

胃粘膜防御に果たすカルパインの役割

Physiological importance of calpains in gastric mucosal defense.

秦 勝志、反町洋之

(財)東京都医学総合研究所・カルパインプロジェクト

Shoji Hata and Hiroyuki Sorimachi

Calpain Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

## Abstract

The continuous and/or improper ingestion of irritants, including alcohol, NSAIDs, and *Helicobacter pylori*, often leads to serious gastropathies, affecting a wide range of people. A complex gastric defense system works to protect against these threats, for example by secreting mucus. Recently, by analysis of gene targeting mice for two gastrointestinal-tract-specific calpains, calpain-8 and calpain-9, we have demonstrated that they are cooperatively involved in the mucosal defense against stress-induced gastropathies. Calpains-8 and -9 are members of Ca<sup>2+</sup>-dependent intracellular proteases comprising a superfamily in almost all eukaryotes, and form a functional complex, "G-calpain", expressed specifically in the mucus-producing cells. In this review, we show our recent results on calpains-8 and -9, and discuss gastric mucosal defense mechanisms involving them.

Key words: calpain, gastric mucosal defense, gastropathy

はじめに

胃粘膜は、強酸性環境の上に絶えず外界からの傷害因子に曝される過酷な条件にあるが、こうした外的ストレスに対して様々な粘膜防御因子がバランス良く機能することで、恒常性を維持している。しかしアルコールやNSAIDsの持続的または不適切な摂取などは時にこのバランスの破綻を引き起こし、潰瘍性疾患の要因となる。胃粘膜表層に存在する表層粘液細胞は、最前線の粘膜バリアーであるムチン粘液層形成などで粘膜防御に大きな役割を果たすが、筆者らは、細胞内プロテアーゼであるカルパイン8とカルパイン9が胃において表層粘液細胞特異的に発現し、機能複合体として胃粘膜防御に機能することを見出した。本稿ではこれら知見を紹介するとともに、カルパインが胃粘膜防御にどう関与するのか、また、潰瘍性胃疾患の予防・治療のターゲットとしてのカルパインの可能性について考察する。

## 1. カルパインとは

カルパイン(calpain)とは  $\text{Ca}^{2+}$ 要求性の細胞内システインプロテアーゼであり、基質の限定分解により様々な細胞機能を調節するモジュレーターである<sup>1),2),3),4)</sup>。ほぼ全ての真核生物と一部の細菌で広くファミリーを形成し、ヒトには15の遺伝子から組織普遍的または特異的に発現するカルパインが存在する(図1)。前者で最も量の多いものは $\mu$ -及び $m$ -カルパインであり、どちらも活性サブユニット(~80 kDa)と制御サブユニット(~30 kDa)からなるヘテロ二量体である。活性サブユニットは、N末端の調節ドメイン(I)及び $\text{Ca}^{2+}$ 結合能を有する3つのドメイン(プロテアーゼドメイン(IIa及びIIb)、リン脂質とも相互作用するC2様ドメイン(III)、5つのEF-ハンドモチーフを持つPEFドメイン(IV))で構成される。後述するカルパイン8と9も同様のドメイン構造を持つが、発現は組織特異的である。また、他のカルパインにはC2様またはPEFドメインが重複・置換した分子種も存在する(図1)。

一般にプロテアーゼによる基質の切断は不可逆的であるためその活性は適切に制御されている。細胞質に存在するカルパインの場合、さらに厳密なセイフティー機構を有しており、通常はプロテアーゼドメインが構造的に開裂しており不活性状態で存在し、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合サイトへの $\text{Ca}^{2+}$ 結合により構造変化を起こして活性中心を形成して活性化する。活性化したカルパインは内在性カルパイン阻害タンパク質であるカルパスタチンによる制御を受ける。カルパインの生理的基質や生理機能の詳細は不明な点が多いが、病態生理学や遺伝学により、発生異常を含む様々な病態にカルパイン活性制御不全の関与

が示されており、特異的阻害剤の開発など治療・診断面のターゲットとして注目されている。

## 2. 胃粘膜防御に働くカルパイン

### a. カルパイン 8 とカルパイン 9

ヒトカルパイン 8 と 9 はどちらも 1 番染色体にコードされ<sup>5)</sup>、アミノ酸レベルで約 50% の相同性を示し<sup>6)</sup>、既述のように 4 ドメインで構成される(図 1)。発現組織分布は胃腸特異的であり、胃粘膜上皮の表層粘液細胞と腸粘膜上皮の杯細胞に局在する(図 2A)。これまでに、カルパイン 8 の細胞内輸送制御への関与<sup>7)</sup>、カルパイン 9 の胃ガン及び胃ガン由来細胞株での発現低下とガン抑制への関与<sup>8),9)</sup>が示唆されている。また、リコンビナント精製標品では異なる酵素学的性質を示し<sup>10),11)</sup>、カルパイン 8 と 9 は同一の細胞で互いに異なる制御のもと特有の機能を果たすと考えられたが、両者の生理機能や病態への関与は明確になっていなかった。

### b. カルパイン 8 と 9 の複合体 G-カルパイン形成

カルパイン 8 と 9 が同一の細胞に発現する一つの理由は両者による複合体形成にあった。筆者らは、カルパイン 8 と 9 の生理機能解明を目的としてカルパイン 8 と 9 それぞれの遺伝子ノックアウトマウス(*Capn8*<sup>-/-</sup>及び*Capn9*<sup>-/-</sup>)の解析を行った。*Capn8*<sup>-/-</sup>と*Capn9*<sup>-/-</sup>共に外見上異常は見られず、週齢に関わらず胃腸に粘膜肥厚や腫瘍形成は認められなかった。ところがウエスタン解析と組織染色を行うと、*Capn8*<sup>-/-</sup>ではカルパイン 9 が、*Capn9*<sup>-/-</sup>ではカルパイン 8 の発現低下を伴うことが示された(図 2B)。RT-PCR 解析によりこれが転写レベルではなく、タンパク質レベルの現象であることが判明した。野生型マウスの胃粘膜抽出液からはカルパイン 8 とカルパイン 9 が共免疫沈降し(図 2C)、さらにゲルろ過解析では両者が約 180 kDa 付近に溶出したことから、カルパイン 8 と 9 による複合体形成が明らかとなり、筆者らはこれを G-カルパイン(G: Gastric)と命名した<sup>12)</sup>。胃粘膜抽出液にCa<sup>2+</sup>を添加すると野生型マウスではカルパイン 8 と 9 共に活性化による自己分解を起こすが、*Capn8*<sup>-/-</sup>では残存するカルパイン 9 も失活していたことから(図 2D)、複合体 G-カルパイン形成はカルパイン 8 と 9 がプロテアーゼとして安定に機能するため不可欠であった。

### c. *Capn8*<sup>-/-</sup>と*Capn9*<sup>-/-</sup>では胃粘膜損傷が増悪しやすい

上述の通り、*Capn8*<sup>-/-</sup>と*Capn9*<sup>-/-</sup>は共に一見正常であるが、胃機能への影響を検討するため、アルコールによる胃粘膜損傷形成の比較解析を行った。絶食させた各マウスに40%アルコール溶液を経口投与し4時間後に胃の粘膜損傷を観察すると、*Capn8*<sup>-/-</sup>と*Capn9*<sup>-/-</sup>は共に野生型マウスに比べて有意に損傷スコアの上昇を示した(図3A)。この現象とカルパイン活性との関係を解析するため、カルパイン8の活性のみを欠損させたノックインマウス(*Capn8*<sup>CS/CS</sup>)も作出した。このマウスでは、野生型カルパイン8の代わりに同量の不活性型(C105S変異)が発現し、ノックアウトマウスと同様に通常条件では生育に異常はなく胃腸の病変も観察されない。そして、複合体G-カルパインも形成されていたが、アルコール投与によりやはり有意に粘膜損傷スコアが上昇した(図3A)。以上から、カルパイン8とカルパイン9は複合体G-カルパインとして胃粘膜防御に機能し、少なくともカルパイン8のプロテアーゼ活性は必要であることが明らかになった。

胃粘膜は上皮細胞だけでなく血流、神経伝達、免疫系などが複雑に制御し合うことで保護されるが<sup>13)</sup>、筆者らはカルパイン8と9が発現する表層粘液細胞の機能に着目して上記遺伝子改変マウスが示す表現型のメカニズム解析を進めている。表層粘液細胞は粘液や重炭酸分泌を主機能とし、短いスパンで絶えず粘膜表層への細胞移動と細胞死をバランス良く行うことで粘膜保護に働く<sup>14)</sup>。アルコール投与前と投与1時間後での細胞当たりの粘液顆粒数を比較したが、野生型マウス、*Capn8*<sup>-/-</sup>、*Capn9*<sup>-/-</sup>の間に有意な差はなかった(図3B)。アルコール投与後の挙動はさらに検討が必要だが、*Capn8*<sup>-/-</sup>と*Capn9*<sup>-/-</sup>の通常条件における粘液産生能に異常はないことが明らかになった。現在、*Capn8*<sup>-/-</sup>と*Capn9*<sup>-/-</sup>の表層粘液細胞のターンオーバーについて検討を行っている(「おわりに」参照)。

#### d. カルパイン8と9の多型と胃疾患発症リスクとの関係について

表1に、ヒトカルパイン8及び9の各遺伝子で報告されているアミノ酸置換を伴う一塩基多型(SNP)を示した。この中には、ナンセンス変異(カルパイン8:Q386stop)やカルパインファミリーで高く保存されたアミノ酸残基の変異(カルパイン9:A102V, R277W)が含まれており、カルパイン8や9の機能に影響が及ぶことが考えられた。筆者らはこれらのSNPについて*in vitro*でプロテアーゼ活性を調べたところ、上記のアミノ酸残基を含めた数種で活性の減弱・消失を認めた。カルパイン9:R277は、肢体型筋ジストロフィー2A型の責任遺伝子産物であるカルパイン3の病因性変異が生じる箇所にも相当する。すなわち、カルパイン8または9遺伝子に特定のSNPを有するヒトでは、G-カル

パインの機能不全によってアルコールなどの外的ストレスに対する胃粘膜の抵抗性が低下しており、症状の慢性化・重篤化のリスクが高まる可能性が示唆された。

おわりに

以上、最近初めて明らかになった胃粘膜防御へのカルパインの関与について述べた。メカニズム解明には至っていないが、近年、NSAIDs (indomethacin または NS-398) 処理した IEC-6 (Intestinal Epithelial cell) 株におけるカルパイン 8 発現低下と細胞移動抑制<sup>15)</sup> や NSAIDs 処理細胞におけるカルパイン活性阻害<sup>16)</sup> が報告された。そして *Capn8*<sup>-/-</sup>、*Capn9*<sup>-/-</sup>、*Capn8*<sup>CS/CS</sup> が示す表現型から、様々なストレス因子によって一旦損傷した胃粘膜の修復に向け、カルパイン 8/9 複合体 G-カルパインが細胞移動の制御を通じて表層粘液細胞を損傷箇所に補充する役割を果たす可能性が考えられる。カルパイン 8 と 9 遺伝子 SNPs と胃疾患症例の相関と共に粘膜損傷メカニズムが明確になれば、潰瘍性疾患の新しい診断・予防への応用に繋がると期待される。

ここで紹介したデータは、(財)東京都医学総合研究所カルパインプロジェクトの方々のご協力と、新潟大学脳研究所の崎村建司博士と阿部学博士、(財)東京都医学総合研究所の鈴木英紀博士、国立国際医療研究センター研究所の反町典子博士、東京大学大学院農学生命科学研究科の阿部啓子博士との共同研究によるものである。この場をお借りして深謝したい。

(文献)

- 1) Goll, D. E. et al: The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731-801, 2003.
- 2) Suzuki, K. et al: Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 53: S12-18, 2004.
- 3) Sorimachi, H. et al: Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp Anim* 59: 549-566, 2010.
- 4) 秦勝志, 反町洋之: 「モジュレータープロテアーゼ」カルパインと細胞内膜系との新しい展開. *生化学* 79: 46-50, 2007.
- 5) Hata, S. et al: Both the conserved and the unique gene structure of stomach-specific calpains reveal processes of calpain gene evolution. *J Mol Evol* 53: 191-203, 2001.
- 6) Sorimachi, H. et al: A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J. Biol. Chem.* 268: 19476-19482, 1993.
- 7) Hata, S. et al: Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the b-subunit of coatamer complex,  $\beta$ -COP. *J. Biol. Chem.* 281: 11214-11224, 2006.
- 8) Liu, K. et al: Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J Biol Chem* 275: 31093-31098, 2000.
- 9) Yoshikawa, Y. et al: Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 91: 459-463, 2000.
- 10) Hata, S. et al: Stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit and oligomerizes through C2-like domains. *J Biol Chem* 282: 27847-27856, 2007.
- 11) Lee, H. J. et al: Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol. Chem.* 379: 175-183, 1998.
- 12) Hata, S. et al: Calpain 8/nCL-2 and calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense. *PLoS Genet* 6: e1001040, 2010.
- 13) Wallace, J. L., Granger, D. N.: The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb J* 10: 731-740, 1996.
- 14) Karam, S. M.: Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 4: D286-298, 1999.
- 15) Raveendran, N. N. et al: Drug-induced alterations to gene and protein expression in intestinal epithelial cell 6 cells suggest a role for calpains in the gastrointestinal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory agents. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 389-399, 2008.
- 16) Silver, K. et al: Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit calpain activity and membrane localization of calpain 2 protease. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 2030-2036, 2010.

(図表原稿)

図1 哺乳類カルパインファミリー模式図

$\mu$ -及び  $m$ -カルパインは各々、カルパイン 1+S1、カルパイン 2+S2 のヘテロ二量体である。括弧内は発現組織を示す。ドメインについては本文を参照。

図2 カルパイン 8/9 複合体 G-カルパインの形成

(A)マウス胃の免疫組織染色像。

(B)野生型マウス、 $Capn8^{-/-}$ 、 $Capn9^{-/-}$ 胃サンプルのウエスタン解析と免疫組織染色像。

(C)野生型マウス胃サンプルを用いた免疫沈降解析。レーン 1,4 は input、レーン 2 は抗カルパイン 8 抗体による免疫沈降サンプル、レーン 5 は抗カルパイン 9 抗体による免疫沈降サンプル、レーン 3,6 は陰性コントロール。

(D)野生型マウスと  $Capn8^{-/-}$ 胃サンプルを用いた *in vitro* カルパイン活性化検討実験。野生型では  $Ca^{2+}$  添加によりカルパイン 8 及び 9 両方のバンドの消失(自己分解)が見られるが、 $Capn8^{-/-}$ で残存するカルパイン 9 はその活性を示さない。

図3 カルパイン 8 及び 9 の遺伝子改変マウスはアルコールによる胃粘膜損傷が増悪する

(A) $Capn8^{-/-}$ 、 $Capn9^{-/-}$ 、 $Capn8^{CS/CS}$  へのアルコール投与による胃粘膜損傷の効果。粘膜損傷による出血痕の長さから損傷スコアを 5 段階で評価した。スコア 0:損傷無し、スコア 1:点状病変、スコア 2:長さ 2mm 未満、スコア 3:長さ 2-4mm、スコア 4:長さ 4mm 以上。

(B) $Capn8^{-/-}$ 、 $Capn9^{-/-}$ のアルコール投与前後における粘液顆粒数の比較。

表1 ヒトカルパイン 8 と 9 で報告されている SNPs とそれぞれのプロテアーゼ活性

表1

	SNP	活性
カルパイン8	Wild type	+++
	V44G	N.D.
	A136V	+++
	S245Y	+++
	Q386stop	-
	T592M	N.D.
	E684K	N.D.
カルパイン9	Wild type	+++
	F48S	N.D.
	F65S	N.D.
	A102V	-
	S122R	N.D.
	R156S	N.D.
	D164N	+++
	I234T	+++
	A239T	+++
	R277W	-
	K322Q	+++
	H327Q	+++
	E342K	+++
	L416R	N.D.
	R458W	+
	L468R	-
	R522W	N.D.
K553stop	-	
M611I	+++	
K673stop	-	

(N.D: 未解析)

図1

組織普遍的

カルパインS1, S2



カルパイン1, 2, 13, 14



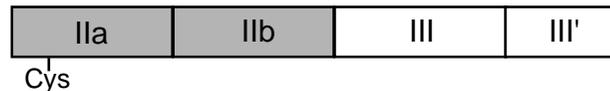
カルパイン5



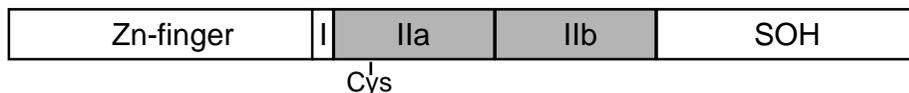
カルパイン7



カルパイン10



カルパイン15



組織特異的

カルパイン3 (骨格筋)



カルパイン6 (胎盤・胎児筋)



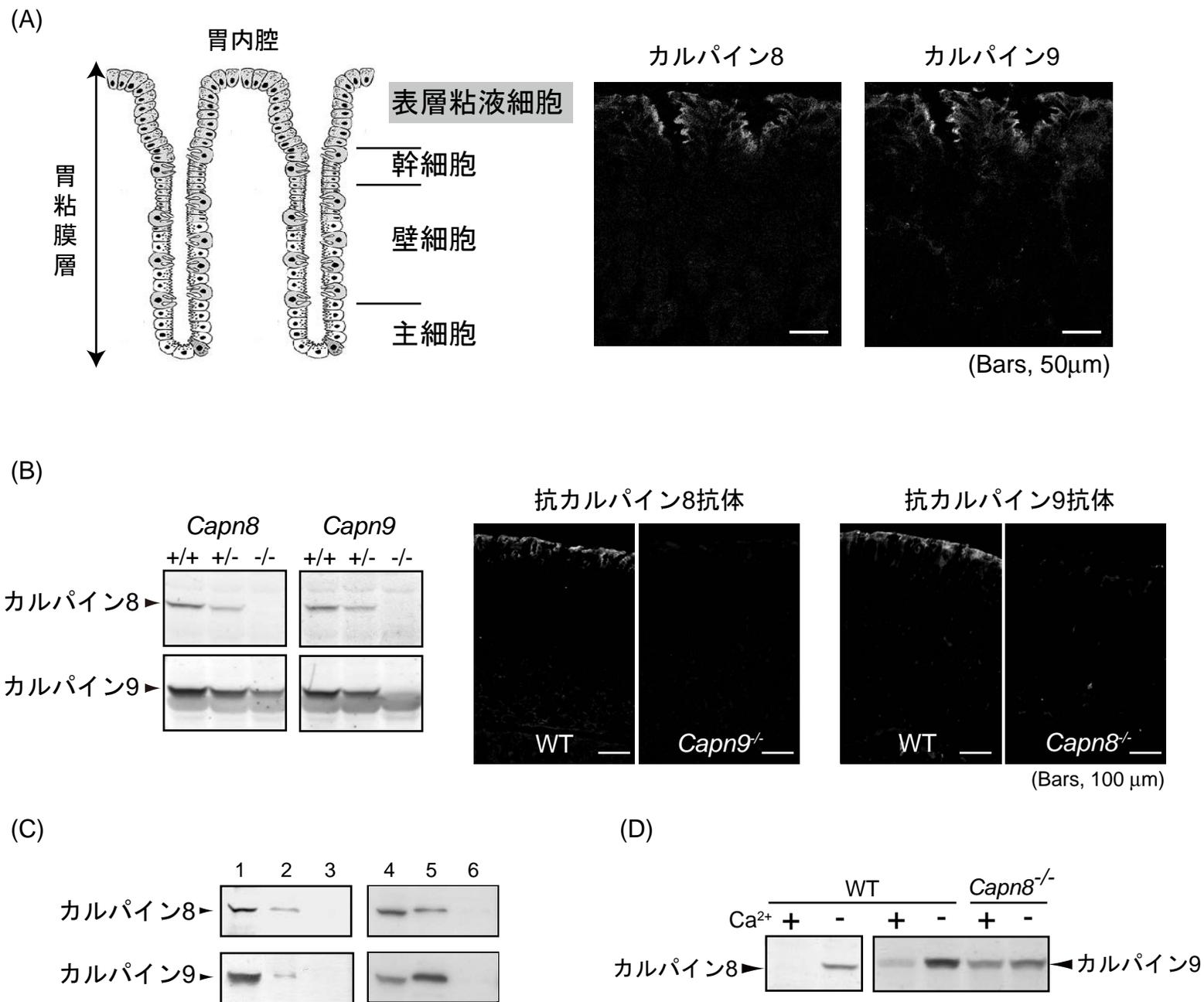
カルパイン8, 9 (胃腸)

カルパイン11 (精巣)

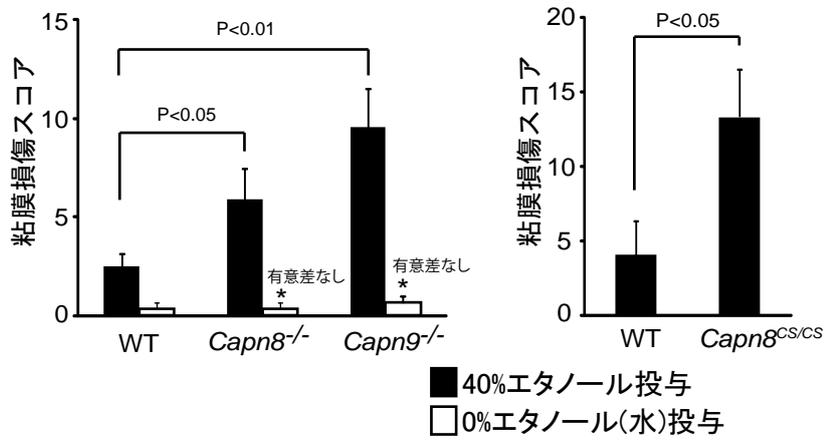
カルパイン12 (毛包)



図2



(A)



(B)

