

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390114

研究課題名（和文）上皮細胞膜上におけるプロテアーゼ活性調節とその異常による病態の解析

研究課題名（英文）Regulation of proteolysis on epithelial cell membrane and its implication in the epithelial disorders

研究代表者

片岡 寛章（KATAOKA HIROAKI）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10214321

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：分子、プロテアーゼ

## 1. 研究計画の概要

細胞周囲微小環境におけるプロテアーゼ活性は、細胞外基質の再構成や生理活性物質の活性調節を介して、多細胞生物の様々な生命現象に深く関与する。本研究では、上皮細胞に特異的に発現する細胞膜結合型インヒビター（HAI-1：HGF activator inhibitor type 1）とその標的プロテアーゼ（HGF activator, matriptase など）による上皮細胞周囲微小環境での生理活性物質プロセッシング制御と、その破綻によって生じる上皮組織の病態を解析する。特に(1) HGF activator の新規基質の探索、(2) HAI-1 knockout (KO) マウスおよび組織特異的 conditional KO マウスの作成とそれらを用いた諸臓器上皮組織における解析、(3) 上皮系がんの進展における HAI-1 の意義解析の3点に重点をおいて研究を行う。

## 2. 研究の進捗状況

(1) HGF activator の基質としてはこれまで pro-HGF しか知られていなかった。新規の生体内生理的基質として、pro-macrophage stimulating protein (proMSP) を同定し、国際誌に発表した（雑誌論文番号 2, 4）。

(2) HAI-1 遺伝子改変マウスの作成と解析

[2-1] HAI-1 欠損マウスが胎盤形成不全により胎生致死となることから、胎盤機能をレスキューした HAI-1 欠損マウスを作成した。その結果、HAI-1 とその標的酵素である matriptase や prostasin との相互作用が表皮の正常角化や毛小皮形成に必須であることを明らかにすることが出来、国際誌に発表した（雑誌論文番号 5）。

[2-2] HAI-1 の conditional KO マウスの系を作成することに成功した。この系を用い

て、これまでに腸管上皮特異的 HAI-1 KO マウスと気管支上皮特異的 HAI-1 KO マウスを作製した。HAI-1 欠損腸管においては、近位大腸において粘膜透過性が亢進し、DSS 投与による炎症性腸疾患モデルを作成し比較したところ、コントロールと比べて有意に生存率が低下することを明らかにした（論文投稿中）。更に、種々の発癌刺激（化学発癌、APC 変異による発癌）による腫瘍形成率が HAI-1 欠損腸管において有意に増加することを見出した（米国消化器病学会 DDW において発表予定：2011 年 5 月 10 日）。

(3) 上皮系癌細胞の進展における HAI-1 の意義を解明するために、培養ヒト癌細胞株を用いて HAI-1 遺伝子のノックダウンおよび強制発現を行い、それらの影響を解析した。その結果、一部の上皮系癌細胞株において HAI-1 の欠失は上皮間葉移行をひきおこし（雑誌論文番号 3） *in vivo* における肺転移巣形成能が亢進することを見出した（雑誌論文番号 1）。更に、この現象はリコンビナント HAI-1 クニツドメイン（first Kunitz domain）によって抑制可能であった（雑誌論文番号 1）。

## 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

（理由）4 年の研究期間のうち、最初の 2 年間に HAI-1 conditional KO マウスの系を確立し、2 年目から 3 年目にかけて腸管および呼吸器上皮特異的 HAI-1 欠損マウスを作成し、3 年目から 4 年目にかけてこれらを用いて炎症や発癌負荷の実験をすすめ、結果を解析することを計画していた。3 年目が終了した現在、腸管および呼吸器上皮特異的 HAI-1 欠損マウスは完成しており、既に一部の負荷

実験とその解析を終了したことから、これに関しては予定通りに順調に進捗しており、今後の進展につながる興味深い知見も得られつつある。また、HGF activator の新規基質探索と皮膚における HAI-1 の意義についても十分な成果を得、それぞれの結果を国際誌に論文として発表している。加えて、2 年目以降に計画していた、ヒト培養上皮系癌細胞を用いた、HAI-1 の癌進展における意義解析については、予想外の興味深い成果を得ることができ、既に国際誌に論文としての発表が終了した。

これらの成果から、当初の計画通りに順調に進展していると評価できる。

#### 4. 今後の研究の推進方策

今回作成した、HAI-1 conditional KO マウスの系は、世界に先駆けた成果であり、これを活用することにより、諸臓器上皮組織における HAI-1 とその標的プロテアーゼの生理学および病理学的機能解析に関して独創的な研究を展開することが可能である。現在進行中の HAI-1 conditional KO マウスにさまざまな炎症刺激や発癌刺激を加えた病態モデルの解析において、今後網羅的遺伝子発現解析や網羅的蛋白質発現解析・質量分析などの手法を加え、HAI-1 とその標的プロテアーゼによって制御されている新規の生理活性物質とそのプロセッシング機構を見出し、新たな研究領域へ展開していきたいと考えている。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 15 件、うち 5 件を記載)

1. Fukushima T, Kawaguchi M, Yamasaki M, Tanaka H, Yorita K, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 suppresses metastatic pulmonary colonization of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Sci*, 102: 407-413 (2011). 査読あり
2. Kataoka H, Kawaguchi M: Hepatocyte growth factor activator (HGFA): pathophysiological functions in vivo. *FEBS J.*, 277:2230-2237 (2010). 査読あり
3. Cheng H, Fukushima T, Takahashi N, Tanaka H, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 regulates the epithelial to mesenchymal transition through membrane-bound serine proteinases. *Cancer Res.*, 69:1828-1835 (2009). 査

読あり

4. Kawaguchi M, Orikawa H, Baba T, Fukushima T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator is a serum activator of single-chain precursor macrophage-stimulating protein. *FEBS J.* 276:3481-3490 (2009). 査読あり
5. Nagaike K, Kawaguchi M, Takeda N, Fukushima T, Sawaguchi A, Kohama K, Setoyama M, Kataoka H: Defect of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1/serine protease inhibitor, Kunitz type 1 (Hai-1/Spint1) leads to ichthyosis-like condition and abnormal hair development in mice. *Am. J. Pathol.*, 173:1464-1475 (2008). 査読あり

[学会発表](計 24 件、うち 5 件を記載)

1. Kawaguchi M, Fukushima T, Takeda N, Hoshiko S, Yorita K, Kohama K, Orikawa H, Baba T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for the integrity of intestinal epithelium. *Experimental Biology* 2010. 2010 年 4 月 26 日 Anaheim CA, USA.
2. Kataoka H: Roles of HAI-1 in epithelial integrity and invasion of carcinoma cells. *Gordon Research Conference on Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis* 2010 年 2 月 17 日 Ventura CA, USA.
3. 片岡寛章: HAI-1 による上皮組織形態と上皮完全性の制御. 第 82 回日本生化学会大会(シンポジウム) 2009 年 10 月 24 日(神戸)
4. Cheng H, Fukushima T, Takahashi N, Tanaka H, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 regulates the epithelial to mesenchymal transition. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2009 年 4 月 19 日 Denver, CO, USA.
5. Kawaguchi M, Nagai M, Fukushima T, Orikawa H, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator is a serum activator of single-chain precursor of macrophage-stimulating protein. 99th Annual Meeting of American Association of Cancer Research 2008 年 4 月 14 日 San Diego CA, USA.