

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：17601
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790250
研究課題名（和文） 腸上皮における細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターの生理的意義に関する研究
研究課題名（英文） Role of membrane-bound serine protease inhibitor in maintaining integrity of intestinal epithelium.
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

研究成果の概要（和文）：Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1)の腸上皮組織における生理的意義を明らかにするため、腸管上皮特異的 HAI-1 ノックアウト（KO）マウスを用いて解析した。HAI-1 KO マウスの大腸組織では杯細胞の減少、腸陰窩の形態異常がみられた。さらに KO マウスは腸上皮の透過性が亢進しており、炎症に対する感受性が亢進していることが明らかになった。これらの結果から、HAI-1 は腸上皮の完全性維持に重要な役割を有していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To analyze the role of HAI-1 in intestine, we used intestinal tissue-specific HAI-1 conditional deficient mice. We found morphological abnormalities in the colonic epithelium with enhanced epithelial cell apoptosis and increased mucosal permeability. Moreover, mice lacking intestinal HAI-1 showed significantly enhanced susceptibility to colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) exposure. These results suggest that HAI-1/SPINT1 plays an important role in maintaining colonic epithelium integrity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：腸上皮、セリンプロテアーゼ、細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビター

1. 研究開始当初の背景

Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) は細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターであり、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 (HGFA) 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 および prostatic などが報告されている。この他にも約 20 種類の細胞膜結合型セリンプロテアーゼが同定されているが、これらの活性調節についてはまだ不明である。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 は現在報告されている標的酵素以外にも、各種上皮組織で特異的に発現している他の膜型プロテアーゼも制御している可能性がある。HAI-1 KO マウスは胎盤機能不全の結果胎生致死となることから、胎盤機能をレスキューした KO マウスの作製も試みたところ、マウスは出生可能となったが、先天性魚鱗癬様の皮膚の異常や、毛の形態形成異常を示し、発育不全のため生後約 2 週間で致死となった。

このことから、HAI-1は胎盤や表皮以外の臓器においても重要な機能を有していることが示唆された。HAI-1は、特に腸管において強く発現していることから、腸管特異的HAI-1コンディショナルKOマウスを作製し、腸管におけるHAI-1の機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

(1) 腸管上皮における細胞膜結合型セリンプロテアーゼ群の発現パターンを解析し、また、HAI-1の小腸及び大腸における標的酵素を同定する。

(2) 腸管特異的HAI-1 KOマウスを用いてDSSを用いた実験大腸炎モデルを作製し、炎症、修復再生におけるHAI-1の機能を解析する。

(3) コントロールであるfloxed HAI-1マウスとHAI-1 KOマウスの小腸、大腸の粘膜上皮から抽出したRNAを用いてcDNAマイクロアレイ解析を行う。さらに抽出蛋白質のプロテオームによる網羅的解析比較も行い、その中からHAI-1 KOマウスにみられる表現型に関与すると考えられる遺伝子、蛋白質を絞り込む。

(4) 腸上皮の分化の過程にHAI-1が関連しているか検証するため、HAI-1 KOマウスにおいて腸上皮細胞分化に関わるNotchシグナル、Wntシグナル伝達経路に関与する遺伝子群の発現に変動がみられるか解析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜結合型セリンプロテアーゼの腸管における発現解析

コントロールであるfloxed HAI-1マウスの腸管を各部位に分け(十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、盲腸)RNAを抽出し、RT-PCR法により、それぞれの部位について、現在同定されている各細胞膜結合型セリンプロテアーゼの発現を確認した。各細胞におけるより詳細な局在を解析するために、組織標本を用いた免疫染色、in situ hybridizationも行った。同様の解析を、腸管上皮特異的HAI-1 KOマウスについてもを行い、HAI-1が膜型セリンプロテアーゼの発現に影響を与えるか検討した。

(2) HAI-1欠失により発現変動する分子の探索

HAI-1 KOマウスの表現型に関与する分子を探索するため、コントロールマウスとHAI-1 KOマウスの小腸、大腸の粘膜上皮からRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイを行った。cDNAマイクロアレイによって見出

された、HAI-1欠失で変動がみられる遺伝子について、腸管の各部位における発現を定量的RT-PCR法及び、ウェスタンブロットで確認した。

(3) 炎症・修復再生におけるHAI-1の意義の解析

炎症、修復再生におけるHAI-1の意義を解明するために、コントロールマウスとHAI-1 KOマウスを用いてDSSによる実験大腸炎モデルを作製した。

モデルマウスは図1に示すように、炎症反応をみるための実験1、炎症からの組織修復、再生をみるための実験2の2通りの方法で作製した。さらに、重度の炎症を惹起させるため、2.5% DSSを7日間投与するモデルも作製した。

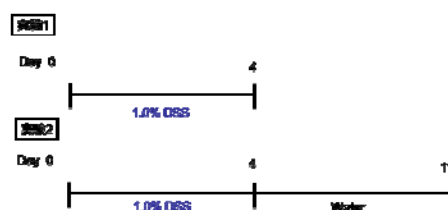


図1. DSS誘発大腸炎モデル作製

(4) 腸管上皮の形態形成・分化におけるHAI-1の意義の解析

HAI-1欠失によって腸管上皮に形態学的な異常がみられるかを検討するため、定常状態におけるコントロールマウス及びHAI-1 KOマウスの小腸、大腸組織をHE染色及び透過電子顕微鏡を用いて超微形態学的に解析した。

4. 研究成果

(1) コントロールマウス及びHAI-1 KOマウスの腸管の各部位について、HAI-1の標的プロテアーゼ及びHAI-2の発現をRT-PCR法によって確認したところ、コントロールマウスとKOマウス間で発現パターンに差はみられなかった(図2)。

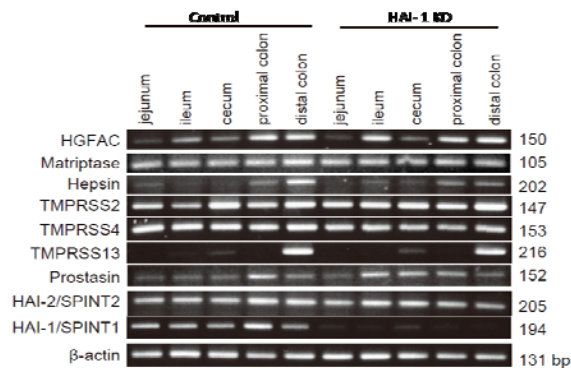


図2. 腸管の各部位におけるHAI-1標的プロテアーゼの発現

(2) コントロールマウス及び HAI-1 KO マウスの小腸、大腸組織の形態について HE 染色を用いて検討したところ、HAI-1 KO マウスの大腸組織では杯細胞が減少しており、腸陰窩の形態異常がみられた。また、BrdU 取り込み法によって細胞増殖活性を検討したところ、KO マウスで有意に細胞増殖活性が亢進していた。さらに、透過電子顕微鏡を用いた超微形態学的解析の結果、KO マウスの一部の杯細胞で、小胞体の拡張がみられ、小胞体ストレスが生じていることが示唆された。小腸組織については、HAI-1 欠失による形態の異常はみられなかった。

(3) 大腸上皮細胞のアポトーシスについて解析したところ、HAI-1 KO マウスではカスパーゼ 3 の活性が亢進していた。また、JNK/SAPK の活性亢進、小胞体ストレスマーカーである GADD153/CHOP の発現亢進もみられた。さらに、cDNA マイクロアレイによる網羅的解析により、KO マウスではアポトーシス抑制分子であるクラステリンの発現が低下していることを見出した。これらの結果から、HAI-1 KO マウスの大腸上皮細胞は、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスが亢進していることが示唆された。

(4) FITC-dextran を用いて腸上皮の透過性を測定したところ、HAI-1 KO マウスでは有意に透過性が亢進していた。また、タイトジャンクション構成蛋白である ZO-1 及び Occludin の発現を免疫染色で検討したところ、KO マウスの大腸上皮の一部で発現の減少がみられた。これらの結果は HAI-1 の標的酵素である matriptase の KO マウスで見られる表現型と類似していた。そこで、大腸上皮細胞における matriptase の発現を免疫染色により検討したところ、KO マウス大腸上皮の形態異常がみられる部位では、matriptase の膜局在がみられず、細胞質に染色される傾向にあることが分かった。in situ hybridization による matriptase の mRNA 発現の検討では異常はみられなかったことから、KO マウスでは、matriptase の細胞膜への輸送に異常を来していることと示唆された。

(5) 1%DSS による実験大腸炎モデルを作製し、炎症、修復再生における HAI-1 の意義を検討したところ、HAI-1 KO マウスでは粘膜の浮腫、粘膜上皮の欠損などの炎症症状が、コントロールマウスと比べ、より重篤であった。さらに、炎症に対する粘膜上皮の再生が遅延していた。2.5%DSS を投与する大腸炎モデルにおいては、HAI-1 KO マウスでは体重が有意に減少し、生存率も低かった(図 3)。さらに、盲腸の委縮、炎症性サイトカインの発現上昇もみられた。

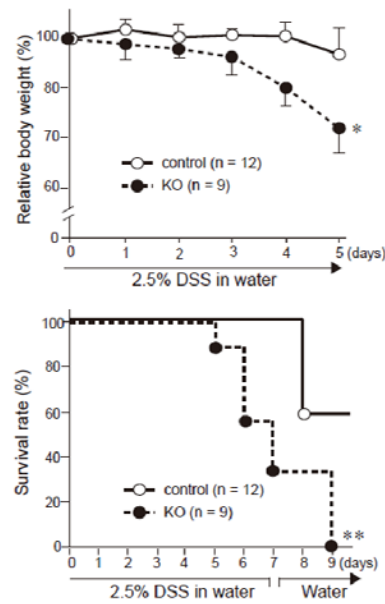


図3. 大腸炎モデルにおける体重変化及び生存率

(6) 以上の結果から、HAI-1 が大腸上皮の形態形成、恒常性維持に必須であり、HAI-1 が欠損すると炎症に対する感受性が亢進することが明らかとなった。HAI-1KO マウスは胎生致死であるため、成体における HAI-1 の機能についてはこれまで不明であった。本研究成果は、コンディショナル KO マウスを用いて成体における HAI-1 の機能を検討した世界に先駆けた成果である。今後は、腸管以外のコンディショナル KO マウスを用いて他の上皮組織における HAI-1 の機能について解析するとともに、ヒトの疾患における HAI-1 の意義について更に検討を重ねていく予定である。

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 6 件)

1. Hoshiko S, Kawaguchi M, Fukushima T, Haruyama Y, Yorita Y, Tanaka H, Seiki M, Inatsu H, Kitamura K, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a suppressor of intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 73:2659-2670 (2013). 査読あり
2. Kohama K, Kawaguchi M, Fukushima T, Lin C-Y, Kataoka H: Regulation of pericellular proteolysis by hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in trophoblast cells. *Hum. Cell* 25:100-110 (2013) 査読あり
3. Baba T, Kawaguchi M, Fukushima T, Sato Y, Orikawa 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.* 228:181-192 (2012) 査読あり

4. Orikawa 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
5. Fukushima T, Kawaguchi M, Yorita K, Tanaka H, Umezawa K, Takeshima H, Kataoka H: Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B, on glioblastoma. *Neuro. Oncol.* 14:19-28 (2012) 査読あり
6. 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

[学会発表] (計 16 件、うち 10 件を記載)

1. Ye JJ, Kawaguchi M, Haruyama Y, Kanemaru A, Fukushima T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) suppresses tumor growth and metastasis of pancreatic adenocarcinoma cells. An AACR Special Conference on Tumor Invasion and Metastasis. 2013 年 1 月 21 日 (San Diego, CA, USA)
2. Kawaguchi M, Haruyama Y, Kataoka H: HGF activator inhibitor type 1 (HAI-1) suppresses tumor growth and metastasis of pancreatic adenocarcinoma cells. 第 71 回日本癌学会学術集会 2012 年 9 月 21 日 (札幌)
3. 川口 真紀子, 竹田直樹, 星子新理, 福島剛, 片岡寛章: 細胞膜結合型プロテアーゼインヒビター HAI-1 は表皮角化細胞の形態形成に必須である. 第 17 回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2012 年 8 月 17 日 (浜松)
4. 片岡寛章, 馬場貴, 福島剛, 川口真紀子, 迫田隅男: 膜型プロテアーゼインヒビター HAI-1 による口腔扁平上皮癌の浸潤制御. 第 21 回日本がん転移学会学術集会 2012 年 7 月 12 日 (広島)
5. Kawaguchi M, Takeda N, Sawaguchi A, Sato Y, Hoshiko S, Fukushima T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor

activator inhibitor type 1 (HAI-1) regulates cell morphology through control of the actin cytoskeleton in epidermal keratinocyte. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 (横浜)

6. Kawaguchi M, Baba T, Fukushima T, Kataoka H: Type II membrane-type serine protease, matriptase, is expressed in perivascular tumor cells HLC-1 xenograft. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日 (名古屋)
7. 川口真紀子, 竹田直樹, 星子新理, 頼田顕辞, 馬場貴, 澤口朗, 福島剛, 片岡寛章: 細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビター、Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) は腸上皮完全性維持に必須である. 第 16 回日本病態プロテアーゼ学会学術総会 2011 年 8 月 26 日 (豊中)
8. 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 & Cellular Biology of Plasminogen Activation. 2011 年 7 月 10 日 (Cambridge, UK)
9. 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. 2011 年 5 月 10 日 (Chicago, USA)
10. 川口真紀子, 星子新理, 福島剛, 田中弘之, 頼田 顕辞, 梅北 佳子, 片岡 寛章: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) は表皮角化細胞の形態形成を制御している. 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 29 日 (横浜)

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