

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08311

研究課題名(和文) 腸管発癌におけるセリン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) Roles of HAI-1, a membrane-anchored serine protease inhibitor, in intestinal carcinogenesis through regulating pericellular proteolysis

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HAI-1欠損マウスでは腸管発癌が亢進していたが、多段階発癌モデルマウスである ApcMin/+マウスモデルにおいてHAI-1とPAR-2を同時に欠損させると有意に腫瘍発生数が抑制された。HAI-1欠損ApcMin/+マウスでは、NF-κBシグナルが活性化しており、NF-κB阻害剤を投与すると、腫瘍発生数は有意に低下したが、HAI-1、PAR-2ダブル欠損ApcMin/+マウスではNF-κBシグナルの活性化が抑制されていた。これらのことから、HAI-1はPAR-2活性化酵素を制御することでNF-κBシグナル活性化を抑制し、腸管発癌を抑制していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is a membrane-bound serine protease inhibitor expressed on epithelial and carcinoma cell surface. We have previously reported that HAI-1 KO mice showed significantly accelerated tumor formation in the intestine. This study aimed to analyze the roles for HAI-1 in intestinal carcinogenesis. To examine whether PAR-2 signaling is responsible for increased tumor formation observed with HAI-1 deficiency in the ApcMin+ model, we generated HAI-1, PAR-2 double KO mice. We observed that concomitant knockout of PAR-2 reduced the formation of intestinal tumors. Moreover, loss of PAR-2 alleviate the activation of NF-κB in the HAI-1 KO intestine. These results suggested that insufficient HAI-1 function induced PAR-2 activation. Excess activation of PAR-2 induces the activation of NF-κB signaling, which may be responsible for increased intestinal tumorigenesis.

研究分野：実験病理学、分子生物学

キーワード：セリンプロテアーゼ セリンプロテアーゼインヒビター 腸管発癌 HAI-1 PAR-2

## 1. 研究開始当初の背景

Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) は肝細胞増殖因子 (HGF) を活性化する酵素を抑制する蛋白として報告された細胞膜結合クニツ型セリンプロテアーゼインヒビターで、全身の様々な上皮組織の細胞膜上に局在している。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 などが報告されており、matriptase、hepsin、TMPRSS4 については、発癌や癌の進展に関連することが分かってきた。現在知られている膜型セリンプロテアーゼインヒビターは HAI-1 の他には極めて限られることから (HAI-2、amyloid precursor protein [APP]、APP-like protein のみ)、HAI-1 が、上皮組織における膜型セリンプロテアーゼの活性制御の中心的役割を担っており、酵素活性調節を介して、上皮細胞恒常性維持や癌などの病態の進展に重要な役割を有すると考えられる。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、さらに、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を見出した。さらに、腸管特異的 HAI-1KO 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。さらに、炎症関連大腸化学発癌モデルにおいても、APC 変異マウスを用いた検討においても、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。近年、matriptase 過剰発現による皮膚腫瘍形成は matriptase の基質である Protease-activated receptor-2 (PAR-2) を欠損させることにより回避できるとの報告がなされ、腸管においても、HAI-1 欠損により matriptase や prostasin などの標的酵素の活性制御が破綻し、その基質である PAR-2 活性化を介して発癌亢進が引き起こされる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、HAI-1 欠損に伴い腸管腫瘍形成が亢進する分子機序を解明することである。具体的には、原因となる HAI-1 の標的酵素及びその基質を同定し、HAI-1 欠損による標的酵素活性異常が細胞周囲にどのような変化をもたらす、発癌の亢進に結びついているのかを解明することである。具体的には、以下の3項目について明らかにすることである。

(1) HAI-1KO マウスの腸管腫瘍組織を用いて HAI-1 標的酵素の発現と活性を解析し、腸管腫瘍組織における HAI-1 の標的酵素が何か、またその基質は何かを同定する。

(2) HAI-1KO マウスにみられた腫瘍形成の亢進が PAR-2 活性化を介しているかについて検討するため、HAI-1, PAR-2 ダブル KO マウスを作製し、腸管腫瘍形成について解析する。

(3) HAI-1 欠損により PAR-2 などの標的酵素の基質が活性化された際に、細胞内でどのようなシグナル伝達が活性化されるのか、ヒト大腸癌細胞株を用いて検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) HAI-1KO マウスの腸管腫瘍組織における標的酵素の発現と活性の検討

ApcMin/+マウスと腸管特異的 HAI-1 KO マウスを交配させて腸管特異的 HAI-1KO ApcMin/+マウスを作製する。また、コントロールとして HAI-1 floxed ApcMin/+マウスを作製する。さらに、腸管特異的 HAI-1 KO マウスを用いて、AOM、DSS 投与による大腸化学発癌モデルマウスを作製する。これらのマウス腸管腫瘍組織における matriptase などの HAI-1 標的酵素の発現パターンが HAI-1 欠損によって変化するかどうかを RT-PCR、ウェスタンブロット、免疫染色を用いて確認する。さらに、これらの標的酵素の酵素活性を組織抽出液と合成基質を用いて測定する。

HAI-1 標的酵素である matriptase や prostasin の基質である PAR-2 の発現パターンについても同様に検討を行う。

### (2) HAI-1、PAR-2 ダブル KO マウスの作製と解析

腸管特異的 HAI-1KO ApcMin/+マウスと PAR-2KO マウスを交配させ、HAI-1, PAR-2 ダブル KO-ApcMin/+マウスを作製する。このマウスと、比較対象である腸管特異的 HAI-1KO ApcMin/+マウスをそれぞれ 15 匹程度以上繁殖させる。作製したマウスを生後 15 週に安楽死させ、腸管の腫瘍発生数と腫瘍サイズを観察する。また、HE 染色により組織学的評価を行う。さらに、ERK-MAPK 経路(増殖シグナル経路)や PI3K-Akt 経路(生存シグナル経路)などの細胞内シグナル伝達経路の活性化について、免疫組織学的に検討を行い、HAI-1 欠損によってこれらのシグナル伝達経路の活性化がおこるか、また、活性化される場合、PAR-2 の発現と関連があるのかを検討する。

腸管特異的 HAI-1 KO マウスと PAR-2KO マウスを交配させ、HAI-1, PAR-2 ダブル KO マウスを作製し、まず、刺激を与えない定常状態における表現型(体重、腸管の形態、腸上皮バリア機能など)を解析する。さらに、AOM、DSS 投与による大腸化学発癌モデルマウスを作製し、同様の観察を行う。

### (3) HAI-1 発現を調節したヒト大腸癌細胞株の樹立

所有するヒト大腸癌細胞株の HAI-1 発現に

ついて RT-PCR 法で検討する。これらの細胞株で HAI-1 を強く発現しているものについては CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集による HAI-1 遺伝子のノックアウト、あるいはレンチウイルスを用いた HAI-1 遺伝子の抑制を行う。HAI-1 の発現が低いあるいは発現がみられない細胞株についてはレンチウイルスによる HAI-1 遺伝子の強制発現を行う。樹立した HAI-1 遺伝子発現を調整したヒト大腸癌細胞株を用いて、HAI-1 発現の程度と標的酵素活性、またその基質の活性化について解析する。

#### 4. 研究成果

(1) ApcMin/+マウスと腸管特異的 HAI-1 KO マウスを交配させて腸管特異的 HAI-1KO ApcMin/+マウスを作製し、腸管腫瘍組織の免疫組織化学的検討を行ったところ、HAI-1KO ApcMin/+マウスでは nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の核移行が亢進しており (図 1)、また、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現が亢進していることから、NF- $\kappa$ B シグナルが活性化していることが分かった。

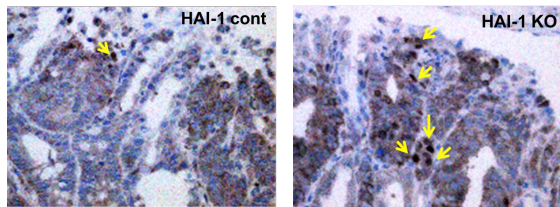


図 1. HAI-1 KO マウスにみられる NF- $\kappa$ B の核移行の亢進

そこで、NF- $\kappa$ B 阻害剤である DHMEQ を生後 8 週から 4 週間投与したところ、DHMEQ 投与群では HAI-1KO ApcMin/+マウスにみられた体重減少が軽減し、腫瘍発生数も有意に低下した (図 2)。

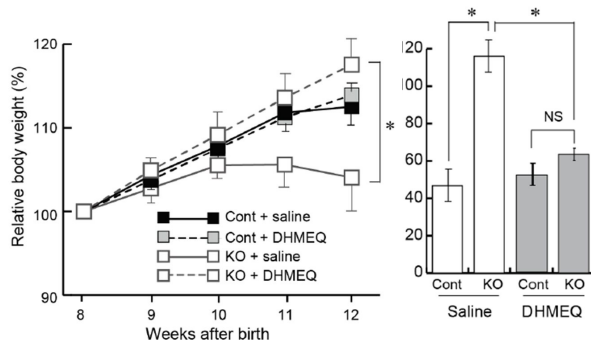


図 2. HAI-1 KO ApcMin/+マウスの体重減少、腫瘍形成における DHMEQ の効果

(2) 腸管特異的 HAI-1KO ApcMin/+マウスと HAI-1 標的酵素である matriptase の基質である PAR-2 の KO マウスを交配させ、HAI-1,PAR-2 ダブル KO-ApcMin/+マウスを作製する。このマウスと、比較対象である腸管特異的 HAI-1KO ApcMin/+マウスの腸管腫瘍発生数を検討したところ、HAI-1,PAR-2

ダブル KO-ApcMin/+マウスでは、腫瘍発生数が有意に低下していた (図 3)。

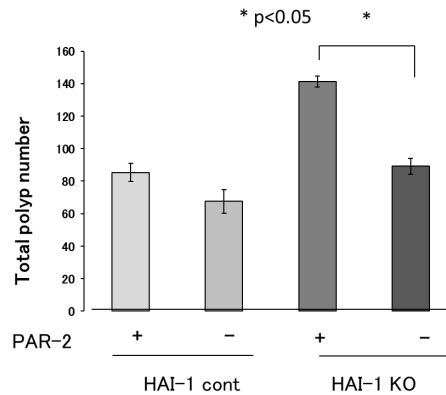


図 3. 腸管腫瘍形成における PAR-2KO の効果

また、HAI-1,PAR-2 ダブル KO-ApcMin/+マウスでは、腫瘍サイズも有意に減少した。これらの結果から HAI-1KO マウスでは、PAR-2 活性化による NF- $\kappa$ B シグナル活性化により、腸管発癌が亢進している可能性が示唆された。

(3) 次に、PAR-2 KO が HAI-1 KO マウスでみられた NF- $\kappa$ B シグナル活性化に影響を及ぼすか検討したところ、PAR-2KO により、HAI-1 KO マウスで亢進していた NF- $\kappa$ B の核移行が有意に抑制されることが明らかとなった (図 4)。

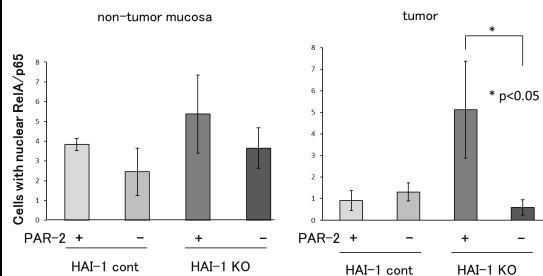


図 4. PAR-2KO による NF- $\kappa$ B の核移行の抑制

(4) 腸管特異的 HAI-1 KO マウスと PAR-2KO マウスを交配させ、HAI-1,PAR-2 ダブル KO マウスを作製し、まず、刺激を与えない定常状態における表現型 (体重、腸管の形態) を解析したところ、定常状態においては、PAR-2KO による影響はみられなかった。次に、これらのマウスを用いて AOM、DSS 投与による大腸化学発癌モデルマウスを作製し、PAR-2 KO が腫瘍形成に与える影響について検討を行ったところ、AOM/DSS による化学発癌モデルでは腫瘍発生数と PAR-2 発現の有無には関連はみられなかった。

(5) APC 変異のある大腸癌細胞株 SW480 細胞の HAI-1 及びその類似蛋白である HAI-2 の発現を確認したところ、HAI-1 はほとんど発現しておらず、HAI-2 は強く発現していたため、HAI-1 の強制発現株及び HAI-2 KO 細

胞株を樹立し、検討を行った。HAI-1 を発現させると増殖能は亢進するが、遊走・浸潤能は低下し、また HAI-1, HAI-2 のどちらも発現していない株では増殖・遊走・浸潤能がすべて低下することがわかった (図 5, 6)。

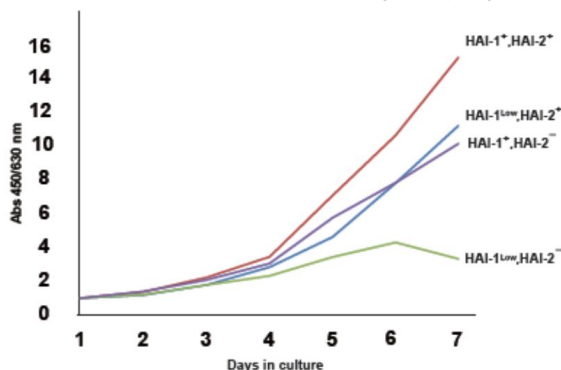


図 5. HAI-1 及び HAI-2 発現が SW480 細胞の増殖能に及ぼす影響

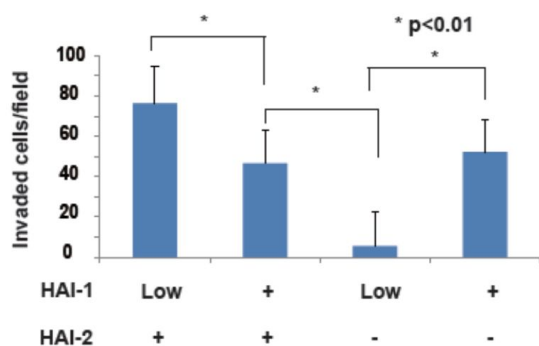


図 6. HAI-1 及び HAI-2 発現が SW480 細胞の浸潤能に及ぼす影響

本研究により、多段階発癌モデルマウスにおいては、腸上皮におけるプロテアーゼ活性制御の破綻が PAR-2 活性化を引き起こし、発癌亢進をもたらす可能性が示唆された。しかし、炎症関連大腸化学発癌モデルにおいては、PAR-2 活性化の影響は見られず、HAI-1 欠損により発癌が亢進する機序は未だ不明であり、今後、PAR-2 以外の HAI-1 標的酵素の基質にも着目してさらに検討を重ねる必要がある。また、大腸癌細胞株 SW480 細胞では HAI-1 の発現の有無により増殖、浸潤能に影響がみられることが明らかとなった。今後これらの細胞を用いて、大腸癌における HAI-1 発現の意義についてさらに解析を進めたい。特に、大腸癌における HAI-1 標的酵素とその基質を同定したいと考えている。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Kataoka H, Kawaguchi M, Fukushima T, Shimomura T: Hepatocyte growth factor activator inhibitors (HAI-1 and HAI-2): Emerging key players in epithelial integrity and cancer. *Pathol*

*Int.*, 68:145-158 (2018) 査読あり

DOI: 10.1111/pin.12647.

2. Yamamoto K, Kawaguchi M, Shimomura T, Izumi A, Konari K, Honda A, Lin CY, Johnson MD, Yamashita Y, Fukushima T and Kataoka H. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI-2)/SPINT2 contributes to invasive growth of oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget*, 9:11691-11706 (2018) 査読あり  
DOI: 10.18632/oncotarget.24450.
3. Sakugawa C, Haruyama Y, Tanaka H, Fukushima T, Kawaguchi M, Kataoka H. Prognostic significance of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1(HAI-1) immunoreactivity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Research Notes*, 10:674 (2017) 査読あり  
DOI: 10.1186/s13104-017-3014-x.
4. Nonboe AW, Krigslund O, Soendergaard C, Skovbjerg S, Friis S, Andersen MN, Ellis V, Kawaguchi M, Kataoka H, Bugge TH, Vogel LK. HAI-2 stabilizes, inhibits, and regulates SEA-cleavage-dependent secretory transport of matriptase. *Traffic*, 18 : 378-391 (2017) 査読あり  
DOI: 10.1111/tra.12482.
5. Kanemaru A, Yamamoto K, Kawaguchi M, Fukushima T, Lin CY, Johnson MD, Camerer E, Kataoka H. Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer associated fibroblasts by paracrine activation of protease activated receptor 2. *Int. J. Cancer*, 140:130-141 (2017) 査読あり  
DOI: 10.1002/ijc.30426.
6. Kawaguchi M, Yamamoto K, Kanemaru A, Tanaka H, Umezawa K, Fukushima T, Kataoka H. Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B signaling suppresses Spint1-deletion-induced tumor susceptibility in the ApcMin/+ model. *Oncotarget*, 7:68614-68622 (2016) 査読あり  
DOI: 10.18632/oncotarget.11863.
7. Kawaguchi M, Kanemaru A, Fukushima T, Yamamoto K, Tanaka H, Haruyama Y, Itoh H, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M, Kataoka H. Ghrelin administration suppresses inflammation associated colorectal carcinogenesis in mice. *Cancer Sci.*, 106:1130-1136 (2015) 査読あり  
DOI: 10.1111/cas.12725.

8. Kawaguchi M, Kanemaru A, Sawaguchi A, Yamamoto K, Baba T, Lin C-Y, Johnson MD, Fukushima T, Kataoka H. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 maintains the assembly of keratin into desmosomes in keratinocytes by regulating protease-activated receptor 2-dependent p38 signaling. *Am. J. Pathol.*, 185:1610-1623 (2015) 査読あり  
DOI:10.1016/j.ajpath.2015.02.009.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 川口真紀子、山本晃士、福島剛、片岡寛章：HAI-1 は protease activated receptor-2 (PAR-2) を介して表皮及び毛髪の形態形成を維持する。第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年
2. Kawaguchi M, Yamamoto K, Fukushima T, Kataoka H : Excess activation of PAR-2 increased frequency of tumor formation in HAI-1 deficient ApcMin+ mice. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年
3. Kawaguchi M, Yamamoto K, Fukushima T, Camerer E, Kataoka H : Accelerated tumor formation induced by Hai-1 deficiency in the ApcMin/+ model is prevented by concomitant deficiency of Par-2. ASBMB Special Symposia Series; Membrane-Anchored Serine Proteases 2017 年
4. 川口真紀子、山本晃士、福島剛、片岡寛章：HAI-1 欠損は PAR-2 シグナル活性化を介して腸管発癌を亢進させる。第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2017 年
5. 川口真紀子、山本晃士、瀬戸暁子、下村猛、福島剛、片岡寛章:HGF activator inhibitor type-2(HAI-2)/SPINT2 は腸管および胆道系上皮の完全性維持に必須である。第 36 回分子病理学研究会 フェニックスシンポジウム in 宮崎 2017 年
6. 川口真紀子、山本晃士、福島剛、片岡寛章：表皮及び毛髪の形態形成の諸段階における HAI-1 発現の意義に関する検討。第 106 回日本病理学会総会 2017 年
7. 川口真紀子、山本晃士、福島剛、片岡寛章：PAR-2 活性化は軽度の DSS 誘発大腸炎における HAI-1 欠損マウスの感受性亢進に参与する。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年
8. Kawaguchi M, Fukushima T, Kataoka H: Loss of HAI-1 upregulates MMP-9 expression and induces degradation of epidermal basement membrane. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年
9. 川口真紀子、山本晃士、福島剛、片岡寛章:HAI-1 欠損は PAR-2 活性化を介して炎症に対する感受性を亢進させる。第 21 回日本病態プロテアーゼ学会 2016 年
10. 川口真紀子、山本晃士、福島剛、片岡寛章：HAI-1 欠損は nuclear factor- $\kappa$ B 経路の活性化を介して腸管発癌を亢進させる。第 34 回日本ヒト細胞学会学術集会 2016 年
11. Kawaguchi M, Kanemaru A, Yamamoto K, Fukushima T, and Kataoka H: Protease-activated receptor-2 is not involved in the susceptibility to DSS-induced colitis observed in HAI-1-deficient mice. 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年
12. Kawaguchi M, Fukushima T, Kataoka H : HGF activator inhibitors (HAIs) may have fundamental roles in biology of colon adenocarcinoma cells. 第 74 回日本癌学会学術集会 2015 年
13. Kawaguchi M, Kanemaru A, Yamamoto K, Fukushima T, Camerer E, Kataoka H : Protease-activated receptor-2 is not involved in the susceptibility to DSS-induced colitis associated with HAI-1 deficiency. ASBMB Special Symposia Series; Membrane-Anchored Serine Proteases 2015 年
14. 川口真紀子、福島剛、金丸愛、山本晃士、田中弘之、片岡寛章:HAI-1 による標的プロテアーゼ活性調節を介したがん悪性形質の制御。第 33 回日本ヒト細胞学会学術集会 2015 年

## 6. 研究組織

### (1) 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