

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07060

研究課題名（和文）消化管バリアにおける極長鎖脂質の分布と機能の解明

研究課題名（英文）Distribution and function of very-long-chain lipids in the formation digestive duct barrier.

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：極長鎖脂質（20よりも長い炭素鎖をもつ脂質）は体表の透過性バリア形成に重要である。本研究は体表よりも広い表面積をもち、外界と接する消化管のバリア形成における極長鎖脂質の役割の解明を目的として行った。マウス消化管の脂質を質量分析法によって解析した結果、皮膚バリア形成に関わる極長鎖セラミドが口腔、食道、前胃に存在することを明らかにした。また、この極長鎖セラミドを減少させたマウスでは口腔バリア機能が低下してい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

消化管は食事、喫煙、薬物などに由来する質・量共に多様な化学物質および体表とは異なる病原体や常在細菌に晒されている。本研究では表皮にのみ存在すると考えられていたタイプの極長鎖セラミドが表皮と同じ重層扁平上皮組織である口腔、食道、前胃に存在し、口腔バリア形成に重要であることを明らかにした。極長鎖セラミドは口腔バリア疾患と関連する可能性があり、診断や治療におけるターゲットとなりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Very-long-chain lipids, which contain >C20 hydrocarbon chain(s), are important for the formation of permeability barrier on the body surface. This study was aimed at elucidating the role of very-long-chain lipids in barrier formation in the digestive tract, which have larger surface area than the body surface. Analysis of lipids in mouse digestive tract by mass spectrometry demonstrated that particular types of very-long-chain ceramides, which are involved in skin barrier, were present in the oral cavity, esophagus, and forestomach. Furthermore, we demonstrated that oral barrier was impaired in mice with reduced very-long-chain ceramides in the oral mucosa.

研究分野：脂質生物学

キーワード：セラミド バリア機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外部環境に晒されている生体を病原体や異物の侵入から守り、体内からの水分等の損失を防ぐ「生体バリア」は個体の恒常性維持の根幹を担う機能である。研究開始までに、申請者は脂質と生体バリアに関する研究を行い、極長鎖脂質が皮膚の透過性バリア形成およびドライアイを防止するための涙液バリア形成に必須であることを *Elovl1* 遺伝子改変マウスの解析によって明らかにしている。このように、生体バリアのうち、体表バリアの形成に関与する脂質は明らかになったが、消化管バリア形成における脂質の役割は明らかにされていなかった。最近、脂肪酸伸長酵素をコードする *ELOVL1* 遺伝子の変異患者について口腔から食道の異常を示唆する所見が報告されており、極長鎖脂質が体表のみならず消化管バリアの形成にも関与している可能性が出てきたため、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

口腔に始まる消化管は食事、喫煙、薬物などに由来する質・量共に多様な化学物質および体表とは異なる病原体や常在細菌に晒されている。また、消化管は部位によって組織学的にも生理学的にも異なる特徴を示す。本研究では、消化管においてバリア機能に関わる脂質を明らかにすることを目的とした。特に極長鎖脂質に着目し、消化管にはどのような極長鎖脂質が存在するのかをまず明らかにし、さらに、そのバリア機能における役割を独自の研究材料である *Elovl1* 遺伝子改変マウスを用いて解明することを目指した。また、皮膚バリア形成不全を示す先天性魚鱗癬患者の角質層サンプルの質量分析を用いた詳細な解析を行い、遺伝子変異が角質層のセラミド組成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスの消化管を口腔粘膜、食道、胃、小腸、大腸に区分し、それぞれの組織から脂質を抽出した。極長鎖脂肪酸はスフィンゴ脂質に豊富に含まれるため、その基本骨格であるセラミドを質量分析により解析した。セラミドを構成する長鎖塩基と脂肪酸には二重結合や水酸基の数および位置の異なるタイプが存在し、それらの組み合わせにより数百以上のセラミド分子種が存在する。本研究では、これらのうち、特に皮膚バリア形成に関わる極長鎖セラミドを中心に質量分析を用いて解析した。また、上述の組織(口腔粘膜、食道、胃、小腸、大腸)から RNA を抽出し、極長鎖セラミド合成に関わる一連の酵素について遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法によって測定した。

(2) 極長鎖セラミドを構成する極長鎖脂肪酸の合成に関わる脂肪酸伸長酵素遺伝子 *ELOVL1* を *Cre-loxP* 系を用いて消化管で条件的欠損させた *Elovl1* コンディショナルノックアウトマウス (*Elovl1* cKO マウス) を作製した。*Elovl1* を消化管で欠損させるため、口腔～食道～前胃の粘膜上皮組織で発現するプロモーターの制御下で *Cre* を発現するトランスジェニックマウスを作製し、*Elovl1* *fllox* マウスとの交配により、*Elovl1* cKO マウスを得た。*Elovl1* cKO マウスの消化管に存在するセラミドを質量分析により解析し、*Elovl1* 欠損とセラミドの鎖長変化や極長鎖セラミド量との関係を調べた。極長鎖セラミドの消化管バリア機能における役割を明らかにするため、*Elovl1* cKO マウスの口腔バリア機能を色素の浸透性を指標として解析した。さらに、*Elovl1* cKO マウスの口腔バリア機能を個体レベルで行動学的に評価した。

(3) セラミド合成酵素のアイソザイムの1つである *CERS3* は極長鎖セラミド合成に重要である。*CERS3* の遺伝子変異は先天性魚鱗癬を引き起こすことが知られているが、*CERS3* 変異をもつ先天性魚鱗癬患者の角質層の詳細なセラミド組成やその健常者との違いはほとんど明らかにされていなかった。本研究では新規 *CERS3* 変異をもつ先天性患者について、*CERS3* 変異体の酵素活性測定およびテープストリップ法により採取した患者角質層セラミドの質量分析を用いた詳細な解析を行なった。

4. 研究成果

(1) これまで表皮特異的に存在し、皮膚バリア形成に関わると考えられていた極長鎖セラミドがマウスの口腔、食道、胃に存在することを明らかにした。一方、この極長鎖セラミドは小腸と大腸には存在しなかった。口腔粘膜、食道、胃の一部である前胃の粘膜上皮組織は表皮と同じ重層扁平上皮であることから、これらの極長鎖セラミドクラスは重層扁平上皮組織において広く合成されることが示唆された。このことと一致して、これらの極長鎖セラミドクラスの合成に特化した酵素の遺伝子は表皮のみならず口腔粘膜、食道、胃にも発現し、小腸と大腸ではほとんど発現していなかった。本研究により、皮膚バリア形成に関わる極長鎖セラミドの消化管における存在が明らかになり、これまで表皮特異的であると考えられていた極長鎖セラミドの組織分布が更新された。

(2) 極長鎖セラミドに含まれる極長鎖脂肪酸の合成に関わる脂肪酸伸長酵素遺伝子 *Elovl1* を口腔～食道～前胃で欠損させた *Elovl1* コンディショナルノックアウトマウス (*Elovl1* cKO マウス) を作製した。*Elovl1* cKO マウスの口腔および食道のセラミドを質量分析により解析した結果、セラミドに含まれる脂肪酸の炭素鎖が短くなっており、皮膚バリア形成に関わる極長鎖セラミドが大きく減少していた。*Elovl1* cKO マウスの口腔バリア機能を色素の浸透性で評価した結果、*Elovl1* cKO マウスでは色素の浸透性が高く、バリア機能の低下が見られた。また、飲水に刺激物質を加え、飲水量の変化(減少)を指標としてバリア機能を間接的に評価した結果、*Elovl1* cKO マウスではコントロールマウスよりも飲水量が顕著に減少したことから、バリア機能の低下が裏付けられた。これらの結果から、*Elovl1* が産生に関わる極長鎖セラミドが口腔バリア機能に重要であることが明らかとなった。

(3) セラミド合成酵素遺伝子 *CERS3* の変異は皮膚バリア機能低下疾患である先天性魚鱗癬を引き起こす。しかし、*CERS3* 変異をもつ魚鱗癬患者の詳細なセラミド組成変化はほとんど明らかにされていなかった。本研究では *CERS3* に新規変異と既知の変異を複合ヘテロ接合型にもつ先天性魚鱗癬患者の解析を行なった。新規変異の *CERS3* 変異体は活性を消失していた。これはこの変異がナンセンス突然変異であり、セラミド合成酵素活性に重要なモチーフを欠くことと一致していた。一方、既知の変異はミスセンス突然変異であり、変異としては報告されていたものの、酵素活性は測定されていなかった。このミスセンス *CERS3* 変異体の酵素活性を測定した結果、活性は野生型の 56% であった。したがって、患者では *CERS3* 活性は消失しておらず、一部活性が残っていることが示唆された。

次に、患者角質層の詳細なセラミド組成を解析した。皮膚バリア形成には2つの極長鎖セラミドクラスが重要であり、これらは1つの極長鎖セラミドクラスの一部が代謝されることによってもう1つの極長鎖セラミドクラスが産生されるという一方向性の代謝関係にある。解析の結果、本研究の患者では上流の極長鎖セラミドクラス量が大きく減少していたにも関わらず、下流の極長鎖セラミドクラス量はほとんど変化していなかった。この結果から、2つの極長鎖セラミドクラスの量は必ずしも相関しないことが明らかになった。酵素活性が完全に消失した場合は2つの極長鎖セラミドクラスは共に消失すると考えられるが、本研究のように、一部活性が残っているケースの解析により、2つの極長鎖セラミド量の関係について新たな知見が得られた。このことから、1つの遺伝子について、酵素活性の残存の程度が異なる複数の患者から得られたサンプルを測定することの重要性が示された。また、本研究の患者のその他のセラミドクラスについても特定のクラスの増加あるいは減少が見られ、*CERS3* の角質層セラミド組成における役割が明らかになった。

上述の2つの極長鎖セラミドクラスのうち、下流の極長鎖セラミドクラスの合成経路については、これまでに提唱されて広く受け入れられている経路に加えて新たな経路が提唱されるなど、結論が出ていない状況にある。2つの提唱されている経路のうち、前者の経路に関与する酵素の候補としてトランスグルタミナーゼ1 (TGM1) が提唱されている。しかし、TGM1 の役割について、生体レベルでの検証は行われていなかった。本研究では、*Tgm1* ノックアウトマウスの表皮中の2つの極長鎖セラミドクラスを質量分析によって解析し、下流の極長鎖セラミドクラス合成における TGM1 の役割を明らかにすることを試みた。その結果、*Tgm1* ノックアウトマウスの表皮では下流の極長鎖セラミドクラス量が野生型に対して約 40% の減少を示した。しかし、下流の極長鎖セラミドの前駆体である上流の極長鎖セラミドクラス量は増加しているとの予想に反して増加しておらず、むしろ約 20% 減少していた。したがって、TGM1 が上流の極長鎖セラミドクラスから下流の極長鎖セラミドクラスへの代謝に直接的に関与するとの結論には至らず、TGM1 の主要な役割である周辺帯の形成への影響が間接的に下流の極長鎖セラミドクラスの減少として現れたという可能性が残された。生体における下流の極長鎖セラミドクラスの合成経路はどちらか1つなのかあるいは2つ存在するのかという問いに対する答えは今後の研究課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sassa Takayuki, Imai Yasutomo, Kihara Akio, Yamanishi Kiyofumi	4. 巻 48
2. 論文標題 Protein bound ceramide levels in the epidermis of transglutaminase 1 deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1799 ~ 1801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nojiri Koki, Fudetani Shuhei, Arai Ayami, Kitamura Takuya, Sassa Takayuki, Kihara Akio	4. 巻 41
2. 論文標題 Impaired Skin Barrier Function Due to Reduced -O-Acylceramide Levels in a Mouse Model of Sjogren-Larsson Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e0035221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00352-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sawai Megumi, Watanabe Keisuke, Tanaka Kana, Kinoshita Wataru, Otsuka Kento, Miyamoto Masatoshi, Sassa Takayuki, Kihara Akio	4. 巻 24
2. 論文標題 Diverse meibum lipids produced by Awat1 and Awat2 are important for stabilizing tear film and protecting the ocular surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Keisuke, Yoshida Masataka, Okumura Takashi, Sassa Takayuki, Kihara Akio, Uchiyama Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Improvement of Evaporative Dry Eye With Meibomian Gland Dysfunction in Model Mice by Treatment With Ophthalmic Solution Containing Mineral Oil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.4.21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Moe, Sassa Takayuki, Kyono Yuki, Uemura Hiroyasu, Kugo Masaaki, Hayashi Hideki, Imai Yasutomo, Yamanishi Kiyofumi, Kihara Akio	4. 巻 48
2. 論文標題 Comprehensive stratum corneum ceramide profiling reveals reduced acylceramides in ichthyosis patient with CERS3 mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 447 ~ 456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanno Honoka, Sassa Takayuki, Sawai Megumi, Kihara Akio	4. 巻 1866
2. 論文標題 Production of branched-chain very-long-chain fatty acids by fatty acid elongases and their tissue distribution in mammals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2020.158842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Masatoshi, Sassa Takayuki, Sawai Megumi, Kihara Akio	4. 巻 9
2. 論文標題 Lipid polarity gradient formed by ω -hydroxy lipids in tear film prevents dry eye disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e53582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.53582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Isokawa Masashi, Sassa Takayuki, Hattori Satoko, Miyakawa Tsuyoshi, Kihara Akio	4. 巻 1
2. 論文標題 Reduced chain length in myelin sphingolipids and poorer motor coordination in mice deficient in the fatty acid elongase Elovl1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 747 ~ 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2019-00067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Masatoshi、Itoh Narumi、Sawai Megumi、Sassa Takayuki、Kihara Akio	4. 巻 140
2. 論文標題 Severe Skin Permeability Barrier Dysfunction in Knockout Mice Deficient in a Fatty Acid Hydroxylase Crucial to Acylceramide Production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 319 ~ 326.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.07.689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Masahiro、Sassa Takayuki、Kidokoro Hiroyuki、Nakata Tomohiko、Kato Kohji、Muramatsu Hideki、Okuno Yusuke、Yamamoto Hiroyuki、Kaname Tadashi、Kihara Akio、Natsume Jun	4. 巻 42
2. 論文標題 Novel biallelic FA2H mutations in a Japanese boy with fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 217 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2019.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計17件(うち招待講演 2件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 高橋多衣子, 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 新規ELOVL1変異を持つ魚鱗癬患者の角質層の包括的セラミドプロファイリング
3. 学会等名 第13回セラミド研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本萌恵, 佐々貴之, 京野由紀, 上村裕保, 久呉真章, 林秀樹, 今井康友, 山西清文, 木原章雄
2. 発表標題 魚鱗癬を引き起こすセラミド合成酵素CERS3変異の活性および角質層セラミド組成への影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹野歩乃佳, 佐々貴之, 澤井恵, 木原章雄
2. 発表標題 極長鎖分岐鎖脂肪酸の伸長と代謝及び組織分布の解明
3. 学会等名 第19回次世代を担うファーマ・バイオフィォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本萌恵, 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 魚鱗癬を引き起こすセラミド合成酵素CERS3変異の活性および角質層セラミド組成への影響
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部147回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤井恵, 大塚賢人, 宮本政宗, 丹野歩乃佳, 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 アシル基転移酵素Awat1および2が生み出す多様なエステル分子種と涙液油層における役割
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本政宗, 佐々貴之, 澤井恵, 木原章雄
2. 発表標題 水酸化脂質による涙液油層中の極性勾配形成がドライアイを防止する
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Itoh N, Ohno Y, Sassa T, Kihara A
2. 発表標題 Acylceramide production and skin barrier formation by the fatty acid omega-hydroxylase CYP4F22/Cyp4f39.
3. 学会等名 FEBS Special Meeting on Sphingolipid Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹野歩乃佳, 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 分岐鎖脂肪酸の伸長と組織分布の解明
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部146回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sassa T, Isokawa M, Kihara A
2. 発表標題 Very long-chain lipids produced by the fatty acid elongase ELOVL1 are important for myelin formation and motor coordination.
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nojiri K, Fudetani S, Sassa T, Kihara A
2. 発表標題 Establishment of Sjogren-Larsson syndrome model mouse leading to elucidation of the skin pathogenesis mechanism.
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 極長鎖脂質による体表バリアの形成
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野尻光希, 筆谷周平, 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 シェーグレン・ラルソン症候群皮膚病態モデルマウスの確立と病態発症機構の解明
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sassa T, Isokawa M, Kihara A
2. 発表標題 Decreases in chain lengths and level of myelin sphingolipids are associated with hypomyelination and deficient motor coordination in mice lacking fatty acid elongase ELOVL1.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹野歩乃佳, 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 分岐鎖脂肪酸の伸長酵素および組織分布の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sassa T
2. 発表標題 Very-long-chain lipids function as barrier lipids.
3. 学会等名 The 10th Annual Congress of Pan Asian-Pacific Skin Barrier Research Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々貴之, 磯川昌志, 服部聡子, 宮川剛, 木原章雄
2. 発表標題 極長鎖スフィンゴ脂質の短鎖化によるミエリン厚低下と協調運動障害
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤井恵, 大塚賢人, 宮本政宗, 丹野歩乃佳, 佐々貴之, 木原章雄
2. 発表標題 アシル基転移酵素Awat1および2が産生する多様なエステル分子種によるドライアイ防止
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院薬学研究院生化学研究室HP
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------