

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	飯野 雄大
<p>主 論 文 題 名 : 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</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景・目的】</p> <p>皮膚は外界と身体内部を隔てる最大の臓器であり、多彩な機能を発揮することで生体の恒常性を維持している。皮膚に存在する多種多様な脂質は様々な皮膚機能の維持に関与することが知られており、脂質代謝酵素の遺伝子欠損マウスは皮膚バリア等の皮膚機能の異常により皮膚炎様症状をきたす。また、皮膚疾患の患者においても脂質代謝の異常は確認されており、病態の根本原因として脂質代謝の関与が疑われる。しかし、これまでの臨床研究では、疾患発症後の脂質代謝が解析されており、病態と脂質代謝は相関関係で説明されていた。また疾患発症後では様々な皮膚機能異常と同時に多岐にわたる脂質が変動するため、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。そのため、皮膚疾患における各々の脂質の意義や変動過程は明らかでなく、皮膚病態形成時の脂質代謝変化の意義は不明瞭であった。そこで本研究では、アトピー性皮膚炎を自然発症するモデルマウスを用いて、病態形成の継時的解析と網羅的な脂質解析を組み合わせることで、皮膚病態形成過程における脂質代謝変化を捉え、その分子メカニズムおよびに生理的意義の解明を目指した。</p> <p>【方法】</p> <p>1. <u>アトピー性皮膚炎モデルマウス Spade のリポドミクス解析</u></p> <p>変異型 Jak1 (R878H) の恒常的な活性化により、8 週齢頃から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 (Yauda T. et al. <i>J Clin Invest.</i> 126: 2064-76. 2016.) と野生型マウスの皮膚組織を生後 0 日、4、8、10 週齢にて採取し、病態の進行をモニターしつつ、飛行時間型質量分析器を用いてノンターゲットリポドミクス解析を行った。また、4 週齢マウスの耳組織から表皮・真皮を単離し、三連四重極型質量分析器を用いて、スフィンゴ脂質のターゲットリポドミクスを行った。</p>			

2. スフィンゴ脂質代謝酵素の *in vitro* 比活性測定

4 週齢 Spade マウスおよび野生型マウスの耳組織から総タンパク質を抽出し、スフィンゴ脂質代謝酵素の比活性測定を行った。その後、ウエスタンブロッティングを行い、スフィンゴ脂質代謝酵素のタンパク質発現量を検証した。

3. Cer[NDS]塗布による Spade マウスの炎症抑制効果の検証

Spade マウスの耳にアセトン:オリーブオイル=4:1 (v/v) に溶かした 1 μ g の Cer[NDS] d18:0/24:0、Cer[NDS] d18:0/16:0 もしくは溶媒単独を 1 日おきに塗布して病態の発症、増悪化をスコアリングした。Spade マウスが 4 週齢になった時点で塗布を開始し、16 週齢になるまで塗布を続けた。

【結果】

1. アトピー性皮膚炎の病態形成過程における脂質代謝変動の解析

ノンターゲットリポドミクスを用いて、Spade マウスの病態形成過程における 700 種類を超える脂質の変動を捉えた。疾患発症後である 10 週齢 Spade マウスでは、アトピー性皮膚炎患者の病変部位においても確認される多様な脂質代謝変動が認められた。一方で、興味深いことに皮膚炎発症前である 4 週齢 Spade マウスにおいて、炭素鎖長 22 以上の極長鎖脂肪酸を含有した Cer[NDS]が野生型と比べ顕著に減少していることをノンターゲットおよびターゲットリポドミクスから見出した。

2. 4 週齢 Spade マウスにおけるスフィンゴ脂質代謝酵素の比活性測定

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活性測定を行った。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たところ、生成された Cer[NDS] d_7 -d18:0/24:0 に変動が認められない一方で、不飽和化反応により Cer[NDS] d_7 -d18:0/24:0 から生成される Cer[NS] d_7 -d18:1/24:0 の生成量が Spade マウスにおいて野生型と比較し、3 倍程度上昇した。一方で、極長鎖セラミドの合成活性や、スフィンゴ脂質 *de novo* 合成活性の低下は認められなかった。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エスタンブロッティ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。

3. 経皮塗布による Cer[NDS]の病態抑制効果の検証

Spade マウスの耳に、溶媒に溶かした Cer[NDS] d18:0/24:0 を繰り返し塗布することで、溶媒単独塗布のコントロールと比較し、皮膚炎の発症、増悪化、および耳の肥厚が有意に抑制された。さらに、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ところ、Cer[NDS] d18:0/24:0 塗布により、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。また、Cer[NDS] d18:0/16:0 の繰り返し塗布によっても、Cer[NDS] d18:0/24:0 の塗布時と同程度の疾患発症および増悪化の抑制効果が確認された。

【考察】

セラミドは皮膚バリア機能に必須の脂質分子である。Spade マウスでは、皮膚炎発症前の4週齢から皮膚バリア能の低下や脂質バリア層の形態異常が観察された。従って、Spade マウスにおける極長鎖脂肪酸含有の Cer[NDS]の減少は、皮膚バリア異常に寄与している可能性が考えられた。

皮膚炎発症前の Spade マウス皮膚組織において、セラミド不飽和化反応が亢進していた。セラミド不飽和化反応を担う Dggs1 酵素のタンパク質発現量に変化は認められなかったことから、発現量非依存的な活性制御機構の存在が示唆された。

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ことから、皮膚の病態形成を Cer[NDS]が制御することが示された。この効果は、極長鎖 Cer[NDS] d18:0/24:0 のみならず、Cer[NDS]d18:0/16:0 においても確認された。表皮に内在する Cer[NDS]のほとんどは極長鎖型であり、極長鎖型の減少の影響を受け、Spade マウスでは Cer[NDS]の総量が減少している。従って、塗布された Cer[NDS]は、内在性の Cer[NDS]の減少を補填することで、鎖長非依存的に病態形成や表皮肥厚を抑制した可能性が考えられた。

【結論】

本研究により、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 Dggs1 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。

【主論文に関する原著論文】

1) Iino Y, Naganuma T, Arita M, Dysregulated ceramide metabolism in mouse progressive dermatitis resulting from constitutive activation of Jak1. *J Lipid Res.* in press.