

令和元年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05589

研究課題名(和文) アシルセラミドによる皮膚バリア形成の分子メカニズムと病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of skin barrier formation by acylceramide.

研究代表者

大野 祐介 (Ohno, Yusuke)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50611498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：アシルセラミドは皮膚バリア形成に必須の脂質であるが、その合成経路は不明であった。アシルセラミド合成不全は皮膚疾患である魚鱗癬を引き起こし、種々の魚鱗癬原因遺伝子が同定されているが、その機能やおよび遺伝子変異による魚鱗癬発症メカニズムには不明な点が多い。本研究では、アシルセラミド合成経路を明らかにし、CYP4F22、ACSVL4、PNPLA1の3種のいずれも機能未知の酵素がアシルセラミド合成経路に関与することを見出した。さらに魚鱗癬原因遺伝子NIPAL4変異による魚鱗癬はMg²⁺取り込み異常に起因するアシルセラミド合成関連酵素などの遺伝子発現異常により引き起こされることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アシルセラミド量の減少は皮膚バリア機能の低下を引き起こす。皮膚バリアの低下によりアレルゲンや病原体の侵入が容易になるため、アシルセラミド量の減少は魚鱗癬のみならずアトピー性皮膚炎の増悪や感染症のリスク上昇につながる。本研究は皮膚バリア脂質であるアシルセラミドの産生経路を世界で初めて明らかにし、この成果は皮膚バリア機能低下に起因する様々な疾患の治療薬、治療法の開発の重要な糸口となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although acylceramide is an essential lipid for skin barrier formation, the pathway of acylceramide synthesis has not been elucidated. Impairment of acylceramide production causes a skin disorder ichthyosis, and several ichthyosis causative genes have been identified. Among them, there exists many genes with unknown function, and the molecular mechanism of the pathogenesis caused by gene mutation remain poorly understood. In this research project, we elucidated the acylceramide synthetic pathway and demonstrated that CYP4F22, ACSVL4 and PNPLA1, enzymes with unknown functions, are involved in the acylceramide synthesis. Furthermore, we revealed that NIPAL4 gene mutations result in aberrant gene expressions including acylceramide synthesis-related enzymes due to decreased Mg²⁺ uptake, leading to pathogenesis of ichthyosis.

研究分野：脂質生化学

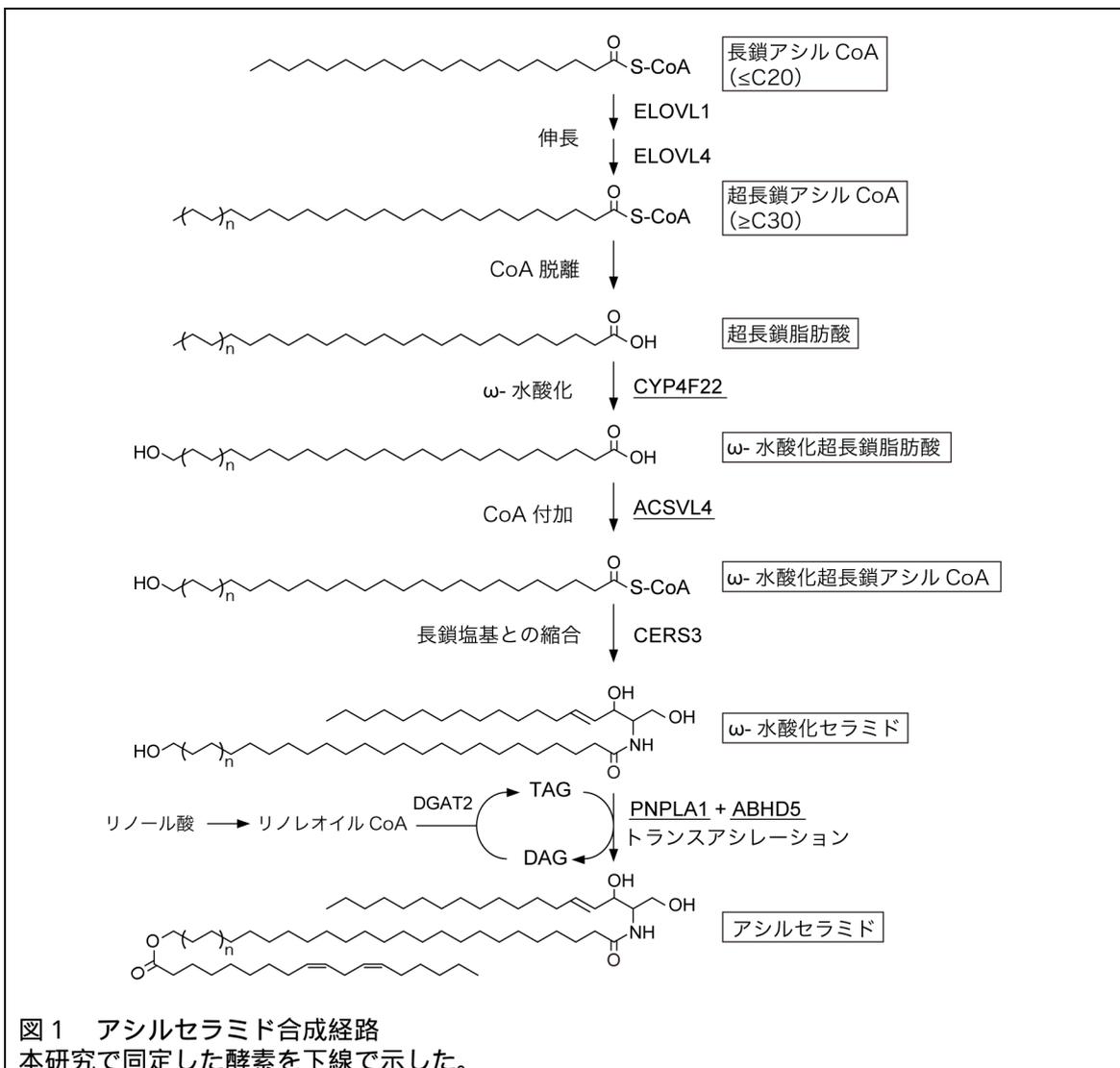
キーワード：アシルセラミド セラミド スフィンゴ脂質 脂肪酸 魚鱗癬 アトピー性皮膚炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アシルセラミドは表皮特異的に存在するセラミド分子種の一つであり、皮膚のバリア機能に必須である。アシルセラミド量の顕著な減少は、皮膚疾患の一つである先天性魚鱗癬を引き起こし、皮膚バリア機能を大きく低下させる。また、アトピー性皮膚炎患者におけるアシルセラミド量の軽微な低下も認められている。セラミドはスフィンゴ脂質の基本構造であり、長鎖塩基のアミノ基に脂肪酸が結合した構造をもち、全ての組織に存在する。アシルセラミドは、セラミドの脂肪酸鎖の ω 末端にリノール酸が結合した構造を持ち、脂肪酸鎖が他の組織に比べて非常に長い(炭素数(C) 30以上)という特徴を有している。アシルセラミドは1980年代に発見され、構造決定がなされたが、合成経路は長年不明であった。申請者は、本研究開始前までアシルセラミドは、C30以上のアシル CoA の合成、アシル CoA の脂肪酸への変換 (CoA 脱離)、脂肪酸の ω 位の水酸化、 ω 水酸化脂肪酸の ω 水酸化アシル CoA への活性化、 ω 水酸化アシル CoA と長鎖塩基の縮合 (ω 水酸化セラミドの合成)、セラミド-O-アシルトランスフェラーゼによる ω 水酸化セラミドへのリノール酸の付加の反応を経て合成されることを示唆していた(図1)。しかし、これらの各反応を担う酵素すべての同定には至っておらず、皮膚バリア脂質であるアシルセラミド合成の分子メカニズム、すなわち皮膚バリア形成の分子メカニズムは明らかになっていなかった。

皮膚のバリア形成異常を生じる魚鱗癬原因遺伝子あるいはノックアウトの表現型が皮膚バリア形成異常を示す遺伝子は多数報告されている (CYP4F22, ALDH3A2, ICHTHYIN, PNPLA1, DGAT2, ACSVL4, ABHD5 等)。しかし、これらの遺伝子産物の多くは機能が明らかになっておらず、遺伝子変異が皮膚バリア異常および魚鱗癬の病態の発症メカニズムには不明な点が多く残されていた。



2. 研究の目的

本研究では、下記の2項目を目的として解析を行なった。(1) 我々が提唱していたアシルセラミドの産生に至る経路の証明とその各反応を担う酵素の同定、(2) ヒトの魚鱗癬原因遺伝子あるいは遺伝子欠損により皮膚バリア形成異常を示すマウス遺伝子とアシルセラミド合成、皮膚

バリア形成との関連性の解明。

3. 研究の方法

(1) 細胞を用いた ω 水酸化セラミドおよびアシルセラミド合成解析

HEK 293T 細胞に脂肪酸伸長酵素 ELOVL4, セラミド合成酵素 CERS3 および ω 水酸化セラミド合成に関与が予想されたシトクロム P450 4F ファミリータンパク質を過剰発現させ, [3H]スフィンゴシントレーサー実験および質量分析解析により, ω 水酸化セラミド産生量を調べた。また, アシルセラミド合成酵素の同定には, ELOVL4, CERS3, CYP4F22 に加え, アシルトランスフェラーゼ候補タンパク質を HEK 293T 細胞に共過剰発現させた同様の実験系を用い, アシルセラミド産生量を調べた。また, レンチウィルスを用いてヒト由来初代培養ケラチノサイトの各種遺伝子をノックダウンし, 脂質解析を行なった。

(2) アシルセラミド合成活性の *In vitro* 解析

小麦無細胞翻訳系を用いて PNPLA1 を組み込んだプロテオリボソームの作製, 精製を行った。リボソームには パルミトイルオレオイルホスファチジルコリンに ω 水酸化セラミド (C30:0), トリリノレインまたはリノレオイル CoA を各種混合したものをを用いた。反応は 37°C で 1 時間行い, 脂質抽出後, 質量分析計でアシルセラミドの定量を行なった。

(3) ノックアウトマウス (KO) の作製と解析

Nipal4 ノックアウトマウスを, ES 細胞を用いた相同組換え法により作製した。*Acsvl4* KO マウスを CRISPR/Cas9 システムにより作製した。マウスの皮膚解析として, 皮膚バリア機能解析(経皮水分蒸散量の測定, トルイジンプルーアッセイ), 形態学的解析(光学顕微鏡(HE染色)および電子顕微鏡観察), 質量分析計による脂質解析を行なった。

4. 研究成果

(1) ω 水酸化脂肪酸合成酵素の同定

これまでアシルセラミドの合成経路における ω 水酸化酵素は, 未同定であった。本研究においてシトクロム P450 ファミリータンパク質のひとつ CYP4F22 が C28 以上の極長鎖脂肪酸の ω 水酸化反応を担う酵素であることを, 細胞を用いたアッセイ, 膜画分を用いた *in vitro* の活性解析により明らかにした。*CYP4F22* 遺伝子変異は魚鱗癬原因遺伝子として知られている。魚鱗癬患者で同定されている *CYP4F22* 変異体では ω 水酸化活性が大きく低下していることを見出した。さらに *CYP4F22* 遺伝子変異患者の表皮の脂質解析により, 患者表皮ではアシルセラミド量が大きく低下していることを明らかにした。

(2) セラミドトランスアシラーゼの同定

アシルセラミド合成の最後の反応ステップである ω 水酸化セラミドへのリノール酸の付加反応に関与することを, 細胞を用いたアッセイにより明らかにした。さらにプロテオリボソームを用いた *in vitro* の活性解析により, PNPLA1 は基質としてリノレオイル CoA を用いるのではなくリノール酸を持つトリグリセリドのリノール酸鎖を ω 水酸化セラミドへ直接転移させることでアシルセラミド合成を行なうトランスアシラーゼであることを証明した。PNPLA1 の魚鱗癬変異体ではアシルセラミド合成活性が顕著に低下することを見出した。

(3) アシルセラミド合成補助因子としての ABHD5 に機能解明

ABHD5 は魚鱗癬症候群(ドルフマン・シャナリン症候群)の原因遺伝子として同定され, *ATGL/PNPLA2* によるトリグリセリド分解を活性化する因子として知られているが, 魚鱗癬症の分子メカニズムは不明であった。本研究では, *ABHD5* は *PNPLA1* によるアシルセラミド合成を上昇させることを見出した。さらにアシルセラミド合成促進の分子メカニズムとして *ABHD5* が *PNPLA1* の脂肪滴への移行を上昇させる, つまり *PNPLA1* の基質(トリグリセリド)へのアクセスを促進するためであることを明らかにした。

(4) 魚鱗癬原因遺伝子 *NIPAL4* の機能解明

NIPAL4 は先天性潜性魚鱗癬の原因遺伝子として知られているが, *NIPAL4* の機能および魚鱗癬発症メカニズムは不明であった。本研究では, *Nipal4* KO マウスを作製し, 皮膚バリア機能解析, 形態学的解析, 脂質組成を行なった。*Nipal4* KO マウスは皮膚バリア機能の低下を伴う新生致死となった。*Nipal4* KO マウスの表皮は過角化, 角質層の脂質ラメラ構造の異常, ケラトヒアリン顆粒の縮小化がみられた。*Nipal4* KO マウスの表皮ではアシルセラミドが 50%程度まで低下し, アシルセラミド合成関連遺伝子, 分化マーカー遺伝子の発現が低下していた。また, *Nipal4* KO マウスの有棘層のケラチノサイトにおいて核内構造の変化(ヘテロクロマチン構造の発達)が認められた。*Nipal4* KO マウス由来のケラチノサイトでは文化に伴う細胞内 Mg^{2+} の増加が抑制された。これらの結果から *Nipal4* が Mg^{2+} トランスポーターとして機能し, Mg^{2+} の取り込みを介してケラチノサイトの分化に伴う遺伝子発現変動に寄与していることを明らかにした。

(5) 魚鱗癬未熟児症候群原因遺伝子 ACSVL4 の機能解明

ACSVL4 は魚鱗癬未熟児症候群 (IPS)の原因遺伝子であり, *Acsvl4* KO マウスは皮膚バリア機能の低下を示し新生致死となることが報告されている。しかし, その皮膚バリア形成異常の分子メカニズムは明らかになっていない。ACSVL4 は脂肪酸のトランスポーターとして機能することも示唆されていたため, 皮膚バリア機能異常は ACSVL4 による脂肪酸の取り込みが低下することで引き起こされるという説も考えられていたが, 本研究では, ACSVL4 がアシルセラミド合成における ω 水酸化脂肪酸の ω 水酸化アシル CoA への活性化反応を担う酵素であると推測した。*Acsvl4* KO マウスはすでに報告があったが入手できなかったため, CRISPR/Cas9 システムを用いて本研究においても作製した。本研究で作製した *Acsvl4* KO マウスも過去の報告と同様の表現型を示した。*Acsvl4* KO の表皮の詳細な脂質組成を調べたところ, *Acsvl4* KO の表皮ではアシルセラミド量が顕著に低下していた。また, ω 水酸化アシル CoA 以降の代謝物の総量 (ω 水酸化セラミド, アシルセラミド, アシルグルコシルセラミド, タンパク質結合型セラミド) が低下していた。一方, *Acsvl4* KO マウスの表皮では脂肪酸量は低下せず, むしろ増加していたため, ACSVL4 は脂肪酸トランスポーターとしての機能は持たないことが示唆された。膜画分を用いた *in vitro* の活性解析において ACSVL4 は ω 水酸化脂肪酸の CoA 付加活性を示した。これらの結果から, ACSVL4 はアシルセラミド合成経路における ω 水酸化脂肪酸を ω 水酸化アシル CoA へ変換する酵素であることを明らかにし, このことは我々が示唆していた経路 (図 1) を介してアシルセラミドが産生されることを意味している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Ohno Y, Nara A, Nakamichi S, Kihara A. Molecular mechanism of the ichthyosis pathology of Chanarin-Dorfman syndrome: stimulation of PNPLA1-catalyzed ω -O-acylceramide production by ABHD5. *J. Dermatol. Sci.*, 2018, 92, 245–253. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.11.005. 査読有.
2. 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. *J. Invest. Dermatol.*, 2017, 138, 741-749. DOI: 10.1016/j.jid.2017.11.008. 査読有.
3. Ohno Y, Elucidation of the Synthetic Mechanism of Acylceramide, an Essential Lipid for Skin Barrier Function. *Yakugaku Zasshi*, 2017, 137, 1201-1208. DOI: 10.1248/yakushi.17-00126. 査読有.
4. Takeichi T, Torrelo A, Lee JYW, Ohno Y, Lozano ML, Kihara A, Liu L, Yasuda Y, Ishikawa J, Murase T, Rodrigo AB, Fernandez-Crehuet P, Toi Y, Mellerio J, Rivera J, Vicente V, Kelsell DP, Nishimura Y, Okuno Y, Kojima D, Ogawa Y, Sugiura K, Simpson MA, McLean WHI, Akiyama M, McGrath JA. Biallelic mutations in *KDSR* disrupt ceramide synthesis and result in a spectrum of keratinization disorders associated with thrombocytopenia. *J. Invest. Dermatol.*, 2017, 137, 2344-2353. DOI: 10.1016/j.jid.2017.06.028. 査読有.
5. Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. Formation of the skin barrier lipid ω -O-acylceramide by the ichthyosis gene *PNPLA1*. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 14610. DOI: 10.1038/ncomms14610. 査読有.
6. Ohno Y, Nakamichi S, Ohkuni A, Kamiyama N, Naoe A, Tsujimura H, Yokose U, Sugiura K, Ishikawa J, Akiyama M, Kihara A. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112, 7707-7712. DOI: 10.1073/pnas.1503491112. 査読有.

[学会発表] (計 20 件)

1. Ohno Y, Kihara A. ABHD5 promotes acylceramide production by facilitating the access of PNPLA1 to lipid droplets. 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium, 2018.
2. Ohno Y, Kihara A. ABHD5 cooperates with PNPLA1 to produce acylceramides. 59th International Conference on the Bioscience of Lipids, 2018.
3. 大野祐介, 服部未来, 山本春佳, 木原章雄. 皮膚バリア脂質アシルセラミド合成におけるアシル CoA 合成酵素 ACSVL4 の機能解析. 第 60 回日本脂質生化学会, 2018.
4. Ohno Y, Kihara A. ABHD5 stimulates acylceramide synthesis by recruiting PNPLA1 to lipid droplets. Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology, 2018.
5. 大野祐介, 中路翔太, 神山望, 木原章雄. 皮膚バリア脂質アシルセラミド合成におけるトランスアシラーゼ PNPLA1 の同定と ABHD5 の関与. 第 59 回日本脂質生化学会, 2017.

6. 大野 祐介, 中路 翔太, 神山 望, 木原 章雄. 皮膚バリア脂質アシルセラミド生合成経路の
全容解明. 日本薬学会第 137 年会, 2017.
7. Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. Identification of human CYP4F22 as an
ultra-long-chain fatty acid-specific ω -hydroxylase responsible for the synthesis of acylceramide, an
essential lipid for skin permeability barrier formation. 21st International Symposium on Microsomes and
Drug Oxidations, 2016.
8. 大野 祐介. 皮膚バリア機能に必須な脂質アシルセラミドの生合成機構の解明. 日本薬学会
北海道支部第 143 回例会, 2016. (日本薬学会北海道支部奨励賞)
9. Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. Epidermal acylceramide: production mechanism and
importance in skin barrier formation. 1st Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium, 2016.
10. Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. Identification of the genes responsible for the
synthesis of acylceramide, an essential ceramide class for skin barrier formation. Gordon Research
Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology, 2016. (Poster Award)
11. 大野 祐介, 木原 章雄. 皮膚バリアを形成するアシルセラミドの合成経路解明. 第 88 回日
本生化学会大会 / 第 38 回日本分子生物学会年会合同大会, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>

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。