは汎用セリンプロテアーゼインヒビターを添加し、同様に検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) すでに当研究室で維持している HAI-2 floxed マウスと腸管上皮特異的に Cre を発現する Villin-Cre マウスを交配させ、腸管上皮特異的 HAI-2 KO マウスを作製したところ、HAI-2 KO マウスは胎生期あるいは生後早期に死亡した。このことから HAI-2 が腸管上皮の形態形成において重要な役割を有することが示唆された。そこで、成体における HAI-2 の機能解析のため、すでに維持している全身でタモキシフェン誘導性に Cre を発現する ROSA-Cre-ERT2 マウスを HAI-2 floxed マウスと交配し、解析を行ったところ、タモキシフェン誘導後著しい体重減少がみられ、3日後には60%、6日目までにはすべてのマウスが死亡した。肉眼的解析から HAI-2 欠損マウスでは腸管に強い表現型が観察され、腸の長さが有意に短くなっており(図1)、組織学的解析の結果、HAI-2 欠損マウスでは CTE 様の形態異常、腸上皮の強い傷害がみられ、杯細胞、パネート細胞がいずれも減少し、アポトーシスの亢進、腸上皮バリア機能の低下もみられた。このことから、HAI-2KO マウスが SPINT2 遺伝子変異によって引き起こされるヒトの CSD や CTE の病態モデルマウスとして用いられることが示唆された。

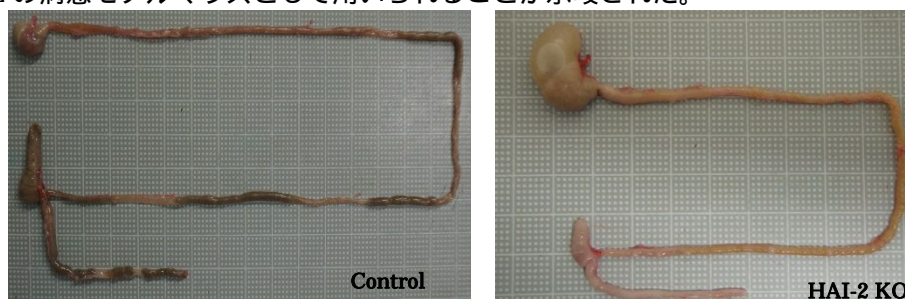


図1 HAI-2 KO マウスの腸管の異常

(2) 小腸からのオルガノイド培養系を確立し、解析したところ、HAI-2 欠損オルガノイドでは Epcam の分解がみられ、タモキシフェン添加 28 時間後にはオルガノイドの崩壊がみられた。この現象は、セリンプロテアーゼインヒビターであるアプロチニン添加や HAI-2 の標的プロテアーゼである prostaticin を同時に欠損させることで回避できた。また、HAI-2 の標的プロテアーゼであり、腸管上皮において prostaticin によって活性化されることが報告されている matriptase の特異的低分子阻害剤によっても、Epcam の分解と Claudin-7 の不安定化及びオルガノイドの崩壊は阻害剤の濃度依存的に抑制された(図2)。これらの結果から、HAI-2 は prostaticin の活性を制御することで prostaticin による matriptase 活性化を抑制し、腸管上皮の正常性維持に寄与していることが明らかになった。また、HAI-2 欠損オルガノイドがプロテアーゼの特異的阻害剤など治療薬の候補となる薬剤の効果の検討や、CTE の病態解明に活用できることが明らかになった。しかし in vivo では汎用セリンプロテアーゼインヒビター投与や、prostaticin の欠損によっても HAI-2 KO マウスの表現型は回避されなかった。

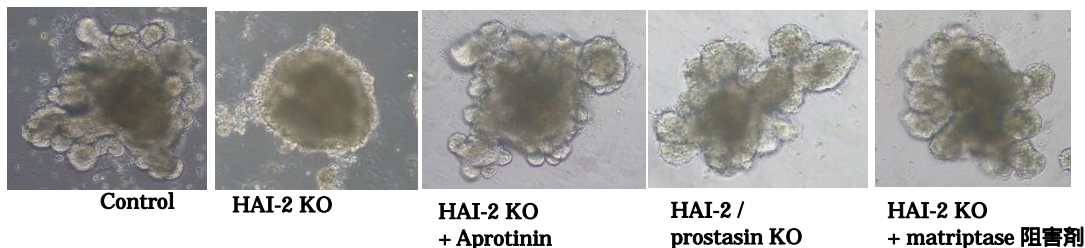


図2 HAI-2 KO オルガノイドの異常と阻害剤の効果

そこで新たに matriptase floxed マウスを導入し、HAI-2 KO マウスと交配させ、HAI-2/matriptase のダブル欠損マウスを作製し、matriptase 欠損により、HAI-2 KO マウスの致死性が回避できるか検討を行った。HAI-2/matriptase のダブル欠損マウスは体重減少がやや改善し、生存期間が約 2 日延長したが、生後約 5 日で早期に致死となった (図 3)。

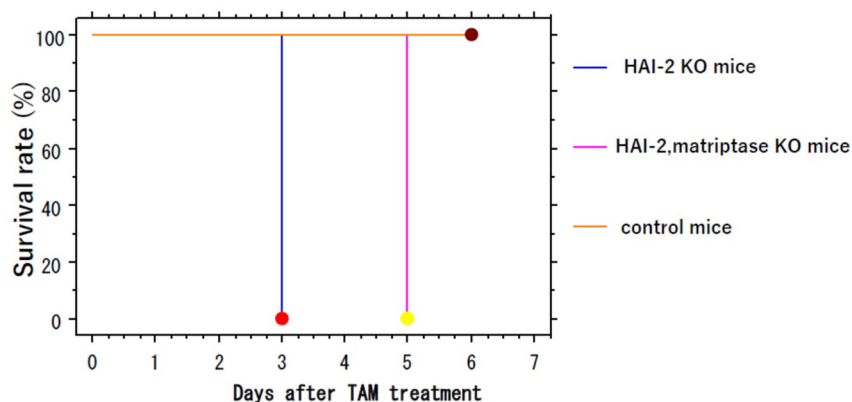


図 3 HAI-2 KO マウスと HAI-2,matriptase ダブル KO マウスの生存率の変化

HAI-2/matriptase のダブル欠損オルガノイドの培養を確立し検討したところ、HAI-2/matriptase のダブル欠損オルガノイドでは、オルガノイドの崩壊はみられず、Epcam の分解及び Claudin-7 の不安定化も緩和された。これらの結果は、HAI-2 KO マウスの致死性の原因は matriptase の活性異常だけでなく、他の機序が関与していることを示唆している。今後さらに matriptase 以外の分子に着目し、HAI-2 KO の致死性のメカニズムを解析することで、HAI-2 の新たな機能を発見したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawaguchi M, Yamamoto K, Kataoka H, Izumi A, Yamashita F, Kiwaki T, Nishida T, Camerer E, Fukushima T	4. 巻 111
2. 論文標題 Protease-activated receptor-2 accelerates intestinal tumor formation through activation of nuclear factor- B signaling and tumor angiogenesis in ApcMIN/+ mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1193-1202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14335.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawaguchi M, Yamamoto K, Takeda N, Fukushima T, Yamashita F, Sato K, Kitamura K, Hippo Y, Janetka JW, Kataoka H	4. 巻 2
2. 論文標題 Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 stabilizes Epcam and maintains epithelial organization in the mouse intestine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-018-0255-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 山本晃士、川口真紀子、片岡寛章	4. 巻 45
2. 論文標題 腸上皮の正常性維持に不可欠な細胞膜結合セリンプロテアーゼ制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 メディカルサイエンスダイジェスト	6. 最初と最後の頁 622-625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukushima Tsuyoshi, Kawaguchi Makiko, Yamamoto Koji, Yamashita Fumiki, Izumi Aya, Kaieda Takashi, Takezaki Yuka, Itoh Hiroshi, Takeshima Hideo, Kataoka Hiroaki	4. 巻 109
2. 論文標題 Aberrant methylation and silencing of the SPINT2 gene in high-grade gliomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2970 ~ 2979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口真紀子、山本晃土、山下文希、福島剛、片岡寛章
2. 発表標題 HAI-2 (SPINT2) はEpCAM/Claudin-7複合体を安定化し、腸上皮完全性を維持する
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawaguchi M, Yamamoto K, FukushimaT, Kataoka H
2. 発表標題 HAI-1 deficient ApcMin+mice increased tumor formation through promoting tumor angiogenesis by PAR-2 signaling
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi M, Yamamoto K, Kiwaki T, FukushimaT, Camerer E, Kataoka H
2. 発表標題 Protease-activated receptor 2 promotes intestinal tumorigenesis through activation of NF- $\kappa$ B signaling and tumor angiogenesis in ApcMin/+mice
3. 学会等名 ASBMB Special Symposia Series; Serine Proteases in Pericellular Proteolysis and Signaling (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口真紀子、山本晃土、山下文希、福島剛、片岡寛章
2. 発表標題 HAI-2欠損マウスは腸管上皮の破綻を来し早期に致死となる
3. 学会等名 第24回 日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 真紀子、山本 晃士、福島 剛、片岡 寛章
2. 発表標題 HAI-1欠損によるDSS誘発大腸炎の感受性亢進と腸粘膜上皮の修復再生過程におけるPAR-2活性化の意義に関する研究
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaguchi M, Yamamoto K, Fukushima T, Kataoka H
2. 発表標題 Concomitant deletion of PAR-2 abrogated the increased tumor formation in HAI-1 deficient ApcMin+ mice
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口真紀子、山本晃士、田中弘之、福島剛、片岡 寛章
2. 発表標題 HAIによる標的プロテアーゼ活性調節を介した上皮完全性の制御
3. 学会等名 第23回 日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------