

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590105

研究課題名（和文）PKCeta を分子標的とした新規抗炎症治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy for skin inflammatory diseases targeting PKCeta.

研究代表者

大場 基（OHBA MOTOI）

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・講師

研究者番号：70297018

研究成果の概要（和文）：PKC η を分子標的とした新規抗炎症治療法の開発を目標とし、その基礎的実験を行った。特に難治性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎を対象とした。アトピーモデルマウスの病態は、ドミナントネガティブ型 PKC η により PKC η 活性を抑制することで著しく改善された。また PKC η の遺伝子発現を極めて有効に抑制しうる siRNA 配列を見出した。更に、PKC η 活性化の上流シグナルとして、創傷刺激や活性酸素刺激が存在することを見出し、これらの刺激が PKC η を介して、アトピー性皮膚炎等の皮膚炎症性疾患の増悪に関与していることが推定された。

研究成果の概要（英文）：My goal is to develop a novel therapeutic method for severe skin inflammatory diseases including atopic dermatitis(AD) targeting PKC η . Inhibition of PKC η activity by using the dominant negative type of PKC η improved the symptom such as erosion and fissure on the back skin of AD model mice. Moreover, novel siRNA sequences for PKC η , which significantly repress the PKC η gene expression, were found. Furthermore, Stimulus by wound and reactive oxygen species existed as an upstream signal of PKC η , suggesting that these signals enhance AD symptom via the increase of PKC η activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

Protein kinase C eta：PKC η は、上皮組織特異的に発現する PKC として我々が単離した C キナーゼである。近年、PKC η の活性を左右する SNPs が、脳梗塞

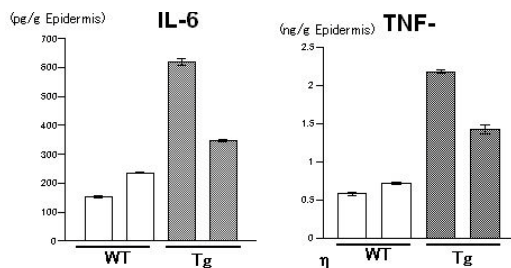
や慢性関節リュウマチの罹患率を数倍上昇させることが報告され（Nature. Genet. 39:212 2007, Atherosclerosis 199:340 2008, J Histo. Cytochem. 55:495 2007）、ヒト疾患における PKC η の重要性が

認識され始めた。

また PKC η トランスジェニックマウスは著しい炎症を生じ、アトピー性皮膚炎に類似した異常所見を示す(図1)。これらの疾患に共通するのは炎症というキーワードであり、PKC η の活性・発現上昇が、様々な炎症性疾患の発生・進展に関与することが示唆される。



図1 (a) Tgマウス背部皮膚のアトピー様所見



(b) 同マウスでの炎症性サイトカイン分泌上昇

Tg η は、PKC η を扁平上皮組織特異的に高発現させたマウスである。Tg η マウスの皮膚は著しい炎症反応を示し、真皮中への顆粒球・T細胞の遊走・浸潤が生じる。この際、表皮から炎症性サイトカイン:IL-1 α , IL-6, TNF α やGM-CSF、ケモカイン:Mip3, IL-8が分泌される。さらに成長と共にIL-4等のTh2誘導性サイトカインも放出され、その結果、生後数ヶ月でアトピー性皮膚炎に類似した病態が出現すると推測される。

2. 研究の目的

アトピーや乾癬等、炎症性難治皮膚疾患に対する根本的治療法は未だ確立されておらず、社会的要請も非常に高い。上記の結果を踏まえ、PKC η の酵素活性や発現を抑制することによって炎症性皮膚疾患を治癒する、新規分子標的治療法の開発を目指した。

具体的には、1) PKC η の活性や発現を抑制することにより、抗炎症効果を発揮する新規遺伝子治療法の開発を進める。2) PKC η を分子標的とした低分子化合物のスクリーニングを行い、新規抗炎症薬の発見を目指す。3) 培養細胞やPKC η トランスジェニックマウス(Tg η)を用いて、PKC η による炎症誘導のメカニズムを詳細に解明し、その知見を基

に、より有効性の高い治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) PKC η を分子標的とした炎症性疾患の新規治療法の開発

PKC η の酵素活性や発現を抑制する種々の遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターを構築し、ハプテン誘導型アトピーモデルマウスに対して適用し、その効果を検討する。候補遺伝子として、

- 1) キナーゼ活性欠損(ドミナントネガティブ)型 PKC η (D/N η)
- 2) PKC η shRNA、
- 3) PKC η 偽基質配列があげられる。

(2) 新規PKC η 活性抑制剤の網羅的探索

放線菌や海洋生物由来の天然有機化合物を材料として、PKC η の酵素活性や mRNA 転写活性を指標として、新規活性化剤の探索を行った。

酵素活性の測定には FRET 法を利用した細胞内での酵素活性変化をモニターするシステムを用いた。また転写活性の測定には、ヒト PKC η promoter 配列を挿入したルシフェラーゼレポーターシステムを利用した。

従来のPKC阻害剤の探索は、組み換え蛋白質を用いた試験管内反応系のため、細胞内での効果が予見できず、有効な物質を見逃したり in vivo では効果を持たない物質を捉える危険性があった。本法は生体内で有効な作用を持つ物質を簡便・迅速に探索できる優れた系である。

(3) PKC η による炎症発生の分子メカニズムの解明

PKC η による炎症性病態発生の分子機構を解明するために、PKC η の上・下流シグナルを明らかにする。予備的実験から上流シグナルとして、1) 創傷刺激・酸化ストレス、2) typeI-interferon、3) 相互作用因子14-3-3が候補として考えられている。下流シグナルとしては、1) JNK, p38等のMAPKシグナル、2) STAT3、3) Rho/Rac/cdc42があげられる。

4. 研究成果

(1) PKC η を分子標的とした炎症性疾患の新規治療法の開発

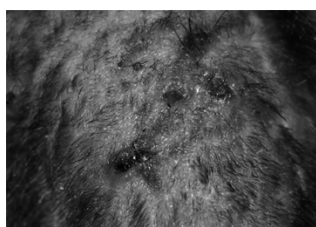
非増殖性アデノウイルスベクターは染色体への組み換えがないため安全で、また広汎な細胞種に高効率に遺伝子導入が可能な優れた特質を持つ。このベクターに下記の遺伝子を挿入し、PKC η の酵素活性を特異的に抑制するベクターを構築(K384をアラニンに置換したキナーゼ活性欠損型PKC η ベクター)し、ハプテン誘導性にアトピー性様皮疹を生じるマウス:NC/Ngaマウス皮膚に導入した。その効果を1) 臨床的診断(搔痒行動、皮膚症状スコアリング:Leungのclinical skin condition scoreを使用)、2) 免疫学的診断

(血漿 IgE 値、好酸球数)、3) 病理学的診断 (HE 染色、L T B 染色、各種マーカー抗原を利用した白血球、肥満細胞等の免疫組織染色) の観点から検討した。

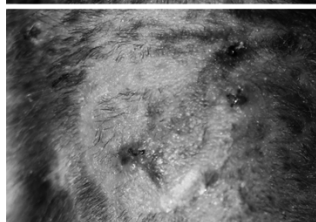
その結果、投与後数日で形態的・臨床的に皮膚の炎症状態が改善され、また病理学的解析の結果、著しい炎症の抑制が、HE 染色や炎症マーカーに対する免疫組織染色により明らかとなった(図2)。

また RNA 干渉 (RNAi) を利用した遺伝子発現抑制による治療法も検討した。PKC η 内の適切な配列を選択し、shRNA 発現レンチウイルスベクターを構築した。培養ケラチノサイトにおいて、PKC η mRNA/蛋白質の発現が抑制されることを確認した。

図2 D/N η アデノウイルスベクター導入による、びらんと紅斑の軽快



D/N PKC η アデノウイルス
処理前



D/N PKC η アデノウイルス
処理3日後

このベクターを NC/Nga マウス皮膚に導入し、その効果を同様に検討した。しかしながら、レンチウイルスベクターの皮膚への感染・浸透性はアデノウイルスベクターに比べて非常に低く、効果的な *in vivo* での遺伝子発現抑制が認められなかった。また、レンチウイルスは染色体への挿入が生じるため、臨床・倫理上の問題も伴う。従って、レンチウイルスベクターによる抗炎症療法の試みは中止した。

次に PKC η siRNA を用いた遺伝子発現抑制効果を検討した。複数の動物埋め込み用 drug delivery 基材 (メドジェル粒 P19, E50 等) に siRNA を加え、皮膚患部へ接触させることで siRNA 導入を試みた。しかしながら、その効果は限定的であった。今後、効果的な siRNA 導入法の確立を目指し、抗炎症治療法を確立させたい。

(2) 新規 PKC η 活性抑制剤の網羅的探索

特に遺伝子発現変化を指標とした系を用いて、PKC η の発現減少を誘導する分子の探索を行った。しかしながら、効果的な候補分子は現在のところ、見いだせていない。今後、

さらに検索対象を拡大し、抗炎症効果を有する試薬の同定を行いたい。

(3) PKC η による炎症発生の分子メカニズムの解明

培養細胞、及びトランスジェニックマウスを用いた解析から、PKC η を活性化する上流シグナルとして、創傷刺激・活性酸素シグナルが考えられた。これらの刺激により、AP-1, NF κ B の転写因子の活性化やそれに引き続いて、HB-EGF, GM-CSF 等の転写活性と蛋白質量の増加が誘導されるが、これらの現象が PKC η の発現や活性を抑制することで阻害された。

これらの結果から、アトピー性皮膚炎に伴う掻痒により生じる創傷刺激が PKC η の活性化とそれに引き続く炎症性サイトカインの発現上昇につながり、病状の悪化を引き起こす可能性が示唆された。

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)

1. Bahjat Al-Ani, Peter W. Hewett, Melissa J. Cudmore, Takeshi Fujisawa, Mahmoud, Saifeddine, Hannah Williams, Wenda Ramma, Samir Sissaoui, Padma-Sheela, Jayaraman, Motoi Ohba, Shakil Ahmad, Morley D. Hollenberg and Asif Ahmed.
Activation of PAR-2 stimulates sVEGFR-1 release via EGF receptor transactivation in endothelial cells. 査読有
Hypertension **55**(3):689-97, 2010.
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.136333

2. Kamioka N, Akahane T, Kohno Y, Kuroki T, Iijima M, Honma I and Ohba M. 査読有
Protein kinase C δ and η differently regulate the expression of loricrin and Jun family proteins in human keratinocytes
Biochem. Biophys. Res. Commun. **394**:106-111, 2010
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.125.

3. Ikuta T, Ohba M., Zouboulis C., Fujii-Kuriyama Y., Kawajiri K. 査読有
B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor.

J. Derm. Sci. 58(3):211-6., 2010
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.04.003.

4. 上岡 なぎさ、本間 生夫、赤羽 智子、
河野葉子、飯島 正文、大場 基。査読有
ヒト三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確
立と表皮分化へのCキナーゼの関与
昭和医学会雑誌 2010 Vol.
70 (3), 253-262, 2010

[学会発表] (計2件)

1. Differential role of protein kinase C
in cell growth between squamous cell
carcinoma and adenocarcinoma.
Motoi Ohba, Tohru Ohmori, Toshio Kuroki
and Etsuko Toya.
19th International Charles Heidelberger
Symposium In Cancer research.
2013, 2. 14-16 Kagoshima, Japan

2. 大場 基 毛包上皮幹細胞の永代培養法
と分化誘導法の確立、2011. 5. 21, 昭和大学
共同研究 研究成果発表会, 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: PKC η 発現抑制系
発明者: 大場 基
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2012-246772
出願年月日: 平成 24 年 11 月 8 日
国内外の別: 国内

○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
<http://www10.showa-u.ac.jp/~molonco/index/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 基 (OHBA MOTOI)

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・講師

研究者番号 : 70297018

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :