

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08647

研究課題名(和文) 難治性皮膚疾患に関わる新規脂質関連分子の網羅的探索と機能解析

研究課題名(英文) Comprehensive and functional analysis of lipid-related molecules involved in intractable skin diseases

研究代表者

住田 隼一 (Sumida, Hayakazu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30609706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚に存在する脂質の異常が皮膚疾患の病態に関わることが多く報告されている。そこで、主要な脂質代謝酵素群であるホスホリパーゼA2(PLA2)に着目し、ヒト臨床皮膚サンプルを用いて、酵素群の発現を網羅的に探索した。結果、皮膚疾患特異的に発現が変動する酵素を複数見つけることができ、疾患マーカーや合併症との相関がみられたものもある。遺伝子欠損マウスに疾患モデルを組み合わせ、皮膚疾患の新規機序解明に取り組んでいる酵素があり、また、その代謝産物が疾患治療薬となりえる可能性をマウスで検討している酵素もある。今後は、本研究で得られた結果を新規創薬展開の基盤として、さらに研究を進展させ、臨床応用を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂質代謝関連酵素とその代謝産物が、皮膚疾患のマーカーとなるだけでなく、病態解明・新規治療薬開発へとつながる可能性が示された。これまで、皮膚疾患の病態研究や既存治療薬の多くは、免疫細胞あるいはそれらの細胞が産生するサイトカインなどをターゲットとしたものが多い。また、既存治療薬では、不応例や副作用などの問題があり、新しい作用機序に基づく新規治療薬の開発が望まれている。今回我々が注目したのは脂質であり、これまでのターゲットとは異なることから、病態の新しい機序解明につながるだけでなく、臨床応用が可能となれば、既存治療薬との併用により、高い治療効果が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Alterations in the skin lipid composition are reported to be involved in the pathology of a variety of skin diseases. Then, we focused on phospholipase A2 (PLA2), a major lipid-metabolizing enzyme group, and comprehensively investigated the expression of those enzymes with clinical human skin samples. Our analyses found that expression levels of multiple enzymes fluctuated specifically for skin diseases and correlated with disease markers and/or complications. By using genetically modified mice and animal disease models, we are successfully trying to elucidate the novel mechanism of enzymes in skin diseases. In addition, its metabolites are being investigated for potential therapeutic agents by applying them to the models. In the future, based on the results obtained during this research period, we would like to further develop this research project and lead to clinical application for skin diseases.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚 脂質 PLA2

## 1. 研究開始当初の背景

脂質は炭水化物やタンパク質とならんで三大栄養素とされ、エネルギー源となるだけでなく、細胞膜の主要構成成分、情報伝達物質としても働く。皮膚に大量に存在する脂質の役割は多岐にわたっており、例えば表皮角化細胞においては、セラミドに代表される角質細胞間脂質が、生体内からの水分蒸散や外界の病原体や異物に対する防御としての役割を果たしている。これら皮膚に存在する脂質の異常がアトピー性皮膚炎をはじめとする皮膚疾患の病態に関与することが多く報告されている。脂質代謝に関わる酵素は多く存在するが、その中でも、Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) は、膜リン脂質から脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素の一群であり、脂質メディエーター産生などにおいて重要とされる。PLA<sub>2</sub> 酵素群には、30 種類以上の分子種があるが、基質や産物が不明であるものも多く、わかっていたとしても、皮膚疾患における役割が不明なものも多い。

## 2. 研究の目的

皮膚の脂質異常がアトピー性皮膚炎など皮膚疾患の病態に関与することを示唆する報告がなされてきている。しかしながら、PLA<sub>2</sub> ファミリーを中心とする脂質代謝酵素群がそれらにどのように関わるかは不明な点が多い。そこで、本研究では、まず、ヒト臨床サンプルを用いて、ヒト皮膚免疫関連疾患に関わる新たな脂質代謝関連分子の発現を網羅的に探索することで、疾患におけるその重要性を推察する。疾患への関与が示唆されるデータが得られれば、その分子の疾患病態における役割を疾患モデルマウスや遺伝子改変マウス、*in vitro* の実験などを駆使することで、詳細に病態メカニズムを解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 臨床検体を用いた脂質代謝関連酵素の網羅的発現解析

倫理委員会の承認を取得後、患者に説明、同意、署名を得て研究を実施した。全身性強皮症、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、皮膚 T 細胞性リンパ腫の診断のために施行した皮膚生検組織、皮膚良性腫瘍切除標本辺縁の健常皮膚組織を用いて、脂質代謝関連分子(特に PLA<sub>2</sub> 酵素群)の発現の違いを検討した。臨床検体は、皮膚凍結組織片として保存した。mRNA を抽出し、それをテンプレートとして、逆転写反応を行い、cDNA を得た。定量 PCR 法にて各遺伝子の mRNA 発現量を病変部と非病変部あるいは健常皮膚とで比較することを網羅的に実施した。

### 皮膚疾患関連マーカーと皮膚病変における脂質関連分子発現との相関解析

各皮膚疾患には、病態の特徴と関連のある合併症や疾患マーカーが存在する。例えば、アトピー性皮膚炎では、臨床的にその重症度を評価するマーカーとして、血清 TARC (thymus and activation-regulated chemokine, CCL17) 値、血清 IgE 値、末梢血好酸球数などが知られている。そこで、先述の網羅的発現解析により疾患特異的に発現上昇や低下が皮膚でみられた脂質関連分子が、これら各疾患マーカーと相関するかを追加で検討した。また、一部の酵素については、その血清中の濃度を ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) にて測定し、例えば、全身性強皮症では、皮膚硬化の程度(スキンスコア)との相関や合併症の有無との関係について検討を行った。

### 臨床検体を用いた発現局在解析

上記の発現網羅的解析では、皮膚全体のサンプルを用いて、発現解析を行っているため、注目する各分子が、どういった細胞種に発現しているのか、発現の分布・局在について調べた。特異的な抗体があるものについては、組織切片を用いた免疫組織化学染色法を実施した。

### マウスを用いた *in vivo* 表現型解析

解析・注目すべき分子については、遺伝子欠損(KO)マウスを入手し、野生型と KO マウスに、ブレオマイシン誘発性強皮症モデル、MC903 塗布誘導アトピー性皮膚炎モデル、イミキモド誘発性乾癬様皮膚炎モデル等を実施し、時系列に沿って詳細に解析、表現型に差がないかを検討した。具体的には、炎症のスコア化、皮膚組織から単離した各種細胞を用いた flow cytometry による免疫細胞の population についての検討などを行った。なお、実験動物の取り扱いについては、動物倫理規定に従い、実験計画については、所属機関の承認を得た。

## 4. 研究成果

### 脂質代謝関連酵素の網羅的発現解析

皮膚組織を用いて網羅的発現解析を実施した。これまでに 29 種類の脂質代謝関連分子(特に PLA2 酵素群)の発現の違いを網羅的に検討した。結果、いくつかの分子にて、皮膚疾患特異的な脂質関連分子の発現変化を見出すことに成功した(図 1)。現在特許申請を検討しているため、具体的な酵素名を記載することが難しいが、アトピー性皮膚炎では、酵素 A、酵素 B、酵素 C の発現上昇が、酵素 D や酵素 E では発現低下がみられた。また、乾癬皮膚においては、酵素 A が上昇しており、全身性強皮症においては、酵素 B の上昇、酵素 D や酵素 F の低下などがみられた。このように、各酵素の発現は、疾患間で共通あるいは異なった発現変動を示しており、これらの酵素が皮膚特異的・疾患特異的な機序で病態に関わっている可能性を示唆している。

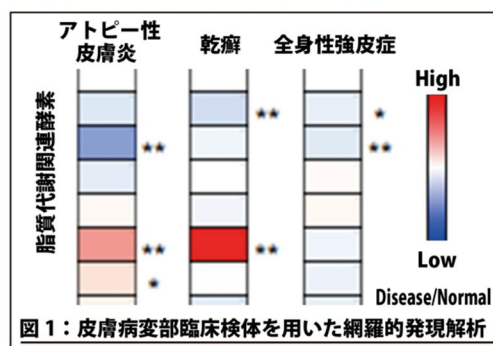


図 1：皮膚病変部臨床検体を用いた網羅的発現解析

### 脂質代謝関連酵素のバイオマーカーとしての可能性

皮膚疾患の皮膚病変部において発現変動がみられた酵素について、各酵素が疾患マーカーと相関するかについて検討を行った。例えば、酵素 C は、アトピー性皮膚炎皮膚で発現上昇がみられるが、これは、血清 TARC 値と正の相関を示した(図 2)。また、酵素 B については、患者血清を用いた検討も追加で行ったが、全身性強皮症の皮膚硬化の程度(スキンスコア)と相関することがわかっている。今後、検体数を増やして、各疾患における既存のバイオマーカーや合併症との相関関係について検討を加え、各酵素の新規バイオマーカーとしての可能性について検討を加える。

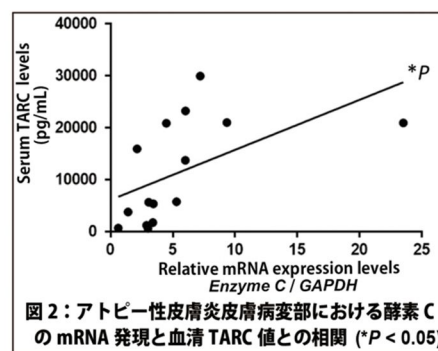


図 2：アトピー性皮膚炎皮膚病変部における酵素 C の mRNA 発現と血清 TARC 値との相関 (\*P < 0.05)

### 遺伝子改変マウスを用いた皮膚疾患における各酵素の機能解析

アトピー性皮膚炎皮膚病変部において、酵素 E が低下していることが明らかとなった。そこで、まず免疫組織染色により酵素 E が脂腺に高発現していることを確認した。次に、酵素 E の KO マウスを入手し、MC903 塗布誘導アトピー性皮膚炎モデルを実施したところ、KO マウスでは野生型マウスと比較して炎症としての皮膚肥厚や好酸球浸潤の増加、さらには、経皮水分蒸散量の増加がみられた。これらのことから、酵素 E がアトピー性皮膚炎の病態に抑制的に働いている可能性が示唆されている。KO マウスの解析を継続すると同時に、酵素 E が脂腺に発現していることを鑑み、脂腺細胞株を用いた検討も展開する予定である。

酵素 F については、全身性強皮症皮膚病変部において低下がみられたが、酵素 F の KO マウスを用いてプレオマイシン誘発性強皮症モデルを実施したところ、野生型と比較して、KO マウスでは、皮膚硬化の増悪がみられており、酵素 F が皮膚の線維化抑制に寄与している可能性が示唆された。こちらについても詳細な機序解明を継続している。

### 今後の計画と展望

以上は、結果の一部であるが、皮膚臨床検体を用いて、脂質代謝関連酵素の網羅的発現解析により、解析対象とすべき候補も選定できている。また、実際にその一部については、遺伝子改変マウスを用いて解析が開始できている。今後は、より詳細な検討を行い、皮膚疾患に関わる脂質関連分子の新規機序解明を目指す。本研究により得られた結果は将来、皮膚疾患制御に関する PLA<sub>2</sub>ファミリーを起点とした脂質代謝マップの創成、脂質経路を応用した新規創薬展開につながる可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 住田隼一
2. 発表標題 皮膚疾患における新規脂質代謝関連分子の役割
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東鷹美、武富芳隆、住田隼一、佐藤伸一、平林哲也、村上誠
2. 発表標題 皮膚の恒常性に関わる新規脂質代謝酵素の同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東鷹美、武富芳隆、住田隼一、七野成乃、佐藤伸一、松島綱治、平林哲也、村上誠
2. 発表標題 皮膚の線維化抑制に関わる新規脂質代謝酵素の同定
3. 学会等名 第143回日本薬学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 伸一  (Sato Shinichi)  (20215792)	東京大学・医学部附属病院・教授    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	武富 芳隆  (Taketomi Yoshitaka)  (40365804)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師     (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関