

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02575

研究課題名(和文) 表皮角化細胞分化における細胞膜リン脂質の役割解明

研究課題名(英文) The role of plasma membrane phospholipid in differentiation of keratinocytes

研究代表者

中村 由和 (Nakamura, Yoshikazu)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授

研究者番号：60366416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では以下を明らかにした。

(1)イノシトールリン脂質代謝酵素PLC γ 1は、表皮角化細胞が特殊な様式の分化をして生じる皮膚付属器官である皮脂腺の正常な形成に必要である。(2)イノシトールリン脂質代謝酵素PLC γ 1とPLC δ 1はマウス皮膚炎モデルの重症度を制御する。(3)黄色ブドウ球菌のイノシトールリン脂質代謝酵素であるPI-PLCは黄色ブドウ球菌の皮膚深部への侵入に関与する。(4)表皮角化細胞では、イノシトールリン脂質PI(4,5)P2の近傍に細胞間接着タンパク質群が存在しており、これらのタンパク質の細胞膜集積にはPI(4,5)P2が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮角化細胞の分化制御機構の理解は表皮分化異常を伴う皮膚疾患の病態理解や創薬標的分子の同定に重要である。本研究により、イノシトールリン脂質PI(4,5)P2やその代謝酵素が表皮角化細胞の分化や細胞間接着を制御する因子の一つであることが強く示唆された。表皮角化細胞におけるPI(4,5)P2やその代謝酵素の変化に着目することで、表皮分化異常を伴う皮膚疾患の病態や発症機序の理解に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The followings were clarified in this study.

(1) Phosphoinositide-metabolizing enzyme PLC γ 1 is required for the normal formation of sebaceous glands. (2) Phosphoinositide-metabolizing enzymes PLC γ 1 and PLC δ 1 regulate the severity of mouse models for inflammatory skin diseases. (3) PI-PLC, phosphatidylinositol-metabolizing enzyme of *S. aureus*, promoted the penetration of *S. aureus* through the epidermal barrier in a mouse model of atopic dermatitis and the human organotypic epidermal equivalent. (4) In keratinocytes, PI(4,5)P2 is proximal to epithelial junctional proteins, and PI(4,5)P2 is required for plasma membrane accumulation of these proteins.

研究分野：脂質生物学

キーワード：イノシトールリン脂質 皮膚 表皮

1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層に位置する表皮の正常な構造や機能維持には表皮角化細胞の適切な分化が必要である。表皮角化細胞の分化は細胞接着因子・転写因子など様々なタンパク質により調節されている。一方、表皮角化細胞の分化において細胞膜脂質の果たす役割はほとんど明らかにされていない。申請者はイノシトールリン脂質やその代謝酵素が表皮角化細胞の分化を制御することを示唆する結果を得ていた。

2. 研究の目的

本研究ではイノシトールリン脂質やその代謝の変化が表皮角化細胞分化に与える影響を解明することを目的とした。具体的には表皮角化細胞の分化に関与するイノシトールリン脂質代謝酵素を特定し、その酵素を操作することにより表皮角化細胞分化に影響が見られるかを検討する。また、表皮角化細胞の分化に関与することが想定される細胞膜リン脂質の近傍に存在するタンパク質を探索、特定し、細胞膜リン脂質による表皮角化細胞分化制御機構を解明する。

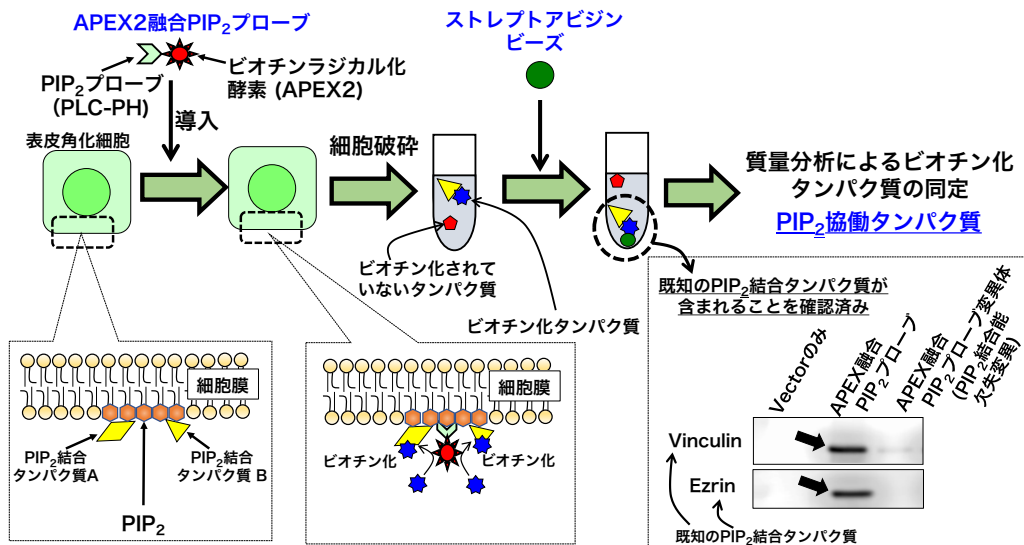
3. 研究の方法

1. 表皮角化細胞の分化に関与するイノシトールリン脂質代謝酵素の特定と機能解析

表皮角化細胞の分化に影響を与える可能性の高いイノシトールリン脂質代謝酵素を表皮角化細胞特異的に欠損させたマウスを作成し、表皮や表皮付属器官の分化や、皮膚炎誘導に対する感受性を調べた。

2. 表皮角化細胞分化に関与するイノシトールリン脂質の近傍タンパク質の探索

ビオチンをラジカル化する酵素である APEX2 を標的タンパク質に付加し、それを細胞内に発現させることで、生細胞内で標的タンパク質の近傍に存在するタンパク質をビオチン化することが可能である。そこで、APEX2 をイノシトールリン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] と特異的に結合するタンパク質 (PLC-PH) に付加し、表皮角化細胞内で発現させ、PI(4,5)P₂ 近傍タンパク質のビオチン化、精製を行った。その後、ビオチン化タンパク質を質量分析により同定し、PI(4,5)P₂ の近傍に存在するタンパク質を特定した。また、PI(4,5)P₂ の 5 位を脱リン酸化する酵素 INPP5E の酵素活性ドメインを細胞膜にアンカーさせて発現させることや、PI(4,5)P₂ 合成酵素 PIP5K1A の発現抑制により PI(4,5)P₂ を減少させ、PI(4,5)P₂ の近傍に存在するタンパク質の細胞内局在に変化が見られるかを調べた。



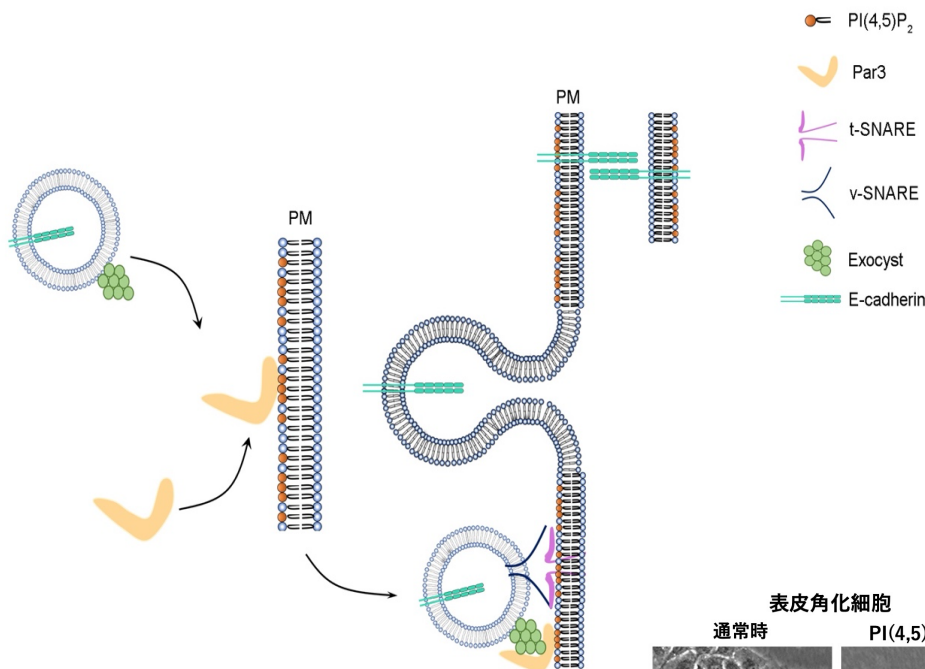
4. 研究成果

1. 表皮角化細胞の分化に関与するイノシトールリン脂質代謝酵素の特定と機能解析

イノシトールリン脂質代謝酵素の一つホスホリパーゼ $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$) を表皮角化細胞特異的に欠損したマウスにおいて表皮角化細胞が特殊な様式の分化をして生じる皮脂腺の形成異常が見られることが明らかになった (Fukuyama *et al. Exp. Dermatol.* 2019)。また、このマウスに皮膚炎を誘導した際には皮膚炎の悪化が見られることも明らかになった。一方で、イノシトールリン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ $\text{C}\delta 1$ ($\text{PLC}\delta 1$) を表皮角化細胞特異的に欠損したマウスは、表皮角化細胞の分化不全を示すことに加え、皮膚炎誘導に対して抵抗性を示した (Shiratori *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019)。また、アトピー性皮膚炎と関連が深い黄色ブドウ球菌が分泌するイノシトールリン脂質代謝酵素であるホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) が黄色ブドウ球菌の皮膚深部への侵入やアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚炎症状悪化に関与することを示唆する結果も得た (Nakamura *et al. Sci. Rep.* 2020)。

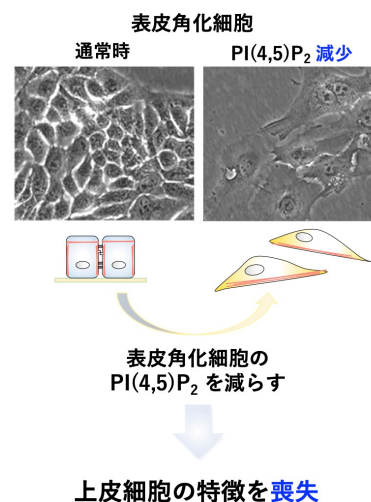
2. 表皮角化細胞分化に関与するイノシトールリン脂質の近傍タンパク質の探索

表皮角化細胞で $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ の近傍に存在するタンパク質を探索したところ、99種類のタンパク質が得られ、その中には表皮角化細胞の分化に寄与する可能性が高い細胞間接着タンパク質群が多く含まれていた。次に、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を減少させ、これらの細胞間接着タンパク質の局在を調べたところ、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ の減少により、細胞間接着タンパク質の細胞膜集積が見られなくなることが明らかになった。さらに、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ は細胞間接着タンパク質を含む輸送小胞の細胞膜への係留を促すタンパク質を細胞膜にリクルートすることにより、細胞間接着タンパク質群の細胞膜集積を促すことを示唆する結果が得られた (Kanemaru *et al. Nature Commun.* 2022)。



3. 表皮角化細胞の上皮細胞特性を制御するイノシトールリン脂質の発見

$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ の5位を脱リン酸化する酵素 INPP5E の酵素活性ドメインを細胞膜にアンカーさせた状態で、安定的に表皮角化細胞に発現させ、慢性的に $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を減少させた。慢性的に $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を減少させた表皮角化細胞では、上皮細胞の特徴である細胞間接着、コンパクトな細胞形態が部分的に失われ、大きく広がった細胞形態や、アクチンストレスファイバーの発達が見られることが明らかになった。さらに、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を



慢性的に減少させた表皮角化細胞では間葉細胞に特徴的に発現する遺伝子群の発現上昇が見られた。これらのことから、表皮角化細胞において、慢性的に PI(4,5)P₂ を減少させた際には、上皮細胞特有の性質が失われ、間葉細胞に部分的に類似した性質が獲得されることが明らかになった (Kanemaru *et al.* *Nature Commun.* 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Park Sung Jin, Haan Kirk, Nakamura Yoshikazu, Fukami Kiyoko, Fisher Thomas E.	4. 巻 41
2. 論文標題 PLC 1 plays central roles in the osmotic activation of N-TRPV1 channels in mouse supraoptic neurons and in murine osmoregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3579-3587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2892-20.2021	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 該当する
1. 著者名 Nakamura Yoshikazu, Kanemaru Kaori, Shoji Madoka, Totoki Kengo, Nakamura Karen, Nakaminami Hidemasa, Nakase Keisuke, Noguchi Norihisa, Fukami Kiyoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphatidylinositol-specific phospholipase C enhances epidermal penetration by Staphylococcus aureus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74692-8	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 Yoneda A., Kanemaru K., Matsubara A., Takai E., Shimozawa M., Satow R., Yamaguchi H., Nakamura Y., Fukami K.	4. 巻 527
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 1050-1056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.040	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 Fukuyama T, Nakamura Y., Kanemaru K, Toyoda C, Jang HJ, Suh PG, Fukami K.	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 Exp. Dermatol.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 中村由和	4. 巻 31
2. 論文標題 ポリホスホイノシタイド代謝によるがん化の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Lipid	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 中村由和、深見希代子	4. 巻 269
2. 論文標題 ホスフォリパーゼCによるイノシトールリン脂質代謝と疾患制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1029-1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Shiratori K, Kanemaru K, Ogura T, Nakajima A, Sugizaki Y, Fukuyama T, Iwakura Y, Nakamura Y, Fukami K.	4. 巻 511
2. 論文標題 Epidermal loss of phospholipase C 1 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.	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 Kazuya Tsujita, Reiko Satow, Shinobu Asada, Yoshikazu Nakamura, Luis Arnes, Keisuke Sako, Yasuyuki Fujita, Kiyoko Fukami, Toshiki Itoh	4. 巻 12
2. 論文標題 omeostatic membrane tension constrains cancer cell dissemination by counteracting BAR protein assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-26156-4	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 Kaori Kanemaru, Makoto Shimozawa, Manabu Kitamata, Rikuto Furuishi, Hinako Kayano, Yui Sukawa, Yuuki Chiba, Takatsugu Fukuyama, Junya Hasegawa, Hiroki Nakanishi, Takuma Kishimoto, Kazuya Tsujita, Kazuma Tanaka, Toshiki Itoh, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, Kiyoko Fukami, Yoshikazu Nakamura	4. 巻 13
2. 論文標題 Plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is critical for determination of epithelial characteristics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-022-30061-9	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 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yoshikazu Nakamura, Kaori Kanemaru, Madoka Shoji, Kengo Totoki, Karen Nakamura, Hidemasa Nakaminami, Norihisa Noguchi, Kiyoko Fukami
2. 発表標題 Phosphatidylinositol-specific phospholipase C enhances penetration of Staphylococcus aureus across the epidermis
3. 学会等名 第45回日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村由和、深見希代子
2. 発表標題 上皮性制御におけるホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸の役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田 萌佳, 米田 敦子, 金丸 佳織, 中村 由和, 深見 希代子
2. 発表標題 イノシトールリン脂質PI(4,5)P2の細胞膜外葉における機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田 敦子, 金丸 佳織, 高井 えりか, 中村 由和, 深見 希代子
2. 発表標題 細胞膜内葉と外葉に局在するイノシトールリン脂質PIP2による細胞 基質接着の制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

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 2020年

1. 発表者名 Kanemaru K., Shiratori K., Ogura T., Fukuyama T., Nakamura Y., Fukami K.
2. 発表標題 Epidermal loss of phospholipase C d1 attenuates irritant contact dermatitis
3. 学会等名 第44回日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村由和、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回日本生化学会大会 (招待講演)
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回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉優希、豊田千穂、福山堯嗣、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回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山堯嗣、豊田千穂、金丸佳織、Pann-Ghill Suh、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 マウス表皮におけるホスホリパーゼ C 1の機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸佳織、米田敦子、松原愛、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉におけるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の検出と機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村由和、下澤誠、金丸佳織、萱野日菜子、須川結衣、千葉優希、福山堯嗣、深見希代子
2. 発表標題 上皮性の獲得、維持におけるホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸の役割の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸佳織、米田敦子、松原愛、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉に存在するホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の検出および生理機能の解析
3. 学会等名 第61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 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Cd1の役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
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 金丸佳織、古石陸人、下澤誠、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-ニリン酸の変化が形質膜コレステロールに与える影響の解析
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 古石 陸人、金丸 佳織、八代 桃香、牧野 巧、中村 由和
2. 発表標題 ホスホリパーゼC様タンパク質の細胞内局在解析と結合タンパク質の探索
3. 学会等名 2021年度日本生化学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長澤 健登、金丸 佳織、田中 朝日、原田 陽介、中村 由和
2. 発表標題 表皮細胞におけるBcl6の機能解析
3. 学会等名 2021年度日本生化学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八代 桃香、金丸 佳織、古石 陸人、牧野 巧、中村 由和
2. 発表標題 ホスホリパーゼC様タンパク質の細胞内局在解析と結合タンパク質の探索
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 古石 陸人, 金丸 佳織, 北又 学, 深見 希代子, 中村 由和
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール(4,5)-二リン酸量や上皮性の制御に関わる酵素の解析
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 長澤 健登, 金丸 佳織, 田中 朝日, 原田 陽介, 中村 由和
2. 発表標題 表皮細胞におけるBcl6の機能解析
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 金丸 佳織, 古石 陸人, 北又 学, 深見 希代子, 中村 由和
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール4,5二リン酸による上皮性制御機構の解析
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 Kaori Kanemaru, Kento Nagasawa, Asahi Tanaka, Yohsuke Harada, Yoshikazu Nakamura
2. 発表標題 Functional analysis of BCL6 in epidermal cells
3. 学会等名 第46回日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------