HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ω水酸化脂質による体表面透過性バリア形成機構の解明［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	宮本, 政宗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13971号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77840
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Masatoshi_MIYAMOTO_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士　臨床薬学　　氏　名　　宮　本　政　宗

学 位 論 文 題 名

ω 水酸化脂質による体表面透過性バリア形成機構の解明

皮膚と涙液は，体表面透過性バリアとして，体外と体内の物質の移動を制限している。魚鱗癬およびドライアイは，それぞれ，皮膚バリアおよび涙液バリアの破綻によって生じる。皮膚バリアおよび涙液バリア機能の形成と維持には脂質が重要である。皮膚では，最外層の角質層において角質細胞間を満たす脂質ラメラが，涙液では，油層と液層から構成される涙液層の外層側に広がる油層が，それぞれバリアの中心となっている。脂質ラメラは，セラミド，脂肪酸，コレステロールからなる脂質の多層構造体であり，セラミドが重量比で約 50 %を占めている。一方の涙液油層は，コレステロールエステル（CE）やワックスモノエステル（WE）と呼ばれる非極性脂質と(*O*-アシル)-ω-ヒドロキシ脂肪酸（OAHFA）やリン脂質などの両親媒性脂質から構成されている。

バリアの中心を担う脂質ラメラや涙液油層に共通する脂質として，ω 位に水酸基を有する炭素数（C）30–36 のアシル鎖を構造中に含む ω 水酸化脂質が存在する。脂質ラメラにおける ω 水酸化脂質は C30–36 の ω 水酸化脂肪酸，リノール酸，長鎖塩基が結合した ω-*O*-アシルセラミド（アシルセラミド）であり，アシルセラミドの生合成不全は魚鱗癬を生じる。一方の涙液油層においては C30–36 の ω 水酸化脂肪酸ともう 1 分子の脂肪酸が結合した OAHFA が存在する。OAHFA は構造中の疎水鎖と極性基によって両親媒性を示すことから，涙液中で非極性脂質と液層の双方と相互作用することで，涙液層の安定化を担っていると考えられている。しかしながら，OAHFA の生合成経路が未解明であるため，実験的には機能の解明はされていない。

シトクロム P450 の 1 つである CYP4F22 は，アシルセラミド生合成経路において，脂肪酸 ω 位を水酸化する酵素であり，C30–36 の脂肪酸を基質とする。*CYP4F22* は，先天性魚鱗癬の原因遺伝子として同定されており，40 を超す遺伝子変異が報告されている。*CYP4F22* 変異患者では，重症度の異なる様々な魚鱗癬症状が報告されており，重症例であるコロジオン児としての出生もしばしばみられる。しかしながら，遺伝子変異による脂肪酸 ω 水酸化活性への影響は十分に解析されておらず，*CYP4F22* 変異患者におけるアシルセラミド量の測定も，症状の軽度な 1 症例について行われたのみである。

そこで本研究では，*CYP4F22* の完全欠損モデルを作製し，皮膚バリアおよび皮膚形態への影響を明らかにするとともに，アシルセラミド量の定量を行った。さらに，OAHFA が C30–36 の ω 水酸化脂肪酸を構造中に含むことから，CYP4F22 が産生に関わると予測し，*CYP4F22* 欠損モデルを用いた OAHFA 産生経路の解明を行うとともに，涙液バリア形成における OAHFA の寄与を明らかとした。

はじめに，系統樹から *Cyp4f39* がマウスにおける *CYP4F22* のオルソログであると予測し，CRISPR/Cas9 システムによって *Cyp4f39* 欠損マウスを作製した。*Cyp4f39* 欠損マウスでは，ヒト魚鱗癬様の皮膚所見がみられ，顕著な体重減少とともに，出生後 8 時間で致死となった。新生致死の原因を明らかとするため，経表皮水分蒸散量の測定を行った結果，*Cyp4f39* 欠損マウスではコントロールマウスの約 15 倍の値であり，皮膚バリアの異常が示された。*Cyp4f39* 欠損マウスの表皮形態をヘマトキシリン/エオジン染色した結果，脂質ラメラの顕著な減少がみられ，皮膚バリアが破綻していることが明らかとなった。透過型電子顕微鏡による詳細な表皮形態の観察の結果，

角質層数の微増，角質細胞の肥厚，ペリダームの残存，コルネオデスモソームの分解低下が観察された。ペリダームはヒトコロジオン児にみられるコロジオン膜と類似した機構により残存していることが予想される。したがって，*Cyp4f39* 欠損マウスはヒトにおける重症型の魚鱗癬と同様の皮膚障害を示すことが明らかとなった。さらに，液体クロマトグラフィー連結型タンデム質量分析計（LC-MS/MS）によってアシルセラミドの定量を行った。その結果 *Cyp4f39* 欠損マウスでは，コントロールマウスの約 1.5%まで減少しており，*Cyp4f39* がアシルセラミド生合成経路における唯一の脂肪酸 ω 水酸化酵素であることが示された。以上の結果より，*Cyp4f39* の欠損は皮膚 ω 水酸化脂質であるアシルセラミドの著しい減少を生じ，皮膚バリア形成不全と重篤な皮膚障害の原因となることが示された。

つづいて，Cyp4f39 の OAHFA 生合成への関与を明らかとするために，表皮特異的なインボルクリンプロモーター制御下で *Cyp4f39* を発現する *Cyp4f39* 欠損マウス（*Tg-Cyp4f39* 欠損マウス）を作製した。*Tg-Cyp4f39* 欠損マウスは新生致死とはならなかった一方で，涙液の貯留が観察され，涙液層の形成に異常があることが示された。*Tg-Cyp4f39* 欠損マウスに対してフルオレセイン溶液の点眼と細隙灯顕微鏡による観察を行った結果，涙液層破壊時間の短縮と角膜上皮障害スコアの上昇がみられ，ドライアイであることが示された。*Tg-Cyp4f39* 欠損マウスの表現型と OAHFA の関係を明らかとするために，有機化学的な手法で OAHFA 標準品を作製し，LC-MS/MS による OAHFA 分析法を確立し，解析を行った。その結果，マイボーム腺では C16:1 OAHFA が主要に産生され，*Tg-Cyp4f39* 欠損マウスでは約 20%まで減少した。この結果から，*Cyp4f39* が OAHFA 生合成に重要であることが明らかとなり，OAHFA の減少が涙液層の不安定化と涙液層の形成異常を引き起こすことが明らかとなった。本研究ではさらに，油層中に存在が示唆されている Type 1 および Type 2 ワックスジエステル（WdiE）とコレステロール（Chl）OAHFA について，標準品の合成と LC-MS/MS 解析によって構造異性体を含めた詳細な解析を行った。その結果，Type 1ω および Type 2ω WdiE と Chl-OAHFA がマイボーム腺から検出され，*Tg-Cyp4f39* 欠損マウスでは消失していることを明らかとした。したがって，Type 1ω および Type 2ω WdiE と Chl-OAHFA はいずれも Cyp4f39 が産生に関わり，OAHFA 同様，C30–36 の鎖長と ω 水酸基を有する OAHFA 代謝物であることが予想された。これら OAHFA 代謝物は CE や WE と OAHFA の間の極性であった。この知見は，油層中に CE/WE<OAHFA 代謝物<OAHFA という極性勾配が存在する可能性を示唆しており，非極性脂質層から液層にかけての極性勾配が，涙液層の安定化に寄与している可能性が示された。

本研究では，皮膚バリアと涙液バリア双方の形成に C30–36 の ω 水酸化脂質（アシルセラミドおよび OAHFA）が重要であることを見出し，これらの産生不全によって重篤な魚鱗癬およびドライアイを生じることを明らかとした。本研究で得られた知見が，ω 水酸化脂質の塗布や点眼，または合成関連タンパク質の発現を増加させるような治療薬・治療法の開発に貢献することが期待される。