

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号： 14501
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23659137
 研究課題名（和文） クローン病の発症における p40phox の役割の解明と創薬
 研究課題名（英文） Roles of p40phox in Crohn disease and its application for drug development
 研究代表者
 齋藤 尚亮 （サイトウ ナオアキ）
 神戸大学・自然科学系先端融合研究環境バイオシグナル研究センター・教授
 研究者番号： 60178499

研究成果の概要（和文）：本研究では、p40phox の遺伝子異常による CGD 腸炎とクローン病の発症機序のベースは共通ではないかという仮説のもと、新しいクローン病の病因の探索することにより全く新しい治療法の開発を目指した。その結果、6 例の乳・幼児期発症治療抵抗性（難治性）クローン病患者について、p40phox を含むすべてのタイプの CGD 患者を鑑別できる我々の活性酸素アッセイ法と遺伝子解析を用いて精査を行ったが、p40phox 遺伝子異常による CGD 腸炎患者を発見することは出来なかった。

研究成果の概要（英文）：On the basis of our hypothesis that the etiology of Crohn's disease is related with that of CGD enteritis due to p40phox gene abnormality, we examined the new cause of Crohn disease and its treatment. We examined the production of reactive oxygen, and p40phox gene mutations in treatment-resistant of the six cases the (refractory) patients with Crohn's disease, but we were not able to discover the CGD enteritis patients due to p40phox gene abnormality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 薬理学一般

キーワード： クローン病 p40phox 活性酸素 NADPH oxidase

1. 研究開始当初の背景

貪食細胞に発現する **NADPH oxidase (Nox)** である Nox2 の活性化には、2 つの細胞膜成分 (Nox2 と p22^{phox}) と 4 つの細胞質成分 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, Rac) との食胞膜上での複合体形成が必須である。Nox2 複合体の構成因子の遺伝子異常によって食胞での ROS 産生の低下が起こり (**免疫異常**)、**小児期**

より重篤な感染症と肉芽腫性炎症を繰り返す慢性肉芽腫症 (CGD) を発症する。p40^{phox} は最後に同定された Nox2 複合体構成因子であり、2006 年になりその KO マウスが作製され、特定の (Fcγ 受容体を介した) 状況では細胞内の ROS 産生低下による細胞内の殺菌能低下が証明された [Ellson, JEM(2009)]。しかし、p40^{phox} 異常による ROS 産生低下が限局的であったため、他の因子の場合とは異なり

p40^{phox}異常によるROS産生異常を伴う患者、いわゆるCGD患者は存在しないという見解が大勢を占めていた。一方で、申請者らは、p40^{phox}の機能発現メカニズムとNox2の活性化にはp40^{phox}が必須であることを報告し[Ueyama et al, MBC(2007)]、p40^{phox}異常によるCGD患者は必ず存在するという見解に立ち、2006年秋以降、本邦のCGD患者の殆どを把握している食細胞機能異常症研究会の協力を得て、CGD様症状(軽症)を呈するにも関わらず病因不明の患者をスクリーニングすることを開始していた。我々の考えを裏付けるように、昨年10月、治療抵抗性の強度下痢を伴う腸炎を主訴とした3歳患者が、p40^{phox}-CGD患者として報告された[Matute, Blood(2009)]。

2. 研究の目的

本研究では、CGD腸炎(特にp40^{phox}の遺伝子異常によるCGD腸炎)とクローン病の発症機序のベースは共通ではないかという仮説を立て、全く新しいクローン病の病因の探索を試み、治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

1)クローン病を含む原因不明の腸炎患者群からのp40^{phox}-CGD患者の発見と遺伝子解析

2)p40^{phox}変異やFcγ受容体のSNPが抗菌オートファジー障害・腸炎に繋がる機序解明

3)2系統のp40^{phox}機能不全マウスに種々の負荷を与えて腸炎モデルを確立

4)クローン病とp40^{phox}異常によるCGD腸炎患者のバイオプシーサンプルの組織学的検索

5)腸炎モデルマウスを用いた治療薬のスクリーニング系の確立

4. 研究成果

6例の乳・幼児期発症治療抵抗性(難治性)クローン病患者を、p40^{phox}遺伝子異常によるCGD腸炎患者と疑い、p40^{phox}を含むすべてのタイプのCGD患者を鑑別できる我々の活性酸素アッセイ法と遺伝子解析を用いて精査を行ったが、1例が特殊なタイプのgp91^{phox}欠損によるCGD患者であったが、p40^{phox}遺伝子異常によるCGD腸炎患者を発見することは出来なかった。現在も、本邦初のp40^{phox}遺伝子異常CGD腸炎患者の発見を目指して、クローン病患者からの対象患者のスクリーニ

ング及び遺伝子解析を引き続き行っている。細胞レベルでのクローン病発症原因の解明については、ゲノムワイド関連研究のp40^{phox}の遺伝子多型がクローン病発症の危険因子であるという報告に立脚し、クローン病とp40^{phox}遺伝子異常CGD腸炎間には、共通発症因子すなわち抗菌オートファジーが関与しているという仮説を立て、p40^{phox}を安定的にノックダウンしたマクロファージ細胞株を樹立し、オートファジー関連因子であるLC3, Atg5, Atg15とオートフィジーとp40^{phox}の機能発現の両者に関与する脂質(PI3P)の免疫組織学的及びライブイメージング解析を行ったが、有意な差を見出すことが出来なかった。有意な所見として、クローン病患者では正常人に比べて白血球での活性酸素産生量が亢進するとのデータが得られた。

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12件)

Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Shirai, Y., Saito, N., and Hara, H. Increased seizure susceptibility in a mouse with diacylglycerol kinase β 2 deficiency. Neuroscience & Medicine in press 掲載確定

Nishimoto, T., Kashiwagi, K., Saito, N., and Shirai, Y. Both C1B domain and pseudosubstrate region are necessary for saturated fatty acid membrane; distinct role of intramolecular domains for different translocation. Biochem Biophys Res Commun 432 :384-388, 2013

Sakuma, M., Shirai, Y., Yoshino, K-I., Kuramasu, M., Nakamura, T., Yanagita, T., Mizuno, K., Hide, I., Nakata, Y., Saito, N. Novel PKC α -mediated phosphorylation site(s) on cofilin and their potential role in terminating histamine release" Mol Biol Cell, 23(18):3707-3721, 2012

Tanabe A, Shiraiishi M, Negishi M, Saito N, Tanabe M, and Sasaki Y. MARCKS dephosphorylation is involved in bradykinin-induced neurite outgrowth in neuroblastoma SH-SY5Y cells. J Cell Physiol. 227(2):618-629.2012

Seki, T., Ken-ich Yoshino, K., Tanaka, S., Dohi, E., Onji, T., Yamamoto, K., Hide, I., Paulson, H.L., Saito, N., Sakai, N. Establishment of a Novel Fluorescence-Based Method to Evaluate Chaperone-Mediated Autophagy in a Single

Neuron. PLoS ONE 7(2): e31232. 2012

Matsubara, T., Ikeda, M., Kiso, Y., Sakuma, M., Yoshino, K-I., Sakane, F., Merida, I., Saito, N. and Shirai, Y. c-Abl tyrosine kinase regulates serum-induced nuclear export of diacylglycerol kinase α by phosphorylation at Tyr218. J. Biol. Chem. 287: 5507-5517, 2012

Ueyama, T., Nakakita, J., Kobayashi, T., Kobayashi, T., Son, J-h., Sakaguchi, H., Leto, T., and Saito, N. Cooperation of p40phox with p47phox for Nox2 activation during Fc γ R-mediated phagocytosis --Mechanism for acquisition of p40phox PI(3)P binding--" J. Biol. Chem. 286, 40693-40705, 2011

Sakai, N., Saito, N. and Seki, T. Molecular pathophysiology of neurodegenerative disease caused by γ PKC mutations. World J. Biological Psychiatry, 12(S1) 95-98, 2011

Seki, T., Adachi, N., Abe-Seki, N., Shimahara, T., Takahashi, H., Yamamoto, K., Saito, N. and Sakai, N. Elucidation of the Molecular Mechanism and Exploration of Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Caused by Mutant Protein Kinase C γ . J Pharmacol Sci 116, 239 - 247, 2011

Shibata, Y., Kawada-Matsuo, M., Shirai, Y., Saito, N., Li, D., and Yamashita, Y. Streptococcus mutans diacylglycerol kinase homologue: a potential target for anti-caries chemotherapy. J. Med. Microbiol. 60:625-630, 2011

Shirai, Y., Morioka, S., Sakuma, M., Yoshino, K., Otsuji, C., Sakai, N., Kashiwagi, K., Chida, K., Shirakawa, R., Horiuchi, H., Nishigori, C., Ueyama, T., Saito, N. Direct binding of RalA to PKC η and its crucial role in morphological change during keratinocytes differentiation. Mol. Biol. Cell 22: 1340-1352, 2011

Matsuo, A., Bellier, J-P, Nishimura, M., Yasuhara, O., Saito, N. and Kimura, H. Nuclear Choline Acetyltransferase Activates Transcription of a High-affinity Choline Transporter. J. Biol. Chem. 286, 5836-5845. 2011

[学会発表] (計 18 件)

黒質線条体系における PKC γ の基質の解析
白藤 俊彦、吉野 健一、足立 直子、高橋 英之、香田 健、梨子田 哲明、吾郷 由希夫、松田 敏夫、齋藤 尚亮 第 121 回日本薬理学会近畿部会、平成 24 年 6 月 29 日、徳

島 (口頭発表・日本語)

Glial functions of Rho-family small GTPases during cerebellar development and after CNS injury. Ueyama, T., Kondoh T., Kohta M., Kohmura, E., Hayashibe, M., Nakamura, T., Sakahara, M., Kassai, H., Nakao, K., Aiba, A. and Saito, N. 14th International congress of histochemistry and cytochemistry、平成 24 年 8 月 26~29 日、京都 (ポスター・英語)

Involvement of PKC γ in neurodegenerative disease.

Saito, N., Takahashi, H., Shirafuji, T., Adachi, N., Danno, S., Ueyama, T., Seki, T. and Sakai, N. 14th International congress of histochemistry and cytochemistry、平成 24 年 8 月 26 日~29 日、京都 (口頭発表・英語)

Role of PKC α -mediated cofilin phosphorylation in the degranulation from RBL-2H3 mast cells. Sakuma, M., Shirai, Y., Yoshino, K., Kuramasu, M., Nakamura, T., Mizuno, K., Hide, I., Nakata, Y. and Saito, N. 22th IUBMB & 37th FEBS、平成 24 年 9 月 4 日~9 日、スペイン (ポスター発表・英語)

DGKbeta による神経突起伸張機構の解析
加野 拓也、上田 修司、山之上 稔、齋藤 尚亮、白井 康仁 第 85 回日本生化学会、平成 24 年 12 月 14 日~16 日、福岡 (ポスター発表・日本語)

黒質線条体系における PKC γ の基質の解析：ドパミン遊離における β PIX リン酸化の役割
白藤 俊彦、上山健彦、吉野健一、足立直子、高橋英之、吾郷由希夫、松田敏夫、齋藤 尚亮 第 86 回日本薬理学会年会、平成 25 年 3 月 21 日~23 日、福岡 (口頭発表・日本語)

Duox の活性酸素産生機構
佐久間 恵、上山健彦、濱田 猛、齋藤尚亮 第 86 回日本薬理学会年会、平成 25 年 3 月 21 日~23 日、福岡 (口頭発表・日本語)

異なるチロシンリン酸化によるジアシルグリセロールキナーゼ α の局在 調節機構
白井康仁、池田もも、佐久間 恵、木曾裕子、齋藤尚亮、第 119 回日本薬理学会近畿部会、平成 23 年 7 月 8 日、名古屋 (口頭発表・日本語)

Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a

high-affinity choline transporter. Matsuo, A., J.P. Bellier., Nishimura, M., Yasuhara, O., Saito, N. and Kimura, H. 8th IBRO world congress of neuroscience, July 14~18, 2011, Italy (ポスター発表・英語)

Novel phosphorylation site(s) of cofilin by PKC α contributes to proper termination of histamine release. 佐久間 恵、白井康仁、吉野健一、倉増真帆、中村朋文、水野健作、秀 和泉、仲田義啓、齋藤尚亮 第 84 回日本生化学会、平成 23 年 9 月 21~24 日、京都 (口頭発表、日本語)

部位特異的K0マウスを用いた低分子量Gタンパク質の組織学的機能解析 上山健彦、齋藤尚亮 日本組織細胞化学会年会、2011 年 9 月 24~25 日、金沢 (招待講演、日本語)

プロテインキナーゼCのトランスロケーションと酵素活性に対するプロポフェノールの効果 宮原岳史、関 貴弘、秀 和泉、田中茂、齋藤尚亮、入船正浩、酒井規雄 第 120 回日本薬理学会近畿部会、平成 23 年 11 月 11 日、京都 (ポスター発表・日本語)

Novel phosphorylation site(s) of cofilin by PKC α and its negative role in the degranulation from RBL-2H3 mast cells. Sakuma, M., Shirai, Y., Yoshino K., Kuramasu, M., Nakamura, T., Mizuno, K., Hide, I., Nakata, Y. and Saito, N. The American society for cell biology. Dec. 3~6, 2011, デンバー (ポスター発表・英語)

中枢神経損傷と Rho family GTPases (CNS injury and Rho family GTPases) 上山健彦、齋藤尚亮 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14~16 日、京都 (口頭発表、英語)

創薬ターゲットとしてのジアシルグリセロールキナーゼ 白井康仁、齋藤尚亮 第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14~16 日、京都 (口頭発表、英語)

ジアシルグリセロールキナーゼのヒスタミン分泌制御における役割 佐久間 恵、白井康仁、上山健彦、齋藤尚亮 第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14~16 日、京都 (ポスター発表、日本語)

無血清時における核内 DGK α の生理機能 木曾裕子、白井康仁、佐久間 恵、池田もも、齋藤尚亮 第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14~16 日、京都 (ポスター発表、日本語)

細胞内シグナル分子の可視化と細胞機能 齋藤尚亮 第 89 回日本生理学大会、平成 24 年 3 月 30~31 日、松本 (招待講演・日本語)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 尚亮 (サイトウ ナオアキ)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・教授

研究者番号：60178499

(2) 研究分担者

上山 健彦 (ウエヤマ タケヒコ)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・准教授

研究者番号：80346254

(3) 連携研究者

楠 正人 (クスノキ マサト)

三重大学・医学 (系) 研究科 (研究院)

研究者番号：50192026