

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590107
研究課題名（和文） PKCeta を分子標的とした毛髪再生法の確立
研究課題名（英文） Novel Molecular Targeted Therapy for Alopecia/Hairloss via 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
70297018

研究成果の概要：

PKC η を分子標的とした毛髪再生技術の確立を目指した。第1に、既知のPKC η 活性化脂質であるコレステロール硫酸のナノ粒子化による発毛誘導実験を行った。第2に、新規PKC η 活性化剤・転写誘導剤の探索をFRET法を原理としたシステム、PKC η プロモーターを使用したレポーターシステムを用い行った。さらに、PKC η トランスジェニックマウスの解析を通じて、PKC η による発毛誘導機構の解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	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：PKC、分子標的薬、再生、毛髪

1. 研究開始当初の背景

PKCetaの過剰発現により、マウス皮膚に著しい発毛が生じた（毛髪再生方法 出願日：平成16年9月10日）。そこで、新規発毛誘導剤の同定を目的としてPKCetaを分子標的とした低分子化合物の新規スクリーニング系を確立した。また既知のPKCeta特異的活性化脂質として、コレステロール硫酸（CS）、スルファチドに着目し、その毛髪再生に対する作用を検討した。その結果、CSは皮膚への浸透性が弱く、毛包の存在する真皮

層に有効にデリバリーされないという問題点が生じた。

2. 研究の目的

(1) 既知PKC η 活性化脂質の経皮吸収素材による高効率導入

PKC η に選択制の高い既知活性化脂質CS、スルファチドを、皮膚真皮層へ輸送するドラッグデリバリーシステムを確立する。皮膚特異的吸収能を有するナノ分子キューブにCSを充填し、マウス皮膚に投与し、その作用を検討する。

(2) PKC η に対する新規活性化物質の探索

PKC η の酵素活性・転写活性を指標として、放線菌や海洋生物由来の化合物を網羅的にスクリーニングし、新規発毛促進物質の発見を目指す。この際、生細胞中のPKC酵素活性や転写活性を測定しうる新規スクリーニング系を用いるのが特徴である。

(3) PKC シグナル伝達経路の解明を通じた体毛発生促進分子の同定

より広範に創薬を推進するために PKC η シグナル伝達経路の解明を進め、PKC η の下流に位置する制御分子を同定し、新規の毛髪再生法へと繋げる。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子を用いた既知活性化脂質の経皮吸収効率の向上と毛髪再生

コレステロール硫酸、スルファチドの溶解性向上とナノチューブ・カプセルへの封入を進める。溶媒として、低級アルコールを第一選択として溶解性の向上を行う。これにn-ヘキサン、サイクロヘキサン等非極性溶媒を適切に加え、マンニトール等を用い乳化させ、安定且つ有効なナノ粒子の作製を進める。ナノ粒子の作製は ASPION 社との共同研究にて行った。

次に、作製された CS ナノ粒子を、C3H マウスの背部皮膚に塗布し、体毛発生の有無を観察し、皮膚組織を採取し、病理組織学的解析を行った。

(2) 新規 PKC η 活性化剤の網羅的探索

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。

(3) PKC η シグナル伝達経路の解析

PKC η トランスジェニックマウスや表皮ケラチノサイトを用いて、発毛誘導に関わる分子やシグナル経路を明らかにした。

4. 研究成果

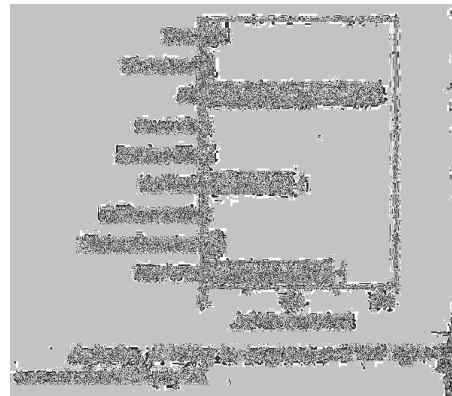
(1) ナノ粒子を用いた既知活性化脂質の経皮吸収効率の向上と毛髪再生

試験管内蛋白質リン酸化実験によって、PKC η 分子に特異性の高い活性化脂質として、CS、スルファチドが見いだされた。特にCSは、代表的なPKCの活性化脂質であるポスファチジルセリン、ホルボールエステルの共刺激と同様の高い活性化を示す。そこで、休止毛周期マウスの背部皮膚に対して、CSを投与した。しかしながら、発毛誘導は認められ

なかった。

この原因としてCSは、代表的な極性・非極性溶媒に対して、非常に溶解性が低く、粘性で乾燥しにくいため、皮膚への浸透度が極めて低いことが考えられた。そこで、CSを皮膚吸収性ナノ粒子に充填し、表皮の細胞間隙を通過せしめ、真皮へと到達させることを試みた。

ナノ粒子の作製は既に実績のあるASPION社や聖マリアンナ医科大・五十嵐博士の協力を頂き、作製した。①Aspion社開発の方法により、CSをヘキサン、エタノール混液(30:25)に溶解した上で、マンニトール溶液を加えて乳化を行い、ナノ粒子としたもの、2)聖マリアンナ大・五十嵐博士のナノキューブ技術(粒子径:約15nm)を適用したもの、計2種類を作製した。このCSナノ粒子を休止期毛周期マウスに作用させ、その効果を検討した。



しかしながら、発毛は見いだされることはなかった。この原因として、以下のことが考えられた。1)CSは極めて溶解性が低く、ナノ粒子内のCS濃度が低いこと、2)皮膚内に高効率で導入されていないことが考えられた。

またCSにはPKC η の活性促進と共に発毛誘導を阻害する作用を有している可能性も推測される。PKCの強力な活性化剤であり、発毛誘導能を有するホルボールエステル(TPA)とCSの作用は一部異なる点が存在する。最も重要な点はTPAによって誘導される皮膚や表皮ケラチノサイト内での炎症誘導作用や基底細胞の増殖誘導がCSでは認められない点である。

今後はCSに比べ、活性化能は劣るものの、溶解性では優れるSulfatideを用いて、同様の実験を行うことを検討している。

(2) 新規 PKC η 活性化剤の網羅的探索

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。

YFP/CFPをPKCeta cDNAに挿入したFRETプローブをHeLa細胞に導入して、スクリーニングを行った。しかしながらCFPの蛍光強度が低い点、YFPとCFPの蛍光スペクトラムに重複する部分が多いため、シグナルが分離しづらい欠点があり、感度・安定性の面でスクリーニングには不十分であった。

そこでPKC η 蛋白質のN末端側にmCherry蛋白質 (Ex. 580nm, Em610nm) を、C末端側にAcGFP1 (Ex. 475nm, Em. 505nm) を挿入したベクターを構築した。さらに感度とS/N比を向上させるために、PKC-AcGFP1間にグリシンスペーサーペプチド (G-spacer: GGSGG) を1~6個挿入したベクターを構築した。これによりGFPとPKC間の蛋白立体構造の自由度を変化させることが可能となる。

蛍光蛋白質の変更によるFRET効率の向上

mCherry	PKC η	GFP				
△						
spacer: GGSGG × (0~5): sp						
construction	sp 0	sp 3	sp 4	sp 5	sp 6	sp 8
%decrease (TPA / no treatment)	6.7	9.0	8.8	6.8	4.1	4.5

これらのベクターをHeLa、COS-1、HEK293、CHO細胞に一過性に導入し、FRETの発生効率を検討した。その結果、COS-1以外の細胞では、融合蛋白質の凝集が生じ、細胞が死滅したり、蛍光の発生量が極めて低い等の問題が生じた。そこでCOS-1に対象細胞を限定し、: TPAに対する反応性を検討した。その結果、G-spacerを5個挿入したコンストラクトが、10%以上のFRET効率を示した。そこで、このベクターを導入した安定形質転換細胞を構築し、スクリーニングを行っている。

(3) PKC η シグナル伝達経路の解析

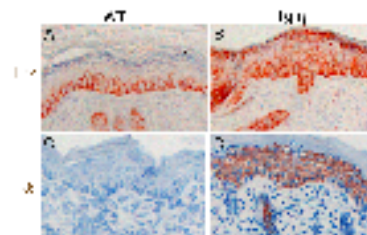
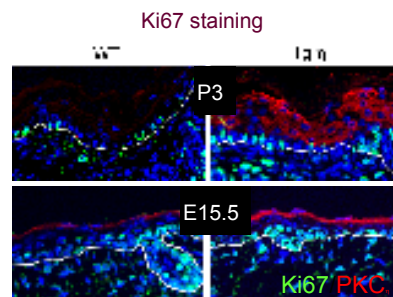
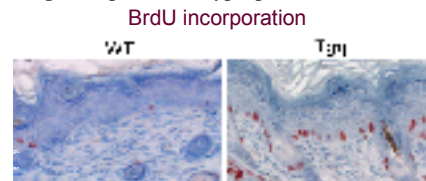
PKCetaによる発毛誘導機構を解明することを目的として、PKCeta トランスジェニックマウスを病理学的・分子生物学的に解析を行った。内在性PKC η とほぼ同一の発現パターンを示す遺伝子: involucrin promoterを用いたトランスジェニックマウス (inv-Tg η) の解析を進めた。

inv-Tg η マウスは、表皮基底細胞や毛包上皮系細胞の増殖が著しく促進されていた。BrdU取り込み実験やKi67染色から、細胞分裂が生じているのはPKC η が発現していない基底細胞のみであった。一方で、表皮角化層は激しい肥厚を示し、分化マーカー: SPR1B, SPR2A, SPR2E, SPR2G, involucrin,

transglutaminase-1の発現上昇が確認され、分化亢進が確かめられた。

増殖促進のメカニズムを調べるために、Realtime RT-PCR、免疫組織染色を行ったところ、HB-EGF、epiregulin、TGF- α の発現上昇が認められた。特徴的なことは、PKC η が発現し、細胞分裂能を欠いた表皮顆粒層においてのみ、これらの増殖因子は発現していた。このことから、これらの因子がパラクライン的に基底細胞に作用し、増殖を促進させる一方で、顆粒層細胞は分化誘導されることが考えられる。

Sign of Epidermal Hyperplasia in Neonatal Tg η



Epi: epidermis, Der: dermis

また真皮層には生後まもなくから顆粒球、T細胞、マクロファージの著しい遊走が確認された。また表皮では、IL-1 α 、IL-6、TNF α 、GM-CSF等の炎症性サイトカインやMIP2、MIP3 α 等のケモカインのmRNA・蛋白質が高い発現を示し、組織学的所見との一致が認められた。また発毛促進因子として知られるFGF2やVEGFの発現上昇も認められた。さらにPKC ϵ の下流シグナルとしてMKK6/p38 α の経路が示唆された。今後さらに詳細なシグナル経路を明らかにし、PKC ϵ による発毛誘導の分子メカニズムを解明し、毛髪再生技術の確立に役立てたい。

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. Watanabe H, Ohba M, Hizawa N, Adachi M, Huang SK, Iijima M. (他6名、7番目)
Functional Characterization of IL-17F as a Selective Neutrophil Attractant in Psoriasis.
J. Invest. Dermatol. **129(3)**:650-6. 2009 査読有
2. Park JW, Kim HP, Lee SJ, Wang X, Wang Y, Ifedigbo E, Watkins SC, Ohba M, Ryter S.W., Vyas Y.M., Choi A.M..
Protein Kinase C α and ζ Differentially Regulate Death-Inducing Signaling Complex Formation in Cigarette Smoke Extract-Induced Apoptosis.
J. Immunol.; **180(7)**:4668-78. 2008 査読有
3. Steinberg R, Harari OA, Lidington EA, Boyle JJ, Nohadani M, Samarel AM, Ohba M, Haskard DO, Mason JC.
A protein kinase C ϵ -anti-apoptotic kinase signaling complex protects human vascular endothelial cells against apoptosis through induction of Bcl-2.
J. Biol. Chem. ;**282(44)**:32288-97. 2007 .
査読有
4. Park J.I., Kim S.G., Chun J.S., Seo Y.M., Jeon M.J., Ohba M., Kim H.J., Chun S.Y.. Activation of protein kinaseC ζ mediates luteinizing hormone- or forskolin-induced NGFI-B expression in preovulatory granulosa cells of rat ovary.

Mol. Cell Endocrinol. **270(1-2)**:79-86. 2007 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 大場 基、PKC η を標的分子とした毛髪再生法の開発、2008. 3. 1, 昭和大学共同研究 研究成果発表会, 東京
2. Kanome. T.,
Relation between MET and EGFR expression in acquired gefetinib-resistant non small lung cancer.
AACR Annual Meeting 2008
2008. 4. 12-16, San Diego, CA, USA
3. 大場 基, Involvement of PKC ϵ in growth and differentiation of epithelial cells and innate immune response. 第32回日本分子生物学会年会、2008. 12. 9-12、神戸

[図書] (計1件)

改訂 培養細胞実験ハンドブック、羊土社、p200-210, p229-234, 2009. 1. 1

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

審査請求願 2008. 5.

毛髪再生方法 書類名: 特許願、出願番号通知: 特願 2004-264736

発明者: 大場 基、黒木 登志夫、出願人: 昭和大学、(株)バイオマスター

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

(3) 連携研究者