

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460153

研究課題名(和文) 難治性炎症性疾患に対するPKCetaを分子標的とした新規治療法

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for intractable inflammatory disease 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PKCetaを分子標的とした、難治性炎症疾患に対する新規治療法の開発を行った。第一に、炎症性皮膚疾患、特にアトピー性皮膚炎が、PKCeta特異的siRNAによって顕著に改善されることをモデルマウスを用いて証明した。また、この実験を行うにあたり、PKCeta特異的・高効率に発現抑制可能なヒト及びマウスsiRNA配列の探索を行い、その発現を著明に抑制できる配列を見出した。これらの成果は、PKC 遺伝子発現阻害siRNA及びそれを含む医薬品として特許申請を行った。更に、全身性炎症性疾患モデルとしてApoEマウスを用い、動脈硬化症に対するPKCeta遺伝子・ペプチド治療法の検討も併せて行った。

研究成果の概要(英文)：Our goal is to develop novel therapeutic methods for severe inflammatory diseases such as atopic dermatitis (AD) and arteriosclerosis targeting PKCeta. We assessed the effects of siRNA and pseudosubstrate peptide for PKCeta on AD-like dermatitis in Nc/Nga mice, model for AD. Administration of PKCeta siRNA using some transdermal delivery systems suppressed deterioration of dermatitis including itching or fissure on the back skin and ear. Moreover, novel siRNA sequences for PKCeta inhibiting its expression significantly were identified. Furthermore, we examined the effects of PKCeta gene knockout in arteriosclerosis model mice; ApoE by ApoE/PKCeta double knockout mice.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分子標的治療 炎症 PKC

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 1990 年に単離した C キナーゼである。

当初、その働きは正常扁平上皮細胞の最終分化や細胞増殖抑制にあると考えられていた。しかし近年、PKC η の活性を左右する SNPs が 脳梗塞、慢性関節リュウマチや萎縮性胃炎の罹患率を上昇させることが相次いで報告され (*Nature. Genet.* 39:212 2007, *Atherosclerosis* 199:340 2008, *Gastric Cancer.* 13(2):90, 2010)、ヒト疾患、特に炎症性慢性疾患における PKC η の重要性が強く認識され始めた。また PKC η トランスジェニックマウス(Tg η)は、アトピー性皮膚炎に類似した著しい炎症を皮膚異常所見を示す。

これらのことから、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。

2. 研究の目的

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呈し、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。

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。本研究では、PKC η の酵素活性・発現を抑制することで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す。特に前研究課題(*基盤研究(C): 22590105*)で得られた遺伝子治療の成果をより発展させ、対象を皮膚に限定せず、動脈硬化症等、より広範な内科的

疾患の予防・改善を含めた臨床応用につなげることを目的とする。

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

遺伝子療法

これまでに、PKC η の酵素活性や発現を抑制する、様々な遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、ハプテン誘導型アトピーモデルマウス:Nc/Nga に適用し、その効果を検討してきた。その結果、ドミナントネガティブ型 PKC η や PKC η shRNA が、炎症性病態を著しく軽快することを見いだした。しかし、ウイルスベクターによる遺伝子治療は安全性・倫理性の観点から臨床応用に多くの困難が伴う。そこで本研究課題では、PKC η siRNA を各種の経皮吸収剤を用いて皮膚内に導入、その抗炎症効果を検証した。

ペプチド治療法

PKC は自身の酵素活性を阻害する、分子種特異的な偽基質 (psudosubstrate) 配列を有する。このペプチドや細胞膜透過性を向上させるポリアルギニン配列を付加した偽基質ペプチドを合成、その抗炎症作用を検討した。

2) PKC η に対する新規阻害剤の探索

PKC η の持続的活性化は炎症性皮膚炎を誘発するが、一過的活性化によっては発毛誘導を促す(特許権、特許名:毛髪再生方法、特許第4476754号、登録日 平成22年3月19日)。この知見を元に、これまでにPKC η の活性化剤を見出す目的で、放線菌や海洋生物由来の化合物をシーズとした網羅的スクリーニングを行ってきた。

このスクリーニングを準用・継続し、抗炎症作用を持つPKC η 阻害剤の発見を目指す。その際、生細胞中のPKC活性や転写活性を指標とするスクリーニング系を用いた。

3) 全身性炎症性疾患への応用

上記研究で得られた抗炎症作用を示す核酸等が、PKC η が関与するとされる、全身性

の慢性炎症疾患にも応用可能か、疾患モデルマウスを用いて検証した。動脈硬化症モデルマウス:ApoE^{-/-}、リウマチモデルマウス: DBA/1J に対して、PKC η 抑制核酸・ペプチド剤をドラッグデリバリー剤に包含して投与、病理組織学的に解析を目指した。

4. 研究成果

PKCeta を分子標的とする難治性炎症疾患の軽快・治癒を目指す新規治療法の開発を行った。第 1 に、炎症性皮膚疾患に着目し、PKCeta の発現や酵素活性を阻害する核酸阻害剤を使用して、病態モデルマウスを対象に以下の検証を行った。アトピー性皮膚炎モデルマウスとして、Nc/Nga を用いて、その背部及び外耳皮膚に PKCeta 特異的 siRNA や PKCeta 偽基質ペプチドを導入し、複数の臨床的所見: 掻痒行動、発赤・出血、浮腫、擦傷、痂皮形成を 4 段階にスコア化することでその効果を評価した。更に、免疫学的診断、病理学的診断の観点から検討した。ハプテンとして Picryl Chloride (2, 4, 6-trinitrochlorobenzene) 、1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene を反復塗布することで、皮膚炎の誘導を行った。

PKCeta 特異的 siRNA は、リポソーム製剤、レシチン様経皮核酸導入剤や皮膚浸透性ペプチド、イオンフォレーシス法などを用いて、皮膚内に導入した。機能性ペプチドとしては、細胞透過性ペプチド: Tat、タイトジャンクション開口作用を持つペプチドを用いた。その結果、siRNA の導入により、肥厚・発赤の改善、掻痒行動の低下等、皮膚炎の臨床スコアは対象群と比較して有意に低下し、皮膚炎の改善・軽快が認められた。また、この実験を行うにあたり、PKCeta 特異的に効率に発現抑制可能なヒト及びマウス siRNA 配列の探索を行い、不死化ケラチノサイト HacaT やヒト肺腺がん細胞株において、PKCeta mRNA レベルを 80~95% 程度抑制できる配列を見出した。これらの成果は、PKC 遺伝子発現阻害 siRNA 及びそれを含む医薬品 (特願 2015-206380) として特許申請を行った。

第 2 に、PKCeta 偽基質配列ペプチド (TRKRQRAMRRRVHQVNG) を用いた PKCeta の活性阻害を試みた。皮膚への同ペプチドの導入のために、既存のミリストイル基付加ペプチドに加えて、3~11 個のポリアルギニンシグナルを付加したペプチド誘導体、PKCeta の細胞内局在部位である小胞体への移動シグナル等を付加したペプチドを試験管内で複数合成し、その効果を培養ケラチノサイト及びマウス個体で検討した。しかしながら、ミリストイル基付加ペプチドを除いて、ケラチノサイトへの導入効率及び PKCeta 活性抑制効果は低く、有効性は確認できなかった。またミリストイル基付加ペプチドも、マウスへの経皮吸収効率は非常に低く、効果が確認できなかった。他の修飾や皮膚特異的ナノ粒子等のドラッグデリバリーシステムを検討する必要があると考えている。

以上の成果を基に更に、全身性慢性炎症性疾患への応用を検討した。特に、動脈硬化症への作用を ApoE ノックアウトマウス(ApoE KO)を用いて検討した。PKCeta siRNA を種々の導入試薬と共に尾静脈投与し、そのデリバリー効果・持続時間を検討した。その結果、特にコラーゲンベース試薬の効果が高いことが示された。また、PKCeta 遺伝子を欠損による動脈硬化への影響を検討するために、PKCeta ノックアウトマウスと ApoE KO とのダブルノックアウトマウスを製し、血液学的・組織病理学的な解析を行っている。以上のことから、アトピー性皮膚炎の分子標的治療法として、PKCeta を標的とした核酸医薬品の応用が考えられた。今回用いた siRNA は非修飾 RNA であり、今後、安定性に優れた架橋型人工核酸等の修飾 RNA の効果を検証し、またより高効率な皮膚内デリバリーシステムを構築することで臨床への応用へとつなげたい。

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 14 件)

1. Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S,

- Murata Y, Kusumoto S, Ando K, Ishida H, Ohnishi T, Sasaki Y.
Distinct Afatinib Resistance Mechanisms Identified in Lung Adenocarcinoma Harboring an EGFR Mutation.
Mol. Cancer Res. 2017 (*in press*) 査読有.
doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0482.
2. Toba-Ichihashi Y., Yamaoka T., Ohmori T. and Ohba M..
Up-regulation of Syndecan-4 contributes to TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells.
Biochem. Biophys. Reports. **5**, 1-7, 2016 査読有.
doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.021
 3. Yamaoka T., Ohmori T., Ohba M., Arata S., Kishino Y., Murata Y., Kusumoto S., Ishida H., Shirai T., Hirose T., Ohnishi T., and Sasaki Y.
The acquired resistant mechanisms for sequential treatment of EGFR-TKI to Met-TKI/EGFR-TKI in a Met amplified EGFR-TKI resistant lung adenocarcinoma cells, harboring EGFR activating mutation.
Mol. Cancer Ther. **15** (12): 3040-3054, 2016 査読有.
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0313
 4. Mori K, Uchida T, Fukumura M, Tamiya S, Higurashi M, Sakai H, Ishikawa F, Shibanuma M.
Linkage of E2F1 transcriptional network and cell proliferation with respiratory chain activity in breast cancer cells.
Cancer Sci. **107**(7): 963-971, 2016 査読有. doi: 10.1111/cas.12953.
 5. Toya E, Ohba M..
Improved long-term culture of epidermal stem cells utilizing CD200R-expressing feeder cells.
The Showa University Journal of Medical Sciences. **27**(2) 83-91, 2015 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/sujms/27/2/27_83/article
 6. Ito H., Hasegawa K., Hasegawa Y., Nishimaki T., Hosomichi K., Kimura S., Ohba M., Yao H., Onimaru M., Inoue I., and Inoue H.
Silver Nanoscale Hexagonal Column Chips for Detecting Cell-free DNA and Circulating Nucleosomes in Cancer Patients.
Scientific Reports. **5**, 10455, 2015 査読有 doi: 10.1038/srep10455.
 7. Son E., Kyung S., Lee S., Jeong S., Shin J., Ohba M., Yeo E., and Park J.
Role of Protein Kinase C (PKC) η in Cigarette Smoke Extract-Induced Apoptosis in Human Lung Fibroblasts.
Human and Exp. Toxicology. **34**(9):869-877, 2015 査読有.
doi: 10.1177/0960327114561343.
 8. Ishikawa F, Ushida K, Mori K, Shibanuma M.
Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling.
Cell Death Dis. **6**:e1619, 2015 査読有.
doi: 10.1038/cddis.2014.583.
 9. Okada S, Irié T, Tanaka J, Yasuhara R, Yamamoto G, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y., Mishima K.
Potential role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis.
J Oral Pathol Med. **44**(2):115-25 2015 査読有. doi: 10.1111/jop.12210.
 10. Tanaka J, Irié T, Yamamoto G, Yasuhara R, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y., Mishima K.
ANGPTL4 regulates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma.
J. Oral Pathol. Med. **44**(2):126-33, 2015 査読有. doi: 10.1111/jop.12212.
 11. Chattopadhyay R., Dyukova E., Singh N., Ohba M., and Rao G.
Vascular endothelial tight junctions and barrier function are disrupted by 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid

partly via protein kinase C ϵ -mediated zona occludens-1 phosphorylation at threonine 770/772.

J. Biol. Chem., **289** (6):3148-3163, 2014.
査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.528190.

12. Ishikawa F, Kaneko E, Sugimoto T, Ishijima T, Wakamatsu M, Yuasa A, Sampei R, Mori K, Nose K, Shibanuma M.

A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGF- β -mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **443**(3):821-7, 2014 査読有.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.050.

13. Yasuhara R, Irié T, Shiozawa E, Yamochi T, Tanaka J, Kohno Y, Fujikura M, Kimura Y, Hanazawa T, Seki K, Sano T, Shiota T, Kushima M, Takimoto M, Mishima K.

Plasmablastic lymphoma of the maxillary sinus with intraoral manifestation caused by direct alveolar bone infiltration in an HIV-negative patient.

J. Pathol Int. **64**(11):588-9, 2014 査読有.
doi: 10.1111/pin.12212.

14. Hayashi S, Tanaka J, Okada S, Isobe T, Yamamoto G, Yasuhara R, Irie T, Akiyama C, Kohno Y, Tachikawa T, Mishima K.

Lin28a is a putative factor in regulating cancer stem cell-like properties in side population cells of oral squamous cell carcinoma.

Exp Cell Res. **319**(8):1220-8, 2013

査読有. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.004.

[学会発表](計7件)

1. 大場 基, 外谷 衣都子, 山岡 利光, 佐々木康綱

Inhibition of metastasis of lung adenocarcinoma cells via the perturbed localization of Rab11/FIP1/RCP by PKCeta depletion.

第13回日本臨床腫瘍学会「ロイトン札幌(北海道・札幌市)」2015年7月16日~18日

2. 大場 基, 外谷 衣都子, 山岡 利光, 大森 亨, 佐々木康綱

PKCetaは膜トラフィック制御を介して、

肺腺がん細胞の増殖と運動を抑制する
第37回日本分子生物学会年会「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」2014年11月25日~27日

3. 大場 基, 外谷 衣都子, 山岡 利光, 大森 亨, 佐々木康綱

EGFR, METの膜輸送を介したPKCetaによる肺腺癌細胞の増殖制御機構

第73回日本癌学会学術総会「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」2014年9月25日~27日

4. 大場 基, 外谷 衣都子, 山岡 利光, 大森 亨, 黒木 登志夫, 佐々木康綱.

PKCeta controls the proliferation of lung adenocarcinoma cells via EGFR and MET endocytic trafficking.

第12回日本臨床腫瘍学会「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」2014年7月17日~19日

5. 外谷 衣都子, 山岡 利光, 大森 亨, 佐々木 康綱, 大場 基.

非小細胞肺癌細胞におけるPKCetaによる細胞遊走・浸潤制御機構の解析

日本薬学会 第134回年会「ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)」

2014年3月27日~3月30日

6. 大場 基, 外谷 衣都子, 山岡 利光, 大森 亨, 佐々木康綱

非小細胞肺癌に対する新たな治療標的としてのprotein kinase Ceta

日本薬学会 第134回年会「ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)」2014年3月27日~3月30日

7. Ohba M., Ohmori T., Kuroki T. and Toya E..

Differential role of protein kinase C eta in cell growth between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma.

19th International Heidelberg Symposium. 「鹿児島大(鹿児島県・鹿児島市)」2013年2月13日~16日.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: PKC 遺伝子発現阻害 siRNA及びそれを含む医薬品

発明者: 大場 基

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2015-206380

出願年月日: 平成 27 年 10 月 20 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

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

柴沼 質子 (Shibanuma, Motoko)
昭和大学・薬学部・教授
研究者番号：60245876

河野 葉子 (Kohno, Yohko)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号：40195681

(4) 研究協力者

()