

氏名	イノウエ ユウダイ 飯野 雄大
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲 第 号
学位授与の日付	令和5年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるセラミド代謝異常に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 有田 誠 (博士(薬学)) (副査) 教授 多胡 めぐみ (博士(薬学)) 講師 高橋 大輔 (博士(理学))

慶應義塾大学学位規程第11条に基づく審査委員会実施日： 2023年 2月 8日

論文内容の要旨

1. 研究の背景

外部環境から身体を保護する皮膚には、生体防御機能を制御する多種多様な脂質が存在する。例えば、スフィンゴ脂質の一種であるセラミドは、外界からの異物の侵入を防ぐバリア機能に不可欠であり、多価不飽和脂肪酸の代謝物には免疫反応を正や負に制御するものが存在する。これら以外にも様々な脂質が皮膚機能に関与することが報告されている。さらに、脂質代謝酵素の遺伝子変異による皮膚疾患も多数確認されていることから、アトピー性皮膚炎においても根本原因として脂質代謝異常が潜んでいる可能性が考えられる。しかし、これまでの臨床研究では発症前の診断が困難なため、主に発症後の脂質組成の変化に焦点が当てられていた。また、疾患発症後には皮膚機能異常に伴って多くの脂質が大きく変動するため、病態の原因となりうる脂質代謝異常の特定は困難であった。こうした背景から、本研究ではアトピー性皮膚炎を自然発症するモデルマウス **Spade** を用いて、皮膚病態形成過程における脂質代謝異常を経時的に捉え、その分子メカニズムおよび生理的意義の解明を目指した。

2. 結果と考察・展望

2-1. アトピー性皮膚炎モデルマウス **Spade** の表現型解析

変異型 **Jak1 (R878H)** の恒常的な活性化により、8週齢ほどでアトピー性皮膚炎様症状を自然発症するモデルマウス **Spade** の皮膚組織を用いて、組織形態の観察および経皮水分蒸散量 (TEWL) の測定を行った。まず、**Spade** マウスの皮膚炎発症前後の組織学的異常を調べるため、HE染色を行ったところ、炎症発症後の8週齢 **Spade** マウスでは野生型マウスと比較し、表皮が肥厚していた一方、4週齢 **Spade** マウスの皮膚形態に大きな異常は認められなかった。次に、電子顕微鏡を用いて、皮膚の脂質ラメラ構造の観

察を行ったところ、4 週齢 Spade マウスの脂質ラメラ中に、層板顆粒が適切に放出されずに残存したような凝集物が確認された。皮膚バリア機能の異常が示唆されたため、経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定したところ、Spade マウスは 4 週齢の時点ですでに野生型マウスと比較し、TEWL の値が増加していることが確認された。

以上より、Spade マウスにおいて紅斑や掻痒行動を伴うアトピー性皮膚炎症状の発症前に、脂質バリア機能の異常が生じていることが明らかとなった。4 週齢 Spade マウスで認められた脂質ラメラ中の凝集物は、皮膚バリアの破綻が生じる複数の脂質代謝酵素欠損マウスにおいても確認されており、適切な脱落が行われずに残存した層板顆粒であると考えられた。角質層形成時に層板顆粒が脱落することで、脂質が放出されてラメラ層が形成されるが、Spade マウスの表皮組織において、このプロセスに異常が生じ、ラメラ中の凝集物やバリア機能の低下が生じたと考えられた。また、Spade マウスにワセリンを塗布し、皮膚バリアを保護すると、疾患の発症および増悪化が遅延することが先行研究において示されている。従って、今回見出した皮膚バリア機能の異常が Spade マウスの病態形成に関与することが考えられた。

2-2. Spade マウスの病態形成過程における脂質代謝異常の解析

次に、Spade マウスの病態形成過程において、どのように脂質代謝変化が生じていくかを網羅的に捉えるため、生後 0 日、4、8、10 週齢の野生型および Spade マウスから採取した皮膚を用いて全脂質を抽出し、飛行時間型質量分析器を用いてノンターゲットリピドミクスを行った。ネガティブイオンおよびポジティブイオンモードで測定した結果、5000 を超える分子が検出された。それらのアノテーションを行い、計 745 分子の脂質を同定した。皮膚炎症発症後の 10 週齢 Spade マウスでは、アトピー性皮膚炎患者における過去の報告と同様に、セラミド (Cer[NS]) やリゾホスファチジルコリン等の様々な脂質代謝物に変動が認められた。一方で興味深いことに、野生型と比較し Spade マウスにおいて、皮膚炎症発症前である 4 週齢の時点からすでに一部のセラミド分子種の減少が認められ、初期の病態形成に関与している可能性が示唆された。

次に、セラミド代謝異常が耳組織のうち表皮、真皮組織のどちらで生じているかを定量的に捉えるため、4 週齢 Spade マウスの耳組織を表皮・真皮組織に分離し、それぞれのセラミド分子含有量を三連四重極型質量分析器を用いたターゲットリピドミクスにより詳細に解析した。その結果、4 週齢 Spade マウスの表皮組織において、マウス皮膚組織に最も豊富に存在する Cer[NS]の量に変化は認められなかったものの、炭素鎖長 22 以上の極長鎖脂肪酸を含有したジヒドロセラミド (Cer[NDS]) が野生型と比べ、顕著に減少していることが明らかとなった。さらに、Cer[NDS]の減少に起因し、炭素鎖長 22 以上の Cer[NDS]/Cer[NS]の比が減少を示した。

以上より、皮膚炎症発症前の 4 週齢 Spade マウスの表皮組織において、炭素鎖長 22 以上の Cer[NDS]が顕著に減少することが明らかとなった。セラミドは皮膚バリア機能

を司る必須分子である。従って、Spade マウスの表皮においてセラミド代謝異常が生じたことで、電子顕微鏡で観察されたラメラ中の凝集物の発生やバリア機能の低下につながったと考えられた。また、アトピー性皮膚炎患者の病変部位においても、Cer[NDS]/Cer[NS]の比の減少が認められており、病態の重症度を示す指標（SCORAD）と強い負の相関を示すことが知られている。そのため、Spade マウスにおいてもCer[NDS]/Cer[NS]の比の変化が病態形成と関与することが考えられた。

2-3. スフィンゴ脂質代謝酵素の *in vitro* 活性測定

次に、極長鎖 Cer[NDS]が減少するメカニズムを解明するため、4週齢野生型マウスおよび Spade マウスの耳組織から回収した総タンパク質抽出液を用いてスフィンゴ脂質代謝酵素の比活性を測定した。安定同位体で標識された $^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$ -セリンと C16:0-CoA をタンパク質抽出液中でインキュベートし、 $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ -DHS d18:0 の生成量を測定したところ、野生型と比較し Spade マウスにおいて変化は認められなかった。従って、スフィンゴ脂質 *de novo* 合成経路の活性低下は認められなかった。次に、セラミド合成反応を検証するため、安定同位体で標識された d_7 -Sph d18:0 と C24:0-CoA をタンパク質抽出液中でインキュベートしたところ、生成された Cer[NS] d_7 -d18:1/24:0 の量に変化は認められなかった。また同様に、安定同位体で標識された d_7 -DHS d18:0 と C24:0-CoA をタンパク質抽出液中でインキュベートし、生成された Cer[NDS] d_7 -d18:0/24:0 を測定したところ、生成量に変化は認められなかった。従って、セラミド合成反応の低下は認められなかった。一方で、 d_7 -DHS d18:0 と C24:0-CoA から生成される Cer[NDS] d_7 -d18:0/24:0 は、その後セラミド不飽和化反応により Cer[NS] d_7 -d18:1/24:0 に代謝されるが、その生成量を測定したところ、Spade マウスにおいて、野生型と比較し3倍程度上昇していた。生成された代謝物の比 (Cer[NDS] d_7 -d18:0/24:0 / Cer[NS] d_7 -d18:1/24:0) を確認したところ、Spade マウスにおいて有意な減少が認められ、セラミド不飽和化反応の亢進が示された。すなわち、Jak1 依存的な皮膚病態の発症初期に、Cer[NDS]の不飽和化反応の亢進による代謝バランスの変化が生じることを明らかにした。一方で、セラミド不飽和化反応を担う *Degs1* のタンパク質発現量をウェスタンブロットングにて確認したところ、Spade マウスにおいて野生型と比較し、発現量の有意な増加は認められなかった。

以上より、4週齢 Spade マウスにおける Cer[NDS]の選択的な減少には、セラミド不飽和化反応の亢進が寄与している可能性が考えられた。また、セラミド不飽和化反応を担う *Degs1* のタンパク質発現量に有意な変化が認められなかった。*Degs1* はこれまでに、ミリストイル化を受けて活性が増加することや、307番目のセリン残基がリン酸化されることが知られている。このことから、Spade マウスにおいて、*Degs1* は何らかの翻訳後修飾により比活性が上昇している可能性が考えられた。

2-4. Cer[NDS]塗布による Spade マウスの炎症抑制効果の検証

Cer[NDS]が Spade マウスにおけるアトピー性皮膚炎の病態形成を制御するかを検証するために、アセトン:オリーブオイル(4:1, v/v)に溶かした1 µgのCer[NDS] d18:0/24:0、Cer[NDS] d18:0/16:0 もしくは溶媒単独を Spade マウスの耳に一日おきに塗布した。4週齢から開始し、16週齢になるまで塗布を行い、アトピー性皮膚炎様症状の発症と進行を、剥けや紅斑、痂皮を指標にスコアリングした。重症度を0から3までスコア化し、1以上を発症と定義した。その結果、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくはCer[NDS] d18:0/16:0の塗布により、溶媒単独塗布のコントロールと比べて皮膚炎発症の遅延が確認され、16週齢時点においてコントロールでは重症スコアが3に達したのに対し、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくはCer[NDS] d18:0/16:0塗布群では、スコア2程度にしか達しなかった。さらに、疾患の発症率も抑制され、耳の肥厚もCer[NDS] d18:0/24:0 もしくはCer[NDS] d18:0/16:0の塗布群で10週齢以降、コントロールと比較し有意に減弱した。一方で、皮膚バリア機能の指標として計測した経皮水分蒸散量(TEWL)はコントロールと比較し、変化が認められなかった。炎症の度合いを定量的に評価するため、皮膚の炎症関連遺伝子の発現量をqPCRにて測定したところ、野生型と比較し、コントロールでは炎症関連遺伝子の発現量が増加を示した。一方、Cer[NDS] d18:0/24:0 およびCer[NDS] d18:0/16:0は、コントロールと比較し、有意な遺伝子発現の抑制を示した。

次に、表皮組織の形態をより詳細に確認するため、野生型マウス、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独を塗布した Spade マウスの耳組織を用いて、表皮層構造のマーカータンパク質を免疫染色により確認した。細胞増殖マーカー、基底層マーカー、有棘層マーカー、角質層マーカーとして、それぞれKi67、Keratin5、Keratin10、Loricrinの免疫染色を行ったところ、いずれのマーカータンパク質においても、野生型と比較しコントロールの Spade マウスにおいて発現が亢進していた。さらに、Cer[NDS] d18:0/24:0 塗布により、溶媒単独塗布のコントロールと比較してマーカータンパク質の発現が減弱し、表皮の肥厚・過形成が抑制されていることが明らかとなった。

以上、Cer[NDS] d18:0/24:0の繰り返し塗布により、Spade マウスの皮膚炎の発症および増悪化が抑制された。また、Cer[NDS] d18:0/16:0においても同様の効果が確認され、皮膚の病態形成をCer[NDS]が制御することが示された。Spade マウスの表皮組織における極長鎖Cer[NDS]の減少は、長鎖Cer[NDS]の塗布によっても代替できることが示唆された。また、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくはCer[NDS] d18:0/16:0の塗布は、TEWLの値を変化させることなく、表皮肥厚を抑制し、皮膚疾患の発症および増悪化を緩和させた。TEWLはバリア機能の指標であり、タイトジャンクションや脂質ラメラの状態を反映する。表皮肥厚は、表皮構成細胞のケラチノサイトの増殖や角化が異常に亢進することで生じる。従って、塗布されたCer[NDS]はタイトジャンクションや脂質ラメラの制御には関与せず、ケラチノサイトの増殖・分化に影響を与えたと考えられる。

2-5. 総括および展望

本研究より、**Jak1** 活性化により生じるアトピー性皮膚炎の病態形成過程において、経時的なセラミド代謝異常、および代謝酵素 **Degs1** の比活性亢進が明らかになった。加えて、**Jak1** 依存的なアトピー性皮膚炎において、**Cer[NDS]**が病態抑制的に機能することが示唆された。**JAK** 阻害剤はすでにアトピー性皮膚炎の治療薬として日本で承認されている。また、**Jak1** のリン酸化がアトピー性皮膚炎患者の病変部位で亢進しており、アトピー性皮膚炎病態における **JAK** シグナルの重要性が指摘されている。本研究成果は、**Jak1** 活性亢進の下流でセラミド代謝異常が生じ、その是正がアトピー性皮膚炎の予防・治療につながる可能性を示した。

論文審査結果の要旨

本審査会では、申請者が約 25 分間の研究発表を行った後、約 1 時間の質疑応答を行った。最後に、申請者が退出し審査委員による協議を行った。

審査委員より、他のアトピー性皮膚炎モデルの存在および、他のモデルマウスにおける **Jak1** 活性化とセラミド代謝異常について質問を受けた。OVA 投与モデルや **IL-13** のトランスジェニックマウス、**Stat3** の遺伝子変異によるアトピー性皮膚炎モデルマウスが存在すると回答した。また、**IL-13** のトランスジェニックマウスの病変部位において、鎖長の長い **Cer[NS]**が減少し、鎖長の短い **Cer[NS]**が増加することが報告されていると回答した。一方で、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて **Jak1** の活性化に言及した報告は無いが、アトピー性皮膚炎患者の病変部位において **JAK1** のリン酸化が亢進している報告があると回答した。

審査委員より、変異によりなぜ **Jak1** は活性化するのかについて質問を受け、**Jak1** の変異はキナーゼドメイン内の **ATP** 結合モチーフに生じているが、その変異により活性化が生じるメカニズムは明らかでないと回答した。

審査委員より、**Degs1** 活性が **Spade** マウスにおいて亢進したメカニズムを問われ、**Degs1** は N 末端のミリスチル化によって代謝活性が亢進することや、307 番目のセリン残基がリン酸化されることが知られているため、**Spade** マウスにおいても翻訳後修飾による活性亢進の可能性があると回答した。実際に翻訳後修飾を確認したことはあるかとの質問を受け、耳組織を用いたリン酸化プロテオミクスを行ったものの、**Degs1** のリン酸化ペプチドは検出されなかったと回答した。また、ミリスチル化や他の翻訳後修飾に関してはまだ検証できていないと回答した。

審査委員より、耳組織を用いた理由について質問を受けた。**Spade** マウスは背中 of 皮膚にもアトピー性皮膚炎様症状が発症するが、耳が最も安定的に発症するため使用したと回答した。また、耳組織は、皮膚所見で判断する疾患発症時期が、毛がないため背中の皮膚より観察しやすく、毛包周期の影響も受けにくいと回答した。

審査委員より、**Spade** マウスにおける他臓器の異常の有無について質問を受けた。血清のクレアチニン値の上昇が皮膚炎発症前の段階で、脾臓の肥大化が発症直前の段階で

観察されると回答した。また、20 週齢ほどの Spade マウスで脱肛が確認されることがあると回答した。

審査委員より、今回見出したセラミド代謝異常とアトピー性皮膚炎の病態形成との因果関係について質問を受けた。セラミドの経皮塗布で疾患が抑制されたことから、病態形成を制御する因子であることが示唆されたものの、実際にセラミド代謝が病態形成の原因となるかは証明できていないと回答した。Degs1 によるセラミド不飽和化反応を抑制する阻害剤を適用することで、因果関係が証明できる可能性があると考えられる。

審査委員より、Jak1 の下流でどの Stat ファミリーのリン酸化が亢進しているのかについて質問を受けた。既報において、皮膚組織における Stat1-6 の免疫染色が行われており、Stat2、Stat3、Stat5、Stat6 のリン酸化が表皮の上層において亢進していることが示されていると回答した。また、Stat3 の遺伝子多型によるアトピー性皮膚炎の患者も存在しており、今回のモデルマウスにおいても Stat3 の活性化が病態進行につながっている可能性があるという回答した。

審査委員より、培養細胞においても Jak1 活性化によるセラミド代謝異常が生じるかについて質問を受けた。Spade マウスの初代培養ケラチノサイト、ヒト由来プライマリーケラチノサイト、ヒト皮膚細胞株の HaCaT を使用し、サイトカイン添加による JAK の活性化や、変異型 Jak1 の過剰発現を行ったが、セラミド代謝異常は生じなかったと回答した。3 次元的に構成された細胞の層構造や、Jak1 活性化による間接的な他のシグナル経路の寄与が、培養細胞では再現が困難であった可能性があるという回答した。

審査委員より、どの細胞の Jak1 活性化がセラミド代謝異常につながっているのかについて質問を受けた。先行研究における皮膚切片の免疫染色において、特に表皮上層のケラチノサイトの Jak シグナルが亢進しているという回答した。また 3 週齢から 10 週齢のモデルマウスの耳組織を用いた FACS 解析により、マスト細胞や T 細胞、B 細胞等の免疫細胞の浸潤は、病態形成前段階である 4 週齢モデルマウスにおいては生じておらず、7、8 週齢といった病態発症の直前で浸潤することから、おそらくケラチノサイトの Jak1 活性化がセラミド代謝異常につながっているという回答した。

審査委員より、鎖長の長いセラミドの働きと重要性について質問を受けた。セラミドは炭素鎖長が長いほど疎水性が高くなり、体内からの水分の蒸散や体外からの異物の侵入を防ぐ皮膚バリア機能に貢献できると回答した。鎖長の長いセラミドの合成酵素は、分化したケラチノサイトで発現が亢進し、表皮上層においては、ほとんどのセラミドが鎖長の長いタイプであると回答した。

セラミド (Cer[NDS]) の塗布により病態形成が抑制されるメカニズムについて質問を受けた。セラミド塗布は経皮水分蒸散量の亢進を抑制しなかったことから、内在性のセラミドが発揮するバリア機能に貢献したわけではないという回答した。セラミドはシグナル分子としても重要であり、ケラチノサイトの増殖・分化を制御することや、免疫細胞の脱顆粒を抑制するため、塗布したセラミドはシグナル分子として働き、病態形成を抑制した可能性があるという回答した。

審査委員より、Jak1 の変異と Degs1 の活性化の関係について質問を受けた。Jak1 は変異により活性化が亢進し、主に、近傍に寄ってくる SH2 ドメインを有するタンパク質をリン酸化する。細胞膜付近でタンパク質のリン酸化を行うことから、小胞体膜タンパク質である Degs1 を直接リン酸化しているとは考えにくいという回答した。従って、Jak1

の下流の他のタンパク質によるリン酸化や、他の翻訳後修飾を受けている可能性があるものの、詳細なメカニズムは明らかになっていないと回答した。

審査委員より、Spade マウスと細菌との関係について質問を受け、無菌環境下では Spade マウスの病態形成が遅延することが他者の実験から示されていると回答した。

公聴会では、セラミド代謝是正の臨床応用について質問を受け、NDS と NS セラミドの比はアトピー性皮膚炎患者の重症度のスコアと相関を示すことが報告されているため、セラミド代謝異常の是正することは臨床応用できる可能性があるという回答した。代謝酵素の *in vitro* 活性測定は、組織や臓器の状態を適切に反映できているのかについて質問を受け、不飽和化反応が亢進していることは間違いないと言えるが、組織を破碎してしまっているため、各細胞や臓器・オルガネラ状態は保たれておらず、完全に組織の状態を反映できていないと回答した。セラミドと疎水性バリア機能との関係について質問を受け、角質層形成の際に細胞外に放出された後、およそ 6 nm と 13 nm の 2 周期の層構造に整列することで、疎水性バリアとして機能すること、またセラミド代謝異常が生じると、整列した層構造の形成が困難となり、バリア機能が保たれなくなると回答した。セラミド塗布が病態形成を抑制したメカニズムに関して質問を受け、経皮水分蒸散量の亢進を抑制しないことからバリア機能回復に貢献したわけではなく、ケラチノサイトの増殖・分化を制御することで病態形成を抑制した可能性があるという回答した。NS セラミドの塗布によって病態形成は抑制されるのかについて質問を受け、NDS セラミドの塗布と同程度の病態形成抑制効果を示したと回答した。また、セラミド塗布が好塩基球やマスト細胞に発現する CD300 を介して脱顆粒を抑制する可能性を回答した。

本研究は、Jak1 活性化により生じるアトピー性皮膚炎の病態形成過程において、病態形成初期のセラミド代謝異常、および代謝酵素 *Degs1* の活性亢進を見出した。加えて、Jak1 依存的なアトピー性皮膚炎において、Cer[NDS]の連続塗布が病態抑制的に作用することを示した。本研究結果から、セラミド代謝異常の是正がアトピー性皮膚炎の病態制御に有効である可能性が示唆された。

申請者の博士論文、学位審査会および公聴会での発表、試問に対する回答は概ね妥当であった。また、本研究および関連領域に関する知識や理解は概ね満足できるものであった。以上より、申請者は博士（薬科学）学位に十分値するものと評価された。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

Yudai Iino, Tatsuro Naganuma, Makoto Arita. Dysregulated ceramide metabolism in mouse progressive dermatitis resulting from constitutive activation of Jak1. *Journal of Lipid Research* 64 (2), 100329, 2023.