

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K17029
研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における細胞膜結合セリンプロテアーゼインヒビターの意義に関する研究

研究課題名(英文) Functional analysis of membraneanchored serine protease inhibitors in oral squamous cell carcinoma.

研究代表者
山本 晃士 (Yamamoto, Koji)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：50776953
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターであるHAIは、上皮細胞周囲のプロテアーゼ活性制御に重要である。本研究では、上皮における意義および癌の進展に与える影響を検討した。その結果、多くの癌で腫瘍抑制因子とされていたHGFA inhibitor type-2 (HAI-2)が、口腔癌において腫瘍促進因子として機能することを報告した。また、HAI-2条件付きノックアウトマウスを作成し、成体におけるHAI-2の機能を解析したところ、HAI-2欠損マウスでは腸上皮の強い傷害や腸上皮バリア機能の低下がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 口腔癌においてHAI-2が増殖・浸潤転移に寄与することを見出し、初めて報告した。免疫組織学的な所見と併せて、HAI-2が口腔上皮の腫瘍性進行の病理診断マーカーとして役立つ可能性がある。
2. 成体内でHAI-2の機能を世界に先駆けて報告した。我々が作製したHAI-2変異マウスモデルは、上皮細胞におけるHAI-2/Hai-2機能の詳細な研究に使用可能である。

研究成果の概要(英文)：Membrane-associated protease inhibitor HAI is important in regulating the pericellular serine protease activities of epithelial cells. In this study, we analyse the role in epithelial cells and the effects of cancer progression. As a result, we reported that HAI-2, which was considered as a tumor suppressor in many cancers, contributes to tumor progression in oral cancer. Moreover, we found that HAI-2 deficient mice showed strong intestinal epithelium injury and decreased intestinal epithelial barrier function, using HAI-2 conditional knockout mice.

研究分野：実験病理

キーワード：口腔扁平上皮癌 プロテアーゼインヒビター HAI-1 HAI-2 prostasin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は全癌に占める割合は1-2%程度であるが、摂食、嚥下、構音など日常生活の根本に係わる口腔機能障害だけでなく審美面にも大きい影響を及ぼし、患者QOLを著しく損なう。病理組織学的には90%以上が扁平上皮癌(口腔扁平上皮癌:OSCC)である。現在のOSCCに対する治療法は、外科療法、放射線療法、化学療法が一般的で、最近になり分子標的治療や免疫療法なども導入されている。しかし、その5年生存率は約50-60%程度と他臓器と比較して特段に悪くはないものの、過去約30年の間に顕著な改善は見られない。その大きな理由としてOSCCが持つ強い局所浸潤性や転移能が考えられている。従って、浸潤・転移に関わる新規マーカーや新規治療標的遺伝子の同定が求められる。

細胞周囲微小環境におけるプロテアーゼ活性制御の破綻は発癌に寄与し、また、がん細胞の浸潤における細胞外基質の異常な破壊や再構成においても重要である。このプロテアーゼ活性制御因子として、細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターであるHAI (HGF activator inhibitor)に着目した。HAIはHGF活性化酵素(HGFA)を抑制するタンパク質として報告され、HAI-1とHAI-2が同定されている。HAIは全身の様々な上皮組織やがん組織に発現しており、主な標的酵素としてはHGFAの他に、matriptaseやprostasinなどの細胞膜結合セリンプロテアーゼが知られている。我々は、強い間質浸潤を示す浸潤先端部のOSCC細胞では細胞膜上のHAI-1が著明に減少し、その程度がリンパ節転移と相関することを報告した。さらにその浸潤先端部にはがんの進展に重要な癌随伴線維芽細胞のリクルートを伴っており、それはHAI-1減少によるmatriptase活性化によるものであった。一方で、HAI-2について肝細胞癌、神経膠芽腫など、多くのがんにおいてその発現が強く抑制されており、がん抑制遺伝子としての機能が報告されているが、逆に発現亢進を示すがんも報告されており、そのがんにおける意義についてはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

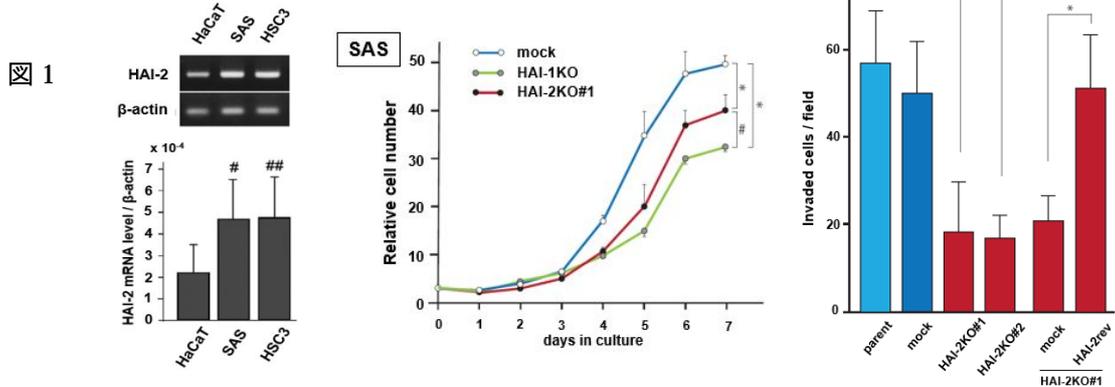
本研究では、頭頸部領域、特に口腔癌におけるHAI-2の発現の意義を明らかにすることを、培養細胞、新たに作成した条件付きHAI-2ノックアウトマウス、人体病理組織標本を用いて解析することを目的としている。

3. 研究の方法

- (1)-1 ゲノム編集技術CRISPR/Cas9システムを用いて、培養細胞株(ヒト表皮角化細胞株、ヒトOSCC細胞株)におけるHAI-1欠損、HAI-2欠損、HAI-1/HAI-2共欠損亜株を作製した。亜株を用い、HAIの細胞増殖・遊走・浸潤への関与を検討し、HAI欠損によって生じるタンパク質発現変化の解析を行った。また、作成した亜株と線維芽細胞の共培養を行い、単培養では得られないシグナル伝達系(HGF-METシグナルなど)の変化や形態変化についても検討した。
- (2) 細胞亜株を用い、HAIs発現の腫瘍形成能(皮下移植)に対する影響を明らかにするためにヌードマウス移植実験を行った。
- (3) OSCC切除症例を用いて、HAI-2の発現を免疫組織染色により確認した。培養細胞による検討で、HAI-2の制御するプロテアーゼの一つであるprostasinの発現に変化があったため、prostasinの染色も行った。得られた染色結果からスコアリングを行なった。
- (4) floxed Spint2 (HAI-2)マウスと全身でタモキシフェン誘導性にCreを発現するROSA-CreERTマウスを交配させ、口腔粘膜の変化を観察することを試みた。

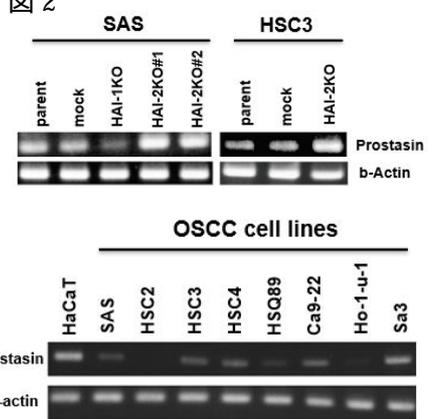
4. 研究成果

(1) 正常不死化角化細胞(HaCaT)と比較し、OSCC 細胞株において HAI-2 はより強く発現している傾向が見られた。CRISPR/Cas9 システムを用いて HAI-2 遺伝子 (*SPINT2*) の欠損株を作製し検討したところ、HAI-2 欠損 OSCC 細胞はコントロール細胞と比較して増殖能とマトリゲル浸潤能が優位に低下した (図 1)。



(1)-2 HAI-2 の標的となり得る細胞膜結合プロテアーゼの発現を RT-PCR で確認すると、HAI-2 欠失により prostasin 発現が上昇していた。そこで、OSCC 細胞 8 種類と HaCaT 細胞を用いて prostasin 発現を確認すると、HaCaT と比較して、すべての OSCC 細胞株で prostasin の発現が低下していた (図 2)。

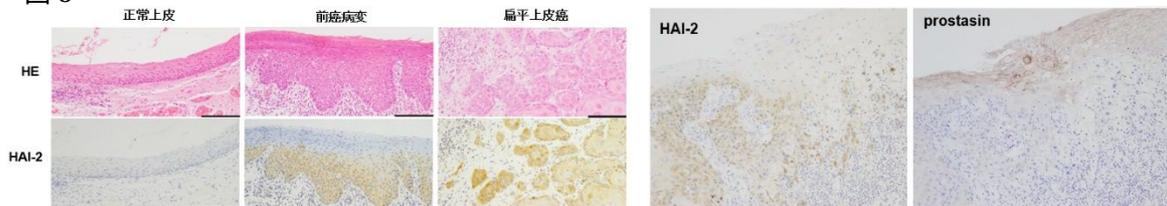
図 2



(1)-3 HAI-2 欠損によって生じた悪性形質減弱が prostasin 発現亢進を介して生じているのではないかと仮説を立て、siRNA を用いた prostasin 発現抑制を試みたところ、HAI-2 欠損により低下した遊走・浸潤能が回復した。

(1)-4 ヒト OSCC 組織での HAI-2 発現を免疫組織学的に評価したところ、正常重層扁平上皮での強陽性率が 9/25 症例(36%)であったのに対し、前がん病変では 23/25 例(92%)、浸潤がんでは 24/25 例(96%)で強陽性を示し、正常上皮と比較して有意に発現が上昇していた。また、病変部において HAI-2 陽性像と prostasin 陽性像が逆相関する傾向も確認できた (図 3)。

図 3



(2) 条件付きHAI-2ノックアウトマウスを作成し、全身でHAI-2を欠損させると、HAI-2欠損マウスでは腸上皮の強い傷害や腸上皮バリア機能の低下がみられ、これを報告した。HAI-2ノックアウトマウスの表現型は劇的であり、口腔粘膜におけるHAI-2の機能解析には角化細胞特異的(keratin-5-Cre)にCre酵素を発現させるマウスを交配させる必要があり、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yamamoto K, Kawaguchi M, Shimomura T, Izumi A, Konari K, Honda A, Lin C-Y, Johnson MD, Yamashita Y, Fukushima T, Kataoka H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI- 2)/SPINT2 contributes to invasive growth of oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 11691-11706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24450	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 1.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 11
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 Nakamura Yuri, Nakahata Shingo, Kondo Yuudai, Izumi Aya, Yamamoto Koji, Ichikawa Tomonaga, Tamura Tomohiro, Noumi Kenta, Yamashita Yoshihiro, Morishita Kazuhiro	4. 巻 509
2. 論文標題 Overexpression of absent in melanoma 2 in oral squamous cell carcinoma contributes to tumor progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 82 ~ 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.066	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 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 晃士、泉 彩、近藤 雄大、山下 善弘
2. 発表標題 HGF activator inhibitor type-2/SPINT2 は口腔扁平上皮癌の浸潤増殖を促進する
3. 学会等名 第36回口腔腫瘍学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 晃士
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるprostasinの機能解析
3. 学会等名 第37回口腔腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 晃士、泉 彩、川口 真紀子、福島 剛、片岡 寛章
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるprostasinの発現と意義
3. 学会等名 第29回日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 晃士、山下 文希、川口 真紀子、泉 彩、福島 剛、片岡 寛章
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌においてprostasinは腫瘍抑制因子として機能する
3. 学会等名 第108回日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 晃士
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるprostasinの機能解析
3. 学会等名 第37回口腔腫瘍学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学医学部病理学講座腫瘍・再生病態学分野ホームページ http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/patho2/index.html

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