

平成 31 年 4 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08220

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた極長鎖脂肪酸の新規機能に関する研究

研究課題名(英文) Study of very long-chain fatty acids using genetically modified mice.

研究代表者

佐々 貴之 (Sassa, Takayuki)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：20342793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：涙液の表面はマイボーム腺から分泌される脂質(マイバム脂質)で覆われている。マイバム脂質は涙液の蒸発防止等の作用を示し、ドライアイの防止に重要である。マイバム脂質の主要成分であるコレステロールエステルとワックスエステルには長い脂肪酸が豊富に含まれる。本研究では、マイバム脂質における長い脂肪酸の役割を明らかにするため、その合成に関与する脂肪酸伸長酵素ELOVL1の遺伝子をマウスにおいて欠損させてマイバム脂質の長さを短くしたところ、涙液蒸発亢進型のドライアイ症状を示すことを見出した。本研究により、マイバム脂質の「長さ」がドライアイの防止に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

涙液には水や粘性物質に加えてマイボーム腺から分泌される脂質が含まれている。脂質は涙液の表層に存在し、涙液の表面張力の低下や蒸発防止に重要な役割を果たす。ドライアイの原因の約8割がマイボーム腺機能不全による脂質の量や質の変化と関係があると言われていたが、脂質をターゲットとする薬剤は存在していない。本研究により涙液の脂質に含まれる脂肪酸の長さの重要性が明らかになったことから、マイボーム腺に働きかけて長い脂肪酸を含む脂質の産生を促す薬剤やそのような脂質を含む目薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The superficial layer of the tear film consists of the lipids that are secreted from the meibomian gland. These lipids are called meibum and prevent water evaporation from the ocular surface. The two major meibum lipids: cholesteryl esters and wax esters abundantly contain very long-chain fatty acids. Gene disruption of fatty acid elongase Elovl1 in mice shortened fatty acids in these meibum lipids. Elovl1 deficient mice exhibited dry eye phenotypes including enhanced water evaporation from the ocular surface and increased eye-blink frequency. This study demonstrates that the length of meibum lipids are important for the prevention of dry eye disease.

研究分野：生化学

キーワード：脂質 ドライアイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

極長鎖脂肪酸は炭素数が 20 より長い脂肪酸であり、長さや不飽和度の異なる多様な分子種が存在する。極長鎖脂肪酸の生合成機構や疾患との関連については一部が明らかになりつつあったが、未解明な点が多く残されていた。研究開始までに、申請者らは、脂肪酸伸長反応の律速段階を触媒する脂肪酸伸長酵素 ELOVL のアイソザイムが哺乳類に 7 種類存在し、それぞれのアイソザイムが異なる基質特異性を示すことを明らかにした。さらに、飽和・一価不飽和の極長鎖脂肪酸合成に関与する ELOVL1 の遺伝子欠損 (KO) マウスを作製し、ELOVL1 により合成される極長鎖脂肪酸が表皮アシルセラミド合成に利用され、皮膚バリアに必須の役割を果たすこと等を報告し、本分野を国際的にもリードする研究成果を挙げていた。

2. 研究の目的

涙液の表層を構成する油層はマイボーム腺から分泌される脂質 (マイバム脂質) から成る。マイバム脂質は涙液の蒸発防止および表面張力の低下作用を示し、ドライアイの防止に重要である。マイバム脂質の主要成分はコレステロールエステルとワックスエステルであり、これらの脂質には飽和・一価不飽和の極長鎖脂肪酸が豊富に含まれる。本研究では、マイバム脂質における極長鎖脂肪酸の役割および生合成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Elov11* KO マウスを作製し、マイボーム腺の脂質分析、涙液量の測定、まぶたや角膜の組織学的解析等により、ドライアイとの関連を解析した。

(2) これまで明らかでなかった一価不飽和脂肪酸や分岐鎖脂肪酸に対する各 ELOVL アイソザイムの伸長活性を測定し、基質特異性を明らかにした。また、質量分析法を用いてマウスの主要臓器における分岐鎖脂肪酸の分布を調べた。

4. 研究成果

(1) *Elov11* KO マウスではマイバム脂質の主成分であるコレステロールエステルとワックスエステルの長さが短くなった。これに伴い、*Elov11* KO マウスは涙液の蒸発亢進やまばたき頻度の増加を示し、涙液蒸発亢進型のドライアイを発症することが明らかとなった。また、*Elov11* KO マウスは約 4 ヶ月齢以降に角膜混濁を示す個体が現れ、その数は月齢の増加につれて増加した。これらの結果から、マイバム脂質の「長さ」がドライアイの防止に重要であることが示された。

(2) マイバム脂質には、直鎖の飽和・一価不飽和極長鎖脂肪酸に加え、枝分かれ構造を持つ分岐鎖の極長鎖脂肪酸が豊富に存在する。そこで、直鎖の一価不飽和脂肪酸および分岐鎖脂肪酸に対する各 ELOVL アイソザイムの伸長活性を測定した。極長鎖脂肪酸への伸長において、直鎖の一価不飽和脂肪酸に対しては ELOVL1、ELOVL3 および ELOVL4 が関与し、分岐鎖脂肪酸に対しては ELOVL1 および ELOVL3 が関与することを明らかにした。また、マウスの主要組織における分岐鎖脂肪酸の存在量および長さについて調べた結果、分岐鎖脂肪酸は多くの組織に存在すること、マイボーム腺に最も豊富に含まれること、組織によって含まれる分岐鎖脂肪酸の長さは異なることを明らかにした。

(3) 国際共同研究として、*ELOVL1* 遺伝子変異を持つ皮膚神経疾患患者の脂質分析および ELOVL1 変異体の活性測定を行い、極長鎖脂肪酸の減少と変異体の活性低下を明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Mueller N, [Sassa T](#), Morales-Gonzalez S, Schneider J, Salchow D, Seelow D, Knierim E, Stenzel W, Kihara A, and Schuelke M (2019) *De novo* mutation in *ELOVL1* causes ichthyosis, acanthosis nigricans, hypomyelination, spastic paraplegia, high frequency deafness, and optic atrophy. 査読有, *J. Med. Genet.* 56(3):164-175
DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105711
2. [Sassa T](#), Tadaki M, Kiyonari H, and Kihara A (2018) Very long-chain tear film lipids produced by fatty acid elongase ELOVL1 prevent dry eye disease in mice. 査読有, *FASEB J.* 32(6):2966-2978
DOI: 10.1096/fj.201700947R
3. Honda Y, Kitamura T, Naganuma T, Abe T, Ohno Y, [Sassa T](#), and Kihara A (2018) Decreased Skin Barrier Lipid Acylceramide and Differentiation-Dependent Gene Expression in Ichthyosis Gene *Nipal4* Knockout Mice. 査読有, *J. Invest. Dermatol.* 138(4):741-749
DOI: 10.1016/j.jid.2017.11.008
4. Sawai M, Uchida Y, Ohno Y, Miyamoto M, Nishioka C, Itohara S, [Sassa T](#), and Kihara A (2017) The 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases HACD1 and HACD2 exhibit functional redundancy and are active in a wide range of fatty acid elongation pathways. 査読有, *J. Biol. Chem.* 292(37):15538-15551

DOI: 10.1074/jbc.M117.803171

5. Sassa T, Hirayama T, and Kihara A (2016) Enzyme activities of the ceramide synthases CERS2-6 are regulated by phosphorylation in the C-terminal region. 査読有, *J. Biol. Chem.* 291(14):7477-7487

DOI: 10.1074/jbc.M115.695858

〔学会発表〕(計27件)

1. Sassa T. Pathological mechanism of congenital ichthyosis revealed by analyses of ichthyosis-causative gene knockout mice. 2018 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea, Jeju Island, Republic of Korea, 2018.10.17.
2. Sassa T and Kihara A. Very long-chain lipids as barrier lipids at the body surface. 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium, Sapporo, 2018. 9. 13.
3. Sassa T. Very long-chain fatty acids as barrier lipids. 3rd Hokkaido University-Taipei Medical University-Kyushu University Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, Japan, 2017.8.31.
4. 佐々貴之, 只木雅人, 木原章雄. 極長鎖脂肪酸 / 脂肪族アルコール含有マイバム脂質は涙液のバリア機能に必須である. 第59回日本脂質生化学会, 京都, 2017. 6. 16.
5. 只木雅人, 佐々貴之, 木原章雄. 涙液バリア形成に必須なマイバム脂質産生の分子機構の解明. 第89回日本生化学会大会, 仙台, 2016. 9. 26.
6. 只木雅人, 佐々貴之, 木原章雄. ドライアイ防止に関わるマイバム脂質の産生機構の解明. 日本生化学会北海道支部第53回支部例会, 札幌, 2016. 7. 8.
7. 佐々貴之, 平山泰佑, 原田由貴, 木原章雄. セラミド合成酵素 CERS2-6 のリン酸化による活性制御. 第58回脂質生化学会, 秋田, 2016.6.10.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
北海道大学大学院薬学研究院生化学研究室ホームページ
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。