

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592084
 研究課題名 (和文) ケロイド治療薬トラニラストの標的分子解析と新しい分子標的ケロイド治療薬の開発
 研究課題名 (英文) Target molecule analysis of the keloid therapeutic drug Tranilast and the development of a new molecule target keloid therapeutic drug
 研究代表者
 小倉 潔 (OGURA KIYOSHI)
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
 研究者番号：70233492

研究成果の概要：ケロイドは、傷の部分が赤みを帯び、盛り上がり、痒み、痛みなどを伴う皮膚の病気で、傷を修復する線維芽細胞がコラーゲンを異常産生することに病因がある。ケロイド形成の主役を担うコラーゲンの異常産生には TGF- β が関与する。Hgs 蛋白は TGF- β シグナル伝達を促進する一方、Hgs 蛋白の C 領域は TGF- β シグナル伝達を阻害する。この C 領域を構成するオリゴペプチドから新しいケロイド薬のリード化合物を検索し、ケロイド薬に求められる活性を有するオリゴペプチド OP20-7 を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、トラニラスト、ケロイド、標的治療

1. 研究開始当初の背景

(1) ケロイド

ケロイド・肥厚性瘢痕は手術、外傷、やけどなどの傷の部分が赤みを帯び、盛り上がり、痒み、痛みなどを伴う皮膚の病気である。これらは創傷治癒時に体質、ホルモンなどの影響で傷を修復する線維芽細胞がコラーゲンを異常産生することに病因がある。ケロイドの発生機序は未だ充分には解明されていないが、ケロイド形成の主役を担うコラーゲンの異常産生には、ケミカルメディエーター PGE2、サイトカイン IL-6、Wnt、TGF- β の関与が明らかとなっている。これらのサイトカインはすべて上皮細胞・間葉系細胞転換を

誘導する機能が明らかとなっている。現在、ケロイド原因遺伝子の解明および新治療法の確立を目指して分子レベルの解析が進められている。

(2) 上皮細胞・間葉系細胞転換 (EMT)

IL-6、Wnt、TGF- β は EMT を誘導するサイトカインである。EMT は胎児形態形成初期において必須の過程であり、外胚葉由来の細胞が中胚葉由来の細胞へと転換する過程や神経堤の形成時に誘導される。EMT はがん細胞転移における浸潤及び血管内移行にも大きく関与している。さらに、創傷治癒時にも EMT 誘導が認められる。創傷治癒過程には創傷先端の上皮細胞は細胞間結合を解除し遊走能

を持った線維芽細胞様に変化する(EMT誘導)。この時、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスが大量に産生される。創傷治癒後のEMT誘導の制御異常がケロイド・肥厚性瘢痕の原因と考えられる。

(3) HGF-regulated tyrosine kinase substrate (Hgs)

Hgs は、ジンクフィンガー (FYVE) 配列を含む領域 (Z)、高プロリン領域 (P)、他の蛋白と結合能を有する疎水性の高いコイルドコイル配列を含む領域 (C)、高プロリン/高グルタミン領域 (Q) の4領域から構成されている(図-1)。HgsはTGF- β -SMADシグナル伝達を担うSMAD2/3、STAM、Eps15、clathrinを含めた多くの蛋白と結合するアダプター蛋白であり、小胞輸送および細胞内シグナル伝達に関連している。申請者はこのHgsのTGF- β -SMADシグナル伝達因子としての機能に注目し、①HgsがEMT誘導能を有すること、そして、②HgsのC領域がEMT誘導とは逆反応である間葉系細胞・上皮細胞転換(MET)を誘導することを見いだしている。

(4) Hgsの筋分化誘導能

骨格筋細胞、脂肪細胞や軟骨細胞に分化可能な多分化能を有するマウスC3H10T1/2細胞にHgsを安定発現させると、筋分化誘導因子のMyoDやミオシン重鎖蛋白の発現が誘導され、筋原細胞へ分化することを見いだした。この結果はWntによる筋分化シグナルなしにHgsが単独でWnt/EMTシグナルを伝達し、筋分化誘導因子MyoD発現を誘導し、筋分化が引き起こされたと考えられる。

(5) ケロイド治療薬トラニラスト

ケロイド・肥厚性瘢痕の治療にはステロイド注射、圧迫療法、放射線治療、手術療法が用いられる。しかし、一般的には簡便な内服液やステロイド外用薬による治療が中心となっている。現在、ケロイド・肥厚性瘢痕に適応をもつ唯一の内服薬がトラニラスト(一般薬剤名リザベン)である。トラニラストはナンテン成分の抗アレルギー作用に関する研究から開発されたわが国初の経口投与可能なアレルギー性疾患治療剤である。その作用機序は肥満細胞、各種炎症細胞からのケミカルメディエーターの遊離抑制にあり、従来の対症療法剤と異なりアレルギー性疾患のより原因療法に近づいた薬剤である。その後、トラニラストはTGF- β の産生、遊離を抑制し、ケロイド・肥厚性瘢痕由来線維芽細胞の増殖および、コラーゲン合成を抑制することが確認された。

2. 研究の目的

HgsはTGF- β /EMT誘導シグナル伝達因子である。しかし、その構成部位のC領域(Hgs/C)だけを細胞内に安定発現させると、Hgsとはまったく逆にTGF- β /EMT誘導シグナル伝達

を抑制・遮断する。ケロイド治療薬トラニラストの作用機序は線維芽細胞や炎症細胞からのTGF- β の産生・遊離抑制であり、TGF- β シグナル伝達の抑制・遮断作用である。したがって、Hgs/Cはケロイド治療薬トラニラストと同様な生理作用を持ち、ケロイド治療薬の新しいリード化合物としての可能性を有している。本研究の目的を以下の(1)と(2)とする。

(1) Hgsがトラニラストの標的分子であるかを明らかにする。

(2) Hgs/Cの構成アミノ酸配列由来のオリゴペプチドから、TGF- β シグナル伝達抑制活性の高いオリゴペプチドを選定し、ケロイド治療薬の新しいリード化合物とする。

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼ活性測定

①TGF- β シグナル伝達により、SMADの転写活性が亢進する。この変化をSMADのレスポンスエレメントをもつルシフェラーゼ発現ベクターを介して、ルシフェラーゼ活性に置き換えて測定する。

②TGF- β シグナル伝達により活性化されるプラスミノゲン・アクティベーター・インヒビター1(PAI-1)やケロイドにおいて重要なコラーゲンのプロモーター活性をルシフェラーゼ活性に置き換えて測定する。

(2) 動物細胞2-ハイブリッドシステムを用いた活性測定

TGF- β シグナル伝達時にはHgsとSMAD2/3が結合し、SMAD2/3のリン酸化(活性化)が起きることが知られている。この相互作用を迅速に定量的に数値化することが必要である。この活性変化を動物細胞2-ハイブリッドシステムを用いて測定する。

(3) ケロイド治療薬トラニラストによるTGF- β シグナル伝達活性への影響を前述の実験(1)、実験(2)を用いて検討する。

(4) Hgs/C構成オリゴペプチドOP20シリーズ(図-1)によるTGF- β シグナル伝達活性への影響を前述の実験(1)、実験(2)を用いて検討する。

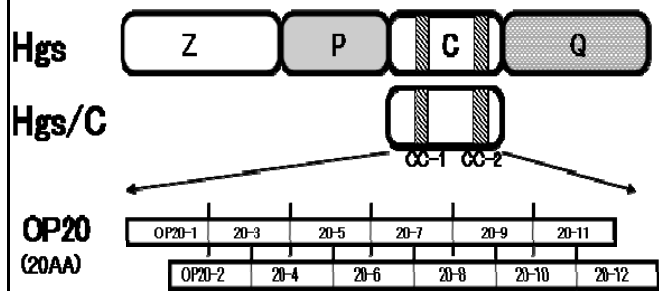


図-1. Hgsの領域構造、Hgs/CとHgs/C構成オリゴペプチド(OP20シリーズ)

4. 研究成果

(1)

①ケロイド治療薬トラニラストは TGF- β シグナル伝達活性や、PAI-1 やコラーゲンのプロモーター活性を阻害した。

②ケロイド治療薬トラニラストは Hgs と SMAD2 の相互作用を阻害した。したがって、Hgs はケロイド治療薬トラニラストの標的分子の1つと考えられる。

(2)

①Hgs/C 構成オリゴペプチドは TGF- β シグナル伝達活性や、PAI-1 やコラーゲンのプロモーター活性を阻害した。

②Hgs/C 構成オリゴペプチドは Hgs と SMAD2 の相互作用を阻害した。

③特に OP20-7 オリゴペプチドによる TGF- β シグナル伝達抑制や、Hgs と SMAD3 の相互作用を阻害効果は顕著であった。

(3) Hgs 構成オリゴペプチドはケロイド治療薬のリード化合物と成り得ると考えられた。特に、OP20-7 ペプチドは、更にペプチド長や修飾基を検討することにより、ケロイド治療薬のリード化合物と成り得ると考える。

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)

- ①Chisada S., Yoshimura Y., Sakaguchi K., Uemura S., Go S., Ikeda K., Uchima H., Matsunaga N., Ogura K., Tai T., Okino N., Taguchi R., Inokuchi J., Ito M. Zebrafish and mouse alpha2, 3-sialyltransferases responsible for synthesizing GM4 ganglioside. *J Biol Chem.* 284, 30534-30546 (2009) (査読有)
- ②Takahashi T., Murakami K., Nagakura M., Kishita H., Watanabe S., Honke K., Ogura K., Tai T., Kawasaki K., Miyamoto D., Hidari KI., Guo CT., Suzuki Y., Suzuki T. Sulfatide is required efficient replication of Influenza A virus. *J Virol.* 82, 5940-5950 (2008) (査読有)
- ③Kasuga J., Yamasaki D., Ogura K., Shimizu M., Sato M., Makishima M., Doi T., Hashimoto Y., Miyachi H. SAR-oriented discovery of peroxisome proliferator-activated receptor pan agonist with a 4-adamantyl phenyl group as a hydrophobic tail. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1110-1115 (2008) (査読有)
- ④Lee S., Shinji C., Ogura K., Shimizu M., Maeda S., Sato M., Yoshida M., Hashimoto Y., and Miyachi H. Design, synthesis, and evaluation of

isoindolinone-hydroxamic acid derivatives as histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4895-4900 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

- ①小倉 潔, 新野由子, 塩田清二: 精巣特異的に発現する PKC δ 分子. 第 31 回 日本分子生物学会年会・第 81 回 日本生化学会大会 合同会議, 2008.12.9-12, 神戸
- ②立野玲子, 小倉 潔, 島村真里子, 後藤敏行: 培養細胞系における管腔形成能評価のための画像解析の検討. 日本バイオイメージング学会 第 17 回 学術集会, 2008.10.30-11.1, 千葉.
- ③Sato M., Yajima Y., Ogura K., Shimizu M., Nishitho Y., Miyachi H.: A novel PPAR alpha/beta/gamma-pan agonist inhibits cell growth in human pancreatic cancer cell lines. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008.10.28-30, Nagoya.
- ④ Shimizu, M., Sato, M., Ogura, K., Nishito, Y., Takeda, Y., Mizuguchi, J., Yoshimoto, T.: Analysis of antitumor activity of IL-2. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008.10.28-30, Nagoya.
- ⑤Ogura K., Kawashima I., Ishikawa Y., Sato M., Shimizu M., Takeda Y., Mizuguchi J., Yoshimoto T.: Comprehensive gene expression analysis of melanoma B16 cells that Hgs expression level changed metastasis activity. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008.10.28-30, Nagoya.
- ⑥小倉 潔, 川島育夫, 石川雄一郎, 島村真里子, 佐藤真友美, 清水元武: GEF-1/Hgs 発現調節によりがん転移能の変化したマウスメラノーマ B16 細胞の網羅的遺伝子発現解析. 第 17 回 日本がん転移学会学術集会, 2008.7.24-7.25, 鹿児島.
- ⑦Sato M., Yajima Y., Ogura K., Shimizu M., Miyachi H. TIPP-703, a peroxisome proliferator-activated receptor pan agonist, induces a G1-phase arrest in human pancreatic carcinoma cell line. The 33rd FEBS Congress-11th IUBMB Conference "Biochemistry of Xell Regulation" 2008. 6.28-7.3, Athens (Greece)
- ⑧Ogura K., Kawashima I., Sato M., Shimizu M. Effects of Hgs on Metastasis ability of Mouse Melanoma B16 cells. The 33rd FEBS Congress-11th IUBMB Conference "Biochemistry of Xell Regulation" 2008. 6.28-7.3, Athens

(Greece)

- ⑨佐藤眞友美, 矢島由起子, 小倉 潔, 西藤泰昌, 宮地弘幸: 新規PPARsリガンドによる膵がん細胞の細胞周期停止機構の解明. 第81回日本内分泌学会学術総会, 2008.5.16-5.18, 青森.
- ⑩小倉潔, 佐藤眞友美, 清水本武: Hgs 高発現および抑制マウスメラノーマ B16 細胞の遺伝子発現プロファイリング. 第30回日本分子生物学会年会・第80回生化学会大会合同大会, 2007.12.11-15, 横浜.
- ⑪立野玲子, 小倉 潔, 島村眞里子, 後藤敏行: 画像解析による管腔形成能の評価. 日本バイオイメージング学会第16回学術集会, 2007.10.31-11.2, 千葉.
- ⑫Sato M., Ogura K., Shimizu M., Kunimasa K., Ohta T., Kaji K., Miyachi, H.: Novel PPAR α, γ dual agonists induce a G1-phase arrest in pancreatic cancer cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007.10. 3-5, Yokohama.
- ⑬Ogura K., Horiguchi S., Sato M., Shimizu M.: Effects of RNA interference of GEF-1/Hgs on metastasis of mouse melanoma B16 cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007.10.3-5, Yokohama.
- ⑭Shimizu M, Sato M., Ogura K., Takeda Y., Mizuguchi J., Yoshimoto T.: Role of macrophages and neutrophils in antitumor activity of Fas ligand (CD95L)-expressing tumor. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007.10.3-5, Yokohama.
- ⑮Chisada S., Yoshimura Y., Uchima H., Ogura K., Tai T., Okino N., Ito. M.: Molecular cloning and characterization of the novel 2, 3-sialyltransferase (GM4 synthase) from zebrafish. Insights into the glycosphingolipid receptor for fish vibriosis 第27回日本糖質学会年会, 2007.8.1-3, 福岡.
- ⑯小倉 潔, 島村眞里子: マウスメラノーマ B16 細胞のがん転移能における Hgs/GEF-1 の影響. 第16回日本がん転移学会総会, 2007.7.9-7.10, 富山.
- ⑰佐藤眞友美, 小倉 潔, 矢島由起子, 国政和宏, 太田敏郎, 宮地弘幸: PPAR $\alpha \gamma$ デュアルリガンドによる膵がん細胞の細胞周期調節作用. 第80回日本内分泌学術集会, 2007.6.14-16, 東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「ガラクトシルセラミド発現因子-1 を標的とする腫瘍増殖制御法」
発明者: 財団法人東京都医学研究機構
小倉 潔
権利者: 財団法人東京都医学研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2010-144763
出願年月日: 2010 年 6 月 25 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 潔 (OGURA KIYOSHI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床
医学総合研究所・主任研究員
研究者番号 70233492

(2) 研究分担者

笠間 健嗣 (KASAMA TAKESHI)
東京医科歯科大学・機器分析センター
准教授
研究者番号 80124668

(3) 連携研究者

なし