

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成23年度)

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	リン脂質代謝を介した増殖・分化制御機構の解明:日本発創薬への基盤作り
研究機関・ 部局・職名	東京薬科大学・生命科学部・教授
氏名	深見 希代子

## 1. 当該年度の研究目的

1. 組織幹細胞の増殖と分化制御における Phospholipase C(PLC)  $\delta$  1 の役割の解析1-1: 皮膚恒常性維持における PLC  $\delta$  1 の機能解析

表皮限定的PLC  $\delta$  1遺伝子欠損(KO)マウスが、顆粒球数の急増など全身的な異常を誘導するメカニズムをサイトカインに注目して検討する。すでに皮膚でIL-23の発現が増加していることを見出しているため、皮膚での恒常性の破綻がどのような機構で顆粒球の増加を誘導するのか、介在する因子や細胞を同定することにより、皮膚におけるリン脂質代謝の重要性を明らかにする。

1-2: 肥満と脂肪細胞形成における PLC  $\delta$  1 の重要性の検証

PLC  $\delta$  1KO マウスはヤセ型で、脂肪前駆細胞から白色脂肪への分化が抑制され、逆に褐色脂肪が維持され熱産生能が亢進していることを明らかにしてきた。褐色脂肪分化と熱産生機能における PLC  $\delta$  1 の役割を明らかにし、肥満防止への応用性を目指す。

## 2. リン脂質の偏りが創る新たな細胞機能の解明

## 2-1: 癌細胞転移における PIP2 偏在機能の解明

ヒト乳癌細胞の浸潤突起形成では PIP2 が必要であることを最近報告した。また PIP2 合成酵素の遺伝子発現抑制が大腸癌細胞での分化誘導剤による E-カドヘリンの発現を阻害することを見出し、癌細胞の悪性化における PIP2 の重要性が判明してきている。そこで、細胞接着や浸潤突起形成に PIP2 がどのように関与するのか詳細な検討を行なう。

## 3. リン脂質代謝をターゲットとした創薬へのアプローチ

## 3-1: 癌細胞悪性化を阻害する薬剤のスクリーニング

上皮・間葉転換は癌細胞の悪性化に重要な役割を担っている。上皮細胞のマーカーである E-カドヘリンの発現を指標とした siRNA ライブラリーのスクリーニングを行なう。また低分子量化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、リード化合物を探索する。またリン脂質代謝と E-カドヘリンの発現、上皮・間葉転換との関連性を明らかにする。

## 2. 研究の実施状況

### 1-1: 皮膚恒常性維持における PLC $\delta$ 1 の機能解析

表皮特異的 PLC $\delta$ 1 遺伝子欠損マウスを作製した所 (cKO マウス)、IL-17 量および顆粒球増加の増加が誘導されたことから、表皮での PLC $\delta$ 1 遺伝子欠損が IL-17 量の増加を誘導することが明らかになった。cKO マウスでは顆粒球増加を引き起こす G-CSF 量が血清中で増加していた。また皮膚では IL-23 の発現量の増加、およびヒトの皮膚炎症性疾患で見られる遺伝子の発現増加も観察された。以上のことから、表皮での PLC $\delta$ 1 遺伝子欠損が皮膚での炎症誘導のみならず、血清中でサイトカイン発現制御を介して全身的な顆粒球増加をもたらすことが明らかになった。

### 1-2: 肥満と脂肪細胞形成における PLC $\delta$ 1 の重要性の検証

PLC $\delta$ 1KOマウスはヤセ型で、白色脂肪量が高脂肪食下でも少ないこと、逆に褐色脂肪の機能が維持され熱産生能が亢進していることが明らかになった。また PLC $\delta$ 1KOマウスではエネルギー代謝が亢進していることが判明した。

そこで次に PLC $\delta$ 1 を発現抑制した 3T3L1 脂肪前駆細胞を脂肪細胞へと分化させた所、顕著に脂肪滴の蓄積が抑制された。またこの細胞では、脂肪分化に関与する遺伝子の発現が顕著に抑制された。このことは PLC $\delta$ 1 が白色脂肪の分化を正に制御していることを示している。

次に PLC $\delta$ 1KOマウスから不死化褐色脂肪細胞を樹立し、分化誘導後の熱産生能を検討した所、uncoupling protein 1 (UCP1) 等の遺伝子が顕著に発現増加しており、熱産生能が亢進している事が判明した。このことは PLC $\delta$ 1 が褐色脂肪の熱産生能を負に制御していることを示している。これらの結果から、PLC $\delta$ 1 は白色脂肪の分化と褐色脂肪の熱産生能を制御する事により、肥満形成に重要な役割を担うことが明らかになった。

### 2-1: 癌細胞転移における PIP2 偏在機能の解明

大腸癌細胞 SW480 細胞の悪性化における PIP2 の重要性を明らかにするため、種々の PIP2 合成酵素等の遺伝子発現抑制を行ない、E-カドヘリンの発現に影響を及ぼす酵素を同定した。

phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type II beta (PIP2KII $\beta$ ) の遺伝子発現抑制を行なった時に、1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ 処理により E-カドヘリンの発現誘導が抑制されることが判明した。また同様に PIP2KII $\beta$  を遺伝子発現抑制した場合には高い浸潤能が維持された。このことは PIP2KII $\beta$  が特異的に PIP2 合成を介して E-カドヘリンの発現誘導に関与している事を示している。

### 3-1: 癌細胞悪性化を阻害する薬剤のスクリーニング

メラノーマ細胞や大腸癌細胞など種々な癌細胞において、E-カドヘリンの発現量と悪性度とに逆相関性が見られた。E-カドヘリンの発現量の少ない癌細胞を用いて、ある集団の siRNA ライブラリーで処理し、E-カドヘリンの発現が上昇することを指標に、E-カドヘリンの発現に関与する遺伝子を検索した。同様に低分子量化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、いくつかの候補遺伝子と化合物を見出している。

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 11 件
計 11 件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. K.Sakurai, M. Hirata, H.Yamaguchi, Y. Nakamura, K. Fukami; Phospholipase Cδ3 is a novel binding partner of Myosin VI and functions as anchoring of Myosin VI on plasma membrane. <b>Advan. Enzyme Regul.</b> (2011) 51, 171–181</li> <li>2. Z. Kouchi, T. Igarashi, N. Shibayama, S. Inanobe, K. Sakurai, H. Yamaguchi, T. Fukuda, S. Yanagi, Y. Nakamura, K. Fukami; Phospholipase Cδ3 regulates RhoA/Rho kinase signaling and neurite outgrowth. <b>J. Biol. Chem.</b> (2011) 286, 8459-71</li> <li>3. K. Yamamoto, Y. Taketomi, Y. Isogai, Y. Miki, H. Sato, S. Masuda, Y. Nishito, K.Morioka, Y. Ishimoto, N. Suzuki, Y. Yokota, K. Hanasaki, Y. Ishikawa, T. Ishii, T. Kobayashi, K. Fukami, K. Ikeda, H. Nakanishi, R.Taguchi, M. Murakami; Hair follicular expression and function of group X secreted phospholipase A2 in mouse skin. <b>J. Biol. Chem.</b> (2011) 286, 11616-31</li> <li>4. Z. Kouchi, Y. Fujiwara, H. Yamaguchi, Y. Nakamura, K. Fukami; Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type II beta is required for vitamin D receptor-dependent E-cadherin expression in SW480 cells. <b>Biochem. Biophys. Res. Comm.</b> (2011) 408, 523-9</li> <li>5. M. Hirata, M. Suzuki, R. Ishii, R. Satow, T. Uchida, T. Kitazumi, T. Sasaki, T. Kitamura, H. Yamaguchi, Y. Nakamura, K. Fukami; Genetic defect in phospholipase Cδ1 protects mice from obesity by regulating thermogenesis and adipogenesis. <b>Diabetes</b> (2011) 60, 1926-37</li> <li>6. H. Yamaguchi, S. Yoshida, E. Muroi, N. Yoshida, M. Kawamura, Z. Kouchi, Y. Nakamura, R. Sakai, K. Fukami; Phosphoinositide 3-kinase signaling mediated by p110α regulates invadopodia formation. <b>J. Cell Biol.</b> (2011) 193, 1275-88</li> <li>7. N. Okamoto, M. Yasukawa, C. Nguyen, V. Kasim, Y. Maida, R. Possemato, T. Shibata, K. L. Ligon, K. Fukami, W. C. Hahn, K. Masutomi; Telomerase and retrotransposons: reverse transcriptases that shaped genomes special feature sackler colloquium: maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. <b>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</b> (2011) 108, 20388-93</li> <li>8. K. Tsutsumi, M. Matsuda, M. Kotani, A. Murakami, I. Takahashi, Y. Terada, T.Kanematsu, K. Fukami, T. Takenawa, E. Jimi, M. Hirata; Involvement of PRIP, phospholipase C-related, but catalytically inactive protein, in bone formation. <b>J. Biol. Chem.</b> (2011) 286, 31032-42</li> <li>9. H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki; <i>Scale</i>: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. <b>Nature Neurosci.</b> (2011) 14, 1481-8</li> <li>10. R. Satow, M. Shitashige, T. Jigami, K. Fukami, K. Honda, I.Kitabayashi, T.Yamada; β-catenin antagonizes <i>PML</i> tumor suppressor function by inhibiting SUMOylation and nuclear body formation. <b>Gastroenterology</b> (2012) 142, 572-81</li> <li>11. H. Kurokawa, H. Noda, M. Sugiyama, A. Sakaue-Sawano, K. Fukami, A. Miyawaki; Software for precise tracking of cell proliferation. <b>Biochem. Biophys. Res. Comm.</b> (2012) 417, 1080-5</li> </ol>

様式19 別紙1

	<p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計19件</p>	<p>専門家向け 計17件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Y. Nakamura, K. Kanemaru, K. Fukami; Epidermal phospholipase C-<math>\delta</math>1 regulates systemic IL-17 level and granulocyte counts. New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine, 2011/11, Fukuoka</li> <li>2. K. Kanemaru, Y. Nakamura, M. Yamaguchi, K. Fukami; Loss of epidermal phospholipase C <math>\delta</math>1 results in a systemic granulocytosis in mice. New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine. 2011/11, Fukuoka</li> <li>3. M. Suzuki, M. Hirata, R. Ishii, R. Satow, T. Uchida, F. Yoshino, Y. Nakamura, K. Fukami; Physiological functions of Phospholipase C<math>\delta</math>1 in adipogenesis and thermogenesis. New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine. 2011/11, Fukuoka</li> <li>4. M. Kawamura, K. Fukami; Methotrexate induces E-cadherin expression in colon cancer cells. The 7th KOREA-JAPAN Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2012/2, Ulsan</li> <li>5. R. Kojima, K. Fukami; A simultaneous loss of phospholipase C delta1 and delta3 causes cardiac failure. The 7th KOREA-JAPAN Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2012/2, Ulsan</li> <li>6. M. Suzuki, K. Fukami; Physiological functions of Phospholipase C<math>\delta</math>1 in adipogenesis and thermogenesis. The 7th KOREA-JAPAN Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2012/2, Ulsan</li> <li>7. 金丸佳織、中村由和、山口真美、深見希代子; 表皮特異的な PLC <math>\delta</math>1 の欠損は、皮膚のサイトカインバランスを乱し、全身性顆粒球増加を引き起こす、第53回日本脂質生化学会、2011/5、東京</li> <li>8. 鈴木睦実、平田真之、石川里佳、内田崇史、吉野芙美子、中村由和、深見希代子; 褐色脂肪におけるホスホリパーゼ C <math>\delta</math>1 の生理機能解析、第53回日本脂質生化学会、2011/5、東京</li> <li>9. 児島亮太、中村由和、橋本悠希、深見希代子; ホスホリパーゼ C <math>\delta</math>1 と <math>\delta</math>3 の同時欠損は心臓の繊維化を引き起こす、第53回日本脂質生化学会、2011/5、東京</li> <li>10. 山口真美、金丸佳織、中村由和、深見希代子; ホスホリパーゼ C <math>\delta</math>1 欠損マウスはペントバルビタール麻酔に対する感受性が低下する、第84回日本生化学会、2011/09、京都</li> <li>11. 児島亮太、中村由和、橋本悠希、深見希代子; ポスターホスホリパーゼ C <math>\delta</math>1 と <math>\delta</math>3 の同時欠損は心臓の線維化を引き起こす、第84回日本生化学会大会、2011/9、京都</li> <li>12. 鈴木睦実、平田真之、石川里佳、内田崇史、吉野芙美子、中村由和、深見希代子; 肥満形成におけるホスホリパーゼ C <math>\delta</math>1 の生理的役割、第84回日本生化学会大会、2011/9、京都</li> <li>13. 金丸佳織、中村由和、山口真美、佐藤浩二郎、深見希代子; 表皮特異的な PLC <math>\delta</math>1</li> </ol>

様式19 別紙1

	<p>の欠損は、全身性顆粒球増加を引き起こす、第 84 回日本生化学会大会、2011/9、京都</p> <p>14. 岡本奈緒子、安川麻美、Christine Nguyen、深見希代子、William C. Hahn、増富健吉; hTERT、BRG1、NS 複合体による tumor initiating cell の誘導、第 70 回日本癌学会学術総会、2011/10、愛知</p> <p>15. Y. Nakamura, K. Kanemaru, S. Inanobe, K. Fukami; Mice lacking epidermal phospholipase C <math>\delta</math> 1 show accerelated wound healing, 第 37 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会、2011/12、京都</p> <p>16. Kaori, Kanemaru, Yoshikazu, Nakamura, Mami, Yamaguchi, Kiyoko, Fukami, Loss of epidermal phospholipase C <math>\delta</math> 1 results in activation of IL-23/IL-17 axis and granulocytosis, 第 37 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会、2011/12、京都</p> <p>17. 深見希代子. ホスホリパーゼ C <math>\delta</math> 1 の代謝調節における役割の解明、群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点シンポジウム、2012/1、前橋(招待講演)</p> <p>一般向け 計 2 件</p> <p>1. 深見希代子.新入生へのメッセージ、新歓キャンプ、2011/5、東京</p> <p>2. 深見希代子. 生命科学の発展がもたらすもの、東久留米高校模擬講義、2011/12、東京</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p>1. A. M. Høye, J. R. Couchman, U. M. Wewer, K. Fukami, A. Yoneda; The newcomer in the integrin family: Integrin <math>\alpha</math>9 in biology and cancer. <b>Adv. Biol. Reg.</b> in press</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~genome/Site/home.html">http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~genome/Site/home.html</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1.「新入生へのメッセージ」平成23年5月7日、東京薬科大学、約120名 2.「生命科学の発展がもたらすもの」平成23年12月20日、東久留米高校、約50名</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	108,000,000	60,800,000		47,200,000	
間接経費	32,400,000	18,240,000		14,160,000	
合計	140,400,000	79,040,000	0	61,360,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	25,810,000	0	0	25,810,000	21,512,103	4,297,897	
間接経費	18,112,720	0	0	18,112,720	18,112,720	0	
合計	43,922,720	0	0	43,922,720	39,624,823	4,297,897	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	20,155,019	実験試薬、化合物サンプル、実験用器具・機器
旅費	127,760	学会等での研究成果発表のための旅費
謝金・人件費等	155,777	実験補助員人件費
その他	1,073,547	学術誌掲載に係る費用
直接経費計	21,512,103	
間接経費計	18,112,720	
合計	39,624,823	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名	
CO2インキュベーター	サンヨー MCO- 18AC	2	680,000	1,360,000	2011/11/7	東京薬科大学	(税抜き)
デジタルCCDカメラ	浜松ホトニクス ORCA-R2 C10600-10B	1	1,900,000	1,900,000	2012/3/7	東京薬科大学	(税抜き)
細胞内カルシウム濃度 測定装置一式	デジタルインターフェー スM7791-19	1	878,300	878,300	2012/3/7	東京薬科大学	(税抜き)
マイクロ冷却遠心機	久保田 3700型	1	511,450	511,450	2012/3/5	東京薬科大学	(税抜き)