

令和 2 年 9 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04051

研究課題名(和文)リン脂質が制御する上皮細胞の特性と疾患発症機構

研究課題名(英文)Regulation of epithelial cell charactor by phosphoinositide

研究代表者

深見 希代子 (Fukami, Kiyoko)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：40181242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質代謝酵素PLC<sub>1</sub>による表皮細胞バリア機能制御機構の解析を行った。表皮特異的PLC<sub>1</sub>遺伝子欠損マウス等で皮膚のバリア機能不全が生じていることから原因を解析し、NFATの不活性化、p38MAPKの異常活性化、RhoAの不活性化を介して表皮顆粒層のタイトジャンクション不良が生じていることを明らかにした。

また、イノシトールリン脂質PIP<sub>2</sub>の細胞膜での新たな生理的意義の解明を行った。PIP<sub>2</sub>は細胞二重膜の内葉に存在すると考えられてきたが、抗PIP<sub>2</sub>抗体やプローブを用いてPIP<sub>2</sub>が外葉にも存在することを明らかにした。また細胞膜外葉PIP<sub>2</sub>が細胞接着や細胞運動に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、リン脂質代謝酵素PLC<sub>1</sub>の不全が、NFATの不活性化、p38MAPKの異常活性化、RhoAの不活性化を介して表皮顆粒層のタイトジャンクション不良を誘導し、表皮細胞バリア機能の破綻を誘導することを明らかにした。こうした表皮細胞バリア機能の異常は乾癬などの炎症性皮膚炎で観察されることから、新たな治療法として発展する可能性がある。

また、イノシトールリン脂質PIP<sub>2</sub>が細胞膜外葉にも存在すること、細胞膜外葉PIP<sub>2</sub>が細胞接着や細胞運動に関与することを明らかにした。こうした事実はいままで考えられてきたリン脂質の役割の概念を変えるものであり、細胞生物学の進展に大きく寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：First, we showed that downregulation of phospholipase C (PLC)d1 impairs the barrier functions of the SC. PLCd1 downregulation also impairs localization of tight junction proteins. Loss of PLCd1 leads to a decrease in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations and NFAT activity, along with hyperactivation of MAPK and inactivation of RhoA. These findings demonstrate that PLCd1 is essential for epidermal barrier integrity.

Next we found that phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) was detected in the cell surface of non-permeabilized cells by anti-PIP<sub>2</sub> antibodies and the PIP<sub>2</sub> probe. Cell surface PIP<sub>2</sub> signal was universally detected in various cell lines. Furthermore, blocking cell surface PIP<sub>2</sub> by the addition of anti-PIP<sub>2</sub> antibody or the PIP<sub>2</sub> probe inhibited cell attachment, spreading, and migration. These results indicate a unique localization of PIP<sub>2</sub> in the outer leaflet that may have a crucial role in cell attachment, spreading, and migration.

研究分野：疾患医科学、細胞生物学

キーワード：イノシトールリン脂質 表皮バリア機能 細胞膜外葉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞はアピカル/バソラテラルという極性を持ち、タイトジャンクションやアドヘレンスジャンクションなどの細胞間接着機構を持つ事が特徴である。イノシトールリン脂質の分布にも極性が見られ、アピカル膜には PIP2 が多く、バソラテラル膜には PIP3 が局在し、細胞接着など上皮細胞の機能に重要な役割を担っている。

我々は、PIP2 分解酵素ホスホリパーゼ C (PLC) 1 が表皮角化細胞の細胞接着・バリア機能の恒常性を維持し、その破綻が乾癬などの炎症性皮膚疾患を誘導すること、大腸がん等でリン脂質代謝が E-カドヘリンの発現調節を介して上皮間葉転換やアドヘレンスジャンクション維持、細胞運動・浸潤性に関与し、がん悪性を制御していること等を明らかにしつつあった。しかしながら、PLC 1 がどのようなメカニズムで表皮角化細胞の細胞接着・バリア機能に関与するのか、リン脂質代謝が実際に上皮間葉転換するのか、がん細胞の悪性化に関わるかなど詳細については判明していない。

## 2. 研究の目的

そこで表皮角化細胞やがん細胞においてリン脂質代謝が制御する上皮細胞の特性である細胞間接着や細胞・基質間接着、上皮間葉転換に焦点を当て、リン脂質代謝の機能不全がもたらす疾患発症の分子機構を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究方法

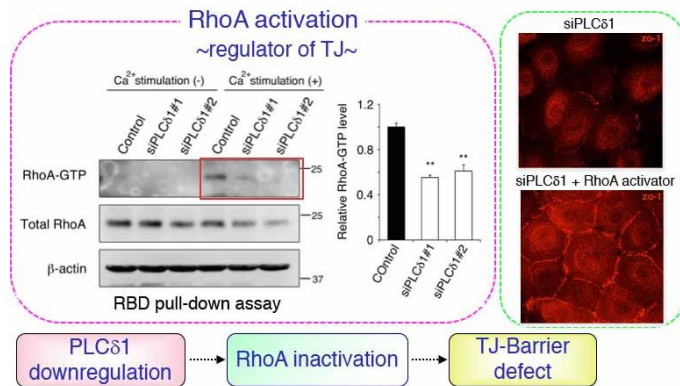
1) リン脂質代謝酵素 PLC 1 による表皮細胞バリア機能制御機構の解析: 表皮特異的 PLC 1cK0 マウスは、乾癬などの皮膚炎様炎症を引き起こす。我々は、これまでに表皮特異的 PLC 1cK0 マウスや三次元ヒト人工皮膚モデル系において PLC 1 の発現抑制を行った場合、皮膚のバリア機能不全が生じていることを確認している。バリア機能は、角質バリアと表皮顆粒層のタイトジャンクションによって主に保たれている。そこで、PLC 1cK0 マウス、三次元ヒト人工皮膚モデル系等を用いて、バリア機能不全の原因を詳細に解明する。

2) 大腸がんにおける PKC アイソザイムの役割の解明: ヒト大腸がん組織での E-カドヘリンと PLC 1 の発現低下を我々は明らかにしている。また最近 PLC 1 により種々の PKC アイソザイムの活性が制御されることを見出しつつある。そこで上皮細胞マーカーである E-カドヘリン発現や他の上皮間葉転換マーカーの発現、大腸がん悪性化における PKC アイソザイムの役割を明らかにする。PKC アイソザイム特異的発現抑制細胞を作製、過剰発現細胞を作製し、増殖性、移動性、ソフトアガーアッセイ、Eカドヘリン発現解析、間葉系・幹細胞性遺伝子発現解析などを行なう。

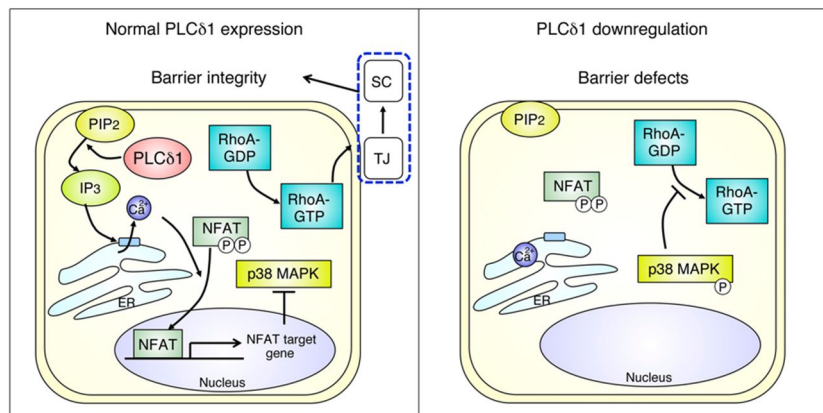
3) イノシトールリン脂質 PIP2 の細胞膜での新たな生理的意義の解明: イノシトールリン脂質 PIP2 は脂質自体が細胞骨格、細胞接着等を制御している。最近 PIP2 の非常に特異的な局在を見出しており、PIP2 の細胞膜での新たな生理的意義の解明を行なう。

#### 4. 研究成果

1) リン脂質代謝酵素PLC 1による表皮細胞バリア機能制御機構の解析: 第一に、表皮特異的PLC 1コンディショナル遺伝子欠損マウスや三次元ヒト人工皮膚モデル系においてPLC 1の発現抑制を行った場合、皮膚のバリア機能不全が生じていることを明らかにした。また



PLC 1の発現抑制におけるバリア機能不全の原因として、PLC 1の下流シグナルであるNFATの不活性化やp38MAPKの活性化異常、RhoAの不活性化を介して表皮顆粒層のタイトジャンクション不良が生じていることが明らかになった。上図では、PLC 1の遺伝子発現抑制により、RhoAの活性が低下していること、この時生じたタイトジャンクションのマーカータンパク質ZO-1の細胞間接着部位での染色減少が、RhoAの活性化剤によってキャンセルしていることを示している。こうした事実は、正常な表皮細胞内では、イノシトールリン脂質代謝によりPLCによってPIP2が分解され、カルシウムの恒常性が保たれ、NFATの活性化により、過剰なMAPKの活性化が抑制、その結果RhoAが活性化してタイトジャンクションなどのバリア機能が維持されると考えられた(右図)。これらの結果は、Cell Death & Differentiation

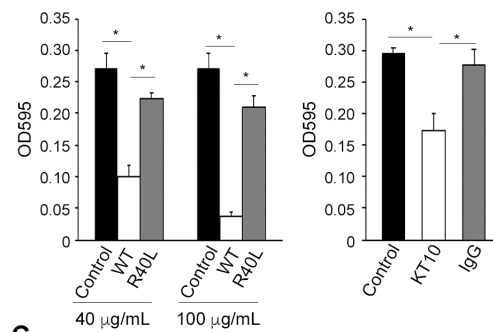


(2017)に報告した。

またクロトンオイルにより接触性皮膚炎を誘導すると、表皮特異的に PLC 1 を欠損したマウスの耳の膨潤が減弱し、PLC 1 が接触性皮膚炎の惹起を軽減することを見出し、報告した(Biochem. Biophys. Res. Commun. 511, 330-335, 2019)。

2) 大腸がんにおけるPKCアイソザイムの役割の解明: 上皮細胞由来の大腸がん等でリン脂質代謝酵素PLC 1がE-カドヘリンの発現調節を介して上皮間葉転換やアドヘレンスジャンクション維持、細胞運動・浸潤性に関与し、がん悪性を制御していること等を明らかにしたので、PLC下流のシグナルである種々のプロテインキナーゼC (PKC) アイソザイムの介在性を検討した。その結果、PLC 1により種々のPKCアイソザイムの活性が固有に制御されることを見出した。また、それぞれのPKCアイソザイムの基質を同定した。こうした結果は、大腸がん悪性を抑制するPLC 1下流のシグナルとしてのPKCアイソザイムが創薬のターゲットに成り得ることを示している。現在論文投稿中である。

3) イノシトールリン脂質PIP2の細胞膜での新たな生理的意義の解明: イノシトールリン脂質代謝の要のリン脂質PIP2はPLCやPI3キナーゼの基質としての役割の他、細胞骨格、細胞接着等を制御している。そこでPIP2に焦点を当て、細胞膜での新たな生理的機能解析を行った。PIP2は細胞内シグナル伝達を司る脂質なので、細胞二重膜の内葉に存在すると考えられてきたが、我々はPIP2がサポニンなどの細胞膜透過剤未処理下においても抗PIP2抗体によって染色像が観察されることから、PIP2が外葉にも存在することを明らかにした。また、PIP2と結合性の高いプローブ(PLC 1・PHドメイン)を用いてFACS解析を行った際にも、野生型プローブでは結合が見られたのに対して、PIP2と結合できない変異型プローブ(R40L)を用いた際には結合が観察されず、PIP2が外葉にも存在することが判明した。PIP2が外葉に存在することは、様々な培養細胞で観察された他、マウスの骨髄細胞など生理的な細胞にも検出された。また外葉PIP2は脂質Raftを破壊するようなコレステロール、スフィンゴミエリンの減少を誘導すると局在が変化した。更にPIP2結合性プローブや抗PIP2抗体で、細胞膜外葉PIP2をマスクすると、細胞接着や細胞運動が阻害されることが判明し、細胞膜外葉PIP2がこれらの機能に関与することが明らかになった(右図)。これらの結果は、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*に発表した(2020 in press)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 T. Fukuyama, Y. Nakamura, K. Kanemaru, C. Toyoda, H. J. Jang, P. G. Suh, K. Fukami.	4. 巻 28
2. 論文標題 Phospholipase Cg1 is required for normal irritant contact dermatitis responses and sebaceous gland homeostasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 1051-1057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/exd.14009	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 該当する
1. 著者名 A. Yoneda, K. Kanemaru, A. Matsubara, E. Takai, M. Shimozawa, R. Satow, H. Yamaguchi, Y. Nakamura, K. Fukami.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） -	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 K. Shiratori, K. Kanemaru, T. Ogura, A. Nakajima, Y. Sugizaki, T. Fukuyama, Y. Iwakura, Y. Nakamura, K. Fukami	4. 巻 511
2. 論文標題 Epidermal loss of phospholipase Cd1 attenuates irritant contact dermatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 330-335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.046. Epub 2019 Feb 18	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 K. Kudo, A. Yoneda, D. Sakiyama, K. Kojima, T. Miyaji, M. Yamazaki, S. Yaita, T. Hyodo, R. Satow, K. Fukami	4. 巻 33
2. 論文標題 Cell surface CD63 increased by up-regulated polylectosamine modification sensitizes human melanoma cells to the BRAF inhibitor PLX4032	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 3851-3869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201800664RR	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 S. Miyamoto, Y. Nagamura, A. Nakabo, A. Okabe, K. Yanagihara, K. Fukami, R. Sakai, H. Yamaguchi	4. 巻 495
2. 論文標題 Aberrant alternative splicing of RHOA is associated with loss of its expression and activity in diffuse-type gastric carcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 1942-1947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.067.	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 R. Satow, T. Nakamura, C. Kato, M. Endo, M. Tamura, R. Batori, S. Tomura, Y. Murayama, K. Fukami	4. 巻 77
2. 論文標題 ZIC5 drives melanoma aggressiveness by PDGFD-mediated activation of FAK and STAT3.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 366-377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472	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 該当する

1. 著者名 T. Hirabayashi, T. Anjo, A. Kaneko, Y. Senoo, A. Shibata, H. Takama, K. Yokoyama, Y. Nishito, T. Ono, C. Taya, K. Muramatsu, K. Fukami, A. M. oz-Garcia, A. R. Brash, K. Ikeda, M. Arita, M. Akiyama, M. Murakami	4. 巻 8
2. 論文標題 PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 14609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms14609	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 該当する

1. 著者名 K. Kanemaru, Y. Nakamura, K. Totoki, Ta. Fukuyama, M. Shoji, H. Kaneko, K. Shiratori, A. Yoneda, T. Inoue, Y. Iwakura, K. Kabashima, K. Fukami	4. 巻 24
2. 論文標題 Phospholipase Cd1 regulates p38 MAPK activity and skin barrier integrity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 1079-1090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cdd.2017.56.	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 該当する

1. 著者名 M. Shimozawa, S. Anzai, R. Satow, K. Fukami.	4. 巻 488
2. 論文標題 Phospholipase C d1 negatively regulates autophagy in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 578-583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.05.098	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 該当する

1. 著者名 H. Yamaguchi, Y. Ito, N. Miura, Y. Nagamura, A. Nakabo, K. Fukami, K. Honda, R. Sakai	4. 巻 96
2. 論文標題 Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur. J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 685-694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2017.07.005	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 該当する

1. 著者名 R. Murase, Y. Taketomi, Y. Miki, Y. Nishito, M. Saito, K. Fukami, K. Yamamoto, M. Murakami.	4. 巻 7
2. 論文標題 Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 2261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12434-z.	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 該当する

1. 著者名 R. Satow, S. Inagaki, C. Kato, M. Shimozawa, K. Fukami	4. 巻 108
2. 論文標題 Identification of ZIC5 as a Survival Factor of Prostate and Colorectal Cancer Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Can. Sci.	6. 最初と最後の頁 2405-2412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13419	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 該当する

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金丸 佳織、米田 敦子、中村 由和、深見 希代子
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール(4,5)二リン酸の細胞膜外葉における検出
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 由和、金丸 佳織、深見 希代子
2. 発表標題 上皮性の制御における イノシトールリン脂質の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉優希、豊田千穂、福山亮嗣、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の細胞膜近傍に存在するタンパク質の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須川結衣, 下澤誠, 萱野日菜子, 金丸佳織, 中村由和, 深見希代子
2. 発表標題 上皮細胞と間葉細胞の形質膜におけるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸量の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 深見希代子
2. 発表標題 イノシトールリン脂質代謝による上皮細胞の維持と分化制御機構
3. 学会等名 日本生化学会中部支部例会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊尊、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 悪性黒色腫の薬剤耐性阻害を目指したZIC5阻害薬の探索
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤誠、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 大腸がん細胞におけるKRAS活性変異はPL C 1の発現抑制を介してオートファジーを促進する
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村由和、金丸佳織、深見希代子
2. 発表標題 表皮バリア形成におけるイノシトールリン脂質代謝酵素ホスホリパーゼC 1の役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金丸佳織、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 ホスホリパーゼC 1はp38MAPKの活性および皮膚のバリア機能を制御する
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村由和、金丸佳織、深見希代子
2. 発表標題 イノシトールリン脂質代謝による表皮角化細胞の機能制御
3. 学会等名 第69回日本皮膚科学会中部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深見希代子
2. 発表標題 細胞膜リン脂質の多彩な生理機能
3. 学会等名 安田女子大学学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木悠大、馬烏亮介、麻田惲、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 大腸がんにおけるPLCd1の機能解析
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福山堯嗣、豊田千穂、中村由和、Suh Pann-Ghill、深見希代子
2. 発表標題 表皮におけるホスホリパーゼ Cd1 の機能解析
3. 学会等名 第 59 回日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 十時謙伍、庄司麻土香、中村由和、中南秀将、中瀬恵亮、野口雅久、深見希代子
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌分泌性脂質代謝酵素が病原性にあたえる影響の解析
3. 学会等名 第 69 回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 深見希代子
2. 発表標題 イノシトールリン脂質の未知なる機能を探索する
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 麻田偲、馬鳥亮介、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 大腸癌におけるPLCd1のPKCを介した作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下澤誠、安齋咲希帆、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 大腸癌細胞においてPLCd1はオートファジーを制御する
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤中良介、矢板咲音里、木村美紗、松原愛、米田敦子、深見希代子
2. 発表標題 PLCd1 はインテグリンを介したがん細胞の接着・遊走を制御する
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 豊田千穂、福山亮嗣、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸結合タンパク質の網羅的探索
3. 学会等名 第 90 回日本生化学会(ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Fukuyama, C. Toyoda, Y.Nakamura, K. Fukami.
2. 発表標題 PLCg1 is required for normal formation of sebaceous glands
3. 学会等名 第 42 回日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中村由和、深見希代子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 脂質クオリティ研究の基礎と臨床	

1. 著者名 深見希代子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 48
3. 書名 基礎講義遺伝子工学II	

1. 著者名 深見希代子	4. 発行年 2017年
2. 出版社 広川書店	5. 総ページ数 17
3. 書名 遺伝子工学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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