

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462029

研究課題名(和文) 正常胃粘膜上皮および胃癌における SPINK1 の機能解析

研究課題名(英文) Function analysis of SPINK1 in normal gastric mucosa epithelium and gastric cancer

研究代表者

尾崎 宣之 (OZAKI, Nobuyuki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40551255

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)：正常胃粘膜上皮のSPINK1の発現系を解析し、同時に胃癌においても解析した。SPINK1は胃粘膜細胞に発現し、胃粘膜の保護および潰瘍部位の創傷治癒促進に働いていた。免疫染色により各種の染色を行ったところ、胃においては陰窩に特に強く発現を確認され、幹細胞の性質を持つ細胞に発現している可能性を示唆させた。胃癌においては高分化型に特に強く発現しており、未分化な癌に関してはほとんど発現を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed an expression system of SPINK1 of normal gastric mucosa epithelium and analyzed it in gastric cancer at the same time. SPINK1 expressed to a gastric mucosa cell and worked in protection of gastric mucosa and vulnerary acceleration of ulcer locus. It was particularly strongly confirmed expression in crypt in a stomach and expressed to the cell which had a property of stem cell. We particularly strongly expressed in well differentiated type in gastric cancer, and did not recognize most expression about undifferentiated carcinoma.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵分泌性トリプシンインヒビター 正常胃粘膜 胃癌

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼはタンパク質やペプチドの消化に加え、ペプチド鎖の切断を介してタンパク質の成熟や生理活性の発現、代謝の調整情報の発現や伝達などの生命現象に直結した重要な役割に関与することが知られているが、そのインヒビターの生理的意義はまだよく知られていない。Serine protease inhibitor Kazal type 1 (SPINK1; マウスホモログ Spink3) は膵臓から単離されたトリプシン特異的な膵臓内在性のインヒビターであり、膵外分泌を担う腺房細胞から消化酵素とともに分泌されるため膵分泌性トリプシンインヒビター (pancreatic secretory trypsin inhibitor, PSTI) とも呼ばれる。SPINK1 は膵臓内で活性化したトリプシンを阻害することにより、膵臓を自己消化から守る役割を負っていると考えられてきた。申請者らは過去に個体レベルで SPINK1 と膵炎との関連を調べる目的で、SPINK1 のマウスホモログである Spink3 欠損マウスを樹立した (Gastroenterology. 2005)。このマウスは生後 2 週間以内に全例死亡するが、出生後より急激に膵臓の変性が始まり、膵組織がほぼ消失していることが判明した。膵炎の発症に SPINK1 が密接に関わっていることが示された。

また、このマウスは生後 2 週間以内に全例死亡するため、われわれは更なる解析を進めるため、CAG プロモーター下にヒト SPINK1 のミニ遺伝子をつなぎ (CAG-SP1)、マウス ES 細胞の X 染色体に置換してマウス (XCAG-SP1 マウス) を樹立した。哺乳類の性染色体である X 染色体が、1 本を除いて、残りの X 染色体で遺伝子発現が抑制されることを X 染色体の不活性化という。XCAG-SP1 マウスはオス (YX;CAG-SP1) と X 染色体の両方にトランスジェーンが挿入されたメス (X;CAG-SP1/CAG-SP1) ではすべての細胞で SPINK1 遺伝子が発現するが、片方に挿入され

たメス (X;CAG-SP1/+) では約半数の細胞でのみ SPINK1 遺伝子が発現するはずである。このマウスと Spink3^{-/-}マウスを交配することで Spink3^{-/-}X^{CAG-SP1/+} を樹立した。Spink3^{-/-}X^{CAG-SP1/+} は野生型に比較して、やや低成長だが、成獣まで成長する。生後 8 週齢の膵臓では、腺房細胞の脱落と広範な線維化を来し、ヒト慢性膵炎と酷似している。このような変化は他臓器においても同様の所見が得られる可能性がある。すなわち、胃粘膜上皮においても Spink3 が発現せず、SPINK1 が発現する領域と発現しない領域が認められるはずである。

2) SPINK1 と胃との関連

以前より SPINK1 は胃粘膜細胞に発現し、胃粘膜の保護および潰瘍部位の創傷治癒促進に働いているとの報告はあるが (Gut. 1995)、これ以降、胃と SPINK1 に関する詳細な解析はなされていない。申請者らは Spink3 の発現を Cre-lox システムを用いて、cre recombinase 遺伝子を Spink3 プロモーター直下に置換して、Spink3-cre マウスを樹立した。Spink3-cre マウスと Rosa26 レポーターマウスを交配して樹立した Spink3-cre-R26R マウスの 8 週齢における全身の -galactosidase (-gal) 活性を X-gal 染色で解析すると、Spink3-Cre-R26R マウスでは広範に、点状に -gal 活性が観察された。特に消化管上皮では部分的に腺 (陰窩) の底辺部から絨毛の頂上にかけて、連続的に -gal 活性が見られ、消化管上皮幹細胞の一部が Spink3 を発現している可能性が示された。

3) SPINK1 と癌との関連

SPINK1 は、腫瘍関連トリプシンインヒビター (tumor associated trypsin inhibitor; TATI) とも呼ばれる。TATI は 1982 年に Stenman らによって卵巣癌患者の尿から同定され、その後 SPINK1 と同一タンパクであると結論付けられた (Int J Cancer. 1983)。また SPINK1 は、膵癌、胃癌、大腸癌、肝癌、

胆道癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌といった様々な癌種で発現していることが確認されている。特に大腸癌(Br J Cancer. 2009)、胆管細胞癌(Am J Gastroenterol. 2006)、前立腺癌(Cancer Cell.2008)などでは SPINK1 高発現群で根治術後の再発が多く、SPINK1 の新規バイオマーカーとしての有用性が報告されている。このように SPINK1 はトリプシン・インヒビター以外にも癌において重要な役割を担っている可能性が示唆される。さらに興味深いことに SPINK1 は構造的に epidermal growth factor (EGF) と類似しており(BBRC 1987)、繊維芽細胞や胃、膵臓癌などの癌細胞株の増殖活性を有していることも知られている (JEM.1990, Digestion.1998)。申請者らは SPINK1 が EGF 受容体 (EGFR) のリガンドとして働き、主に Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して膵癌細胞株の増殖を促進させることを報告した (Mol Cancer Res. 2009)。以上の知見より、消化器癌において SPINK1 は細胞増殖促進を示し、癌の増殖・進展に寄与する可能性があると考えられる。

2 . 研究の目的

近年、診断法や治療法の進歩により消化器癌の治療成績は着実に向上してきたが、いまだ消化器癌が死因の上位を占める。この死亡率の増加を抑制するには新たな治療戦略の確立、新規バイオマーカーの探索が重要である。本研究ではユニークなトリプシン・インヒビターである Serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) に注目した。以前申請者らは、SPINK1 が EGFR のリガンドとして働き、主に Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して癌細胞株の増殖を促進させることを報告した (Mol Cancer Res. 2009)。本研究では、消化器癌、特に胃癌と SPINK1 との関係の解明、及びそれをターゲットとした治療戦略の開発を目標とす

る。

3 . 研究の方法

正常胃粘膜における SPINK1 の機能を詳細に解析するために、Spink3-/-X^{CAG-SP1/+} 遺伝子改変マウスを用いて、生体内での SPINK1 の発現意義を明らかにする。

消化器癌発癌における SPINK1 の機能を解析するために、遺伝子改変マウスを用いて発癌実験を行い、生体内での SPINK1 の制御機構を明らかにする。

4 . 研究成果

SPINK1 のマウスホモログである Spink3 欠損マウスはすでに樹立している。このマウスは生後 2 週間以内に全例死亡するため、われわれは更なる解析を進めるため、このマウスに SPINK1 minigene を cre-lox システムを用いてのノックインに成功し、膵臓でのみ SPINK1 が発現するコンディショナル KO マウス 4 ラインを新たに樹立した。

8 週齢においての表現型を解析すると、膵臓において SPINK1 の発現と Spink3 が null の状態を維持していることを確認した。胃・小腸・大腸・精囊・腎でも Spink3 が null の状態を確認できた。

膵で SPINK1 が発現すると Spink3 が null の状態でも生存可能であり、交配・継代も可能であることが確認できた。

他臓器でも確認を行ったが、外的刺激を与えない生理的な状態では、胃・大腸に明らかな炎症や腫瘍等の発症は認められなかった。正常胃粘膜における SPINK1 の機能を詳細に解析するために、Spink3-/-X^{CAG-SP1/+} 遺伝子改変マウスに取り組んだが、残念ながら樹立には成功しなかった。更なる解析が必要である。

SPINK1 は胃粘膜細胞に発現し、胃粘膜の保護および潰瘍部位の創傷治癒促進に働いていた。免疫染色により各種の染色を行ったところ、胃においては陰窩に特に強く発現を確

認され、幹細胞の性質を持つ細胞に発現している可能性を示唆させた。胃癌においては高分化型に特に強く発現しており、未分化な癌に関してはほとんど発現を認めなかった。

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 4 件)

Ida S, Ozaki N, Araki K, Hirashima K, Zaito Y, Taki K, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Oki E, Morita M, Watanabe M, Maehara Y, Yamamura K, Baba H, Ohmuraya M. SPINK1 Status in Colorectal Cancer, Impact on Proliferation, and Role in Colitis-Associated Cancer. *Mol Cancer Res*. 2015;13(7):1130-8. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0581.

Iwatsuki M, Tanaka H, Shimizu K, Ogawa K, Yamamura K, Ozaki N, Sugiyama S, Ogata K, Doi K, Baba H, Takamori H. Simultaneous total laparoscopic curative resection for synchronous gastric, cecal and rectal cancer: Report of a case. *Int J Surg Case Rep*. 2015;6C:129-32. doi: 10.1016/j.ijscr.2014.11.065.

Ozaki N, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Takamori H, Baba H. Definitive diagnosis of a duplicate gallbladder can only be made intraoperatively: report of a case. *Clin J Gastroenterol*. 2014;7(4):338-41. doi: 10.1007/s12328-014-0494-2.

Iwatsuki M, Takamori H, Eto K, Shimizu K, Ogawa K, Yamamura K, Ozaki N, Tanaka H, Sugiyama S, Ogata K, Doi K, Kamio T, Baba H. Repeated recurrence of a gastric gastrointestinal stromal tumor on the chest wall after initial curative resection: Report of a case. *Int J Surg Case Rep*. 2015;6C:36-9. doi: 10.1016/j.ijscr.2014.11.033.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 宣之 (OZAKI, Nobuyuki)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：40551255

(2)研究分担者

橋本 大輔 (HASHIMOTO, Daisuke)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80508507

石本 崇胤 (ISHIMOTO, Takatsugu)
熊本大学・国際先端医学研究拠点・
客員准教授
研究者番号：00594889

大村谷 昌樹 (Ohmuraya, Masaki)
熊本大学・生命資源開発センター・准教授
研究者番号：60398229

渡邊 雅之 (WATANABE, Masayuki)
公益財団法人がん研究会・がん研有明病院・
食道担当部長
研究者番号：80254639