

**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 24 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 : 表皮形成における 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詳細に解析する。また PLC  $\delta$  1 欠損による表皮の分化異常がもたらす疾患例としてアトピー性皮膚炎や乾癬などの皮膚疾患に着目し、PLC  $\delta$  1 の関与を検討する。

**1-2 : 肥満と筋細胞における PLC  $\delta$  1 の機能解析**

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。褐色脂肪と同様に熱産生機能を持つ筋肉に今回着目し、PLC  $\delta$  1 の関与を検討し、肥満防止への応用性を目指す。

**1-3 : PLC  $\delta$  1 /  $\delta$  3DKO マウスを用いた個体発生における PLC の重要性の検証**

PLC  $\delta$  1 /  $\delta$  3DKO は胎盤の形成不全により胎生致死となる。そこで正常な胎盤機能を持つコンディショナル DKO マウスを作製したので、個体の形態形成における PLC  $\delta$  タイプの新たな機能を明らかにする。

**2. リン脂質の偏りが創る新たな細胞機能の解明**

**2-1 : 癌細胞における細胞外 PIP2 偏在機能の解明**

リン脂質 PIP2 は細胞二重膜内膜に存在するリン脂質であるが、サポニン非存在下、抗 PIP2 抗体で特徴ある染色像が観察されることから、PIP2 が必要に応じて外側に局在するという概念を検証する。

**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 : 酵素の機能を制御する低分子量化合物の探索**

PLC  $\delta$  1 や PIP2 合成酵素が種々の皮膚疾患や癌細胞の悪性化、薬剤耐性機構、肥満形成などに関与している事実を基に、これらを分子標的とした低分子量化合物をライブラリーから探索する。

**3-2 : 癌細胞悪性化を阻害する薬剤のスクリーニング**

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たので、E-カドヘリンの発現を指標に、siRNA ライブラリーや低分子量化合物ライブラリーのスクリーニングを行いシード化合物を探索する。

## 2. 研究の実施状況

### 1. 組織幹細胞の増殖と分化制御における PLC $\delta$ 1 の役割の解析

#### 1-1 : 表皮形成における PLC $\delta$ 1 の機能解析

- 表皮限定的PLC  $\delta$  1遺伝子欠損が、顆粒球増加をもたらすメカニズムを検討し、表皮細胞の異常がサイトカインの1つIL-23の発現増加、IL-17の局所リンパ節および血中での増加、G-CSFの血中での増加を介して顆粒球増加を引き起こす事を明らかにした。この事は表皮でのPLC  $\delta$  1遺伝子欠損が、皮膚での乾癬様の疾患を誘導すると同時に、全身的な異常を引き起こす事を示している。これらの結果を、Nature Communicationsに発表した。
- 次にアトピー性皮膚炎の患者さんからの皮膚切片での PLC  $\delta$  1の発現を検討し、発現が減少していることを見いだした。またアトピー性皮膚炎の皮膚で見られる肥満細胞や好酸球の浸潤性をPLC $\delta$ 1遺伝子欠損マウスで染色により検討したところ、これらの免疫細胞が増加していることが明らかとなった。IgE及びIgG1の増加も観察された。これらの結果は、 PLC $\delta$ 1がアトピー性皮膚炎に関与していることを示している。

#### 1-2 : 肥満と筋細胞における PLC $\delta$ 1 の機能解析

- PLC  $\delta$  1 発現抑制した筋芽細胞 C2C12 細胞を分化誘導し、UCP2, 3 などの熱産生に関する遺伝子の発現を調べることで熱産生機能を検討したが、 PLC  $\delta$  1 が筋細胞での熱産生に関与するという有意な結果は得られなかった。

#### 1-3 : PLC $\delta$ 1 / $\delta$ 3DKO マウスを用いた個体発生における PLC の重要性の検証

- PLC  $\delta$  1 /  $\delta$  3DKOで見られた胎盤の形成不全による胎生致死を回避するため、正常な胎盤機能を持つコンディショナルDKOマウスを作製した。両遺伝子の発現が顕著に多い心臓で心肥大や線維化などの異常が観察された。そこで心臓超音波検査を行なった所、ポンプ機能などの低下などが確認された。心不全マーカーであるナトリウム利尿ペプチドANPやBNPの上昇も見られた。更にコンディショナルDKOマウス心筋や PLC  $\delta$  1 /  $\delta$  3遺伝子発現抑制したH9c2ラット心筋芽細胞においてアポトーシスが生じていることが判明した。これらの結果より、PLC  $\delta$  1 /  $\delta$  3両遺伝子欠損は心臓においてアポトーシスを誘導し、その結果心臓の繊維化が起こり、心機能の低下がもたらされると考えられた。

### 2. リン脂質の偏りが創る新たな細胞機能の解明

#### 2-1 : 癌細胞における細胞外 PIP2 偏在機能の解明

- PIP2 は細胞二重膜外側に存在することが、抗 PIP2 抗体染色で示唆されたので、PIP2 と親和性の高いドメインタンパクを用いて同様の現象が観察されるかを検証した。PIP2 と結合性が高い PLC  $\delta$  1PH ドメインと、結合部位に変異を導入したものを作製し、大腸がん細胞でまた PIP2 が細胞二重膜外側に局在する事を示唆するデータを得た。今後データの信頼性を検証すると共に、生理的意義を検討する。

### 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 : 酵素の機能を制御する低分子量化合物の探索

- PLC  $\delta$  1 の発現に大きな影響を与える低分子量化合物を見出している。細胞運動や浸潤性への影響を現在検討している。

#### 3-2 : 癌細胞悪性を阻害する薬剤のスクリーニング

- E-カドヘリンの発現を指標に、siRNAライブラリーや低分子量化合物ライブラリーのスクリーニングを行ない、E-カドヘリンの発現に関与する新たな分子や低分子量化合物を見出している。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 4 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kanemaru, K., Nakamura, Y., Sato, K., Kojima, R., Takahashi, S., Yamaguchi, M., Ichinohe, M., Kiyonari, H., Shioi, G., Kabashima, K., Nakahigashi, K., Asargiri, M., Jamora, C., Yamaguchi, H., and <u>Fukami, K.</u> K. Epidermal phospholipase Cδ1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. Nat. Commun. <b>3</b>, 963 (2012).</li> <li>2. Satow, R., Shitashige, M., Jigami, T., <u>Fukami, K.</u>, Honda, K., Kitabayashi, I., and Yamada, T. β-catenin antagonizes PML tumor suppressor function by inhibiting SUMOylation and nuclear body formation. Gastroenterology <b>142</b>, 572-81 (2012).</li> <li>3. Kurokawa, H., Noda, H., Sugiyama, M., Sakaue-Sawano, A., <u>Fukami, K.</u>, and Miyawaki, A. Software for precise tracking of cell proliferation. Biochem. Biophys. Res. Comm. <b>417</b>, 1080-5 (2012).</li> <li>4. Runkel, F., Hintze, M., Griesing, S., Michels, M., Blanck, B., <u>Fukami, K.</u>, Guénet, J.L., and Franz, T. Alopecia in a viable Phospholipase C delta 1 and Phospholipase C delta 3 double Mutant. PLoS ONE <b>7</b>, e39203 (2012).</li> </ol> <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 22 件</p>	<p>専門家向け 計 19 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kanemaru, K., Nakamura, Y., and <u>Fukami, K.</u> Loss of epidermal phospholipase C δ1 results in IL-23/IL-17 axis activation and granulocytosis, 42<sup>nd</sup> Annual European Society for Dermatological Research Meeting 2012/9, Venice, ITALY</li> <li>2. Hirano, T., Kawamura, M., Kato, A., Tamura, M., Satow, R., and <u>Fukami, K.</u> Methotrexate induces E-cadherin expression in colon cancer cells, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists &amp; The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 2012/5, KOBE</li> <li>3. 橋本悠希、児島亮太、中村由和、<u>深見希代子</u>. ホスホリパーゼCδ1とδ3は正常な心機能の維持に重要である、第54回日本脂質生化学会、2012/6、福岡</li> <li>4. 内田崇史、米田敦子、<u>深見希代子</u>. マクロファージにおけるホスホリパーゼCδ1の生理機能解析、第54回日本脂質生化学会、2012/6、福岡</li> <li>5. 金丸佳織、中村由和、梶島健治、<u>深見希代子</u>. 表皮特異的なPLCδ1の欠損は乾癬様皮膚炎を引き起こす、第54回日本脂質生化学会、2012/6、福岡</li> <li>6. 中村由和、金丸佳織、梶島健治、<u>深見希代子</u>. ホスホリパーゼCδ1はアトピー性皮膚炎発症因子フィラグリンの発現を制御する、第54回日本脂質生化学会、2012/6、福岡</li> <li>7. 岡本奈緒子、加藤友康、吉田正行、山口聡子、安川麻美、木下圭太、<u>深見希代子</u>、津田均、増富健吉. 卵巣がんの組織型におけるがん幹細胞関連遺伝子の発現検討、第71回日本癌学会学術総会、2012/9、札幌</li> </ol>

8. Nakamura, Y., Kanemaru, K., Kabashima, K., Nakahigashi, K., and Fukami, K. Phospholipase C d1 is required for normal expression of profilaggrin in keratinocytes, 第37回日本研究皮膚科学会、2012/12、沖縄
9. Kanemaru, K., Nakamura Y., Kabashima, K., Nakahigashi, K., and Fukami, K. Epidermal phospholipase Cd1 regulates systemic interleukin-17 levels and granulocyte counts in mice, 第37回日本研究皮膚科学会、2012/12、沖縄
10. 中村由和、金丸佳織、深見希代子. Phospholipase Cδ1は表皮角化細胞におけるプロフィラグリンの正常な発現に必須である、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
11. 金丸佳織、中村由和、深見希代子. 表皮におけるホスホリパーゼCδ1の欠損は血清中のIL-17濃度を上昇させ顆粒球増多を引き起こす、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
12. 山口眞美、金丸佳織、中村由和、深見希代子. ホスホリパーゼCδ1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85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
13. 伊藤優未、山口英樹、深見希代子、本田一文、三浦奈、山田哲司、堺隆一. 浸潤突起形成におけるアクチニン4の機能解析、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
14. 吉田那智、山口英樹、高梨美帆、田中弘文、深見希代子、柳原五吉. スキルス胃癌細胞株におけるc-Met受容体型チロシンキナーゼ依存性の検討、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
15. 高梨美帆、山口英樹、吉田那智、深見希代子、柳原五吉、堺隆一. スキルス胃癌細胞株における分子標的薬剤感受性の違い、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
16. 佐藤礼子、下重美紀、深見希代子、山田哲司. 大腸癌細胞においてβ-cateninはPMLの機能を阻害する、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
17. 吉田文乃、松村欣宏、馬郡健太、稲垣毅、深見希代子、酒井寿郎. ヒストンメチル化酵素SETB1のモノクローナル抗体の作製と脂肪細胞分化におけるChIP Seq解析と翻訳後修飾解析、第35回日本分子生物学会、2012/12、福岡
18. 岡本奈緒子、加藤友康、吉田正行、山口聡子、安川麻美、木下圭太、津田均、深見希代子、増富健吉. 卵巣がんにおけるがん幹細胞関連因子及びhTERT複合体の発現検討、第35回日本分子生物学会、2012/12、福岡
19. 中村加奈子、稲垣毅、松村欣宏、深見希代子、酒井寿郎. ChIP sequence法を用いた代謝関連Jmjd1a標的遺伝子の解析、第35回日本分子生物学会、2012/12、福岡

一般向け 計3件

1. 深見希代子. 生命科学の発展がもたらすもの、成蹊高校模擬講義、2012/11、東京
2. 深見希代子. 生命科学の発展がもたらすもの、八千代松陰高校模擬講義、2013/2、千葉
3. 深見希代子. 薬学と生命科学への想い、岐阜薬科大学80周年記念、2012/9

様式19 別紙1

<p>図書 計1件</p>	<p>1. Høye, A. M., Couchman, J. R., Wewer, U. M., <u>Fukami, K.</u>, and Yoneda. A. The newcomer in the integrin family: Integrin <math>\alpha 9</math> in biology and cancer. Adv. Biol. Reg. <b>52</b>, 326-39,(2012).</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. <u>深見希代子</u>. 生命科学の発展がもたらすもの、成蹊高校模擬講義、2012/11、東京 2. <u>深見希代子</u>. 生命科学の発展がもたらすもの、八千代松陰高校模擬講義、2013/2、千葉</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計2件</p>	<p>1. 2012年7月24日 日経産業新聞 「皮膚に赤い発疹 酵素減が関連か -東京薬科大、マウス実験」 2. 2012年7月18日 日刊工業新聞 「東京薬科大、乾癬発症に関与する皮膚の脂質代謝酵素を発見」</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

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	23,000,000	24,200,000	0
間接経費	32,400,000	18,240,000	6,900,000	7,260,000	0
合計	140,400,000	79,040,000	29,900,000	31,460,000	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	4,297,897	23,000,000	0	27,297,897	23,073,434	4,224,463	0
間接経費	0	6,900,000	0	6,900,000	6,900,000	0	0
合計	4,297,897	29,900,000	0	34,197,897	29,973,434	4,224,463	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	18,467,082	実験試薬、化合物サンプル、実験用器具、機器類
旅費	84,820	学会等での研究成果発表の為の旅費
謝金・人件費等	2,684,173	実験補助員の人件費(2名分)
その他	1,837,359	論文出版掲載料、解析依頼等
直接経費計	23,073,434	
間接経費計	6,900,000	
合計	29,973,434	

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
小型恒温振とう培養機	バイオシェーカー タイテック BR-23FP/MR	1	584,000	584,000	2013/1/28	東京薬科大学
				0		
				0		

【税抜】