

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860166

研究課題名(和文) 表皮における細胞膜結合型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 maintaining keratinocyte morphology

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：表皮におけるHepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1)の意義を明らかにするため、HAI-1ノックアウトマウス及びHAI-1発現を抑制したHaCaT細胞を用いて解析を行ったところ、HAI-1発現が欠損あるいは低下した表皮細胞ではデスモソームの数は減少し、トノフィラメント収束不全も生じた。これらの異常は、HAI-1の標的酵素であるmatriptaseの活性亢進によるProtease-activated receptor-2 (PAR-2) を介したp38活性化が原因であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To obtain a better understanding of the role of HAI-1 in maintaining epidermal integrity, we performed ultrastructural analysis of Hai-1-deficient mouse epidermis and organotypic culture of an HAI-1 knockdown (KD) human keratinocyte cell line, HaCaT. We found that the aggregation of tonofilaments to desmosomes was significantly reduced in Hai-1-deficient mouse with decreased desmosome number. Similar findings were observed in HAI-1 KD HaCaT organotypic cultures. Immunohistochemical analyses demonstrated that p38 was activated in Hai-1-deficient keratinocytes. Silencing of protease-activated receptor-2 (PAR-2) abrogated the activation of p38 in HAI-1 KD HaCaT cells. Furthermore, treatment of HAI-1 KD HaCaT cells by p38 inhibitor abrogated the morphological abnormalities in the organotypic culture. These results suggest that HAI-1 have a critical role in maintaining normal keratinocyte morphology through regulation of PAR-2-dependent p38 MAP kinase signaling.

研究分野：実験病理学、分子生物学

キーワード：表皮 セリンプロテアーゼ セリンプロテアーゼインヒビター p38MAPK PAR-2

1. 研究開始当初の背景

Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) は細胞膜結合ユニット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、TMPRSS13、TMPRSS4 および prostasin が報告されている。HAI-1 はこれらの酵素の活性調節を介して、上皮細胞機能維持における一定の役割を有すると考えられる。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 マウスの作製と表現型の解析を行ったところ、HAI-1 KO マウスが、先天性魚鱗癬様の表皮角化異常、バリア機能低下、毛小皮形成不全を示すことが明らかとなった。HAI-1 KO マウス表皮にみられた異常は、HAI-1 の標的酵素である matriptase の低発現マウスと HAI-1 KO マウスの交配で回避されることが報告され、HAI-1 欠失による matriptase の活性制御破綻が上皮組織で様々な病態を引き起こすことが考えられる。しかし、matriptase の活性制御破綻が実際にどのようなメカニズムで表皮に異常をもたらすのか、他の分子の関与はあるのか、その詳細は明らかになっていない。表皮においては、matriptase は同じく HAI-1 の標的酵素である prostasin を活性化することも報告されている。Matriptase と prostasin はいずれも Protease - activated receptor -2 (PAR-2) 活性化酵素であり、近年、prostasin 過剰発現マウスでみられる表皮異常が、PAR-2 を同時に KO することで回避できることが報告された。これらのことから、表皮において、prostasin の至適酵素活性が、皮膚恒常性維持に必須であること、また matriptase 活性制御破綻による HAI-1 KO マウスの皮膚異常は、prostasin 活性異常、PAR-2 活性化を介している可能性が示唆される。そこで、本研究では、HAI-1 の表皮における生理的及び病態生理学的意義について、HAI-1 の酵素活性制御と病態との関連に着目し、解析を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HAI-1 ノックアウト (KO) マウスの皮膚にみられる表現型を解析し、表皮における HAI-1 の生理的及び病態生理学的意義を明らかにすることである。具体的には以下の 3 項目である。

(1) 野生型マウスと KO マウスの皮膚組織及び培養ケラチノサイトを超微形態学的及び免疫組織化学的に解析し、KO マウスの表皮細胞の形態異常を詳細に解析する。

(2) 初代培養したケラチノサイト、不死化したヒト由来ケラチノサイトを用いて、matriptase や prostasin など HAI-1 の標的酵素や PAR-2 の発現を si-RNA を用いて抑制し、細胞内のシグナル伝達や細胞の形態を解析し、表皮異常との関連を検討する。

(3) 野生型マウスと KO マウスの皮膚組織及び初代培養ケラチノサイトから抽出した 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連すると考えられる遺伝子、蛋白質を絞り込み、その分子が表皮異常に関与しているか検討する。

3. 研究の方法

(1) HAI-1 KO マウス皮膚組織の超微形態学的及び免疫組織化学的解析

皮膚組織の超微形態学的解析

生後 7 日、14 日の野生型マウスと KO マウスの皮膚組織を用いて各週齢における KO マウスの表皮細胞の形態異常を透過電子顕微鏡を用いて超微形態学的に詳細に解析した。

培養ケラチノサイトの免疫組織化学的解析

HAI-1 遺伝子の発現を抑制したヒト由来の不死化ケラチノサイト細胞株 HaCaT を用いて 3 次元培養を行い、細胞の形態を超微形態学的に解析した。また、ケラチノサイトの分化を免疫組織化学的に検討した。さらに、標的酵素の si-RNA を用いた発現抑制や各種シグナル伝達阻害剤、プロテアーゼインヒビターなどを添加し、同様の検討を行い、HAI-1 KO マウスの形態異常に関連する分子を探索した。

(2) 表皮における HAI-1 標的酵素活性の検討

野生型マウスと KO マウスから樹立した培養ケラチノサイトの培養上清中の酵素活性を合成基質を用いて測定した。活性を持つ酵素を特定するために、使用する合成基質に対する加水分解活性を持つ酵素の発現を順に si-RNA で抑制し、活性が低下するものを探索した。さらにザイモグラフィ法を用いて培養上清中の酵素活性を検討した。また、HaCaT 細胞の HAI-1 発現を抑制し、同様の酵素活性測定を行い、表皮における HAI-1 の発現と酵素活性との関連を解析した。

(3) 表皮において HAI-1 と相互作用する新規分子の探索

表皮において HAI-1 と相互作用する新規分子を探索するため、不死化ケラチノサイト細胞株 HaCaT から抽出した蛋白を抗 HAI-1 抗体を用いて免疫沈降し、HAI-1 と共沈する蛋白を質量分析装置を用いて同定した。

4. 研究成果

(1) HAI-1KO マウス表皮及び3次元培養したヒト不死化表皮細胞株 HaCaT を用いて超微形態学的解析を行ったところ、HAI-1KO マウスでは表皮細胞デスモソームの数は減少し、トノフィラメント収束不全も生じた(図1)。この異常はHAI-1発現抑制(HAI-1 KD) HaCaT 細胞においてもみられた(図2)。また、3次元培養において、ケラチノサイト分化マーカーによる検討から、コントロール HaCaT 細胞では、表皮の構造が保たれているものの、HAI-1発現抑制 HaCaT 細胞では、表皮細胞の極性に異常を来していることが明らかになった。

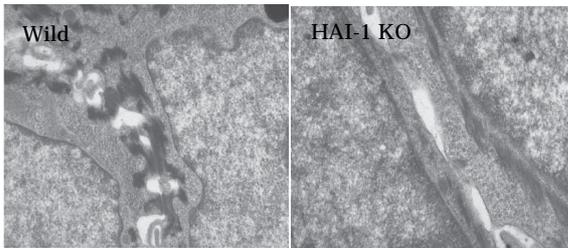


図1. HAI-1 KO マウス及び野生型マウスの表皮透過電子顕微鏡像

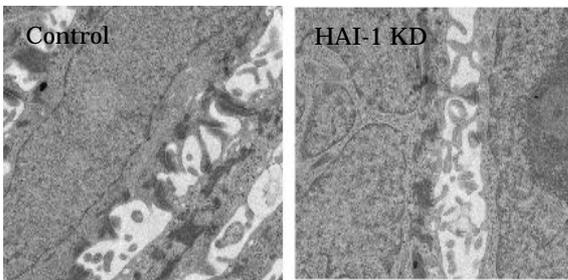


図2. 3次元培養 HaCaT 細胞の透過電子顕微鏡像

(2) (1)でみられた HAI-1 発現低下に伴う表皮の形態異常のメカニズムを明らかにするため、HAI-1 KO マウスの表皮及び HAI-1 KD HaCaT 細胞の p38MAPK の活性化について検討を行ったところ、いずれもコントロールと比較して、p38MAPK の活性化がみられた(図3)。そこで、HaCaT 細胞の3次元培養液に p38MAPK 阻害剤を添加したところ、形態異常が回避され、デスモソームの数もコントロールと同程度に回復した。

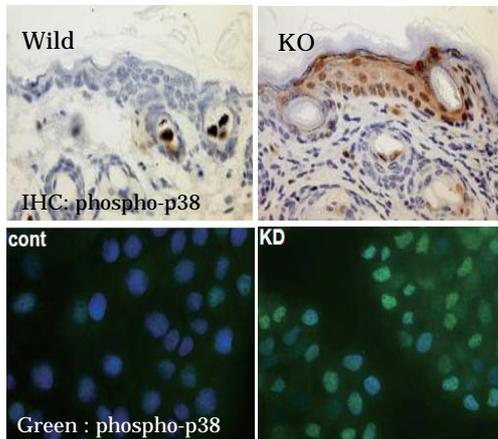


図3. HAI 発現低下による p38MAPK 活性化

(3) 次に、HAI-1 発現低下によって p38MAPK が活性化するメカニズムについて検討を行った。HAI-1 標的酵素である matriptase や prostasin は PAR-2 活性化酵素でもあることから、p38MAPK 活性化は PAR-2 活性化が関与しているのではないかと考え解析を行ったところ、PAR-2 アゴニスト添加によって p38MAPK 活性化は亢進し、PAR-2 アンタゴニストあるいは PAR-2 中和抗体を添加することによって p38MAPK 活性化は抑制された(図4)。

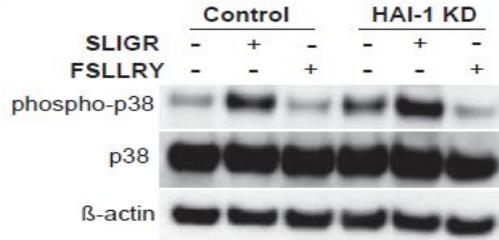


図4. PAR-2 による p38 活性化
(SLIGR: PAR-2 アゴニスト FSLLRV: PAR-2 アンタゴニスト)

(4) HAI-1 KO ケラチノサイト及び HAI-1 KD HaCaT 細胞の培養上清を用いてプロテアーゼ活性を測定したところ、いずれも matriptase の活性が亢進していることが明らかになった。さらに HAI-1 KD HaCaT 細胞の matriptase、prostasin、PAR-2 の遺伝子発現を抑制したところ、いずれの場合も p38MAPK の活性化が抑制された(図5)。さらに、HaCaT 細胞の3次元培養液に活性化型 matriptase あるいは PAR-2 アゴニストを添加すると、HAI-1 KD 細胞と同様の形態異常、デスモソームの数の減少がみられ、HAI-1 KD HaCaT 細胞の3次元培養液に PAR-2 アンタゴニストあるいはセリンプロテアーゼインヒビターを添加すると、形態異常は回避され、デスモソームの数もコントロールと同程度に回復した。

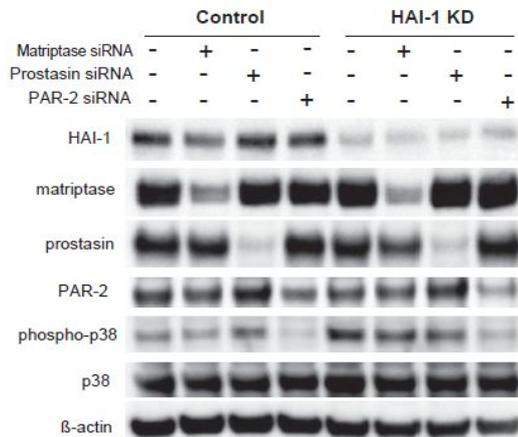


図5. PAR-2 抑制による p38 活性化抑制

以上の結果から、HAI-1 発現低下による matriptase の活性調節異常が、PAR-2 を介した p38 活性化をもたらし、表皮の異常をもたらすことが明らかになった。

(5) 表皮において HAI-1 と相互作用する新規分子を探索するため、HaCaT 細胞から抽出した蛋白を抗 HAI-1 抗体を用いて免疫沈降し、HAI-1 と共沈する蛋白を質量分析によっていくつか同定した。同定された蛋白の表皮における意義についてはまだ不明であり、今後解析をすすめていく予定である。

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 2 件)

1. Kawaguchi M, Kataoka H. Mechanisms of Hepatocyte Growth Factor Activation in Cancer Tissues. *Cancers (Basel)*. 6:1890-1904 (2014) 査読あり
2. Ye J, Kawaguchi M, Haruyama Y, Kanemaru A, Fukushima T, Yamamoto K, Lin CY, Kataoka H. Loss of HAI-1 participates in metastatic spreading of human pancreatic cancer cells in a mouse orthotopic transplantation model. *Cancer Sci*. 105:44-51 (2014) 査読あり

[学会発表](計 16 件、うち 12 件を記載)

1. Kawaguchi M, Kanemaru A, Fukushima T, and Kataoka H. Roles of HAI-1, a membrane-anchored serine protease inhibitor, in maintaining keratinocyte morphology. 第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 (神奈川県横浜市)
2. Kawaguchi M, Haruyama Y, Umezawa K, Fukushima T, Kataoka H: Antitumor effect of DHMEQ, a small molecule inhibitor of nuclear factor- κ B, on Hai-1-deficient ApcMin+ mice. 第 73 回 日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 27 日 (神奈川県横浜市)
3. 川口真紀子, 金丸愛, 梅澤一夫, 片岡寛章: 低分子 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は HAI-1 欠損による腸管発癌亢進を抑制する. 第 19 回 日本病態プロテアーゼ学会 2014 年 8 月 8 日 (大阪府豊中市)
4. 川口真紀子, 金丸愛, 山本晃士, 福島剛, 片岡寛章: HGF activator inhibitor-1 (HAI-1) による表皮細胞 PAR-2 活性化制御の意義. 第 33 回 分子病理学研究会 2014 年 7 月 25 日 (宮城県刈田郡)
5. 片岡寛章, 川口真紀子, 金丸愛, 福島剛: HAI-1 はマトリプテースによる PAR2 活性化制御を介してケラチノサイトの細胞間接着維持に働く. 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日 (広島県広島市)
6. Haruyama Y, Ye J-J, Kawaguchi M,

Kanemaru A, Fukushima T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) suppresses invasion of pancreatic adenocarcinoma cells through inhibition of matriptase/protease-activated receptor-2 axis. AACR Annual Meeting 2014 年, 4 月 5-9 日 (San Diego, CA, USA)

7. Kawaguchi M, Fukushima T, Kanemaru A, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 suppresses tumor invasiveness of lung adenocarcinoma HLC-1 cells through regulation of thrombospondin-1 expression. 第 36 回 日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日 (兵庫県神戸市)

8. Kawaguchi M, Hoshiko S, Haruyama Y, Fukushima T, and Kataoka H. Suppressing roles of membrane-bound serine protease inhibitor, HAI-1, in colorectal carcinogenesis. 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日 (神奈川県横浜市)

9. Kawaguchi M, Takeda N, Kanemaru A, Sawaguchi A, Fukushima T, Kataoka H: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for maintaining keratinocyte morphology through regulation of PAR-2-dependent p38 MAP kinase signaling. ASBMB Special Symposia Series; Membrane-Anchored Serine Proteases, 2013 年 9 月 20 日 (Potomac, MD, USA)

10. Kataoka H, Kawaguchi M: Roles for HAI-1, a cell surface inhibitor of membrane-anchored serine proteases, in epithelial integrity and cancer progression. ASBMB Special Symposia Series; Membrane-Anchored Serine Proteases, 2013 年 9 月 20 日 (Potomac, MD, USA)

11. 川口真紀子, 金丸愛, 山本晃士, 片岡寛章: 表皮ケラチノサイトにおける細胞膜結合型セリンプロテアーゼ活性制御の意義. 第 18 回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2013 年 8 月 16 日 (大阪府豊中市)

12. 川口真紀子, 星子新理, 金丸愛, 梅澤一夫, 片岡寛章: 腸管発癌における Hepatocyte growth factor activator inhibitor type1 (HAI-1) の意義. 第 10 回 日本病理学会カンファレンス 2013 年 8 月 2 日 (兵庫県神戸市)

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