

課題番号	LS115
------	-------

**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25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

<p><b>1. 組織幹細胞の増殖と分化制御における Phospholipase C(PLC)δ1 の役割の解析</b></p> <p><b>1-1: 表皮形成における PLC δ1 の機能解析</b></p> <p>PLC δ1 欠損による表皮の分化異常をもたらす症例としてアトピー性皮膚炎に着目し、PLC δ1 の関与を検討する。表皮限定的 PLC δ1 遺伝子欠損マウスでの表皮バリア機能、免疫細胞の浸潤性の検討、血清中の IgE 量の測定等により、アトピー性皮膚炎での PLC δ1 の役割を検証する。また初代培養細胞の3次元培養系を構築し、in vitro での PLC δ1 発現抑制による関与の検証を行なう。</p> <p><b>1-2: PLC δ1/δ3DKO マウスを用いた個体発生における PLC の重要性の検証</b></p> <p>PLC δ1/δ3DKO は胎盤の形成不全により胎生致死となる。そこで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(cDKO)マウスを作製した。cDKO マウス個体では心臓の線維化や肥大が見られ、心機能の低下を示す事が明らかになってきている。そこでマウスを用いた生理的機能解析と共に、培養細胞を用いて心機能不全に至る原因解明を行なう。</p> <p><b>2. リン脂質代謝をターゲットとした創薬へのアプローチ</b></p> <p><b>2-1: 酵素の機能を制御する低分子量化合物の探索</b></p> <p>リン脂質代謝との関連が判明してきている E-カドヘリンの発現を指標にした低分子量化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった結果、いくつかの低分子量化合物を見出した。E-カドヘリンの発現はがん細胞の悪性を阻害することから、創薬シーズになる可能性を検討する。</p> <p><b>2-2: 癌細胞悪性を阻害する標的分子の同定</b></p> <p>E-カドヘリンの発現を指標に、siRNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、興味深い転写因子を見出した。今年度はこの転写因子による E-カドヘリンの発現制御の検証、過剰発現系の構築に検討や、マウスへの過剰発現細胞の移植によるがん細胞の悪性化への影響等を検討する。</p>
--

2. 研究の実施状況

<p><b>1-1: 表皮形成における PLC δ1 の機能解析</b></p> <p>表皮限定的 PLC δ1 遺伝子欠損マウスでは表皮の分化異常が生じ、表皮バリア機能、免疫細胞の浸潤等アトピー性皮膚炎に類似した表現型が観察された。また PLC δ1 遺伝子を発現抑制した初代培養細胞の3次元培養系(人工皮膚構造)においても、バリア機能の低下が観察された。</p> <p><b>1-2: PLC δ1/δ3DKO マウスを用いた個体発生における PLC の重要性の検証</b></p> <p>cDKOマウスの約半数は生後1週間以内に死亡し、生き残ったマウスでも心臓の線維化や肥大が見られている。今回心臓超音波検査等により、心機能の低下が生じていることが判明した。また</p>
--

cDKOマウスの心臓で免疫細胞の浸潤や炎症性サイトカインの産生増加など心筋炎様症状が起こっていた。またこれらの現象に先立って心筋細胞のアポトーシスが生じていることが判明した。さらに培養細胞でPLC  $\delta$  1/  $\delta$  3両遺伝子を発現抑制した場合にも、アポトーシスの増加と、下流シグナルであるPKC $\theta$ の活性化不全が観察された。こうした結果から、PLC  $\delta$  1/  $\delta$  3両遺伝子がPKC $\theta$ を介して心筋細胞の生存と機能に重要な役割を担うことが明らかになった。

**2-1: 酵素の機能を制御する低分子量化合物の探索**

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、見出した低分子量化合物について、増殖性、転移性、正常細胞への毒性などへの影響を検討した。大腸癌細胞に対して3種類、メラノーマ細胞に対して3種類の有望な化合物を見出した。

**2-2: 癌細胞悪性を阻害する標的分子の同定**

E-カドヘリンの発現を指標にした siRNA ライブラリーのスクリーニングを行ない、新たに見出した転写因子について、過剰発現系や発現抑制系を構築し、がん細胞に対する増殖性、細胞接着性、移動性を検討した結果、この転写因子ががん細胞の悪性に強く関わっていることが判明した。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 6 件
計 7 件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hirano, T., Satow, R., Kato, A., Tamura, M., Murayama, Y., Saya, H., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., and <u>Fukami, K.</u> Identification of novel small compounds that restore E-cadherin expression and inhibit tumor cell motility and invasiveness. <i>Biochem Pharmacol.</i> <b>86</b>, 1419-29 (2013).</li> <li>2. Lukacs, V., Hammond, G. R., Sharma, E., <u>Fukami, K.</u>, and Rohacs, T. Distinctive changes in plasma membrane phosphoinositides underlie differential regulation of TRPV1 in nociceptive neurons. <i>J. Neurosci.</i> <b>33</b>,11451-63 (2013).</li> <li>3. Staats, KA., Van, H. L., Jones, A. R., Bento, A. A., Van, H. A., Shatunov, A., Simpson. C.L., Lemmens. R., Jaspers. T., <u>Fukami, K.</u>, Nakamura, Y., Brown, RH. Jr, Van, D. P., Liston, A., Robberecht, W., Al-Chalabi. A., and Van, D. B.L. Genetic ablation of phospholipase C delta 1 increases survival in SOD1(G93A) mice. <i>Neurobiol. Dis.</i> <b>60</b>,11-7 (2013).</li> <li>4. Ishida, S., Matsu-ura, T., <u>Fukami, K.</u>, Michikawa, T., and Mikoshiba, K. Phospholipase C-<math>\beta</math>1 and <math>\beta</math>4 contribute to non-genetic cell-to-cell variability in histamine-induced calcium signals in HeLa cells. <i>PloS One</i> <b>9</b>, e86410 (2014).</li> <li>5. Yamaguchi, H., Yoshida, N., Takanashi, M., Ito, Y., <u>Fukami, K.</u>, Yanagihara, K., Yashiro, M., and Sakai R. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhou gastric carcinoma cells. <i>PloS One</i> <b>9</b>, e85485 (2014).</li> <li>6. Yamaguchi, H., Takanashi, M., Yoshida, N., Ito, Y., Kamata, R., <u>Fukami, K.</u>, Yanagihara, K., and Sakai, R. Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffusetype gastric carcinoma cells resistant to Met and FGFR inhibitors. <i>Cancer Sci.</i> <b>10</b>.12387 (2014).</li> </ol>
	(掲載済み一査読無し) 計 0 件
	(未掲載) 計 1 件

	<p>1. Nakamura, Y., Kanemaru, K., Kojima, R., Hashimoto, Y., Marunouchi, T., Oka, N., Ogura, T., Tanonaka, K., and <u>Fukami, K.</u> Simultaneous loss of phospholipase Cδ1 and phospholipase Cδ3 causes cardiomyocyte apoptosis and cardiomyopathy. Cell Death &amp; Dis. in press</p>
<p>会議発表 計 25 件</p>	<p>専門家向け 計 24 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kanemaru, K., Nakamura, Y., and <u>Fukami, K.</u> Loss of phospholipase Cδ1 impairs epidermal barrier and induces chronic dermatitis. International Investigative Dermatology, 2013/5, Edinburgh</li> <li>2. Nakamura, Y., Kanemaru, K., and <u>Fukami, K.</u> Keratinocyte-specific loss of Phospholipase Cδ1 results in aberrant activation of IL-23/IL-17 axis and skin inflammation. International Investigative Dermatology, 2013/5, Edinburgh</li> <li>3. Matsumura, Y., Yoshida, A., Nakaki, R., Wakabayashi, K., Inagaki, K., <u>Fukami, K.</u>, Aburatani, H., and Sakai, J. Histone H3K9 methyltransferase SETDB1 regulates metabolic switch of preadipocytes to adipocytes through repression of <i>C/EBPα</i>. Cold Spring Harbor meeting. 2013/11, Cold Spring Harbor</li> <li>4. Tamura, M., Satow, R., and <u>Fukami, K.</u> Identification of Novel Small Compounds that Restore E-cadherin Expression and Inhibit Tumor Cell Motility and Invasiveness, The 8<sup>th</sup> Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2013/11, Fukuoka</li> <li>5. Ogura, T., Kanemaru, K., Nakamura, Y., and <u>Fukami, K.</u> Phospholipase Cδ1 Regulates Keratinocyte Proliferation and differentiation, The 8<sup>th</sup> Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2013/11, Fukuoka</li> <li>6. Fujinaka, R., Yoneda, A., and <u>Fukami, K.</u> Function of PLC delta family in integrin-mediated cellular process, The 8<sup>th</sup> Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2013/11, Fukuoka</li> <li>7. 佐藤礼子、金丸佳織、中村由和、<u>深見希代子</u>.リン脂質代謝酵素に着目した病態モデルの構築、BIO Tech2013, 2013/5、東京</li> <li>8. 小倉崇寛、金丸佳織、中村由和、<u>深見希代子</u>. ホスホリパーゼ Cδ1 はセラチノサイトの増殖・分化を制御する、第 55 回脂質生化学会、2013/6、松島</li> <li>9. 金丸佳織、中村由和、<u>深見希代子</u>. ホスホリパーゼ Cδ1 の欠損は炎症性皮膚疾患を誘導する、第 55 回脂質生化学会、2013/6、松島</li> <li>10. Yoneda, A., Morgan-Fisher, M., Høye, A. M., Wewer, U. M., and <u>Fukami, K.</u> Fine regulation of common players in cancer cell migration and fibronectin matrix assembly, 第 65 回日本細胞生物学会大会、2013/6、名古屋(招待講演)</li> <li>11. 高梨美帆、山口英樹、吉田那智、<u>深見希代子</u>、堺隆一. スキルス胃癌細胞の腹膜播種における Met 受容体型チロシンキナーゼの役割 第 65 回日本細胞生物学会大会、2013/6、名古屋</li> <li>12. 工藤光野、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 の機能解析、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013/6、名古屋</li> </ol>

	<p>13. 伊藤優未、山口英樹、<u>深見希代子</u>、本田一文、三浦奈美、山田哲司、堺隆一. 浸潤突起形成におけるアクチニンアイソフォームの機能、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013/6、名古屋</p> <p>14. 米田敦子、Morgan-Fisher, M., Høye, A. M., Wewer, U. M., Couchman, J. R., <u>深見希代子</u>. 細胞外マトリックスと細胞内アクチン骨格とのインテグリンを介した双方向クロストーク、第45回日本結合組織学会学術大会 第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013/6、和歌山(招待講演)</p> <p>15. <u>深見希代子</u>、金丸佳織、中村由和. 酸性リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ C (PLC) <math>\delta 1</math> と <math>\delta 3</math> の生理機能解析、第86回日本生化学会大会、2013/9、横浜(招待講演)</p> <p>16. 中村由和、金丸佳織、<u>深見希代子</u>. 細胞膜リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ C <math>\delta 1</math> によるケラチノサイトの増殖、分化制御と表皮バリア形成、第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜(招待講演)</p> <p>17. 佐藤礼子、平野珠生、<u>深見希代子</u>. 大腸癌における PLCD1 の機能解析、第 86 回日本生化学会大会 2013/9、横浜</p> <p>18. Kanemaru, K., Nakamura, Y., and <u>Fukami, K.</u> Epidermal phospholipase C<math>\delta 1</math> regulates systemic interleukin-17 levels and granulocyte counts in mice.第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜 (招待講演)</p> <p>19. 岡臨、小倉崇寛、金丸佳織、中村由和、<u>深見希代子</u>.ホスホリパーゼ C <math>\delta 1</math> はケラチノサイトの増殖・分化を制御する、第86回日本生化学会大会、2013/9、横浜</p> <p>20. 新屋有希、金丸佳織、中村由和、<u>深見希代子</u>. イノシトールリン脂質代謝酵素と皮膚疾患の関連についての検討、第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜</p> <p>21. 鈴木沙知、米田敦子、<u>深見希代子</u>.フィブロネクチンマトリックス形成における <math>\delta</math> 型ホスホリパーゼ C の機能解析、第 86 回日本生化学会大会 2013/9、横浜</p> <p>22. 戸村詩織、佐藤礼子、<u>深見希代子</u>. 大腸癌細胞における E-cadherin 発現制御に関与する PLC アイソフォームの同定、第 86 回日本生化学会大会、2013/9、横浜</p> <p>23. 松雪綾乃、金丸佳織、中村由和、<u>深見希代子</u>. 肥満合併による乾癬悪化を再現するマウスモデルの確立、第86回日本生化学会大会、2013/9、横浜</p> <p>24. 佐藤礼子、<u>深見希代子</u>. 大腸癌の進展における PLCD1 の機能解析 第72回日本癌学会学術総会、2013/10、横浜</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>1. <u>深見希代子</u>. 生命科学の発展は未来を変える、いちよう塾、2013/7、八王子</p>
<p>図書 計 4 件</p>	<p>1. Nakamura, Y., Kanemaru, K., Fukami, K. Physiological functions of phospholipase C<math>\delta 1</math> and phospholipase. C<math>\delta 3</math>. Adv. Biol. Regul. <b>53</b>, 356-62 (2013).</p> <p>2. Fukami, K., Nakamura, Y. The role of phospholipase C isozymes in cellular homeostasis. Phospholipases in Health and Disease in press</p> <p>3. 深見希代子、中村由和 ホスホリパーゼ C (PLC)による恒常性維持機構とその破綻がもたらす疾病 医学のあゆみ 248 (13) 1051-1058 (2013).</p>

様式19 別紙1

	4. 金丸佳織、中村由和、深見希代子 表皮におけるイノシトールリン脂質代謝の役割 生化学 ミニレビュー 印刷中
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	<a href="http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~genome/Site/pages/main.html">http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~genome/Site/pages/main.html</a> (東京薬科大学生命科学部ゲノム病態医科学研究室 HP)
国民との科学・技術対話の実施状況	<u>深見希代子</u> . 「生命科学の発展は未来を変える」 いちよう塾、2013/7、八王子
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25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	83,800,000	24,200,000	0	0
間接経費	32,400,000	25,140,000	7,260,000	0	0
合計	140,400,000	108,940,000	31,460,000	0	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	4,224,463	24,200,000	0	28,424,463	28,424,463	0	0
間接経費	0	7,260,000	0	7,260,000	7,260,000	0	0
合計	4,224,463	31,460,000	0	35,684,463	35,684,463	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	24,741,605	実験試薬、化合物サンプル、実験用器具、機器類
旅費	312,405	学会等での研究成果発表のための旅費
謝金・人件費等	2,371,331	実験補助員の人件費(2名分)
その他	999,122	論文出版掲載料、機器修理等
直接経費計	28,424,463	
間接経費計	7,260,000	
合計	35,684,463	

## 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	
ラボ用オートクレーブ 50L	トミー LSX-500	2	530,000	1,060,000	2013/5/13	東京薬科大学	【税抜】
超低温槽	CLN-32U 327LXW715+81X D765XH1975	1	944,000	944,000	2014/1/6	東京薬科大学	【税抜】
ケミルミスキャナーシステム	C-DiGit	1	950,000	950,000	2014/1/22	東京薬科大学	【税抜】