

令和元年6月11日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15452

研究課題名(和文)皮膚恒常性に関わる脂質代謝系の包括的理解を目指した網羅的メタボローム解析

研究課題名(英文)Global understanding of the lipid metabolic network involved in skin homeostasis

研究代表者

永沼 達郎(Naganuma, Tatsuro)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：60779619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚の恒常性は多種多様な脂質分子によって制御されており、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患の発症には脂質代謝異常に関わる可能性がある。疾患発症と脂質代謝異常との因果関係を明らかにするには、皮膚症状を呈する前から継時的に脂質組成を解析する必要がある。また、皮膚の恒常性維持に関わる多彩な脂質分子を包括的に捉えることも肝要である。本研究では、LC-MS/MSを用いた網羅的メタボローム解析技術を用いてアトピー性皮膚炎モデルマウスに適用し、病態の進行に伴う脂質代謝変化を継時的かつ包括的に捉えることで、疾患発症に先立って特定のセラミド代謝系に異常を生じていることを見出し、アトピー発症の原因となる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚疾患と脂質代謝に関する研究は、その多くが疾患発症後の脂質組成に着目されていた。例えば、アトピー性皮膚炎患者の患部において、セラミドが減少することは古くから知られている。しかし、アトピー発症後では多種のセラミドが一斉に減少していることから、病態と関連する分子の特定はされていない。また、セラミドの減少が疾患発症の原因なのか副次的な結果なのかを区別することが難しい。本研究では、症状の発症前において既にセラミドの中でも炭素鎖が長いNDSセラミドが特徴的に減少していることを見出し、アトピー発症の原因となる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Varieties of the lipid molecules are involved in the maintenance of skin homeostasis, and disrupted lipid metabolisms are shown in patients of cutaneous disorders. To clarify the disease pathogenesis of dermatitis, it's important to capture the comprehensive lipidome profile in the course of disease onset and progression. In the present study, we performed lipidomic analyses using LC-MS/MS in atopic dermatitis model mouse. As a results, we found significant reductions in NDS ceramide and DHS levels in the early phase of disease onset, suggesting that abnormal ceramide metabolism cause disrupted ceramide balances and might be responsible for the pathogenesis of atopic dermatitis.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リポミクス メタボローム解析 質量分析 アトピー性皮膚炎 皮膚

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、病原体やアレルゲンの侵入を防ぐバリア機能、侵入した異物に対する免疫システム、損傷を受けた際の修復機構、外気温や物理的・化学的刺激を感知するセンシングシステムを備えており、生体恒常性の維持に不可欠な組織である。皮膚がもつこれらの機構は、多種多様な脂質分子が独自の機能を発揮することで維持されている。そのため、脂質代謝バランスに異常を生じると様々な皮膚疾患の発症につながると考えられる。実際、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患患者の皮膚において、疾患発症に伴い脂質バランスが大きく変化していることが報告されており、皮膚疾患発症の陰には何らかの脂質代謝異常が原因として潜んでいると推察される。しかし、これまでの研究では疾患発症後の脂質組成に着目されていたため、脂質代謝異常が疾患発症の原因なのか、それとも発症して副次的に生じるものなのか、区別がついていなかった。また、疾患発症後では、異常を生じる脂質代謝系が多岐にわたっており、どの脂質代謝物が病態と関連するのか明確でなかった。

2. 研究の目的

本研究では、(i)そもそも脂質代謝異常が皮膚疾患発症前から生じているのか、(ii)どの脂質代謝系の異常が疾患発症に関与するのか、(iii)どのようなメカニズムで脂質代謝異常を生じるのか、(iv)どのようなメカニズムで疾患発症につながるのか、以上4点を明らかにすることで、皮膚疾患の病態メカニズムに潜む脂質代謝系の発見とその病態メカニズムの分子レベルでの解明することを目的とした。さらに、皮膚の恒常性を制御する新たな脂質代謝系の発見も同時に目指した。(図1)

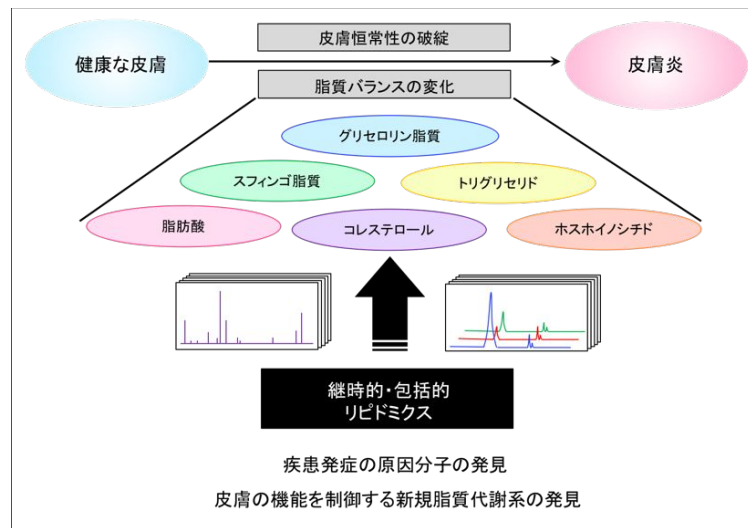


図1: 本研究の概要

3. 研究の方法

(1) 上記の課題を解決するためには、皮膚疾患の発症前から継続的かつ包括的に脂質組成を解析し、病態進行の各段階における脂質組成の異常と症状・表現型とを紐付ける必要がある。そこで本研究では、皮膚に存在する多彩な脂質分子を網羅的に解析するために、LC-MS/MS を利用したターゲット質量分析とノンターゲット質量分析を組み合わせる、マルチリポミクスを研究の戦略基盤とした。ターゲット解析は特定の脂質分子を選択的かつ高感度に検出する一方、ノンターゲット解析は標的分子を特定せず網羅的に検出することができる。これらの2つの分析技術を組み合わせることで、セラミドなど既知の脂質分子はもちろん、存在量の少ないエイコサノイドなどの脂質メディエーターや、これまで想定されていない未知の脂質分子も含めて分析することができる。

(2) 包括的・継続的リポミクスを適用するモデルとして、アトピー性皮膚炎自然発症モデル Spade (Stepwise Progressive Atopic Dermatitis: *J Clin Invest.* 2016, 126(6)) を用いた。Spade では、*Jak1* 遺伝子の点変異により *Jak1* が恒常的に活性化することでアトピー性皮膚炎を自然発症する。およそ4週齢で皮膚バリア機能の低下、およそ6-8週齢で感覚神経C線維の表皮への伸長や顆粒球の浸潤、8週齢以降から痒みや発赤などの皮膚炎症状を呈することから、継続的な表現型変化と脂質変動とを結びつけることができるモデルである。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスおよび Spade の生後0日、4週齢、8週齢、10週齢のタイムポイントで皮膚組織を採取し、脂質を抽出してQ-TOF型LC-MS/MSによるノンターゲット解析を行った。その結果、合計5000種を超える分子が検出された。これらの分子について、MS-DIALによるピークアライメントおよびアノテーションを行った結果、図2に示すような代謝物計745分子を一斉同定することに成功した。さらに、ターゲット解析により炎症・抗炎症性脂質メディエーターを含む脂肪酸代謝物を113種類一斉同定・定量し、ノンターゲット解析と合わせて計858分子種の脂質を解析した。以上、皮膚組織にマルチリポミクスの系を適用し、皮膚の脂質分子の包

括的解析の基盤を構築した。

(2) ノンターゲット解析で同定した全ての代謝物について、Spade と野生型マウスとのシグナル強度値の比を算出し、log₂ fold change としてヒートマップで示した(図3)。その結果、アトピー性皮膚炎様症状の発症後(8, 10週齢)では、様々な脂質分子種に変化が認められることが明らかとなった。そのうち、アトピー性皮膚炎患者において減少していることが報告されているセラミド分子種が、Spade においても減少していることが確認され、モデルの妥当性が示された。さらに興味深いことに、アトピー症状を発症する

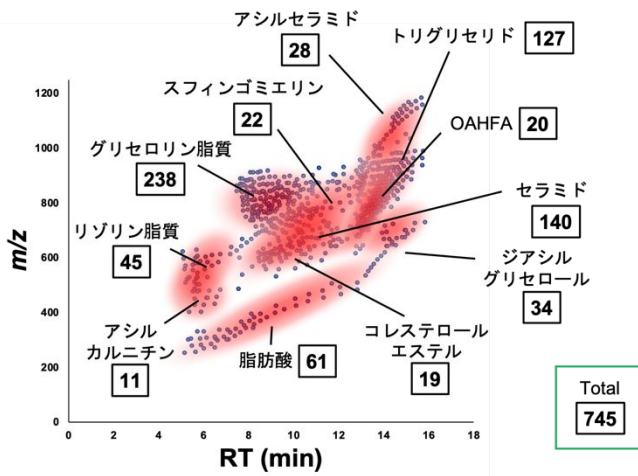


図2: 皮膚組織のノンターゲット解析により同定した脂質分子種

前の4週齢の段階で既にある特定のセラミド分子種に顕著な変化が認められることが明らかとなった。これらの脂質代謝異常は、疾患発症の原因となる可能性がある。セラミドは、脂肪酸と長鎖塩基がアミド結合により縮合した構造であり、脂肪酸と長鎖塩基の組み合わせにより多種に分類される。ボルケーノプロットにより、4週齢における脂質の変動の大きさと確からしさをプロットしたところ、セラミドの中でも、NDSセラミドやADSセラミドといった、ジヒドロスフィンゴシン(DHS)を含むセラミド種が選択的に減少していることが明らかとなった。同時に、NDSやADSの前駆体であるDHSも顕著かつ有意に減少していた。さらに、SpadeではNDSセラミドの中でも特に脂肪酸の炭素数22以上のものが選択的に減少していることが明らかとなった。以上より、Spadeでは、Jak1の恒常的活性化により、何らかのメカニズムを介してアトピー発症前からNDS/DHSセラミド代謝系に異常を生じていることが明らかとなった。セラミドは皮膚バリア機能に不可欠であることから、アトピー発症に先立つ皮膚バリア機能の低下とNDS-DHS代謝異常との関連が示唆された。また、ターゲット解析の結果では、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸がそれぞれジヒドロキシ化された代謝物である8,15-diHETE, 8,15-diHEPE, 10,17-diHDHAが8週齢のSpadeにおいて3倍以上に上昇することを見出した。セラミドは皮膚バリア機能に不可欠であること、8,15-diHETEは好酸球の遊走活性や感覚神経C線維の感受性を上昇させることが報告されており、Spadeにおけるバリア能低下、顆粒球浸潤、痒みなどの表現型との関連が示唆された。

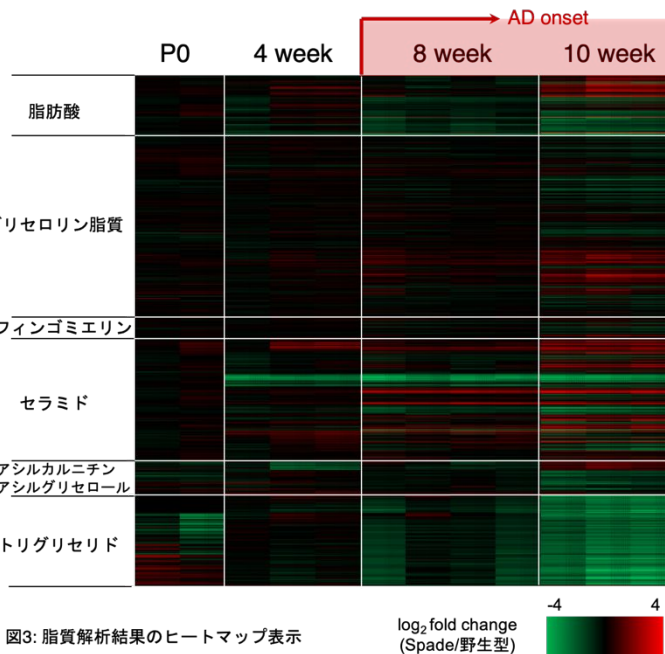


図3: 脂質解析結果のヒートマップ表示

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Honda Y., Kitamura T., Naganuma T., Abe T., Ohno Y., Sassa T., Kihara A.
Decreased Skin Barrier Lipid Acylceramide and Differentiation-Dependent Gene Expression in Ichthyosis Gene Nipal4-Knockout Mice
Journal of Investigative Dermatology 138(4) 741-749 2018 (査読あり)

永沼達郎, 有田誠
脂肪酸クオリティと炎症・アレルギーの制御
炎症と免疫 25(4) 265-270 2017 (査読なし)

〔学会発表〕(計4件)

永沼達郎, 飯野雄大, 有田誠

皮膚の網羅的リポドミクスと疾患モデルへの適用

第11回セラミド研究会学術集会 2018年10月26日(招待講演)

Tatsuro Naganuma, Yudai Iino, Makoto Arita

Untargeted analysis of skin lipid profiles in the development of dermatitis

Japan-Korea Joint Lipid Symposium 2018年9月14日(口頭発表)

飯野雄大, 永沼達郎, 有田誠

アトピー性皮膚炎マウスにおける脂質代謝異常の網羅的解析

第17回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2018 2018年9月1日(口頭発表)

飯野雄大, 永沼達郎, 有田誠

アトピー性皮膚炎発症に関わる脂質代謝系の網羅的メタボローム解析

第60回日本脂質生化学会 2018年5月31日(口頭発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://keio-pha-pcm.jp>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。