

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591665

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患モデルマウスにおける脂質代謝ネットワークの解析

研究課題名(英文)Analyses of lipid network using inflammatory dermatoses model mice

研究代表者

山本 圭(YAMAMOTO, Kei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：30304504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：表皮の脂質は皮膚バリア機能の形成および皮膚病態生理機能に重要な要素である。脂質代謝の破綻が皮膚病態と密接に関連していることが予想されるが、皮膚疾患における脂質ネットワークの役割については十分に理解されていない。本研究では、PLA2アイソザイムのひとつであるPLA2G2Dが樹状細胞に局在し、DHA由来の抗炎症性脂質メディエーターのひとつであるリゾルビンD1の産生に関わり、接触性皮膚炎応答の収束を制御することを明らかにした。すなわち、PLA2G2Dによる炎症の収束は多くの炎症性代謝疾患でも引き起こされていることが予想され、PLA2G2Dを標的としたバイオ医薬品の開発研究へと発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Epidermal lipids play important roles in skin barrier and pathophysiological function. Although perturbed lipid metabolism often leads to skin abnormality, molecular mechanisms underlying this process still remain incompletely understood. In this research, we show that secreted PLA2 group IID (PLA2G2D) is preferentially expressed in dendritic cells (DCs) and displays a pro-resolving function. In hapten-induced contact dermatitis, resolution of inflammation was compromised in skin and LNs of PLA2G2D-deficient mice, in which the immune balance was shifted toward a proinflammatory state over an anti-inflammatory state. PLA2G2D in the LNs contributed to mobilization of a pool of DHA that could serve as precursors for pro-resolving lipid mediators such as resolvin D1. Our results highlight PLA2G2D as a "resolving sPLA2" that ameliorates inflammation through mobilizing pro-resolving lipid mediators and points to a potential use of this enzyme for treatment of inflammatory disorders.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：脂質代謝 脂質メディエーター 皮膚疾患 接触性皮膚炎 ホスホリパーゼA2 炎症収束

1. 研究開始当初の背景

皮膚の病態生理を考える上で脂質が非常に重要な要素であることは、多様な脂質メディエーターが外的刺激により皮膚で産生すること、また表皮角質のバリア機能の形成に脂質が必須であることから明白である。接触性皮膚炎やアトピー性皮膚炎に代表される炎症性皮膚疾患は、免疫系、表皮バリア機能、搔破などが複雑に絡み合った複合アレルギー疾患であり、Th1/Th2 応答や高IgEなどの免疫学的異常、表皮角質蛋白質の遺伝変異による表皮バリア機能の異常、神経生理学的異常である搔破過敏などが発症機序として考えられていた。脂肪酸は多様な脂質メディエーターの前駆体であり、角質バリア脂質の構成成分のひとつでもある。従って、脂質代謝の破綻は皮膚病態と密接に関連していることが予想されるが、本病態における脂質ネットワークの役割は十分に理解されていなかった。脂質は極めて微量である、半減期が短い、直接遺伝子にコードされないなど依然として困難な研究対象であった。しかし、近年の高感度な質量分析計の開発により脂質メディエーターの網羅的な定性・定量解析が可能となり、従来想像できなかったほど多種多様でしかも微量な脂質が病態生理的条件下で変動することが分かってきた。質量分析の技術を皮膚に応用すれば、従来部分的にしか見えていなかった皮膚病態に伴う脂質分子のダイナミクスを網羅的に追跡することが理論的に可能となった。

生体膜を構成するグリセロリン脂質を加水分解するホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、リゾリン脂質と遊離脂肪酸を産生する。この遊離脂肪酸はシクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼの作用によって酸化脂肪酸に代謝され、リゾリン脂質とともに脂質メディエーターとして様々な生体機能に関与する。約 30 種類の PLA₂ アイソザイムのうち

細胞外分泌性 PLA₂ (sPLA₂) 群は 10 種類のアイソザイムから成り、生体内機能については不明な点が多く残されていた。sPLA₂ がリン脂質代謝酵素であることを踏まえると、その生理的な役割の解明には酵素依存的に起こる脂質ネットワークの同定が鍵となる。申請者らは、sPLA₂ 遺伝子改変マウスを用いて組織から抽出したリン脂質(基質)および酸化脂肪酸(代謝産物)を質量分析計により詳細にプロファイリングし、各 sPLA₂ アイソザイムの生理的役割について脂質分子レベルで解明を進めていた。これまでの sPLA₂ 分子群の包括的な機能解析の過程で、皮膚と sPLA₂ 分子群との関連について、a)皮膚の異なる細胞に異なる sPLA₂ サブタイプが発現している、b)各酵素の各遺伝子改変マウスは、各々の発現部位に対応する表現型を示す、ことを見出した。例えば、sPLA₂ アイソザイムの PLA2G10 は毛包の外根鞘に局在し体毛形成に関わること、PLA2G2D は樹状細胞に局在し樹状細胞機能に関わること、PLA2G3 は肥満細胞に局在し肥満細胞の成熟に関連することを明らかとしつつあった。

2. 研究の目的

本研究では、皮膚生理機能の脂質ネットワークを解明するためのツールとして質量分析計を用い、皮膚病態モデルにおけるリン脂質分子および酸化脂肪酸代謝物を解析することを目的とした。マウスモデルとして、皮膚に関連する sPLA₂ 分子種の KO および Tg マウスにフォーカスを当てて比較解析し、炎症性皮膚疾患における各 sPLA₂ 分子種に特徴的な作用機序と脂質ネットワークを包括的に解明する。

3. 研究の方法

sPLA₂ 酵素群のうち樹状細胞に局在する PLA2G2D と表皮細胞に局在する PLA2G2F に着目し、炎症性皮膚疾患モデルマウスとし

て、DNFB 塗布による接触性皮膚炎モデルを各種遺伝子改変マウスに適応し、表現型を解析した。

(2)上記モデルに脂質プロファイリングを展開応用し、組織中の特定の細胞集団における脂質ネットワークを明らかにした。

(3)ヒト炎症性皮膚疾患について各 sPLA₂ 群の位置づけを調べ、マウスモデルによって得られた知見と比較検討し、sPLA₂ 群が疾患のバイオマーカーとなる可能性を考察した。

4 . 研究成果

PLA2G2D はマウスおよびヒトにおいて脾臓とリンパ節での発現が極めて高く、その中でも樹状細胞 (DC: CD11c⁺細胞) に高発現していた。そこで、DC における PLA2G2D の機能を調べる目的で、ハプテン誘導接触性皮膚炎モデルを *Pla2g2d*-K0 に適用してその表現型を精査した。*Pla2g2d*-K0 では皮膚炎応答の開始と進行は野生型マウスと同様に起こるのに対し、皮膚炎後期の浮腫の収束が見られず炎症が持続した。この収束期の皮膚と所属リンパ節における各種炎症性マーカーの発現は、野生型マウスに比べて *Pla2g2d*-K0 では顕著に高い値を示した。*Pla2g2d*-K0 より調整した骨髄由来 DC (BMDC) は野生型マウス由来 BMDC と比較して活性化が亢進しており、*Pla2g2d*-K0 の BMDC を移植した野生型マウスに抗原を単回塗布すると、野生型マウスの BMDC を移植したマウスに比べて浮腫が増悪した。さらに脂質メタボローム解析の結果、*Pla2g2d*-K0 はリンパ節において高度不飽和脂肪酸を持つホスファチジルエタノールアミンを基質として抗炎症性脂質とされるドコサヘキサエン酸 (DHA) の遊離し、その結果、DHA 代謝産物のリゾルビン D1 (RvD1) が接触性皮膚炎を収束させることが明らかになった。以上の結果から、

PLA2G2D は DC 由来の “抑制性” sPLA₂ であり、抗炎症性脂質の産生を制御することで炎症を収束する役割をもつことが示唆された。

PLA2G2F は表皮に発現している主要な sPLA₂ アイソザイムであり、表皮上部の顆粒層と角質層に局在していた。さらにこの酵素は、皮膚癌および乾癬といった様々なヒト皮膚疾患において肥厚した表皮の上部に強く発現していることが見出され、皮膚病態との関連が示唆された。マウスに接触性皮膚炎および皮膚癌を施すと皮膚の肥厚部位において *Pla2g2f* の発現が増加した。*Pla2g2f*-K0 にこれらのモデルを適用すると、炎症により惹起された皮膚肥厚が減弱した。さらに脂質メタボローム解析の結果、PLA2G2F の作用によって産生されたリゾリン脂質が病態に応じて変化した。現在、この炎症性皮膚疾患におけるリゾリン脂質の意義については検討を進めているところである。

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4件)

(1)*Miki, Y., *Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J.M., Hara, S., Gelb, M.H., and Murakami, M. (2013) Lymphoid tissue phospholipase A₂ group IID resolves contact hypersensitivity by driving anti-inflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.* 210: 1217-1234 . (査読有)
*equally contributed.

(2)Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Satom H., Murase, R., Yamamoto, K.,

Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M.H., Arita, M., Yokomizo, T., Nakamura, M., Watanabe, K., Hirai, H., Nakamura, M., Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto, K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S., and *Murakami, M. (2013) Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A₂-prostaglandin D₂-DP1 receptor paracrine axis. *Nat. Immunol.* 14: 554-563 (査読有)

(3) Sato, H., Taketomi, Y., Ushida, A., Isogai, Y., Kojima, T., Hirabayashi, T., Miki, Y., Yamamoto, K., Nishito, Y., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hara, S., Ida, S., Miyamoto, Y., Watanabe, M., Baba, H., Miyata, K., Oike, Y., Gelb, M.H., and Murakami, M. (2014) The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metabolism*. in press. (査読有)

(4) 三木寿美、山本圭、村上誠 . (2013) 疾病における脂質代謝ネットワークの機能。オレオサイエンス 13(10)、23-29 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

(1) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Gelb, M.H., Lambeau, G, and Murakami, M. Epidermal phospholipase A₂ group IIF regulates keratinocyte differentiation and skin barrier through driving a unique set of lipid products. 16th GEM/10th GERLI meeting 2013 GEM/GERLI Lipidomics meeting.

2013.11.10.-11.14., Nice, France

(2) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Gelb, M.H., Lambeau, G, and Murakami, M. Epidermal phospholipase A₂ group IIF regulates keratinocyte differentiation and skin barrier through driving a unique set of lipid products. 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases. 2013.11.3.-11.6., San Juan, Puerto Rico

(3) 山本圭、三木寿美、佐藤真利子、椛島健治、石川由起雄、石井壽晴、村上誠 . IIF 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は皮膚疾患の進行に寄与する . 第 86 回日本生化学会. 2013. 9. 11.-13. 横浜

(4) 山本圭、三木寿美、佐藤真利子、武富芳隆、池田和貴、中西広樹、田口良、村上誠 . IIF 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は表皮の恒常性維持および病態に寄与する . 第 55 回日本脂質生化学会. 2013. 6. 6.-6.7 宮城県松島町

(5) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Gelb, M.H., Lambeau, G, and Murakami, M. GROUP IIF PHOSPHOLIPASE A₂ MAINTAINS SKIN HOMEOSTASIS. 5th International Conference on Phospholipase A₂ Mediates Signaling in Translational Medicine, 2013.5.20-5.21, New Orleans (米国)

(6) 山本圭、佐藤弘泰、佐藤真利子、三木寿美、武富芳隆、村上誠 . 皮膚病態生理機能における IIE 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ の役割 . 第 85 回日本生化学会. 2012. 12. 15. 福岡

(7) Yamamoto, K., Shimo, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., Gelb, M.H., Lambeau, G., and Murakami, M. Secreted phospholipase A₂s in skin homeostasis. **New Aspect of Phospholipid Biology and Medicine 2011.** 2011. 11. 15. 福岡

(8) Yamamoto, K., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Murakami, M. Hair follicular expression and function of group X secreted phospholipase A₂ in mouse skin. **The 8th GERLI Lipidomics meeting.** 2011. 10. 27. Lyon, France

(9) Yamamoto, K., Shimo, K., Miki, Y., Taketomi, Y., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., Gelb, M.H., Lambeau, G., and Murakami, M. Group IIF phospholipase A₂ maintains epidermal homeostasis. **The 12th International Conference on Bioactive Lipids in Inflammation, Cancer and Related Diseases.** 2011. 9. 19. Seattle, USA

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕
出願状況 (計 2 件)

1) 名称 : PLA2G2F を指標とした表皮角化細胞の過増殖性疾患に対する薬剤スクリーニング方法
発明者 : 村上誠、山本圭
権利者 : 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類 : 特許
番号 : 特願 2 0 1 3 - 2 4 0 8 7 1
出願年月日 : 平成 25 年 11 月 21 日
国内外の別 : 国内

2) 名称 : PLA2G2F を指標とした抗皮膚癌

薬のスクリーニング方法

発明者 : 村上誠、山本圭

権利者 : 公益財団法人東京都医学総合研究所

種類 : 特許

番号 : 特願 2 0 1 2 - 2 5 5 3 1 6

出願年月日 : 平成 24 年 11 月 21 日

国内外の別 : 国内

〔 その他 〕

ホームページ等

www.igakuken.or.jp/lipid

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山本 圭 (YAMAMOTO, Kei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号 : 3 0 3 0 4 5 0 4