

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462920

研究課題名(和文)上皮性癌における細胞内プロテアーゼの新しい機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of new functions of an intracellular protease in epithelial cancers

研究代表者

福間 裕 (FUKUMA, Yutaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員

研究者番号：50253688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで癌とプロテアーゼの研究は多くの報告がなされており、プロテアーゼは発癌を助長する「悪玉因子」として長い間認識されてきた。しかしながら、我々はエンドソーム・リソソーム性プロテアーゼであるカテプシンEが抗腫瘍効果を示す「善玉因子」として機能することを見出した。本研究ではカテプシンE欠損は乳腺細胞の癌化を促進することと、カテプシンE欠損による変動遺伝子群及びタンパク質の同定を試みた。その結果カテプシンE欠損乳腺細胞は正常細胞と比べてWnt5aタンパク質が著しく減少していた。従ってカテプシンE欠損により、Wnt-カテニン経路のシグナルの異常が癌発症の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are many studies reported relationship between cancer and proteases. For a long time, proteases have been recognized as bad factors for cancer progression. However, we discovered that cathepsin E prevents cancer progression as a good factor. In this study, we found that cathepsin E deficiency developed mammary tumors, and identified the altered genes and proteins in the cathepsin E-deficient mammary cells. As a result, Wnt5a was significantly impaired in the deficient mammary cells. Therefore, cathepsin E deficiency may cause abnormal Wnt/  $\beta$ -catenin signaling, thereby resulting in cancer development.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：上皮性癌 プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

これまで癌とプロテアーゼの研究は多くの報告がなされており、その多くがマトリックスメタロプロテアーゼやリソソーム性プロテアーゼであるカテプシンBやLなどに焦点が当てられてきた。これらのプロテアーゼの機能として、癌の増殖・浸潤・転移に関係していることが示され、これらのプロテアーゼの阻害剤が癌抑制として働くことが示されていた。従って、プロテアーゼは発癌を助長する「悪玉因子」として長い間認識されてきた。

しかしながら、我々はエンドソーム・リソソーム性プロテアーゼであるカテプシンEが抗腫瘍効果を示す「善玉因子」として機能することを見出した。本プロテアーゼは、*in vitro*の実験系で、癌細胞のみを濃度依存的にアポトーシスに誘導し、免疫系細胞の活性化などを通じて、腫瘍の増殖・転移を抑制しているようである。最近我々は、*in vivo*でも、カテプシンE欠損マウスが上皮性癌を発症することを見出している。悪性腫瘍は細胞の生死を司る制御機構が異常になっており、癌細胞が無限に増殖を繰り返す難治性疾患である。歯科領域でも扁平上皮癌を始め様々な癌疾患があり、その制御機構の解明は治療する上でも重要なカギとなる。

本研究では、抗腫瘍効果を示すプロテアーゼのさらなる分子メカニズム、特に上皮細胞における発癌に関する分子機構の解明と予防・診断・治療への応用を目指す研究を遂行する。

## 2. 研究の目的

生体内でのカテプシンE欠損による発癌メカニズムを探るため、以下に述べる2点について明らかにした。**1)** 癌病変部のDNAマイクロアレー解析で遺伝子レベルの変化を野生型と欠損マウスで比較した。また、カテプシンE欠損により蓄積または欠損しているタンパク質について解析を行った。**2)** そこから予想されるシグナル分子を推定し、ウエスタンブロッティングを行って変化しているシグナル分子を同定した。

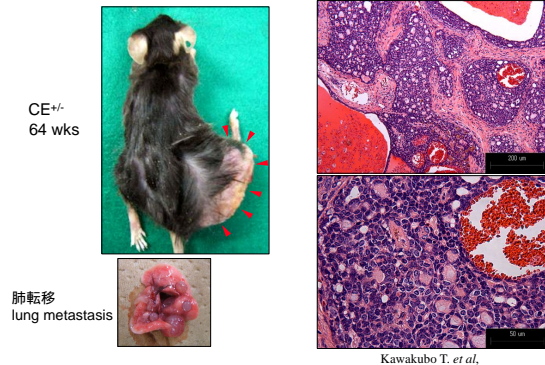
## 3. 研究の方法

雌の正常マウス(C57BLの遺伝的背景)およびカテプシンE欠損マウスを長期飼育(78週し、乳腺の発症率を算定した。その際に、癌化した乳腺組織を切除し、免疫組織化学的解析及び分子生物学的解析(DNAマイクロアレー)及び生化学的解析(ウエスタンブロッティング)を行った。また正常マウスおよびカテプシンE欠損マウスから得た乳腺細胞を培養した。さらにカテプシンEノックアウト乳腺細胞にカテプシンEを発現させて、その表現型などを比較した。

## 4. 研究成果

### (1) カテプシンE欠損は乳腺細胞の癌化を促進する

雌の正常マウスおよびカテプシンE欠損マウスを長期飼育し、乳腺癌の発症率を算定した。52週及び64週間の飼育では、正常マウスに比べてカテプシンE欠損マウスで有意に発症率が上昇していた。下図はカテプシンEヘテロマウスでの乳腺癌の様子と組織像を示す。



### (2) カテプシンE欠損による変動遺伝子群及びタンパク質の同定

雌の正常マウスおよびカテプシンE欠損マウスを11週飼育して、正常マウスおよびカテプシンE欠損マウスの乳腺組織の発現遺伝子を比較した。正常マウスに比べカテプシンE欠損マウスで2倍以上発現レベルが上昇していた遺伝子は654遺伝子検出できた。一方、カテプシンE欠損マウスで2倍以上発現レベルが減少していた遺伝子は665遺伝子であった。これらの結果に基づき我々はWnt-カテニン経路について注目し解析をさらに進めた。

両マウスから得られた乳腺細胞を培養し、Wnt5a抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を行ったところ、カテプシンE欠損乳腺細胞は正常細胞と比べてWnt5aタンパク質が著しく減少していることを見出した。さらに重要な知見として、カテプシンE欠損乳腺細胞にカテプシンE遺伝子を発現させるとWnt5aタンパク質が回復した。これらの結果よりカテプシンE欠損により、Wnt-カテニン経路のシグナルの異常が起こり、その結果癌が発症した可能性が示唆された。

最近の研究ではWnt5a依存性の-カテニン非依存性経路の活性化にはクラスリン依存性のエンドサイトーシス経路が関与していることが示唆されている。カテプシンEがエンドソームに特異的に局在するプロテアーゼであることから、カテプシンEがWnt5aを直接的・量的に制御していることで癌化を引き起こす可能性が示唆された。

最後に本研究は山本健二先生(九州大学名誉教授)および安河内(川久保)友世先生(福岡大学薬学部講師)との共同研究で行われた結果を基に一部記載しました。両先生には改めて謝意を表します。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Tsukuba T, Yanagawa M, Kadowaki T, Takii R, Okamoto Y, Sakai E, Okamoto K, Yamamoto K: Cathepsin E deficiency impairs autophagic proteolysis in macrophages. PLoS One 8(12): e82415, 2013 査読有
2. Nishishita K, Sakai E, Okamoto K, Tsukuba T: Structural and phylogenetic comparison of napsin genes: The duplication, loss of function and human-specific pseudogenization of napsin B. Gene 517(2): 147-157, 2013 査読有
3. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Fisetin Inhibits Osteoclastogenesis Through Prevention of RANKL-Induced ROS Production by Nrf2-Mediated Upregulation of Phase II Antioxidant Enzymes. J Pharmacol Sci. 121(4): 288-298, 2013 査読有
4. Kadowaki T, Kido MA, Hatakeyama J, Okamoto K, Tsukuba T, Yamamoto K.: Defective adipose tissue development associated with hepatomegaly in cathepsin E-deficient mice fed a high-fat diet. Biochem Biophys Res Commun Mar; 446(1):212-217, 2014 査読有
5. Yamaguchi Y, Sakai E, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Inhibitory effects of tert-butylhydroquinone on osteoclast differentiation via up-regulation of heme oxygenase-1 and down-regulation of HMGB1 release and NFATc1. J Appl Toxicol 34(1):49-56, 2014 査読有
6. Kawakubo T, Yasukochi A, Toyama T, Takahashi S, Okamoto K, Tsukuba T, Nakamura S, Ozaki Y, Nishigaki K, Yamashita H, Yamamoto K.: Repression of cathepsin E expression increases the risk of mammary carcinogenesis and links to poor prognosis in breast cancer. Carcinogenesis 35(3):714-726, 2014 査読有
7. Iwatake M, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T: Castalagin exerts inhibitory effects on osteoclastogenesis through blocking a broad range of signaling pathways with low cytotoxicity. Phytother Res. 29(6):917-924, 2015 査読有
8. Shimada-Sugawara M, Sakai E, Okamoto K, Fukuda M, Izumi T, Yoshida N, Tsukuba T: Rab27A regulates transport of cell surface receptors modulating multinucleation and lysosome-related organelles in osteoclasts. Sci Rep. 5:9620, 2015 査読有
9. Yashima Y, Okamoto K, Sakai E, Iwatake M, Fukuma Y, Nishishita K, Tsukuba T: Cobalt protoporphyrin represses osteoclastogenesis through blocking multiple signaling pathways. Biometals. 28(4):725-732, 2015 査読有
10. Iwatake M, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T: Punicalagin attenuates osteoclast differentiation by impairing NFATc1 expression and blocking Akt- and JNK-dependent pathways. Mol Cell Biochem. 407(1-2):161-172, 2015 査読有
11. Fukuma Y, Sakai E, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Cafestol has a weaker inhibitory effect on osteoclastogenesis than kahweol and promotes osteoblast differentiation. Biofactors. 41(4):222-231, 2015 査読有
12. Uchino K, Okamoto K, Sakai E, Yoneshima E, Iwatake M, Fukuma Y, Nishishita K, Tsukuba T: Dual effects of liquiritigenin on the proliferation of bone cells: Promotion of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast differentiation. Phytother Res. 29(11):1714-1721, 2015 査読有
13. Yoneshima E, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Yoshida N, Tsukuba T: The transcription factor EB (TFEB) regulates osteoblast differentiation through ATF4/CHOP-dependent pathway. J Cell. Physiol. 231, 1321-1333, 2016 査読有
14. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, -- Tsukuba T -- Zughayer SM *et al.* :Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy 12, 1-222, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 33 件)

1. Sakai E, Iwatake M, Tanaka T, Tsukuba T: Chemical constituents from sanguisorba officinalis inhibits osteoclastogenesis. 2nd International Conference on Pharma-Nutrition 2013, Singapore, Singapore, Apr 15-17, 2013
2. Iwatake M, Sakai E, Tanaka T, Tsukuba T: Inhibitory effects of a polyphenol from oak on bone diseases. 2nd International Conference on Pharma-Nutrition 2013, Singapore, Singapore, Apr 15-17, 2013
3. Fukuma Y, Sakai E, Sugawara Megumi, Yoneshima E, Nishishita K, Okamoto K, and Tsukuba T: Cafestol prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation. 第 86 回日本薬理学会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2013 年 3 月 21 ~ 23 日
4. Yoneshima E, Okamoto K, Sakai E, Yoshida N, and Tsukuba T:

- Up-regulation mechanisms of endosomal/lysosomal proteins during osteoblast differentiation. 第 86 回日本薬理学会, 福岡国際会議場 (福岡県、福岡市), 2013 年 3 月 21 ~ 23 日
5. Sakai E, Fukuma Y, Sugawara M, Nishishita K, Okamoto K, and Tsukuba T: Deficiency of Nrf2 accelerates osteoclastogenesis. 第 86 回日本生化学会大会合同大会, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市), 2013 年 9 月 11 ~ 13 日
  6. Iwatake M, Sakai E, Okamoto K, Yoneshima E, Zaito Y, Tanaka T, Tsukuba T: Suppressive effects of an oak extract on osteoclast formation and bone resorption. 第 86 回日本生化学会大会合同大会, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市), 2013 年 9 月 11 ~ 13 日
  7. 内野加穂, 岡元邦彰, 坂井詠子, 福間裕, 岩竹真弓, 西下一久, 筑波隆幸: リクイリチゲニンの破骨細胞形成への効果, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター (岡山県、岡山市), 2013 年 9 月 20 ~ 22 日
  8. 坂井詠子, 岩竹真弓, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: *Sanguisorba officinalis* 由来化学成分の破骨細胞分化に対する影響, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター (岡山県、岡山市), 2013 年 9 月 20 ~ 22 日
  9. 岩竹真弓, 坂井詠子, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞の分化抑制に関するザクロポリフェノールの作用メカニズムの解明, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター (岡山県、岡山市), 2013 年 9 月 20 ~ 22 日
  10. 米嶋枝里香, 岡元邦彰, 坂井詠子, 岩竹真弓, 筑波隆幸, 吉田教明: 骨芽細胞の分化成熟におけるリソソーム性タンパク質の役割, 第 72 回日本矯正歯科学会大会, キッセイ文化ホール (長野県、松本市), 2013 年 10 月 7 ~ 9 日
  11. 福間裕, 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: カフェストールによる破骨細胞分化抑制作用, 第 66 回日本薬理学会西南部会, 福岡大学薬学部 (福岡県、福岡市), 2013 年 11 月 16 日
  12. 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの系統樹解析と生化学的解析 - 遺伝子重複、偽遺伝子化と機能喪失, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド・神戸国際会議場 (兵庫県、神戸市), 2013 年 12 月 11 ~ 14 日
  13. Sakai E, Iwatake M, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T: Chemical constituents of *Sanguisorba officinalis* inhibits osteoclastogenesis. 第 87 回日本薬理学会, 東北大学百周年記念会館、(宮城県仙台市), 2014 年 3 月 19 ~ 21 日
  14. Yashima Y, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Tsukuba T: Cobalt protoporphyrin prevents osteoclastogenesis via blocking of  $\text{I}\kappa\text{B}$  phosphorylation. 第 87 回日本薬理学会, 東北大学百周年記念会館、(宮城県仙台市), 2014 年 3 月 19 ~ 21 日
  15. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞における細胞骨格を制御するタンパク質の同定と機能の解明, 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府、豊中市), 2014 年 8 月 5 ~ 6 日
  16. 財津有末, 岩竹真弓, 坂井詠子, 岡元邦彰, 佐藤啓子, 中山浩次, 筑波隆幸: 歯周病細菌によるヒト肝細胞株への細胞侵入と脂肪滴形成への影響, 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府、豊中市), 2014 年 8 月 5 ~ 6 日
  17. 八島由佳, 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 筑波隆幸: コバルトプロトポルフィリンの破骨細胞分化および活性化に対する影響 Effects of cobalt protoporphyrin on osteoclastogenesis, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場 (福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日
  18. 坂井詠子, 福間裕, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Nrf2 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレスと破骨細胞分化 Oxidative stress and osteoclastogenesis in Nrf2-deficient mice, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場 (福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日
  19. 岩竹真弓, 坂井詠子, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞の分化抑制に関するエラジタンニン類の作用メカニズムの解明 Clarification of inhibitory mechanisms of ellagitannins in osteoclastogenesis, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場 (福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日
  20. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞におけるポドソームの形成に参与するタンパク質の同定とその機能解析 Identification and functional analysis of a protein regulating podosomal formation in osteoclasts, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場 (福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25 ~ 27 日
  21. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 吉田教明, 筑波隆幸: 破骨細胞の多核化とリソソーム機能を制御する rab タンパク質の同定 Identification of a rab protein regulating multinucleation and lysosomal function in osteoclasts, 第 56

- 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2014年9月25~27日
22. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 福田光則, 泉哲郎, 吉田教明, 筑波隆幸: Rab27Aは破骨細胞の多核化とリソソーム機能を制御する 第87回日本生化学会大会合同大会, 京都国際会館(京都府、京都市), 2014年10月15~18日
  23. 坂井詠子, 山口優, 福間裕, 菅原めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Nrf2遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレスと骨代謝 Oxidative stress and bone metabolism in Nrf2-deficient mice 第87回日本生化学会大会合同大会, 京都国際会館(京都府、京都市), 2014年10月15~18日
  24. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞における膜動態と細胞骨格制御に関するタンパク質の解析 Functional analysis of a protein regulating membrane dynamics and cytoskeleton in osteoclasts 第87回日本生化学会大会合同大会, 京都国際会館(京都府、京都市), 2014年10月15~18日
  25. Yoneshima E, Okamoto K, Wang X, Sakai E, Nishishita K, Yoshida N, Tsukuba T: Role of transcription factor EB (TFEB) in BMP-induced osteoblastogenesis. 第88回日本薬理学会, 名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市), 2015年3月18~20日
  26. Okamoto K, Uchino K, Yoneshima E, Sakai E, Nishishita K, Tsukuba T: Effects of liquiritigenin on differentiation of bone cells. 第88回日本薬理学会, 名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市), 2015年3月18~20日
  27. 山下健太郎, 岩竹真弓, 岡元邦彰, 山田慎一, 梅田正博, 筑波隆幸: 口腔扁平上皮癌におけるカテプシンKの浸潤突起形成での役割 第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, ANAクラウンプラザホテルグランコート名古屋(愛知県、名古屋市), 2015年8月21~22日
  28. 筑波隆幸: 骨系細胞におけるリソソームの新しい機能, サテライトシンポジウム「内膜系オルガネラの形成・輸送機構」, 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日
  29. 福間裕, 坂井詠子, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: カフェストールは、カフェオールより破骨細胞分化阻害効果が弱く、骨芽細胞の成熟を促進する Cafestol has a weaker inhibitory effect on osteoclastogenesis than kahweol and promotes osteoblast maturation. 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日
  30. 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1/Nrf2の破骨細胞分化における役割 The role of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclast. 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日
  31. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 骨吸収におけるリソソーム小胞輸送に関するタンパク質の同定とその機能解析 Identification and analysis of a protein regulating vesicle trafficking of lysosomes in osteoclasts. 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日
  32. 米嶋枝里香, 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 筑波隆幸, 吉田教明: リソソーム促進転写因子TFEBの骨芽細胞分化における影響 第74回日本矯正歯科学会大会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2015年11月18~20日
  33. 坂井詠子, 福間裕, 山口優, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1/Nrf2の破骨細胞と骨芽細胞分化における役割 The roles of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclasts and osteoblasts. 第88回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド・神戸国際会議場(兵庫県、神戸市), 2015年12月1~4日
- 〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept\\_op.html](http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_op.html)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
福間 裕 (FUKUMA, Yutaka)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員、研究者番号: 50253688
  - (2) 研究分担者  
筑波 隆幸 (TSUKUBA, Takayuki)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授、研究者番号: 30264055
- 岡元 邦彰 (OKAMOTO, Kuniaki)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授、研究者番号: 10311846
- 西下 一久 (NISHISHITA, Kazuhisa)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教、研究者番号: 20237697
- 坂井 詠子 (SAKAI, Eiko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教、研究者番号: 10176612