

## 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24年4月25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

研究成果の概要（和文）：

細胞周囲微小環境におけるプロテアーゼ活性は生命現象に深く関与する。本研究では上皮細胞の細胞膜結合型インヒビター（HAI-1）とその標的プロテアーゼの、生理活性物質活性化制御、上皮完全性維持、発癌そして癌進展における意義を検討した。その結果、HAI-1が表皮の正常角化と毛小皮形成に必須で、また腸管上皮完全性維持においても重要であることを明らかにした。更に、発癌や癌細胞浸潤における抑制因子として機能することも見出した。

研究成果の概要（英文）：

Pericellular proteolysis has critical roles in homeostasis and disease progression in multicellular organisms. We analyzed roles for hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1), a membrane-bound serine protease inhibitor expressed on the epithelial cell surface, and its target proteases (HGF activator, matrilysin, etc) in processing of pericellular bioactive molecules, epithelial integrity, carcinogenesis and cancer progression. Our data uncovered critical roles of HAI-1 in normal regulated keratinization of epidermal keratinocytes, formation of hair cuticle and intestinal epithelial integrity. We also found that HAI-1 may be an important suppressor of epithelial carcinogenesis and cancer invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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. 研究開始当初の背景

細胞外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。これまで、分泌型細胞外プロテアーゼの

機能と意義に関しては膨大な研究がなされ、解明が進んできた。しかし、細胞膜結合型プロテアーゼの機能解析はまだ端緒に終わったばかりである。細胞周囲微小環境におけるプロテアーゼ活性は細胞機能に大きな影響を

及ぼすことから、細胞膜上に存在する膜結合型プロテアーゼ群とそれらのインヒビター蛋白質について、これらの相互作用と機能を明らかにすることが強く求められる。

HAI-1は2個のクニッツ型インヒビタードメインと細胞膜貫通ドメインを有する膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターである。これまでに2種類のHAI(HAI-1、HAI-2)が報告されている。このような膜結合型のセリンプロテアーゼインヒビターはめずらしく、HAI以外にはamyloid precursor protein (APP)とAPP-like proteinを認めるのみである。申請者は、HAI-1が実際に様々な上皮細胞膜上に局在し、膜上で機能していることを明らかにしていた。研究開始当初、HAI-1の標的酵素としては、HGF activator、matrilysin、hepsin、prostasinが知られていた。HGF activatorは多機能増殖因子として知られる肝細胞増殖因子(HGF)の活性化酵素である。Matrilysinとhepsinは細胞膜結合セリンプロテアーゼで、癌進展における重要性が知られていた。Prostasinも膜型セリンプロテアーゼであり、細胞膜ナトリウムポンプの活性化酵素としても知られていた。HAI-1は種々の上皮組織で、これらのプロテアーゼの活性調節を行ない、上皮組織機能とその病態において重要な役割を有していると想定されていたが、HAI-1の実際の生体内機能については、我々が報告した胎盤絨毛形成における必要性以外は、ほとんど分かっていなかった。

また、HAI-1の標的酵素のひとつであるHGF activatorについては、その特異的基質としてはproHGFしか知られていなかった。しかし、我々が作成したHgf activatorノックアウト(KO)マウスを用いた検討からは、proHGF以外にも重要な生体内基質が存在することが示唆されていた。

## 2. 研究の目的

以上のような背景をもとに、本研究は以下の項目を研究目的として設定した。

- (1) HAI-1の胎盤以外の上皮組織における生体内機能を解明するためには適切なマウスモデルが必要である。通常のHai-1 KOマウスが胎盤形成不全で胎生致死となるため、あらたな遺伝子改変マウス(胎盤をレスキューしたKOマウス、条件付きKOマウス)を作成する。
- (2) Hai-1の上皮組織における生体内機能を、上記のマウスを用いて検証する。
- (3) HAI-1/Hai-1の発癌や癌進展(特に浸潤・転移)における意義を、上記のマウスと培養ヒト癌細胞株を用いて検証する。
- (4) HGF activatorの新規生体内基質を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウスの作成と利用

Hai-1 KOマウスの胎盤不全による胎生致死性を回避するため、Hai-1 KOマウスES細胞を樹立し、それを初期胚の内部細胞塊にインジェクションすることで、野生型胎盤を有するHai-1 KOマウスを作成した。

LoxP/Cre recombinaseによる条件付きKOマウスを作成するために、LoxP配列で挟まれたHAI-1遺伝子を有する、floxed Hai-1マウスを作成した。

Floxed Hai-1マウスとVillin-Creマウスを交配することにより、腸管特異的Hai-1 KOマウスを、またそれをApc変異マウスと交配することで、腸管Hai-1欠損Apc変異マウスを作成した。これらのマウスを用いて、腸管上皮Hai-1欠損がdextran sodium sulfate (DSS)投与で誘導される実験的腸炎の重症度に与える影響、azoxymethane (AOM)とDSS投与によって生じる大腸発癌に与える影響、そして、Apc変異に伴う発癌に与える影響を検討した。

既に作成しているHgf activator KOマウスをHGF/Hgf activatorの新規基質検索に利用した。すなわち、Hgf activator KOマウス由来の試料にHgf activatorを添加し、プロセッシングされる分子を検討した。

### (2) HAI-1発現を人為的に操作したヒト癌細胞株の作成

レトロウイルスベクターを用いてshRNAによる安定的HAI-1ノックダウン(KD)細胞、あるいはレンチウイルスを用いた強制的HAI-1発現細胞を、ヒト癌細胞培養株(膀胱癌細胞株及び口腔癌細胞株)を用いて作成し、HAI-1の機能解析を行った。

### (3) HAI-1発現の検討

手術で切除された大腸腫瘍組織、口腔癌組織、また、マウスの組織を用いて、免疫組織学的にHAI-1/Hai-1の発現動態と臨床病理学的解析を行った。

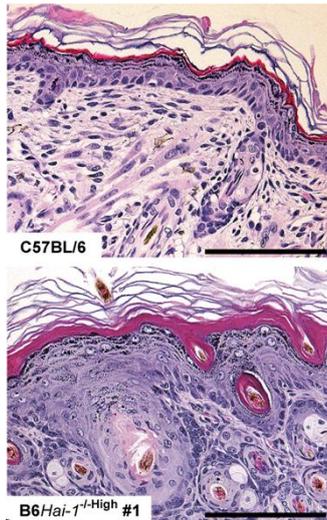
### (4) 倫理的配慮

臨床材料を用いた蛋白質発現の検討にあたっては、宮崎大学医学部倫理委員会に申請し認可を得たプロトコルに従って行った。同意書が必要とされた検体に関しては、本人および家族に実験内容の説明を行なった上で同意を得るインフォームドコンセントを確実にし、書面での承諾書を得たうえで指針を遵守して行った。動物実験は動物愛護と生命倫理の精神に基づき、指針を遵守し、その実験計画は学内審査委員会の認可を受けた上で、許可された施設内で行った。遺伝子組み換え実験は「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、学内委員会の審査をうけ、許可をうけた上で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胎盤をレスキューすることにより出生した Hai-1 KO マウスの解析によって明確となった、HAI-1 の皮膚における役割

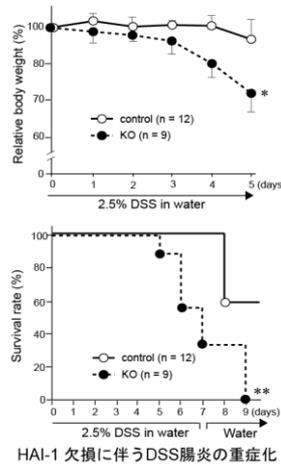
HAI-1 欠損マウスが胎盤形成不全により胎生致死となることから、胎盤機能をレスキューした HAI-1 欠損マウスを作成した。その結果、HAI-1 とその標的プロテアーゼである matriptase や prostasin との相互作用が表皮の正常角化や毛小皮形成に必須であることを明らかにすることが出来た。すなわち、HAI-1 欠損新生胎仔は、魚鱗癬様過角化、表皮肥厚（下図）と毛小皮形成不全を有し、表



皮保湿能も低下しており、出生後約 2 週間で致死となった。この角化異常は、HAI-1 欠損による matriptase の活性異常に伴い、prostasin の活性化が適切に生じず、プロフィラグリンの正常なプロセッシングが起きないことによると考えられた（雑誌論文番号 15）。

##### (2) 腸管特異的 HAI-1 欠損マウスの作成と、その解析によって明確となった、HAI-1 の腸管上皮完全性維持における意義

HAI-1 の条件付き 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た。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強い炎症を認め、有意



に生存率が低下することが明らかとなった（雑誌論文番号 5）。

##### (3) 腸管特異的 Hai-1 欠損マウスを用いた解析で明らかとなった、HAI-1 の発癌抑制機能

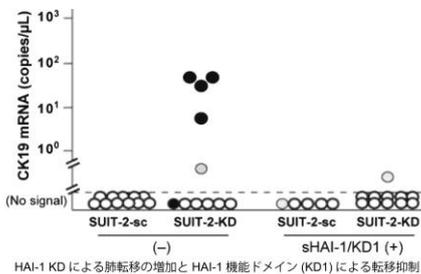
Apc 遺伝子変異マウス (Apc<sup>Min+</sup>) の腸管上皮 Hai-1 を選択的に KO したマウスを作成し、発癌効率に対する影響を観察したところ、Hai-1 欠損に伴い、小腸腫瘍形成が強く亢進し、マウスの生存期間が有意に短縮することを確認した。また、AOM と DSS を用いた化学発癌モデルにおいても、腸管上皮 Hai-1 欠損に伴い大腸癌の形成率が上昇することを観察した。すなわち、Hai-1 は腸管において発癌抑制因子として機能しているといえる（論文投稿準備中）。

##### (4) 培養ヒト細胞株を用いた HAI-1 機能の検証—[1] HAI-1 標的プロテアーゼとの相互作用の解析と新規標的の探索

HAI-1 とその最も重要な標的プロテアーゼである matriptase との相互作用を検証し、HAI-1 発現量が低下した場合の matriptase 活性について解析した（雑誌論文番号 3）。また、気道に特異的に発現する human airway trypsin-like protease が、HAI-1 の標的プロテアーゼのひとつであり、かつ気道上皮細胞における macrophage stimulating protein (MSP) の活性化プロテアーゼであることを明らかにした（雑誌論文番号 2, 4, 12）。

##### [2] 癌細胞における HAI-1 機能解析の結果明らかとなった、HAI-1 の浸潤抑制機能

培養ヒト膀胱癌細胞株 (SUIT2) を用いて、HAI-1 を KD したところ、上皮間葉転換現象 (EMT) が生じることが観察された。一方で SUIT2 の高転移亜株では既に EMT が生じており、同時に HAI-1 の発現が低下していた。この現象には、膜結合型セリンプロテアーゼである TMPRSS4 が関与していると考えられた（雑誌論文番号 11）。また、HAI-1 KD の結果、SUIT2 細胞の肺転移能は亢進したが、これは HAI-1 機能ドメインのリコンビナント蛋白で抑制可能であった（雑誌論文番号 6）。



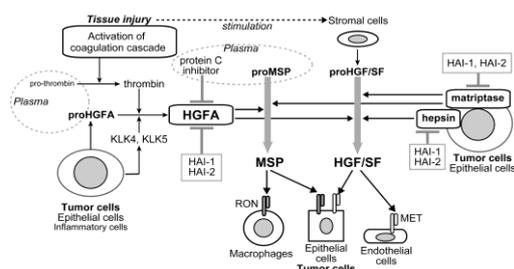
口腔扁平上皮癌 (OSCC) 組織における HAI-1 発現を臨床病理学的に検討したところ、顕著な浸潤性を示す浸潤先端部においては細胞膜上の HAI-1 が強く低下し、これがリンパ節転移の有無と有意に相関することが示された。そこで、培養 OSCC 細胞株 (SAS)

を用いて HAI-1 を KD し、その影響を観察したところ、HAI-1 KD に伴って SAS 細胞にも EMT が示唆される変化が生じ、浸潤能が強く亢進する事が示された(雑誌論文番号 1)。

以上の(1)から(4)までの成果は、上皮細胞膜上に発現している HAI-1 が、上皮完全性の維持と発癌抑制、さらには癌細胞の浸潤性抑制において、重要な意義を有していることを示している。今後、これらの機能の分子基盤を解明することは、癌をはじめとする種々の上皮組織の病態における新たな治療標的の発見につながる可能性がある。

#### (5) HGF activator の新規生体内基質の探索およびその他の成果

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。本研究では新規の生体内生理的基質として、pro-macrophage stimulating protein (proMSP) を明らかにし、報告した(雑誌論文番号 8, 10)。細胞周囲微小環境における HGF activator の役割について、我々の仮説を下図に示す。



また、HGF activator/HAI-1/HGF の系が、ブレオマイシン投与肺線維症マウスモデルにおいて、線維化制御因子として機能している可能性を指摘した(雑誌論文番号 9)。加えて、HAI-1 発現制御における低酸素や酸化ストレスの関与、HGF activator を活性化する新たな酵素(KLK4, KLK5)の同定などの成果もあげ、報告した(雑誌論文番号 13, 16)。

#### 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 16 件)

1. Baba T, Kawaguchi M, Fukushima T, Sato Y, Orikiwa H, Yorita K, Tanaka H, Lin C-Y, Sakoda S, Kataoka H: Loss of membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 induces oral squamous cell carcinoma cells invasiveness. J Pathol, in press 査読あり
2. Orikiwa H, Kawaguchi M, Baba T, Yorita K, Sakoda S, Kataoka H: Activation of macrophage-stimulating

protein by human airway trypsin-like protease. FEBS Lett, 586:217-221, (2012). 査読あり

3. Xu H, Xu, Z, Tseng I-C, Chou F-P, Chen Y-W, Wang J-K, Johnson M, Kataoka H, C-Y Lin: Mechanisms for the control of matriptase activity in the absence of sufficient HAI-1. Am J Physiol-Cell Physiol, 302:C453-462 (2012). 査読あり
4. Kato M, Hashimoto T, Kataoka H, Shimomura T, Kitamura N: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 inhibits protease activity and proteolytic activation of human airway trypsin-like protease. J Biochem, 151:179-187 (2012). 査読あり
5. Kawaguchi M, Takeda N, Hoshiko S, Yorita K, Baba T, Sawaguchi A, Nezu Y, Yoshikawa T, Fukushima T, Kataoka H: Membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 is required for maintenance of intestinal epithelial integrity. Am J Pathol, 179: 1815-1826 (2011). 査読あり
6. 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
7. Funagayama M, Kondo K, Chijiwa K, Kataoka H: Expression of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor type 1 in human hepatocellular carcinoma and postoperative outcome. World J Surg, 34: 1563-1571 (2010). 査読あり
8. Kataoka H, Kawaguchi M: Hepatocyte growth factor activator (HGFA): pathophysiological functions in vivo. FEBS J, 277: 2230-2237 (2010). 査読あり
9. Phin S, Sylvain Marchand-Adam S, Fabre A, Marchal-Somme J, Bantsimba-Malnda C, Kataoka H, Paul Soler P, Crestan B: Imbalance in the pro-hgf activation system in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. Am J Resp Cell Mol Biol, 42: 286-293 (2010). 査読あり
10. Kawaguchi M, Orikiwa 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
11. 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
  12. Tanaka H, Fukushima T, Yorita K, Kawaguchi, Kataoka H: Tissue injury alters the site of expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in bronchial epithelial cells. Human Cell, 22: 11-17 (2009). 査読あり
  13. Komaki W, Fukushima T, Tanaka H, Itoh H, Chosa E, Kataoka H: Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 on the epithelial cell surface is regulated by hypoxic and oxidative stresses. Virchows Archiv, 453: 347-57 (2008). 査読あり
  14. 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: 464-1475 (2008). 査読あり
  15. Nagai M, Takahashi N, Miyazawa K, Kawaguchi M, Chijiwa K, Kataoka H: Activation of MET receptor tyrosine kinase in ulcer surface epithelial cells undergoing restitution. Pathol Int, 58: 462-464 (2008). 査読あり
  16. Mukai S, Fukushima T, Naka D, Tanaka H, Osada Y, Kataoka H: Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1-related peptidases. FEBS J, 275: 1003-1017 (2008). 査読あり
- [学会発表] (計 34 件、うち 12 件を記載)
1. Kataoka H, Baba T, Fukushima T, Chen-Yong Lin C-Y, Kawaguchi M: Loss of membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 induces oral squamous cell carcinoma cells invasiveness. Gordon Research Conference on Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis 2012 年 2 月 13 日 Ventura CA, USA.
  2. Kawaguchi M, Hoshiko S, Kataoka H: Defect of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 (HAI-1) enhances intestinal tumorigenesis in APC/min mice. Gordon Research Conference on Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis 2012 年 2 月 14 日 Ventura CA, USA.
  3. Kataoka H, Hoshiko S, Kawaguchi M, Baba T, Yorita K, Tanaka H, Fukushima T: HGF activator inhibitor type 1 maintains intestinal epithelial integrity and suppresses intestinal tumorigenesis. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日
  4. Kawaguchi M, Hoshiko S, Yorita K, Baba T, Fukushima T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) plays an important role in maintaining integrity of intestinal epithelium. XIIIth International Workshop on Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation. 2011 年 7 月 10 日 Cambridge, UK.
  5. Hoshiko S, Kawaguchi M, Yorita K, Fukushima T, Kataoka H: Defect of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1, a cell surface serine protease inhibitor, enhances intestinal tumorigenesis in ApcMin/+ mice. Digestive Disease Week 2011. 2011 年 5 月 10 日 Chicago IL, USA.
  6. 星子 新理、川口 真紀子、頼田 顕辞、福島 剛、片岡 寛章: HGF activator inhibitor type1 (HAI-1) の欠失は APC 変異マウスの腸管腫瘍形成を促進する。第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 29 日 (横浜)
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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)

10. 片岡寛章、福島剛、頼田顕辞、田中弘之：  
細胞膜結合型セリンプロテアーゼイン  
ヒビター HAI-1 は癌細胞の上皮・間葉  
転換 (EMT) 現象の制御に関わる. 第  
98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 3  
日 (京都)
11. 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.
12. 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 SanDiego CA, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.miyazaki-med.ac.jp/patho2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

竹田 直樹 (TAKEDA NAOKI)

熊本大学・生命資源・研究支援センター・  
教授

研究者番号：90304998

### (3)連携研究者

田中 弘之 (TANAKA HIROYUKI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90433060

福島 剛 (FUKUSHIMA TSUYOSHI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10452913