

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009 年～2012 年
 課題番号：21790267
 研究課題名（和文）
 上皮多層化研究に基づいた癌化の分子機構解析
 研究課題名（英文）
 Common Mechanism for Cancer Progression and Stratification of Epithelia
 研究代表者
 松井 毅（MATSUI TAKESHI）
 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 特定拠点助教

 研究者番号：10452442

研究成果の概要（和文）：

皮膚特異的分泌蛋白質 Dermokine が早期大腸癌・膵臓癌にも発現することを見だし、有効は血清腫瘍マーカーとなることを示した。皮膚特異的蛋白質分解酵素 SASPase は、アトピー性皮膚炎の疾患素因である Profilaggrin を分解し、角質層水分量を制御する酵素であることを示した。また同時に早期癌においても発現していることも見いだした。以上のことから早期癌は、重層上皮組織の形成の分子機構と一部類似していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Skin-specific secreted peptide, dermokine was expressed in colorectal and pancreatic cancer at the early-stage of carcinogenesis. Serum dermokine was potential biomarker in these cancers. In addition, activity of skin-specific protease, SASPase plays a key role in stratum corneum hydration through profilaggrin processing. SASPase was also expressed at the early-stage of carcinogenesis. These results suggested the potential link between cancer progression and stratification of epithelia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1170,000
2010 年度	800,000	240,000	1040,000
2011 年度	800,000	240,000	1040,000
2012 年度	800,000	240,000	1040,000
総計	3300,000	990,000	4290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：癌、細胞・組織、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

人体の上皮組織には、単層上皮組織（胃や腸等）と重層上皮組織（皮膚や食道等）の二種類が存在し、各々の器官を区画化することにより独自の生理機能の発揮に成功している。しかし、その形成・維持機構は依然不明瞭な点が多い。一方で悪性腫瘍の9割が上皮組織から発生する事から、その形成・維持機構の研究は、癌化の分子機構解明に結びつくと考えられる。

皮膚表皮に代表される重層上皮組織は、基底層において分裂し、有棘層・顆粒層で分化しながら多層化し、最終的には細胞死を起した後、角質層において剥離する。重層扁平上皮はこのようなターンオーバーを一定速度でそれぞれ調和させつつ、上皮の性質を保ち、多層構造を維持しているという特徴的な組織である。

ところで、大腸癌発生初期段階においては、単層上皮である正常大腸が上皮過形成と呼ばれる上皮多層化状態を経て、アデノーマとなりポリープを形成し、その中から癌が形成される。本研究では、この癌化の初期における多層化現象が、重層上皮組織形成の分子機構と類似している点に着目する。すなわち、上皮重層化に伴い特異的に発現する共通分子の機能解析を通して、重層上皮組織の形成・維持機構と早期癌化の分子的関連性を明らかにしようとするものである。

我々は以前、高速 *in situ* hybridization 法を用いてマウス皮膚表皮 cDNA library から重層上皮特異的新規分泌蛋白質 Dermokine を同定した。(Matsui *et al.*, *Genomics* 2004) その後、 α 、 β 以外にも γ 、 δ 、 ϵ といった isoform が存在する事も報告された。(Toulza *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 2005; Naso *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 2006)しかし、これら isoform の機能の違いを含め、Dermokine がどのような生理機能を担っているのかは明らかになっていない部分が多い。

一方で、癌細胞に Dermokine が発現する事も公的データベース上で明らかになっていた。そこで申請者は、京都府立医科大学消化

器外科部門/ (株) エーザイ/ (株) カン研究所と共同研究を行い、分泌型 Dermokine (β , γ) が早期大腸癌 (Cancer in adenoma) の上皮多層化領域において高発現する事を見だし、大腸癌手術前血清に対して ELISA を行うと、既存の血清腫瘍マーカーよりも高い陽性率で早期癌 (Tis, T1) を検出できる事が明らかにしつつあった。そこで、本研究においては、引き続き、これらの Dermokine の血清腫瘍マーカーとしての発現と有効性の検証と、Dermokine の正常組織における生理機能を明らかにすることにより、重層上皮形成・維持機構と、早期癌化の分子機構の生物学的関連性を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

悪性腫瘍の9割は上皮組織に由来する。すなわち上皮細胞形成・維持機構の研究は、癌化の分子機構解析にも結びつくものである。本研究では、癌化の初期における上皮多層化現象が、重層上皮組織（皮膚表皮等）の形成分子機構と類似している点に着目し、両現象に共通に発現する事が明らかになりつつある「機能未知皮膚特異的分泌蛋白質 Dermokine」「皮膚特異的蛋白質分解酵素 SASPase」の重層上皮組織と癌細胞における関連性の解明を行う。それら両側面から得られた知見を統合する事により、癌に対する新規診断薬、新規創薬標的の同定へと結びつける。

3. 研究の方法

重層上皮形成・維持機構と早期癌化における上皮多層化現象との類似性を明らかにする為に、Dermokine 及び SASPase のノックアウトマウスを用いた生理機能解析と、癌細胞におけるこれら分子の発現解析を並行して行う。癌との関連性解析は、臨床消化器癌サンプル、消化器癌細胞株の解析に対して行った。

① ヒト癌における Dermokine アイソフォームの発現パターン解析と血清検査法の検証
食道癌・胃癌・大腸癌・膵臓癌の細胞株や組織における Dermokine の各アイソフォーム (α / β / γ / δ / ϵ) の mRNA 発現状況や抗体染色を用いた局在解析を行った。ノザンブロ

ットや各エクソン毎に設定した primer を用いた定量的 RT-PCR 解析により、各アイソフォームがどのような比率で発現しているのかを詳細に明らかにした。

② マウス癌モデル (APCmin/+) における Dermokine の発現解析

上記解析をマウス早期癌モデル (APCmin/+) 対して行った。

③ Dermokine のノックアウトマウス解析

既に作製済みであった Dermokine ノックアウトマウスをヘアレスマウスと戻し交配し、重層上皮組織を中心に組織学的解析、重層上皮分化マーカーの発現状況の解析や角層機能に関して解析を行った。

④ SASPase のノックアウトマウスの解析と癌組織における発現解析

①～③の解析を皮膚特異的蛋白質分解酵素 SASPase においても行った。

4. 研究成果

① 食道癌・胃癌・大腸癌・膵臓癌の細胞株・組織における Dermokine の各アイソフォーム ($\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon$) の mRNA 発現状況や抗体染色を用いた局在解析による Dermokine アイソフォームの発現パターン解析を行った。細胞株を用いた解析によりこれら癌腫においては、少なくとも、Dermokine- β 、 γ が発現していることが明らかとなった。また大腸癌細胞株 HCT116 の培養上清中に、これら isoform の蛋白質が、実際に分泌されていることも明らかにした。更に、臨床癌組織を用いた解析により大腸癌・胃癌・膵臓癌のいずれも早期癌において、Dermokine- β/γ が発現していることを明らかにした。以上の知見を基にして、大腸癌患者血清や膵臓癌患者血清において、Sandwich ELISA 法による血清検査を行い、Dermokine 検査は早期癌腫瘍マーカーとして有効であることを証明し、論文に投稿・掲載された。(Tagi and Matsui *et al.*, *J. Gastroenterol.*, 2010; Watanabe *et al.*, *Anticancer Res.*, 2013) この事実は、癌化初期における上皮多層化に伴って Dermokine の分泌が血中に反映されていることを示し、これまでの仮説を裏付けるものと考えられる。

② またマウス早期癌モデルである APCmin/+マウスの大腸に対しての定量的 RT-PCR 解析を行い、マウスの正常大腸部位に比べ Dermokine- β が、癌組織では発現亢進してい

ることを確認した。しかしヒト組織とは異なり、抗体を用いての蛋白質発現は確認できなかった。従って、Dermokine のマウス消化器癌における解析は中止し、皮膚表皮における生理機能解析を行い、ヒト早期癌における発現との相関性及び生理的意義を検討した。

③ Dermokine ノックアウトヘアレスマウスを作製し、皮膚表皮の解析を行った所、角質層に構造や強度異常が認められた。このことは Dermokine が分泌蛋白質でありながらも何らかの構造蛋白質としての機能を持ち、角質層の質的变化に関わっている可能性が考えられた。

④ また新たな重層上皮特異的分子であり、かつ消化器癌に発現する分子として、蛋白質分解酵素 SASPase の機能解析を行った。SASPase 欠損ヘアレスマウスは、乾燥肌を呈する事が明らかとなっていたが、詳細な解析の結果、アトピー性皮膚炎の最大の疾患素因遺伝子である Profilaggrin の分解異常が起こっていることを明らかにした (Matsui *et al.*, *EMBO Mol. Med.* 2011)。また *in vitro* では、Profilaggrin のリンカー配列を切断する事も明らかとなり、Profilaggrin 分解の律速段階を調節する酵素であると考えられた。一方で SASPase は、APCmin/+マウスの大腸癌ポリープやヒト大腸癌組織に高く転写されていることも明らかとなった。

以上のことから、本研究において、皮膚特異的遺伝子と消化器癌の癌発症過程において、何らかのシグナル情報伝達の共通性が認められることが示唆された。これらの上皮関連のシグナル伝達機構は癌化の早期段階において、働いていることが考えられ、早期癌発生の分子機構の解明、血清腫瘍マーカーとしての応用性、創薬標的分子の同定等に結びつく可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件) (すべて査読有り)

1. Watanabe K, Oochiai T, Kikuchi S, Kumano T, Matsui T, Morimoto K, Yasukawa S, Nakamori S, Sasako M, Yanagisawa A, Otsuji E: Dermokine Expression in Intraductal Papillary-Mucinous Neoplasm and Invasive Pancreatic Carcinoma. *Anticancer Res.* 32: 4405-4412, 2012.

2. Matsumura S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Muramatsu T, Furuta M, Tanaka S, Sakamoto M, Arii S, Inazawa J: Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 18:3541-51, 2012.
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1007.

3. Sandilands A, Brown SJ, Goh CS, Pohler E, Wilson NJ, Campbell LE, Miyamoto K, Kubo A, Irvine AD, Thawer-Esmail F, Munro CS, McLean WH, Kudoh J, Amagai M, Matsui T: Mutations in the SASPase gene (ASPRV1) are not associated with atopic eczema or clinically dry skin. *J. Invest. Dermatol.* 132:1507-10, 2012.
doi:10.1038/jid.2011.479

4. Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J: SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene* 31, 4923-4934, 2012.
doi:10.1038/onc.2011.646

5. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011.
doi: 10.1002/emmm.201100140

6. Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 32:389-398, 2011.
doi: 10.1093/carcin/bgq254

7. Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E: Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* 45:1201-11, 2010.
doi: 10.1007/s00535-010-0279-4

8. Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31:1027-36, 2010.
doi: 10.1093/carcin/bgq053

[学会発表] (計 16 件)

1. Matsui T: Mammalian Skin-specific Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase is a Key Modulator of Skin Moisturization and Evolution. *RSC-iCeMS Joint International Symposium Cell-Material Integration and Biomaterial Sciences*
March 18, 2013 (Kyoto)

2. Matsui T: Mammalian Skin-specific Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase is a Key Modulator of Skin Moisturization and Evolution. *The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan*
December 13, 2012 (Fukuoka)

3. Matsui T: Endogenous Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase as a Key Modulator of Skin Moisturization and Evolution. *6th Annual Symposium on Nanobiotechnology, Cell-Material Integration and Biomaterial Sciences.*
November 8-9, 2012 (Kyoto)

4. Matsui T: Endogenous Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase as a Key Modulator of Skin Moisturization. *The Montagna Symposium on the Biology of the Skin*
October 12, 2012 (Oregon, USA)

5. Matsui T: Mammalian Skin-specific Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase is a Key Modulator of Skin Moisturization. *Fujihara Seminar 2012: A new horizon of retroposon research*
Aug 3, 2012 (Kyoto)

6. Matsui T: Mammalian Skin-specific Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase is a Key Modulator of Skin Moisturization.
Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology
May 29, 2012 (Kobe)
7. Matsui T: Endogenous Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase as a key modulator of skin moisturization.
The 8th Okazaki Biology Conference: Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics -
March 23, 2012 (Okazaki)
8. Matsui T: Evolutionally integrated retroviral-like aspartic protease, SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan*
December 13, 2011 (Yokohama)
9. Matsui T: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing
The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
December 10, (Kyoto)
10. Matsui T: 表皮の顆粒層特異的に発現するプロテアーゼSASPaseによる、角質層水分量の制御機構
The 61st Annual Meeting of Japanese Society of Allergology
November 11, 2011 (Tokyo)
11. Matsui T: 皮膚表皮顆粒層特異的なレトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼSASPaseは、ProfilaggrinからFilaggrinへの分解を制御し、角質層の水分量を調節する。
The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society
September 22, 2011 (Kyoto)
12. Matsui T: 脊椎動物陸上進出の謎と皮膚の美容
The 29th Annual Meeting of the Japanese Society of Aesthetic Dermatology

September 10, 2011 (Yamaguchi)

13. Matsui T: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing.
Heidelberg-Kyoto Joint Symposium "Crossing Boundaries: Stem Cells, Materials, and Mesoscopic Sciences"
July 21-23, 2011 (Heidelberg, Germany)

14. Matsui T: 陸上脊椎動物において獲得された皮膚表皮顆粒層特異的なレトロウイルス型プロテアーゼSASPaseは、角質層の水分量を調節する。
Annual Meeting for the Society of Evolutionary Studies
July 30, 2011 (Kyoto)

15. Matsui T: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing.
Epithelial Differentiation & Keratinization Gordon Research Conference
July 3-8, 2011(USA)

16. Matsui T: Analysis and clinical application of dermokines, stratified epithelia-specific secreted proteins.
Gordon research Conference-Epithelial Differentiation & Keratinization
June 24, 2009
(Les Diabretes, Switzerland)

[図書] (計1件)

Matsui T: Endogenous Retroviral-Like Aspartic Protease, SASPase as a Key Modulator of Skin Moisturization.
Treatment of Dry Skin Syndrome -The Art and Science of Moisturizers- Edited by Lodén and Maibach, Springer, Part 2: 179-192, 2012.

[その他]

ホームページ等
<http://epithelial.evolution.jp/TakeshiMatsui/Japanese.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
松井 毅 (MATSUI TAKESHI)

京都大学 物質-細胞統合システム拠点
特定拠点助教
研究者番号：10452442