

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15431

研究課題名(和文)炎症性腸疾患発症におけるプロリン異性化酵素Pin1の役割と治療法への応用

研究課題名(英文)Role of Pin1 on the pathogenesis of inflammatory bowel diseases

研究代表者

浅野 知一郎(Asano, Tomoichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号：70242063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、DSSによる大腸炎ではPin1の発現量が40～50倍にも増加していることを見出した。そこで、我々は、Pin1発現増加が大腸炎の発症に関与している可能性を考慮し、Pin1 KOマウスにDSSを投与したところ、Pin1 KOマウスではDSS負荷による潰瘍性大腸炎の発症が顕著に抑制される結果を得た。我々は、Pin1を阻害させる低分子化合物をマウスに与えると、DSSによる大腸炎の発症が抑制できることを判明させた。以上より、炎症性腸疾患の発症にPin1の発現量増加が関与していること、さらに、Pin1を阻害することによって炎症性腸疾患の新規治療への可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Pin1 is a unique peptidyl-propyl isomerase (PPIase). Pin1 specifically recognizes phosphorylated serine or threonine residues located immediately N-terminal to a proline and then isomerizes the peptide bond and catalyze isomerization of prolyl peptide bonds from trans to cis. Inflammatory bowel disease (IBD) represents a group of inflammatory disorders in intestine. We found that Pin1 was markedly increased in the DSS-induced colitis mouse intestine. In addition, Pin1 KO mice showed high resistance to the DSS-induced colitis. We also performed the experiment to generate the novel Pin1 inhibitors. Oral administration of these inhibitors to mice inhibited the development of DSS-induced colitis. Taken together, it was demonstrated that Pin1 is involved in the development of inflammatory bowel diseases and that Pin1 inhibitors may be usable for the treatment with these disorders.

研究分野：代謝学、生化学

キーワード：Pin1 プロリン異性化酵素 炎症性腸疾患

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) の発症メカニズムが未だ不十分な解明に留まっている。代表的なプロリン異性化酵素の一つである Pin1 は、標的タンパクの pSer/Thr-Pro を含むモチーフに結合することで細胞増殖や神経機能、代謝調節などに重要な裨割を果たしているが、我々は、DSS による大腸炎では Pin1 の発現量が 40~50 倍にも増加していることを見出した。そこで、炎症性腸疾患 (IBD) の発症に Pin1 がどのように関与しているかを明らかにすることは、新規の治療方法の開発に繋がる意義が考えられる。

### 2. 研究の目的

Pin1 は、細胞増殖や神経機能、代謝調節などに重要な裨割を果たしていることが示されている。本研究では、DSS 投与の大腸炎モデルマウスの腸管において Pin1 が顕著に増加していることを見出した。そこで、Pin1 の腸管における発現制御機構、大腸炎惹起における細胞の種類ごとの Pin1 の役割、ヒト炎症性腸疾患における Pin1 発現量の変化、について、研究を進める。最終的には、Pin1 阻害薬を用いた潰瘍性大腸炎の治療の開発を目標とする。

### 3. 研究の方法

血球系特異的、大腸上皮特異的、血球と大腸上皮特異的 Pin1 KO マウスを作成し、各群において DSS 誘導性大腸炎の程度を検討し、細胞ごとの Pin1 の関与を解明する。

DSS 誘導性大腸炎マウスの腸管より Pin1 高発現細胞を分離し、細胞の種類を同定すると共に、機能上の特性を明らかにする。さらに、血球系細胞については、大腸粘膜下に浸潤している血球系細胞を分離し、細胞表面マーカーを検討することで、T 細胞サブセットの動態を明らかにする。

好酸球、好中球、T 細胞において Pin1 が大腸炎発症に果たしている役割を明確にするために、各種培養細胞を用い、Pin1 siRNA や Pin1 阻害薬の処理による変化を検討する。

潰瘍性大腸炎やクローン病の患者の病変部位における細胞の種類ごとの Pin1 の発現量の変化を検討し、病態との関連を明確にする。

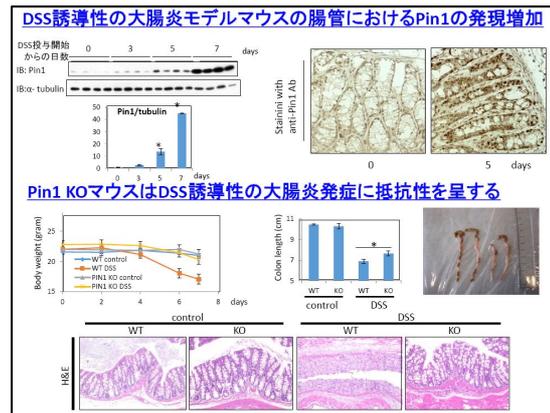
新規に作成した Pin1 阻害薬を DSS 誘導性大腸炎マウスに投与し、大腸炎の改善効果が顕著な化合物を絞り込み、Pin1 阻害薬による IBD 治療の可能性を探る。

### 4. 研究成果

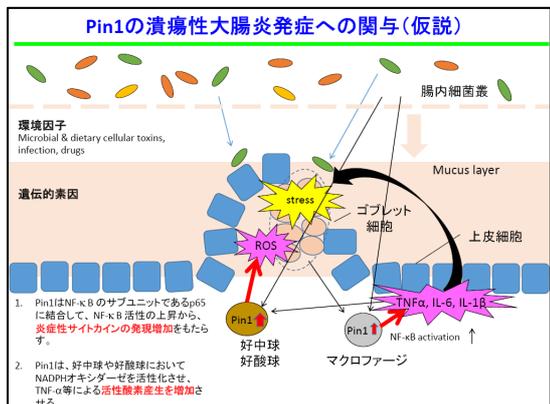
プロリン異性化酵素とは、プロリンとその N 端側のアミノ酸とのペプチド結合を、cis から trans 構造へと変化させることで、標的タンパクの活性、細胞内局在や安定性を変化させる酵素の総称である。プロリン異性化酵素の一つである Pin1 発現量の増加が、癌の悪性度と密接に関係していることは従来か

ら知られていた。また、Pin1 遺伝子欠損マウスが、肺繊維症の発症に抵抗性を示すことも報告されていた。

我々は新たに、炎症性腸疾患の病変部で Pin1 発現量が顕著に増加していること、また、Pin1 の遺伝子欠損マウスでは、DSS 投与による腸炎の発症抑制が認められることを見出した。すなわち、我々は、Pin1 が、炎症性腸疾患や NASH の治療ターゲットとなることを新規に見出した。



現在、炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎) の治療としては、抗炎症薬、ステロイドや免疫抑制剤に加え、近年は抗 TNF 抗体が使用されているが、長期的な寛解維持は困難である。抗炎症薬は効果が弱く、使用は軽症例にほぼ限られる。中等症以上には、抗 TNF- 抗体や抗 IL-6 抗体が用いられており奏功する症例も多いが、無効あるいは副作用のため中止せざるを得ないこともある。重症例には、ステロイドや免疫抑制剤が使用されるが、副作用が強く、短期間の使用に限られる。また、経過中に大腸癌を発症することも問題となっている。以上から、新規の治療薬の開発は強く望まれており、現在、抗インテグリン抗体など様々な治療薬の開発が進められているが、Pin1 を治療ターゲットとしたものはない。



そこで、広島大学医学部と、東京大学創薬機構 (岡部隆義教授)、東京薬科大学生命科学部 (伊藤久央教授) の3大学による共同研究開発から、優れた多様な Pin1 阻害化合物を開発し、炎症性腸疾患の治療に有効な化合物の作成を行った。その結果、経口投与で DSS 投与による腸炎の発症を抑制できる化合物

の開発に成功した。

## 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 13 件)

(以下、すべて査読あり)

1. Konagaya, Y., Terai, K., Hirao, Y., Takakura, K., Imajo, M., Kamioka, Y., Sasaoka, N., Kakizuka, A., Sumiyama, K., Asano, T., and Matsuda, M.  
A highly sensitive FRET biosensor for AMPK exhibits 1 heterogeneous AMPK responses among cells and organs.  
Cell Rep. 21(9), 2628-2638, 2017
2. Yamamoto, J., Imai, J., Izumi, T., Takahashi, T., Kawana, Y., Takahashi, K., Kodama, S., Kaneko, K., Gao, J., Uno, K., Sawada, S., Asano, T., Kalinichenko, VV., Susaki, EA., Kanzaki, M., Ueda, HR., Ishigaki, Y., Yamada, T. and Katagiri, H.  
Neuronal signals regulate obesity induced  $\beta$ -cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism  
Nat. Commun. 8(1), 1930, 2017
3. Yamamotoya, T., Nakatsu, Y., Kushiyama, A., Matsunaga, Y., Ueda, K., Inoue, Y., Inoue, MK., Sakoda, H., Fujishiro, M., Ono, H., Kiyonari, H., Ishihara, H. and Asano, T.  
Trk-fused gene (TFG) regulates pancreatic  $\beta$  cell mass and insulin secretory activity  
Scientific Reports 7(1), 15035, 2017
4. Nakatsu, Y., Kokubo, H., Bumdelger, B., Yoshizumi, M., Yamamotoya, T., Matsunaga, Y., Ueda, K., Inoue, Y., Inoue, MK., Fujishiro, M., Kushiyama, A., Ono, H., Sakoda, H. and Asano, T.  
The SGLT2 Inhibitor Luseogliflozin Rapidly Normalizes Aortic mRNA Levels of Inflammation-Related but Not Lipid-Metabolism-Related Genes and Suppresses Atherosclerosis in Diabetic ApoE KO Mice.  
Int. J. Mol. Sci. 18(8), 1704, 2017
5. Nakatsu, Y., Mori, K., Matsunaga, Y., Yamamotoya, T., Ueda, K., Inoue, Y., Mitsuzaki-Miyoshi, K., Sakoda, H., Fujishiro, M., Yamaguchi, S., Kushiyama, A., Ono, H., Ishihara, H., and Asano, T.  
The prolyl isomerase Pin1 increases  $\beta$ -cell proliferation and enhances insulin secretion.  
J. Biol. Chem. 292(28), 11886-11895, 2017

6. Sakai, G., Inoue, I., Suzuki, T., Sumita, T., Inukai, K., Katayama, S., Awata, T., Yamada, T., Asano, T., Katagiri, H., Noda, M., Shimada, A., and Ono, H.

Effects of the activations of three major hepatic Akt substrates on glucose metabolism in male mice.

Endocrinology. 158(8), 2659-2671, 2017

7. Yamamotoya, T., Nakatsu, Y., Matsunaga, Y., Fukushima, T., Yamazaki, H., Kaneko, S., Fujishiro, M., Kikuchi, T., Kushiyama, A., Tokunaga, F., Asano, T., Sakoda, H.

Reduced SHARPIN and LUBAC Formation May Contribute to CCL<sub>4</sub>- or Acetaminophen-Induced Liver Cirrhosis in Mice.

Int. J. Mol. Sci. 18(2), 326, 2017

8. Fukushima, T., Yoshihara, H., Furuta, H., Hakuno, F., Saeki, Y., Iemura, SI., Natsume, T., Nakatsu, Y., Kamata, H., Asano, T., Komada, M., Takahashi, SI.

USP15 attenuates IGF-I signaling by antagonizing Nedd4-induced IRS-2 ubiquitination

Biochem. Biophys. Res. Commun. 484(3); 522-528, 2017

9. Sano, T., Nagayasu, S., Suzuki, S., Iwashita, M., Yamashita, A., Shinjo, T., Sanui, T., Kushiyama, A., Kanematsu, T., Asano, T., and Nishimura, F.

Epicatchin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance.

Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 27(3), 249-259, 2017

10. Kushiyama, A., Nakatsu, Y., Matsunaga, Y., Yamamotoya, T., Mori, K., Ueda, K., Sakoda, H., Fujishiro, M., Ono, H., and Asano, T.

Role of uric acid metabolism-related inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome components such as atherosclerosis and non-alcoholic steatohepatitis

Mediators Inflamm. ID 8603164 2016

11. Shinjo, T., Iwashita, M., Yamashita, A., Sano, T., Tsuruta, M., Matsunaga, H., Sanui, T., Asano, T., and Nishimura, F.

IL-17A synergistically enhances TNF $\alpha$ -induced IL-6 and CCL20 production in 3T3-L1 adipocytes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 477; 241-6, 2016

12. Nakatsu, Y., Matsunaga, Y., Yamamotoya,

T., Ueda, K., Inoue, Y., Mori, K., Sakoda, H., Fujishiro, M., Ono, H., Kushiyama, A., and Asano, T.

Physiological and Pathogenic Roles of Prolyl Isomerase Pin1 in Metabolic Regulations via Multiple Signal Transduction Pathway Modulations.

Int. J. Mol. Sci. 17; E1495, 2016

13. Okubo H., Kushiyama, A., Sakoda, H., Nakatsu, Y., Iizuka, M., Taki, N., Fujishiro, M., Fukushima, T., Kamata, H., Nagamachi, A., Inaba, T., Nishimura, F., Katagiri, H., Asahara, T., Yoshida, Y., Chonan, O., Encinas, J., and Asano, T.

Involvement of Resistin-like molecule  $\beta$  in the development of methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice

Sci, Reports 6; 20157, 2016

〔学会発表〕(計8件)

プロリン異性化酵素 Pin1 は ATGL 及び HSL に結合し、分解を促進する

井上 由貴、中津 祐介、山本屋 武、松永 泰花、迫田 秀之、藤城 緑、菊池 貴子、榎山 暁史、浅野 知一郎

第60回日本糖尿病学会年次学術集会  
2017年5月18日

Trk-fused gene (TFG) の膵細胞における役割の解明

山本屋 武、中津 祐介、松永 泰花、井上 由貴、迫田 秀之、藤城 緑、山崎 広貴、菊池 貴子、榎山 暁史、浅野 知一郎

第60回日本糖尿病学会年次学術集会  
2017年5月19日

組織特異的キサンチンオキシダーゼによるインスリン感受性と慢性炎症の制御

榎山 暁史、菊池 貴子、山崎 広貴、山本屋 武、中津 祐介、松永 泰花、藤城 緑、迫田 秀之、浅野 知一郎、岩本 安彦

第60回日本糖尿病学会年次学術集会  
2017年5月19日

エネルギー代謝調節機構が CCL19-CCR7 経路を介した肥満およびインスリン抵抗性に及ぼす影響に関する検討

佐野 朋美、岩下 未咲、新城 尊徳、山下 明子、浅野 知一郎、西村 英紀

第60回日本糖尿病学会年次学術集会  
2017年5月19日

プロリン異性化酵素 Pin1 は、PRDM16 の分解を促進することで熱産生を抑制する

中津 祐介、山本屋 武、松永 泰花、井上 由貴、迫田 秀之、藤城 緑、榎山 暁史、浅野 知一郎

第60回日本糖尿病学会年次学術集会

2017年5月19日

SGLT2 阻害薬ルセオグリフロジンによる動脈硬化抑制効果の検討

浅野 知一郎、山本屋 武、松永 泰花、井上 由貴、迫田 秀之、藤城 緑、山崎 広貴、榎山 暁史、中津 祐介

第60回日本糖尿病学会年次学術集会  
2017年5月19日

性ホルモン結合グロブリン (SHBG) は、脂肪細胞とマクロファージに対して作用し、脂肪量減少効果と抗炎症効果をもたらす

山崎 広貴、迫田 秀之、藤城 緑、山本屋 武、菊池 貴子、金子 直、岩本 安彦、浅野 知一郎、榎山 暁史

第60回日本糖尿病学会年次学術集会  
2017年5月19日

SGLT2 阻害薬カナグリフロジンによる糖尿病性腎症発症抑制効果とプロリン異性化酵素 Pin1 の関与

松永 泰花、中津 祐介、山本屋 武、井上 由貴、迫田 秀之、藤城 緑、榎山 暁史、佐野 朋美、西村 英紀、浅野 知一郎

第60回日本糖尿病学会年次学術集会  
2017年5月20日

〔産業財産権〕

取得状況(計4件)

名称: 新規化合物並びにそれを用いた Pin1 阻害剤、炎症性腸疾患治療剤及び大腸癌予防剤

発明者: 浅野知一郎、中津祐介、岡部隆義、伊藤久央

権利者: 国立大学法人広島大学、国立大学法人東京大学、学校法人東京薬科大学

種類: 基本特許

番号: PCT/JP2017/42804

取得年月日: 2017.11.29

国内外の別: 国内、国外

名称: 新規アミド系化合物、並びにそれを用いた Pin1 阻害剤、炎症性疾患の治療剤及び癌の治療剤

発明者: 浅野知一郎、中津祐介、岡部隆義、伊藤久央

権利者: 国立大学法人広島大学、国立大学法人東京大学、学校法人東京薬科大学

種類: 基本特許

番号: 特願 2017-152806

取得年月日: 2017.8.7

国内外の別: 国内

名称: 脂肪性肝疾患の治療剤及び肥満症の治療剤

発明者: 浅野知一郎、中津祐介、岡部隆義、伊藤久央

権利者：国立大学法人広島大学、国立大学法人東京大学、学校法人東京薬科大学  
種類：基本特許  
番号：特願 2017-152807  
取得年月日：2017.8.7  
国内外の別：国内

名称：新規アントラニル酸系化合物、並びにそれを用いた Pin1 阻害剤、炎症性疾患の治療剤及び癌の治療剤  
発明者：浅野知一郎、中津祐介、岡部隆義、伊藤久央  
権利者：国立大学法人広島大学、国立大学法人東京大学、学校法人東京薬科大学  
種類：基本特許  
番号：特願 2017-152808  
取得年月日：2017.8.7  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野 知一郎 (ASANO, Tomoichiro)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科  
(医) ・教授  
研究者番号：70242063

### (2) 研究分担者

中津 祐介 (NAKATSU, Yukuke)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科  
(医) ・講師  
研究者番号：20452584