



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                                  |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 脂質の組成／代謝変化による角化症モデルの病態解析 [全文の要約]                                                                                                                                                 |
| Author(s)           | 若林, 雅人                                                                                                                                                                           |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】<br><a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a> |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                            |
| Degree Name         | 博士(生命科学)                                                                                                                                                                         |
| Dissertation Number | 甲第13181号                                                                                                                                                                         |
| Issue Date          | 2018-03-22                                                                                                                                                                       |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/69372">https://hdl.handle.net/2115/69372</a>                                                                                                |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                  |
| File Information    | Masato_Wakabayashi_summary.pdf                                                                                                                                                   |



# 学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 若 林 雅 人

## 学 位 論 文 題 名

### 脂質の組成／代謝変化による角化症モデルの病態解析

角化症は角化異常によって角質層が肥厚する皮膚疾患の総称である。近年、乾燥肌、鱗屑、過角化によって特徴づけられる魚鱗癬や魚鱗癬様の皮膚バリア障害を示す先天性角化症において、表皮の脂質合成／代謝に関わる遺伝子変異が原因として複数報告され、角化症における脂質の重要性が明らかにされてきた。原因遺伝子の機能と病態の関係は調べられているが、脂質変化から病態を調べた報告は少ない。本研究では、希少な先天性角化症であるオルムステッド症候群 (OS；第一章) と後天性角化症に分類される乾癬 (第二章) に着目し、脂質の組成／代謝変化の観点から角化症モデルの病態を調べることとした。

第一章：OS は掌蹠及び口周囲の角化によって特徴づけられ、貧毛と強い痒みを好発する。OS の原因として、温度感受性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル *TRPV3* (transient receptor potential vanilloid subtype 3) の顕性変異 (機能亢進変異) が見つかっている。*TRPV3* は主に表皮基底層のケラチノサイトと毛包に発現し、メバロン酸代謝の中間体であるファルネシル 2 リン酸によって活性化、脂肪酸代謝物の 17(R)-resolvin D1 によって阻害されるなど、脂質との関連性がある。*WBN/Kob-Ht (Ht)* ラットは OS 患者と同じ顕性の *Trpv3* 変異をもつヘアレスラットである。*Ht* ラットは過角化や表皮肥厚といった OS 様症状を示すため、OS モデルとして有用である。OS 様症状は *TRPV3* の機能亢進によって発症するが、その病態形成の分子機構は分かっていない。そこで、脂質組成の観点から OS モデルラットを解析し、OS 病態の根底にある分子変化の理解を目指した。

ヘマトキシリン／エオジン染色によって皮膚組織の形態を観察すると、*Ht* ラット皮疹部では過角化、顆粒球や単球の浸潤などの OS 様症状が認められたのに対し、無疹部では明確な OS 様症状は認められなかった。電子顕微鏡によって *Ht* ラット無疹部の詳細を観察すると、角質層の数が野生型 (WT) ラットに比べてわずかに多く認められた。また、トルイジンブルー、ルナ、マッソントリクローム染色、ミエロペルオキシダーゼ活性測定によって *Ht* ラット無疹部においてマスト細胞、好酸球、コラーゲン、好中球の増加が WT ラットに比べて認められた。*Ht* ラット無疹部では明確な OS 様変化が観察されなかったが、白血球数、線維化、角質層数の増加によって OS 様病態の発症につながる前段階にあると考えられた。そこで、病態発症につながる分子変化を探索するため、液体クロマトグラフ質量分析計を用いたノンターゲット／ターゲット測定によって *Ht* ラット無疹部の脂質を解析した。27 脂質クラス、593 脂質分子種を同定し、その中で、15-リポキシゲナーゼ (15-LOX) 代謝物が *Ht* ラットでは WT ラットに比べて減少率、減少量ともに顕著であった。15-LOX 代謝物は lipoxin A<sub>4</sub>, protectin D1, resolvin D1 といった抗炎症性脂質メディエーターの前駆体であるため、15-LOX 代謝物量の減少と OS 病態との関連が考えられた。さらに本研究では、組織学的／脂質変化に対する知見を深めるため、遺伝子発現変動をマイクロアレイによって解析した。*Ht* ラット無疹部では WT ラットに比べ、ケモカイン (*Ccl20*, *Cxcl1*, *Cxcl2*)、炎症に関連するカルシウム結合タンパク質 (*S100a8*, *S100a9*)、炎症促進性サイトカイン (*Il36b*) が増加していた。ケモカイン、*Il36b* の発現量増加は定量的 RT-PCR によっても確認した。ケモカイン／サイトカインの発現増加は白血球浸潤や炎症との関連が考えられる。また、15-LOX 遺伝子 (*Alox15*, *Alox15b*) の発現量は *Ht* ラット無疹部において WT ラットに比べて顕著に減少して

いた。Ht ラット無疹部における 15-LOX 代謝物量の減少は 15-LOX 遺伝子の発現低下によって起こることが示唆された。

以上のように、OS 病態発症につながる前段階にあると考えられた Ht ラット無疹部において、TRPV3 の機能亢進による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加に応じたカルシウム結合タンパク質の遺伝子発現の増加、ケモカイン／サイトカインの遺伝子発現の増加、抗炎症性脂質メディエーターの前駆体である 15-LOX 代謝物の減少を明らかにした。この炎症促進に傾いた状態が OS 病態発症の引き金となる可能性がある。

第二章：乾癬はケラチノサイトの過剰増殖を伴う炎症性角化症である。乾癬の重症度は肥満、糖尿病、高脂血症との間に正の関連がある。セラミドからスフィンゴミエリンを合成するスフィンゴミエリン合成酵素 2 (SMS2) は肥満、インスリン感受性、炎症に関与する。表皮ではスフィンゴミエリンは皮膚バリア形成に必要なセラミド前駆体である。乾癬と代謝性疾患の関係、代謝性疾患と SMS2 の関係は報告されているが、SMS2 と皮膚病態の関係を調べた報告がない。そこで、本研究ではイミキモド (IMQ) による乾癬様皮膚炎モデルを作製し、脂質の代謝変化 (SMS2 欠損) の観点から乾癬病態への影響を調べることにした。

IMQ 塗布によって 3 種類の乾癬モデルを作製した。これらは、1) 通常食 (ND) または 2) 高脂肪食 (HFD) を与えたマウスの背部に誘発した 2 つの背部乾癬モデル、3) ND を与えたマウスの耳介に誘発した耳介乾癬モデルである。WT マウスの背部乾癬モデルでは、紅斑、表皮肥厚、経皮水分蒸散量 (TEWL) が IMQ 塗布によって増加し、HFD 摂取によって ND 摂取群に比べて増悪した。Sms2 欠損マウスでは ND を摂取した背部及び耳介乾癬モデルにおいて、紅斑、表皮肥厚、TEWL、耳介浮腫が WT マウスに比べて軽減された。HFD を摂取した背部乾癬モデルにおける Sms2 欠損マウスの症状も同様に軽減された。この際、HFD 摂取による体重増加は Sms2 欠損マウスにおいて抑制された。両マウスの症状は HFD 摂取によって増悪したが、Sms2 欠損マウスの方が WT マウスよりも軽く、体重増加の抑制と一致した。これは乾癬の重症度と肥満の間に正の関連がある報告と一致した。

Sms2 欠損マウスの症状軽減に対する理解を深めるため、乾癬病態に関与するサイトカインの発現を調べた。ND を摂取した耳介乾癬モデルでは、Sms2 欠損マウスの IL-17A、TNF- $\alpha$  量が症状の変化と一致して WT マウスに比べて減少した。背部乾癬モデルの HFD 摂取群では、Sms2 欠損マウスの Il17a、Il17c、Il23a の mRNA 発現量及び IL-1 $\beta$  量が症状の変化と一致して WT マウスに比べて減少した。IL-17A や TNF- $\alpha$  を阻害する生物学的製剤は乾癬病態に対して有効であるため、これらサイトカインの減少が Sms2 欠損マウスの症状軽減に一部寄与したと考えられる。次に、背部乾癬モデルの表皮の脂質変化を調べた。皮膚バリア形成に重要なアシルセラミドの量は HFD 群の Sms2 欠損マウスにおいて減少したが、SMS2 の基質であるセラミドや産物であるスフィンゴミエリンの量は Sms2 欠損によって変化しなかった。一方、血清中では Sms2 欠損によってセラミドが増加し、スフィンゴミエリンは減少した。IMQ は塗布した皮膚局所だけでなく、脾臓にも影響するため、両マウスから脾臓細胞を採取し、IMQ に対する応答性を TNF- $\alpha$  分泌によって評価した。その結果、TNF- $\alpha$  分泌は Sms2 欠損マウス由来脾臓細胞において WT マウスに比べて減少した。以上のように IMQ による免疫細胞の炎症応答は Sms2 欠損によって抑制されることが明らかとなった。体重差のある HFD 摂取群だけでなく、体重差のない ND 摂取群においても Sms2 欠損マウスの乾癬様症状が軽減された。本研究では症状軽減に対して TNF- $\alpha$ 、IL-17A 量の減少が寄与していることを示唆し、免疫細胞における炎症応答の抑制が関与している可能性を示した。

2 つの角化症モデルの病態を調べた本研究から、15-LOX 代謝物やその誘導体が OS 病態に関与すること、肥満を伴った乾癬治療に対して SMS2 が産生するスフィンゴミエリンが関与することを明らかにし、脂質代謝制御による角化症治療の可能性を見出した。