

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす  
脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation,  
Solo-type, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid  
Molecules to Develop Innovative Medical Technologies

研究開発課題名：(日本語) 生理活性脂質アルケニル型リゾリン脂質の機能と解明

(英語) Functional elucidation of bioactive alkenyl-type lysophospholipids.

研究開発担当者 (日本語) 徳島大学大学院社会産業理工学研究部・准教授

山本 圭

所属 役職 氏名：(英語)

Kei YAMAMOTO, Ph.D.

Associate Professor,

Graduate School of Technology, Industrial and Social Science,

Tokushima University

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

## II. 成果の概要

本研究開発では、表皮肥厚性疾患増悪の新規生理活性脂質として発見されたアルケニル型リゾリン脂質(P-LPE)の代謝や動態に関わる作用機序を解明し、これを基軸とした創薬および予防治療の実用化に向けての理論基盤の構築となることを目指している。下記に平成 28 年度の研究開発の成果について報告する。

### 1) 新規脂質代謝産物 (P-LPE) の機能評価

生理活性脂質としての P-LPE を評価するうえで、P-LPE が直接表皮角化細胞 (ケラチノサイト) に作用するのか、あるいは P-LPE の代謝産物が作用するのか考慮する必要がある。組換えオートタキシン (ホスホリパーゼ D) を用いて検討したところ、P-LPE はホスホリパーゼ D によりプラズマローゲン型リゾホスファチジン酸に代謝されることを証明した。現在、P-LPE およびその代謝産物の機能評価をヒト表皮角化細胞 NHEK を用いて分化および活性化を指標に精査している。

### 2) P-LPE の受容体探索

G タンパク質共役型受容体検出法である TGF $\alpha$  切断アッセイ法を用いて P-LPE をリガンドとする GPCR の同定を進めていたが、現時点では候補となる GPCR は見つかっていない。そこで、過去の実施結果を精査し、候補となる GPCR を約 10 種類にまで絞り込み、現在当該遺伝子を欠損させた表皮細胞株を作成し同定を進めている。

### 3) 創薬としての展開

研究開発計画に予定していた P-LPE のモノクローナル抗体の作成は、ハイブリドーマ 1314 個中、スクリーニングにより 19 個まで絞り込めており、平成 29 年度も引き続きスクリーニングを続ける。

### 4) アルケニル型リゾリン脂質を基軸としたバイオマーカーの探索

P-LPE 以外のアルケニル型リゾリン脂質を基軸とした新たな脂質メディエーターの探索を対象疾患および対象臓器を広げて実施することを目的としている。平成 28 年度は乾癬モデルを対象に角質、皮膚、血清などの臓器について脂質メタボローム解析をおこなった。その結果、テープストリッピングにより採取した角質の P-LPE が表皮肥厚性疾患の病態悪化度に応じて増加した。この結果を受けて平成 29 年度はヒト試料を用いた検討をおこなう予定である。

一方、アルケニル型リゾリン脂質を産生する酵素である sPLA<sub>2</sub> に着目し、sPLA<sub>2</sub> 遺伝子改変マウスを用いて皮膚機能に着目した解析を実施している。平成 28 年度にはリンパ組織の樹状細胞に発現している IID 型 sPLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-IID) が、リゾリン脂質ではなく  $\omega$ 3 脂肪酸代謝産物を動員することでリンパ節炎症 (急性炎症)、接触性皮膚炎 (Th1 応答)、乾癬 (Th17 応答) の各炎症病態を改善する一方で、抗腫瘍免疫を抑制して皮膚癌を促進することを報告した (Miki et al, *J. Biol. Chem.* 2016)。また、毛包に発現している IIE 型 sPLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-IIE) は、不飽和脂肪酸および P-LPE および LPE を分子種非選択的に遊離し、毛皮質の発育に関連することを報告した (Yamamoto et al, *J. Biol. Chem.* 2016)。次年度でも引き続き各種病態を惹起させたモデルを用いて P-LPE の機能評価を精査する。

以上により本研究開発は着実に計画研究を実施している。

In this research, we elucidate the possible mechanism of metabolic and dynamic action of alkenyl-type lysophospholipids (P-LPEs) as a novel bioactive lipid for exacerbation of epidermal hyperplastic diseases. Based on the knowledge, this project is aiming to be construction of the theoretical foundation for practical application of drug discovery and preventive therapy. This is the result of research and development in FY2016 as follows.

#### **1) Functional evaluation of novel lipid metabolite (P-LPE).**

In evaluating P-LPE as a bioactive lipid, it is necessary to consider whether P-LPE acts directly or P-LPE metabolites act on keratinocytes. Studies using recombinant autotaxin (phospholipase D) demonstrated that P-LPE is metabolized by phospholipase D into plasmalogen type lysophosphatidic acid. At present, functional assessment of P-LPE and its metabolites using human epidermal keratinocyte NHEK is closely examined using differentiation and activation as indices.

#### **2) Search for P-LPE receptors.**

We have been trying to identify GPCRs using P-LPE as a ligand by use of TGF $\alpha$  cleavage assay method, which is a G protein-coupled receptor detection, however candidate GPCRs have not been found at the present time. Therefore, we examined past implementation results, narrowed down candidate GPCR to about 10 genes, and prepared an epidermal cell line that is deficient in the relevant gene.

#### **3) Development as drug discovery.**

The screening of P-LPE monoclonal antibody that was scheduled for research and development plan is narrowed down to 19 by screening among 1314 hybridomas, and will continue to be screened in FY2017.

#### **4) Exploration for biomarkers based on alkenyl-type lysophospholipids.**

We aimed to explore for new lipid mediators based on alkenyl-type lysophospholipids other than P-LPE using various diseases and organs. In FY2016, lipid metabolome analysis was performed using organs such as epidermis, skin, and serum of psoriasis model. As a result, the epidermal P-LPE collected by tape stripping increased according to the malignancy of psoriasis model. Based on this results, we plan to investigate using human samples in FY2017.

On the other hand, we focused on secretory phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), an alkenyl-type lysophospholipid producing enzyme, and performed functional analysis of skin function using sPLA<sub>2</sub> gene-engineered mice. In FY2016, we reported that dendritic sPLA<sub>2</sub>-IID improves inflammatory pathologies of lymph node inflammation (acute inflammation), contact dermatitis (Th1 response), psoriasis (Th17 response), while suppressing anti-tumor immunity to promote skin cancer by mobilizing omega-3 polyunsaturated fatty acid metabolites not lysophospholipids (Miki *et al.*, J. Biol. Chem. 2016). Furthermore, we reported that sPLA<sub>2</sub>-IIE in hair follicles produces unsaturated fatty acids, LPE and P-LPE non-selectively and is associated with ciliary development (Yamamoto *et al.*, J. Biol. Chem. 2016). In the next fiscal year, we will continue to investigate the functional evaluation of P-LPE using models that caused various disease states.

As a result of the above, this research and development steadily conducts planned research.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 5 件）

1. \*Murase, R., \*Sato, H., \*Yamamoto, K., Ushida, A., Nishito, Y., Ikeda, K., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Taketomi, Y., Murakami, M. Group X secreted phospholipase A<sub>2</sub> releases  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, suppress colitis and promote sperm fertility. *J. Biol. Chem.* 291, 6895-6911 (2016). **\*equally contributed.**
2. Miki, Y., Kidoguchi, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Gelb, M.H., Yamamoto, K., Murakami, M. Dual roles of group IID phospholipase A<sub>2</sub> in inflammation and cancer. *J. Biol. Chem.* 291, 15588-15601 (2016).
3. Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Nishito, Y., Gelb, M.H., Taketomi, Y., Murakami, M. Expression and function of group IIE phospholipase A<sub>2</sub> in mouse skin. *J. Biol. Chem.* 291, 15602-15613 (2016).
4. Tanigawa, H., Miyata, K., Tian, Z., Aoi, J., Kadomatsu, T., Fukushima, S., Ogata, A., Takeda, N., Zhao, J., Zhu, S., Terada, K., Endo, M., Morinaga, J., Sugizaki, T., Sato, M., Morioka, M.S., Manabe, I., Mashimo, Y., Hata, A., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Murakami, M., Araki, K., Jinnin, M., Ihn, H., Oike, Y. Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis. *Sci. Rep.* 6, 34690 (2016)
5. 山本圭. 皮膚の恒常性や疾患を調節する新しい脂質メディエーター. *生化学* 88, 786-790 (2016)
6. Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Murase, R., Taketomi, Y., Murakami, M. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> specificity on natural membrane phospholipids. *Methods in Enzymol.*, 583, 101-117 (2017).

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ウシ生乳由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の精製と酵素学的性質, ポスター, 川井恵理佳, 田中充樹, 瀬来由衣, 戸田圭祐, 目賀拓斗, 川上祐生, 高橋吉孝, 木本眞順美, 山本圭, 村上誠, 山本登志子, 第70回日本栄養・食糧学会大会(神戸), 2016/05/13-05/15, 国内.
2. The two secreted phospholipase A<sub>2</sub>s PLA2G2F and PLA2G2E play distinct roles in skin homeostasis and diseases. 7th International conference on phospholipase A<sub>2</sub> and lipid mediators., ポスター, Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Lambeau, G., Gelb, M., Murakami, M., La Jolla (USA), 2016/05/19-05/20, 国外.
3. 表皮肥厚性疾患を調節する新しい生理活性脂質の発見, 口頭, 山本圭, 村上誠, 第57回日本生化学会 中国・四国支部例会(高知), 2016/05/27-05/28, 国内.
4. 炎症および癌病態におけるIID型sPLA<sub>2</sub>の二面的役割, 口頭, 三木寿美, 城戸口優, 山本圭, 村上誠, 第58回日本脂質生化学会(秋田), 2016/06/09-06/10, 国内.
5. 皮膚の恒常性と病態における二種のsPLA<sub>2</sub>の発現と機能, 口頭, 山本圭, 三木寿美, 佐藤弘泰, 武富芳隆, 村上誠, 第58回日本脂質生化学会(秋田), 2016/06/09-06/10, 国内

6. マスト細胞を制御する第二のAnaphylactic sPLA<sub>2</sub>の同定, 口頭, 武富芳隆, 砂川アンナ, 入江敦, 山本圭, 三木寿美, 佐藤弘泰, 小林哲幸, 村上誠, 第58回日本脂質生化学会 (秋田), 2016/06/09-06/10, 国内.
7. IID型分泌性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>は抗腫瘍免疫を抑制する, 口頭, 城戸口 優, 山本 圭, 三木 寿美, 村上 誠, 第89回日本生化学会 (仙台), 2016/09/25-09/27, 国内.
8. IID型分泌性ホスホリパーゼA<sub>2</sub>は皮膚免疫疾患を普遍的に抑制する, 口頭, 三木 寿美, 城戸口 優, 山本 圭, 村上 誠, 第89回日本生化学会 (仙台) , 2016/09/25-09/27, 国内.
9. A unique plasmalogen pathway driven by secreted phospholipase A<sub>2</sub> regulates skin homeostasis and disease., 口頭, Murakami, M., Yamamoto, K., The 1st International Plasmalogen Symposium. (Fukuoka, Japan), 2016/11/07-11/08, 国内.
10. Plasmalogen-lysophosphatidylethanolamine is a novel regulator and biomarker for epidermal-hyperplastic diseases. , ポスター, Yamamoto, K., Miki, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., The 1st International Plasmalogen Symposium. (Fukuoka, Japan), 2016/11/07-11/08, 国内.
11. 健康と病態に関わる脂質ネットワークの研究, 口頭, 山本 圭, 第2回BRIGHTシンポジウム (徳島) , 2016/12/16, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 健康と病態に関わる脂質ネットワークの研究, 山本圭, 鳴門高校大学訪問 (徳島大学常三島キャンパス), 2016/07/06, 国内.
2. 健康と病態に関わる脂質ネットワークの研究, 山本圭, 徳島大学生物資源産業学部オープンキャンパス (徳島大学常三島キャンパス), 2016/08/05, 国内.

### (4) 特許出願

なし