

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461671

研究課題名(和文)脂質メタボロームによる新規皮膚疾患バイオマーカーの同定と医療に向けての基盤構築

研究課題名(英文) Identification of new skin disease biomarkers by lipid metabolome analyses and establishment of foundation for medical treatment

研究代表者

山本 圭 (Yamamoto, Kei)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・准教授

研究者番号：30304504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では皮膚疾患を対象を絞り広範な脂質メタボローム解析を展開し、新規バイオマーカーの創成を目指した。その結果、表皮特異的に発現するsPLA2-IIIFは、乾癬、接触性皮膚炎、皮膚癌といった表皮肥厚性疾患で高く発現していること、この酵素産物であるリゾプラズマローゲンは表皮の過増殖や活性化を促進し、乾癬や皮膚癌の増悪に関わる新しい生理活性脂質であることを明らかにした。さらに毛包に発現しているsPLA2-IIIEが毛包形成に寄与すること、リンパ組織の樹状細胞に発現しているsPLA2-IIIDは接触性皮膚炎や乾癬は炎症状態を改善する一方で抗腫瘍免疫を抑制して皮膚癌を促進する作用を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to create novel biomarkers by use of extensive lipid metabolome analyses of various skin diseases. As a result, epidermis-specifically expressed group IIIF secretory phospholipase A2 was distributed in the uppermost regions of epidermal-hyperplastic diseases such as psoriasis, contact dermatitis and skin carcinogenesis. Ethanolamine lysoplasmalogen, a sPLA2-IIIF-derived marker product, induced hyperproliferation and activation of keratinocytes and was novel lipid mediator for exacerbation of psoriasis and skin cancer. We found that group IIIE sPLA2 was expressed abundantly in hair follicles and contributed to hair follicle formation. Furthermore, we found that dendritic sPLA2-IIID improves inflammatory pathologies of contact dermatitis and psoriasis, while suppressing anti-tumor immunity to promote skin cancer by mobilizing omega-3 polyunsaturated fatty acid metabolites.

研究分野：脂質生化学

キーワード：プラズマローゲン ホスホリパーゼA2 乾癬 接触性皮膚炎 皮膚癌 リピドミクス

1. 研究開始当初の背景

表皮角質のバリア機能の形成にセラミドや脂肪酸が必須であること、多様な生物活性をもつ生理活性脂質(脂質メディエーター)が脂肪酸から産生されること、さらに炎症性皮膚疾患が表皮バリア機能低下および免疫系異常に起因する複合アレルギー疾患であることから、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。しかしながら、これらの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かった。脂質は極めて微量で半減期が短いなどの理由で困難な研究対象であった。近年の質量分析機を用いた脂質メタボローム解析(リピドミクス)の躍進により、生命活動に伴う脂質関連代謝分子の定性定量解析が可能となり、多種多様で微量な脂質メディエーターが病態生理的条件下で変動することが分かってきた。

脂質メディエーターの生合成は、生体膜を構成するグリセロリン脂質がホスホリパーゼ A₂(PLA₂)によって遊離脂肪酸とリゾリン脂質に加水分解されることから始まる。そのため、PLA₂の機能を理解することは脂質の関わる生命応答の解明につながると考えられる。PLA₂には約 30 種類の分子種が存在し、細胞外分泌性 PLA₂ (sPLA₂)ならびに細胞内に存在する Ca²⁺要求性の cPLA₂ 群、Ca²⁺非要求性の iPLA₂ 群に大別される。申請者らの研究室では、従来機能が不明であった sPLA₂ 群の遺伝子改変マウス(KO および TG)を作出し、これに脂質メタボローム解析を展開することで、sPLA₂ 群を起点とする新しい脂質ネットワークとその生命応答との関連を多数見出しつつあった。各アイソザイムは、既存の概念である脂質メディエーター産生を介した経路だけでなく、組織固有の細胞外リン脂質環境を変えることにより、多彩な生命応答に関わることが分かってきた。

当時、申請者は sPLA₂ 群のうち、表皮の顆

粒層から角質層に局在する sPLA₂-IIF が「Epidermal PLA₂」として表皮角化細胞(ケラチノサイト)の分化に伴い発現誘導されること、ケラチノサイトから分泌される細胞外リン脂質を基質として高度不飽和脂肪酸およびプラズマローゲン型リゾホスファチジルエタノールアミン(P-LPE)を供給すること、さらにケラチノサイトの分化を促進することで表皮の弱酸性化環境の維持およびバリア機能に寄与することを見出した。一方、sPLA₂-IIF 過剰発現マウスでは sPLA₂-IIF 欠損マウスとは相補的に、ケラチノサイトの過増殖に伴う表皮の肥厚(乾癬と類似)が認められた。さらに sPLA₂-IIF 欠損マウスに、皮膚癌、乾癬、接触性皮膚炎の病態モデルを施すと各病態が改善されたことから、sPLA₂-IIF 欠損マウスではケラチノサイトが未分化なため、病態に伴う表皮の異常増殖が充分におこらないと結論づけた。

申請者は遺伝子改変マウスに脂質メタボローム解析を展開することで病態と関連する脂質代謝産物を同定する試みをおこなっており、その例として sPLA₂-IIF が抗炎症脂質メディエーターを産生し炎症を収束させることを見出している。当時、皮膚癌、乾癬、接触性皮膚炎の皮膚病態モデルの皮膚を脂質メタボローム解析により調べると、機能未知である P-LPE が sPLA₂-IIF の機能を反映する代謝産物であることを見出した。そこで本研究計画では、脂質メタボローム解析により sPLA₂ 分子群を基点とした皮膚疾患固有の新規脂質分子を同定し、その機能を精査することで、脂質性皮膚疾患バイオマーカーとしての理論基盤を構築することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに申請者が展開してきた PLA₂ 分子群の解析を継続発展させ、皮膚疾患にターゲットを絞り広範な脂質メタボローム解析を展開し、皮膚疾患バイオマーカー

一の創成を目指した。具体的には、予備的な検討で浮上してきた以下の項目について解析をすすめた。(1) 皮膚疾患と相関する新規脂質代謝産物である P-LPE の機能を精査する。(2) 申請者の研究室で所有する各種 PLA₂ 欠損マウスについて、皮膚疾患の表現型と照合しつつ脂質メタボローム解析を展開し新たな脂質メディエーター候補を探索する。(3) 皮膚疾患モデルに対し、脂質代謝に関わる各種抗体または阻害剤の適応が可能か検討する。(4) ヒト炎症性皮膚疾患について P-LPE および各 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、疾患のバイオマーカーとなる可能性を探求する。

3. 研究の方法

本研究では、申請者がこれまでに sPLA₂ 分子群の皮膚機能に関して得た知見を理論基盤に、皮膚疾患モデルに焦点を絞り質量分析機を用いた網羅的な脂質メタボローム解析による皮膚疾患バイオマーカーの創成を検討した。具体的な方法を次に記す。

(1) 皮膚疾患と相関する新規脂質代謝産物 (P-LPE) に対して機能評価と作用点の探索、(2) 病態 (皮膚癌、接触性皮膚炎、乾癬) を施した野生型マウスおよび sPLA₂ 群遺伝子改変マウスの網羅的な脂質メタボローム解析、(3) sPLA₂ サブタイプの活性を阻害する低分子化合物または抗体を用いた治療戦略の検討、(4) ヒト皮膚疾患の患者サンプルを用いた各病態の進行度、脂質分子の産生量、PLA₂ 分子種の局在および発現の相関性の検討、をおこなう。

4. 研究成果

(1) 表皮肥厚性疾患を制御する新規生理活性脂質の発見 (発表論文 11)

表皮特異的に発現している sPLA₂-IIF は、乾癬、接触性皮膚炎、皮膚癌といった表皮肥厚性疾患で高く発現していた。この酵素は高

度不飽和脂肪酸 (PUFA) を含有するプラズマローゲン型 PE (P-PE) に対する選択性が高く、特に *vivo* ではドコサヘキサエン酸 (DHA) を持つ P-PE を優先的に分解した。この時に生じるリゾプラズマローゲン (P-LPE) は表皮の過増殖や活性化を促進し、乾癬や皮膚癌の増悪に関わることを明らかにした。

(2) **毛包の sPLA₂ の同定: sPLA₂-IIE** (発表論文 6)

表皮の主要な分泌性ホスホリパーゼ A₂ として sPLA₂-IIF を同定したが (発表論文 3)、本論文では別のアイソザイムである sPLA₂-IIE が毛周期に応じて毛包に発現誘導されることを発見した。sPLA₂-IIE 欠損マウスの毛包では毛包上皮と体毛の乖離が認められ、一部の毛包関連遺伝子の発現が変化していたが、表皮に異常は見られなかった。これら一連の研究は、皮膚に高発現している 2 種の sPLA₂ (毛包の sPLA₂-IIE と表皮の sPLA₂-IIF) の機能的相違ならびに各酵素が固有に動員する脂質の重要性を初めて明らかにしたものである。

(3) 接触性皮膚炎、乾癬、皮膚癌における sPLA₂-IID の免疫抑制機能の普遍性 (発表論文 5)

リンパ組織の樹状細胞に高発現している sPLA₂-IID は、抗炎症性の 3 脂肪酸代謝物を構成的に動員することで接触性皮膚炎における Th1 免疫応答を抑制する (Miki et al, *J Exp Med* 2013)。本論文では、sPLA₂-IID の欠損および過剰発現マウスを用いて、本酵素の免疫抑制機能の普遍性について検証した。その結果、sPLA₂-IID はリンパ組織の脂質バランスを構成的に免疫抑制の方向にシフトさせることにより、リンパ節炎症 (急性炎症)、接触性皮膚炎 (Th1 応答)、乾癬 (Th17 応答) の各炎症病態を改善する一方で、抗腫瘍免疫を抑制して皮膚癌を促進することがわかった。このことから、3 脂肪酸代謝物動員酵素としての sPLA₂-IID の免疫抑制作用は病態

に応じて体に良い方向にも悪い方向にも作用し得ることが明らかとなった。

(4) sPLA₂-X から産生される 3 脂肪酸は皮膚炎症と精子の運動を抑制する(発表論文 7)

sPLA₂-X はリン脂質の極性基を識別しないが、脂肪酸に関しては PUFA(特に 3 脂肪酸)を好む傾向がある。この性質は *vivo* において特に顕著で、本酵素の過剰発現マウスでは 3 脂肪酸の遊離量が増加し、皮膚組織も含めて全身的に免疫抑制の表現型を示した。また、sPLA₂-X 欠損マウスの解析によれば、本酵素は主要発現組織である大腸において EPA や DHA を動員して大腸炎を抑制し、精子においてドコサペンタエン酸(DPA)を遊離して受精を促進した。したがって、sPLA₂-X により遊離される PUFA は組織固有の局所環境に依存するものと思われる。

リン脂質による破骨細胞融合機構の発見(発表論文 1)

リン脂質は主に内層に遍在することが知られているが、破骨細胞が分化誘導する際に、ホスファチジルエタノールアミンの合成が増加すること、内層から外層へ輸送する分子の発現増加による局在変化が引き起こされた結果、破骨細胞の細胞融合が引き起こされることを明らかにした。このことは破骨細胞の分化融合のメカニズムに脂質分子が関与していることを示している。

脂肪細胞から分泌される脂質代謝酵素による肥満の新しい調節機構の発見(発表論文 13)

高脂肪食を負荷させた肥満細胞に sPLA₂-V と sPLA₂-IIE の 2 種類のホスホリパーゼ A₂ が著しく発現誘導されるのを見出した。そのうち sPLA₂-V はリポタンパク質粒子のリン脂質から不飽和脂肪酸を動員することで、脂肪組

織の慢性炎症を抑制する役割を持つこと、sPLA₂-IIE のは、リポタンパク質の微量リン脂質の量を調節することで、脂肪組織や肝臓への脂質の運搬・貯蔵を促進する役割を担う肥満誘導型酵素であることを明らかにした。

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 13 件)

- 1) Irie, A., Yamamoto, K., Miki, Y., and Murakami, M. Phosphatidylethanolamine dynamics are required for osteoclast fusion. *Sci. Rep.* 7, 46715 (2017) 査読有
- 2) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Murase, R., Taketomi, Y., and Murakami, M. Secreted phospholipase A₂ specificity on natural membrane phospholipids. *Methods in Enzymol.* 583, 101-117 (2017) 査読有
- 3) Murakami, M., Yamamoto, K., Miki, Y., Murase, R., Sato, H., and Taketomi, Y. The roles of secreted phospholipase A₂ gene family in immunology. *Adv. Immunol.* 132, 91-134 (2016) 査読有
- 4) 山本圭. 皮膚の恒常性や疾患を調節する新しい脂質メディエーター, *生化学* 88 (6), 786-790 (2016) 査読無
- 5) Miki, Y., Kidoguchi, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Gelb, M.H., Yamamoto, K., and Murakami, M. Dual roles of group IID phospholipase A₂ in inflammation and cancer. *J. Biol. Chem.* 291, 15588-15601 (2016) 査読有
- 6) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Nishito, Y., Gelb, M.H., Taketomi, Y., and Murakami, M. Expression and function of group IIE phospholipase A₂ in mouse skin. *J. Biol. Chem.* 291,

- 15602-15613 (2016) 査読有
- 7) *Murase, R., *Sato, H., *Yamamoto, K., Ushida, A., Nishito, Y., Ikeda, K., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Taketomi, Y., and Murakami, M. Group X secreted phospholipase A₂ releases ω-3 polyunsaturated fatty acids, suppress colitis and promote sperm fertility. *J. Biol. Chem.* 291, 6895-6911 (2016). *equally contributed. 査読有
- 8) 三木寿美, 山本圭, 村上誠. 接触性皮膚炎と抗炎症脂質メディエーター, **臨床アレルギー科**, 63, 156-163 (2015) 査読無
- 9) Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., and Taketomi, Y. A new era of secreted phospholipase A₂. *J. Lipid Res.* 56, 1248-1261 (2015) 査読有
- 10) Vijay, R., Hua, X., Meyerholz, D.K., Miki, Y., Yamamoto, K., Gelb, M.H., Murakami, M., and Perlman, S. Critical role of Phospholipase A₂ group IID in age-related susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome-CoV infection. *J. Exp. Med.* 212, 1851-1868 (2015) 査読有
- 11) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Nishito, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., Kambe, N., Kabashima, K., Lambeau, G., Gelb, M.H., and Murakami, M. The role of group IIF secreted phospholipase A₂ in epidermal homeostasis and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 212, 1901-1919 (2015) 査読有
- 12) Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Yamamoto, K., and Lambeau, G. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: the 3rd edition. *Biochimie.* 107 Pt A, 105-113 (2014) 査読有
- 13) 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. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metab.* 20, 119-132 (2014) 査読有
- [学会発表](計13件)
- 1) 山本圭. 健康と病態に関わる脂質ネットワークの研究, 第2回BRIGHTシンポジウム, 2016.12.16. (招待講演) 徳島大学薬学部(徳島県徳島市).
- 2) Yamamoto, K., Miki, Y., Taketomi, Y., and M. Murakami. Plasmalogen-lysophosphatidylethanolamine is a novel regulator and biomarker for epidermal-hyperplastic diseases. The 1st International Plasmalogen Symposium. 2016.11.7-8.九州大学百年講堂(福岡県福岡市).
- 3) 山本圭, 三木寿美, 佐藤弘泰, 武富芳隆, 村上誠. 皮膚の恒常性と病態における二種のsPLA₂の発現と機能. 第58回日本脂質生化学会. 2016.6.9.-10.にぎわい交流館AU(秋田県秋田市).
- 4) 山本圭, 村上誠. 表皮肥厚性疾患を調節する新しい生理活性脂質の発見. 第57回日本生化学会 中国・四国支部例会. 2016.5.27.-28.高知大学医学部(高知県南国市).
- 5) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Lambeau, G., Gelb, M., and Murakami, M. The two secreted phospholipase A₂s PLA2G2F and PLA2G2E play distinct roles in skin homeostasis

- and diseases. 7th International conference on phospholipase A₂ and lipid mediators. 2016.5.19-5.20 La Jolla, USA.
- 6) 山本 圭. 表皮肥厚性疾患を調節する新しい脂質メカニズムの発見. 2015年度 第6回学際脂質創生研究部会, 2016.1.22. 徳島大学工業会館 (徳島県徳島市).
- 7) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Kambe, N., Kabashima, K., Lambeau, G., Gelb, M., and Murakami, M. Plasmalogen-lysophosphatidylethanolamine driven by group IIF sPLA₂ underlies epidermal-hyperplastic disorders. The 14th International Conference on Bioactive Lipids in Inflammation, Cancer and Related Diseases. 2015.7.12-7.15 Budapest, Hungary. (Oral presentation) .
- 8) 山本圭, 三木寿美, 村上誠. IIF型分泌性ホスホリパーゼA₂により産生されるアルケニル型ホスファチジルエタノールアミンは表皮肥厚性疾患のバイオマーカーである. 第57回日本脂質生化学会. 2015.5.28.-29.一橋大学一橋講堂 (東京都千代田区).
- 9) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Murakami, M. Group IIF sPLA₂ promotes skin carcinogenesis. 6th International conference on phospholipase A₂ and lipid mediators. 2015.2.10-2.12 京王プラザホテル (東京都新宿区).
- 10) Yamamoto, K., Miki, Y., Taketomi, Y., Kambe, N., Kabashima, K., Lambeau, G., Gelb, M., Murakami, M. A unique lipid pathway driven by group IIF sPLA₂ underlies epidermal-hyperplastic disorders. 6th International conference on phospholipase A₂ and lipid mediators. 2015.2.10-2.12 京王プラザホテル (東京都新宿区).
- 11) 山本圭. 新規リゾホスファチジルエタノールアミンは表皮PLA₂依存的な表皮肥厚性疾患のバイオマーカーである. Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 2014.11.23. ラフォーレ修善寺 (静岡県伊豆市).
- 12) 山本圭, 三木寿美, 村上誠. アルケニル型リゾホスファチジルエタノールアミンはIIF型分泌性ホスホリパーゼA₂依存的な表皮肥厚疾患のバイオマーカーである. 第87回日本生化学会. 2014.10.15.-18. 国立京都国際会館 (京都府京都市).
- 13) Yamamoto, K., Miki, Y., Taketomi, Y., and Murakami, M. Secreted phospholipase PLA₂ regulates epidermal homeostasis and hyperplastic disorders by mobilizing unique lipid products. 2014 Yonsei-Igakuken Joint Symposium. 2014. 6. 20. Seoul, Korea .

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

- 1) 名称: 表皮肥厚性疾患及び/又は表皮肥厚性症状に対する予防、改善、又は治療剤
 発明者: 山本圭, 村上誠, 酒瀬川信一
 権利者: 国立大学法人徳島大学、公益財団法人東京都医学総合研究所
 種類: 特許出願
 番号: 2017-100149
 出願年月日: 平成29年5月19日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

- 1) www.igakuken.or.jp/lipid
 2) www.bb.tokushima-u.ac.jp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 圭 (YAMAMOTO, Kei)
 徳島大学大学院・生物資源産業学研究部・准教授

研究者番号: 30304504