

博士学位論文 2022 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

飯野雄大

# 目次

略語	3
脚注	5
1 序論	
1-1 皮膚の構造と脂質の機能	6
1-2 アトピー性皮膚炎	10
1-3 セラミド合成経路	12
1-4 アトピー性皮膚炎モデルマウス <b>Spade</b>	14
2 研究目的	16
3 方法	
3-1 マウスの飼育	17
3-2 マウステールからのゲノム抽出とジェノタイピング	17
3-3 経皮水分蒸散量 (TEWL) の測定	19
3-4 耳組織からの表皮、真皮の単離	19
3-5 RNA 精製、cDNA 調製、定量的 RT-PCR	19
3-6 タンパク質ライセートの調製	24
3-7 スフィンゴ脂質代謝酵素の <i>in vitro</i> 比活性測定	25
3-8 三連四重極型質量分析器を用いたスフィンゴ脂質の分析	26
3-9 飛行時間型質量分析器を用いた脂質分析	32
3-10 ウェスタンブロッティング	33
3-11 脂質塗布実験	34
3-12 形態観察および免疫染色	34
3-13 統計解析	36
4 結果	

4-1	Spade マウス皮膚組織においてバリア機能の異常が認められた	37
4-2	皮膚炎発症後の Spade マウスにおいて、アトピー性皮膚炎患者と似た脂質代謝異常が確認された	39
4-3	皮膚炎発症前の 4 週齢 Spade マウスにおいて、Cer[NDS]が顕著に減少することを見出した	43
4-4	4 週齢 Spade マウス表皮組織において、極長鎖 Cer[NDS]の減少が認められた	46
4-5	4 週齢 Spade マウスの皮膚組織において、セラミド不飽和化反応の亢進が認められた	50
4-6	セラミド不飽和化酵素 Dsgs1 の遺伝子・タンパク質発現は有意に変化しなかった	53
4-7	Cer[NDS] d18:0/24:0 の塗布により Spade マウスの皮膚炎発症および増悪化が抑制された	55
4-8	Cer[NDS] は鎖長に依存せず、Spade マウスの皮膚炎発症および増悪化を抑制した	58
5	考察	61
6	主論文に関する原著論文	67
7	参考文献	68
8	謝辞	79

## 略語

17, 18-EpETE, 17,18-epoxy eicosatetraenoic acid

Cer, ceramides

Cer[AS], ceramides containing  $\alpha$ -hydroxy fatty acid and sphingosine

Cer[EOH], ceramides containing ester-linked fatty acid,  $\omega$ -hydroxy fatty acid, and 6-hydroxysphingosine

Cer[EOP], ceramides containing ester-linked fatty acid,  $\omega$ -hydroxy fatty acid, and phytosphingosine

Cer[EOS], ceramides containing ester-linked fatty acid,  $\omega$ -hydroxy fatty acid, and sphingosine

Cer[NDS], ceramides containing non-hydroxy fatty acid and dihydrosphingosine

Cer[NH], ceramides containing non-hydroxy fatty acid and 6-hydroxysphingosine

Cer[NP], ceramides containing non-hydroxy fatty acid and phytosphingosine

Cer[NS], ceramides containing non-hydroxy fatty acid and sphingosine

$d_3$ , three deuterium atoms

$d_7$ , seven deuterium atoms

$d_9$ , nine deuterium atoms

DEGS, delta(4)-desaturase sphingolipid

DHS, dihydrosphingosine

ELOVL, elongation of long-chain fatty acids

IP<sub>3</sub>, inositol trisphosphate

JAK, Janus kinase

MRM, multiple reaction monitoring

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E2

PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol bisphosphate

PLP, pyridoxal 5'-phosphate

RvE<sub>1</sub>, resolvin E1

Spade, stepwise progressive atopic dermatitis

Sph, sphingosine

TEWL, transepidermal water loss

## 脚注

本研究では、ヒトのタンパク質を全て大文字で表記し、マウスのタンパク質は頭文字のみ大文字で表記した。また、遺伝子はイタリック体で記した。

(例) DEGS1、ヒトの DEGS1 タンパク質

**Degs1**、マウスの DEGS1 タンパク質

*DEGS1*、ヒトの DEGS1 遺伝子

*Degs1*、マウスの DEGS1 遺伝子

# 1 序論

## 1-1 皮膚の構造と脂質の機能

皮膚は外界と身体内部を隔てる最大の臓器であり、成人で面積は約 1.6 mm<sup>2</sup>、重量で体重の約 16% を占める。外側から表皮、真皮、皮下組織と呼ばれる層構造を形成しており、最外層に位置する表皮はさらに、ケラチノサイトと呼ばれる細胞が外側から角質層、顆粒層、有棘層、基底層の 4 層構造を形成している (図 1 A)。角質層は、脱核し死細胞となったケラチノサイトで構成されている。その間隙はセラミドやコレステロール等の疎水性の高い脂質が整列しており、脂質ラメラと呼ばれる層構造を形成している。脂質ラメラは、疎水性バリアの本体として体内からの水分の蒸散、外部からの異物の侵入を防ぐ役割を担っている。脂質ラメラを構成する角質細胞間脂質は重量比でセラミドが 50%、ステロール類が 25%、遊離脂肪酸が 15% を占めている

(1) (図 1 B)。角質細胞間脂質として最も豊富に存在するセラミドは脂肪酸と長鎖塩基がアミド結合した構造を持つ。セラミドを構成する脂肪酸と長鎖塩基は、炭素鎖長や不飽和度、水酸基の数や位置に多様性を有しており、その組み合わせによりセラミドは多様な分子種に分類される (2-4) (図 1 C)。例えば、水酸基を持たない脂肪酸とスフィンゴシン (Sph) で構成されるセラミドは Cer[NS]、同様の脂肪酸とジヒドロスフィンゴシン (DHS) で構成されるセラミドは Cer[NDS] と分類・表記される。多くの臓器では脂肪酸鎖長が 16、18、24 のセラミドが豊富である一方、皮膚では 24、26 のセラミドが主に存在し、他臓器ではほぼみられない 28 以上のセラミドも存在する (5)。炭素鎖 26 以上の脂肪酸を含有するセラミドの中には、 $\omega$  位が水酸化された  $\omega$  ヒドロキシセラミドが存在し、さらに  $\omega$  位にリノール酸がエステル結合することで、脂質ラメラの足場として機能するアシルセラミドが生成される。炭素鎖 24 以上の脂肪酸の伸長反応は ELOVL1/4 によって触媒され、脂肪酸の  $\omega$  位の水酸化は CYP4F22 が担

う (6, 7)。PNPLA1 および ABHD5 は、トリアシルグリセロールから切り出したリノール酸をセラミドの  $\omega$  位に転移させ、アシルセラミドを生成する (8)。これらセラミド合成酵素の遺伝子欠損マウスはいずれも、バリア機能の破綻により生後間もなく死亡することが確認されており、セラミドは皮膚バリア機能に不可欠であることが伺える (9-14)。

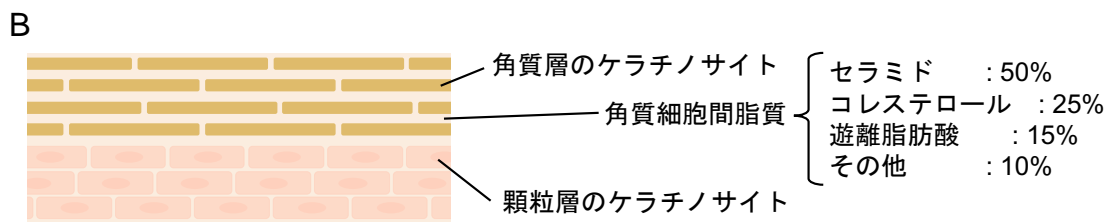
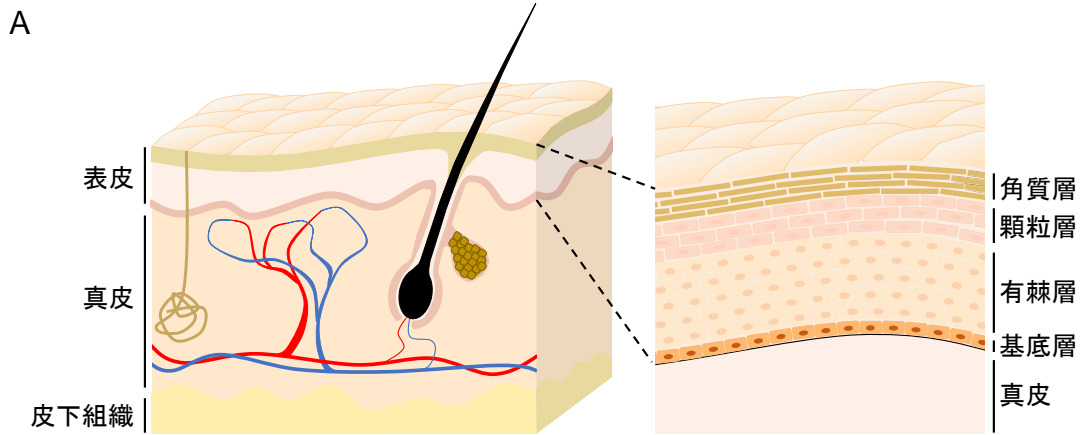
皮膚の恒常性維持には、他にも様々な脂質分子が関わっている。例えば、 $\omega$ 3系多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) のエポキシ代謝物である 17, 18-EpETE は、Gpr40 を介して炎症部位への好中球の遊走を抑制し、Th1 型皮膚炎を抑制する (15)。グリセロリン脂質の一種であるリゾホスファチジン酸 (LPA) は、LPA 受容体 1 と 5 を介してケラチノサイトの分化を亢進させ、フィラグリン等の分化マーカー遺伝子の発現を上昇させる (16)。エイコサノイドである PGE<sub>2</sub> はケラチノサイトに発現する EP2 を介して PAR-2 の細胞膜への移行を抑制する (17)。それにより、定常的に存在する PGE<sub>2</sub> は TSLP の遺伝子発現を抑制しており、Th2 型免疫反応への応答を制御している。EPA の水酸化代謝物である RvE<sub>1</sub> は BLT1 を介して、樹状細胞や  $\gamma\delta$ T 細胞の所属リンパ節への遊走を抑制することで、Th17 型皮膚炎を抑制する (18)。

また、皮膚組織における脂質代謝酵素の遺伝子欠損マウスは皮膚機能に異常をきたすことが複数の報告で示されている。例えば、PIP<sub>2</sub> から IP<sub>3</sub> とジアシルグリセロール (DAG) を合成する Plc $\delta$ 1 のケラチノサイト特異的ノックアウトマウスでは、IL-23 や IL-17 の産生量が上昇し、Th17 型皮膚炎を発症する (19)。セラミドの *de novo* 合成経路の律速酵素である Sptlc2 のケラチノサイト特異的欠損マウスにおいても、生後 2 週ほどから Th17 型皮膚炎を呈することが報告されており、IL-17 陽性の  $\gamma\delta$ T 細胞数の増加が確認されている (20)。

以上のように、多様な脂質分子はそれぞれが特徴的な生理作用を発揮することで、皮膚に存在する様々な細胞や皮膚機能を制御している。皮膚疾患患者の病変部位



においても多岐にわたる脂質分子の変動が認められており、病態への関与が疑われている。



**C**

脂肪酸	N (non-hydroxy FA)	A ( $\alpha$ -hydroxy FA)	B ( $\beta$ -hydroxy FA)	EO (esterified $\omega$ -hydroxy FA)
長鎖塩基				
DHS (dihydrosphingosine)	NDS 	ADS 	BDS 	EODS 
Sph (sphingosine)	NS 	AS 	BS 	EOS 
PHS (phytosphingosine)	NP 	AP 	BP 	EOP 
HS (6-hydroxysphingosine)	NH 	AH 	BH 	EOH 

## 図 1. 皮膚の構造とセラミド多様性

(A) 皮膚の構造。皮膚は外側から表皮、真皮、皮下組織に分類される。表皮はさらに、角質層、顆粒層、有棘層、基底層の4層構造を形成する。(B) 角質層では、脱核し死細胞となったケラチノサイトが堆積している。その隙間には角質細胞間脂質と呼ばれるセラミド等の脂質が整列しており、脂質ラメラと呼ばれる疎水性の層構造を形成することで、疎水性バリアとして機能している。(C) セラミドの多様性を示した。セラミドは前駆体となる脂肪酸と長鎖塩基の組み合わせにより様々に分類される。

## 1-2 アトピー性皮膚炎

先進国において代表的な皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎は、増悪と軽快を繰り返す掻痒のある湿疹を主病変とする疾患である。アトピー素因（体質）とバリア機能の脆弱性等に起因する皮膚を含む臓器の過敏を背景に、様々な病因が複合的に関わる事がアトピー性皮膚炎の病態形成に関与すると考えられている (21)。アレルギー疾患として、Th2 型の免疫応答が主体であることが知られ、先進国では 2-10% に及ぶ成人が罹患しているとされる (22)。抗炎症薬であるステロイドや、カルシニューリン阻害薬であるタクロリムスを用いた対症療法が主流となっているが、近年ではサイトカイン受容体をターゲットとした抗 IL-4 受容体モノクローナル抗体も 10 年ぶりの新薬として登場し、大きな病態改善効果を示している。また、JAK をターゲットとした分子標的薬も複数承認され、現在も多くの JAK 阻害剤が臨床研究へと進んでいる (23)。このようにアトピー性皮膚炎の治療は進歩を遂げ始めている一方で、抗体医薬は薬価や副作用、投与中断後の作用減弱の問題も残っており、重症度が中等度以上の患者のみに適用されている。さらに、多因子性の疾患であるアトピー性皮膚炎は、完治が困難であるのみならず、患者によっても容体が異なる。そのため、それぞれの患者に適した治療を選択する必要がある、今後も様々な治療戦略を生み出していくことが求められている。

こうした難治性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎患者の病変部位において、多岐にわたる脂質代謝の変動が報告されている。例えば、LC-MS を用いて病変部位の 11 種類のセラミドを分析した報告では、Cer[NH]、Cer[NP]、Cer[NDS]、Cer[EOS]、Cer[EOH]、Cer[EOP]の 6 種類の総量が減少し、Cer[AS]の総量が増加していることが示された (24)。また、セラミドのみならずスフィンゴミエリン (SM) とリゾホスファチジルコリン (LPC) も分析した報告では、いずれも炭素鎖長が 24 以上の長い脂肪酸を含有した分子種が減少し、炭素鎖長 16 の長鎖脂肪酸を含有した分子種が増加している

ことが明らかとなった (25)。他にも多価不飽和脂肪酸代謝物等の様々な脂質分子の変動がアトピー性皮膚炎の病変部位において確認されている (26–28)。

このようにアトピー性皮膚炎病変部位において、様々な脂質代謝の変動が確認されているものの、皮膚病態とは相関関係にて脂質の意義が説明されている。皮膚疾患の臨床研究においては、発症の判断が困難であり、発症後の解析が主にされていた。そのため、細胞または臓器レベルで作用を発揮する脂質代謝が変動する時期、変動するメカニズム、病態形成時に与える影響は不明瞭であった。こうした問題から、脂溶性代謝物は低分子医薬品としての可能性を秘めるものの、未だ病態への介入に応用ができていない。

### 1-3 セラミド生合成経路

以下にセラミド生合成経路を示した（図2）。皮膚において最も重要な脂質分子の一つであるセラミドは、スフィンゴ脂質 *de novo* 合成経路で生成される。まず、律速酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ（Spt）によりパルミトイル CoA（C16:0-CoA）とセリンが縮合し、3-ケトジヒドロスフィンゴシン（3-ketoDHS）に代謝される（6）。Spt は、Sptlc1/2/3 の3種類が存在し、Sptlc1/2 もしくは Sptlc1/3 の組み合わせで複合体を形成することで活性を発揮する。活性本体は Sptlc2 または Sptlc3 であり、Sptlc1 は調節サブユニットであることが知られている。また、サブユニットとして Sptssa/ssb も存在し、活性の調節を担っている。Sptlc1/2 および Sptlc1/3 の複合体はそれぞれ Sptssa または Sptssb とさらに複合体を形成する。Sptlc2 の複合体はパルミトイル CoA（C16:0-CoA）を基質とする一方、Sptlc3 の複合体はミリストイル CoA（C14:0-CoA）やステアシル CoA（C18:0-CoA）等も幅広く基質にし、多様な炭素鎖長の長鎖塩基を生成することが知られる（29）。Spt により生成された 3-ketoDHS はその後、Fvt-1 によって NADPH 依存的に長鎖塩基であるジヒドロスフィンゴシン（DHS）に代謝される（30）。ヒトにおいて、FVT-1 をコードする *KDSR* 遺伝子の変異により血小板減少症を伴う皮膚角化症を発症することが報告されている（31）。生成された DHS は様々な炭素鎖長のアシル CoA とアミド結合し、Cer[NDS]が生成される。この反応はセラミド合成酵素である CerS が担っており、哺乳類では CerS1-6 が存在する。中でも CerS3 は炭素鎖長が 24 以上のアシル CoA を基質とし、皮膚バリアに不可欠な極長鎖脂肪酸含有のセラミドを合成する（6）。ヒトにおいて *CERS3* の一塩基多型（SNP）で魚鱗癬が生じること、また、*CerS3* の遺伝子欠損マウスは皮膚バリア機能の破綻で新生致死を起こすことから、皮膚における極長鎖セラミドの重要性が伺える（32, 33）。生成された Cer[NDS]はその後、Cer[NS]や Cer[NP]といった他のセラミドに代謝される。哺乳類で最も豊富に存在する Cer[NS]はセラミド不飽和化酵素の *Degs1* によ

って二重結合が付加されることで生成される (34)。皮膚と小腸に多く見られる Cer[NP]は *Degs2* によって水酸化されることで生成される。生成された多様なセラミドはセラミダーゼで長鎖塩基に分解され、*Sphk1/2*、*Sgpp1*、*Sgpl1*、*Aldh3a2/3b2*、*Acsl*、*Tecr* が関わる分解経路を経てパルミトイル CoA に変換され、グリセロ脂質に代謝される (34)。

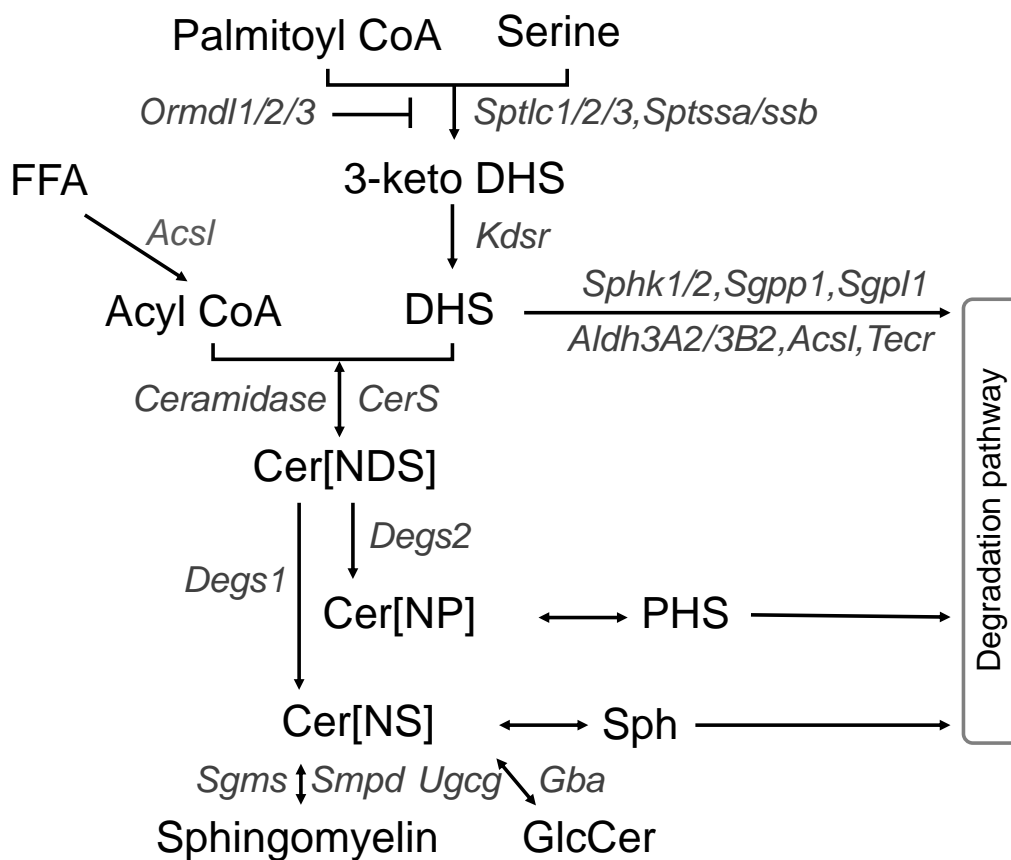


図 2. セラミド生合成経路

黒字は脂質種、灰色は遺伝子を示している。

#### 1-4 アトピー性皮膚炎モデルマウス Spade

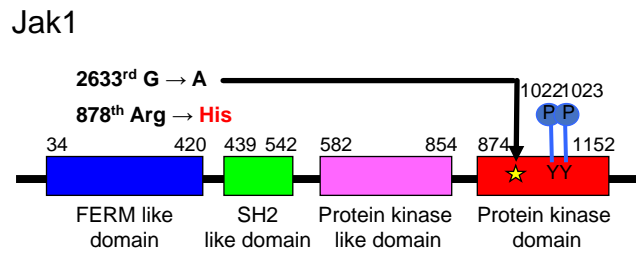
本研究では、アトピー性皮膚炎モデルとして Spade マウスを使用した。Spade マウスは E-ethyl N-nitrosourea (ENU) により、全身に非受容体型チロシンキナーゼである Jak1 の点変異 (R878H) が生じている (35)。キナーゼドメイン内の ATP 結合モチーフ近傍の点変異が JAK1 の恒常的な活性化を引き起こすことで、Spade マウスでは耳などの皮膚組織にアトピー性皮膚炎が自然発症する (図 3A, B)。既報において、Spade マウスの骨髄移植実験が行われており、非骨髄由来細胞の Jak1 変異が疾患発症に必須であることが示されている。また、Jak1 活性化により生じる Stat タンパク質のリン酸化が、Spade マウスの表皮組織上部で生じていることが免疫染色により明らかとなっている。これらの結果から、ケラチノサイトにおける Jak1 の重要性が示唆されているものの、病態発症の詳細な原因やメカニズムは未だ明らかとなっていない。Spade マウスの週齢ごとの解析では、8 週齢において掻痒行動や紅斑等のアトピー性皮膚炎病態を発症すること、10 週齢において血清中の IgE やヒスタミン濃度が上昇することが示されている (図 3 C)。

A



参考文献 (35) より引用

B



C

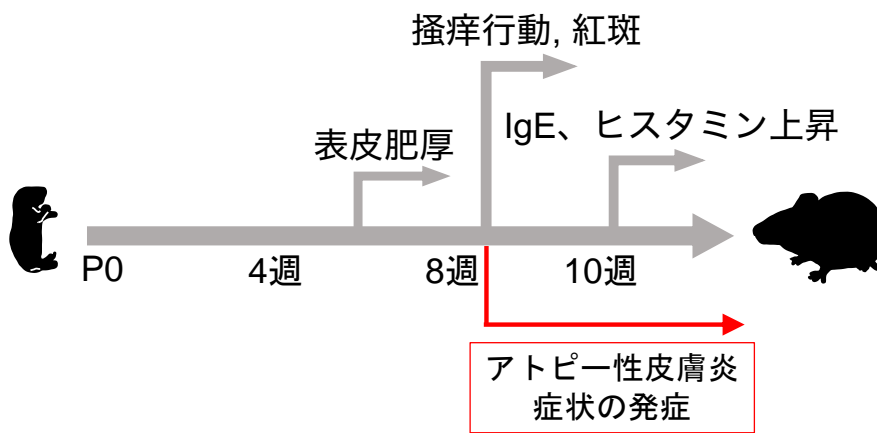


図 3. Spade マウス

(A) 20 週齢の野生型 (左) および Spade マウス (右) の写真を示した。(B) Jak1 のドメインおよび変異箇所を示した。(C) Spade マウスの週齢ごとの表現型を示した。



## 2 研究目的

皮膚は外界と身体内部を隔てる最大の臓器であり、多様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生理的意義の解明を目指した。

## 3 方法

### 3-1 マウスの飼育

アトピー性皮膚炎モデルマウスとして、C57BL/6 系統の Spade マウスを使用した。Spade マウスは理化学研究所 生命医科学研究センター 免疫器官形成研究グループより譲受した。マウスの飼育は、Specific pathogen-free を満たす飼育室にて行い、12 時間ごとの明暗サイクルで、自由に摂餌および飲水できる状態で飼育した。Spade マウスは C57BL/6J と戻し交配を繰り返して系統維持した。本研究における動物実験は、慶應義塾大学動物実験規定に則って行った [承認番号 : A2022-079]。

### 3-2 マウステールからのゲノム抽出とジェノタイピング

マウステールに 150  $\mu$ L の 50 mM NaOH を加えて、95°C で 50 分インキュベートして溶解させた。1 M Tris/HCl (pH 8.0) を 15  $\mu$ L 加えて遠心 (1500 g、20°C、3 分) を行い、上清 20  $\mu$ L を回収し、20  $\mu$ L の TE<sub>0.1</sub> (10 mM Tris/HCl (pH 8.0) 、0.1 mM EDTA) で希釈し、ゲノム溶液とした。

マウステールから得られたゲノム溶液をテンプレートとし、プライマー Spade-F2、Spade-F3、Spade-R2、Spade-CF、Spade-CR および r-Taq (TOYOBO、Osaka、Japan) を用いて、下記に示す 2 パターンのプライマーの組み合わせで PCR 反応を行った。プライマー配列は表 1 に示した。

Template	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ rTaq Buffer	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
2 mM dNTPs	0.8 $\mu$ L	0.8 $\mu$ L
5 $\mu$ M primer-F2	0.5 $\mu$ L	-

5 $\mu$ M primer-F3	-	0.5 $\mu$ L
5 $\mu$ M primer-R2	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
5 $\mu$ M primer-CF	0.25 $\mu$ L	0.25 $\mu$ L
5 $\mu$ M primer-CR	0.25 $\mu$ L	0.25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	6.15 $\mu$ L	6.15 $\mu$ L
rTaq	0.05 $\mu$ L	0.05 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

95°C 5分

1. 94°C 30秒

2. 61°C 1分

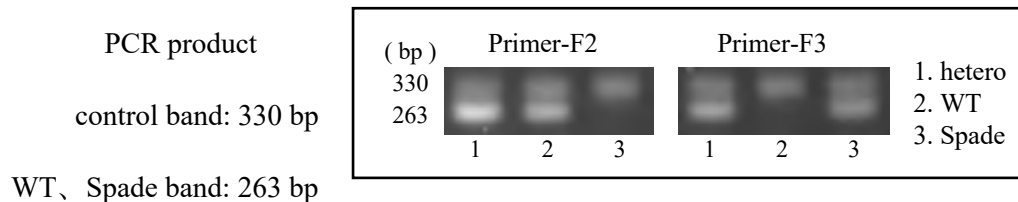
3. 72°C 1分

1-3  $\times$  30 cycle

72°C 5分

4°C  $\infty$

PCR産物を midori green advance DNA stain を含有する 1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、紫外線により増幅断片 (control band: 330 bp、WT、Spade band: 263 bp) を発光させて検出した。Spade-CF、Spade-CR により増幅された control 断片は PCR のポジティブコントロールとした。



### 3-3 経皮水分蒸散量 (TEWL) の測定

蒸発計 AS-VT100RS (Asahi Biomed、Tokyo、Japan) を、麻酔をかけたマウスの耳の内側に密着させ、経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定した。測定は、機械が安定化するまで待機した後、片方の耳に対して 3 回ずつ行い、出た値の平均値を用いた。

### 3-4 耳組織からの表皮、真皮の単離

マウスを頸椎脱臼した後、耳を採取しピンセットで表裏の二つに割いた。ホスファターゼ阻害剤 (Phosstop; Merck、Darmstadt、Germany) およびプロテアーゼ阻害剤 (cOmplete protease inhibitor; Merck) を加えた下記の溶液に入れ、37°C で 1 時間 20 分振盪した。その後、ピンセットを用いて真皮と表皮を丁寧に分離した。これを RNA 調製用もしくは脂質解析用のサンプルとし、液体窒素で凍結したのち、-80°C で保存した。

RPMI (Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA)	3.6 mL
FBS (biowest、USA)	400 µL
Dispase (Thermo Fisher Scientific)	4 mg
<hr/>	
Total	4 mL

### 3-5 RNA 精製、cDNA 調製、定量的 RT-PCR

凍結したサンプルとメタルコーン (細、3 mL、YASUI KIKAI、Osaka、Japan) を破砕チューブに入れ、液体窒素で冷却後、マルチビーズショッカー®MB1200 (YASUI KIKAI) を用いて組織を破砕した (2500 rpm、15 秒、2 回)。破砕した組織から、RNeasy® Mini Kit (QIAGEN、Tokyo、Japan) を用いて総 RNA を抽出した。次に 500

ng の RNA を用いて、下記条件にて逆転写反応を行った。生成した cDNA 溶液に 70  $\mu\text{L}$  の Milli-Q を加え、5 ng/ $\mu\text{L}$  の cDNA サンプルとした。

500 ng RNA	24 $\mu\text{L}$
DEPC-Treated Water (Thermo Fisher Scientific)	
5 $\times$ Prime script RT master mix (TaKaRa, Shiga, Japan)	6 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Total	30 $\mu\text{L}$

37°C 15 分

85°C 5 秒

RT-PCR は、各遺伝子に特異的なプライマー（表 1）を用いて下記の条件で定量的 RT-PCR を行った。

5 ng/ $\mu\text{L}$ cDNA	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ each Primer Mix	0.4 $\mu\text{L}$
Milli-Q	3.6 $\mu\text{L}$
TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa)	5.0 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Total	10 $\mu\text{L}$

95°C 30 秒

1. 95°C 5 秒

2. 60°C 30 秒

1-2  $\times$  40 cycle

95°C 10 秒

Melt curve

12°C ∞

表 1. プライマーリスト

primer	5'→3'
Genotyping	
Spade-F2	CGGTTCTGAAGAGGATTCG
Spade-F3	CGGTTCTGAAGAGGATTCA
Spade-R2	ATCTATGCTTGGCCCTCCTC
Spade-CF	AAGGAAGGGTGACCTGTGTG
Spade-CR	ACCGCAGCACAGTAAATAAGTAA
qPCR	
h/mGAPDH_F_q	GAACGGGAAGCTCACTGGGATGGCC
h/mGAPDH_R_q	TGTCATAACCAGGAAATGAGCTTGAC
mSptlc1_qPCR_F1	CCTGTCCTTTGGAGTCCTTGG
mSptlc1_qPCR_R1	GGGGAGGTAACGAAGCAGAAA
mSptlc2_qPCR_F1	GAGTATGGAGCAGGGGTGTG
mSptlc2_qPCR_R1	TGACGCATGGTTCAGCTCAT
mSptlc3_qPCR_F1	CGACGGCGACTGAAAGAGAT

mSptlc3_qPCR_R1	CCTTCTGGCAGGGAAGTAGC
mOrmdl1_qPCR_F1	TCCGGATCAGGGTAGAGCAA
mOrmdl1_qPCR_R1	ATGCAGCTGTGGCATTTTGG
mOrmdl2_qPCR_F1	GTAGGACTGCTGCATGTGGT
mOrmdl2_qPCR_R1	CCTTTCCTGGTCAGGGGTC
mOrmdl3_qPCR_F1	AGCATTCCTTTGTGAGCGT
mOrmdl3_qPCR_R1	CTGTGAACTGGACCCCGTAG
mKdsr_qPCR_F1	TTTGCAAACCAGAGCAGGTG
mKdsr_qPCR_R1	GCAATTGTTTCGAAAAGGCC
mSphk1_qPCR_F1	CTCACCGAACGGAAGAACCA
mSphk1_qPCR_R1	CCTGCTCGTACCCAGCATAG
mSphk2_qPCR_F1	TCTCTGGATGAGGTCTCGGG
mSphk2_qPCR_R1	GGTGATTTCTGGTCCCCTG
mSgpl1_qPCR_F1	AATTGTGGCTCCCGAGAGTG
mSgpl1_qPCR_R1	GTGGGGTAGAACAGACCAGC
mSgpp1_qPCR_F1	CTTGCCGCTCTACTACCTGT
mSgpp1_qPCR_R1	GGTACATGACCAGCACCCAG
mSgpp2_qPCR_F1	TGGACCCTCATCGATTCCCT

mSgpp2_qPCR_R1	TGGTCGGGCTGTAGTAGTCA
mAldh3a2_qPCR_F1	TTCTCGTAACAATAAGCTCATCAAACG
mAldh3a2_qPCR_R1	CAGCATCCCCAGCCTTCCTTTGTTG
mAldh3b2_qPCR_F1	TGAGTTCATCAACCGGCGGGAGAAGC
mAldh3b2_qPCR_R1	GTTGTTGGTTCCAGGGACCATAAGG
mElov11_qPCR_F1	CTATCGCTTGGGCCTCGAAT
mElov11_qPCR_R1	CTCGAACCATCCGAAGTGCT
mElov13_qPCR_F1	GCTTTGCCATCTACACGGATGACGC
mElov13_qPCR_R1	TCATTGGCTCTTGGATGCAACTTTGC
mElov14_qPCR_F1	ACGTGATCATGTACTCCTACTATGG
mElov14_qPCR_R1	CCGTTTCGATGAGATAACCATTTCGTGG
mElov15_qPCR_F1	AAGAACAACCACCAGATCACCGTGC
mElov15_qPCR_R1	TCAATCCTTTTCGCTGCTTCCTGGGC
mElov16_qPCR_F1	TTCATGACTATGAACTATGGCGTGC
mElov16_qPCR_R1	GATGTAGGCCTCAAAGAAGAAATGG
mElov17_qPCR_F1	CTGGCTTTATTACTTCTCCAAATTC
mElov17_qPCR_R1	GTATTTTAGTGGCGCTTGCTTTTGC
h/m-Cers3_qPCR_F1	CTGGCTTCCTCCAACAATAAAGTGG



h/m-Cers3_qPCR_R1	TCAAGTTACACTTCTTTGCCAGTCC
mDegs1_qPCR_F1	GCCGAACATTACATGTTCTTGAAGG
mDegs1_qPCR_R1	GTTCCCTTTCGGAGGCCTCCTCATC
mI11b_qPCR_F1	TGCCACCTTTTGACAGTGATG
mI11b_qPCR_R1	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
mTnfa_qPCR_F1	GATCGGTCCCAAAGGGATG
mTnfa_qPCR_R1	CACTTGGTGGTTTGCTACGAC
mI16_qPCR_F1	AGCCCACCAAGAACGATAGT
mI16_qPCR_R1	TTGTGAAGTAGGGAAGGCCG
mS100a8_qPCR_F1	CCCACTTTTATCACCATCGCAA
mS100a8_qPCR_R1	AAATCACCATGCCCTCTAGAAG
mS100a9_qPCR_F1	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT
mS100a9_qPCR_R1	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT

### 3-6 タンパク質ライセートの調製

4 週齢のマウスの耳を回収し、液体窒素で凍結した。凍結したサンプルとメタルコーン（細、3 mL、YASUI KIKAI）を破砕チューブに入れ、液体窒素で冷却後、マルチビーズショッカー®MB1200（YASUI KIKAI）を用いて組織を破砕した（2500 rpm、15 秒、2 回）。破砕したサンプルを 500  $\mu$ L の buffer A [50 mM HEPES/NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl、10 % glycerol、1 mM DTT、1 mM PMSF、1  $\times$  protease inhibitor

cocktail (Complete EDTA-free; Merck)、1 × phosstop (Merck) ] に懸濁し、QSONICA Q125 (WAKEN) を用いて超音波破碎 (10 秒、amp 30 %、2 回) を行った。遠心 (200 g、4°C、3 分) 後の上清をライセートとして用いた。ライセートは、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク濃度を求めた。

### 3-7 スフィンゴ脂質代謝酵素の *in vitro* 比活性測定

スフィンゴ脂質 *de novo* 合成経路 (Spt 酵素および Fvt-1 酵素) の活性測定において、200–300 µg のライセートを 4 mM <sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N-L-セリンおよび 20 µM C14:0-CoA もしくは C16:0-CoA と共に 37°C で 1 時間インキュベートした。アシル CoA は初めに加え、溶媒を乾固させてから使用した。反応液には補酵素として、1 mM NADPH (Merck) および 500 µM ピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) も加えた。

ライセート (200–300 µg) + bufferA	31.2 µL
50 mM NADPH	0.8 µL
5 mM PLP	4 µL
40 mM <sup>3</sup> C <sub>3</sub> , <sup>15</sup> N-L-serine	4 µL
1 mM C14:0-CoA or C16:0-CoA	0.8 µL
<hr/>	
Total	40 µL

セラミド合成酵素 (CerS5/6 酵素または CerS2/3 酵素) およびセラミド不飽和化反応 (Degs1 酵素) の活性測定において、200–300 µg のライセートを 5 µM *d*<sub>7</sub>-Sph d18:1 または *d*<sub>7</sub>-DHS d18:0 を 20 µM の C16:0-CoA もしくは C24:0-CoA と 37°C で 1 時間インキュベートした。長鎖塩基およびアシル CoA は初めに加え、溶媒を乾固させてから使用した。

ライセート (200–300 µg) + bufferA	40 µL
100 µM <i>d</i> <sub>7</sub> -Sph d18:1 or <i>d</i> <sub>7</sub> -DHS d18:0	2 µL
1 mM C16:0-CoA or C24:0-CoA	0.8 µL
<hr/>	
Total	40 µL

インキュベート後、50 µL のクロロホルムおよび 100 µL のメタノールを加えて、代謝反応を停止させた。ボルテックスを行った後、内部標準物質 (30 nM *d*<sub>3</sub>-Cer[NS] d18:1/18:0、*d*<sub>3</sub>-Cer[NDS] d18:0/18:0) の入ったクロロホルムを 50 µL 加え、60 µL の Milli-Q を加えて良く攪拌した。遠心 (10,000 rpm、20°C、1 分) 後、下層を全量回収し、乾固させた。その後、50 µL メタノールに再溶解させ、LC-MS<sup>TM</sup>-8060 (SHIMAZU、Kyoto、Japan) を用いて脂質解析を行った。

### 3-8 三連四重極型質量分析器を用いたスフィンゴ脂質の分析

セラミドおよびスフィンゴミエリンの分析は、超高速トリプル四重極型 LC-MS/MS システム LC-MS<sup>TM</sup>-8060 (SHIMAZU) による Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードで行い、既に Ohno らが報告している条件で測定した (11)。カラムは、ACQUITY UPLC HSS T3 (粒子径 1.8 µm、カラム長 50 mm、内径 2.1 mm) (Waters、Milford、USA) を使用し、流速 0.300 mL/min、55°C、25 分の条件で行った。移動層は、A 液; アセトニトリル : Milli-Q = (3:2、v/v) 、B 液; アセトニトリル : イソプロパノール = (1:9、v/v) にそれぞれ酢酸アンモニウム 10 mM を添加した 2 液混合型グラジエントを使用し、質量分析装置に 1 µL インジェクションした。グラジエント条件は以下の図に示した (図 4)。標準品 (Cer[NDS] d18:0/16:0、Cer[NDS] d18:0/24:0、Cer[NS] d18:1/16:0、Cer[NS] d18:1/24:0、SM d18:1/16:0、SM d18:1/24:0) を

用いた外部標準法にて検量線を作成し、化合物の定量を行った。内部標準を用いて抽出効率を補正した。同定、定量は LabSolutions Insight (SHIMAZU) を用いて行った。MRM 解析で使用した設定は以下の表に示した (表 2)。

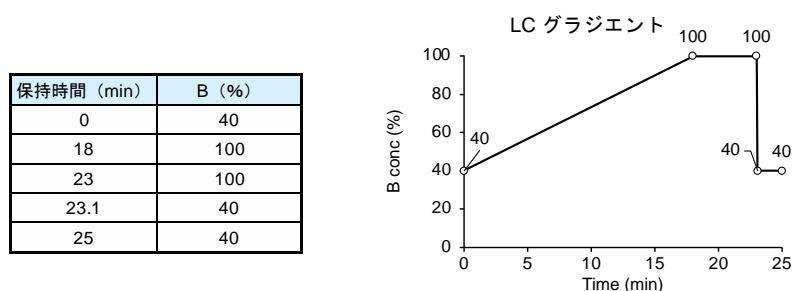


図 4. セラミドおよびスフィンゴミエリン測定におけるグラジエント条件

表 2. セラミドおよびスフィンゴミエリン測定における MRM 条件およびコリジョンエネルギー

	name	Q1	Q3	ion	Dwell time	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	NDS d16:0/14:0	487.47	238.25	+	89	-20	-20	-21
2	NS d16:1/14:0	482.46	236.24	+	51	-20	-20	-21
3	NDS d16:0/16:0	512.5	238.25	+	51	-20	-20	-21
4	NDS d17:0/14:0	498.49	252.27	+	51	-20	-35	-21
5	NS d17:1/14:0	496.47	250.25	+	47	-20	-29	-21
6	NS d18:1/14:0	510.49	264.27	+	43	-20	-20	-21
7	NDS d16:0/18:0	540.53	238.25	+	43	-20	-27	-21
8	NS d16:1/16:0	510.49	236.24	+	43	-20	-28	-21
9	NS d17:1/16:0	524.5	250.25	+	40	-20	-25	-21
10	NDS d18:0/14:0	512.5	266.28	+	43	-20	-20	-21
11	NDS d17:0/18:0	554.55	252.27	+	43	-20	-30	-21
12	NDS d17:0/16:0	526.52	252.27	+	43	-20	-32	-21

13	NS d18:1/16:0	538.5	264.25	+	40	-20	-24	-21
14	NDS d16:0/20:0	568.57	238.25	+	40	-20	-28	-21
15	NS d16:1/18:0	538.52	236.24	+	40	-20	-25	-21
16	NDS d18:0/16:0	540.55	266.3	+	40	-20	-32	-21
17	NDS d17:0/20:0	582.58	252.27	+	40	-20	-30	-21
18	NS d17:1/18:0	552.53	250.25	+	40	-20	-25	-21
19	NDS d17:0/22:0	610.61	252.27	+	40	-20	-29	-21
20	NDS d16:0/22:0	596.6	238.25	+	40	-20	-30	-21
21	<i>d</i> <sub>3</sub> -NS d18:1/18:0	569.55	264.25	+	40	-20	-23	-20
22	NS d18:1/18:0	566.55	264.25	+	40	-20	-23	-21
23	NS d16:1/20:0	566.55	236.24	+	40	-20	-24	-21
24	<i>d</i> <sub>3</sub> -NDS d18:0/18:0	571.6	266.3	+	40	-22	-29	-20
25	NDS d18:0/18:0	568.55	266.3	+	40	-20	-29	-21
26	NS d17:1/20:0	580.57	250.25	+	25	-20	-26	-21
27	NS d18:1/20:0	594.6	264.25	+	40	-20	-27	-21
28	NS d17:1/22:0	608.59	250.25	+	20	-20	-27	-21
29	NS d16:1/22:0	594.58	236.24	+	24	-20	-26	-21
30	NDS d18:0/20:0	596.6	266.3	+	33	-20	-35	-21
31	NS d18:1/22:0	622.6	264.25	+	20	-20	-28	-21
32	NDS d17:0/34:1	776.78	252.27	+	24	-26	-35	-21
33	NS d16:1/24:0	622.61	236.24	+	20	-26	-26	-21
34	NDS d16:0/24:0	624.62	238.25	+	20	-20	-34	-21
35	NDS d18:0/22:0	624.65	266.3	+	20	-20	-29	-21
36	NS d17:1/24:0	636.63	250.25	+	20	-26	-29	-21
37	NDS d17:0/28:0	694.7	252.27	+	20	-26	-33	-21

38	NS d18:1/24:0	650.65	264.25	+	20	-26	-33	-21
39	NS d16:1/26:0	650.64	236.24	+	20	-26	-31	-21
40	NDS d17:0/24:0	652.64	252.27	+	20	-26	-33	-21
41	NDS d18:0/24:0	652.65	266.3	+	20	-26	-36	-21
42	NDS d16:0/26:0	652.66	238.25	+	20	-26	-36	-21
43	NDS d16:0/30:0	708.72	238.25	+	20	-26	-38	-21
44	NS d17:1/26:0	664.66	250.25	+	20	-26	-32	-21
45	NDS d17:0/26:0	666.67	252.27	+	20	-26	-36	-21
46	NS d18:1/26:0	678.65	264.25	+	20	-26	-33	-21
47	NDS d17:0/30:0	722.74	252.27	+	20	-26	-44	-21
48	NS d16:1/28:0	678.67	236.24	+	20	-26	-29	-21
49	NDS d18:0/26:0	680.7	266.3	+	20	-26	-37	-21
50	NDS d16:0/28:0	680.69	238.25	+	20	-26	-34	-21
51	NS d17:1/28:0	692.69	250.25	+	20	-26	-29	-21
52	NS d18:1/28:0	706.7	264.25	+	20	-26	-30	-21
53	NS d16:1/32:1	732.72	236.24	+	20	-26	-34	-21
54	NS d16:1/30:0	706.7	236.24	+	20	-26	-35	-21
55	NDS d18:0/28:0	708.7	266.3	+	20	-26	-40	-21
56	NS d17:1/32:1	746.74	250.25	+	20	-26	-40	-21
57	NS d17:1/30:0	720.72	250.25	+	20	-26	-31	-21
58	NS d18:1/30:0	734.75	264.25	+	21	-26	-34	-21
59	NS d16:1/32:0	734.74	236.36	+	21	-26	-31	-21
60	NDS d18:0/30:0	736.75	266.3	+	21	-26	-40	-21
61	NDS d16:0/32:0	736.75	238.25	+	21	-26	-35	-21
62	NS d17:1/32:0	748.75	250.25	+	21	-26	-35	-21

63	NS d17:1/34:1	774.77	250.25	+	21	-26	-35	-21
64	NDS d16:0/32:1	734.73	238.25	+	21	-26	-32	-21
65	NDS d17:0/32:0	750.77	252.27	+	21	-26	-48	-21
66	NS d18:1/32:0	762.75	264.25	+	21	-26	-35	-21
67	NDS d18:0/32:0	764.8	266.3	+	23	-26	-41	-21
68	NS d17:1/34:0	776.78	250.25	+	23	-26	-39	-21
69	NDS d17:0/34:0	778.8	252.27	+	27	-26	-45	-21
70	NS d17:1/36:0	804.82	250.25	+	31	-26	-39	-21
71	SM d18:1/16:0	703.5	184.1	+	22	-26	-26	-21
72	SM d18:1/18:0	731.5	184.1	+	22	-26	-28	-21
73	SM d18:1/20:0	759.6	184.1	+	22	-26	-28	-21
74	SM d18:1/22:0	787.6	184.1	+	22	-26	-30	-21
75	SM d18:1/24:0	815.6	184.1	+	22	-26	-30	-21
76	SM d18:1/26:0	843.7	184.1	+	22	-26	-34	-21
77	SM d18:1/28:0	871.7	184.1	+	22	-26	-34	-21
78	SM d18:1/30:0	899.7	184.1	+	22	-26	-35	-21
79	SM d18:1/32:0	927.8	184.1	+	22	-26	-32	-21
80	SM d18:1/34:0	955.8	184.1	+	22	-26	-35	-21
81	SM d18:1/36:0	983.8	184.1	+	22	-26	-30	-21
82	SM d18:1/30:1	897.7	184.1	+	22	-26	-30	-21
83	SM d18:1/32:1	925.7	184.1	+	22	-26	-30	-21
84	SM d18:1/34:1	953.8	184.1	+	22	-26	-30	-21

長鎖塩基の分析は、超高速トリプル四重極型 LC-MS/MS システム LC-MS<sup>TM</sup>-8060 (SHIMAZU) による MRM モードで行った。カラムは、Kinetex 2.6 μm C8 100 Å (粒

子径 2.6  $\mu\text{m}$ 、カラム長 150 mm、内径 2.1 mm) (Waters、Milford、USA) を使用し、流速 0.400 mL/min、40°C、30 分の条件で行った。移動層は、A 液; Milli-Q + 0.2% ギ酸、B 液; アセトニトリルの 2 液混合型グラジエントを使用し、1  $\mu\text{L}$  インジェクションした。グラジエント条件は以下の図に示した (図 5)。標準品 (DHS d18:0、Sph d18:1) を用いた外部標準法にて検量線を作成し、化合物の定量を行った。内部標準を用いて抽出効率を補正した。同定、定量は LabSolutions Insight (SHIMAZU) を用いて行った。MRM 解析で使用した設定は以下の表に示した (表 3)。

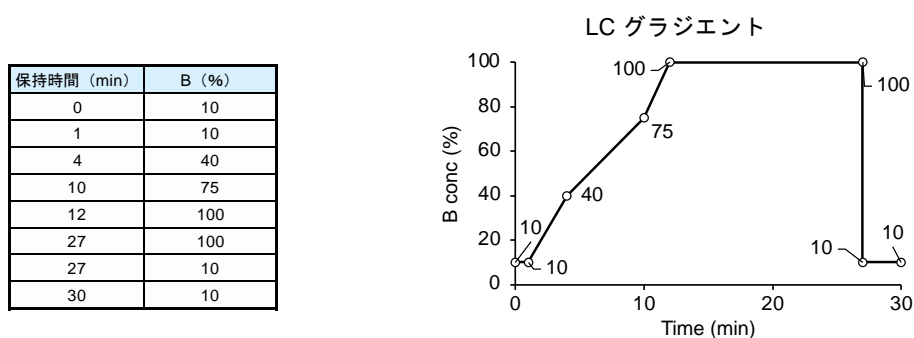


図 5. 長鎖塩基測定におけるグラジエント条件

表 2. 長鎖塩基測定における MRM 条件およびコリジョンエネルギー

	name	Q1	Q3	ion	Dwell time	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	DHS d16:0	274.27	256.25	+	22	-11	-14	-22
2	$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -DHS d16:0	277.27	259.25	+	22	-11	-14	-22
3	Sph d16:1	272.25	254.24	+	22	-11	-10	-19
4	$^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -Sph d16:1	275.25	257.24	+	22	-11	-10	-22
5	DHS d17:0	288.29	270.27	+	22	-11	-14	-22
6	$d_3$ -DHS d17:0	291.29	273.27	+	22	-11	-14	-22
7	Sph d17:1	286.27	268.26	+	22	-11	-10	-22



8	DHS d18:0	302.3	284.3	+	22	-11	-14	-22
9	<i>d</i> <sub>7</sub> -DHS d18:0	309.35	291.35	+	22	-12	-14	-16
10	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N-DHS d18:0	305.3	287.3	+	22	-11	-14	-22
11	Sph d18:1	300.3	282.25	+	22	-11	-10	-22
12	<i>d</i> <sub>7</sub> -Sph d18:1	307.35	289.35	+	22	-11	-10	-22
13	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N-Sph d18:1	307.35	289.35	+	22	-11	-10	-22
16	<i>d</i> <sub>3</sub> -NDS d18:0/18:0	571.6	266.3	+	12	-22	-30	-20
17	<i>d</i> <sub>3</sub> -NS d18:1/18:0	569.55	264.25	+	12	-20	-30	-20

### 3-9 飛行時間型質量分析器を用いた脂質分析

P0 のマウスからは体幹の皮膚、4、8、10 週齢のマウスからは耳を採取し、湿重量を測定後 -80°C のフリーザーに保存した。凍結したサンプルとメタルコーン（細、3 mL、YASUI KIKAI）を破砕チューブに入れ、液体窒素で冷却後、マルチビーズショッカー®MB1200（YASUI KIKAI）を用いて組織を破砕した（2500 rpm、15 秒、2 回）。次に、メタノール（QTofMS 用、Wako、Osaka、Japan）を 1 mL、内部標準（1 μM *d*<sub>9</sub>-Cer[EOS] d18:1/32:0/18:2）の入ったクロロホルムを 500 μL 加え、-30°C で一晩静置し、脂質を抽出した。その後、遠心（2000 g、4°C、10 分）し、上清 1 mL をジャケットチューブに回収した。Milli-Q を 66.7 μL 加えて室温で 15 分インキュベートし、遠心（2000 g、20°C、10 分）した。上清 200 μL を回収し、バイアル（Agilent、Tokyo、Japan）に挿入したインサート（Agilent、Tokyo、Japan）に移し、質量分析装置に 1 μL インジェクションした。

脂質のノンターゲット分析は、液体クロマトグラフィーと TripleTOF® 6600 システム（Waters/Sciex）による Information Dependent Acquisition（IDA）モードで行い、Tsubawa らが報告している条件で行った（36）。カラムは、ACQUITY BEH C18 カラム（粒子径 1.7 μm、カラム長 50 mm、内径 2.1 mm）（Waters）を使用し、流速 0.300

mL/min、45°C、20分の条件で行った。移動層は、A液；メタノール：アセトニトリル：Milli-Q = (1:1:3、v/v/v)、B液；イソプロパノールにそれぞれ酢酸アンモニウム5 mM、EDTA 10 nM を添加した2液混合型グラジエントを使用し、測定はネガティブイオンモードとポジティブイオンモードで行った。グラジエント条件は以下の図に示した（図6）。解析はMS-DIALによる自動同定と、目視によるMS/MSフラグメント解析で行った。

保持時間 (min)	B (%)
0	0
1	0
5	40
7.5	64
12	64
12.5	82.5
19	85
20	95
20.1	0
25	0

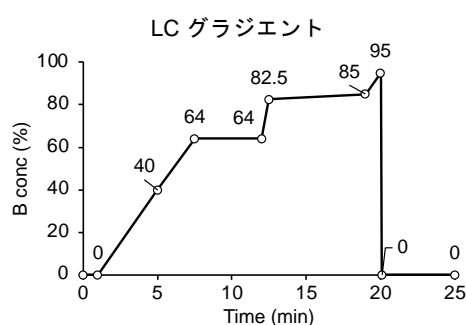


図6. 飛行時間型質量分析器の測定におけるグラジエント条件

### 3-10 ウェスタンブロッティング

マウスの耳を回収し、液体窒素で凍結した。凍結したサンプルとメタルコーン（細、3 mL、YASUI KIKAI）を破砕チューブに入れ、液体窒素で冷却後、マルチビーズショッカー®MB1200（YASUI KIKAI）を用いて組織を破砕した（2500 rpm、15秒、2回）。破砕したサンプルを1% SDS buffer [62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8)、1% sodium dodecyl sulfate、10% glycerol、5% 2-mercaptoethanol、0.02% bromophenol blue、cComplete protease inhibitor (Merck)、Phosstop (Merck)] に溶解した。QSONICA Q125 (WAKEN) を用いて超音波破砕（10秒、amp 30%、2回）を行った。遠心（10,000 g、20°C、3分）後の上清をライセートとして用いた。ライセートは、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク濃度を求めた。10–20 μg

のタンパク質を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に持ち込み、続いて PVDF 膜 (Merck) に転写した。イムノブロットの二次抗体には、HRP-conjugated anti-rabbit IgG F(ab')<sub>2</sub> fragment (ab6721、1:5000 希釈; Abcam、Cambridge、UK) を、一次抗体には、rabbit anti-Actin (A2066、1:3000; Merck Millipore) もしくは rabbit anti-delta 4-desaturase, sphingolipid 1 (Degs1、PA5-42741、1:1000 希釈; Thermo Fisher Scientific) を使用した。発色には、ECL western blotting substrate (Bio-Rad、Berkeley、CA、USA) を使用した。

### 3-11 脂質塗布実験

Cer[NDS] d18:0/24:0 (Merck) もしくは Cer[NDS] d18:0/16:0 (Merck) をアセトン: オリーブオイル = (4:1、v/v) に溶かし、0.05 µg/µL の懸濁液とした。マウスに三種混合麻酔を腹腔投与し、懸濁液を両耳の内側と外側に 10 µL ずつ、計 40 µL 塗布した。塗布は、マウスが 4 週齢になった時点から開始し、16 週齢になるまで 1 日おきに行った。コントロールとして、溶媒のみの塗布も行った。皮膚炎症の増悪度のスコア化は既報を参考にし (35, 37)、スコア 0 (症状無し)、スコア 1 (弱い症状; 紅斑・出血・擦過傷が認められる)、スコア 2 (中程度の症状; 大きい瘡蓋や擦過傷、部分的な耳の欠けが認められる)、スコア 3 (重傷; 過度な耳の肥厚・変形、大きな耳の欠けや欠損が認められる) とした。両耳のスコアの平均値を算出し、0.5 以上を皮膚炎発症と定義した。

### 3-12 形態観察および免疫染色

マウス耳組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンに包埋した。クリオスタットを用いて 5-10 µm の切片を作成し、スライドグラス (MATSUNAMI、Tokyo、Japan) に貼付した。スライドグラス上の切片を再水和さ

せ、ヘマトキシリン溶液 (Wako) で 5 分染色した後、40°C 程度のぬるま湯で 10 分間色出しを行った。その後、0.2% エオジン溶液 (Wako) で 5 分間染色を行った。余分なエオジンを 70% エタノールで洗浄した後、100% エタノールとキシレンに浸して脱水した。その後、スライドガラスを風乾させ、封入剤として CC/Mount™ (Merck) を使用し、カバーガラス (MATSUNAMI) を乗せた。乾燥後、顕微鏡 (BZ-X700; Keyence, Osaka, Japan) を用いて、形態観察を行った。

免疫染色を行う際には、5 μm の切片を作成してスライドガラスに貼付した。10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中でスライドガラスをオートクレーブ (120°C、5 分) にかけて、抗原賦活化を行った。1% BSA を加えた PBS を切片に滴下しブロッキング (20°C、1 時間) した後、1% BSA を加えた PBS に Ki67 (ab15580; Abcam)、Krt5 (905504; Biolegend)、Krt10 (ab76318; Abcam)、Lor (ab85679; Abcam) のいずれかを 100 倍希釈で加え、切片上に滴下した。1 時間のインキュベーション後、PBS-T を用いて洗浄し、1% BSA を加えた PBS に 2 次抗体 (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)、A-11006; Thermo Fisher Scientific) を 1/1000 倍希釈で加え、切片上に滴下した。1 時間のインキュベーション後、PBS-T を用いて洗浄し、Mounting Medium With DAPI (ab104139; Abcam) を用いて封入した。乾燥後、顕微鏡 (BZ-X700; Keyence, Osaka, Japan) を用いて、観察を行った。

脂質ラメラ構造の電子顕微鏡解析は、四酸化ルテニウムを用いた既報の方法を参考にした (12, 38)。マウス耳組織を、2% パラホルムアルデヒドおよび 2% グルタルアルデヒドが入ったカコジル酸緩衝液に浸して固定した。さらに、2% 酸化オスミウムを用いて固定 (4°C、2 時間) した後、2% 四酸化ルテニウムおよび 0.25% ヘキサシアノ鉄酸カリウム溶液に浸して再度固定 (4°C、2 時間) を行った。30–100% エタノールを用いて脱水した後、プロピレンオキシドに浸した (15 分、3 回)。その後、エポキシ樹脂 (EPON812; EM Japan, Tokyo, Japan) に包埋し、2008 ULTROTOME V

(LKB、Merck) を用いて超薄切片 (80–90 nm) を作成した。切片を 2% 酢酸ウラニルに 15 分浸した後、lead stain solution (Merck) に 2 分浸して染色した。電子顕微鏡は H-7600 (HITACHI、Tokyo、Japan) を用いた。画像は 100kV の加速電圧条件で撮影した。

### 3-13 統計解析

統計解析は Excel (Microsoft) を用いた。2 群の有意差検定には、unpaired two-tailed Student *t*-test もしくは Mann-Whitney *U*-test を用いた。3 群以上の有意差検定には、one-way ANOVA を行った後、Dunnett's test を行った。 $P < 0.05$  を統計的有意とした。

## 4 結果

### 4-1 Spade マウス皮膚組織においてバリア機能の異常が認められた

アトピー性皮膚炎モデルマウスである Spade マウスは Jak1 遺伝子に点変異が生じており、Jak1 が恒常的に活性化することで、Th2 型皮膚炎症を呈する (35)。およそ 8 週齢ほどから耳などの皮膚組織に皮膚炎を発症し、10 週齢以降に血清の IgE やヒスタミン濃度が上昇することが知られている。本研究ではまず、皮膚炎発症前後の組織学的異常を調べるため、疾患発症前の 4 週齢および発症直後の 8 週齢の Spade マウスの耳組織を用いて、HE 染色を行った。その結果、8 週齢の Spade マウスにおいて表皮の肥厚が認められた一方で、4 週齢の Spade マウスでは表皮肥厚および形態的異常は認められなかった (図 7 A)。次に、電子顕微鏡を用いてより詳細な皮膚組織の形態解析を行った。皮膚バリアに必須の構造である脂質ラメラ層の解析を行ったところ、4 週齢の野生型マウスの脂質ラメラは正常に形成されていた一方で、4 週齢 Spade マウスのラメラ中のみ、時折、層板顆粒が適切に放出されずに残存したような凝集体が観察された (図 7 B)。脂質ラメラ層の異常が確認されたため、次に皮膚バリア機能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) の測定を行った。その結果、8 週齢の Spade マウスにおいて野生型と比較し顕著な TEWL の上昇が認められた。さらに興味深いことに、8 週齢 Spade マウスほどの大きな変化ではないものの、4 週齢 Spade マウスにおいても野生型と比較し、有意に TEWL が上昇していることが明らかとなった (図 7 C)。以上の結果より、Spade マウスにおいて、紅斑や搔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。

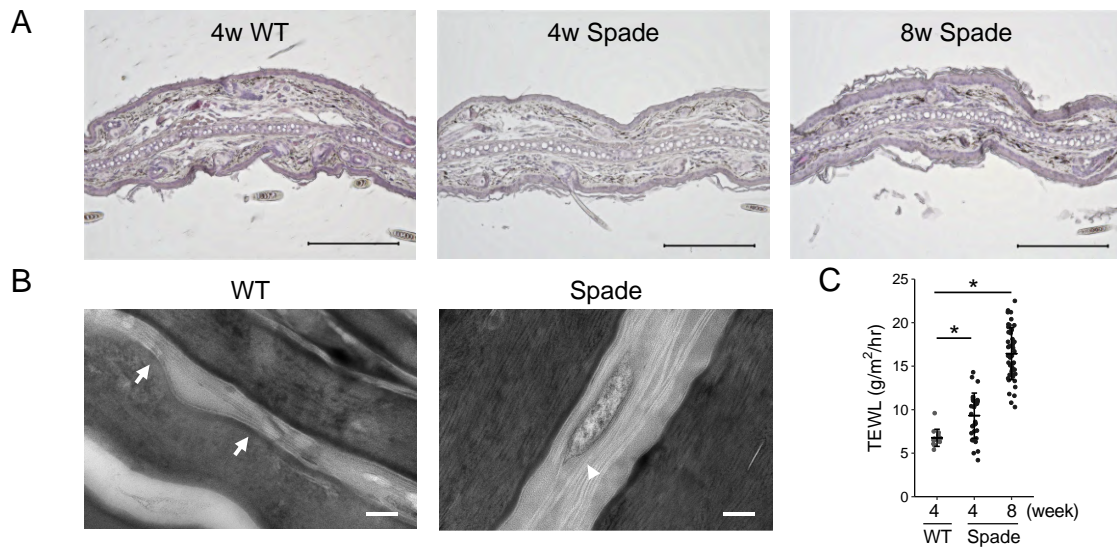


図 7. Spade マウスの表現型解析

(A) 野生型（4 週齢）および Spade マウス（4、8 週齢）の耳組織における HE 染色像を示した。Scale bars: 200  $\mu\text{m}$ 。(B) 4 週齢の野生型および Spade マウスにおける電子顕微鏡画像を示した。野生型マウスにおいて、通常の脂質ラメラ層（矢印）が観察された一方で、Spade マウスにおいて時折、層板顆粒が適切に放出されずに残存したような凝集体（矢頭）が脂質ラメラ中に観察された。Scale bars: 100 nm。(C) 野生型（4 週齢）および Spade マウス（4、8 週齢）の耳組織における経皮水分蒸散量（TEWL）を測定した。n=14–48。Dunnett's test、 $*P < 0.05$ 。mean  $\pm$  standard error (SE).

## 4-2 皮膚炎発症後の Spade マウスにおいて、アトピー性皮膚炎患者と似た脂質代謝異常が確認された

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 (postnatal 0 day; P0)、4、8、10 週齢のマウス皮膚組織を用いて、ノンターゲットリピドミクスを行った。ネガティブイオンモード、ポジティブイオンモード合わせて 5000 種類を超えるイオンが検出され、そのうち計 745 種類のイオンのアノテーションに成功した (図 8 A)。これらアノテーションした脂質の結果を用いて principal component analysis (PCA) 解析を行ったところ、皮膚疾患発症後の 8 週齢や 10 週齢の Spade マウスは、野生型マウスや発症前の Spade マウスの脂質プロファイルと大きく異なることが示された (図 8 B)。アトピー性皮膚炎患者の病変部位では、極長鎖脂肪酸が含有した Cer[NS] (44:1;O2-50:1;O2) やスフィンゴミエリン (SM; 44:1;O2-46:1;O2)、リゾホスファチジルコリン (LPC; 24:0-30:0) が減少し、長鎖脂肪酸含有の Cer[NS] (32:1;O2-40:1;O2)、SM (32:1;O2)、LPC (14:0-22:0) が上昇することが示されている (25)。そこで、アノテーションされた脂質分子の詳細な解析を行い、疾患発症後の Spade マウスがアトピー性皮膚炎患者と同様の脂質代謝変化を示すかを確認した。その結果、10 週齢の Spade マウスにおいて、極長鎖 Cer[NS] (42:1;O2-50:1;O2)、LPC (24:0-26:0) の減少および長鎖 Cer[NS] (32:1;O2-40:1;O2)、LPC (16:0、18:0) の増加が認められ、患者の脂質代謝変化との一致が認められた (図 8 C, D)。一方で、SM は極長鎖型 (44:1;O2) が増加、長鎖型 (32:1;O2, 36:1;O2, and 38:1;O2) が減少を示し、患者の結果とは一致しなかった (図 8 E)。異なる臨床研究では、アトピー性皮膚炎患者の病変部位において、遊離の不飽和脂肪酸の総量が上昇し、炭素鎖長 22 から 28 の飽和脂肪酸の合計量が減少することが報告されている (27)。この変化は、10 週齢の Spade マウスにおいても認められ、疾患発症後の Spade マウスは患者と似た脂肪酸バランスの変化が生じていることが明らか



となった（図 8 F, G）。Berdyshev らは、アトピー性皮膚炎患者の病変部位において、脂質のみならず脂肪酸伸長酵素である *ELOVL1-7* の遺伝子発現も調べている (25)。彼らは *ELOVL3/6* の有意な減少を見出し、その二つの遺伝子が極長鎖脂肪酸の減少に寄与することを明らかにしている。そこで、10 週齢 Spade マウスにおいて同様の遺伝子発現の変化が生じているかを検証するため、耳組織における ELOVL 遺伝子の発現量を qPCR により測定した。その結果、*Elovl6* の有意な減少および、*Elovl3/4/5* の減少傾向が生じていることを見出した（図 8 H）。以上の結果より、疾患発症後の Spade マウスは、アトピー性皮膚炎患者の病変部位と似た脂質プロファイル変化を示すことが明らかとなった。

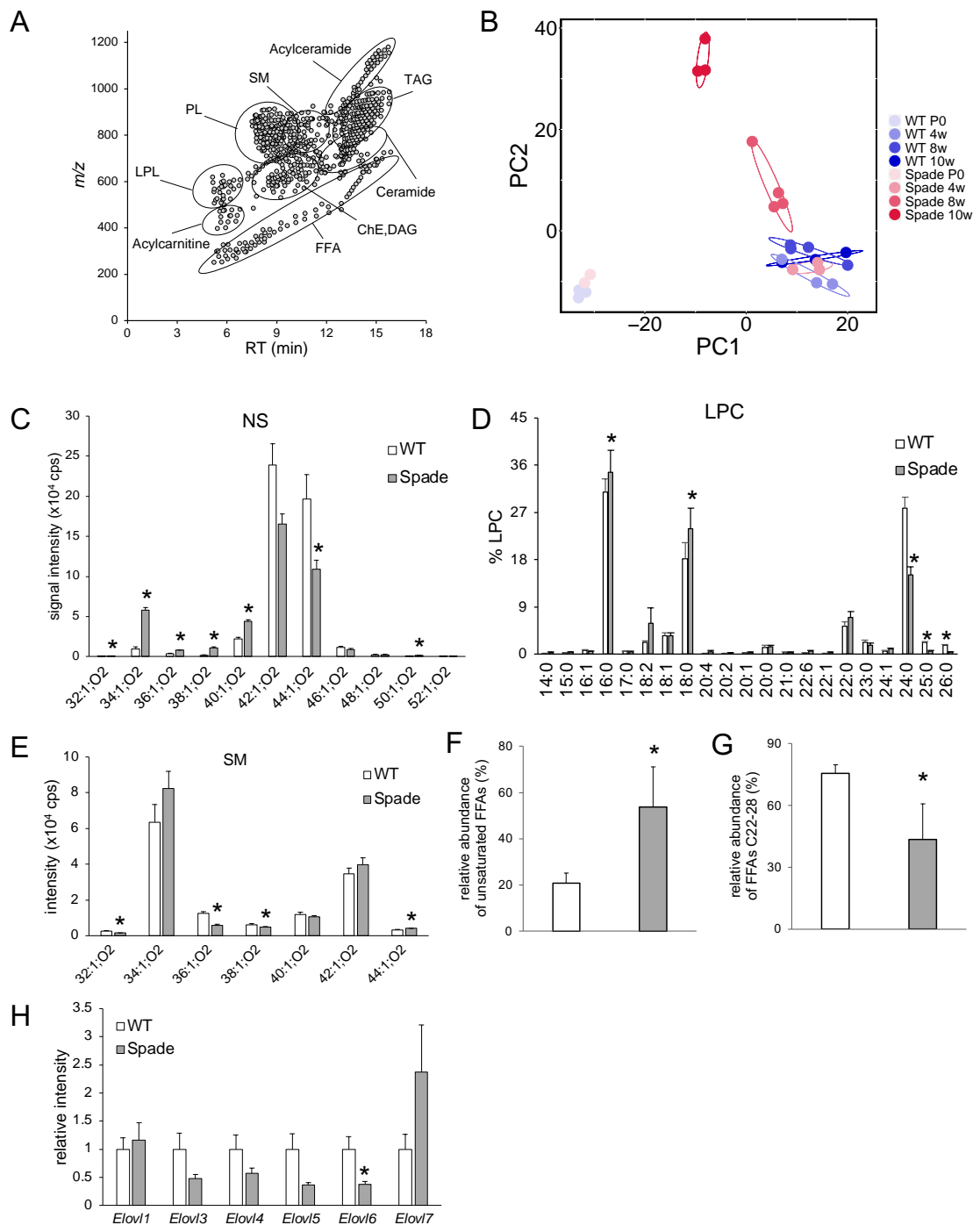


図 8. 10 週齢 Spade マウスにおける脂質代謝変動の解析

(A) ネガティブイオンおよびポジティブイオンモードの脂質測定においてアノテーションされた全ての脂質を、retention time (RT) および  $m/z$  を元を示した。cholesteryl

ester (ChE) 、 diacylglycerol (DAG) 、 free fatty acid (FFA) 、 lysophospholipid (LPL) 、 phospholipid (PL) 、 Sphingomyelin (SM) 、 triacylglycerol (TAG) 。 (B) アノテーションされた全ての脂質のシグナル強度値を用いて PCA 解析を行った。 (C) 10 週齢の野生型および Spade マウスにおける飽和脂肪酸含有の Cer[NS]のシグナル強度値を示した。 (D) 10 週齢の野生型および Spade マウスにおける LPC の値を示した。 アノテーションされた全ての LPC のシグナル強度の合計値に対する、それぞれの分子の存在割合を示した。 (E) 10 週齢の野生型および Spade マウスにおける SM のシグナル強度値を示した。 (F) 10 週齢の野生型および Spade マウスにおいて、アノテーションされた全ての遊離脂肪酸の合計量に対する不飽和脂肪酸の割合を示した。 (G) 10 週齢の野生型および Spade マウスにおいて、アノテーションされた全ての遊離脂肪酸の合計量に対する炭素鎖長 22 から 28 の飽和脂肪酸の合計量の割合を示した。 (H) 10 週齢の野生型および Spade マウス耳組織における *Elovl* 遺伝子の発現量を qPCR により測定した。それぞれの遺伝子発現量は *Gapdh* の発現量で補正し、野生型の発現量の平均値を 1 とした時の Spade マウスにおける相対値を示した。 n = 3。 mean + SE。 student's *t*-test、 \**P*<0.05。

#### 4-3 皮膚炎発症前の 4 週齢 Spade マウスにおいて、Cer[NDS]が顕著に減少することを発見した

疾患発症後の 10 週齢の Spade マウスにおいて、多くの脂質代謝変化が認められた一方で、発症前の 4 週齢においても一部のセラミド (Cer) 分子群に脂質代謝変動が生じていることが確認された (図 9 A)。そこで次に、4 週齢の Spade マウスにおける脂質代謝変化を詳細に解析した。ボルケーノプロットにて分子種ごとの変化を確認した結果、野生型と比較し 4 週齢の Spade マウスにおいて、Cer[NDS]の多くが、顕著かつ大きく減少していることが明らかとなった (図 9 B)。セラミドは前駆体である脂肪酸と長鎖塩基の炭素鎖長や不飽和度、水酸基の数や位置に多様性を有しており、その組み合わせにより多様な分子種に分類される (2-4) (図 1 C)。Ishikawa らは、アトピー性皮膚炎患者の病変部位において、Cer[NDS]をはじめ、Cer[NP]、Cer[NH]、アシルセラミドである Cer[EOS]、Cer[EOP]、Cer[EOH]の減少および Cer[AS]の増加を確認している (24)。発症後の 10 週齢 Spade マウスでは、これらの分子種のうち、Cer[EOS]の減少や Cer[AS]の増加を認めたものの、発症前の段階では Cer[NDS]のみが顕著に減少していた (図 9 C, D)。以上の結果より疾患発症前の Spade マウス耳組織において、多様なセラミドの代謝変化に先立ち、Cer[NDS]が顕著に減少することが明らかとなった。

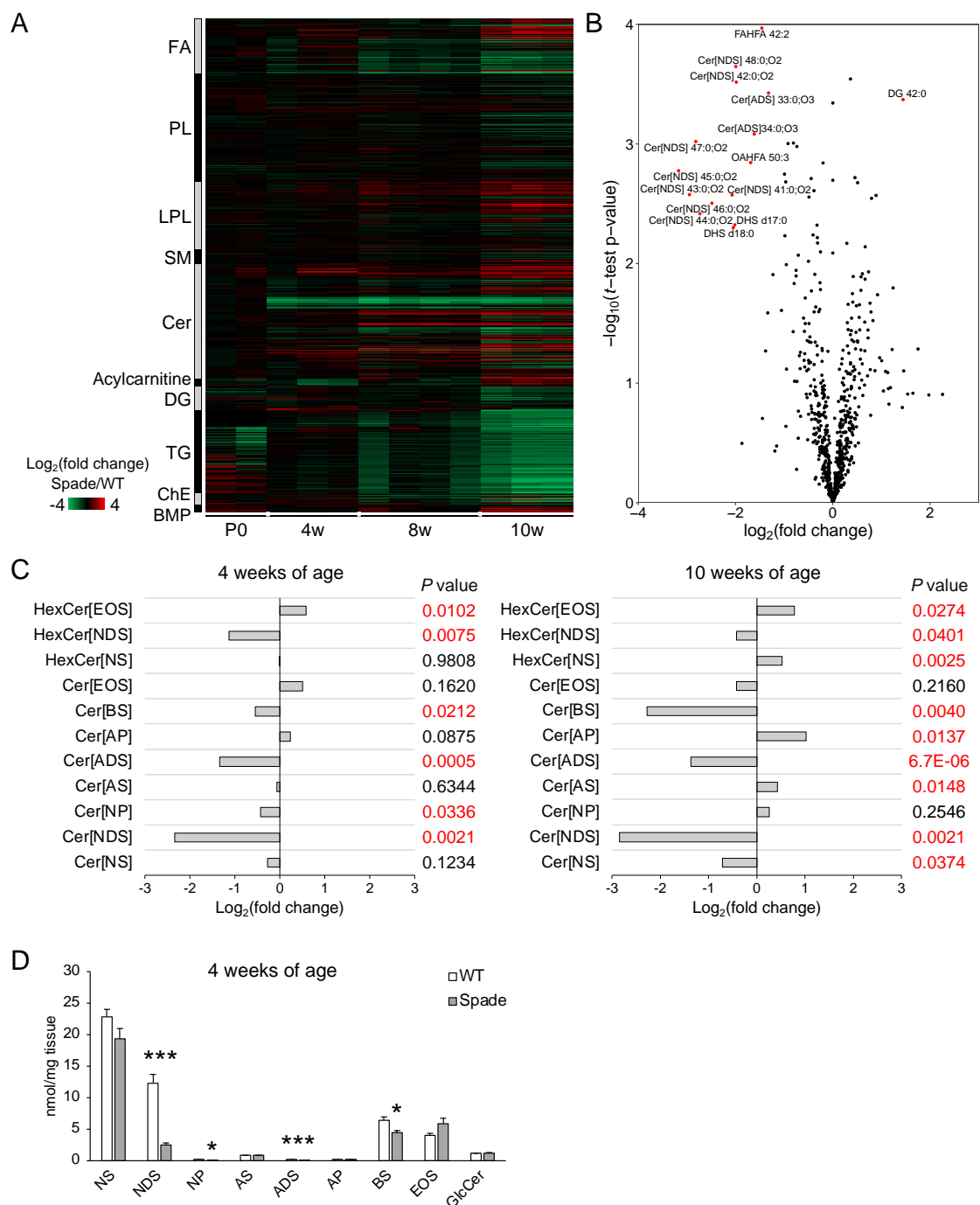


図 9. 4 週齢 Spade マウスにおける脂質代謝変動の解析

(A) アノテーションされた全ての脂質の変動をヒートマップに示した。耳重量でシグナル強度値を補正し、週齢が一致する野生型の平均値に対する Spade マウスの脂質の変動を分子ごとに色で示している。P0 (n = 2) ; 4、10 週齢 (n = 3) ; 8 週齢 (n =

4)。(B) 4 週齢の野生型マウスに対する 4 週齢 Spade マウスの脂質変動をボルケーノプロットで示した。 $P = 0.01$  以下の脂質を表記した。(C) 週齢が同じ野生型マウスに対する Spade マウスの分子種ごとのセラミド合計量の変動を示した。(D) アノテーションされたセラミド分子の分子種ごとの合計量を絶対値で示した。内部標準物質 ( $d_9$ -Cer[EOS] d18:1/32:0/18:2) で補正し、絶対量を算出した。mean + SE。student's  $t$ -test、\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 。

#### 4-4 4 週齢 Spade マウス表皮組織において、極長鎖 Cer[NDS]の減少が認められた

セラミドは、皮膚のバリア機能に必須の生体分子であり、セラミド代謝の異常により皮膚炎症に至ることが知られている (20, 39)。そこで次に、皮膚炎発症前の Spade マウスにおけるセラミド代謝異常に着目した。まず、皮膚組織における Cer[NDS]の代謝異常が表皮、真皮組織のどちらで生じているかを確かめるため、皮膚組織を表皮、真皮に分離して MRM モードのターゲットリピドミクスを行った。炭素鎖長 16 から 18 の長鎖塩基および炭素鎖長 14 から 32 の脂肪酸を含有した Cer[NS]、Cer[NDS]を測定した。4 週齢の野生型マウスの表皮と真皮のセラミド存在量を比較したところ、d16:1 もしくは d18:1 の長鎖塩基と炭素数 24 以上の極長鎖脂肪酸を含有した Cer[NS]は表皮に豊富であった (図 10 A)。また、d17:1 の長鎖塩基含有の Cer[NS]および検出された全ての Cer[NDS]は表皮に豊富であった。この結果より、多くのセラミドが表皮組織に局在することが示された。次に、皮膚組織において最も豊富なセラミドである d18:1 含有の Cer[NS]および d18:0 含有の Cer[NDS]の Spade マウス表皮組織における代謝変動を確認したところ、いずれの Cer[NS]においても減少は認められない一方で、炭素鎖長 22 以上の極長鎖脂肪酸を含有した Cer[NDS]が顕著に減少していることが明らかとなった (図 10 B, C)。アトピー性皮膚炎患者の病変部位において Cer[NDS]/Cer[NS]比は減少し、病態の重症度を示す指標 (scoring AD, SCORAD) と強い相関を示すことが報告されている (40)。そこで Spade マウスにおける Cer[NDS]/Cer[NS]比を確認したところ、野生型マウスと比較し、炭素鎖長 22 以上の Cer[NDS]/Cer[NS]比の減少が認められた (図 10 D)。次に、同様の脂質抽出サンプルを用いて、セラミド前駆体のスフィンゴシン (Sph)、ジヒドロスフィンゴシン (DHS) を測定したところ、いずれも真皮では変化は認められず、表皮において減少することが認められた (図 10 E, F)。また、d18:0 含有の Cer[NDS]、d18:1 含有の

Cer[NS]およびスフィンゴミエリン (SM) の合計量を測定したところ、スフィンゴミエリンの総量が有意に増加していたものの、減少を示したものは Cer[NDS]のみであった (図 10 G, H, I)。以上の結果から、疾患発症前の Spade マウスの表皮組織において、極長鎖脂肪酸を含有した Cer[NDS]が特徴的に減少していることが明らかとなり、スフィンゴ脂質代謝の異常が、Spade マウスにおける病態制御に寄与する可能性が考えられた。



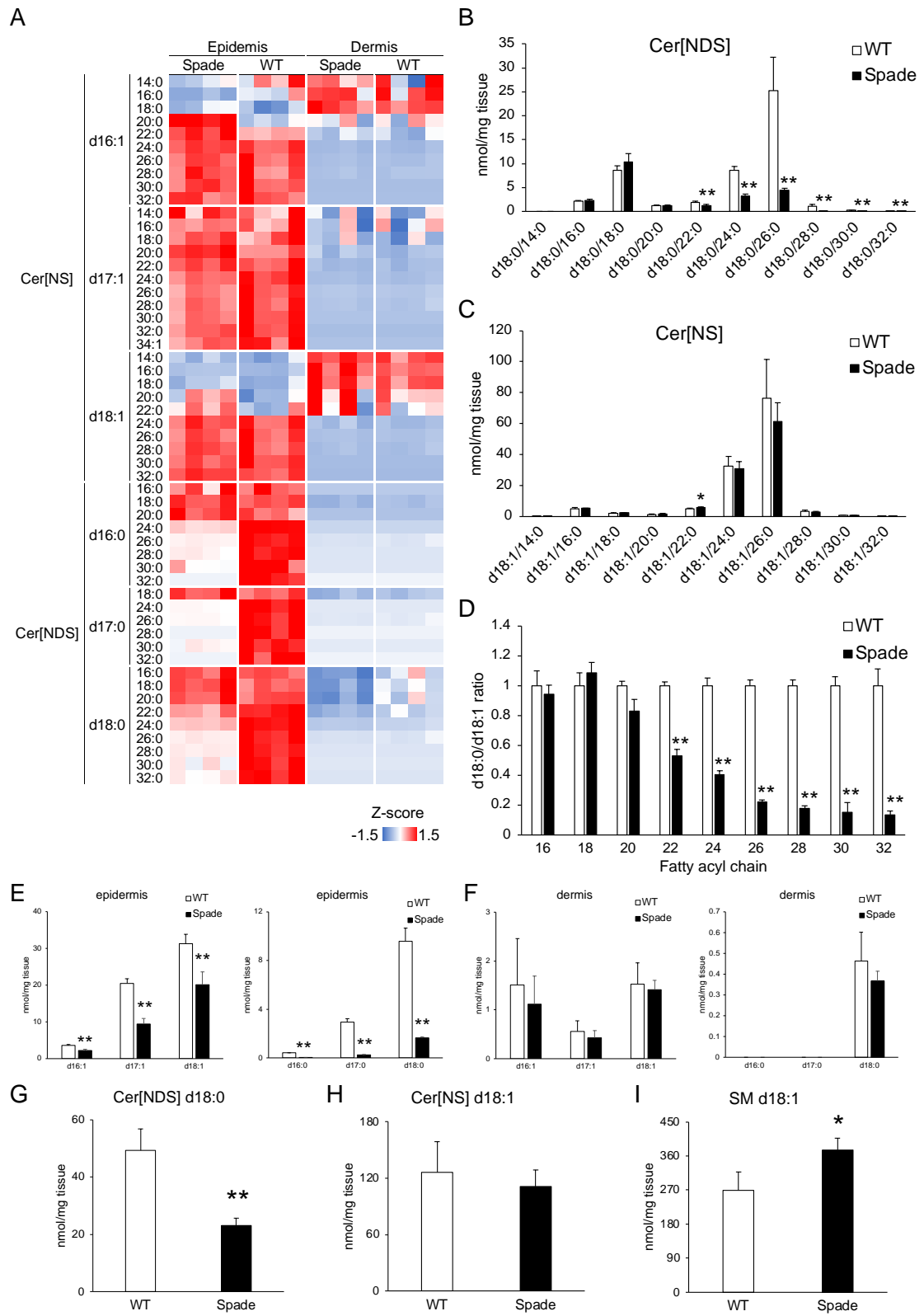


図 10. 4 週齢マウスの表皮および真皮組織におけるスフィンゴ脂質ターゲット解析

(A) 4 週齢マウスの表皮および真皮組織において、検出されたセラミドの絶対量を分子種ごとに Z-score で補正し、存在量の差を色で示した。(B) 4 週齢マウスの表皮組織における d18:0 含有の Cer[NDS]の存在量を示した。(C) 4 週齢マウスの表皮組織における d18:1 含有の Cer[NS]の存在量を示した。(D) 4 週齢マウスの表皮組織における Cer[NS]に対する Cer[NDS]の比を脂肪酸鎖長ごとに示した。(E) 4 週齢マウスの表皮組織において検出された長鎖塩基の存在量を示した。(F) 4 週齢マウスの真皮組織において検出された長鎖塩基の存在量を示した。(G) 4 週齢マウスの表皮組織において検出された d18:0 含有の Cer[NDS]の合計量を示した。(H) 4 週齢マウスの表皮組織において検出された d18:1 含有の Cer[NS]の合計量を示した。(I) 4 週齢マウスの表皮組織において検出された d18:1 含有の SM の合計量を示した。n = 4。mean + SE。student's *t*-test、\**P* < 0.05、\*\**P* < 0.01。

#### 4-5 4 週齢 Spade マウスの皮膚組織において、セラミド不飽和化反応の亢進が認められた

次に Cer[NDS]が減少するメカニズムの解明に着手した。Cer[NDS]の減少の原因として、スフィンゴ脂質 *de novo* 合成経路 (Spt, Kdsr) の活性低下、セラミド合成酵素 (CerS) の活性低下、セラミド不飽和化反応 (Dggs) の活性亢進のいずれかが考えられたため、それぞれの経路に関わる代謝酵素の比活性測定を行った (図 2 参照)。まず、C16:0-CoA と安定同位体で標識した  $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{15}\text{N}$ -セリンを 4 週齢マウス皮膚組織のタンパク質抽出液中でインキュベートし、*de novo* 合成経路の活性測定を行ったところ、Spade マウスのタンパク質抽出液における  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -DHS d18:0 の生成量は野生型と比較し、変化を示さなかった (図 11 A)。この結果から、4 週齢 Spade マウスの皮膚組織において、*de novo* 合成経路の活性は低下していないことが示された。次に、セラミド合成酵素の活性を測定するため、C24:0-CoA と安定同位体で標識された  $d_7$ -Sph d18:1 をタンパク質抽出液中でインキュベートした。生成された Cer[NS]  $d_7$ -d18:1/24:0 の量を確認したところ、野生型と Spade マウスの生成量に変化は認められなかった (図 11 B)。同様に、 $d_7$ -DHS d18:0 と C24:0-CoA を用いて、 $d_7$ -Cer[NDS] d18:0/24:0 の生成量を検証したが、変化は認められなかった (図 11 C)。これらの結果から、4 週齢 Spade マウスの皮膚組織において、セラミド合成酵素の活性低下は生じていないことが示された。一方で興味深いことに、生成された  $d_7$ -Cer[NDS] d18:0/24:0 からセラミド不飽和化反応により代謝される  $d_7$ -Cer[NS] d18:1/24:0 を測定したところ、Spade マウスにおいて有意に増加することが明らかとなった (図 11 C)。また、セラミド不飽和化反応の指標として、生成された Cer[NDS]/Cer[NS]比を確認したところ、野生型と比較し Spade マウスにおいて 2 倍程度まで減少することが明らかとなった (図 11 D)。C24:0-CoA の代わりに C16:0-CoA を用いても、野生型と同程度のセラミド合成活性、および不飽和化反応の活性亢進が確認された (図 11 E-G)。以上の結果より、疾患発

症前の4週齢の Spade マウスにおいて、セラミド不飽和化反応が亢進していることが明らかとなった。

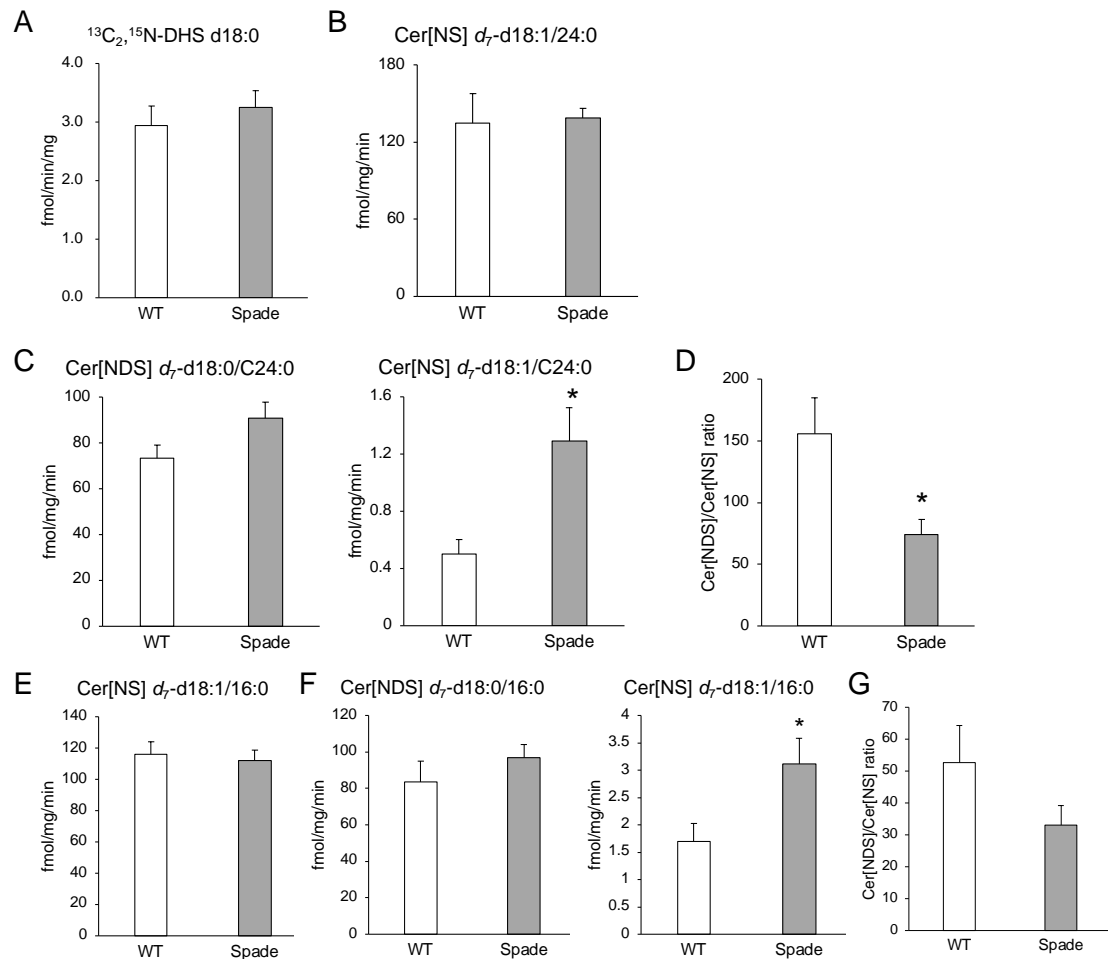


図 11. スフィンゴ脂質代謝経路のタンパク質活性測定

(A) 4週齢マウスの耳組織におけるタンパク質抽出液中で  $^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$ -セリンと C16:0-CoA をインキュベートした際に生成された  $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -DHS d18:0 の量を示した。補酵素として 1mM NADPH と 500  $\mu\text{M}$  pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を使用した。(B)  $d_7$ -Sph d18:1 と C24:0-CoA をインキュベートして生成された Cer[NS]  $d_7$ -d18:1/24:0 の量を示した。(D)  $d_7$ -DHS d18:0 と C24:0-CoA をインキュベートして生成された Cer[NDS]  $d_7$ -d18:0/24:0 およびその代謝物である Cer[NS]  $d_7$ -d18:1/24:0 の量を示した。(E)  $d_7$ -DHS d18:0 と C24:0-CoA をインキュベートして生成された Cer[NDS]  $d_7$ -d18:0/24:0 と Cer[NS]  $d_7$ -d18:1/24:0

の比を示した。(F)  $d_7$ -Sph d18:1 と C16:0-CoA をインキュベートして生成された Cer[NS]  $d_7$ -d18:1/16:0 の量を示した。(G)  $d_7$ -DHS d18:0 と C16:0-CoA をインキュベートして生成された Cer[NDS]  $d_7$ -d18:0/16:0 およびその代謝物である Cer[NS]  $d_7$ -d18:1/16:0 の量を示した。(H)  $d_7$ -DHS d18:0 と C16:0-CoA をインキュベートして生成された Cer[NDS]  $d_7$ -d18:0/16:0 と Cer[NS]  $d_7$ -d18:1/16:0 の比を示した。n = 3。mean + SE。student's *t*-test、\* $P < 0.05$ 。

#### 4-6 セラミド不飽和化酵素 Dggs1 の遺伝子・タンパク質発現は有意に変化しなかった

次に、セラミド不飽和化反応が亢進した原因を探るため、スフィンゴ脂質の代謝に関わる酵素の遺伝子およびタンパク質発現量を測定した。まず、4週齢野生型および Spade マウスの表皮組織を用いて、qPCR によりスフィンゴ脂質代謝酵素の遺伝子発現を測定した。その結果、Spade マウスにおいて、一部の遺伝子発現に有意な減少が認められた一方で、セラミド不飽和化反応の責任酵素である Dggs1 の遺伝子発現に有意な差は認められなかった (図 12 A)。また、耳組織における Dggs1 のタンパク質発現量をウエスタンブロットティングにて確認したところ、4週齢の Spade マウスにおいて野生型と比較し有意な発現増加は認められなかった (図 12 B)。以上の結果より、4週齢 Spade マウスにおいて、Dggs1 の遺伝子・タンパク質発現量に有意な変化が生じていないことが明らかとなった。

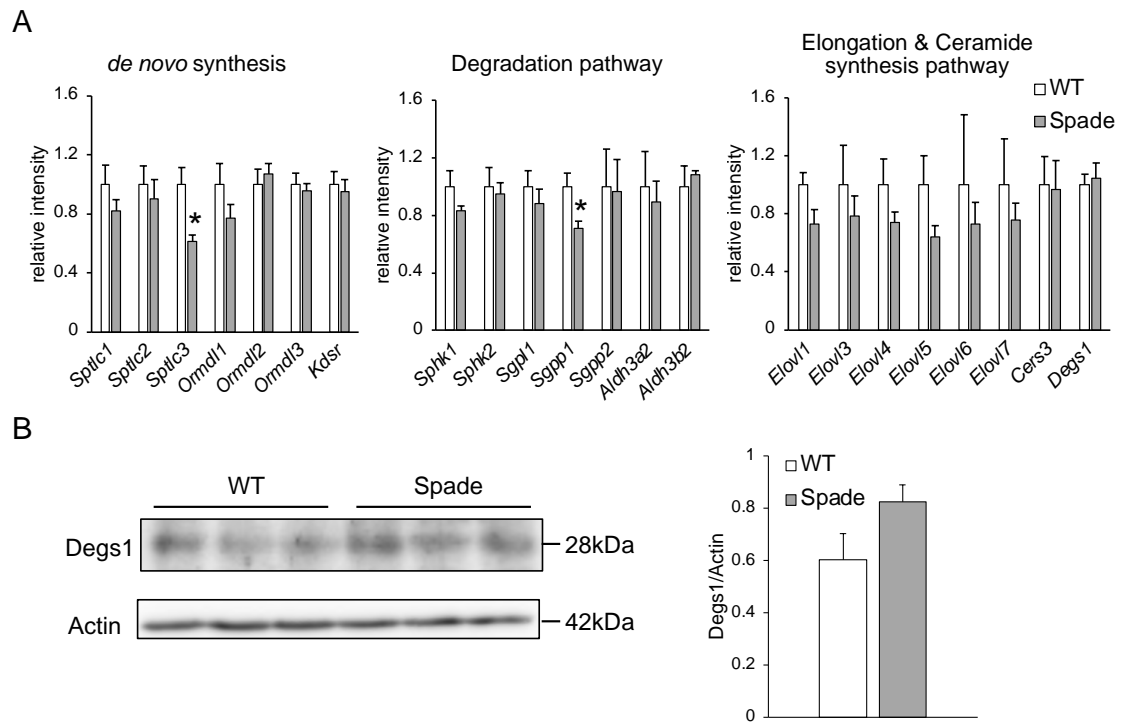


図 12. スフィンゴ脂質代謝酵素の遺伝子・タンパク質の発現量解析  
 (A) 4 週齢マウスの表皮組織におけるスフィンゴ脂質代謝酵素の遺伝子発現量を qPCR により測定した。それぞれの遺伝子発現量は *Gapdh* の発現量で補正し、野生型の発現量の平均値を 1 とした時の *Spade* マウスにおける相対値を示した。(B) 4 週齢耳組織のタンパク質ライセートを用いてウエスタンブロッティングを行った。Actin に対する *Degr1* のバンドの濃さを Image J により定量した。n = 3。mean + SE。student's *t*-test、\**P* < 0.05。

#### 4-7 Cer[NDS] d18:0/24:0 の塗布により Spade マウスの皮膚炎発症および増悪化が抑制された

次に、Cer[NDS]が Spade マウスのアトピー性皮膚炎様症状の発症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 Cer[NDS] d18:0/24:0 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 (図 13 A)。その結果、Cer[NDS] d18:0/24:0 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 70%のマウスが皮膚炎を発症したのに対し、Cer[NDS] d18:0/24:0 塗布群では 50%しか発症しなかった (図 13 B)。さらに、症状の増悪化も Cer[NDS] d18:0/24:0 塗布群で有意に減弱した (図 13 C)。またこれらの結果と一致し、耳の肥厚も有意に抑制されたものの、バリア機能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) に変化は認められなかった (図 13 D-F)。次に、表皮組織の形態を確認するため、表皮の層ごとのマーカータンパク質の免疫染色を行った。その結果、Ki67 (基底層増殖細胞マーカー)、Krt5 (基底層マーカー)、Krt10 (有棘層マーカー)、Lor (顆粒層、角質層マーカー) のいずれにおいても野生型と比較し Spade マウスにおいて発現が亢進していた (図 13 G)。さらに、Cer[NDS] d18:0/24:0 を塗布した Spade マウスにおいて、溶媒単独を塗布したコントロールの Spade マウスと比較し、これらマーカータンパク質の発現亢進が抑制されることが明らかとなった。以上の免疫染色より、Spade マウスで生じる表皮肥厚・過形成が Cer[NDS] d18:0/24:0 の塗布により抑制されたことが明らかとなった。



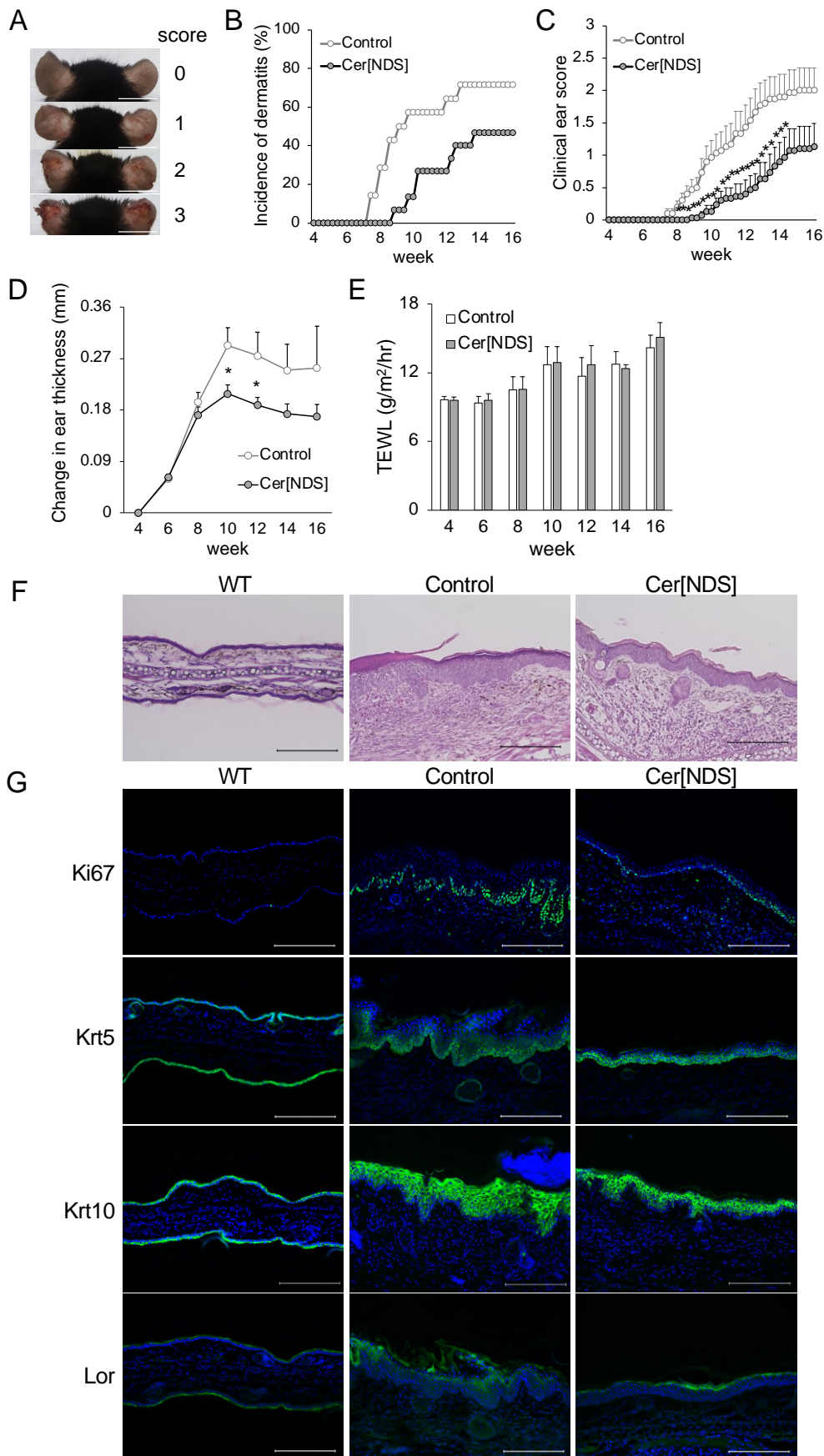


図 13. Cer[NDS] d18:0/24:0 を Spade マウスの耳に塗布した際の表現型解析

(A) Spade マウスの耳の炎症度合いをスコア化した。(B) Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の皮膚疾患の発症率を示した。Mann-Whitney's *U* test。(C) Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の皮膚疾患の増悪度をスコア化した。(D) Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の耳の肥厚の変化を示した。(E) Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の経皮水分蒸散量 (TEWL) の値を示した。(F) 野生型マウスもしくは、Cer[NDS] d18:0/24:0 または溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の耳組織の HE 染色像を示した。野生型は 12 週齢、Spade マウスは塗布を開始してから 8 週後 (12 週齢) の耳組織を用いた。Scale bars: 200  $\mu$ m。(G) 野生型マウスもしくは、Cer[NDS] d18:0/24:0 または溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の耳組織の免疫染色像を示した。野生型は 12 週齢、Spade マウスは塗布を開始してから 8 週後 (12 週齢) の耳組織を用いた。Ki67、Krt5、Krt10、Lor (緑) および DAPI (青) を示している。Scale bars: 200  $\mu$ m。n = 15。mean + SE。student's *t*-test、\**P* < 0.05。

#### 4-8 Cer[NDS] は鎖長に依存せず、Spade マウスの皮膚炎発症および増悪化を抑制した

先ほど認められた Cer[NDS] d18:0/24:0 の病態形成抑制効果が極長鎖 Cer[NDS] に特異的な作用であるかを確かめるため、Cer[NDS] d18:0/16:0 を Spade マウスの耳に一日おきに塗布した。その結果、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、Cer[NDS] d18:0/24:0 と同程度まで発症の遅延および増悪化が抑制された (図 14 A, B)。またこれらの結果と一致し、耳の肥厚も有意に抑制され、先ほどと同様にバリア機能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) に変化は認められなかった (図 14 C, D)。炎症度合いを定量的に調べるため、炎症関連遺伝子の発現を調べたところ、Cer[NDS] d18:0/16:0 および Cer[NDS] d18:0/24:0 は同程度の遺伝子発現の抑制を示した (図 14 E)。以上の結果より、塗布された Cer[NDS] は鎖長に依存せず、Spade マウスの疾患形成を抑制することが明らかとなった。

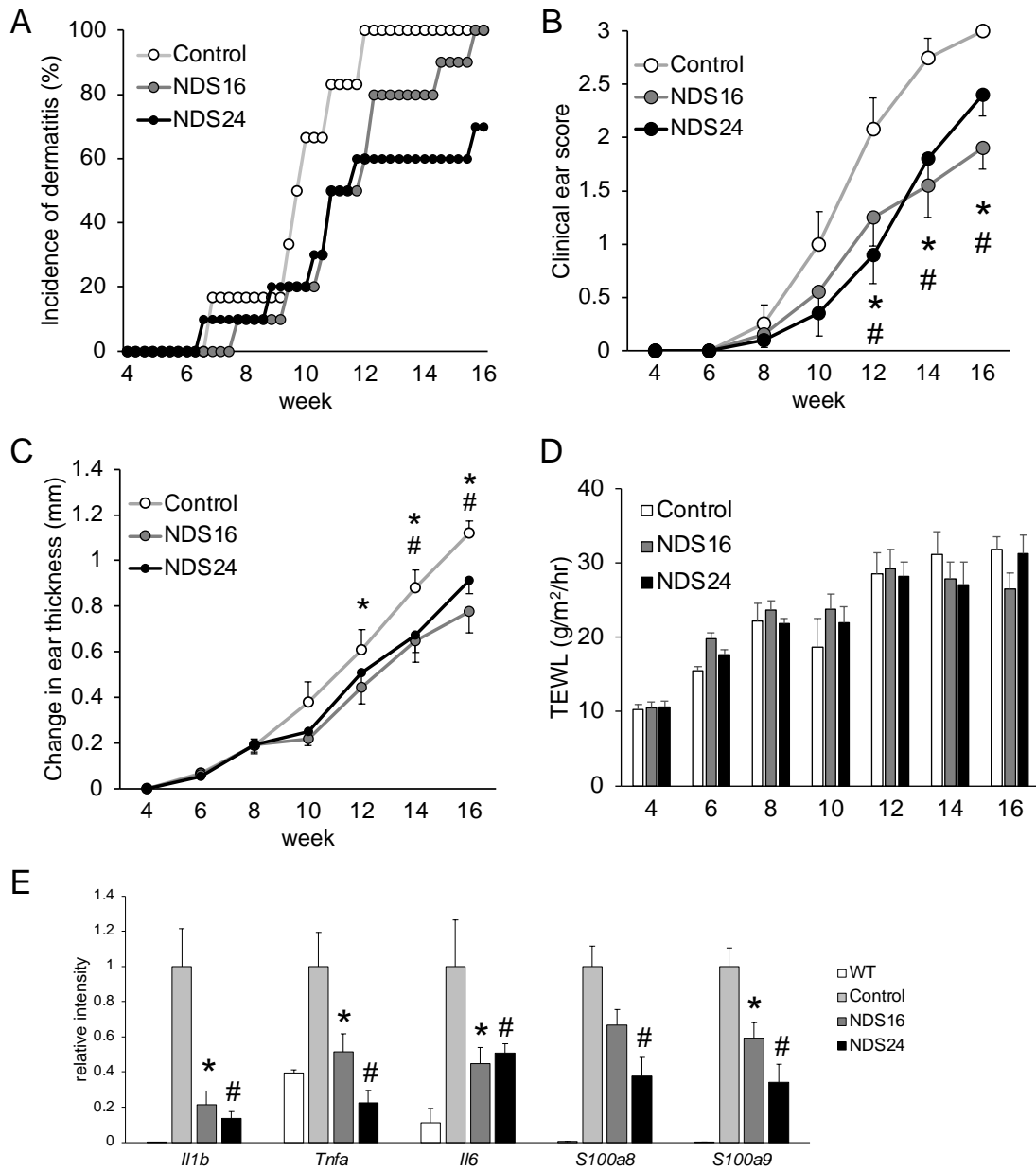


図 14. Cer[NDS] d18:0/16:0 または Cer[NDS] d18:0/24:0 を Spade マウスの耳に塗布した際の表現型解析

(A) Cer[NDS] d18:0/16:0、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の皮膚疾患の発症率を示した。Mann-Whitney's *U* test。 (B) Cer[NDS] d18:0/16:0、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の皮膚疾患の増悪度をスコア化した。 (C) Cer[NDS] d18:0/16:0、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の

耳の肥厚の変化を示した。(D) Cer[NDS] d18:0/16:0、Cer[NDS] d18:0/24:0 もしくは溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の経皮水分蒸散量 (TEWL) の値を示した。(E) 野生型マウスもしくは、Cer[NDS] d18:0/16:0、Cer[NDS] d18:0/24:0 または溶媒単独 (Control) を Spade マウスの耳に塗布した際の炎症関連遺伝子の発現量を qPCR により測定した。野生型は 16 週齢、Spade マウスは塗布を開始してから 12 週後 (16 週齢) の耳組織を用いた。それぞれの遺伝子発現量は *Gapdh* の発現量で補正し、Control の平均値を 1 とした時の野生型マウスおよび Cer[NDS] が塗布された Spade マウスにおける相対値を示した。n = 3-20。mean ± SE。Dunnett's test、Cer[NDS] d18:0/16:0 vs. Control; \* $P < 0.05$ 、Cer[NDS] d18:0/ 24:0 vs. Control; # $P < 0.05$ 。

## 5 考察

本研究では、網羅的なリピドームプロファイリングを行うことで、**Jak1** の恒常的な活性化による皮膚炎の発症や進行に伴うスフィンゴ脂質の代謝異常を見出すことに成功した。さらに、炭素鎖長 22 以上の極長鎖脂肪酸が含有した **Cer[NDS]** の顕著な減少が **Spade** マウスの皮膚炎発症前に生じることを明らかにし、こうした脂質の代謝変化が、**Jak1** の活性化を介した皮膚炎における新規の病態制御因子であると推測された。

本研究では皮膚炎症の病因を分子レベルで明らかにするため、**Jak1** の活性依存的にアトピー性皮膚炎様症状を呈するモデルマウスを用いた。**JAK** 阻害剤はすでにアトピー性皮膚炎の治療薬として承認されており、多くの **JAK** 阻害剤が現在臨床研究へと進んでいる (23)。また、ヒトおよび他のマウスモデルにおいて、**JAK1** の遺伝子変異による **JAK1** 活性化が、皮膚炎発症につながるとの報告も存在し、皮膚の恒常性維持における **JAK1** の重要性が示唆されている (41, 42)。**Spade** マウスにおいては、キナーゼドメイン内の **R878H** の変異が **Jak1** の活性化を引き起こす (35)。また、**Jak** の活性化により生じる **Stat** タンパク質のリン酸化が表皮組織の上部で生じていることが示されている。さらに骨髄移植実験から、**Spade** マウスの皮膚炎発症には、非骨髄由来細胞が必須であることが明らかとなっている。これらのことから、表皮ケラチノサイトの上部における **JAK** シグナルの活性化が重要であることが示唆されている。本研究では、極長鎖脂肪酸が含有した **Cer[NDS]** が疾患発症前に減少することを見出した (図 9 A, B)。これまでに **JAK** シグナルの活性化とセラミド代謝変化の関連を示した報告は存在しない。一部の報告では、**JAK** シグナルを含む複数のシグナルを活性化させるサイトカインの刺激により、セラミド代謝異常が生じるとの報告がケラチノサイトの培養実験で示されているものの、**JAK1** 依存性については言及されていない (25, 43-

45)。従って本研究は、*Jak1* の活性化を介した皮膚炎発症モデルマウスにおけるセラミド代謝異常を報告した初めての研究であると言える。

皮膚に存在する多種多様な脂質は、それぞれが特徴的な分子作用を発揮し、皮膚や表皮の恒常性維持に貢献することが知られているが、アトピー性皮膚炎の病態形成段階において、どのように脂質プロファイルが変化していくかは未だ明らかとなっていない。本研究では、ノンターゲットおよびターゲットリピドミクスを駆使し、マウス皮膚炎発症過程における脂質プロファイリングを網羅的に明らかにした。*Spade* マウスの皮膚炎発症後においては、アトピー性皮膚炎患者の病変部位における脂質代謝変化と同様の変化が多く観察された (図 8 C, D, F, G)。加えて、セラミド、LPC、遊離脂肪酸は極長鎖脂肪酸含有のタイプが減少し、長鎖脂肪酸含有のタイプが増加した。極長鎖脂肪酸や極長鎖セラミドは皮膚バリアとして働くラメラ脂質の構成分子であり、それらの代謝異常は皮膚バリア不全による新生致死に至ることが代謝酵素欠損マウスを用いた解析から証明されている (14, 32, 46–49)。従って、疾患発症後の *Spade* マウスにおいて認められる極長鎖脂肪酸含有脂質の代謝異常は、脂質ラメラの整合性を乱し、更なるバリア機能異常や病態の悪化を引き起こしている可能性がある。

*Berdyshev* らはアトピー性皮膚炎患者の病変表皮において、*ELOVL3/6* の遺伝子発現が減少していることを示した (25)。*ELOVL3* は炭素鎖長 18 から 24 までの脂肪酸を合成する脂肪酸伸長酵素であり、*ELOVL6* は炭素鎖長 12 から 18 の脂肪酸を合成する (50, 51)。彼らはケラチノサイトの *ELOVL3/6* をノックダウンすることで、極長鎖脂質が減少し、長鎖脂質が増加することを *in vitro* 実験で示している。疾患発症後の 10 週齢の *Spade* マウスにおいては、*Elovl* 酵素のうち、*Elovl6* の遺伝子発現は有意に減少しており、*Elovl3/4/5* は減少傾向を示した (図 8 H)。*Elovl4* は炭素鎖長 28 以上の脂肪酸を合成する皮膚バリア機能に不可欠な酵素である一方、*Elovl5* は多価不飽和脂肪酸を伸長

する酵素であることが知られている (50, 51)。そのため、疾患発症後の Spade マウスにおいては、*Elovl3/4/5* の減少が極長鎖脂質の減少に寄与していることが考えられる。

疾患発症前の 4 週齢 Spade マウスの表皮において、炭素鎖長 22 以上の極長鎖脂肪酸が含有した Cer[NDS]が選択的に減少していた (図 10 B)。極長鎖型のセラミドの減少であるため、*Elovl4* や *CerS3* 酵素の比活性の低下が関与していると考えられた。しかし、4 週齢時点の Spade マウスでは極長鎖 Cer[NS]や遊離の極長鎖脂肪酸が減少していないことから、*Elovl4* の酵素活性は変化していないことが推測される。また、Cer[NDS]の前駆体である DHS が減少していたことから、*Spt* 酵素の活性低下も寄与していることが考えられた。さらに、Cer[NDS]が減少していたことから、セラミド不飽和化酵素である *Degs1* の活性上昇も考えられた。そこで、皮膚組織のタンパク質抽出液を用いてそれら酵素の比活性を測定したところ、4 週齢 Spade マウスにおいて *Degs1* のみ有意な活性亢進が認められた (図 11 A-G)。*Degs1* は Cer[NDS]を不飽和化し、Cer[NS]に代謝する酵素である。*Degs1* 酵素の活性が上昇すると、Cer[NDS]は減少し、Cer[NDS]/Cer[NS]比の減少が生じることとなる。事実、4 週齢の Spade マウスにおいて Cer[NDS]/Cer[NS]比の減少が認められた (図 10 D)。一方で、Cer[NDS]から代謝される Cer[NS]の量の増加は認められなかった (図 10 C)。4 週齢 Spade マウスの表皮組織における Cer[NDS]の減少 (30 nmol/mg tissue vs. 野生型) は Cer[NS]の代謝産物である SM の増加 (90 nmol/mg tissue vs. 野生型) に反映されている可能性があり、*Degs1* の活性上昇により生成された Cer[NS]は、SM に代謝されたと推測される (図 10 G-I)。以上より、*Degs1* は 4 週齢の Spade マウスにおける Cer[NDS]および Cer[NDS]/Cer[NS]比が減少した原因酵素であると考えられる。また、アトピー性皮膚炎患者において、DHS/Sph や Cer[NDS]/Cer[NS]比の減少が認められており、これらの比は病態の重症度を示す指標 (scoring AD, SCORAD) と強い相関を示すことが報告されている (40)。他のアトピー性皮膚炎モデルマウスの角質層においても DHS/Sph 比の減少が報告されて



いる (52)。Chaurasia らは肝臓および脂肪組織特異的な *Degs1* の欠損マウスを作成し、炭素鎖長 16 から 24 の脂肪酸を含有した Cer[NDS]/Cer[NS]比が上昇することを示した (53)。この結果から、*Degs1* が炭素鎖長 16 から 24 の Cer[NDS]を基質として認識することが示唆される。我々の結果においても炭素鎖長 16、24 のセラミド不飽和化反応の亢進が確認されており (図 11 D, G)、*Degs1* の基質の鎖長選択性は広いと考えられる。従って、極長鎖脂肪酸含有の Cer[NDS]が選択的に減少した原因は、*Degs1* の基質選択性では説明できない。極長鎖 Cer[NDS]の選択的減少を説明し得る一つの可能性としては、*Degs1* 活性の亢進がラメラ脂質合成の場である表皮上部で生じたとの仮説が挙げられる。脂質ラメラ中の Cer[NDS]はほとんどが炭素鎖長 24 以上の極長鎖脂肪酸含有脂質であり、16 や 18 の脂肪酸が含有した Cer[NDS]はほとんど存在しない (54)。このラメラ中の脂質は、表皮基底層ではなく、分化したケラチノサイトの層である有棘層や顆粒層で盛んに合成される。従って、*Degs1* の活性上昇が有棘層以降の表皮上部で生じた場合、極長鎖 Cer[NDS]が選択的に減少する可能性がある。また、*Jak1* 活性化の下流で生じる Stat タンパク質のリン酸化は *Spade* マウスの表皮上部で生じていることが既報で示されており (35)、この事実は *Degs1* が表皮上部で活性化している可能性を支持する。

*Wigger* らはラットの肝臓ミクロソーム画分と安定同位体で標識した化合物を用いてスフィンゴ脂質 *de novo* 合成経路の活性をモニタリングすることに成功している (55)。本研究では、この既報を参考にし、各種スフィンゴ脂質代謝酵素の比活性の測定を行った。その結果、野生型と比較し、*Spade* マウスの皮膚組織ライセートにおいてセラミド不飽和化反応が 2 倍ほど亢進していることが明らかとなった (図 11 D)。 *Degs1* のタンパク質発現量をウェスタンブロットティングにて確認したところ、野生型と *Spade* マウスに有意な変化は認められず (図 12 B)、タンパク質発現量に依存しない *Degs1* の活性上昇が生じていることが示唆された。*Degs1* は膜脂質を不飽和化する

酵素に特徴的な3つの共通配列を有する小胞体膜タンパク質である (56–58)。既報において、N末端のミリスチル化により不飽和化活性が上昇することが示されている (59)。加えて、活性変化に寄与するかは不明であるが、307番目のセリン残基がリン酸化されることが、リン酸化タンパク質のショットガンプロテオミクスによって同定されている (60)。本研究で確認された *Degs1* の活性上昇は、こうした翻訳後修飾が寄与している可能性がある。

4週齢の *Spade* マウスにおいて、野生型と比較し TEWL が有意に増加することが示された (図 7 C)。さらに、*Spade* マウスの一部の脂質ラメラ観察像に、層板顆粒が適切に放出されずに残存したような凝集体が確認された (図 7 B)。この凝集体は、*Pnpl1* や *Abhd5* といった皮膚バリア不全を伴うラメラ脂質の代謝酵素欠損マウスにおいても認められている (12, 38)。従って、4週齢 *Spade* マウスにおける JAK1 の活性化やセラミド代謝異常が、脂質ラメラ中の凝集体の発生につながり、バリア機能の異常に寄与している可能性が考えられた。

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 (図 13 A–E, 図 14 A–E)。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。事実、免疫染色からも、Cer[NDS] の塗布により表皮過形成が抑制されたことが明らかとなっている (図 13 G)。また、表皮におけるセラミドは極長鎖が主であり、極長鎖 Cer[NDS] の減少 (18:0/24:0, 39%; d18:0/26:0, 17% vs. 野生型) は、表皮の Cer[NDS] 合計量の減少 (47% vs. 野生型) にも影響した (図 10 B, G)。塗布された

Cer[NDS]は、表皮の Cer[NDS]の減少を補填することで、鎖長非依存的に表皮過形成や病態形成を抑制したのかもしれない。

以上、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。本研究成果は、これまで明らかでなかったセラミド代謝と皮膚恒常性の維持との関係性における新たな知見であり、セラミド代謝異常の是正が皮膚疾患制御に寄与する可能性を示唆するものである。

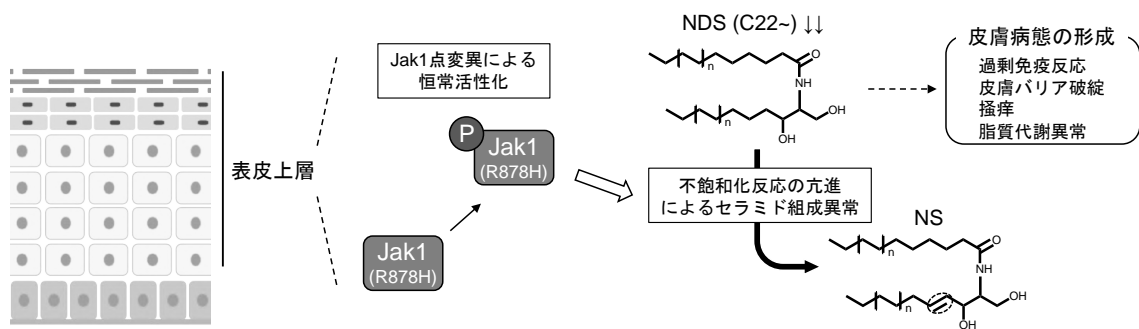


図 15. 本研究の概念図

## 6 主論文に関する原著論文

1. Iino Y, Naganuma T, Arita M. 2023. Dysregulated ceramide metabolism in mouse progressive dermatitis resulting from constitutive activation of Jak1. *J Lipid Res.* Jan 11;64(2):100329.

## 7 参考文献

1. Yardley, H. J., and R. Summerly. 1981. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol Ther.* **13**: 357–383.
2. Masukawa, Y., H. Narita, E. Shimizu, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, T. Kitahara, Y. Takema, and K. Kita. 2008. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res.* **49**: 1466–1476.
3. van Smeden, J., L. Hoppel, R. van der Heijden, T. Hankemeier, R. J. Vreeken, and J. A. Bouwstra. 2011. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res.* **52**: 1211–21.
4. T'Kindt, R., L. Jorge, E. Dumont, P. Couturon, F. David, P. Sandra, and K. Sandra. 2012. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* **84**: 403–411.
5. Masukawa, Y., H. Narita, H. Sato, A. Naoe, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, and T. Kitahara. 2009. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res.* **50**: 1708–1719.
6. Breiden, B., and K. Sandhoff. 2014. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* **1841**: 441–452.
7. Ohno, Y., S. Nakamichi, A. Ohkuni, N. Kamiyama, A. Naoe, H. Tsujimura, U. Yokose, K. Sugiura, J. Ishikawa, M. Akiyama, and A. Kihara. 2015. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**: 7707–7712.

8. Kien, B., S. Grond, G. Haemmerle, A. Lass, T. O. Eichmann, and F. P. W. Radner. 2018. ABHD5 stimulates PNPLA1-mediated  $\omega$ -acylceramide biosynthesis essential for a functional skin permeability barrier. *J Lipid Res.* **59**: 2360–2367.
9. Itoh, N., M. Sawai, T. Sassa, and A. Kihara. 2020. Severe Skin Permeability Barrier Dysfunction in Knockout Mice Deficient in a Fatty Acid  $\omega$ -Hydroxylase Crucial to Acylceramide Production. *J Invest Dermatol.* **140**: 319-326.e4.
10. Hirabayashi, T., T. Anjo, A. Kaneko, Y. Senoo, A. Shibata, H. Takama, K. Yokoyama, Y. Nishito, T. Ono, C. Taya, K. Muramatsu, K. Fukami, A. Muñoz-Garcia, A. R. Brash, K. Ikeda, M. Arita, M. Akiyama, and M. Murakami. 2017. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun.* **8**: 14609.
11. Ohno, Y., N. Kamiyama, S. Nakamichi, and A. Kihara. 2017. PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid  $\omega$ -O-acylceramide. *Nat Commun.* **8**: 14610.
12. Grond, S., F. P. W. Radner, T. O. Eichmann, D. Kolb, G. F. Grabner, H. Wolinski, R. Gruber, P. Hofer, C. Heier, S. Schauer, T. Rüllicke, G. Hoefler, M. Schmuth, P. M. Elias, A. Lass, R. Zechner, and G. Haemmerle. 2017. Skin Barrier Development Depends on CGI-58 Protein Expression during Late-Stage Keratinocyte Differentiation HHS Public Access. *J Invest Dermatol.* **137**: 403–413.
13. Li, W., R. Sandhoff, M. Kono, P. Zerfas, V. Hoffmann, B. C.-H. Ding, R. L. Proia, and C.-X. Deng. 2007. Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int J Biol Sci.* **3**: 120–8.
14. Sassa, T., Y. Ohno, S. Suzuki, T. Nomura, C. Nishioka, T. Kashiwagi, T. Hirayama, M. Akiyama, R. Taguchi, H. Shimizu, S. Itohara, and A. Kihara. 2013. Impaired epidermal

- permeability barrier in mice lacking *elov11*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol.* **33**: 2787–96.
15. Nagatake, T., Y. Shioyama, A. Inoue, J. Kikuta, T. Honda, P. Tiwari, T. Kishi, A. Yanagisawa, Y. Isobe, N. Matsumoto, M. Shimojima, S. Morimoto, H. Suzuki, S. Hirata, P. Steneberg, H. Edlund, J. Aoki, M. Arita, H. Kiyono, Y. Yasutomi, M. Ishii, K. Kabashima, and J. Kunisawa. 2018. The 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid–G protein–coupled receptor 40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* **142**: 470-484.e12.
16. Sumitomo, A., R. Siritach, D. Thumkeo, K. Ito, R. Nakagawa, N. Tanaka, K. Tanabe, A. Watanabe, M. Kishibe, A. Ishida-Yamamoto, T. Honda, K. Kabashima, J. Aoki, and S. Narumiya. 2019. LPA induces keratinocyte differentiation and promotes skin barrier function through the LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF axis. *Journal of Investigative Dermatology.* **139**: 1010–1022.
17. Sawada, Y., T. Honda, S. Nakamizo, S. Nakajima, Y. Nonomura, A. Otsuka, G. Egawa, T. Yoshimoto, M. Nakamura, S. Narumiya, and K. Kabashima. 2019. Prostaglandin E2-EP2 signaling negatively regulates murine atopic dermatitis-like skin inflammation by suppressing TSLP expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* **144**: 1265-1273.e9.
18. Sawada, Y., T. Honda, S. Nakamizo, A. Otsuka, N. Ogawa, Y. Kobayashi, M. Nakamura, and K. Kabashima. 2018. Resolvin E1 attenuates murine psoriatic dermatitis. *Sci Rep.* **8**: 11873.
19. Kanemaru, K., Y. Nakamura, K. Sato, R. Kojima, S. Takahashi, M. Yamaguchi, M. Ichinohe, H. Kiyonari, G. Shioi, K. Kabashima, K. Nakahigashi, M. Asagiri, C. Jamora,

- H. Yamaguchi, and K. Fukami. 2012. Epidermal phospholipase C $\delta$ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. *Nat Commun.* **3**: 963.
20. Nakajima, K., M. Terao, M. Takaishi, S. Kataoka, N. Goto-Inoue, M. Setou, K. Horie, F. Sakamoto, M. Ito, H. Azukizawa, S. Kitaba, H. Murota, S. Itami, I. Katayama, J. Takeda, and S. Sano. 2013. Barrier Abnormality Due to Ceramide Deficiency Leads to Psoriasiform Inflammation in a Mouse Model. *Journal of Investigative Dermatology.* **133**: 2555–2565.
21. Saeki, H., M. Akiyama, M. Abe, A. Igarashi, S. Imafuku, Y. Ohya, N. Katoh, H. Kameda, K. Kabashima, Y. Tsunemi, M. Hide, and M. Ohtsuki. 2022. English version of Japanese guidance for the use of oral Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatments of atopic dermatitis. *J Dermatol.* **00**: 1–19.
22. Akdis, C. A., M. Beccel Akdis, T. Bieber, C. Bindslev-Jensen, M. Boguniewicz, P. Eigenmann, Q. Hamid, A. Kapp, D. Y. M. Leung, J. Lipozencic, T. A. Luger, A. Muraro, N. Novak, T. A. E. Platts-Mills, L. Rosenwasser, A. Schey-Nius, F. Estelle, R. Simons, J. Spergel, K. Turjanmaa, U. Wahn, S. Weidinger, T. Werfel, and T. Zuberbier. 2006. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/ American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology and Allergy.* **118**: 152–69.
23. Chovatiya, R., and A. S. Paller. 2021. JAK inhibitors in the treatment of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* **148**: 927–940.
24. Ishikawa, J., H. Narita, N. Kondo, M. Hotta, Y. Takagi, Y. Masukawa, T. Kitahara, Y. Takema, S. Koyano, S. Yamazaki, and A. Hatamochi. 2010. Changes in the Ceramide



- Profile of Atopic Dermatitis Patients. *Journal of Investigative Dermatology*. **130**: 2511–2514.
25. Berdyshev, E., E. Goleva, I. Bronova, N. Dyjack, C. Rios, J. Jung, P. Taylor, M. Jeong, C. F. Hall, B. N. Richers, K. A. Norquest, T. Zheng, M. A. Seibold, and D. Y. M. Leung. 2018. Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI Insight*. **3**: e98006.
26. van Smeden, J., M. Janssens, E. C. J. Kaye, P. J. Caspers, A. P. Lavrijsen, R. J. Vreeken, and J. A. Bouwstra. 2014. The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp Dermatol*. **23**: 45–52.
27. Danso, M., W. Boiten, V. van Drongelen, K. Gmelig Meijling, G. Gooris, A. el Ghalbzouri, S. Absalah, R. Vreeken, S. Kezic, J. van Smeden, S. Lavrijsen, and J. Bouwstra. 2017. Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition. *J Dermatol Sci*. **88**: 57–66.
28. Töröcsik, D., C. Weise, J. Gericke, A. Szegedi, R. Lucas, J. Mihaly, M. Worm, and R. Rühl. 2019. Transcriptomic and lipidomic profiling of eicosanoid / docosanoid signalling in affected and non-affected skin of human atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol*. **28**: 177–189.
29. Hornemann, T., A. Penno, M. F. Rützi, D. Ernst, F. Kivrak-Pfiffner, L. Rohrer, and A. von Eckardstein. 2009. The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J Biol Chem*. **284**: 26322–26330.
30. Kihara, A., and Y. Igarashi. 2004. FVT-1 Is a Mammalian 3-Ketodihydrosphingosine Reductase with an Active Site That Faces the Cytosolic Side of the Endoplasmic Reticulum Membrane. *J Biol Chem*. **279**: 49243–50.

31. Takeichi, T., A. Torrelo, J. Y. W. Lee, Y. Ohno, M. L. Lozano, A. Kihara, L. Liu, Y. Yasuda, J. Ishikawa, T. Murase, A. B. Rodrigo, P. Fernández-Crehuet, Y. Toi, J. Mellerio, J. Rivera, V. Vicente, D. P. Kellsell, Y. Nishimura, Y. Okuno, D. Kojima, Y. Ogawa, K. Sugiura, M. A. Simpson, W. H. I. Mclean, M. Akiyama, and J. A. Mcgrath. 2017. Biallelic Mutations in KDSR Disrupt Ceramide Synthesis and Result in a Spectrum of Keratinization Disorders Associated with Thrombocytopenia. *Journal of Investigative Dermatology*. **137**: 2344–2353.
32. Radner, F. P. W., S. Marrakchi, P. Kirchmeier, G.-J. Kim, F. Ribierre, B. Kamoun, L. Abid, M. Leipoldt, H. Turki, W. Schempp, R. Heilig, M. Lathrop, and J. Fischer. 2013. Mutations in CERS3 Cause Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis in Humans. *PLoS Genet*. **9**: e1003536.
33. Jennemann, R., M. Rabionet, K. Gorgas, S. Epstein, A. Dalpke, U. Rothermel, A. Bayerle, F. van der Hoeven, S. Imgrund, J. Kirsch, W. Nickel, K. Willecke, H. Riezman, H.-J. Gröne, and R. Sandhoff. 2012. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet*. **21**: 586–608.
34. Gault, C. R., L. M. Obeid, and Y. A. Hannun. 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol*. **688**: 1–23.
35. Yasuda, T., T. Fukada, K. Nishida, M. Nakayama, M. Matsuda, I. Miura, T. Dainichi, S. Fukuda, K. Kabashima, S. Nakaoka, B.-H. Bin, M. Kubo, H. Ohno, T. Hasegawa, O. Ohara, H. Koseki, S. Wakana, and H. Yoshida. 2016. Hyperactivation of JAK1 tyrosine kinase induces stepwise, progressive pruritic dermatitis. *J Clin Invest*. **126**: 2064–2076.
36. Tsugawa, H., K. Ikeda, M. Takahashi, A. Satoh, Y. Mori, H. Uchino, N. Okahashi, Y. Yamada, I. Tada, P. Bonini, Y. Higashi, Y. Okazaki, Z. Zhou, Z. J. Zhu, J. Koelmel, T.

- Cajka, O. Fiehn, K. Saito, M. Arita, and M. Arita. 2020. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nat Biotechnol.* **38**: 1159–1163.
37. Matsuda, H., N. Watanabe, G. P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi, M. Matsumoto, H. Ushio, S. Saito, P. W. Askenase, and C. Ra. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* **9**: 461–466.
38. Pichery, M., A. Huchencq, R. Sandhoff, M. Severino-Freire, S. Zaafour, L. Opálka, T. Levade, V. Soldan, J. Bertrand-Michel, E. Lhuillier, G. Serre, A. Maruani, J. Mazereeuw-Hautier, and N. Jonca. 2017. PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Hum Mol Genet.* **26**: 1787–1800.
39. Allende, M. L., L. M. Sipe, G. Tuymetova, K. L. Wilson-Henjum, W. Chen, and R. L. Proia. 2013. Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 regulates keratinocyte differentiation and epidermal homeostasis. *J Biol Chem.* **288**: 18381–91.
40. Tonicic, R. J., I. Jakasa, S. L. Hadzavdic, S. M. Goorden, K. J. G. der Vlugt, F. S. Stet, A. Balic, M. Petkovic, B. Pavicic, K. Zuzul, B. Marinovic, and S. Kezic. 2020. Altered Levels of Sphingosine, Sphinganine and Their Ceramides in Atopic Dermatitis Are Related to Skin Barrier Function, Disease Severity and Local Cytokine Milieu. *Int J Mol Sci.* **21**: 1958.
41. Sabrautzki, S., E. Janas, B. Lorenz-Depiereux, J. Calzada-Wack, J. A. Aguilar-Pimentel, B. Rathkolb, T. Adler, C. Cohrs, W. Hans, S. Diener, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, D. H. Busch, H. Höfler, M. Ollert, T. M. Strom, E. Wolf, F. Neff, and M. Hrabě De Angelis. 2013. An ENU mutagenesis-derived mouse model with a dominant Jak1 mutation

- resembling phenotypes of systemic autoimmune disease. *American Journal of Pathology*. **183**: 352–368.
42. Takeichi, T., J. Y. W. Lee, Y. Okuno, Y. Miyasaka, Y. Murase, T. Yoshikawa, K. Tanahashi, E. Nishida, T. Okamoto, K. Ito, Y. Muro, K. Sugiura, T. Ohno, J. A. McGrath, and M. Akiyama. 2022. Autoinflammatory Keratinization Disease With Hepatitis and Autism Reveals Roles for JAK1 Kinase Hyperactivity in Autoinflammation. *Front Immunol*. **12**: 1–12.
43. Sawada, E., N. Yoshida, A. Sugiura, and G. Imokawa. 2012. Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: An implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. **68**: 25–35.
44. Hatano, Y., H. Terashi, S. Arakawa, and K. Katagiri. 2005. Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. **124**: 786–792.
45. Tawada, C., H. Kanoh, M. Nakamura, Y. Mizutani, T. Fujisawa, Y. Banno, and M. Seishima. 2014. Interferon- $\gamma$  Decreases Ceramides with Long-Chain Fatty Acids: Possible Involvement in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. **134**: 712–718.
46. Joshua Cameron, D., Z. Tong, Z. Yang, J. Kaminoh, S. Kamiyah, H. Chen, J. Zeng, Y. Chen, L. Luo, and K. Zhang. 2007. Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int. J. Biol. Sci*. **3**: 111–9.

47. Yamamoto, H., M. Hattori, W. Chamulitrat, Y. Ohno, and A. Kihara. 2020. Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene FATP4 through formation of the barrier lipid  $\omega$ -O-acylceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **117**: 2914–2922.
48. Vasireddy, V., Y. Uchida, N. Salem, S. Y. Kim, M. N. A. Mandal, G. B. Reddy, R. Bodepudi, N. L. Alderson, J. C. Brown, H. Hama, A. Dlugosz, P. M. Elias, W. M. Holleran, and R. Ayyagari. 2007. Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ( $\geq$ C28) and the unique  $\omega$ -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum Mol Genet.* **16**: 471–482.
49. Aldahmesh, M. A., J. Y. Mohamed, H. S. Alkuraya, I. C. Verma, R. D. Puri, A. A. Alaiya, W. B. Rizzo, and F. S. Alkuraya. 2011. Recessive mutations in ELOVL4 cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. *Am J Hum Genet.* **89**: 745–750.
50. Ohno, Y., S. Suto, M. Yamanaka, Y. Mizutani, S. Mitsutake, Y. Igarashi, T. Sassa, and A. Kihara. 2010. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 18439–18444.
51. Kitazawa, H., A. E. Yasuhisa, M. Ae, K. Shimamura, A. E. Akira, N. Ae, and S. Tokita. 2009. Development of a High-Density Assay for Long-Chain FattyAcyl-CoA Elongases. *Lipids.* **44**: 765–73.
52. Loiseau, N., Y. Obata, S. Moradian, H. Sano, S. Yoshino, K. Aburai, K. Takayama, K. Sakamoto, W. M. Holleran, P. M. Elias, and Y. Uchida. 2013. Altered sphingoid base profiles predict compromised membrane structure and permeability in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* **72**: 296–303.

53. Chaurasia, B., T. S. Tippetts, R. M. Monibas, J. Liu, Y. Li, L. Wang, J. L. Wilkerson, C. R. Sweeney, R. F. Pereira, D. H. Sumida, J. A. Maschek, J. E. Cox, V. Kaddai, G. I. Lancaster, M. M. Siddique, A. Poss, M. Pearson, S. Satapati, H. Zhou, D. G. McLaren, S. F. Previs, Y. Chen, Y. Qian, A. Petrov, M. Wu, X. Shen, J. Yao, C. N. Nunes, A. D. Howard, L. Wang, M. D. Erion, J. Rutter, W. L. Holland, D. E. Kelley, and S. A. Summers. 2019. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science (1979)*. **365**: 386–392.
54. Kawana, M., M. Miyamoto, Y. Ohno, and A. Kihara. 2020. Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *J Lipid Res*. **61**: 884–895.
55. Wigger, D., E. Gulbins, B. Kleuser, and F. Schumacher. 2019. Monitoring the Sphingolipid de novo Synthesis by Stable-Isotope Labeling and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Front Cell Dev Biol*. **7**: 210.
56. Ternes, P., S. Franke, U. Zähringer, P. Sperling, and E. Heinz. 2002. Identification and Characterization of a Sphingolipid  $\Delta 4$ -Desaturase Family. *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 25512–25518.
57. Cadena, D. L., R. C. Kurten, and G. N. Gill. 1997. The Product of the MLD Gene Is a Member of the Membrane Fatty Acid Desaturase Family: Overexpression of MLD Inhibits EGF Receptor Biosynthesis. *Biochemistry*. **36**: 6960–6967.
58. Sperling, P., U. Zähringer, and E. Heinz. 1998. A Sphingolipid Desaturase from Higher Plants: IDENTIFICATION OF A NEW CYTOCHROME b 5FUSION PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*. **273**: 28590–28596.

59. Beauchamp, E., X. Tekpli, G. Ile Marteil, D. Lagadic-Gossmann, P. Legrand, and V. Rioux. 2009. N-Myristoylation targets dihydroceramide  $\Delta$ 4-desaturase 1 to mitochondria: Partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid. *Biochimie*. **91**: 1411–1419.
60. Dephoure, N., C. Zhou, J. Villén, S. A. Beausoleil, C. E. Bakalarski, S. J. Elledge, and S. P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**: 10762–10767.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました慶應義塾大学薬学部 代謝生理化学講座 有田誠教授に厚く御礼申し上げます。

研究課題の立案、研究の遂行、論文執筆にわたって熱心且つ丁寧なご指導を賜りました、北海道大学薬学部 生化学研究室 永沼達郎助教に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧なご指導とご助言を賜りました、慶應義塾大学薬学 代謝生理化学講座 前川大志専任講師、大場陽介専任講師に厚く御礼申し上げます。

副査として本論文をご精読、審査して頂き、有益なご助言を頂きました、慶應義塾大学薬学部 衛生化学講座 多胡めぐみ教授、慶應義塾大学薬学部 生化学講座 高橋大輔専任講師に深く感謝申し上げます。

マウスを譲渡して下さった理化学研究所 生命医科学センター 免疫器官形成研究グループの皆様には感謝致します。

本研究を行うにあたり、日常の議論を通じて多くの有益な知識や示唆を頂きました、慶應義塾大学薬学部 代謝生理化学講座ならびに、理化学研究所 生命医科学研究センター メタボローム研究チームの皆様には深く感謝致します。

最後に、これまでの学生生活において、励まし、応援し、支え続けて下さいました家族に最大の感謝を捧げます。