

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11571

研究課題名(和文) 食欲と脂質代謝を制御する脂質分子の生合成・分解機構の解明：肥満改善の創薬に向けて

研究課題名(英文) Mechanism for biosynthesis and degradation of lipid molecules controlling appetite and lipid metabolism

研究代表者

坪井 一人 (TSUBOI, Kazuhito)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80346642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：N-アシルエタノールアミンは食欲抑制・脂肪分解などの作用を示す脂質メディエーターである。本研究ではその分解酵素に焦点を当て、セラミド分解酵素として認識されてきた酸性セラミダーゼがN-アシルエタノールアミンの加水分解に関わることを細胞および動物組織レベルの解析により示した。さらに、当該酵素の蛍光基質LAMCAが類似酵素であるN-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼの基質にもなることを明らかにし、活性測定時に注意が必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、脂質メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの新たな代謝酵素として、酸性セラミダーゼを明らかにしたことが挙げられる。同時に、蛍光色素を用いた本酵素の活性測定の問題点が浮き彫りとなった。社会的意義としては、新たなN-アシルエタノールアミン代謝酵素の発見により、本酵素の阻害という新たな作用機序を持つ抗肥満薬の開発に繋がる可能性を有することが挙げられる。

研究成果の概要(英文)：N-Acylethanolamines are lipid mediators showing several bioactivities including appetite suppression and lipolysis. In the present study, we focused on their degrading enzymes. Our cell- and animal tissue-level analyses revealed that acid ceramidase, which has been recognized as a ceramide-hydrolyzing enzyme, is actually involved in the hydrolysis of N-acylethanolamines. Furthermore, we found that LAMCA, a fluorescent substrate of this enzyme, is also a substrate of a similar enzyme, N-acylethanolamine acid amidase; which should be considered when using this substrate.

研究分野：脂質生物学

キーワード：肥満 脂質代謝 脂質メディエーター リソソーム酵素 セラミド N-アシルエタノールアミン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長鎖脂肪酸とエタノールアミンが縮合した構造を持つ *N*-アシルエタノールアミンは、マリファナ様作用や抗炎症・鎮痛といった多彩な生体作用を持つ一群の脂質分子である。なかでも脂肪酸部分がオレイン酸であるオレオイルエタノールアミドは、小腸上皮細胞で生合成された後、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  を活性化し、求心性迷走神経を介して食欲抑制作用を発揮する。加えてオレオイルエタノールアミドは脂肪分解の亢進、グルカゴン様ペプチド-1 の分泌促進といった作用を有し、内因性の抗肥満物質として機能することが確立されている。しかしながら、*N*-アシルエタノールアミンの生合成・分解機構には不明な点が多い。

研究代表者らはこれまで動物組織における *N*-アシルエタノールアミンの生合成・分解機構の解析を行ってきた。*N*-アシルエタノールアミンは、3本の脂肪酸鎖を有する特殊な前駆体リン脂質 *N*-アシル-ホスファチジルエタノールアミンから細胞内で生成する。細胞から放出されて生理機能を発揮した後、細胞内に取り込まれて加水分解を受けてその生物活性を失う。この加水分解反応を触媒する酵素として、脂肪酸アミド加水分解酵素が古くから知られている。これに加えて研究代表者は、リソソーム酵素である *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼが同反応を触媒することを明らかにして遺伝子クローニングを行った。さらに、本酵素とアミノ酸配列が類似する酸性セラミダーゼも本反応を試験管内で触媒する予備的結果を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、食欲と脂質代謝を制御する *N*-アシルエタノールアミンに関して、生理的に重要な生合成・分解酵素を同定することである。本研究では、セラミドを分解するリソソーム酵素として認識されてきた酸性セラミダーゼに着目し、その *N*-アシルエタノールアミン分解活性について細胞および臓器のレベルで詳細な検討を行った。さらに、酸性セラミダーゼをターゲットとした解析を行う際に有用な蛍光基質について基礎検討を行った。具体的には、本酵素の蛍光基質として研究代表者が開発した LAMCA について特異性解析を行い、酸性セラミダーゼと *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼが混在する生体試料を用いた酵素活性の測定に適用出来るか評価を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞内で発現させた酸性セラミダーゼの *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性の解析

ヒト腎臓 HEK293 細胞に *N*-アシルエタノールアミンの生合成に関わる酵素であるホスホリパーゼ A/アシルトランスフェラーゼ 2 および *N*-アシル-ホスファチジルエタノールアミン特異的ホスホリパーゼ D を安定発現させた (HEK293/PLAAT2/NAPE-PLD 細胞)。本細胞にヒトの酸性セラミダーゼもしくは *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼをリポフェクション法により一過性に強制発現させた。24 時間後から細胞を [ $^{14}\text{C}$ ]エタノールアミンで 18 時間代謝標識した。細胞から脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで [ $^{14}\text{C}$ ] *N*-アシルエタノールアミンを分離・定量した。また、HEK293/PLAAT2/NAPE-PLD 細胞もしくは野生型 HEK293 細胞を用いて同様に強制発現を行い、48 時間後に細胞から脂質を抽出して高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析により *N*-アシルエタノールアミンを分子種ごとに分析した。

#### (2) 内在性酸性セラミダーゼの *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性の解析

内在性に酸性セラミダーゼを高発現するヒト前立腺 LNCaP 細胞に、酸性セラミダーゼもしくは *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼ、あるいはその両者の siRNA をリポフェクション法により導入してノックダウンを行った。72 時間後に細胞から脂質を抽出し、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析により *N*-アシルエタノールアミンを分子種ごとに分析した。

#### (3) 臓器レベルでの酸性セラミダーゼの *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性の解析

サポシン D は酸性セラミダーゼの活性化タンパク質であると考えられている。野生型およびサポシン D 欠損マウスの脳、腎臓、肝臓を用いてホモジネートを調製した。pH 4.5 の緩衝液中で 100  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]セラミド (*N*-[ $^{14}\text{C}$ ]ラウロイルスフィンゴシン) と 30 分間、もしくは 100  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ] *N*-アシルエタノールアミン ([ $^{14}\text{C}$ ]ラウロイルエタノールアミド) と 4 時間、37°C で反応させた。反応液から脂質を抽出した後、生成物である [ $^{14}\text{C}$ ]ラウリン酸を薄層クロマトグラフィーにより分離し、画像解析を用いて定量した。

#### (4) 蛍光基質 LAMCA の特異性解析

LAMCA は有機合成後に薄層クロマトグラフィーにより精製した。N 末端に FLAG タグを付加したヒト酸性セラミダーゼをヒト胎児腎臓 HEK293T 細胞に一過性に強制発現させ、抗 FLAG

アフィニティーゲルを用いて高度に精製した。同様の方法でヒト *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼをヒト胎児腎臓 HEK293 細胞に発現させて精製した。精製酵素を PAMCA と pH 5.25 の緩衝液中で 37°C にて反応させた。この際、活性促進剤としてリン脂質ホスファチジルコリン(200 μM)もしくは非イオン性界面活性剤 Nonidet P-40 (0.1%, w/v)を共存させた。反応開始から 90 分間、蛍光強度(Ex 360 nm/Em 460 nm)を 5 分ごとに測定することで加水分解活性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞内で発現させた酸性セラミダーゼの *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性の解析

HEK293/PLAAT2/NAPE-PLD 細胞を [<sup>14</sup>C]エタノールアミンで代謝標識した検討では、*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼだけでなく酸性セラミダーゼを強制発現させても細胞内の [<sup>14</sup>C]*N*-アシルエタノールアミンは対照細胞の半分程度に減少した。質量分析による検討でも、酸性セラミダーゼ発現細胞では *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼ発現細胞と同様に、オレオイルエタノールアミド(18:1)をはじめとする種々の *N*-アシルエタノールアミンの細胞内含量が対照細胞の半分以下であった(図 1)。野生型 HEK293 細胞でも同様の結果を得た。従って、細胞内に発現させた組換え酸性セラミダーゼが *N*-アシルエタノールアミンを分解出来ることが明らかとなった。

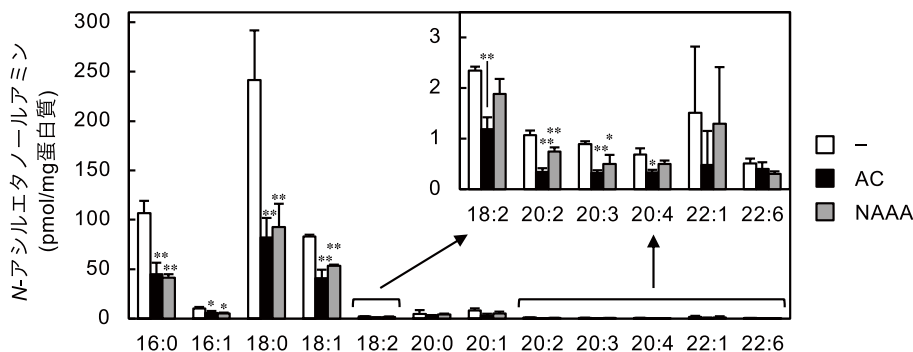


図1 酸性セラミダーゼ/*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼを強制発現させたHEK293/PLAAT2/NAPE-PLD細胞の*N*-アシルエタノールアミン含量分子種ごと(アシル基の炭素原子数とC=C二重結合数の組合せで示す)の分析結果を示す(平均±SD,  $n = 3$ )。-, 対照; AC, 酸性セラミダーゼ; NAAA, *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

##### (2) 内在性酸性セラミダーゼの *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性の解析

LNCaP 細胞において内在性の酸性セラミダーゼをノックダウンすると、内在性の *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼをノックダウンした時と同様に、オレオイルエタノールアミド(18:1)などの種々の *N*-アシルエタノールアミンの細胞内レベルは上昇した(図 2)。また、両酵素を同時にノックダウンすると、さらに *N*-アシルエタノールアミンは上昇した。従って、内在性の酸性セラミダーゼが細胞レベルで *N*-アシルエタノールアミンの分解に関わることが判明した。

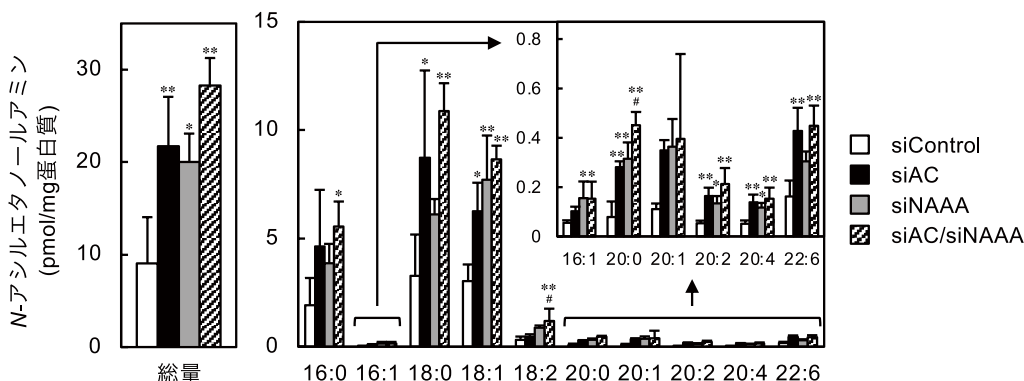


図2 内在性酸性セラミダーゼ/*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼを発現抑制させたLNCaP細胞の*N*-アシルエタノールアミン含量 *N*-アシルエタノールアミン総量(左)と分子種ごと(右、アシル基の炭素原子数とC=C二重結合数の組合せで示す)の分析結果を示す(平均±SD,  $n = 3-6$ )。siControl, 対照; siAC, 酸性セラミダーゼ発現抑制; siNAAA, *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼ発現抑制; \*,  $P < 0.05$  vs siControl; \*\*,  $P < 0.01$  vs siControl; #,  $P < 0.05$  vs siAC

### (3) 臓器レベルでの酸性セラミダーゼの *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性の解析

サポシン D 欠損マウスの脳、腎臓、肝臓のホモジネートのセラミド加水分解活性は野生型マウスの 16-32%と低値であり、サポシン D の酸性セラミダーゼ活性化能を反映しているものと考えられた (図 3)。同様に *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性も野生型マウスの 15-29%と低かった。この結果から、酸性セラミダーゼが *N*-アシルエタノールアミンの加水分解に関わることが動物組織レベルの解析からも示唆され、小腸においても当該活性を考慮する必要があると考えられた。

### (4) 蛍光基質 LAMCA の特異性解析

LAMCA の分解で生じた 7-アミノ-4-メチルクマリンに由来する蛍光は時間とともにほぼ直線的に増加し、測定の信頼性が高いことが示された。LAMCA は、Nonidet P-40 存在下ではもっぱら *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼと選択的に反応し、酸性セラミダーゼによる加水分解はほとんど認められなかった (図 4)。一方、ホスファチジルコリンの存在下では、酸性セラミダーゼによる活性が *N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼの 2.7 倍高かった。従って、両酵素が混在する生体試料において酸性セラミダーゼ活性を LAMCA 加水分解活性により測定するにはホスファチジルコリンの存在下で行う必要があるが、*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼの共存に注意して阻害薬を併用するなどの配慮が必要であると考えられた。

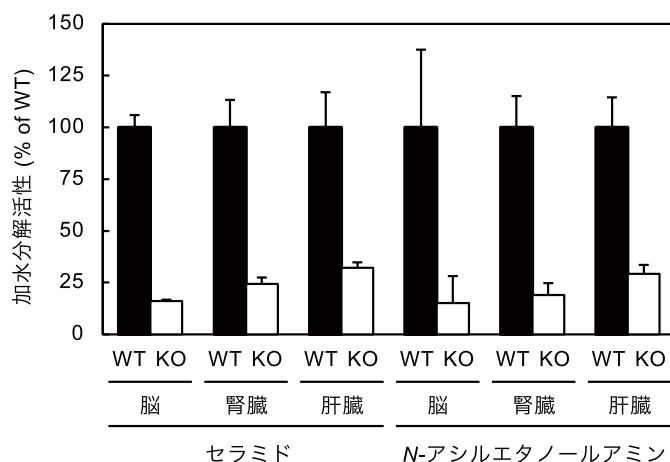


図3 サポシンD欠損マウスの臓器ホモジネート中のC12:0セラミドおよびC12:0 *N*-アシルエタノールアミン加水分解活性  
平均 ± SD ( $n = 3$ ); WT, 野生型; KO, サポシンD欠損マウス

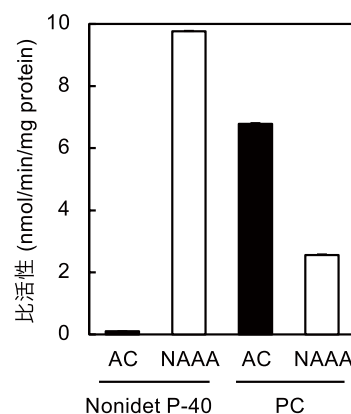


図4 蛍光基質LAMCAの特異性解析  
平均 ± SD ( $n = 3$ ); AC, 酸性セラミダーゼ;  
NAAA, *N*-アシルエタノールアミン酸性  
アミダーゼ; PC, ホスファチジルコリン

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 北風 圭介, 坪井 一人	4. 巻 94
2. 論文標題 蛍光基質を用いた簡便なグリセロホスホジエステラーゼGDE4およびGDE7の活性測定法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 923 ~ 927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuboi Kazuhito, Tai Tatsuya, Yamashita Ryouhei, Ali Hanif, Watanabe Takashi, Uyama Toru, Okamoto Yoko, Kitakaze Keisuke, Takenouchi Yasuhiro, Go Shinji, Rahman Iffat Ara Sonia, Houchi Hitoshi, Tanaka Tamotsu, Okamoto Yasuo, Tokumura Akira, Matsuda Junko, Ueda Natsuo	4. 巻 1866
2. 論文標題 Involvement of acid ceramidase in the degradation of bioactive N-acylethanolamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2021.158972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taniai Tomohiko, Shirai Yoshihiro, Shimada Yohta, Hamura Ryoga, Yanagaki Mitsuru, Takada Naoki, Horiuchi Takashi, Haruki Koichiro, Furukawa Kenei, Uwagawa Tadashi, Tsuboi Kazuhito, Okamoto Yasuo, Shimada Shu, Tanaka Shinji, Ohashi Toya, Ikegami Toru	4. 巻 112
2. 論文標題 Inhibition of acid ceramidase elicits mitochondrial dysfunction and oxidative stress in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4570 ~ 4579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Guo Yiman, Uyama Toru, Rahman S. M. Khaledur, Sikder Mohammad Mamun, Hussain Zahir, Tsuboi Kazuhito, Miyake Minoru, Ueda Natsuo	4. 巻 26
2. 論文標題 Involvement of the Isoform of cPLA2 in the Biosynthesis of Bioactive N-Acylethanolamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26175213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitakaze Keisuke, Oyadomari Miho, Zhang Jun, Hamada Yoshimasa, Takenouchi Yasuhiro, Tsuboi Kazuhito, Inagaki Mai, Tachikawa Masanori, Fujitani Yoshio, Okamoto Yasuo, Oyadomari Seiichi	4. 巻 54
2. 論文標題 ATF4-mediated transcriptional regulation protects against -cell loss during endoplasmic reticulum stress in a mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Yasuo, Kitakaze Keisuke, Takenouchi Yasuhiro, Yamamoto Shinya, Ishimaru Hironobu, Tsuboi Kazuhito	4. 巻 88
2. 論文標題 Sphingosine 1-phosphate receptor type 2 positively regulates interleukin (IL)-4/IL-13-induced STAT6 phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 110156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2021.110156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitakaze Keisuke, Tsuboi Kazuhito, Tsuda Maho, Takenouchi Yasuhiro, Ishimaru Hironobu, Okamoto Yasuo	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of a selective fluorescence-based enzyme assay for glycerophosphodiesterase family members GDE4 and GDE7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlir.2021.100141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 坪井 一人、宇山 徹、上田 夏生	4. 巻 92
2. 論文標題 N-アシルエタノールアミンの機能と生合成機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 666 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenouchi Yasuhiro, Kitakaze Keisuke, Tsuboi Kazuhito, Okamoto Yasuo	4. 巻 391
2. 論文標題 Growth differentiation factor 15 facilitates lung fibrosis by activating macrophages and fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112010 ~ 112010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計55件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 北風圭介, 坪井一人, Hanif Ali, 木本来希, 竹之内康広, 石丸浩靖, 山下純, 上田夏生, 田中保, 岡本安雄
2. 発表標題 グリセロホスホジエステラーゼ7は小胞体内腔において環状ホスファチジン酸を産生する
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 杉本理栄, 石丸浩靖, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺胞上皮細胞特異的p16ノックアウトマウスを用いた老化肺胞上皮細胞の肺線維化への影響
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井玲奈, 竹之内康広, 北風圭介, 杉本理栄, 石丸浩靖, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維症におけるリゾリン脂質メディエーター分解酵素の役割
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石丸浩靖, 北風圭介, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 青山裕美
2. 発表標題 発汗抑制によるマウス足底部の角層水分量低下がアレルギー反応に与える影響
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井一人, 北風圭介, 津田真帆, 竹之内康広, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 蛍光基質を用いたグリセロホスホジエステラーゼGDE4およびGDE7の活性測定法の確立
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本安雄, 竹之内康広, 北風圭介, 松井玲奈, 石丸浩靖, 坪井一人
2. 発表標題 肺線維症における脂質メディエーター分解酵素の役割
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiro Tsuboi, Tatsuya Tai, Ryouhei Yamashita, Hanif Ali, Takashi Watanabe, Toru Uyama, Yoko Okamoto, Keisuke Kitakaze, Yasuhiro Takenouchi, Iffat Ara Sonia Rahman, Hitoshi Houchi, Tamotsu Tanaka, Akira Tokumura, Junko Matsuda, Yasuo Okamoto, Natsuo Ueda
2. 発表標題 Acid ceramidase as a third N-acyl ethanolamine hydrolase in cells and tissues
3. 学会等名 32nd Annual International Cannabinoid Research Society Symposium on the Cannabinoids (国際学会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名	M. Casasampere, J. L. Abad, J. Ung, C. Dufau, K. Tsuboi, A. Delgado, J. Casas, G. Fabrias
2. 発表標題	A novel fluorogenic probe to monitor the activity of acid ceramidase, fatty acid amide hydrolase and N-acyl ethanolamine acid amidase
3. 学会等名	14th Sphingolipid Club Meeting (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	上田夏生、坪井一人、田井達也、松田純子、田中 保
2. 発表標題	脂質メディエーターN-アシルエタノールアミンの分解における酸性セラミダーゼの関与
3. 学会等名	第373回脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Takashi Watanabe, Shinji Go, Yuta Ishizuka, Kazuhito Tsuboi, Ayaka Ono, Junko Matsuda
2. 発表標題	Pathophysiological analysis of Saposin D-deficient Twitcher mice
3. 学会等名	第63回日本先天代謝異常学会 学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	北風圭介、坪井一人、Hanif Ali、木本来希、竹之内康広、石丸浩靖、山下純、上田夏生、田中保、岡本安雄
2. 発表標題	グリセロホスホジエステラーゼ7は小胞体内腔における環状ホスファチジン酸の産生酵素である
3. 学会等名	第95回日本生化学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 杉本理栄, 石丸浩靖, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維症における老化肺胞上皮細胞の役割
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北風圭介, Hanif Ali, 木本来希, 竹之内康広, 石丸浩靖, 山下純, 上田夏生, 田中保, 岡本安雄, 坪井一人
2. 発表標題 グリセロホスホジエステラーゼ7による環状リン脂質メディエーターの細胞内産生
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 杉本理栄, 石丸浩靖, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 p16コンディショナルノックアウトマウスを用いた肺線維化における老化肺胞上皮細胞の役割の解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井一人
2. 発表標題 新規抗がん薬のスクリーニングに有用な酸性セラミダーゼ活性測定法
3. 学会等名 KMSメディカル・アーク2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本安雄, 竹之内康広, 北風圭介, 松井玲奈, 石丸浩靖, 杉本理栄, 坪井一人
2. 発表標題 線維化肺における脂質メディエーター分解酵素の発現低下メカニズム
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsuboi K, Tai T, Yamashita R, Ali H, Watanabe T, Uyama T, Okamoto Y, Kitakaze K, Takenouchi Y, Go S, Rahman IAS, Houchi H, Tanaka T, Okamoto Y, Tokumura A, Matsuda J, and Ueda N
2. 発表標題 Role of acid ceramidase in the hydrolysis of anti-inflammatory and anorexic N-acyl ethanolamines
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okamoto Y, Kitakaze K, Takenouchi Y, Tsuboi K
2. 発表標題 The role of sphingosine 1-phosphate type 2 receptor on IL-4/IL-13-stimulated STAT6 phosphorylation in phorbol12-myristate13-acetate-treated THP-1 cells
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takenouchi Y, Kitakaze K, Tsuboi K, and Okamoto Y
2. 発表標題 Growth differentiation factor 15 activates macrophages and fibroblasts
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本安雄, 北風圭介, 竹之内康広, 山本慎也, 坪井一人
2. 発表標題 THP-1細胞由来マクロファージにおけるインターロイキン (IL) -4/IL-13刺激によるSTAT6リン酸化に対するスフィンゴシン1-リン酸2型受容体の役割
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yiman Guo, 宇山徹, S. M. Khaledur Rahman, Mohammad Mamun Sikder, Zahir Hussain, 坪井一人, 三宅実, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシルエタノールアミン合成におけるcPLA2ファミリーの関与
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細谷征矢, 酒井梨玖, 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 マクロファージ特異的p16ノックアウトマウスを用いた肺線維化におけるマクロファージ老化の関与の検討
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井梨玖, 細谷征矢, 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維化における老化マクロファージの関与の検討
3. 学会等名 第35回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 杉本理栄, 岡本安雄
2. 発表標題 肺胞上皮細胞およびマクロファージにおける細胞老化関連遺伝子p16の肺線維化への関与の検討
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 濱田良真, 竹之内康広, 坪井一人, 稲垣舞, 立川正憲, 藤谷与士夫, 岡本安雄, 親泊政一
2. 発表標題 ATF4を介した転写制御は小胞体ストレスによる隣細胞の喪失を防ぐ
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊昂, 郷慎司, 石塚佑太, 坪井一人, 小野綾可, 松田純子
2. 発表標題 クラッペ病の神経病態は「サイコシン仮説」だけでは説明できない
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郭一滴, 宇山徹, Rahman S. M. Khaledur, Sikder Mohammad Mamun, Hussain Zahir, 坪井一人, 三宅実, 上田夏生
2. 発表標題 Involvement of isoform of cPLA2 in the biosynthesis of N-acylethanolamine
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪井一人, 渡邊昂, 北風圭介, 竹之内康広, 松田純子, 岡本安雄
2. 発表標題 サボシンDノックアウトマウスを用いた酸性セラミダーゼのN-アシルエタノールアミン加水分解活性の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風圭介, 坪井一人, 津田真帆, 竹之内康広, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 蛍光法によるグリセロホスホジエステラーゼGDE4およびGDE7活性の測定
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本安雄, 北風圭介, 竹之内康広, 山本慎也, 石丸浩靖, 坪井一人
2. 発表標題 THP-1マクロファージにおけるIL-4/IL-13刺激によるSTAT6の完全活性化にS1P2-Rhoキナーゼ経路が重要である
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 肺胞上皮細胞およびマクロファージにおけるp16過剰発現による線維化関連因子の遺伝子発現変化の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊昂, 郷慎司, 坪井一人, 小野綾可, 松田純子
2. 発表標題 Krabbe病の病態は「サイコシン仮説」のみでは説明できない
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊昂, 坪井一人, 石塚佑太, 小野綾可, 郷慎司, 松田純子
2. 発表標題 クラッペ病の神経病態はサイコシンの蓄積だけでは説明できない
3. 学会等名 第26回日本ライソゾーム研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石丸浩靖, 北風圭介, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 青山裕美
2. 発表標題 発汗抑制による角層水分量低下がアレルギー反応に与える影響について
3. 学会等名 第36回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹之内康広, 牧田恭輔, 北風圭介, 坪井一人, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 マクロファージ特異的p16ノックアウトマウスを用いた肺線維化における老化マクロファージの役割の解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井一人, 渡邊昂, 北風圭介, 竹之内康広, 松田純子, 岡本安雄
2. 発表標題 抗炎症・食欲抑制性脂質メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの酸性セラミダーゼによる加水分解: サポシンDノックアウトマウスを用いた検討
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北風圭介, 坪井一人, 津田真帆, 竹之内康広, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 グリセロホスホジエステラーゼGDE4およびGDE7活性測定の簡便法開発と阻害剤探索
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本安雄, 北風圭介, 竹之内康広, 山本慎也, 石丸浩靖, 坪井一人
2. 発表標題 ホルボールエステル処理したTHP-1 M sにおけるIL-4/IL-13とS1P/S1P2シグナルのクロストーク
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪井一人, 渡邊昂, 北風圭介, 竹之内康広, 松田純子, 岡本安雄
2. 発表標題 酸性セラミダーゼによる抗炎症・食欲抑制性メディエーターN-アシルエタノールアミンの加水分解: サポシンD欠損マウスの臓器を用いた検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 坪井一人, 田井達也, 山下量平, 宇山徹, 岡本蓉子, 郷慎司, 渡邊悦子, Iffat Ara Sonia Rahman, 芳地一, 田中保, 岡本安雄, 徳村彰, 松田純子, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシルエタノールアミンの加水分解における内在性酸性セラミダーゼの関与
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇山徹, Smriti Sultana Binte Mustafiz, 森戸克弥, 高橋尚子, 川合克久, Zahir Hussain, 坪井一人, 荒木伸一, 山本圭, 田中保, 上田夏生
2. 発表標題 N-アシル-ホスファチジルエタノールアミンの生成におけるcPLA2 の細胞内基質の検討
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 Growth/differentiation factor 15 (GDF15)はマクロファージと線維芽細胞の活性化を介して肺の線維化を促進する
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 津川和江, 河野恵理, 三宅雅人, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 親泊政一
2. 発表標題 膵 細胞における小胞体ストレス応答転写因子ATF4の機能解明
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹之内康広, 嶋田大雅, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維症で増加するGrowth/differentiation factor 15 (GDF15) はマクロファージと線維芽細胞を活性化する
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇山徹, Binte Mustafiz Smriti Sultana, 森戸克弥, 高橋尚子, 川合克久, Hussain Zahir, 坪井一人, 荒木伸一, 山本圭, 田中保, 上田夏生
2. 発表標題 バイオフィクターであるN-アシルエタノールアミンの生合成に関わるcPLA2 の機能解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹之内康広, 嶋田大雅, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維症で増加するGrowth/differentiation factor 15 (GDF15)は線維化促進に関与する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北風圭介, 親泊美帆, 張君, 津川和江, 河野恵理, 三宅雅人, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄, 親泊政一
2. 発表標題 小胞体ストレス応答転写因子ATF4の機能不全は膵 細胞の脱分化を惹起する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪井一人, 田井達也, 山下量平, 宇山徹, 岡本蓉子, 郷慎司, 渡邊悦子, Iffat Ara Sonia Rahman, 芳地一, 田中保, 岡本安雄, 徳村彰, 松田純子, 上田夏生
2. 発表標題 抗炎症・食欲抑制性脂質メディエーターであるN-アシルエタノールアミンの酸性セラミダーゼによる細胞・組織内での加水分解
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Tani ai, Yoshihiro Shirai, Yohta Shimada, Ryoga Hamura, Mitsuru Yanagaki, Naoki Takada, Kazuhito Tsuboi, Yasuo Okamoto, Toya Ohashi, Katsuhiko Yanaga
2. 発表標題 Inhibition of sphingolipid metabolism has ceramide-induced anti-tumor effect on pancreatic cancer cells
3. 学会等名 Clinical Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本慎也, 北風圭介, 竹之内康広, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 ホルボールエステル処理したTHP-1細胞におけるIL-4/IL-13刺激によるSTAT6リン酸化に対するスフィンゴシン1-リン酸2型受容体の役割
3. 学会等名 第34回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新山佳史, 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺胞上皮細胞およびマクロファージにおける線維化関連因子の発現に対する老化遺伝子p16の役割
3. 学会等名 第34回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹之内康広, 新山佳史, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 p16の強制発現による肺胞上皮細胞およびマクロファージにおける線維化関連因子の発現の変化
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本安雄, 北風圭介, 竹之内康広, 山本慎也, 坪井一人
2. 発表標題 ホルボールエステル処理したTHP-1細胞におけるIL-4/IL-13刺激によるSTAT6リン酸化に対するスフィンゴシン1-リン酸2型受容体の役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北風圭介, 親泊美帆, 張 君, 濱田良真, 竹之内康広, 坪井一人, 藤谷与土夫, 岡本安雄, 親泊政一
2. 発表標題 Transcription factor ATF4 maintains pancreatic $\beta$ -cell identity during ER stress
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹之内康広, 新山佳史, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 p16強制発現細胞における線維化関連因子の発現変化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

## 〔図書〕 計4件

1. 著者名 Tsuboi K, Ueda N	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 509
3. 書名 Assay of NAAA activity (pages 261-274), Methods Mol. Biol., Vol. 2576, Endocannabinoid Signaling: Methods and Protocols 2nd Edition	

1. 著者名 Guo Y, Uyama T, Rahman SMK, Sikder MM, Hussain Z, Tsuboi K, Miyake M, Ueda N	4. 発行年 2022年
2. 出版社 MDPI	5. 総ページ数 236
3. 書名 Involvement of the isoform of cPLA2 in the biosynthesis of bioactive N-acylethanolamines (pages 187-200), A Themed Issue in Honor of Professor Raphael Mechoulam: The Father of Cannabinoid and Endocannabinoid Research	

1. 著者名 坪井一人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 672
3. 書名 3.3 不飽和脂肪酸, 3.3.3 生理学 (pages 327-332); ビタミン・バイオフィクター総合事典	

1. 著者名 Tsuboi K, Uyama T, Ueda N	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 472
3. 書名 Inhibition of NAPE-PLD activity by natural compounds and synthetic drugs, and its biological relevance (pages 301-336), Drug Discovery Series No. 76. New tools to interrogate endocannabinoid signalling-from natural compounds to synthetic drugs	

## 〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学薬理学教室  
<https://kms-pharmacol.wixsite.com/website>  
<https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=205>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北風 圭介  (KITAKAZE Keisuke)  (80840545)	川崎医科大学・医学部・助教   (35303)	
研究分担者	竹之内 康広  (TAKENOUCHI Yasuhiro)  (30582233)	川崎医科大学・医学部・講師   (35303)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 保  (TANAKA Tamotsu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スペイン	Inst. for Adv. Chem. of Catalonia		
米国	Univ. of Virginia		
フランス	Univ. Toulouse III-Paul Sabatier		