

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890115

研究課題名（和文）IKK $\beta$ のキナーゼ活性非依存的な役割の解明研究課題名（英文）Exploring the kinase-independent role of IKK $\beta$ 

研究代表者

芦田 昇 (Ashida Noboru)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00538978

研究成果の概要（和文）：炎症機構において重要な働きを担っている IKK $\beta$ のキナーゼ活性非依存的な役割に注目し、その詳細なメカニズムと既存の抗炎症剤による影響を検討した。その結果、IKK $\beta$ が物理的に結合して制御している可能性のある蛋白を質量分析によっていくつか同定し、また動脈硬化や癌に関わるとされている蛋白の発現が抗炎症剤によって制御されていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We have identified several proteins which physically interact with IKK $\beta$  and they are possibly regulated by it in kinase-independent manner. Also we have found some proteins which have been reported to have close connection with atherosclerosis or cancer are regulated by some anti-inflammatory drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：医歯薬学・薬理学一般

キーワード：炎症、循環器

## 1. 研究開始当初の背景

炎症反応は生体において必要不可欠な防御反応である一方、それが各種疾患における原因・増悪因子であるとされており、動脈硬化などの血管病変におけるマクロファージ遊走、急性呼吸窮迫症候群における血管透過性の亢進、心筋梗塞後の虚血再還流障害、心筋炎などにおいてその病態に対する炎症の関与が多く報告されている。このため、医療に於いては炎症は常に抑制の対象として捉えられ、その視点において研究や製薬が指向されてきた。しかし、炎症反応が生体生存にお

ける不可欠な機能である以上、その制御には十分なメカニズムの解明が前提となる。

(1) NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B は転写因子ファミリーの一つであり、TNF $\alpha$ などの炎症惹起物質によってそのシグナル経路が活性化され、IKK $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 複合体のリン酸化、I $\kappa$ Bのリン酸化及び分解を介して最終的にNF $\kappa$ Bが核内に移動することによって転写因子として各種蛋白やサイトカインなどの発現を制御している。このNF $\kappa$ B経路は炎症反応における最も重要な細胞内シグナル伝達とされ、その解明が進んでいるに

もかかわらず、最終的に遊走・増殖などの細胞動態や血管透過性などの生体反応にどのように関与しているのかについては依然として不明な点が多い。

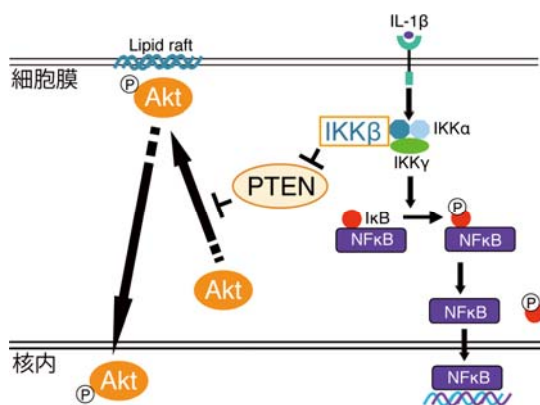
## (2) IKK $\beta$

IKK  $\beta$  は NF  $\kappa$  B のシグナル伝達経路において最も大きな役割を果たしているキナーゼとされている。その証左として、IKK  $\beta$  のノックアウトマウスは胎生到死であるがその原因が NF  $\kappa$  B (p65) のノックアウトと同じ肝細胞の大量アポトーシスであり、その胎児から採取された繊維芽細胞において NF  $\kappa$  B の活性が見られないことなどがあげられる。この IKK  $\beta$  は臨床薬として広く使われているアスピリンがその活性阻害薬であることが示しているように、転写因子そのものである NF  $\kappa$  B よりも治療対象としてアプローチしやすいと考えられていることもあり、多くの研究がこのキナーゼについてなされてきた。

## (3) 血管内皮特異的 IKK $\beta$ ノックアウトマウスでの知見

本申請者はこれまでの研究において、IKK  $\beta$  の血管内皮特異的ノックアウトマウスを製作したところ、そのマウスは低出生率・低体重、胎盤低形成、胎盤内血管低形成、血管透過性亢進、血管内皮細胞遊走能低下などの表現型を示した。ところで 2003 年に同じ血管内皮特異的 Tie2 プロモーターを用い、I  $\kappa$  B が活性化されない mutation を加えることによって NF  $\kappa$  B を抑制したマウスが既に報告されているが、極めて興味深いことに、このマウスは上記のいくつかの表現型の点において本マウスとの大きな相違が認められた。このことは、IKK  $\beta$  がキナーゼとして NF  $\kappa$  B のシグナル経路を活性化する役割と独立した働きを有していることを強く示唆した。そこで NF  $\kappa$  B シグナル以外で同様の表現型を持つ遺伝子改変マウスを検索したところ、Akt のノックアウトマウスが上記表現型すべての点において本マウスと同じ表現型を有していることが注目された。このため本マウスの血管内皮の Akt 活性を検討するために抗リン酸化 Akt 抗体で免疫染色したところその著明な抑制が認められ、また IKK  $\beta$  を欠損した初代培養血管内皮細胞においても Akt リン酸化抑制が認められた。また野生型 IKK  $\beta$  及び Kinase-Dead IKK  $\beta$  の過剰発現がともに Akt リン酸化を亢進させた。次に Akt 活性化過程に於ける Akt の細胞質内から細胞表面 Lipid Raft、核内への移行を免疫染色及び Sucrose Gradient にて検討したところ、IKK  $\beta$  欠損細胞に於いて Akt の Lipid Raft への移行が抑制されることが認められ、それは野生型 IKK

$\beta$  及び Kinase-Dead IKK  $\beta$  の過剰発現によって回復された。また、IKK  $\beta$  欠損細胞に於いて認められた透過性亢進、遊走能低下は野生型及び Kinase-Dead IKK  $\beta$ 、加えて活性型 Akt である myrAkt の過剰発現によって回復された。また、さらなる in vivo での検討として血管内皮特異的 IKK  $\beta$  heterozygous ノックアウトマウスを用いて Hind-Ischemia model を製作したところ、heterozygous ノックアウトマウスにおいて血管新生の著明な抑制が認められ、Akt の関与をさらに強く示唆する結果となった。さらにその Akt 制御のメカニズムを解明すべく Akt 上流の分子を検討したところ、PTEN が IKK  $\beta$  によってキナーゼ活性非依存的に制御されていることが判明した。この研究の一部は 2007 年アメリカ心臓病学会において Louis N. and Arnold M. Katz Basic Science Research Prize 優秀賞 (finalist) を受賞し、2011 年 5 月に論文として発表された (Ashida, N. *et al.* IKK  $\beta$  regulates essential functions of the vascular endothelium through kinase-dependent and -independent pathways. *Nat. Commun.* 2:318 doi: 10.1038/ncomms1317 (2011).)。



## 2. 研究の目的

- (1) IKK  $\beta$  のキナーゼ非依存的役割の機構を検討することによる、上記の Akt/PTEN 制御の詳細なメカニズムの解明およびその他のターゲット分子の同定
- (2) IKK  $\beta$  のキナーゼ活性を抑制するとされている既存の抗炎症薬剤の、IKK  $\beta$  のキナーゼ非依存的役割に及ぼしている影響の検討

## 3. 研究の方法

- (1) IKK  $\beta$  を中心とした Protein-Protein interaction の検討

IKK  $\beta$  が NF  $\kappa$  B シグナルとは独立してキナーゼ活性非依存的に Akt/PTEN を制御していることが見出されたが、そのメカニズムは依然不明な点が多く、また IKK  $\beta$  のキナーゼ非依存的

役割のターゲットが他に存在する可能性もある。一般的に、キナーゼ活性非依存的なシグナル伝達の方法としては物理的

Protein-Protein interaction の関与が考えられるため、各種候補蛋白とIKK $\beta$ との結合を検討することによってその解明を図る。

(2) 各種薬剤や阻害薬によるIKK $\beta$ のキナーゼ非依存的役割への影響

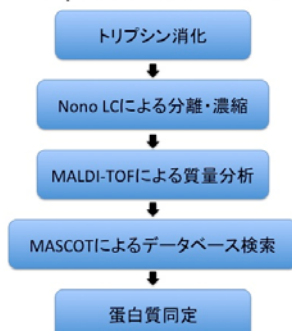
これまで数多くの抗炎症作用を持つとされる薬剤が開発され、IKK $\beta$ の抑制作用があるとされるものも多いが、それはIKK $\beta$ のキナーゼ活性のみが観察されていた。すなわち、キナーゼ活性非依存的なIKK $\beta$ の働きがそれらの薬剤によってどのように変化・制御されているかは検討されていない。これを検討することにより、例えば癌と循環器疾患のように、異なる疾患をターゲットとした異なる抗炎症薬の使用、ひいてはそれに注目した疾患特異的な抗炎症薬の開発が期待される。具体的には、既存の抗炎症作用を有する薬剤やinhibitorがIKK $\beta$ および関連蛋白の発現量や細胞内局在にどのような影響を有しているかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) プロテオミクスによる IKK $\beta$  結合蛋白の同定

キナーゼ非依存的な制御であることより IKK $\beta$  との物理的結合がメカニズムとして最も可能性が高いと考えられたため、Akt をはじめとした関連シグナル分子を検討したが IKK $\beta$  との物理的結合を示す安定した結果は得られなかった。一方、これまで IKK $\beta$ 、Akt との関わりを報告されていない分子が関与している可能性も当然ながら否定できず、IKK $\beta$  とキナーゼ非依存的に結合する蛋白の網羅的解析が必要と思われた。このため、野生型 IKK $\beta$ 、Kinase-active IKK $\beta$ 、Kinase-dead IKK $\beta$  をそれぞれ細胞に過剰発現させ、IKK $\beta$  に結合した蛋白を免疫沈降の後 nanoLC により分離・濃縮→MALDI-TOF/TOF により質量分析→MASCOT データベース検索による蛋白の同定を行った。

#### IKK $\beta$ 結合蛋白の同定



その結果、複数の分子が上記3種の IKK $\beta$  に共通して結合していることが判明し、興味深いことにそのうちのいくつかは癌やAktとの関連を報告されているものであった。また、それらは共免疫沈降、ウェスタンブロットでIKK $\beta$ との結合が確認された。今後、これらについて更に検討を行う。

(2) 代表的な抗炎症薬を高濃度・長期間にわたって細胞培地に添加することによる IKK $\beta$  およびその他のシグナル蛋白の変化を確認したところ、いくつかの抗炎症薬において細胞から培地中に放出される蛋白質がある種のシグナル蛋白を制御していることが見られた。このため、それらの蛋白質を上記の IKK $\beta$  結合蛋白と同様にプロテオミクスにて同定を試みたところ、動脈硬化や癌などの炎症が増悪因子とされる疾患に関連の深い蛋白が複数同定された。これらの蛋白についてはウェスタンブロット、RT-PCR 等にて発現の変化が確認された。今後その臨床的意義も含めてさらに検討を行う。

#### 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1件)

① Noboru Ashida, Sucharita SenBanerjee, Shohta Kodama, Shi Yin Foo, Matthew Coggins, Joel A. Spencer, Parisa Zamiri, Dongxiao Shen, Ling Li, Tracey Sciuto, Ann Dvorak, Robert E. Gerszten, Charles P. Lin, Michael Karin & Anthony Rosenzweig.

IKK $\beta$  regulates essential functions of the vascular endothelium through kinase-dependent and -independent pathways. *Nat. Commun.* 2:318 doi: 10.1038/ncomms1317 (2011). 査読有

(Corresponding Authors: Anthony Rosenzweig and Noboru Ashida)

[学会発表] (計1件)

① Noboru Ashida, Sucharita SenBanerjee, Shohta Kodama, Joel A. Spencer, Parisa Zamiri, Ling Li, Robert E. Gerszten, Charles P. Lin, Michael Karin, Anthony Rosenzweig, Masayuki Yokode. “IKK $\beta$  regulates Akt activation in kinase-independent manner in endothelial cells” 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2009年7月17日 於下関メッセ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦田 昇 (ASHIDA NOBORU)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00538978