

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17816

研究課題名(和文)皮膚炎発症過程における脂質代謝変化の網羅的リポドミクス解析

研究課題名(英文)Comprehensive lipidomics of skin lipid profiles in the development of dermatitis

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、種々の脂質分子が独自の機能を発揮することで維持されており、脂質代謝バランスの破綻はアトピー性皮膚炎をはじめとした様々な皮膚疾患の発症に関与すると考えられている。皮膚炎病態に関わる脂質代謝異常を明らかにするには、病態形成に伴う脂質代謝変動を網羅的かつ継時的に解析することが肝要である。我々は、LC-MS/MSを用いたリポドミクス解析により、アトピー様皮膚炎を自然発症するモデルマウスにおける脂質代謝変動を発症前から継時的に解析し、皮膚炎発症および悪化に関わる脂質組成異常を明らかにするとともに、脂質組成に異常を生じる原因となる酵素反応を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに様々な皮膚疾患において脂質組成異常が認められていたが、疾患発症後の解析であったため多くの脂質分子に異常が生じており、病態を引き起こす正体は明らかではなかった。本研究では、症状が出る前の段階で生じる脂質代謝異常を特定し、皮膚疾患の発症および悪化に関わる脂質代謝異常の一つを見出すことに成功した。また、脂質組成異常を生じる原因となる酵素反応を示唆し、皮膚炎の治療に有効な新規標的候補を見出したと言える。

研究成果の概要(英文)：Various lipids are indispensable for the maintenance of skin homeostasis, and dysregulated lipid metabolism can cause disease onset of dermatitis such as atopic dermatitis. To clarify the disease pathogenesis of dermatitis, it's important to capture the comprehensive lipidome profile in the course of disease onset and progression. We performed LC-MS/MS based comprehensive lipidomics in mouse model of atopic dermatitis. As a result, we found unique alterations of lipid metabolism involved in disease onset and progression and underlying mechanisms for the dysregulation of lipid balances.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リポドミクス 脂質 皮膚炎 LC-MS/MS

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、区別がついていない。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はなかった。そのため、皮膚疾患の発症に関わる脂質代謝異常の発見および病態を引き起こすメカニズムを解明するためには、下記に示す4点の問いを解決する必要がある。

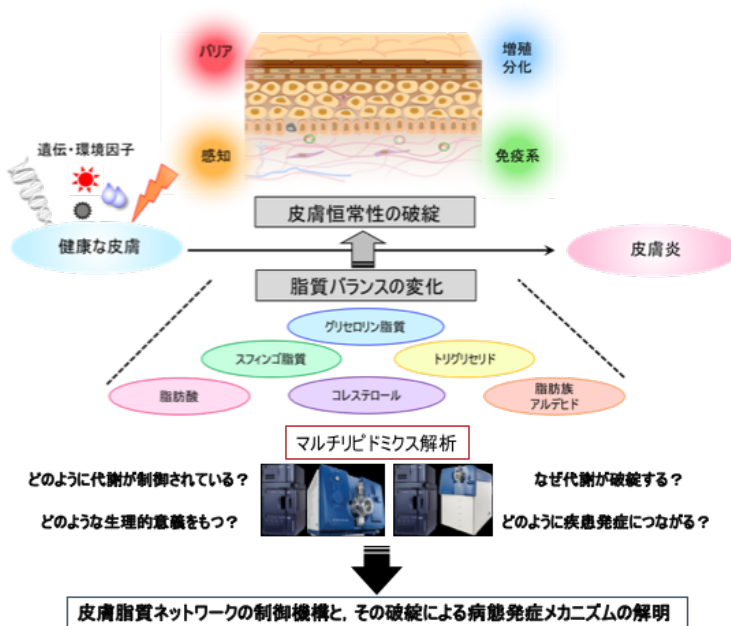


図1: 本研究の概略図

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、区別がついていない。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はなかった。そのため、皮膚疾患の発症に関わる脂質代謝異常の発見および病態を引き起こすメカニズムを解明するためには、下記に示す4点の問いを解決する必要がある。

1. 『脂質代謝異常は皮膚疾患発症前から生じているのか』
2. 『どの脂質代謝系の異常が疾患発症に関与するのか』
3. 『どのようなメカニズムで脂質代謝異常を生じるのか』
4. 『どのようなメカニズムで疾患発症につながるのか』

2. 研究の目的

本研究は、皮膚疾患の進行に伴う脂質代謝異常を継時的・包括的に捉えることで、皮膚疾患の病態メカニズムに潜む脂質代謝異常を明らかにすること、同時に脂質代謝異常と症状・表現型とを紐付けることで、皮膚の機能を制御する新たな脂質代謝系の発見を目指した。また、脂質代謝異常を生じる原因が、どの酵素が触媒する代謝反応の異常に起因するかを解明することを目的とした (図1)。

3. 研究の方法

液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いたノンターゲットリピドミクス解析を、アトピー性皮膚炎自然発症モデルマウスである Spade (J Clin Invest. 2016, 126(6)) に適用し、皮膚炎発症過程における脂質組成変動を包括的に解析した。リピドミクス解析により見出された NDS セラミドの減少が皮膚炎発症に寄与するかを検証するために、Spade に NDS セラミドを塗布して飼育した際の皮膚炎の発症率や症状の悪化に対する影響を評価した。NDS セラミドの減少が引き起こされるメカニズムを明らかにするため、プロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクスによりタンパク質の発現量およびタンパク質のリン酸化修飾を網羅的に解析した。さらに、安定同位体標識された化合物を、マウスの皮膚組織パンチバイオプシーおよび培養ケラチノサイト HaCaT に代謝させるトレーサー実験により、NDS セラミドの代謝活性を解析した。

4. 研究成果

野生型および Spade マウスの生後 0 日, 4 週齢, 8 週齢, 10 週齢の皮膚組織から抽出した脂質を解析した結果, 皮膚炎症症状を発症した後 (8, 10 週齢) では, Spade において様々な脂質分子に変動が認められた。一方で興味深いことに, 皮膚炎症症状を呈する前の 4 週齢の時点で, ある特定のセラミド分子のクラスターが Spade において選択的かつ大きく減少していた。セラミド分子種を詳細に解析すると, 長鎖塩基としてジヒドロスフィンゴシン (DHS) をもつ NDS セラミドが減少していた。さらに, 脂肪酸部分の炭素鎖長を解析すると, 炭素数 22 以上の脂肪酸を含有する NDS セラミドが選択的に減少して

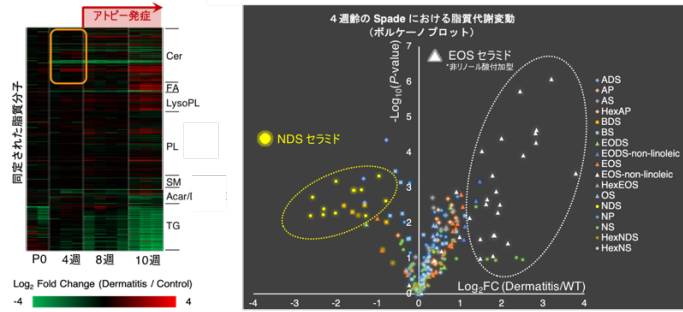
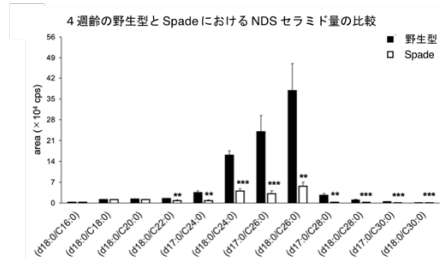


図 2 : Spade の病態形成過程における脂質代謝変動

いることが明らかとなった (図 2,3)。また, DHS も同様に Spade で減少していた (図 3)。セラミドは皮膚バリア機能に重要であることが知られているため, 4 週齢における Spade の皮膚バリア機能を経皮水分蒸散量 (TEWL) により測定したところ, Spade では野生型と比べて有意に TEWL が高く, 皮膚バリア機能が低下していることが示された (図 3)。NDS セラミドの減少が皮膚炎発症に寄与するかを検証したところ, NDS セラミドの塗布により Spade の皮膚炎発症時期が遅延し, 症状の悪化も抑制された (図 3)。以上より, Spade では皮膚炎発症前から NDS セラミドが大きく減少し, 皮膚炎発症の原因となっている可能性が示唆された。



NDS セラミドが減少するメカニズムを解明するために, 野生型および Spade の皮膚組織から調製したタンパク質ライセートを用いて, NDS セラミドの合成活性および DHS の *de novo* 合成活性をそれぞれ *in vitro* で測定したところ, どちらの代謝活性にも Spade において変化が認められなかった。しかし, セラミド合成活性測定において, 通常は前駆体である DHS とアシル CoA を基質として添加して活性を評価するが, 基質としてアシル CoA のみを添加して, ライセート中に含まれる内因性の DHS と反応させたところ Spade では NDS セラミドの生成量が大きく低下した。このことから, Spade における NDS セラミドの低下には, 前駆体である DHS の低下が寄与している可能性が示唆された。Spade において異常をきたしている代謝経路をさらに詳細に解析するため, Spade の皮膚組織パンチバイオプシーや, Spade 変異を導入した Jak1 を過剰発現させた HaCaT に, 安定同位体標識された DHS を取り込ませて代謝させることで, DHS の代謝フラックスを解析した。その結果, DHS が代謝されて産生される NS/NDS の比が Spade で高く, NDS から NS への代謝活性が上昇している可能性が示唆された。また, プロテオミクス解析の結果, Spade の耳では NDS から NS への代謝を触媒する *Degs1* の発現が野生型のおよそ 1.3 倍に増加していた。さらに, リン酸化プロテオミクスの結果, Spade においてスフィンゴミエリンの分解に関わる *Smpd4* と, グルコシルセラミドの分解に関わる *Gba2* のリン酸化状態が変化しており, これまでに報告されていない新規リン酸化サイトも見出された。以上より, Spade における NDS セラミドの低下には, *Degs1* の発現増加による NS への変換の亢進が一部寄与している可能性が示唆された。

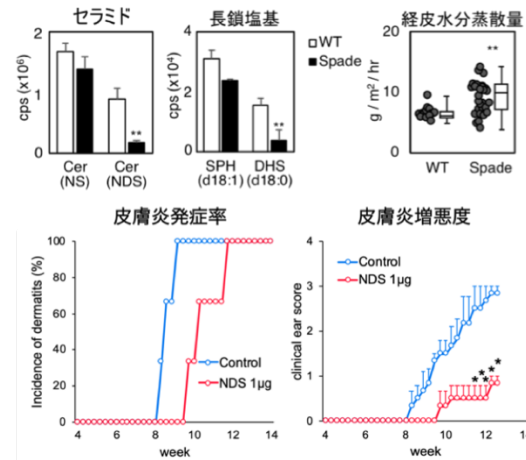


図 3 : Spade における NDS セラミドと DHS の減少とバリア機能の低下
NDS セラミド塗布による病態抑制効果

以上より, Spade において皮膚炎の発症に関わる脂質代謝異常として, *Degs1* 活性の亢進による NDS セラミドの減少を新たに見出した。しかし, 今後の NDS セラミドの低下は, *Degs1* 活性の部分的な亢進のみでは説明がつかず, 他の代謝反応の異常も複合的に寄与している可能性が高い。そのため今後の展望としては, リン酸化プロテオミクスで見出した *Smpd4*, *Gba2* を中心に, リン酸化状態の変化が酵素活性に与える影響を *in vitro* で評価し, 実際に Spade でも活性が変化しているかを同時に検証することで, Spade における *Degs1* 以外の代謝異常を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Akira Utsunomiya, Takenao Chino, Natsuko Utsunomiya, Vu Huy Luong, Atsushi Tokuriki, Tatsuro Naganuma, Makoto Arita, Kiyoshi Higashi, Koichi Saito, Noriyuki Suzuki, Ayako Ohara, Manabu Sugai, Koji Sugawara, Daisuke Tsuruta, Noritaka Oyama, Minoru Hasegawa | 4. 巻 140 |
| 2. 論文標題 Homeostatic Function of Dermokine in the Skin Barrier and Inflammation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology | 6. 最初と最後の頁 838-849 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2019.09.011 | 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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中野裕介, 永沼達郎, 有田誠 |
| 2. 発表標題 ヒト培養ケラチノサイトにおける脂肪酸代謝系の包括的解析 |
| 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 平野愛美, 永沼達郎, 有田誠 |
| 2. 発表標題 アレルギー性接触皮膚炎の病態形成過程における脂肪酸代謝系の包括的解析 |
| 3. 学会等名 第18回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平野愛美, 永沼達郎, 有田誠 |
| 2. 発表標題 アレルギー性接触性皮膚炎の病態制御に関わる脂肪酸代謝系の包括的解析 |
| 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 Yudai Iino, Tatsuro Naganuma, Makoto Arita |
| 2. 発表標題 Untargeted lipidomics revealed dysregulated ceramide metabolism in the initiation phase of atopic dermatitis |
| 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 永沼達郎, 飯野雄大, 平野愛美, 岡村真宜, 有田誠 |
| 2. 発表標題 炎症性皮膚疾患の病態形成過程における脂質代謝変動の包括的メタボローム解析 |
| 3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |