

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 22 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590599

研究課題名（和文）

リポミクスによる新規アトピー性皮膚炎バイオマーカーの探索と検証

研究課題名（英文）

Identification of novel atopic dermatitis biomarkers by lipidomic analysis

研究代表者

中村 光浩 (NAKAMURA MITSUHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30433204

研究成果の概要（和文）：セラミドなどのスフィンゴリン脂質は皮膚角質の主要成分として重要な役割を担っている。アトピー性皮膚炎患者のセラミド含量が減少している。申請者は、細胞中のセラミド(C₁₆-、C₁₈-、C₂₀-、C₂₂-、C₂₄- および C_{24:1}-セラミド等)を定量するために質量分析装置(LC-MS/MS、MALDI-TOF、LC/MS-IT-TOF)を用いた分析法を確立した。本測定法により、アトピー性皮膚炎の角質のセラミドを構成脂肪酸の長さにより分離分析できた。本バイオマーカーはアトピー性皮膚炎に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sphingolipid metabolites such as ceramides, major lipids of the stratum corneum, are known to play critical roles in various epidermal functions. Patients with atopic dermatitis commonly show reduced ceramide contents of the skin. We developed several mass spectrometry methods (LC-MS/MS, MALDI-TOF, and LC/MS-IT-TOF) for the rapid, simultaneous quantification of C₁₆-, C₁₈-, C₂₀-, C₂₂-, C₂₄-, and C_{24:1}-ceramide. This method was successfully applied to monitor the profiles of fatty acid lengths of ceramides in the stratum corneum. The profiles of fatty acid lengths of ceramides could be useful for the diagnosis of atopic dermatitis.

交付決定額

(金額単位：4,550,000円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：シグナル伝達、脂質、アレルギー・喘息、薬理学、分析化学、アトピー性皮膚炎、バイオマーカー、質量分析

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)は近年増加の一途をたどっており、一部の症例は難治性で社会

生活に支障をきたすことから、その予防法や根本的治療法の確立に向けた病態解明が待たれる疾患である。

ADは遺伝的なアトピー素因に、アレルギー的・非アレルギー的な刺激が誘因となり発症する慢性の湿疹である。近年、ADの評価のために、高感度・高選択性のバイオマーカーが臨床現場で待ち望まれている。スフィンゴリン脂質代謝物(SL、セラミド(Cer)等)は、皮膚バリア機能を担う主成分、表皮細胞の分化増殖を司る細胞内情報伝達物質および炎症誘発物質という多彩な機能を有しADの病態形成に深く関わる。SLからADの病態を俯瞰するとその機能は、**皮膚バリア機能**:ドライスキンによる角層のバリア機能障害は非アレルギー素因とされる。AD患者では表皮の保湿機能に関わるCerやその他のSL(スフィンゴミエリンおよびグルコシルセラミド)が減少している。**細胞内情報伝達物質**:AD患者では、バリア機能障害により痒みの知覚神経終末が表皮内に伸長し、易刺激性による痒みから搔破の悪循環に陥るとされている。AD患者の皮膚では、ケラチノサイトから分泌される神経成長因子(NGF)が増加しており表皮内への神経繊維の進展や表皮肥厚、T細胞活性化による種々のサイトカイン産生などを介してADの痒みに関与している可能性がある。NGFがS1Pを活性化することから、表皮のSLを介したAD病態への関与が示唆されている。**炎症誘発因子**:AD患者角層では、deacylaseにより生成する炎症誘発因子スフィンゴシルホスホコリンが蓄積することが報告されている。以上のSLプロファイルにより、アレルギー的および非アレルギー的病因を同時に把握することが可能となると考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ADの病態メカニズムを皮膚のバリア機能を担うCer等のSLに着目して分子レベルで解明し、SLを新たな診断バイオマーカーとしてADの診断に臨床応用することである。代表者は、高感度かつ高選択性の質量分析装置(MS)を活用したリポドミクスによりSL分析測定系を開発する。本研究で特定される新規SLバイオマーカーは、ADの病態解明と診断に極めて有用なものになると考えられる。

3. 研究の方法

従来、皮膚のSL分析にはTLCが汎用されていたが、その量的変化を正確に定量することは極めて困難であった。そこで申請者は、MS測定法を開発した。MALDI-TOF/TOFによる網羅的リポドミクス:この段階では簡便な試料前処理で高い質量精度を有する

MALDI-TOF/TOF(UltraFlex (Bruker社))を用いる。引き続き、LC-MSでは、ion trapの高い質量精度をと広いダイナミックレンジを有する分析系、四重極質量分析装置LC-MS/MSのMRMにより、頑健な定量性を有する高感度分析系を開発する。MS分析の特長からC₁₆-、C₁₈-、C₂₄-のアシル鎖毎にCerを分析できる。従って、ADの病態により変化するCerが、de novo合成由来(C₁₆-、C₁₈-Cer)か、スフィンゴミエリン由来(C₂₄-Cer)かといった情報を得ることが出来る。

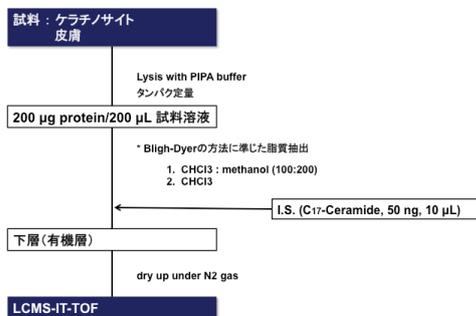
4. 研究成果

MALDI-TOF/TOFを用いた測定法:

MALDI-TOF/MSの測定はUltraflex TOF/TOF(ブルカー・ダルトニクス社)を用いた。Bligh-Dyer法に準じ、試料から抽出したSLに、マトリックス溶液(2,5-ジヒドロ安息香酸)を加え混和後、ターゲットプレート(MTP384 target ground steel)にのせ測定した。測定はリフレクターモードで行い、測定に用いた照射レーザーの波長は337nmとした。レーザーの照射位置を手動でかえながら約200回のスキャンを行い平均のスペクトルを得た。文書同意を得た健康人の皮膚角質のセラミドプロファイルを調べ、C₁₆-、C₁₇-、C₁₈-、C₂₄-およびC_{24:1}-Cerが存在する事を明らかにした。

LC-IT/TOF測定法の開発:

以下に簡潔に方法を記す。Bligh-Dyer法に準じ、試料からスフィンゴ脂質代謝物を抽出した(図1)。LC装置はProminenceシステム、MS検出器はLCMS-IT-TOF(島津製作所(株))を用いた。ODS-C₁₈カラムを用いたLCによりC₁₆-、C₁₇-、C₁₈-、C₂₄-およびC_{24:1}-セラミドを分離後、MS検出部に導入した。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法、ポジティブイオンモードで検出した(図2)。データ処理はLC solution(島津製作所(株))を使用した。



* Bligh EG, Dyer WJ, Can J Biochem Physiol, 1959; 37: 911

図1 細胞由来の脂質抽出操作

MS検出器	LCMS-IT-TOF (島津製作所)
イオン化モード	ESI(+)
N ₂ ガス流速	1.5 L/min
プローブ電圧	+4.5 kV
ブロック温度	200°C
CDL温度	200°C
検出器電圧	1.62 V
スキャン範囲	m/z 480-660

データ処理 LC solution (島津製作所)

図 2 MS 条件

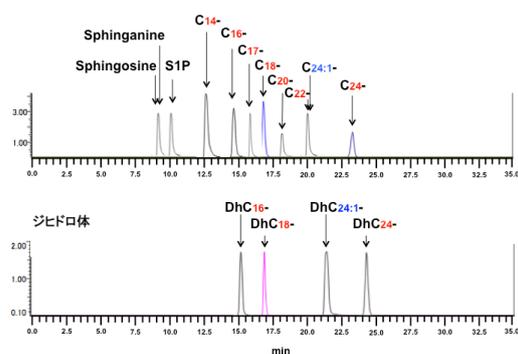


図 3 LC クロマトグラム (標準液)

C₁₆-、C₁₇-、C₁₈-、C₂₄-および C_{24:1}-Cer は LC により良好に分離され(図 3)、m/z は各々 538.52、552.54、566.55、650.65 および 648.63 であった(図 4)。また、回収率および日間変動も良好であった(図 5)。

Ceramides	m/z		Calibration range (μg/mL)	Regression line R ²
	[M+H] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺		
C ₁₆ -Cer	510.4886	492.4781	0.1 - 5.0	0.990
C ₁₇ -Cer	538.5199	520.5094	0.05 - 5.0	0.995
C ₁₈ -Cer	552.5356	534.5250	0.5 - 10.0	0.941
C ₂₄ -Cer	566.5512	548.5407	0.5 - 5.0	0.992
C _{24:1} -Cer	650.6451	632.6346	0.5 - 10.0	0.992
C _{24:1} -Cer	648.6295	630.6189	0.2 - 7.8	0.886

R² : linear correlation coefficients for the calibration

図 4 バリデーションデータ(1)

1) 回収率

Ceramides	0.5 μg/mL		1 μg/mL		5 μg/mL	
	Mean ± S.D. (%)	C.V. (%)	Mean ± S.D. (%)	C.V. (%)	Mean ± S.D. (%)	C.V. (%)
C ₁₆ -Cer	95.5 ± 9.5	9.9	97.4 ± 9.8	10.0	91.7 ± 15.2	16.6
C ₁₇ -Cer	103.2 ± 10.1	9.8	95.6 ± 5.7	5.9	91.0 ± 12.7	13.9
C ₂₄ -Cer	96.8 ± 5.6	5.8	103.4 ± 10.6	10.3	93.1 ± 6.1	6.5

C.V. : Coefficient of variation

2) 日間変動

Ceramides	0.5 μg/mL			1 μg/mL			5 μg/mL		
	Mean ± S.D. (μg/ml)	C.V. (%)	Accuracy (%)	Mean ± S.D. (μg/ml)	C.V. (%)	Accuracy (%)	Mean ± S.D. (μg/ml)	C.V. (%)	Accuracy (%)
C ₁₆ -Cer	0.65 ± 0.17	26.1	30.0	0.91 ± 0.09	9.9	-9.0	5.09 ± 0.76	15.0	1.8
C ₁₇ -Cer	0.76 ± 0.23	30.3	50.2	1.17 ± 0.25	21.4	17.1	4.50 ± 0.79	19.1	-11.1
C ₂₄ -Cer	0.60 ± 0.12	20.0	20.0	1.14 ± 0.13	11.4	14.0	4.87 ± 0.72	14.5	-2.6

C.V. : Coefficient of variation

図 5 バリデーションデータ(2)

LC-MS/MS 測定法の開発:

本研究が目指す最終成果物は、SL バイオマーカーの臨床での有用性の実証である。試料

から SL 抽出を行い、LC-MS/MS(ABI 4000、Applied Biosystems 社)により行う。C₁₆-、C₁₈-、C₂₄-セラミドの LC 分離には、LCMS-IT-TOF と同様に C18 カラムを用いる。移動相は、水/メタノールのグラジエント条件とし、MS/MS 検出は、ESI(+)⁺で MRM トランジションを設定した。AD モデル細胞(ケラチノサイト)において、アシル基の炭素鎖長に基づきセラミドのプロファイルを精査したところ、AD モデル細胞では短鎖アシル鎖をもつセラミド含量が多く、正常細胞では長鎖アシル鎖を有するセラミド含量が多い知見を得た。また、本法は、細胞内情報伝達物質としての SL 定量法として極めて有用であった。

本研究で特定される新規 AD 診断バイオマーカーは、AD の病態解明と診断に極めて有用なものになると考えられる。

動物実験によるアレルギー素因に着目した AD メカニズムの解明(共同研究者(稲垣直樹)):

稲垣らは、NC/Nga マウスにダニ抗原溶液を反復塗布することにより、IgE 上昇および激しい搔破行動を伴う AD に類似した皮膚炎を発症するモデルマウスを確立している。NC/Nga マウスでは Th1/Th2 バランスが Th2 有意にシフトしており IL-4 mRNA 発現が誘導されていることを示している。

ハブテン(ジニトロフルオロベンゼン:DNFB)を反復塗布した BALB/c マウスの AD モデルにおいてステロイド剤デキサメタゾンは全く搔破行動を抑制せず、それに対し、免疫抑制薬タクロリムスは表皮への神経線維の進入伸長および搔破行動を強く抑制することを明らかにした。更に、タクロリムスによる搔破行動の抑制はタクロリムスによるサブスタンス P の減少を介する可能性を示唆した。また、免疫抑制剤シクロスポリンも搔破行動を抑制することを明らかにした。今後、本病態モデルマウスでの SL プロファイルを詳細に検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Shah M. M., Saio M., Yamashita H., Tanaka H., Takami T., Ezaki T., Inagaki N.: Lactobacillus acidophilus strain L-92 induces CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and suppresses

allergic contact dermatitis. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**,612-616 (2012) DOI: 10.1248/bpb.35.612.

Takeshita M., Banno Y., Nakamura M., Otsuka M., Teramachi H., Tsuchiya T., Itoh Y.: The pivotal role of intracellular calcium in oxaliplatin-induced inhibition of neurite outgrowth but not cell death in differentiated PC12 cells. *Chem. Res. Toxicol.*, **24**,1845-1852 (2011) DOI: 10.1021/tx200160g

Ito H., Yoshida K., Murakami M., Hagiwara K., Sasaki N., Kobayashi M., Takagi A., Kojima T., Sobue S., Suzuki M., Tamiya-Koizumi K., Nakamura M., Banno Y., Nozawa Y., Murate T.: Heterogeneous sphingosine-1-phosphate lyase gene expression and its regulatory mechanism in human lung cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1811**, 119-128 (2011) DOI:10.1016/j.bbailip.2010.12.005

Shah M.M., Miyamoto Y., Yamada Y., Yamashita H., Tanaka H., Ezaki T., Nagai H., Inagaki N.: Orally supplemented *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 inhibits passive and active cutaneous anaphylaxis as well as 2,4-dinitrofluorobenzene and mite fecal antigen induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Microbiol. Immunol.* **54**, 523-533 (2010) DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00251.x
Yamashita H., Ito T., Kato H., Asai S., Tanaka H., Nagai H., Inagaki N.: Comparison of the efficacy of tacrolimus and cyclosporine A in a murine model of dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* **645**, 171-176 (2010) DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.07.031

Inagaki N., Shiraishi N., Igeta K., Nagao M., Kim J.F., Chikumoto T., Itoh T., Katoh H., Tanaka H., Nagai H.: Depletion of substance P, a mechanism for inhibition of mouse scratching behavior by tacrolimus. *Eur. J. Pharmacol.* **626**, 283-289 (2010) DOI:10.1016/j.ejphar.2009.09.043

Nemoto S., Nakamura M., Osawa Y., Kono S., Itoh Y., Okano Y., Murate T., Hara

A., Ueda H., Nozawa Y., Banno Y.: Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and AKT activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 10422-10432 (2009) DOI: 10.1074/jbc.M900735200

[学会発表](計10件)

西端友里、中村光浩、伊藤裕美、大塚万祐子、小泉恵子、土屋照雄、村手隆、坂野喜子: LCMS-IT-TOFによるスフィンゴ脂質測定系の開発、日本薬学会第132年会(札幌)、2012.3.28-31.

伊藤裕美、萩原和美、田中広治、小林美沙、星川あすか、水谷直貴、高木明、小嶋哲人、小泉恵子、中村光浩、坂野喜子、野澤義則、村手隆: The effect on acid sphingomyelinase (ASMase) by resveratrol, 第84回日本生化学会大会(京都)、2011.9.21-24.

Kawahara S., Nakamura M., Murate T., Hara A., Nozawa Y., and Banno Y., Sphingosine Kinase Regulate Oxaliplatin Sensitivity of Human Colon Cancer Cells through Ceramide Accumulation and CD44 expression, 51st International Conference on the Bioscience of Lipids (Bilbao, Spain) 2010.9.7-11.

Ito H., Murakami M., Hagiwara K., Sasaki N., Kobayashi M., Hoshikawa A., Takagi A., Kojima T., Banno Y., Tamiya-Koizumi K., Nakamura M., Nozawa Y., Murate T.: The regulatory mechanism of NSMase2 gene expression by ATRA in MCF7 cells, 51st International Conference on the Bioscience of Lipids (Bilbao, Spain) 2010.9.7-11.

Murate T., Yoshida K., Ito H., Murakami M., Hagiwara K., Tagawa Y., Sasaki N., Takagi A., Kojima T., Sobue S., Suzuki M., Tamiya-Koizumi K., Nakamura M., Banno Y., Nozawa Y.: Heterogeneous sphingosine-1-phosphate lyase gene expression and its regulatory mechanism in human lung cancer cell lines 51st International Conference on the Bioscience of Lipids (Bilbao, Spain) 2010.9.7-11.

大塚万祐子、中村光浩、川原さと実、竹下未希、原明、坂野喜子、土屋照雄: シスプラチンによる神経細胞様 PC12 細胞の突起退縮に対するデセン酸の効果、第33回日

本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸)、2010.12.7-10.

川原さと実、中村光浩、大辻陽子、原明、村手隆、野澤義則、坂野喜子、スフィンゴ脂質代謝による抗癌剤感受性と CD44 発現の調節機構、第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸)、2010.12.7-10.

Tanaka K., Tamiya-Koizumi K., Hagiwara K., Murakami M., Murate T., Banno Y., Nakamura M., Kannagi R., Kyogashima M.: Down regulation of neutral ceramidase induces neural differentiation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会 (神戸)、2010.12.7-10.

河野早紀、竹下未希、根本聡、中村光浩、伊藤善規、土屋照雄、村手隆、野澤義則、坂野喜子: 大腸癌細胞のスフィンゴ脂質代謝による抗癌剤感受性の制御機構、第 3 回スフィンゴセラピー研究会 (鳥取)、2009.7.18-19.

川原さと実、河野早紀、竹下未希、中村光浩、岡野幸雄、原明、村手隆、野澤義則、坂野喜子: スフィンゴシンキナーゼによる抗癌剤感受性の制御機構、第 82 回日本生化学会大会 (神戸) 2009.10.21-24.

〔図書〕(計 1 件)

「LC-MS/MS の基本原理とは」(分担執筆) < 実務担当者のアンケートを集めた > 分析法バリデーション Q & A 集、pp.27-41、情報機構、2010

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
該当なし

取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村光浩 (NAKAMURA MITSUHIRO)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 30433204

(2) 研究分担者

稲垣直樹 (INAGAKI NAOKI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 30137062

坂野喜子 (BANNO YOSHIKO)
岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号: 50116852

(3) 連携研究者
該当なし