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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13971
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80123
Type	doctoral thesis
File Information	Masatoshi_MIYAMOTO.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

令和元年度

博士学位論文

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

北海道大学大学院　生命科学院

臨床薬学専攻

生化学研究室

宮本政宗

令和 2 年 3 月

目次

略語一覧 4
脚注 6
1. 序論 7
1.1. 体表面透過性バリア 7
1.2. 皮膚バリアと ω 水酸化脂質 7
1.2.1. 皮膚の構造と脂質ラメラの役割 7
1.2.2. 脂質ラメラと ω 水酸化脂質 8
1.2.3. アシルセラミドと魚鱗癬 10
1.2.4. CYP4F22 と **ARCI** 13
1.3. 涙液バリアと ω 水酸化脂質 14
1.3.1. 涙液の機能の概要と構成 14
1.3.2. マイボーム腺の構造 15
1.3.3. マイバム脂質とドライアイ 16
1.3.4. マイバム脂質の構成 17
1.3.5. マイバム脂質の生合成経路 18
1.3.6. 油層における脂質 **2** 層モデルと **OAHFA** の機能 19
1.3.7. 現行のドライアイ治療法 20
1.4. 本研究の目的 21
2. ω 水酸化脂質による皮膚バリア形成機構の解明 23
2.1. 目的 23
2.2. 結果 23
2.2.1. ***Cyp4f39***$^{-/-}$マウスにおける新生致死性と **ARCI** 様の皮膚異常 23
2.2.2. ***Cyp4f39***$^{-/-}$マウスは皮膚バリアの破綻を示す 23
2.2.3. ***Cyp4f39***$^{-/-}$マウスにおける脂質ラメラの消失とペリダームおよびコルネオデスモソームの残存 26
2.2.4. ***Cyp4f39***$^{-/-}$マウスにおけるアシルセラミドのほぼ完全な消失 30

2.2.5. ***Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおける ω-OH セラミドの減少と超長鎖 FA 含有セラミドの増加** 30

2.2.6. ***Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおけるケラチノサイトの分化およびアシルセラミド生合成に関わる mRNA 発現量の微増** 33

2.3. 考察 36

2.3.1. ***Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおける重篤な皮膚障害** 36

2.3.2. ***Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおけるペリダームの残存** 37

2.3.3. ***Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおけるコルネオデスモソームの残存** 38

2.3.4. ***Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおける層板顆粒の成熟不全** 39

2.3.5. 今後の展望 39

2.4. 材料と方法 41

2.4.1. ***Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスの作製** 41

2.4.2. マウスの飼育 41

2.4.3. 皮膚バリアアッセイ 41

2.4.4. 皮膚の形態観察 42

2.4.5. 表皮脂質組成解析 42

2.4.6. 定量的 **RT-PCR** 43

3. ω 水酸化脂質による涙液バリア形成機構の解明 44

3.1. 目的 44

3.2. 結果 44

3.2.1. ***Tg-Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスは眼瞼下垂および涙液の貯留を示す** 44

3.2.2. ***Cyp4f39*** **の欠損はマイボーム腺閉塞を伴うドライアイを生じる** 46

3.2.3. ***Tg-Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおける正常なマイボーム腺および角膜形成とマイバム脂質合成関連遺伝子の発現** 48

3.2.4. ***Cyp4f39*** **の欠損によるマイバム脂質中の C16:1 OAHFA の減少** 49

3.2.5. ***Cyp4f39*** **の欠損によるマイバム脂質中の Type 2ω WdiE の消失** 53

3.2.6. ***Cyp4f39*** **の欠損によるマイバム脂質中の Type 1ω WdiE およびコレステロール OAHFA の消失** 57

3.2.7. ***Tg-Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスにおける CE および WE 量の増加** 59
3.3. 考察 62
3.3.1. マイバム脂質中の ω 水酸化脂質生合成経路 62
3.3.2. 涙液層の形成と OAHFA 65
3.3.3. ω 水酸化脂質を介する油層中の脂質極性勾配の形成 66
3.3.4. 今後の展望 67
3.4. 材料と方法 69
3.4.1. ***Tg-Cyp4f39***$^{-/-}$**マウスの作製** 69
3.4.2. イムノブロッティング 69
3.4.3. BUT の測定と角膜上皮障害のスコア化 70
3.4.4. 涙液量の測定 70
3.4.5. マイボーム腺および角膜のヘマトキシリン/エオジン染色 70
3.4.6. 定量的 RT-PCR 70
3.4.7. LC-MS/MS による脂質解析 71
3.4.8. マイバム脂質の TLC による分離 71
3.4.9. OAHFA および Type 2 WdiE の合成 72
5. 表一覧 75
6. 参考文献 90
謝辞 99

略語一覧

ABC	ATP binding cassette
ABHD	α / β hydrolase domain containing
ADDE	aqueous deficient dry eye
ALOX	arachidonate lipoxygenase
ARCI	Autosomal recessive congenital ichthyosis
AWAT	acyl-CoA wax alcohol acyl transferase
BUT	tear film breakup time
CE	cholesteryl ester
CERS	ceramide synthase
Chl	cholesterol
CIE	congenital ichthyosiform erythroderma
CoA	coenzyme A
CYP	cytochrome P450
DEWS	dry eye work shop
EDE	evaporative dry eye
ELOVL	elongation of very long chain fatty acid
FA	fatty acid
FAl	fatty alcohol
FAR	fatty acyl-CoA reductase
FATP	fatty acid transport protein
GBA	glucosylceramidase
HI	harlequin ichthyosis
KLK	kallikrein regulated peptidase
LC	long chain
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
LEKTI	lympho epithelial kazal type inhibitor
LI	lamellar ichthyosis
MGD	meibomian gland dysfunction
MRM	multiple reaction monitoring
NMP	1-metyl-2-pyrrolidone
OAHFA	(*O*-acyl)- ω -hydroxy fatty acid
PAM	protospacer adjacent motif
PBS	phosphate buffered saline
PNPLA	patatin like phospholipase domain containing lipase

RT-PCR	revers transcription PCR
SDR	short chain dehydrogenase/reductase
SHCB	self healing collodion baby
SICB	self improving collodion baby
SOAT	sterol *O*-acyl transferase
SPF	specific pathogen free
SPINK	serine protease inhiditor kazal type
TEWL	trans epidermal water loss
TFOS	tear film ocular surface
TLC	thin layer chromatography
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
ULC	ultra long chain
UPLC	ultra performance liquid chromatography
VLC	very long chain
WdiE	wax diester
WE	wax ester
α-OH	alpha hydroxy
ω-OH	omega hydroxy

脚注

本研究では，ヒトタンパク質をすべて大文字で表記し，マウスタンパク質は頭文字のみ大文字で表記する。マウスタンパク質もすべて大文字で表記する規定があるが，ヒトタンパク質との混同を避けるための措置である。遺伝子についてもタンパク質同様，ヒト遺伝子はすべて大文字，マウス遺伝子は頭文字のみ大文字とし，イタリックで表記する。

また，本稿は 1. ω 水酸化脂質による皮膚バリア形成機構の解明，2. ω 水酸化脂質による涙液バリア形成機構の解明の 2 部構成となっている。序論のみ共通の章をとり，目的，結果，考察，材料と方法については 2 部間で独立している。

1. 序論

1.1. 体表面透過性バリア

物質の透過を制限するための構造体を物質透過性バリア（透過性バリア）と呼ぶ[1)]。人体においては，様々な組織や構造体が透過性バリアとして機能しており，血液脳関門や血液胎盤関門は，物質の組織から組織への移行を制限するという点で，体内における透過性バリアと言える。そういった透過性バリアの中でも，皮膚と涙液は，“体表面”におけるバリアである。人体は，恒常的に細菌やウイルスといった微生物，アレルゲン，化学物質など，様々な異物に曝露されている。また，陸上環境は非常に乾燥した環境であり，体内からの水分の損失は致命的である。体表面透過性バリアは，こういった外界からの異物の侵入や，体内からの水分の蒸散を防ぐために，ヒトを含む陸生動物にとって非常に重要である。

1.2. 皮膚バリアと ω 水酸化脂質

1.2.1. 皮膚の構造と脂質ラメラの役割

体表面透過性バリアの 1 つである皮膚は，表皮，真皮，皮下組織に分けられ，最も表層側を覆っている表皮は，内側から基底層，有棘層，顆粒層，角質層の 4 層で構成されている[1,2)]（図 1）。表皮は主に角化細胞（ケラチノサイト）で構成されており，基底層で分裂，増殖する。増殖したケラチノサイトは分化しつつ上層へと移動する。細胞の形態も分化段階に応じて変化していき，上層になるにつれて扁平化していく。ケラチノサイトは分化段階によって層が区分されており，ヒト表皮では，比較的分化初期の有棘層は 5–10 層，成熟が進み，脂質の合成が活発になる顆粒層は 2–3 層となっている。ケラチノサイトは最終的に脱核し，無核の角質細胞となり，角質層を構成する。

角質層は，皮膚バリアとして非常に重要であり，ヒトでは約 10 層の重層化した角質細胞と角質細胞間をみたす脂質構造体から構成されている。角質細胞はケラチン繊維とフィラグリンからなる細胞骨格で形成されており，細胞膜の裏打ち構造として主にインボルクリンやロリクリンで構成される周辺帯が存在する[1)]。さらに，周辺帯をプラットフォームとして，コルネオデスモソームが角質細胞間接着を担い，脂質エンベロープが角質細胞膜を形成している[3)]。角質細胞間脂質は，スフィンゴ脂質の疎水性骨格であるセラミドと，脂肪酸，コレステロールから構成されており，モル比で 1:1:1 となっている。セラミドの存在量は，モル比では約 30%であるが，重量比では実に 50%を占めており[4)]，角質細胞間脂質における中心的な脂質クラスとなっている。角質細胞間脂質は，セラミド，脂肪酸，コレステロールがラメラ状の脂質多層構造をとることから，脂質ラメラと呼ばれる。脂質ラメラを構成する脂質は，炭化水素鎖による疎水部と，水酸基やカルボン酸による極性部をもっており，極性基間の相互作用と疎水基同士の

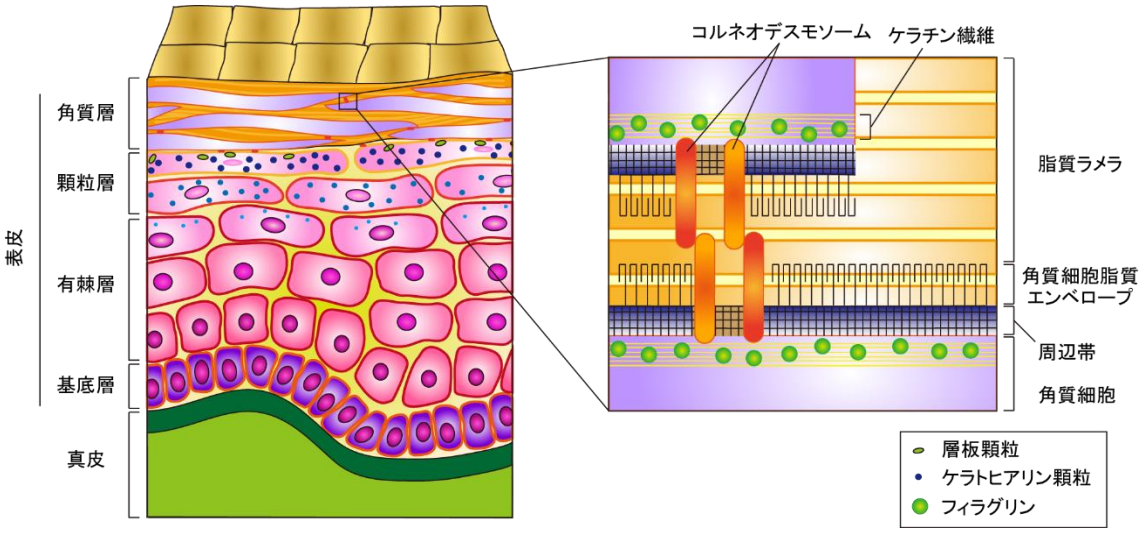


図 1. 皮膚の構造

皮膚全体の構造モデル図（左図）。皮膚は表皮と真皮から構成されている。表皮は角質層，顆粒層，有棘層，基底層の 4 層からなる。角質層の構造モデル（右図）。角質細胞の細胞骨格はケラチン繊維とフィラグリンにより形成されており，裏打ち構造として周辺帯が存在する。角質細胞表面は角質細胞脂質エンベロープが覆っており，角質細胞間は脂質ラメラと呼ばれる脂質多層構造が満たしている。角質細胞同士はコルネオデスモソームによって接着されることで，剥離が防止されている。

相互作用が交互に繰り返されることでラメラ構造となっている [5,6]。そのため脂質ラメラは，多層構造と疎水性によって，外部からの物質の透過とともに体内からの水分の蒸散を制限しており，皮膚バリアの中心的な役割を果たす。実際に，脂質ラメラの形成異常は魚鱗癬を生じることからも，皮膚バリアにおいて重要な構造体と言える [1]。

1.2.2. 脂質ラメラと ω 水酸化脂質

脂質ラメラの構成要素の 1 つであるセラミドは，長鎖塩基と脂肪酸（FA）がアミド結合した構造からなる疎水鎖 2 本構造である [1]。セラミドは，長鎖塩基と FA の分子種の違いにより多様なクラスが存在する。セラミドを構成する長鎖塩基は，アミノ基とヒドロキシ基を同一構造内にもつアミノアルコールであり，水酸基の数や不飽和度の異なる分子種が存在する。哺乳類には 4 つの分子種が存在し，2 つの水酸基と飽和の炭素鎖をもつジヒドロスフィンゴシン，ジヒドロスフィンゴシンの 4 位に 2 重結合が導入されたスフィンゴシン，同じく 4 位が水酸化されたフィトスフィンゴシン，スフィンゴシンの 6 位に水酸基をもつ 6-ヒ

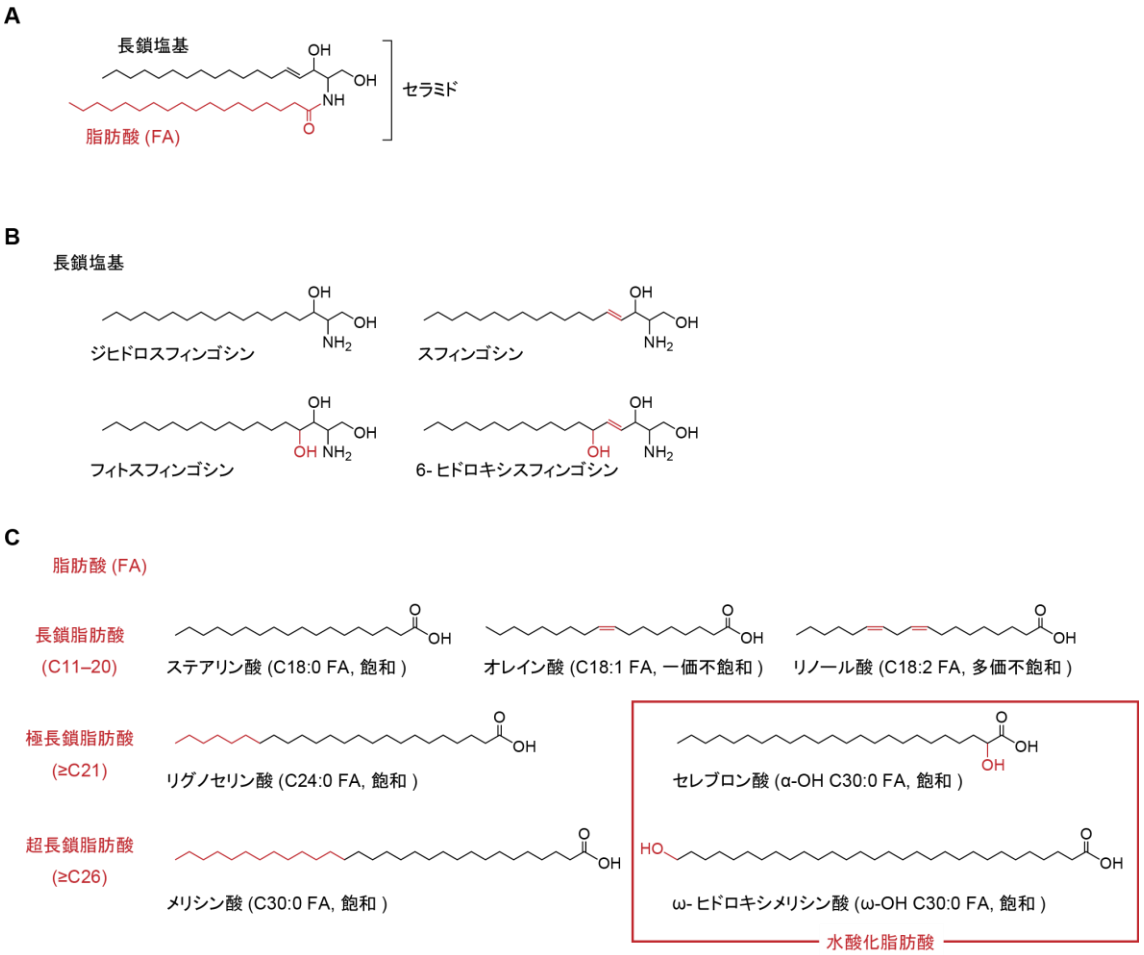


図 2. セラミドを構成する長鎖塩基および FA の構造

（A）セラミドの構造。セラミドは長鎖塩基と FA のアミド結合により形成されている。（B）哺乳類が持つ代表的な長鎖塩基の構造。（C）FA の分類および構造と代表的な分子種。

ドロキシスフィンゴシンが知られている（図 2A）[1]。長鎖塩基は，パルミトイル CoA（C16:0-CoA）とセリンのクライゼン型縮合によって，セリンに由来する 2 炭素の伸長によって産生されるため，C18 の分子種が主要である [1]。一方の FA は，鎖長，不飽和度，水酸基の位置や有無によって分類されている。鎖長による分類では長鎖（C11–20）FA，極長鎖（≥C21）FA などがあり，極長鎖 FA の中でも特に≥C26 の鎖長をもつものは，超長鎖 FA とも呼ばれる（図 2B）。不飽和度による分類では，二重結合をもたない飽和型 FA に対し，二重結合数によって，一価不飽和型または，それより多い多価不飽和型がある。水酸基を有する FA は水酸化 FA と呼ばれ，水酸基の位置の異なる α 水酸化（α-OH）FA，ω 水酸化（ω-OH）FA の 2 つが知られている [1]。

セラミドクラスの中でも，ω-OH FA の ω 末端にさらにリノール酸が結合したものが表皮特異的に存在する [1,7]。ω 位がアシル化されたセラミドであることから，ω-*O*-アシルセラミド（以下アシルセラミド）と呼ばれるこのセラミドクラスは，ω-OH FA を構造中に含んでいることから，ω 水酸化脂質に分類される。アシルセラミドには 2 つの特徴があり，1 つは前述した ω-OH FA を含むことであるが，もう 1 つは C30–36 の ω-OH 超長鎖 FA をもつことである。アシルセラミドの生合成経路は，その大部分がすでに解明されており，脂肪酸伸長酵素 ELOVL1 および ELOVL4 によるアシル CoA の C30–36 への伸長反応，CoA の脱離，脂肪酸 ω 水酸化酵素 CYP4F22 による ω 末端の水酸化，FATP4 による CoA 付加（当研究室投稿中データ），セラミド合成酵素 CERS3 による長鎖塩基との縮合，PNPLA1 と ABHD5 によるアシル基転移反応の 6 つのステップからなる（図 3）[1,8-10]。アシルセラミドは，長鎖塩基，ω-OH 超長鎖 FA，リノール酸の 3 本の疎水鎖と，長鎖塩基の持つ水酸基の極性によって，脂質同士の強固な疎水性相互作用と，極性基を介した水素結合によって，ラメラ構造形成に非常に有利な構造と考えられる。したがってアシルセラミドは，皮膚バリア形成，特に脂質ラメラ形成に重要な脂質であり，減少や消失は魚鱗癬の原因となる [1,7]。

1.2.3. アシルセラミドと魚鱗癬

魚鱗癬は，臨床像として皮膚の乾燥，過角化，鱗屑および落屑を生じる皮膚疾患の総称であり，過角化した皮膚が魚の鱗状に見えることからこの名がつけられている [11]。魚鱗癬のうち，遺伝子変異によって先天的に発症するものを先天性魚鱗癬と呼ぶ。先天性魚鱗癬には様々な病型が存在している。最も患者数の多い尋常性魚鱗癬は先天性魚鱗癬の中では比較的軽度な病型であり，原因遺伝子としてフィラグリンをコードする *FLG* やカスパーゼ 14 をコードする *CASP14* 遺伝子の変異が知られている [12,13]。フィラグリンはケラチンとともに角質細胞骨格を形成するタンパク質であり，カスパーゼ 14 は角質層におけるフィラグリン代謝に関わっている。尋常性魚鱗癬を含む，症状が皮膚に限局した魚鱗癬を非症候性魚鱗癬と分類し，皮膚以外の組織においても何らかの症状を有するものを症候性魚鱗癬と呼ぶ。常染色体潜性先天性魚鱗癬（ARCI, autosomal recessive congenital ichthyoses）は非症候性魚鱗癬に分類され，さらに詳細な病型分類としては道化師様魚鱗癬（HI, harlequin ichthyosis），葉状魚鱗癬（LI, lamellar ichtyosis），先天性魚鱗癬様紅皮症（CIE, congenital ichthyosiform erythroderma）に大別される [14,15]。HI は，ARCI の中で最も重症度の高い病型であり，非常に分厚い皮膚の肥厚化を生じ，過角化した部分には裂孔もみられる。それに対して LI と CIE は，HI ほど顕著な過角化は示さないものの，重症例ではコロジオン膜に覆われたコロジオン児としての出生がみられることが特徴である。LI においては鱗屑が比

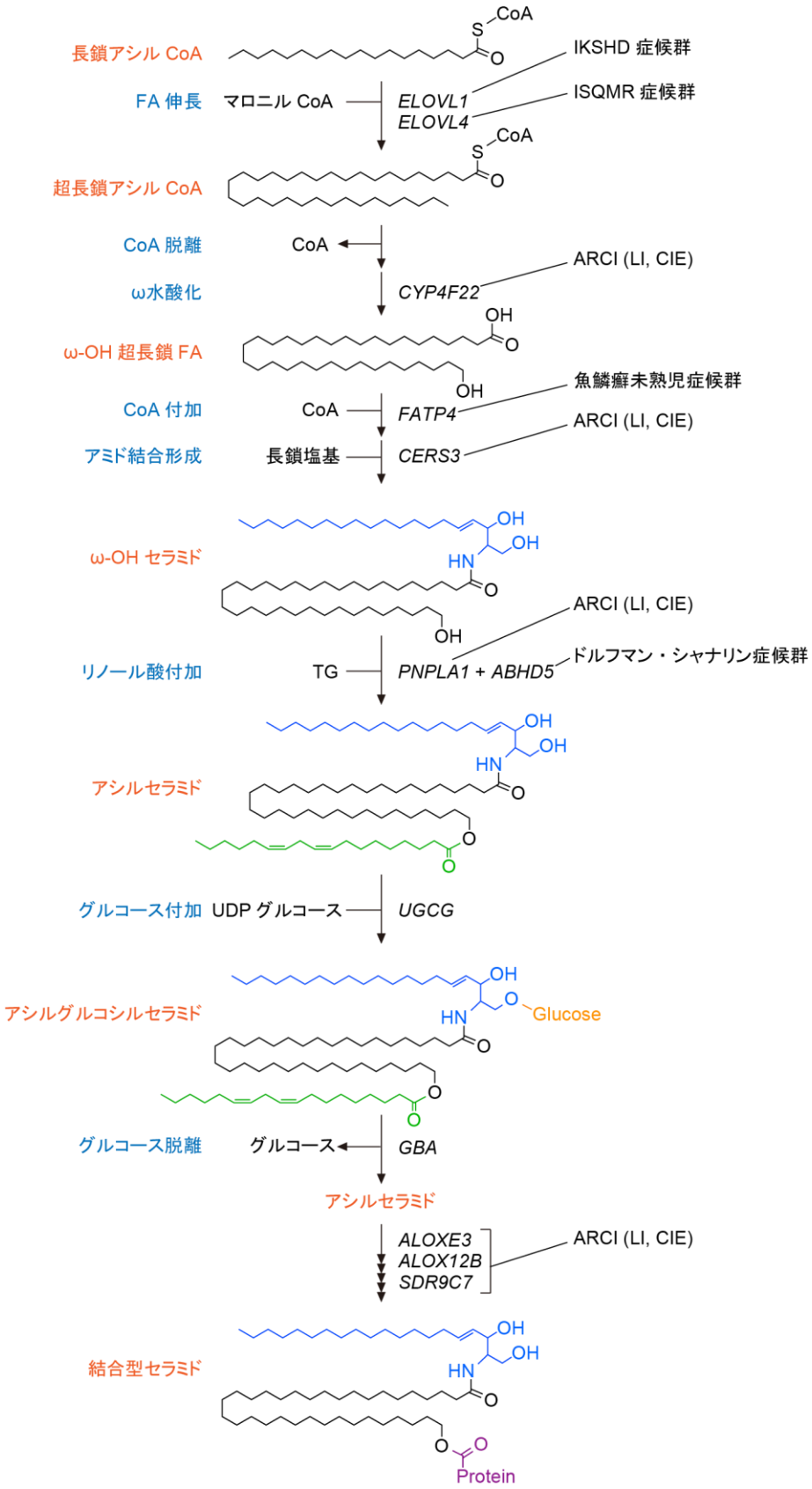

長鎖アシル CoA
CoA
S
O
IKSHD 症候群
FA 伸長
マロニル CoA
ELOVL1
ELOVL4
ISQMR 症候群
超長鎖アシル CoA
CoA 脱離
CoA
ARCI (LI, CIE)
ω水酸化
CYP4F22
ω-OH 超長鎖 FA
OH
魚鱗癬未熟児症候群
CoA 付加
FATP4
アミド結合形成
長鎖塩基
CERS3
ARCI (LI, CIE)
ω-OH セラミド
HN
リノール酸付加
TG
PNPLA1 + ABHD5
ドルフマン・シャナリン症候群
アシルセラミド
グルコース付加
UDP グルコース
UGCG
アシルグルコシルセラミド
Glucose
グルコース脱離
グルコース
GBA
アシルセラミド
ALOXE3
ALOX12B
SDR9C7
結合型セラミド
Protein

図 3. アシルセラミドおよび結合型セラミド生合成経路と魚鱗癬

長鎖アシル CoA は ELOVL1, ELOVL4 によって超長鎖アシル CoA まで伸長される。CoA の脱離により超長鎖 FA となったのちに，CYP4F22 によって ω 位が水酸化され，超長鎖 ω-OH FA となる。ω-OH FA は FATP4 によって再度 CoA 付加を受けたのち，CERS3 によって長鎖塩基と縮合することで ω-OH セラミドが産生される。PNPLA1 および ABHD5 によって最終的に ω 位末端にリノール酸が付加することでアシルセラミドが合成される。アシルセラミドは，UGCG によるグルコシル化を受けたのちに角質層に放出され，GBA で糖が脱離されることで再度アシルセラミドとなる。角質層内のアシルセラミドは脂質ラメラの構成脂質となるか，または ALOXE3，ALOX12B，SDR9C7 による代謝を受け，結合型セラミドとなる。先天性魚鱗癬の原因遺伝子については，変異による魚鱗癬病型を遺伝子の右側に示す。

較的大きく，名前の通り葉状または板状をしていること，また，鱗屑下の皮膚に発赤や紅潮がみられない点が CIE と異なる。一方の CIE では，紅潮などの紅皮症症状が顕著であり，細かい鱗屑がみられる。

アシルセラミドと先天性魚鱗癬の発症には密接な関係があり，アシルセラミド生合成に関わる遺伝子はいずれも，先天性魚鱗癬の原因遺伝子として同定されている。脂肪酸 ω 水酸化を担う *CYP4F22*，ω 水酸化セラミドの合成を担う *CERS3*，アシルセラミド生合成の最終ステップである ω 水酸化セラミドへのリノール酸付加を担う *PNPLA1* の 3 つの遺伝子変異は，いずれも ARCI を生じ，病型としては LI や CIE が認められる [14,15]。さらに，アシル CoA の伸長を担う *ELOVL1* と *ELOVL4*，CoA 付加を担う *FATP4*，*PNPLA1* と共同してアシルセラミド合成を担う *ABHD5* もまた，IKSHD 症候群や ISQMR 症候群，魚鱗癬未熟児症候群，ドルフマン・シャナリン症候群といった症候性魚鱗癬の原因遺伝子である [16-19]。

アシルセラミドの生合成は，ケラチノサイトの分化が進んでいる有棘層の上層から始まり，主に顆粒層で行われる。生合成されたアシルセラミドは，そのまま角質層に輸送されるわけではなく，UDP-グルコースのセラミドへの転移酵素である UGCG によってアシルグルコシルセラミドとなったのちに，ABC トランスポーターの 1 つである ABCA12 によって，層板顆粒内に取り込まれる [1]。詳しい機構は明らかとはなっていないものの，アシルグルコシルセラミドは層板顆粒に取り込まれた状態で顆粒層の最上層まで移動したのち，顆粒層と角質層の細胞間隙に放出され，2 つの経路で代謝される。1 つは，グルコセレブロシダーゼ GBA によって糖が脱離し，アシルセラミドとして脂質ラメラ形成に関わる

ことであり（図 3），もう 1 つは，ALOXE3，ALOX12B，SDR9C7 によるエポキシ化，水酸化，酸化を経て，角質細胞表面のタンパクと結合した結合型セラミドとなる経路である [1,20,21]。結合型セラミドは，角質細胞表面を覆う角質細胞脂質エンベロープを構成している。結合型セラミドの生合成に関わる *ABCA12* や *ALOXE3*，*ALOX12B*，*SDR9C7* も ARCI の原因遺伝子となっており，*ABCA12* 変異では HI を，*ALOXE3*，*ALOX12B*，*SDR9C7* 変異では LI や CIE を発症することが知られている [14,15,22]。したがって，結合型セラミドもまた皮膚バリア形成に重要であり，アシルセラミドは脂質ラメラ形成に加えて，結合型セラミドの原料となるという点でも皮膚バリア形成に重要であることが伺われる。

1.2.4. CYP4F22 と ARCI

CYP4F22 はシトクロム P450 の 1 つであり，C30–36 の FA を基質に，ω 位の水酸化反応を担うことを，2015 年に当研究室で報告している [23]。CYP4F22 は N 末端を小胞体内腔側に，C 末端をサイトゾル側に持つ一回膜貫通タンパク質である。膜貫通領域は N 末端近傍にあるため大部分がサイトゾル側に露出しており，活性中心であるヘム結合部位は C 末端近くに存在している [23]。アシルセラミド生合成経路における超長鎖アシル CoA の産生を担う ELOVL1 および ELOVL4 はいずれも小胞体に局在する膜タンパクである。したがって，CYP4F22 は，小胞体膜上に露出した超長鎖 FA の ω 末端を水酸化しているものと考えられる。産生された ω-OH FA はそのまま小胞体膜で ω-OH セラミドまで代謝され，最終的に膜上に露出した ω 水酸基に対して PNPLA1 によってリノール酸が転移することでアシルセラミドが産生されることが予想されている [23]。

CYP4F22 が ARCI の原因遺伝子として初めて報告されたのは，2006 年である [24]。その後，1 塩基置換によるミスセンス変異，ナンセンス変異，フレームシフト変異や，より大きな欠失など，多くの変異が見つかり，現在では 40 を超す変異が報告されている [25]。一方で *CYP4F22* 変異患者では，症状や経過の異なる様々な臨床像が報告されている。これまでに *CYP4F22* 変異患者で報告されている所見として最も多いものは，比較的軽度な LI や CIE であるが，コロジオン児として出生する重症例も見られる [25,26]。さらに，コロジオン児として出生したのちに症状が大きく好転し，治癒または，軽快する SHCB（Self Healing Collodion Baby）や SICB（Self Improving Collodion Baby）も報告されている [27]。このような重症度の違いは，*CYP4F22* 遺伝子変異による酵素活性低下の程度が影響していることが予想されるものの，現在のところ遺伝子変異と酵素活性および症状の相関は明らかにされていない。

CYP4F22 変異による酵素活性への影響は，脂肪酸 ω 水酸化の異常によるアシルセラミド量の変化を生じることが予測されるが，変異患者における表皮アシ

ルセラミド量の測定は現在のところ 1 症例のみである [23]。この症例は，1 塩基置換によるミスセンス変異と欠失によるフレームシフト変異が原因の症例であり，症状としては軽度であった。これらの *CYP4F22* 変異体を作製し，*in vitro* での活性測定を行った結果，アシルセラミドの産生能が 4–20%に低下しており，明らかに酵素活性が低下していた。なお，患者表皮のアシルセラミド量についても 10 分の 1 程度まで減少していることが報告されている [23]。しかしながらこの結果は，言い換えるならば活性がわずかに残存しており，アシルセラミドについても消失していないことを示している。先天性魚鱗癬原因遺伝子の大部分は，マウスを用いた遺伝子欠損モデルが作製されており，脂質ラメラの消失や過角化など，先天性魚鱗癬様の症状が確認されている [28-34]。その一方で，*CYP4F22* に関しては，いまだに遺伝子の完全欠損モデルは作製されておらず，完全に酵素活性が消失した状態での皮膚バリアへの影響や，形態的な変化，また，アシルセラミド量については解析がされていない。

1.3. 涙液バリアと ω 水酸化脂質

1.3.1. 涙液の機能の概要と構成

涙液は，異物が直接眼球に接触しないように排除する他，眼球表面，特に角膜の乾燥を防ぐ役割を担っている。特に眼球表面からの水分の損失を抑制するという点で，体表面透過性バリアの 1 つと言える。涙液層は厚さ約 3 μm であり，脂質からなる油層，水分を中心とする水層，ムチンの分散しているムチン層の 3 層から構成されている（図 4）[35-37]。

最外層の油層は，外界と接する 0.05 μm 程度の層であり [38]，油層より下の水層やムチン層からの水分の蒸発を防ぐとともに，表面張力を下げることで，涙液層全体の安定性を維持している [39]。眼球表面の乾燥を防ぐという涙液の役割にとって，水分の透過を制限する油層は，涙液バリアの中心となる。油層は様々な脂質によって形成されており，上下眼瞼に存在するマイボーム腺で産生・分泌される [40]。

油層の直下に位置する水層は，主涙腺や一部は杯細胞から分泌される。水層には水分の他にも電解質や酸素，種々の生理活性物質が含まれており，角膜への酸素や栄養の供給を担っている。他にも，水層に含まれる生理活性物質には，アルブミンや免疫グロブリンの他，リゾチームやラクトフェリンのような抗菌ペプチド，表皮成長因子などがあり，角膜上皮の増殖や角膜上皮の損傷治癒など多くの働きに関わっている [41]。

最下層のムチン層は，主に眼瞼結膜に存在する杯細胞から分泌されるムチンを多く含む層である。ムチンはコアタンパクに無数の糖鎖が結合した高分子糖タンパクであり，大きく膜型ムチンと分泌型ムチンの 2 種類が存在する。膜型

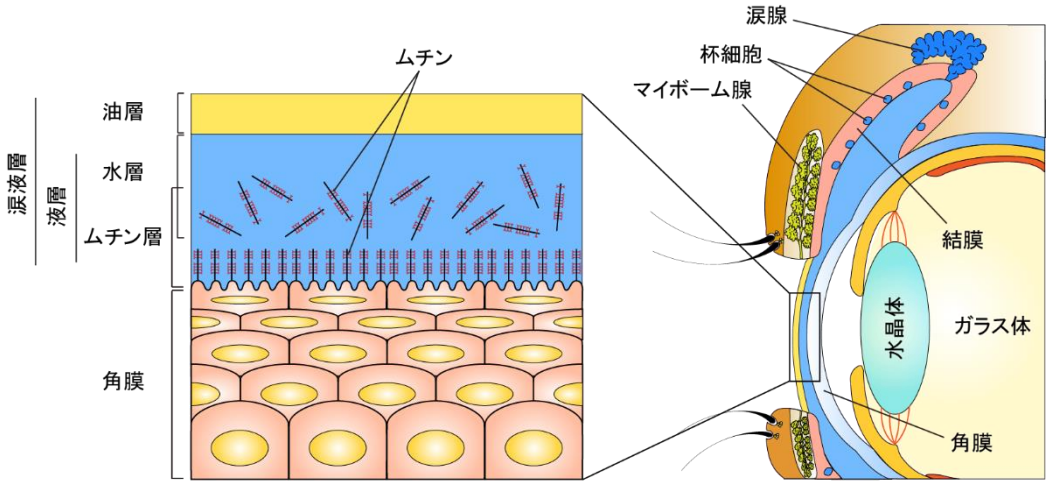


図 4. 涙液層の構造

角膜表面を覆う涙液は，油層，水層，ムチン層の 3 層から構成されている。水層とムチン層を合わせて液層と呼ぶ場合もある。涙液層モデルを左図に示す。眼および眼付属器官として涙液を分泌する涙液や杯細胞，油層を構成するマイバム脂質を分泌するマイボーム腺が存在する。眼および眼付属器官の位置関係の模式図を右図に示す。

ムチンは角膜上皮で産生され，角膜上皮に結合しており，水分の保持や瞬目動作時に眼瞼結膜と角膜上皮の接触を防ぐ役割がある。一方の分泌型ムチンも膜型ムチン同様に水分の保持に働き，水層中に広く分散している [42]。水層とムチン層の境界はあいまいであり，水層とムチン層をまとめて液層と呼ぶことがある。

1.3.2. マイボーム腺の構造

マイボーム腺は，油層を構成する脂質のほぼすべてを産生・分泌している。マイボーム腺からの分泌物はマイバムと呼ばれ，マイバム中の脂質をマイバム脂質と呼ぶ。マイボーム腺は，マイバム脂質の合成と蓄積を行う腺房と，分泌されたマイバム脂質の通り道である導管で構成されている（図 5）[40]。マイボーム腺は，上下眼瞼の結膜側に分布しており，開口部は睫毛よりも内側にある。上下眼瞼では，マイボーム腺の発達の程度が異なり，総じて上眼瞼で発達が良い。そのため，ヒトのマイボーム腺数は上眼瞼で 25–40 個，下眼瞼で 20–30 個，導管の長さは上眼瞼の中央部で約 5.5 mm，下眼瞼の中央部では約 2 mm 程度となっている [40]。腺房の大きさは，上下眼瞼とも変わらず，直径 150–200 μm となっており，個数は導管の長さに比例する。マイバム脂質を合成する腺房は球状の組織で，構成細胞はマイボサイトと呼ばれる。腺房の最外層は単層であり，基底細胞とも呼

ばれ，マイボサイトが増殖・分裂している。マイボサイトはさらに分化しながら

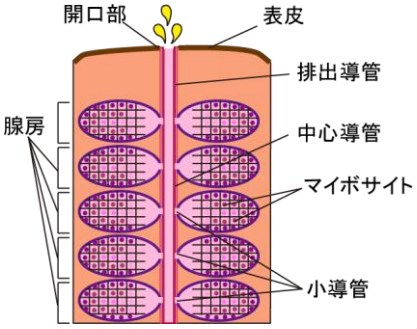


図 5. マイボーム腺の構造

マイボーム腺の模式図を示す。マイボーム腺は主に腺房と導管で構成されている。腺房は，主にマイボサイトで構成されており，最外層のマイボサイトは基底細胞と呼ばれ，分裂・増殖する。マイボサイトは分化しながら中心方向に移動し，最終的に核を失う。成熟したマイボサイトは全分泌の形式で蓄積した脂質を放出する。導管には，小導管，中心導管，排出導管があり，小導管は腺房から分泌された脂質の通り道として中心導管とつながっている。中心導管はすべての小導管と接続されている。最も眼瞼縁に近い導管部は排出導管と呼ばれ，開口部につながっている。

マイバム脂質を合成・貯蔵し，腺房の中心部に向かって移動する。成熟したマイボサイトは最終的に死細胞となるため，顕微鏡では核を失った構造がみられる。蓄積されたマイバム脂質は，全分泌の形式で放出されることが知られているが[40]，全分泌に至る詳細な機構は現在のところ明らかになっていない。分泌されたマイバム脂質は，小導管を通り，中心導管に至る。中心導管は，各腺房で産生されたマイバム脂質が集まる直径 100–150 μm の管状組織であり，表皮と同じ角化型扁平上皮で構成されている。マイバム脂質は最終的に中心導管周辺の筋層が発達した排出導管を経て，開口部から眼球表面に分泌される。中心導管から排出導管壁の過角化は，マイボーム腺からのマイバム脂質の分泌を低下させる原因となる[40]。

1.3.3. マイバム脂質とドライアイ

2017 年にドライアイの世界的な基準をまとめている DEWS（Dry Eye Work Shop）の報告書が改定され，“TFOS DEWS Ⅱ Report”が発行された。その報告の中で，ドライアイの定義についても改訂があり，“ドライアイは，涙液層の恒常性の破綻に特徴づけられた多因子性の眼球表面の異常症で，何らかの自覚症状があり，涙液層の不安定化，高浸透圧，眼球表面の炎症症状や障害，知覚神経異常が原因となるもの”となっている[43]。

ドライアイの患者数は年々増加傾向にあり，国や地域によって違いはあるものの，人口の 7–33%で罹患していることが報告されている[44,45]。ドライアイには涙液減少型（ADDE, Aqueous Deficient Dry Eye）と蒸発亢進型（EDE, Evaporative

Dry Eye）の 2 つの病型が存在する[46,47]。ADDE は，涙液量自体の減少が原因のドライアイを指し，涙腺を含む外分泌腺の炎症により腺組織が破壊され，分泌能を失う自己免疫疾患であるシェーグレン症候群と，それ以外の非シェーグレン症候群型に分類される[47]。非シェーグレン症候群型の原因としては涙腺導管部の閉塞などによる涙腺機能異常が挙げられる。一方の EDE は，涙腺機能に異常はなく，涙液中の水分の蒸散が亢進した状態を指す。EDE の原因は内因性と外因性の 2 つに分けられ，閉眼不全や瞬目不全，マイボーム腺閉塞などに起因するマイボーム腺機能不全（MGD, Meibomian Gland Dysfunction）が内因性に分類され，コンタクトレンズの使用やビタミン A 欠乏症などが外因性に分類される[47]。TFOS DEWS Ⅱ Report において ADDE と EDE では EDE の方が多いと記述されており，EDE が 35.8–58%，ADDE と EDE の合併例が 25.4–30.5%，ADDE が 3.5–10.3%とする報告がある[47,48]。EDE の中でも，MGD を呈する割合は非常に高く，シェーグレン症候群を呈する症例を除くドライアイ患者の 87%（MGD 単発，EDE かつ MGD，ADDE かつ MGD）にみられることが報告されている[49]。MGD では，マイバム脂質の分泌減少が生じるが，その原因としてはマイボーム腺の閉塞や腺組織の萎縮，先天性異常が挙げられ，不快感や異物感などの自覚症状を呈し，血管拡張や眼瞼縁の不整，マイボーム腺開口部の閉塞やマイバム脂質の圧出低下などの異常所見がみられる。この様に，マイバム脂質の質的・量的な維持は，ドライアイの防止に重要であり，MGD（特にマイバム脂質の分泌異常）によるドライアイは患者数の多さからも，大きな問題と言える。

1.3.4. マイバム脂質の構成

マイボーム腺から分泌されるマイバム脂質は，多彩な脂質クラスから構成されている（図 6）。マイバム脂質中に最も豊富に存在する脂質クラスはコレステロール（Chl）と FA が結合したコレステロールエステル（CE）であり，マイバム脂質全体の 30–67%を占めると言われている[50,51]。脂肪族アルコール（FAl）と FA が結合した脂質クラスはワックスモノエステル（WE）と呼ばれ，マイバム脂質中に 25–48%存在し，CE と WE でマイバム脂質全体の大部分を占める[50,51]。その一方で，CE や WE 以外の様々な脂質クラスの存在も報告されている。代表的な脂質クラスとしては ω-OH FA の ω 末端にもう 1 分子の FA が結合した(*O*-アシル)-ω 水酸化脂肪酸（OAHFA）が知られており，マイバム脂質全体の 1–5%と報告されている[51]。その他にもトリアシルグリセロール，Chl，ワックスジエステル，コレステロールジエステルの存在が示唆されている。また，油層中には遊離の FA はほとんど存在しないとされており，1%未満であるとする報告がある[51]。

マイバム脂質の詳細な分子種解析は，存在比の高い CE や WE については進ん

でおり，鎖長としては C26 程度の分岐鎖 FA（特に *iso* タイプ）を含む分子種が多いことが明らかとなっている [52]。CE や WE の分子種解析は，ガス-液体クロ

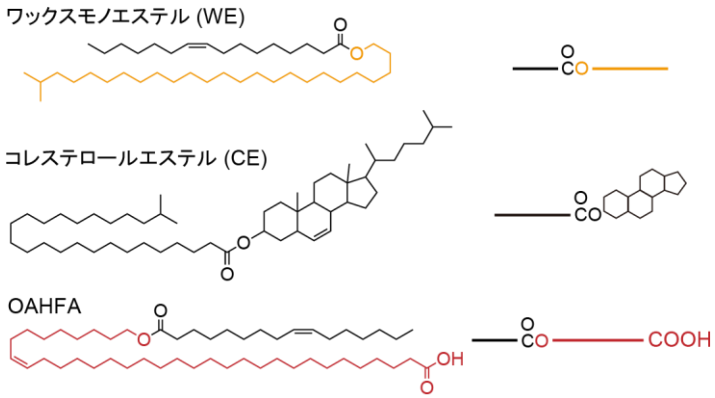


図 6. 主要なマイバム脂質の構造
マイバム脂質中の主要な脂質クラスの構造（WE, CE, OAHFA）を示す。各構造式の右に簡略化した模式図を示す。図中の橙色は FAl を，赤色は水酸化 FA を示す。

マトグラフィーが用いられていた 1980 年代から現代に至るまで検討が続いている。MS/MS や MS^n といった質量分析技術の大幅な発展によって，近年では様々な組織において脂質組成が明らかになりつつある。しかしながら，多様な脂質クラスからなるマイバム脂質については，構造異性体の分離分析など，十分に解明されていない点も多い。その原因の 1 つとして，標準品の不足が挙げられる。現在，Chl や FA など全身に広く存在する脂質クラスと CE や WE については数多くも標準品が市販されており，十分な分離分析が可能であるが，OAHFA やワックスジエステル，コレステロールジエステルの標準品は存在せず，MS によるフラグメントイオン解析により存在を示唆する報告は増えてきている一方で [51,53]，エステル結合の位置異性体などの構造異性体の分離に成功したという報告はない。

1.3.5. マイバム脂質の生合成経路

各マイバム脂質の生合成経路については，いまだに不明な点も多い。CE や WE はいずれも，超長鎖 FA（または FAl）をもつことから，脂肪酸伸長酵素 ELOVL の関与が予想されていた。当研究室で作製した *Elovl1* 欠損マウスのマイバム脂質では，≥C24 の CE，≥C26 の WE に顕著な減少がみられ，それより短い鎖長をもつ分子種には蓄積がみられた [54]。また，飽和型の FAl をもった WE，同じく飽和型の FA をもった CE については，*Elovl1* と同じく脂肪酸伸長を担う *Elovl3* の欠損マウスにおいて，それぞれ≥C22 と≥C20 の鎖長で減少がみられたことから [55]，CE および WE の産生には *ELOVL1* や *ELOVL3* が関わることが明らかとなっている。また，CE の持つエステル結合形成に SOAT1（storol *O*-acyl transferase 1）が関わることがすでに明らかとなっており，一方の WE についても，マイボーム腺での機能は不明ながら，AWAT1/2（acyl-CoA wax alcohol acyl transferase 1/2）

にエステル合成活性があることがマウスの皮脂腺解析によって示されている[51,56-58]。

OAHFA や WdiE，コレステロールジエステルについては，マイボーム腺での生合成経路はほとんど未解明である。OAHFA については，いくつかの報告によって，C30–36 程度の鎖長の ω-OH FA を構造中に有することが示唆されており[51,59]，ELOVL によるアシル CoA の伸長反応に続いて，脂肪酸 ω 水酸化酵素 CYP4F22 が産生に関わることが予想されるものの，実験的な検討はされていない。また，ω 水酸基へのアシル基の付加反応についてもエステル化酵素は未同定である。

1.3.6. 油層における脂質 2 層モデルと OAHFA の機能

マイバム脂質を構成する各脂質クラスの明確な機能は，各脂質クラスが消失するようなモデルが確立されていないために，実験的な証明は少ない。そのような中で，涙液層の物理化学的または構造化学的な解析が進んでおり，近年では涙液油層が均一な 1 層ではなく，2 層のサブレイヤーからなるという 2 層モデルが提唱されている[38]。このモデルについては，X 線構造解析などからも支持されており，外層側に CE や WE といった非常に極性の低い脂質が集まり（非極性脂質層），液層側にリン脂質やコレステロール，OAHFA など，両親媒性を示す脂質が集まっている（両親媒性脂質層）と考えられている（図 7）[60,61]。

サブレイヤーの形成にあたり，非極性脂質層の形成には飽和かつ長い鎖長の非極性脂質が必要であることが示唆されており，パルミチン酸（C16:0 FA）をもった CE で PBS 上に単層の油層膜モデルを作製したところ，分散性が悪いということが報告されている[62]。油層の正常な形成には，構成する脂質分子間の流動性も求められることから，分散性の悪い脂質クラスは，油層の質を低下させることになる。実際に，CE および WE の鎖長の短鎖化がみられた *Elovl1* 欠損マウスにおいては，眼球表面からの水分蒸散の亢進がみられており，EDE であることが示唆されている[54]。

安定な涙液層の形成にあたり，非極性脂質層のみでは，水が中心の液層上に安定的な伸展が困難であることは明らかであり，非極性脂質層と液層の相互作用を担うための界面形成が必要である。その役割を担っているものが，両親媒性脂質層であると考えられている。両親媒性脂質層は，水素結合を形成できるような極性基と炭化水素鎖からなる疎水基の両方を持つ脂質クラスによって構成されており，OAHFA やリン脂質が該当する。リン脂質に関しては，油層中の存在量は極めて少ないことが報告されていることから[39,51]，OAHFA の寄与が大きいことが予想される。OAHFA は，ω-OH FA と ω 末端に付加したもう 1 分子の FA による疎水性構造と，ω-OH FA のもつカルボン酸による親水性の双方を有してい

ることから，両親媒性を示す脂質クラスである。したがって OAHFA は，非極性脂質層と液層をつなぐ両親媒性脂質として，界面形成を担う可能性がある。

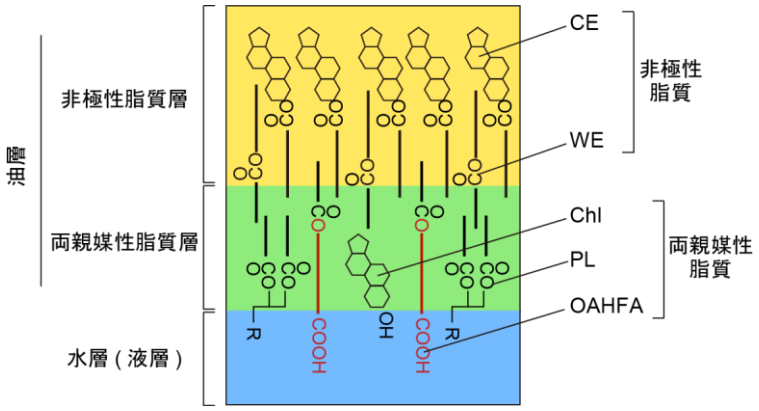


図 7. 涙液油層の 2 つのサブレイヤーモデル

涙液油層は極性の異なるマイバム脂質によって 2 つのサブレイヤーに分かれている（非極性脂質層，両親媒性脂質層）。非極性脂質層は，極性の非常に低い CE や WE によって構成され，両親媒性脂質層は Chl，TAG，OAHFA など疎水鎖と極性基を有する脂質が含まれている。Chl，コレステロール; PL，リン脂質

OAHFA のマイバム脂質中における存在量は 1–5%程度とする報告があり，マイバム脂質中に多量に存在する脂質クラスではないものの，非極性脂質層と液層間の界面を形成するには十分な量であると考えられる。

1.3.7. 現行のドライアイ治療法

ドライアイの治療は，コア・メカニズムに従って，対症療法的に行われる [63]。日本と諸外国においてはコア・メカニズムの考え方が異なっている。日本においては，何らかの原因による涙液層の安定性の低下が角膜や結膜の上皮障害を生じることが原因と考えるが，諸外国においては，様々な原因が涙液層の不安定化とともに，浸透圧の上昇を生み，炎症が生じることに起因すると考える。したがって，諸外国における治療戦略としては，炎症性疾患に対する治療として，シクロスポリンや副腎皮質ステロイド，非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）の点眼が用いられている [63]。この項目においては，異なる考え方による戦略が存在することを踏まえた上で，日本において現行で使用されている治療薬を中心に，涙液層の各層に焦点を当てた治療戦略について述べる。

日本および諸外国において，広く用いられている点眼薬に，人口涙液がある。本国では人口涙液マイティア®として処方されるが，主成分は塩化ナトリウム，塩化カリウム等の電解質であり，水層に類似した組成となっている。人口涙液同様に，水層に焦点を当てたものにヒアルロン酸がある。ヒアレイン®の名称で承

認されており，主成分のヒアルロン酸はグルコサミノグリカンの一種である。多糖構造であることから，ムチンのような保水作用があるとされており，液層中の水分の保持により効果を発揮する [64]。これら 2 つは，主に水層を対象としているが，ムチン層を対象とした点眼薬が本国では 2 つ承認されている。1 つはジクアホソルナトリウムである。ジクアス®の名称で承認されており，結膜上皮と杯細胞膜状の G_q/G_{11} 共役型受容体である $P2Y_2$ 受容体に結合し，Ca^{2+}濃度上昇作用により，水分およびムチンの分泌亢進作用を示す [65,66]。もう 1 つは，レバミピドである。ムコスタ®の名称で胃粘膜保護薬として豊富な使用経験を有しているが，角膜上皮細胞におけるムチン遺伝子の発現上昇作用があることが明らかとなり，ムチン量の増加を主な目的として使用されている [67]。点眼薬を使用した治療以外にも，涙液の排出を行う涙点を人工的にふさぐ涙点プラグの使用なども存在するが，市販薬も含めて，本国では点眼治療が主流である。

このように，液相（水層とムチン層）を標的とした治療薬の開発は進んでいる一方で，油層を主な標的とした点眼薬は処方箋医薬品としては開発されていない。MGD 症例においては温罨法のように，マイボーム腺を温め，マッサージによりマイバム脂質の分泌を促す対処法の他，水分の蒸散を抑える目的で 2 %ひまし油を点眼する例もある [68]。しかしながら，ひまし油の成分は実際の油層組成とは大きく異なり，マイバム脂質の補充を視野に入れた治療法は現在のところ存在しない。この理由の 1 つとして，油層組成の詳細が明らかになっていないことが挙げられる。油層を構成する脂質は種類が多く複雑である。また，分析法も十分に確立はされていないことから，治療法の開発に向けて油層脂質の分析法を発展させる必要がある。

1.4. 本研究の目的

ω 水酸化脂質は，体表面透過性バリアとして機能する皮膚および涙液の双方に共通する脂質クラスである。皮膚バリアにおいてはアシルセラミドが重要であることが知られており，涙液においては OAHFA が両親媒性脂質として涙液層の安定化に寄与する可能性が示唆されている。皮膚バリアにおけるアシルセラミドの生合成経路において，FA に ω 水酸基を導入させる酵素が CYP4F22 であり，遺伝子変異により重症度や病型の異なる魚鱗癬を生じる。遺伝子変異による CYP4F22 の脂肪酸 ω 水酸化活性の変化とアシルセラミド量，魚鱗癬症状の相関関係は明らかとはなっていない。そこで本研究では，*CYP4F22* の完全欠損モデルを作製し，皮膚バリア機能および表皮形態の評価とともにアシルセラミド量の測定を行い，皮膚バリア形成における ω 水酸化脂質の寄与を明らかにすることとした。さらに本研究ではマイバム脂質中の OAHFA が C30–36 の ω-OH FA を構造中に含んでいることから，CYP4F22 が生合成に関わると予想し，*CYP4F22*

欠損モデルを用いて，OAHFA の生合成経路を解明することとした。また，このマウスの涙液バリア機能を評価することで, OAHFA を含む ω 水酸化脂質の涙液バリア形成における役割を明らかにすることとした。

2. ω 水酸化脂質による皮膚バリア形成機構の解明

2.1. 目的

CYP4F22 の完全欠損モデルマウスを作製し，皮膚バリアを中心とした評価と形態観察を行うとともに，LC-MS/MS によるアシルセラミド量の測定を行うことで，皮膚バリア形成におけるアシルセラミドを含む ω 水酸化脂質の寄与を明らかとする。

2.2. 結果

2.2.1. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける新生致死性と ARCI 様の皮膚異常

CYP4F サブファミリーには，ヒトで 6 つ，マウスで 9 つのアイソザイムが存在する。また，シトクロム P450 の分子種命名の特徴として，生物種間で分子種番号が異なっている。*CYP4F22* の完全欠損モデルマウスを作製するにあたり，マウスにおける *CYP4F22* の機能的オルソログは不明であった。そこで，ヒトおよびマウスの CYP4F 分子種の系統樹を作成した結果，マウス Cyp4f39 が最も近く，CYP4F22 のオルソログであることが示唆された（図 8A）。ヒト CYP4F22 とマウス Cyp4f39 タンパク質の同一性と相同性を調べると，同一性は 86.4%，相同性は 93.7%であった。そこで，*CYP4F22* の完全欠損モデルとして *Cyp4f39* 欠損（*Cyp4f39*$^{-/-}$）マウスを，CRISPR/Cas9 システムを用いて作製することとした。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの作製にあたり，ターゲット配列を活性中心の上流に位置するエキソン 11 に設計し，32 塩基を欠失した *Cyp4f39*$^{+/-}$マウスを得ることに成功した（図 8B）。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスを作製するために *Cyp4f39*$^{+/-}$マウス同士の交配を行った結果, 自然分娩による出産後 1 日目以降に, *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは存在せず, 他のアシルセラミド合成関連遺伝子の欠損マウス同様，新生致死となった。

CYP4F22 が ARCI の原因遺伝子であることから *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは, 皮膚障害により新生仔の段階で致死性を示したと予想される。そこで, 出生直後のマウスの皮膚観察を行うために，母体内で十分に成長した状態となる胎生 18.5 日で帝王切開により胎仔を摘出し, 解析と観察を行うこととした。帝王切開による摘出後のマウスを観察すると, 明らかに皮膚全体が赤く, 首回りや腕を中心に皮膚が張った状態で，全体的にしわが少ない個体がみられた（図 8C）。摘出したマウスのジェノタイピングを行った結果，皮膚の異常所見がみられた個体はすべて *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスであった。これらの皮膚所見は，*CYP4F22* 変異患者にみられる ARCI 症状，特に CIE でみられる症状に近い表現型であると考えられる。

2.2.2. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは皮膚バリアの破綻を示す

Cyp4f39$^{-/-}$マウスの帝王切開による摘出後の体重変化と生存時間を調べるために，*Cyp4f39*$^{+/+}$マウスおよび *Cyp4f39*$^{+/-}$マウスとともに，経時的な観察と体重

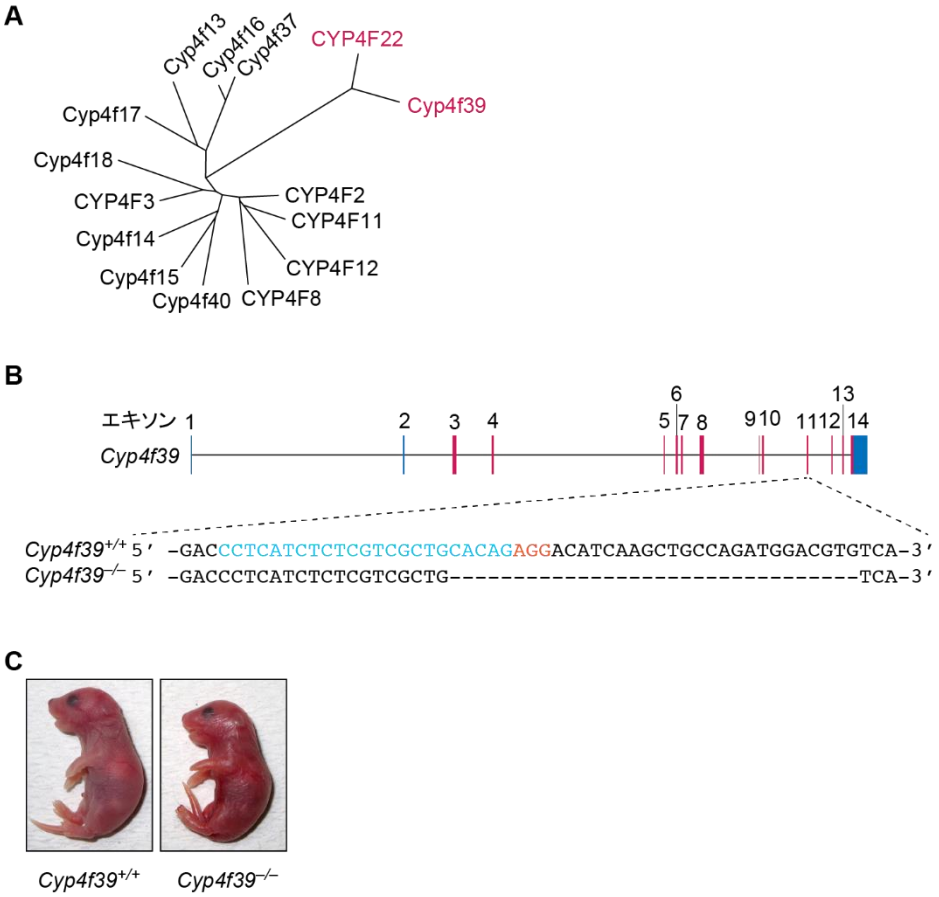


図 8. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの作製と魚鱗癬様の皮膚所見

（A）ヒトおよびマウス CYP4F/Cyp4f ファミリーの系統樹。ヒトのシトクロム P450 タンパク質は CYP4F**のようにすべて大文字で，マウスのシトクロム P450 タンパク質は Cyp4f**のように頭文字のみを大文字で記載する。（B）マウス *Cyp4f39* 遺伝子上のエキソン構造。赤色は翻訳領域，青色は非翻訳領域を示す。ガイド RNA の標的周辺の塩基配列を下に示す。*Cyp4f39*$^{+/+}$の塩基配列上における明るい青色は 23 塩基の標的配列を，橙色は PAM 配列を示す。*Cyp4f39*$^{-/-}$の塩基配列上の破線領域は変異導入による 32 塩基の欠失を示す。（C）胎生 18.5 日で帝王切開により摘出したコントロールマウス（*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス）および *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの写真。

測定を行った。まず体重変化について，*Cyp4f39*$^{+/+}$マウスおよび *Cyp4f39*$^{+/-}$マウスはいずれも，帝王切開による摘出時点を 0 時間とした場合に，7 時間の時点の体重は 0 時間時の 98%であり，体重の減少はほとんどみられなかった。その一方で *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは急速な体重減少が観察され，7 時間の時点で 0 時間時の 67%であった（図 9A）。生存率についても，*Cyp4f39*$^{+/+}$マウスおよび *Cyp4f39*$^{+/-}$

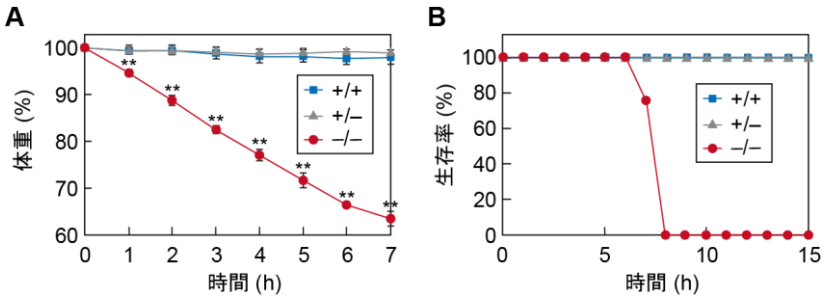


図 9. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける新生致死性

胎生 18.5 日で帝王切開により仔マウスを摘出した。*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス（n=5）と *Cyp4f39*$^{+/-}$マウス（n=10）をコントロールマウスとして *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=4）との比較のために使用し，経時的な体重変化の測定（A）と生存時間の観察（B）を行った。A の値はジェノタイプごと，測定時間ごとの体重の平均値±標準偏差を示し，Tukey 検定によって有意差を求めた。**P< 0.01; +/+, *Cyp4f39*$^{+/+}$マウス; +/–, *Cyp4f39*$^{+/-}$マウス; –/–, *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス

マウスはいずれも観察開始から 15 時間が経過した時点で死亡する個体がみられなかったのに対して，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは，観察開始 7 時間の時点で死亡した個体が観察され，8 時間が経過した時点で全個体の死亡が確認された（図 9B）。

この急速な体重減少の原因として，体内の水分量の著しい減少が予想された。生物において，体内の水分の占める割合は非常に大きく，出生直後は特にその割合が高い。体内からの水分の損失は，出血や下痢といった状態を除けば，最小限に制限されている。この体内からの水分の損失を防ぐことが皮膚バリアの機能の 1 つであることから，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける皮膚バリア機能の評価を行うこととした。皮膚バリアには，体内から体外への物質透過の制限（インサイド–アウトバリア）と体外から体内への物質透過の制限（アウトサイド–インバリア）の 2 つの機能がある（図 10A）。そこで，初めにインサイド–アウトバリアの評価を行うために，経表皮水分蒸散量（TEWL, trans epidermal water loss）の測定を行ったところ，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは *Cyp4f39*$^{+/+}$マウスおよび *Cyp4f39*$^{+/-}$マウスの約 15 倍の値を示した（図 10B）。この結果は，予想通り *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて，体内から体外への水分の損失量が増えていることを示すものであった。さらに，アウトサイド–インバリアの評価を行うために，トルイジンブルー溶液による染色性を調べた。コントロールマウスとして使用した *Cyp4f39*$^{+/-}$マウスでは，ほとんど染色はみられなかった一方で，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては全身で強い染色がみられた（図 10C）。以上の結果より，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける皮膚バリアの破綻が示され，体内からの激しい水分損失によって急速な体重減少が生じ，新生致死となることが明らかとなった。

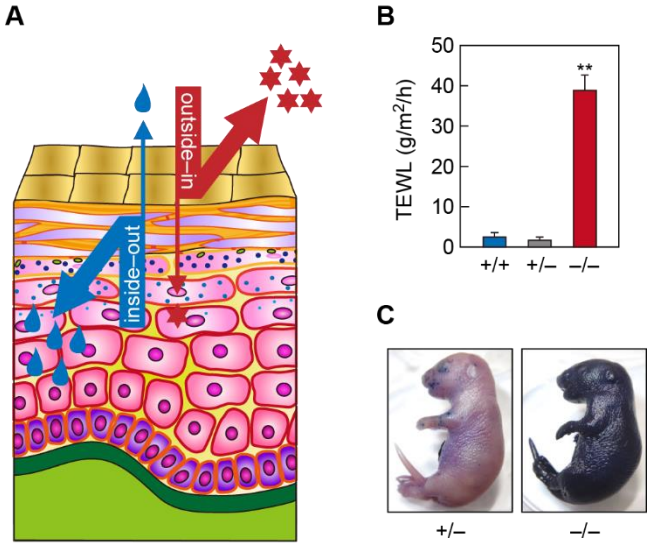


図 10. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける皮膚バリア異常

（A）正常な皮膚における outside–in，inside–out への物質透過の制限（透過性バリア）の模式図。（B，C）胎生 18.5 日で帝王切開により仔マウスを摘出し，皮膚バリア機能の評価を行った。*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス（n=16）と *Cyp4f39*$^{+/-}$マウス（n=16）をコントロールとして *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=12）との比較のために使用し，TEWL の測定を行った（B）。グラフはジェノタイプごとの平均値±標準偏差を示し，Tukey 検定によって有意差を求めた。**P< 0.010.1%トルイジンブルー溶液で 30 分間染色を行ったコントロールマウス（*Cyp4f39*$^{+/-}$マウス）および *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの写真（C）。+/+, *Cyp4f39*$^{+/+}$マウス; +/–, *Cyp4f39*$^{+/-}$マウス; –/–, *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス

2.2.3. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける脂質ラメラの消失とペリダームおよびコルネオデスモソームの残存

Cyp4f39$^{-/-}$マウスの詳細な表皮形態の解析を行うために，コントロールマウスおよび *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの皮膚切片を作製し，ヘマトキシリン/エオジン染色を行った。コントロールマウスにおいては，正常な基底層，有棘層，顆粒層，角質層がみられ，角質層における脂質ラメラは網目状の空隙として観察された（図 11）。脂質ラメラがこのような空隙となる理由は，染色を行う際の組織の脱水にメタノールを使用しているために，脂質成分が抽出されたことに起因すると考えられる。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては脂質ラメラに由来する空隙はほとんど観察されなかった。この結果は，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて，脂質ラメラが大きく減少していることが，皮膚バリアの破綻に関わっていることを示すものであった。

より詳細な表皮形態を観察するために，透過型電子顕微鏡解析を行った。その

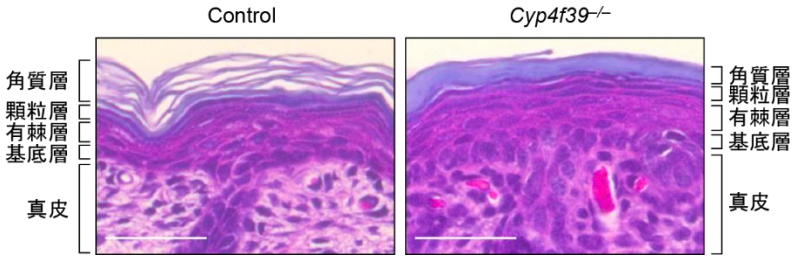


図 11. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける脂質ラメラの消失

胎生 18.5 日のコントロールマウス（*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス）および *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス皮膚切片のヘマトキシリン/エオジン染色画像。スケールバーは 50 μm を示す。

結果，透過型電子顕微鏡画像からも，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの角質層において角質細胞間の幅が短縮しており，脂質ラメラの形成が低下していることが確認された（図 12A，E）。ヘマトキシリン/エオジン染色と比較して，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける脂質ラメラは多く残存しているようにみえるが，おそらく固定法の違いによるものであり，脂質ラメラの形成に明らかな異常がみられるという点では一致している。

その一方で，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，角質層の層数の微増と角質細胞の肥厚化が観察された（図 12A，F，G）。角質細胞の肥厚化に関しては，角質細胞が上層になるにつれて扁平化するため，顆粒層側から数えて 1 層目，4 層目，7 層目の細胞の厚さを定量した。いずれの層でも *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス角質細胞の方がコントロールマウスよりも厚く，1 層目で約 1.4 倍，4 層目で約 1.8 倍，7 層目で約 2.2 倍であった（図 12G）。

加えて *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス角質層の最外層では，ペリダームと呼ばれる構造体が観察された（図 12A–D）。ペリダームは，胎児期の表皮形成過程に存在する構造体であり，通常のケラチノサイトとは異なり，細胞内小器官が少なく，ケラチン繊維も乏しいことが知られているものの，その機能は未だ明らかとなっていない。しかしながら，ヒトでは胎生 50 日頃にはすでに存在しており，ペリダームと基底細胞による 2 層構造をとることが知られている [69]。胎児期の表皮形成過程は，2 層状態が 65 日頃まで続き，その後 95 日頃までに中間層が形成され，3 層構造となる。ペリダームはこの時期，徐々に厚みを増していき，さらにペリダーム以下の層が増加していく 96–160 日の間でペリダームの厚さと電子密度もさらに増すことが報告されている。ペリダームは 160 日以降の表皮では消失しており，一方で最上層の細胞は角化が始まる [69]。マウスにおけるペリダームも，ヒトと同様に表皮形成時に最外層を覆い，角質層が形成され，表皮として成熟するにつれて消失すると考えられる。したがって，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいてペリダームがみられることは，表皮の成熟過程に異常があることを示している。

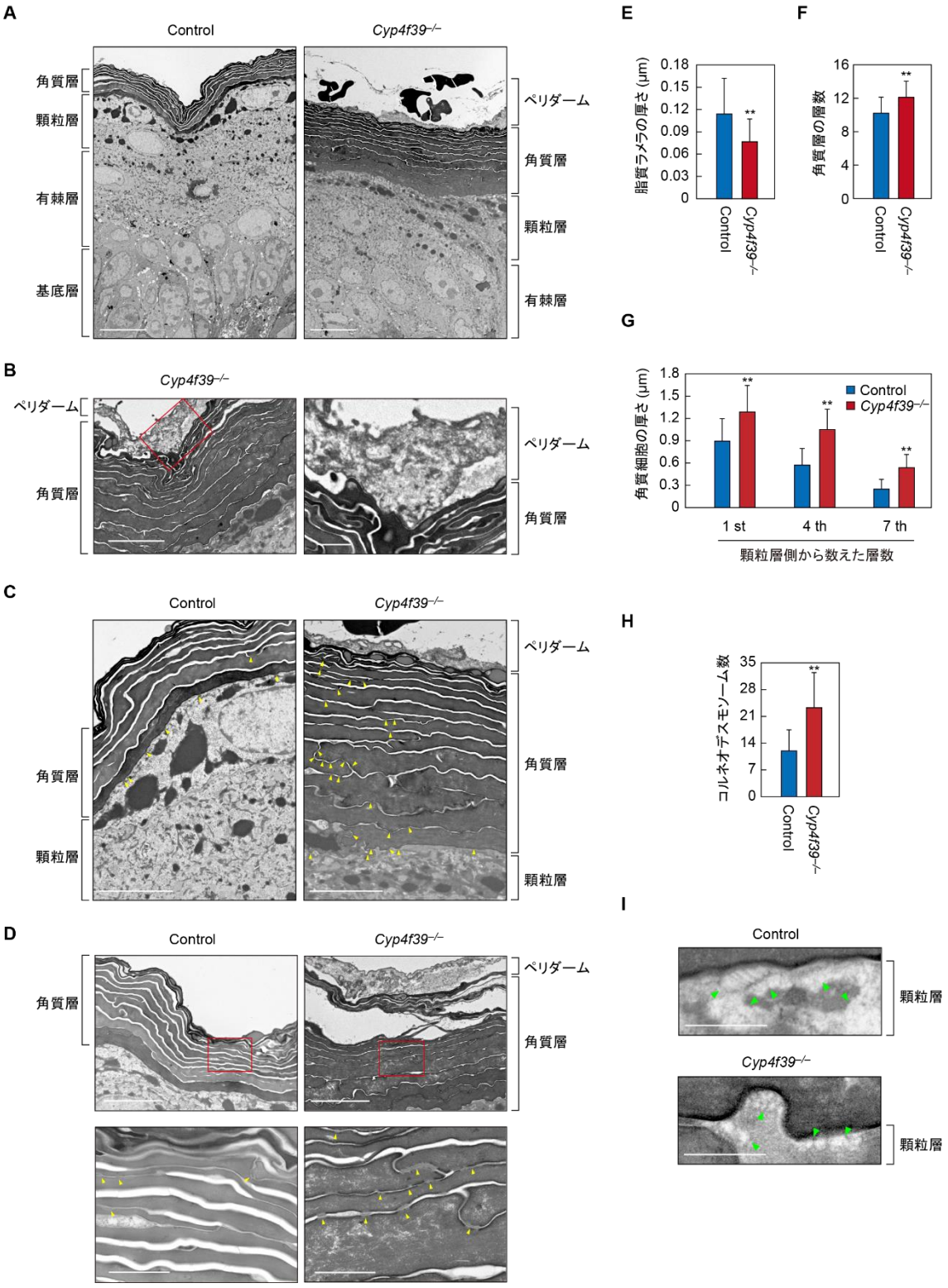


図 12. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける角質層数の微増，角質細胞の肥厚化，ペリダームの残存，コルネオデスモソームの分解低下と未熟な層板顆粒の増加

（A–D）胎生 18.5 日のコントロールマウス（*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス）および *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス表皮の透過型電子顕微鏡解析画像。B の右パネルおよび D の下パネルは

それぞれ，左パネルおよび上パネルの赤色の囲み部分の拡大画像を示す。A，B の左パネル，C，D の上パネルのスケールバーは 5 μm，B の右パネルと D の下パネルは 1 μm を示す。（E–H）透過型電子顕微鏡画像の画像解析。無作為に選択した透過型電子顕微鏡画像の任意の点≥10 以上で行った脂質ラメラの厚さ（E），角質層の層数（F），角質細胞の厚さ（G），コルネオデスモソーム数（H）の定量値。E の横軸は顆粒層側から数えた角質層の層数を示す。グラフは各定量値の平均±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。**$P < 0.01$（I）胎生 18.5 日のマウスの顆粒層最上部から角質層にかけての透過型電子顕微鏡解析画像。緑色の矢頭は層板顆粒を，スケールバーは 0.5 μm を示す。

さらに *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，角質細胞間接着に関わるコルネオデスモソーム数がコントロールマウスと比較して多くみられた（図 12C，D，H）。コルネオデスモソームは，細胞間接着を担うデスモソームの一種であり，角質細胞同士の結合を担っている（図 1）。コルネオデスモソームは通常，角質層の上層になるにつれて構成タンパク質が分解され，数が減少する [3]。コントロールマウスにみられるコルネオデスモソームの大部分は顆粒層に近い 1–3 層目に多くみられ，上層付近ではまばらにみられるのみであった（図 12C，D）。しかしながら，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，角質層の 1 層目付近のコルネオデスモソーム数はコントロールマウスと比較しても同程度であるが，4 層目以降，上層になっても減少がみられなかった。このことから，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは通常は分解されるはずのコルネオデスモソームが，分解されずに残存しているために，総数としてコントロールマウスよりも多くみられたことが予想される。

Cyp4f39$^{-/-}$マウスにおける角質層以外の表皮層における形態異常として，層板顆粒の成熟不全がみられた（図 12I）。層板顆粒は脂質ラメラを構成する脂質の輸送に関わる細胞内小胞である。脂質ラメラの構成脂質は有棘層の上層から主に顆粒層で合成され，層板顆粒に取り込まれた状態で顆粒層の最上層まで輸送される。層板顆粒に取り込まれた脂質は，電子顕微鏡画像上では，はじめは顆粒状の点としてみえているが，顆粒層の最上層では“stacked lamellar”と呼ばれる層状構造となる [6]。本研究においてコントロールマウスの顆粒層最上部には，層状構造が明確な層板顆粒が観察された（図 12I，上図）。しかしながら，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの顆粒層最上部においては，小さく，顆粒状の点がみられるのみであり，コントロールマウスでみられたような層状構造の成熟した層板顆粒はみられなかった（図 12I，下図）。この結果は，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける層板顆粒の成熟（Stacked lamellar 形成）異常を示しており，脂質ラメラの減少が，層板顆粒の成熟異常に起因することを示唆している。

2.2.4. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるアシルセラミドのほぼ完全な消失

コントロールマウスと *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける脂質組成の変化を明らかとするために，胎生 18.5 日で帝王切開により摘出した個体から表皮を剥離し，脂質抽出ののちに，順相 TLC による分離と銅リン酸試薬による呈色を行った。その結果，コントロールマウスにみられるアシルセラミドおよびアシルグルコシルセラミドを含むバンドが *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは消失していた（図 13A)。一方，超長鎖 FA を構造中に含むセラミドおよびグルコシルセラミドのバンドについては，コントロールマウスと比較して *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスで濃く検出された。

本研究ではさらに，アシルセラミドの分子種ごとの詳細な定量分析を行うために，表皮から抽出した脂質を LC-MS/MS を用いて測定した。その結果，コントロールマウスにおいては，C30–34 の飽和型および C32–36 の一価不飽和型の ω-OH FA を有するアシルセラミドが検出され, C34:1 タイプが最も多くみられた（図 13B，左図)。また飽和タイプでは，C26 および C28 の分子種は非常に少なく，一価不飽和タイプではいずれの鎖長の分子種とも検出限界以下であった。さらに，同じ測定を *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスについても行った結果，すべての分子種で著しい減少が確認され, 総量ではコントロールマウスの約 1.5%であった（図 13B，右図)。この結果から，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウス表皮ではアシルセラミドの大部分が消失していることが確認され, Cyp4f39 がアシルセラミド生合成に関わる唯一の脂肪酸 ω 水酸化酵素であることが明らかとなった。

2.2.5. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける ω-OH セラミドの減少と超長鎖 FA 含有セラミドの増加

アシルセラミド生合成経路においてアシルセラミドは, 前駆体である ω-OH セラミドの ω 末端へのリノール酸付加によって産生される。Cyp4f39 による脂肪酸 ω 水酸化は，ω-OH 超長鎖セラミド合成に必要であり，その合成不全がアシルセラミド消失の要因であることが予想された。そこで, マウス表皮における ω-OH セラミド量について LC-MS/MS を用いた定量を行った。その結果，コントロールマウスにおいてはアシルセラミドと同様に C30–34 の飽和型および C32–36 の一価不飽和型の ω-OH FA 有する ω-OH セラミドが検出された（図 14A)。一方，同じ測定を *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスについても行った結果，顕著な減少がみられ，総 ω-OH セラミド量はコントロールマウスの約 5.4%であった。したがって，アシルセラミドの前駆体である ω-OH セラミドの生合成過程においても，Cyp4f39 がほぼ唯一の脂肪酸 ω 水酸化酵素として機能していることが示された。

ω-OH セラミドのように水酸化 FA を構成中に含むセラミドは水酸化セラミドと呼ばれ，ω-OH セラミドの他，FA の 2 位に水酸基をもつ α-OH セラミドが存在する。α-OH セラミドについても LC-MS/MS による定量を行った結果，コント

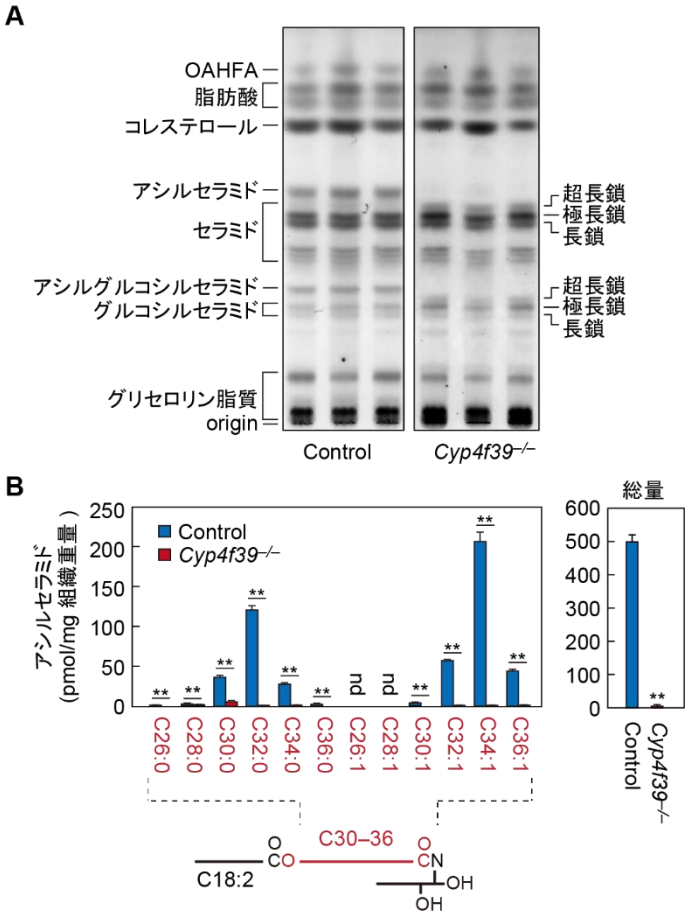


図 13. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるアシルセラミドの消失

胎生 18.5 日のコントロールマウス（*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス, n=3）と *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）の表皮から脂質を抽出し， TLC による分離と銅リン酸試薬による検出（A）および， LC-MS/MS によるアシルセラミドの定量（B）を行った。B の左のグラフはアシルセラミド分子種ごとの定量値を示し，横軸はアシルセラミドの構造中の ω-OH FA の鎖長と不飽和度を示す。右のグラフは検出されたアシルセラミドの総量を示す。定量値は平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。**P< 0.01; nd, not detected

ロールマウスにおいて C16–28 の飽和型 α-OH セラミドが検出された（図 14B）。一方の *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいても，コントロールマウスで検出されたすべての α-OH セラミド分子種で減少や増加はみられなかった。この結果は，α-OH セラミドの合成に Cyp4f39 が関与しないことを示すとともに，ω-OH セラミドの消失に対する代償機構として，α-OH セラミドが増加するような機構は存在しないことを示している。

順相 TLC による表皮脂質の分離分析によって, *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて超長

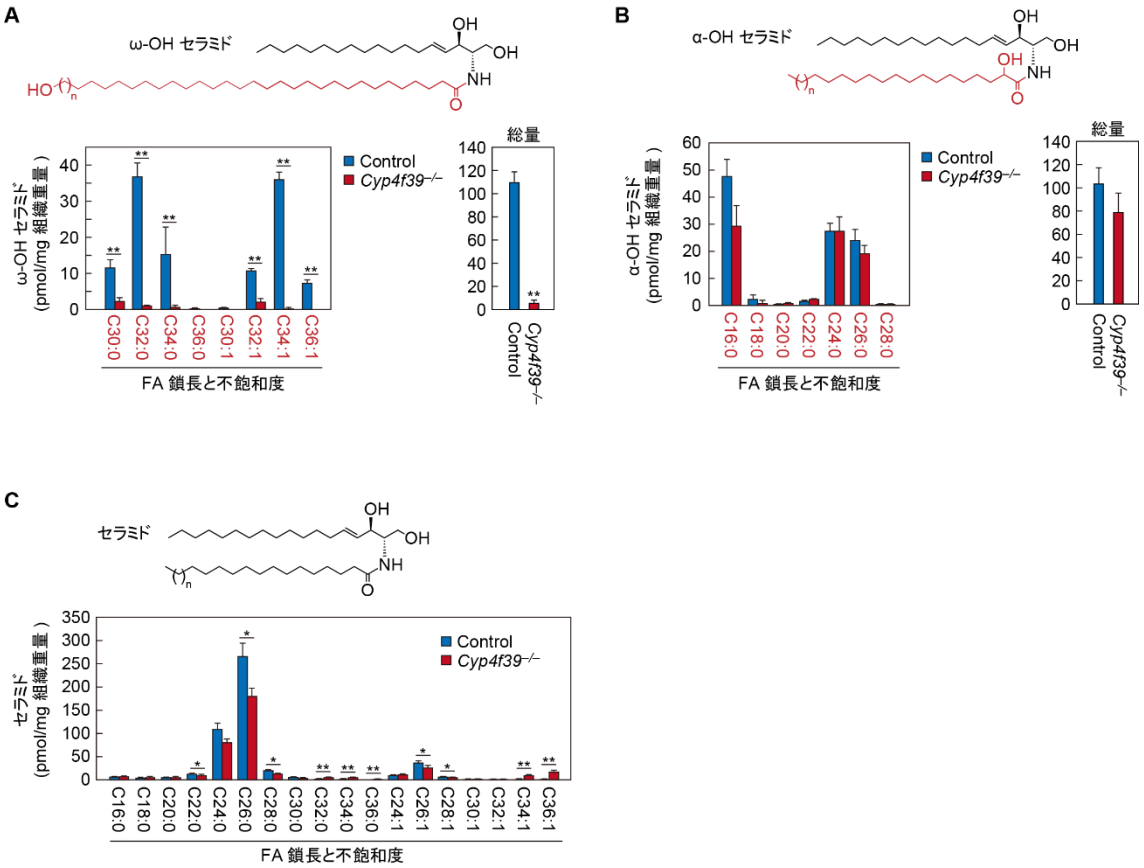


図 14. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける ω-OH セラミドのほぼ完全な消失

胎生 18.5 日のコントロールマウス（*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス, n=3）と *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）の表皮から脂質を抽出し，LC-MS/MS を用いて ω-OH セラミド（A），α-OH セラミド（B），セラミド（C）の定量を行った。A と B の左のグラフおよび C のグラフは各セラミドの分子種ごとの定量値を示し，横軸は FA の鎖長と不飽和度を示す。A と B の右のグラフは検出された各セラミド分子種の総量を示す。A–C のグラフの上に，各セラミドクラスの構造式を示す。定量値は平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。*P<0.05; **P< 0.01

鎖 FA を構造中に有するセラミドが増加していることが示された（図 13A）。そこで，非水酸化セラミドについても LC-MS/MS による定量を行った結果，コントロールマウスでは C16–36 の飽和型および一価不飽和型の非水酸化セラミド分子種が検出された（図 14C）。飽和型と一価不飽和型を比較すると，総量では飽和型の方が多く，一価不飽和型の約 8 倍であった。鎖長については C26 の分子種が最も多く検出された。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスについても同じ測定を行った結果，C22–28 の飽和型および C26 と C28 の一価不飽和型の分子種では，コントロールマウスと比較して有意な減少が確認された。その一方で，コントロールマウスで

はほとんど検出されなかった C32–36 の飽和型および C34 と C36 の一価不飽和型の分子種について，コントロールマウスよりも増加していることが明らかとなった。C30 を超す鎖長の非水酸化セラミドの *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける増加は，通常は ω-OH セラミドの合成に使用される超長鎖 FA が，*Cyp4f39* が欠損していることで ω 水酸化を受けずに，直接，セラミド合成酵素による長鎖塩基との縮合に用いられたことを示唆している。

2.2.6. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるケラチノサイトの分化およびアシルセラミド生合成に関わる mRNA 発現量の微増

アシルセラミド生合成に関わる遺伝子の変異によって，ケラチノサイトの分化やその他のアシルセラミド合成関連遺伝子の mRNA 発現量に影響があることが報告されていることから [28,29,32], *Cyp4f39* 欠損によるこれら遺伝子の mRNA 発現量への影響を，定量的 RT-PCR によって評価した。その結果，基底層マーカーであるケラチン 5/14 の mRNA（*Krt5* および *Krt14*），有棘層–顆粒層マーカーのケラチン 1/10 の mRNA（*Krt1* および *Krt10*）については，コントロールマウスと *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける発現量にほとんど差はみられなかった（図 15A）。その一方で，顆粒層–角質層かけて発現するフィラグリン（*Flg*）については，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいてコントロールマウスよりも高い発現量が示され，同じく顆粒層–角質層マーカーであるロリクリンとインボルクリンの mRNA（*Lor* および *Ivl*）についても増加傾向がみられた。アシルセラミドの生合成過程に関わる遺伝子（脂肪酸伸長酵素 *Elovl1*，*Elovl4*，極長鎖脂肪酸 CoA 付加酵素 *Fatp4*，セラミド合成酵素 *Cers3*，アシル CoA 転移酵素 *Pnpla1*，脂肪滴結合タンパク *Abhd5*）の mRNA については，*Elovl4* と *Cers3* でわずかに増加がみられたが，その他の mRNA 発現量に差はみられなかった（図 15B）。また，アシルセラミド代謝物である結合型セラミドの産生に関わるリポキシゲナーゼ *Aloxe3* については *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスで減少がみられたが，ATP 結合カセットトランスポーターの 1 つであり，顆粒層で合成された脂質を層板顆粒内に輸送する *Abca12* の mRNA 発現量について，差はみられなかった（図 15C）。これらの結果から，ケラチノサイトの分化や，*Cyp4f39* を除くアシルセラミドおよび結合型セラミドの産生に関連する遺伝子の mRNA 発現量について，いくつかの遺伝子で増加または減少がみられたものの，多くの遺伝子ではコントロールマウスと *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス間で差はみられず，*Cyp4f39* の欠損は，表皮における遺伝子発現に明らかな影響を与えないことが示された。

Cyp4f39$^{-/-}$マウスの角質層上層でみられたコルネオデスモソームの残存について，遺伝子レベルでの増加の可能性を検討するために，コルネオデスモソームを構成するデスモプラキン（*Dsp*），デスモコリン 1/3（*Dsc1/3*），デスモグレイン

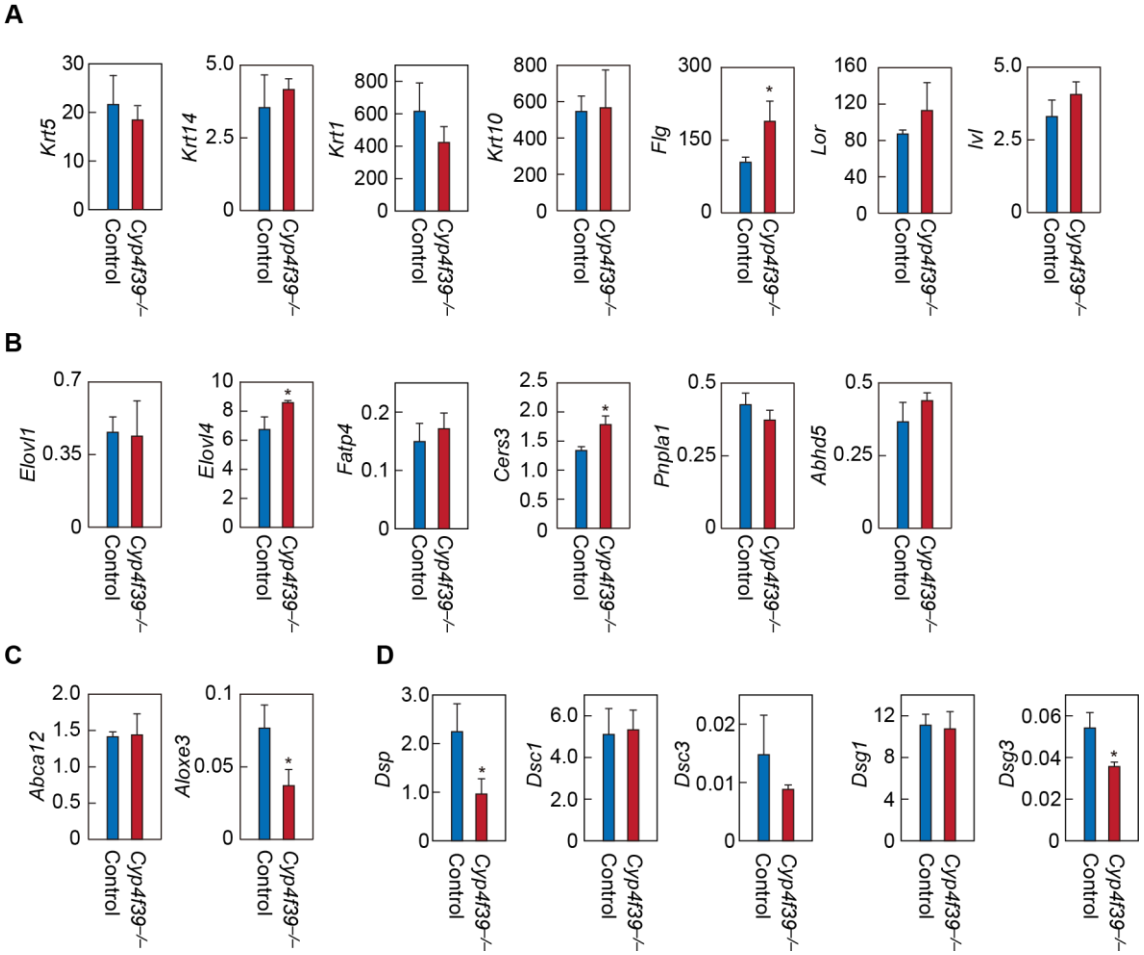


図 15. *Cyp4f39* 欠損によるケラチノサイト分化マーカー，アシルセラミド合成関連遺伝子，結合型セラミド合成関連遺伝子，コルネオデスモソーム関連遺伝子の発現への影響

胎生 18.5 日のコントロールマウス（*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス, n=3）と *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）の表皮から総 RNA を調製し，定量的 RT-PCR によって mRNA 発現量の解析を行った。（A）細胞骨格形成関連遺伝子（*Krt5*, *Krt14*, *Krt1*, *Krt10*, *Flg*）と角質細胞の裏打ち構造である周辺帯タンパク質関連遺伝子（*Lor*, *Ivl*）。（B）アシルセラミド生合成関連遺伝子（*Elovl1*, *Elovl4*, *Fatp4*, *Cers3*, *Pnpla1*, *Abhd5*）。（C）層板顆粒形成関連遺伝子（*Abca12*）と結合型セラミド生合成関連遺伝子（*Aloxe3*）。（D）コルネオデスモソーム関連遺伝子（*Dsp*, *Dsc1*, *Dsc3*, *Dsg1*, *Dsg3*）。ハウスキーピング遺伝子として *Hprt* の定量を行った。各遺伝子の mRNA 発現量は，*Hprt* の発現量に対する相対値として求め，平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。*P<0.05

1/3（*Dsg1/3*）の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR によって測定した。その結果，

Cyp4f39$^{-/-}$マウスにおいて *Dsp* と *Dsg3* の減少および *Dsc3* の減少傾向がみられた一方で，*Dsc1* と *Dsg1* に変化はみられなかった（図 15D）。したがって，コルネオデスモソーム数の *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける増加は，遺伝子レベルでの増加ではなく，分解の低下であることが強く示唆された。

2.3. 考察

本研究では，脂肪酸 ω 水酸化酵素の完全欠損モデルとして，*Cyp4f39* 欠損マウスを作製し，皮膚バリアや皮膚形態への影響を評価した。作製した *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは帝王切開後 8 時間以内に致死となり（図 9B），帝王切開による摘出時の *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，ヒト *CYP4F22* 変異患者にみられるような紅皮症表現型が観察された（図 8C）。さらに，表皮の形態観察の結果からは，脂質ラメラの消失，ペリダームの残存，角質層総数の微増，角質細胞の肥厚化，コルネオデスモソームの分解低下といった形態異常が明らかとなった（図 11，12）。これら表皮の形態異常は皮膚バリア機能にも大きな影響を与えており，TEWL の値はコントロールマウスの約 15 倍を示し（図 10B），体内からの著しい水分の損失が新生致死の原因であり，帝王切開後約 6 時間で帝王切開直後の 70%以下まで体重が減少したと考えられる（図 9A）。また，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいてアシルセラミドおよび ω-OH セラミドの消失が確認された（図 13B, 14A）。その一方で C30 を超す鎖長の非水酸化セラミドの *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける増加も観察されたが，アシルセラミドや ω 水酸化セラミドの変化量に比べてわずかな差であり，正常な皮膚バリア形成においては，Cyp4f39 が産生する ω-OH FA を有する ω-OH セラミドやアシルセラミドが重要であると考えられる。本研究で得られた知見は，マウスと同様のアシルセラミド生合成経路を有するヒトにおいて，ω 水酸化脂質の減少が軽度な魚鱗癬を生じ，ω 水酸化脂質の著しい減少によって *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにみられたような重篤な魚鱗癬を生じる可能性を示唆するものであった。

2.3.1. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける重篤な皮膚障害

Cyp4f39$^{-/-}$マウスはアシルセラミドがほぼ完全に消失していた（図 13）。同様にアシルセラミドの消失がみられる魚鱗癬モデルマウスとして，アシルセラミド生合成経路における ω-OH セラミドの ω 末端へのリノール酸付加を担う *Pnpla1* の欠損（*Pnpla1*$^{-/-}$）マウスが報告されている [28,29,31]。しかしながら，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスと *Pnpla1*$^{-/-}$マウスにおける表現型を比較すると，脂質ラメラの消失といった共通点がある一方で，いくつかの点で表現型に違いがみられる。例えば，皮膚バリア異常の程度が *Pnpla1*$^{-/-}$マウスと比較して *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの方が強いことが挙げられる。実際に TEWL の値について，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスではコントロールマウスの約 15 倍の値であったのに対して，*Pnpla1*$^{-/-}$マウスではコントロールマウスの 3–6 倍と報告されており [28,29,31]，皮膚を介した体内の水分の透過と蒸散が *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスではより亢進している。この結果は，出生後の体重減少にも表れており，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは帝王切開による出生後 7 時間で体重が 33%減少した一方で，*Pnpla1*$^{-/-}$マウスでは 16 時間以上が経過した時点で約 20%の減少となっている [29]。表皮の形態についても，両者では異なる点がある。

例えば角質層の形態について，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは過角化はほとんど起きておらず，わずかな層数の増加と角質細胞の肥大化が生じているのみであった（図12)。その一方で *Pnpla1*$^{-/-}$マウスでは顕著な過角化とともに圧縮されたような角質層が観察されている。*Pnpla1*$^{-/-}$マウスではさらに，有棘層の肥厚化が認められており，角質層だけでなく有棘層にも形態異常を示していたが [28,29,31]，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，このような異常はみられなかった。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスと *Pnpla1*$^{-/-}$マウスの表皮では，遺伝子の発現変動にも違いがみられた。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，表皮各層のマーカーやアシルセラミド生合成に関わる遺伝子の発現量には，コントロールマウスと比較してもほとんど差はみられなかった。また，*Flg* については発現の増加が確認されたものの，*Flg* と同様に顆粒層マーカーとして知られる *Lor* や *Ivl* については，増加傾向はみられるものの有意な発現増加ではなかった（図 15)。一方の *Pnpla1*$^{-/-}$マウスでは，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスとは対照的に *Flg* や *Lor* の発現は減少することが報告されている [29]。また， *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは発現量に変化がみられなかった *Abca12* について，*Pnpla1*$^{-/-}$マウスでは上昇がみられた [28,29]。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスと *Pnpla1*$^{-/-}$マウスの表現型が異なる理由として，アシルセラミド生合成経路においてそれぞれの遺伝子欠損によって蓄積する中間体の違いが関係することが考えられる。*Pnpla1*$^{-/-}$マウスでは，アシルセラミド前駆体の ω-OH セラミドが蓄積することが報告されている [28,29,31]。ω-OH セラミドは，アシルセラミド合成における中間体であるため，野生型マウスにおける発現は少ないが，*Pnpla1*$^{-/-}$マウスにおける蓄積は大きい。一方の *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，ω-OH セラミドの蓄積はみられなかった（図 14A)。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，超長鎖 FA の ω 水酸化が停止するため，超長鎖 FA を有するセラミドの蓄積が検出されたが，増加量はわずかであった（図 14C)。したがって，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスと *Pnpla1*$^{-/-}$マウスにおける表現型の違いは，ω-OH セラミド量に大きな影響を受けていることが予想される。すなわち，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスと比較して，*Pnpla1*$^{-/-}$マウスの皮膚バリア異常の重篤性が低かった理由として，*Pnpla1*$^{-/-}$マウスでは，減少したアシルセラミドの機能を，蓄積した ω-OH セラミドが部分的に相補していることが考えられる。

2.3.2. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるペリダームの残存

Cyp4f39$^{-/-}$マウスの表皮では，角質層の最外層にペリダームの残存が観察された。ペリダームは，表皮形成の初期から角質層が形成されるまでの期間，表皮の最外層を覆っている膜構造である [69]。アシルセラミドの生合成は，有棘層の上層から始まり，主に顆粒層で行われることから，生合成関連遺伝子の発現もまた表皮の分化が進むとともに上昇すると予想される。すなわち *CYP4F22*/*Cyp4f39* は，ペリダームが表皮最外層を覆っている胎児期にはすでに発現していると考

えられ，機構は不明であるが，ペリダームの消失を含む表皮の成熟過程に関わっていることが予想される。ヒトの魚鱗癬における重症症例では，コロジオン膜に覆われた状態で出生するコロジオン児が報告されており，*CYP4F22* 変異患者においてもしばしばみられる [25]。コロジオン膜形成の詳細な機構についても明らかとなっていないが，通常であれば出生時には消失している膜構造が残存しているという点で，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにみられたペリダームの残存と類似している。本研究で作製した *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは，脂肪酸 ω 水酸化酵素の遺伝子完全欠損モデルであり，実際にアシルセラミドや ω-OH セラミドといった ω 水酸化脂質はほぼ完全に消失していた（図 13B，14A）。そのため，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにみられたペリダームの残存は，ω 水酸化脂質の著しい減少による表皮形成過程の異常を示しており，ヒト *CYP4F22* 変異患者におけるコロジオン児としての出生は，ω 水酸化脂質の減少による表皮形成異常を意味していると考えられる。またこの結果から，脂肪酸 ω 水酸化酵素の活性の消失が重症型の魚鱗癬を生じ，一方で，酵素活性が残存している場合，その残存活性の大きさによって，魚鱗癬症状の重症度が変化していることが予想された。

2.3.3. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるコルネオデスモソームの残存

コルネオデスモソームは，角質層において角質細胞間の接着に関わるデスモソーム構造の一種であり，デスモソームから構造が変化することで形成され，主にデスモコリン 1 とデスモグレイン 1 によって構成されている [3]。コルネオデスモソームは角質層の全層にわたって発現しているわけではなく，角質層の上層になると，主にカリクレインファミリーペプチダーゼ（kallikrein-regulated peptidases; KLKs）によって分解される [70]。その結果，角質層が剥離しやすい状態となり，垢として除去される。KLK にはチモーゲンが存在し，KLK 前駆体から KLK への成熟にはマトリプターゼの 1 つである ST14 が関与している。そのため，*ST14* の変異患者では KLK によるコルネオデスモソームの分解が低下し，魚鱗癬症状を呈することが報告されている [71]。またその一方で，セリンプロテアーゼインヒビターである LEKTI（lympho epithelial kazal Type inhibitor）は，デスモグレイン 1 の過剰な分解を抑制しており，産生には SPINK5（serine protease inhibitor kazal-Type 5）が必要であるため，*SPINK5* の遺伝子変異は角質層の剥離亢進による皮膚バリア異常症であるネザートン症候群の原因となっている [72,73]。本研究において *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，コルネオデスモソームの増加が観察された（図 12）。このコルネオデスモソームの増加は角質層の上層側で顕著であり，加えて，*Dsg1* や *Dsc1* の遺伝子発現量にはコントロールマウスと比較して変化がみられなかったことから（図 15D），コルネオデスモソーム構造の合成が亢進しているのではなく，分解過程に異常があると考えられる。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスと

同様にコルネオデスモソームの分解低下やペリダームの残存が観察されたARCI モデルに *Cers3* 欠損マウスがある [30]。Cers3 はアシルセラミド生合成経路におけるセラミドの合成に関わる酵素であり，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスと同様，アシルセラミドとともに ω-OH セラミドの消失が報告されている。したがって，コルネオデスモソームの残存という形態異常についても，ω-OH セラミドの消失が影響している可能性が考えられる。コルネオデスモソームの分解はいくつかの要因（プロテアーゼインヒビター，pH，コレステロール硫酸）によって制御されている [70,74,75]。pH は，KLK が機能するために重要な環境因子であり，一般に角質層の上層になるにつれて低下していく。pH を低下させる要因も様々であり，FA やエクリン腺から分泌される乳酸，フィラグリンに由来する代謝物のウロカニン酸などが知られている [75,76]。KLK は通常，LEKTI によって活性が抑制されているが，pH が低下することで LEKTI による阻害が解除され，プロテアーゼ活性が発現する [74]。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいてコルネオデスモソームの分解が低下した明確な理由は不明であるが，ω-OH セラミドの消失の他，脂質ラメラの消失によって FA やコレステロール硫酸といった脂質の局在や分布に異常が生じ，pH の低下が生じなかったことで LEKTI の機能が維持され，KLK の活性が低下しているという可能性が考えられる。

2.3.4. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける層板顆粒の成熟不全

層板顆粒は，脂質ラメラを構成する脂質を取り込み，蓄積し，輸送する細胞内小胞である [1]。合成された脂質ラメラの構成脂質は層板顆粒内に取り込まれ，顆粒層の上部までは層板顆粒内で顆粒状に存在している。しかしながら，顆粒層の最上部に到達するまでの間に，徐々に脂質同士の相互作用により脂質構造体を形成していき，最終的には“Stacked lamellar”と呼ばれるラメラ状の多層構造となる [6]。Stacked lamellar の形成過程の詳細はいまだ明らかとはなっていないものの，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，この Stacked lamellar が観察されず，顆粒層の最上部においても顆粒状の分布がみられるのみであった（図 12I）。アシルセラミドは，他のセラミドクラスと異なり，構造中に超長鎖 FA とエステル結合を介したリノール酸を有しており，全体では疎水鎖 3 本構造となっている。アシルセラミドは，この 3 本の疎水鎖によって種々の脂質と相互作用することが可能であり，立体的な脂質構造体の形成，すなわち，Stacked lamellar の形成および維持に重要であると考えられる。

2.3.5. 今後の展望

本研究では *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの皮膚解析によって，ω 水酸化脂質（アシルセラミドおよび ω-OH セラミド）の正常な皮膚バリア形成への重要性が明らかとな

った。脂質ラメラ形成が低下しているような皮膚バリア異常患者に対する治療法は保湿や掻痒感などに対する対症療法に限られており，ω 水酸化脂質を応用した治療薬の開発は，新たな治療戦略となる可能性がある。例えば，ω 水酸化脂質を含む軟膏剤またはクリーム剤の塗布である。ω 水酸化脂質が脂質ラメラの形成に重要であることから，外部から ω 水酸化脂質を補うことで，脂質ラメラの形成を相補できる可能性がある。現状の問題点としては，生理条件下では ω 水酸化脂質は有棘層から顆粒層で産生され，層板顆粒内であらかじめラメラ状の多層構造となったのちに，角質層に放出され，脂質ラメラを形成するため [1,6]，外部からの補充では正常なラメラ状の多層構造を形成できない可能性が挙げられる。現在のところ，直接的に顆粒層内に薬剤を投与する技術に関する報告はないが，選択的な投与が可能となった場合，ω 水酸化脂質を補充することで，正常な層板顆粒と脂質ラメラの形成が可能と考えられる。特に，本研究において *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは *Abca12* などの層板顆粒形成に関連する遺伝子の発現には影響がみられなかったことから，*CYP4F22* 変異患者においても，ω 水酸化脂質の補充によって皮膚バリアを回復できる可能性がある。

2.4. 材料と方法

2.4.1. *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの作製

Cyp4f39$^{-/-}$マウスは，CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。*Cyp4f39* 遺伝子のエキソン 11 内に PAM（Protospacer Adjacent Motif）配列に隣接する 23 塩基のガイド RNA 標的配列を設定し，最終的に Cas9 タンパク質による切断の標的となるように，ガイド RNA 標的配列を含むプライマーペア（f1 および f2; Table 1）を設計し，アニーリングさせたものを，ガイド RNA と Cas9 タンパク質を共発現させる CRISPR/Cas9 ベクターである pX330（Addgene, Watertown, MA）の *Bbs* I サイトにクローニングした。このプラスミドを C57BL/6J マウスの受精卵に注入し，仮親へ移植した。産道感染の可能性を排除するため，帝王切開して蘇生した新生仔を里親に育てさせた。産仔の尾からゲノム DNA を抽出し，エキソン 11 の標的配列周辺を増幅するプライマーを用いて PCR を行い，増幅断片のシークエンス解析を行った結果，32 塩基が欠失し，フレームシフトによるナンセンス変異が生じた個体が得られた。このマウスを C57BL/6J マウスと交配し，*Cyp4f39*$^{+/-}$マウス系統を確立した。*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは，*Cyp4f39*$^{+/-}$マウスを交配することで作製した。マウスのジェノタイピングはマウステールから抽出したゲノム DNA，プライマー（p1 および p2; 表 1）を用いて PCR による増幅ののち，制限酵素 *Afl*Ⅲで処理することで確定させた。CRISPR/Cas9 システムによって欠損した 32 塩基中に *Afl*Ⅲサイトが含まれているため，*Cyp4f39*$^{-/-}$マウスに由来する PCR 産物を制限酵素処理した場合，*Afl*Ⅲによる切断が生じないことを利用している。

2.4.2. マウスの飼育

マウスの飼育は，SPF 環境下，室温 23 ± 1 °C 湿度 50 ± 5 %，12 時間毎に明/暗のサイクルを繰り返す条件で行い，摂餌と給水は自由に行える状態で行った。妊娠可能な雌を一晩雄と同居させて交配を行い，翌日の正午に雄を別のケージに移し，この時点を胎生 0.5 日とした。胎生 18.5 日で帝王切開により胎仔を摘出し，蘇生を行ったのちに解析に使用した。動物実験はすべて，北海道大学動物実験委員会の規定に従い行った。

2.4.3. 皮膚バリアアッセイ

経表皮水分損失量の測定は，胎生 18.5 日の時点で帝王切開により摘出した仔マウスの背部に対して，生存した状態で経表皮水分蒸散計 AS-VT100RS evaporimeter（Asahi Biomed, Yokohama, Japan）を用いて閉鎖式チャンバー法にて行った。

トルイジンブルー観察は，胎生 18.5 日の時点で帝王切開により摘出した仔マ

ウスをメタノールに 5 分間浸したのち, PBS でリンスした状態で 0.1 %（w/v %）トルイジンブルー溶液で 30 分間染色を行った。染色後，PBS で再度リンスし，観察に使用した。

2.4.4. 皮膚の形態観察

ヘマトキシリン/エオジン染色は，胎生 18.5 日の時点で帝王切開により摘出した仔マウスの背部の皮膚を使用した。マウスから剥離させた皮膚を 10 %中性緩衝ホルマリン溶液（pH 7.2）で 48 時間室温にて固定した。固定した皮膚をメタノールで脱水したのちキシレンで洗浄し，密閉式自動固定包埋装置（Tissue-Tek VIP-6; Sakura，Torrance，CA）を使用してパラフィンを浸透させた。これをパラフィンブロック包埋装置（TEC-P-DC; Sakura）によってブロック化した。皮膚のパラフィンブロックを，ミクロトーム REM-710（Yamato Kohki，Asaka，Japan）を使用して切断し, 4 μm の切片を作製した。切片は自動染色装置（Tissue-Tek DRS 2000; Sakura）を使用してキシレンとエタノールで脱パラフィン処理，水洗ののちヘマトキシリン/エオジン溶液で染色し，再度エタノールとキシレンで脱水した。染色された切片は Leika DM5000B microscope（Leica Microsystems，Wetzlar，Germany）を用いて明視野観察を行い，DFC295 digital color camera で撮影した。

透過型電子顕微鏡解析は，胎生 18.5 日の時点で帝王切開により摘出した仔マウスの背部の皮膚を使用した。剥離させた皮膚を 5 %グルタルアルデヒド/0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）に浸し，4 °C で 72 時間固定した。固定した皮膚は 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）で一晩さらに固定したのち，1 % OsO_4/0.05 M カコジル酸緩衝液（pH 7.4）で 60 分および 0.5 % RuO_4 で 30 分処理した（Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA）。固定した皮膚をエタノールと酸化プロピレンで段階的に脱水し，Epon 812 resin（Taab Laboratories, Berkshire, United Kingdom）に包埋したのち，70 °C で 4 日間処理した。これを厚さ 70 nm の超薄切片に切断し，酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。切片の解析は JEM-1400Plus（JEOL, Tokyo, Japan）で行った。撮影は CCD camera（EM-14830RUBY2; JEOL）で行った。

2.4.5. 表皮脂質組成解析

脂質抽出は，胎生 18.5 日の時点で帝王切開により摘出した仔マウスの背部の皮膚から行った。剥離させた皮膚は，600 μL の PBS に浸し，55 °C で 3 分間加温したのち, ピンセットを用いて表皮と真皮を分離した。採取した表皮 10–20 mg を乾熱滅菌したホモジェナイザーにいれ，2 mL の chloroform/methanol/water（30:60:8, v/v/v）を加え，約 10 分間粉砕操作を行った。抽出物を 50 °C で 15 分加温後，800 × g で 15 分遠心し，上清を回収した。抽出操作を 3 回行い，上清は

すべてまとめた。集めた上清に 4.8 mL の水を加え，二層分配を行った。800 × g で 15 分遠心し, 有機層を回収した。乾固させた有機層は chloroform/methanol（2:1, v/v）で再溶解し，TLC および LC-MS/MS 解析に使用した。

表皮 1 mg 分の脂質を順相 TLC（Silica Gel 60 TLC plates; Merck Darmstadt, Germany）を用いて 3 つの溶媒によって分離した。

1. chloroform/methanol/water（40:10:1, v/v）で底辺から 2 cm まで展開後乾燥させ，再度底辺から 5 cm まで展開。
2. chloroform/methanol/acetic acid (47:2:0.5, v/v)で底辺から 8.5 cm まで展開。
3. hexane/diethylether/acetic acid (65:35:1, v/v)で底辺から 9.5 cm まで展開した。

分離した脂質は銅リン酸試薬 [3 % (w/v) $CuSO_4$ in 8 % (v/v)リン酸溶液]の噴霧と 180 °C 3 分の加熱によって呈色させた。

表皮 125 ng 分の脂質は LC-MS/MS 解析に使用した。脂質の分離および検出は，超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）連結三連四重極型質量分析計（Xebo TQ-S; Waters, Milford, MA）を用いて行った。UPLC による脂質の分離は，グラジエントシステムを用い，移動相 A [acetonitrile/water (3:2, v/v) + 5 mM ammonium formate]と移動相 B [acetonitrile/2-propanol (1:9, v/v) + 5 mM ammonium formate] の混合比を変えて行った（表 3）。カラムは逆相系カラム（ACQUITY UPLC CSH C18 column; 粒子径, 1.7 μm; 内径, 2.1; 長さ, 100 mm; Waters）を用い，測定中のカラム温度は 55 °C で測定を行った。アシルセラミド，ω-OH セラミド，α-OH セラミド，セラミドの検出は，イオン化にエレクトロスプレーイオン化法を用い，MRM でポジティブイオンの検出を行った。Q1 および Q3 の値とコーン電圧，コリジョンエネルギーは各分子種に特異的な値を用いた（表 5–7）。測定したデータの解析は MassLynx software（Waters）を用いて行った。

2.4.6. 定量的 RT-PCR

総 RNA 抽出は，胎生 18.5 日の時点で帝王切開により摘出した仔マウスの背部の皮膚から行った。剥離させた皮膚は，600 μL の PBS に浸し，55 °C で 3 分間加温したのち，ピンセットを用いて表皮と真皮を分離した。総 RNA 抽出は NucleoSpin RNA kit（Machery-Nagel, Dueren, Germany）を用いて行った。RT-PCR は, 50 ng/μL に調節した総 RNA, プライマー（表 2）, One step TB Green PrimeScript RT-PCR kit Ⅱ（Takara Bio）を用いて行った。サーマルサイクラーは，CFX96 Touch real-time PCR detection system（Bio-Rad, Hercules, CA）を使用し，50 °C で 30 分，94 °C で 2 分のインキュベートののち，94 °C で 30 秒，60 °C で 30 秒，72 °C で 1 分を 35 サイクル行った。mRNA 発現量はそれぞれ *Hprt* の発現量で補正した。

3. ω 水酸化脂質による涙液バリア形成機構の解明

3.1. 目的

OAHFA 生合成に CYP4F22 が関わると予測し，*CYP4F22* 完全欠損モデルマウスを用いて OAHFA 生合成経路の探索を行うこととした。さらに OAHFA が両親媒性脂質として非極性脂質層と液層の相互作用に関わる可能性が示唆されていることから，同じく *CYP4F22* 完全欠損モデルマウスを用いて，涙液バリア形成への ω 水酸化脂質の寄与を明らかとする。

3.2. 結果

3.2.1. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは眼瞼下垂および涙液の貯留を示す

Cyp4f39$^{-/-}$マウスは皮膚バリア不全により新生致死となる。出生直後のマウスのマイボーム腺は未発達であり，また，十分な大きさもないことから，解析にはマウスが成体まで成長することが必須である。そこで本研究では，表皮特異的に *Cyp4f39* を発現させることで，皮膚バリア不全による新生致死性を回避した *Cyp4f39*$^{-/-}$マウスを作製することとした。このマウスを作製するために，表皮特異的なインボルクリン（*IVL*）プロモーター制御下で，3xFLAG タグを付加した Cyp4f39 タンパク質を発現するトランスジーンを用いて，表皮では *Cyp4f39* を発現するが，その他の組織では発現しないようなトランスジェニック（*Tg*）マウスを作製した。*Tg* マウス同士の交配により，最終的にトランスジーンを発現した *Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス）を得た（図 16A）。作製した *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスは新生致死とならずに成体まで成長し，コントロールマウスと比較して体重にも差はみられなかった（図 16B）。3×FLAG-Cyp4f39 タンパク質が表皮特異的に発現していることを確かめるために，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスから組織を摘出し，細胞抽出液を調製したのち，抗 FLAG 抗体とローディングコントロールとして抗 Gapdh 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。その結果，心臓，肺，肝臓，胃，小腸，腎臓では 3×FLAG-Cyp4f39 タンパク質は全く発現しておらず，予想通り表皮において高い発現が確認された一方で，マイボーム腺と角膜においてもわずかにタンパク質の発現がみられた（図 16C）。マイボーム腺における 3×FLAG-Cyp4f39 の発現について，マイボーム腺を構成する中心導管の混入が予想される。中心導管は，各マイボーム腺において，腺房で産生されたマイバム脂質のすべてが集まるマイボーム腺中で最も太い直径 100–150 μm の管であり，表皮と同じ角化型扁平上皮で構成されている [40]（図 5）。角質細胞における細胞膜の裏打ち構造の形成に IVL は関わることから，中心導管においても IVL が発現していると考えられる。また，角膜についても，*IVL* プロモーターが機能することが報告されている [77]。したがって，本研究で作製した *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，主に表皮に *Cyp4f39* が発現しており，マイバム脂質を合成するマイボ

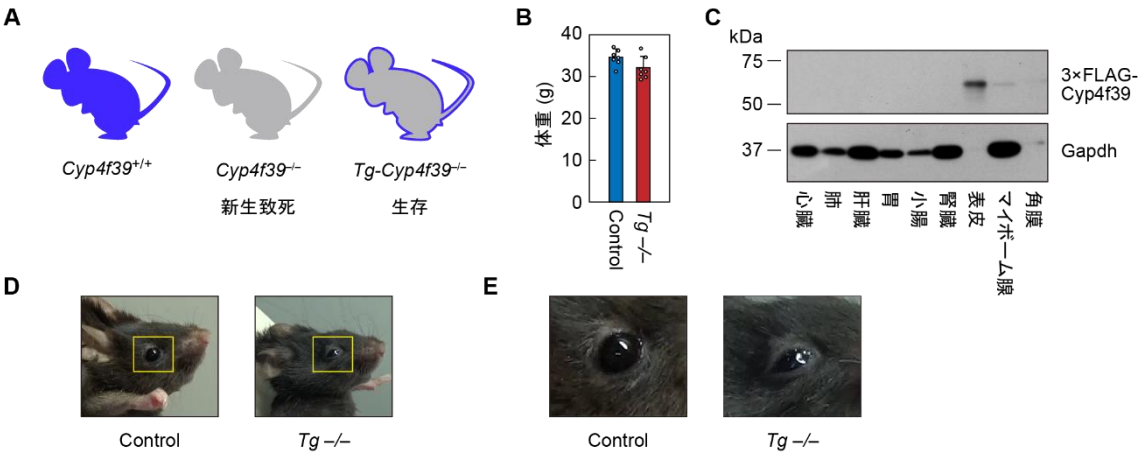


図 16. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの作製

（A）*Cyp4f39*$^{+/+}$マウス（野生型），*Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（*Cyp4f39* 全身欠損マウス），*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの模式図。青色は *Cyp4f39* の発現を，灰色は *Cyp4f39* の欠損を示す。（B）10–12 ヶ月齢のコントロールマウス［*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=3）と *Tg-Cyp4f39*$^{+/-}$（n=7）］と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=12）の体重。値は平均値±標準偏差を示す。（C）イムノブロッティングによる 3×FLAG-Cyp4f39 タンパク質の発現確認。12 ヶ月齢の *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの心臓，肺，肝臓，胃，腎臓，表皮，マイボーム腺，角膜から総ライセートを調製し，タンパク質 20 µg 分を SDS-PAGE により分離し，抗 FLAG 抗体とローディングコントロールとして抗 Gapdh 抗体を使用してイムノブロッティングによりトランスジーンに由来する Cyp4f39 タンパク質に付加した FLAG タンパク質の発現を検出した（D，E）。12 ヶ月齢のコントロールマウス（*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$）および *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの写真。E の写真は D の写真の黄色の囲み部分の拡大。*Tg* –/–，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$

ーム腺の腺房を構成するマイボサイトでは，*Cyp4f39* 遺伝子は発現していないと考えられる。

作製した *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，眼瞼下垂と下眼瞼側への涙液の貯留が観察された（図 16D，E）。眼瞼下垂は，過去の当研究室の報告において，マイバム脂質中の CE や WE 中の FA の短鎖化によってドライアイ症状を呈する脂肪酸伸長酵素 *Elovl1* 欠損マウスにおいてもみられた表現型である [54]。また，涙液の貯留については，眼球表面への涙液の伸展過程に異常があることを示唆している。涙液油層は機能の 1 つとして，表面張力を低下させることが予想されており，これは，涙液層の安定性にも関わると考えられる。そのため，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，表面張力が上昇することで，正常な涙液層の形成がされておらず，ドライアイを呈している可能性が示された。

3.2.2. *Cyp4f39* の欠損はマイボーム腺閉塞を伴うドライアイを生じる

Elovl1 欠損マウスにおいて確認された表現型として，眼瞼下垂の他に瞬目回数の増加が挙げられる [54]。瞬目は，マイバム脂質や液層成分の分泌や涙液層の形成に重要な無意識下の動作であり，瞬目回数の増加は，ヒトのドライアイ患者でもみられる症状の 1 つである [78]。そこで本研究においてもコントロールマウスと *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの瞬目回数を測定し，比較を行うこととした。本研究では，加齢による影響も考慮するために，1–12 ヶ月齢のマウスを用いて瞬目回数の測定を行った。その結果，すべての月齢においてコントロールマウスでは 1 分間当たりの平均瞬目回数は 0.4 回未満であったのに対し（図 17A），*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは 1–3 ヶ月齢では 3.5 回，4–6 ヶ月齢では 5.0 回，7–9 ヶ月齢では 5.1 回，10–12 ヶ月齢では 7.7 回であり，いずれの月齢においても，コントロールマウスと比較して顕著な瞬目回数の増加がみられた。また，加齢による影響については，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて瞬目回数の増加傾向はみられたものの有意な差はなく，加齢に伴う明確な表現型の進行は示さなかった。

瞬目回数の増加は，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるドライアイ表現型を示唆するものであった。本研究ではさらに，ドライアイの確定を行うために，ヒトにおけるドライアイ診断に一般的に用いられている手法を用いることとした。2017 年に改訂された TFOS DEWS Ⅱ Report によると，自覚症状に加えて，涙液層破壊時間（BUT），涙液浸透圧の測定，眼表面組織の染色結果のいずれか 1 つ以上に異常がみられた場合，ドライアイと確定診断される [43]。検査項目のうち BUT の測定は，涙液層の安定性を評価する項目であり，水溶性のフルオレセイン溶液を点眼し，軽く瞬目を行ってもらうことで眼球表面にフルオレセインを含む涙液が膜状に広がった状態で観察を開始し，涙液膜に破綻が生じるまでの時間を細隙灯顕微鏡観察により計測する手法である。涙液浸透圧については，何らかの原因により涙液量が減少した状態だと，涙液成分の濃縮が生じ，浸透圧が上昇する。眼表面組織の染色は，角膜や結膜，眼瞼縁を染色することで障害や不整を観察する診断法である。本研究では，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスに対して，フルオレセインの点眼と細隙灯顕微鏡観察によって，BUT の測定と角膜上皮障害のスコア化を行った。その結果，BUT について，コントロールマウスでは平均 7.4 秒で涙液層の破綻が観察され，一方の *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは平均 2.2 秒とコントロールマウスの約 1/3 に短縮がみられた（図 17B）。さらに，角膜上皮障害のスコア化については，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいてコントロールマウスの約 2.5 倍のスコアが示された（図 17C）。以上の結果より，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，涙液層の不安定化とともに，角膜上皮障害が生じていることが示され，ドライアイであることが確定した。

ドライアイには大きく ADDE と EDE の 2 つの病型が存在する [47]。EDE にお

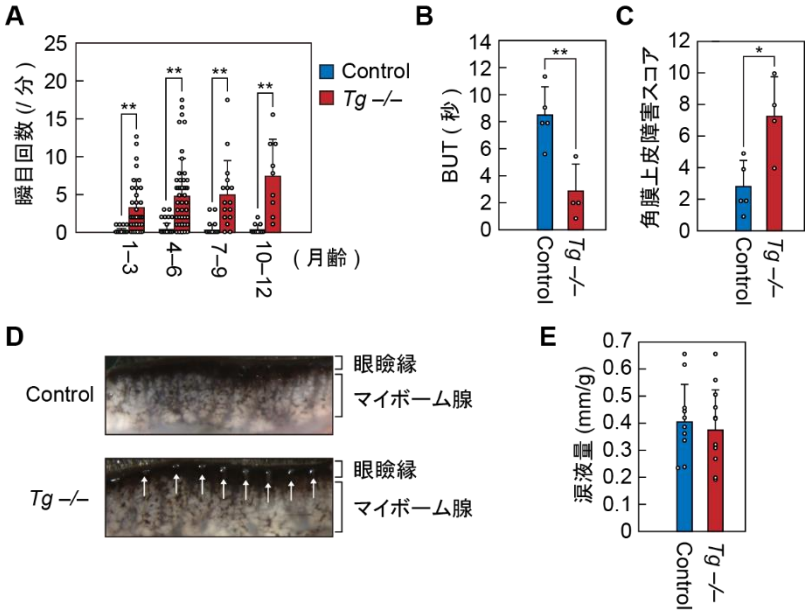


図 17. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスはドライアイを呈する

（A）10–12 ヶ月齢のコントロールマウス [*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=6）および *Tg-Cyp4f39*$^{+/-}$（n=9）] と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=14）の瞬目回数の測定を行った。コントロールマウスと *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスはそれぞれ 1–3 ヶ月齢で 25 回と 34 回，4–6 ヶ月齢で 43 回と 40 回，7–9 ヶ月齢で 28 回と 16 回，10–12 ヶ月齢で 11 回と 9 回測定を行った。値は瞬目回数の平均値±標準偏差を示す。（B，C）8–17 ヶ月齢のコントロールマウス [*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$(n=3)] と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス(n=4)を用いて， BUT の測定（B）および角膜上皮障害のスコア化（C）を行った。それぞれの値は平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。*P<0.05; **P< 0.01（D）8 ヶ月齢のコントロールマウス（*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$）と 14 ヶ月齢の *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの上眼瞼を摘出し，顕微鏡下で眼瞼縁の撮影を行った。白矢印はマイボーム腺開口部の閉塞を示す。(E) 10–12 ヶ月齢のコントロールマウス [*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=3）および *Tg-Cyp4f39*$^{+/-}$（n=7）] と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=12）に対してフェノールレッド糸法を用いて涙液量の測定を行った。グラフの値は平均値±標準偏差を示す。*Tg –/–*，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$

ける最も主要な原因は MGD であり，ドライアイ患者全体の 80%以上にみられる [49]。MGD ではしばしばマイバム脂質分泌不全の原因として，眼瞼縁に存在するマイボーム腺開口部の閉塞症状が観察される。*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの瞼を摘出し，眼瞼縁の観察を行った結果，マイボーム腺開口部の塞栓が確認された（図 17D）。MGD における塞栓には Capping や Plugging と呼ばれる開口部の小隆起，Capping や Plugging より膨大化したくちばし状の Poughting，塞栓同士がつなが

った状態の Ridging が挙げられるが，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにみられた塞栓は Plugging に相当するものと考えられる。ADDE の可能性を考慮し，コントロールマウスと *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの涙液量を測定したところ，両者の間に差はみられなかった（図 17E）。これらの結果より，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるドライアイ表現型は，マイボーム腺の Plugging を合併した EDE であることが明らかとなった。

3.2.3. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける正常なマイボーム腺および角膜形成とマイバム脂質合成関連遺伝子の発現

Cyp4f39 の欠損によるマイボーム腺と角膜形成とマイボサイトの分化への影響を明らかとするために，ヘマトキシリン/エオジン染色による *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスのマイボーム腺および角膜の観察を行った。マイボーム腺は，導管と腺房から構成されており，マイバム脂質の合成は腺房で行われる。腺房を構成するマイボサイトは，腺房の最表面に存在する単層の基底部で分裂，増殖する。その後マイボサイトは分化しながら腺房の中心に向かって移動していく過程で，マイバム脂質を合成，蓄積する [40]。最終的に成熟したマイボサイトは，死細胞となり核を失い，蓄積したマイバム脂質を全分泌の形式で放出する。そのため，コントロールマウスにおいては，有核のマイボサイトとともに，無核の細胞が観察された（図 18A）。また基底部の細胞を除いて，腺房内の細胞は脂質が蓄積しているため周辺組織よりも明るく見える細胞が多くみられた。一方の *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスについても，腺房の形態はコントロールと違いはなく，基底細胞，分化し脂質を蓄積したマイボサイト，脱核した細胞が観察され，コントロールマウス同様，マイボーム腺としての形態やマイボサイトの分化は正常であることが示された。さらに，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにみられた角膜上皮障害について，*Cyp4f39* の欠損が角膜の形成に影響を与えている可能性もあることから，角膜の形態についても観察を行った。その結果，コントロールマウスと同様に *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，角膜上皮，角膜実質（ストローマ）細胞，角膜内皮細胞からなる各層が観察された（図 18B）。各層の形態や層数についても差はみられず，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける角膜形成は正常であることが明らかとなった。

続いて，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおけるマイバム脂質の産生に関わる遺伝子（*Awat1*，*Awat2*，*Far1*，*Far2*，*Soat1*，*Cyp4f39*）の発現量を調べるために，定量的 RT-PCR を用いて mRNA の発現量解析を行った。マイバム脂質のうち，WE は FAl と FA のエステル結合からなっており，Awat1 および Awat2 は FAl にアシル基を転移させるアシルトランスフェラーゼとして [57]，Far1（Fatty Acyl-CoA Reductase 1）および Far2 はアシル CoA から FAl を産生する還元酵素として機能する [79]。また，CE については Chl と FA のエステル結合で形成されており，

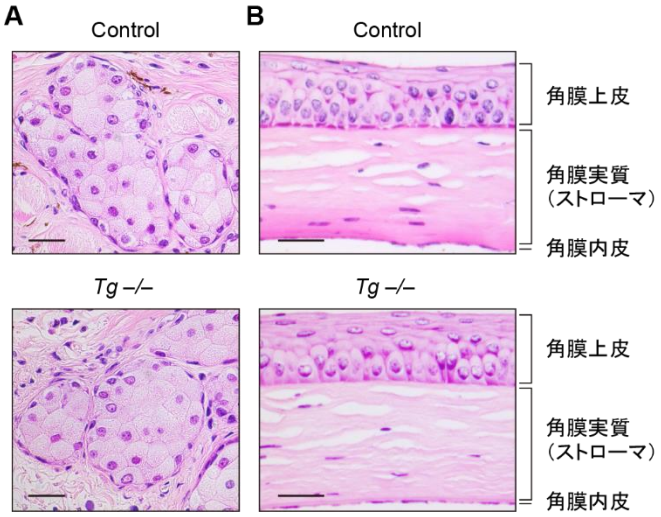


図 18. *Cyp4f39* 欠損マウスにおけるマイボーム腺と角膜の正常な形成

12 ヶ月齢のコントロールマウス（*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$）と 14 ヶ月齢の *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスのマイボーム腺および角膜切片のヘマトキシリン/エオジン染色を行った。明視野よるマイボーム腺（A），角膜（B）の顕微鏡観察写真を撮影した。スケールバーは 25 μm を示す。*Tg* –/–，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$

Soat1 はコレステロールにアシル基を転移させるアシルトランスフェラーゼ活性を有する [56,58]。*Cyp4f39* を除く 5 つのマイバム脂質合成関連遺伝子について，いずれの mRNA 発現量とも，コントロールマウスと *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの間に差はみられなかったことから（図 19），*Cyp4f39* の欠損は，マイボサイトにおけるその他の遺伝子発現には影響しないことが示された。また，*Cyp4f39* の mRNA について，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいてもわずかに発現がみられたが，これは，トランスジーンのマイボーム腺での発現と同様に，マイボーム腺の導管の混入に由来するものと考えられる。

3.2.4. *Cyp4f39* の欠損によるマイバム脂質中の C16:1 OAHFA の減少

Cyp4f39 がマイボーム腺において OAHFA の産生に関わることを明らかとするために，LC-MS/MS を用いたマイバム脂質中の OAHFA 解析を行うこととした。しかしながら，OAHFA の LC-MS/MS による解析法は十分に確立されておらず，標準品も市販されていないことから，特異的な分離分析は困難であった。そこで本研究では，初めに OAHFA の標準品として[(*O*-C18:1)-ω-OH C22:0 FA]を ω-OH behenic acid (C22:0 FA)と oleoyl (C18:1) chloride を有機化学的に縮合させることで作製した。作製した OAHFA 標準品を LC-MS/MS を用いたプロダクトイオンスキャンによって測定した結果，[C18:1 FA−H]$^-$に帰属される *m/z* 281.06 と

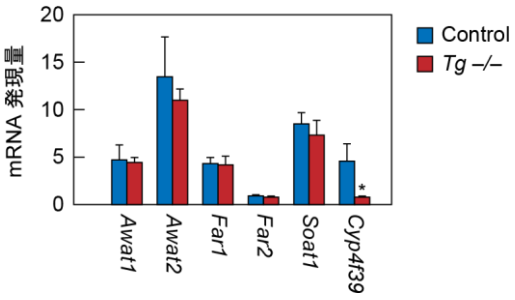


図 19. *Cyp4f39* 欠損マウスにおけるマイバム脂質合成関連遺伝子の正常な発現

12 ヶ月齢のコントロールマウス [*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=3）] と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）のマイボーム腺から総 RNA を調製し，定量的 RT-PCR を用いてマイバム脂質合成関連遺伝子（*Awat1*, *Awat2*, *Far1*, *Far2*, *Soat1*, *Cyp4f39*）とハウスキーピング遺伝子として *Hprt* の発現量を定量した。各遺伝子の発現量は，*Hprt* の発現量に対する相対値として求め，平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。*P<0.05; *Tg* –/–，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$

[M−H−(C18:1 FA−OH)]$^-$に帰属される *m/z* 354.95 の 2 つのフラグメントイオンが検出され，目的の OAHFA 標準品であることが確認された（図 20A，B）。また，OAHFA は構造中に ω-OH FA を有するとされているが，水酸基の位置異性体が存在する可能性も想定された。生体内の水酸化 FA としては，ω-OH FA に加えて，Fa2h（Fatty acid 2 hydroxylase）によって産生される脂肪酸 2 (α)位が水酸化された α-OH FA が知られている [1,80]。本研究では, α-OH FA を構造中に含む OAHFA（α-OAHFA）が存在する可能性を考慮し，OAHFA と同様の手法で[(*O*-C18:1)-α-OH C22:0 FA]も作製し，標準品として用いた。

次に，OAHFA を高感度に検出するために，OAHFA がカルボン酸を構造中に有することを利用し，一般に FA の誘導体化などに用いられている *N*-(4-aminomethylphenyl)pyridinium（AMPP）による誘導体化を行い，LC-MS/MS による多重反応モニタリング（MRM）のメソッドを作製した（表 8）。この際に，LC の移動相条件の検討も行い, 合成した 2 つの標準品 (OAHFA および α-OAHFA) を用いて，両者が分離可能な系を作製した（図 20C）。

確立した測定条件を使用してコントロールマウスおよび *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスのマイボーム腺における OAHFA の解析を行った。その結果，OAHFA のみがコントロールマウスで検出され，α-OAHFA は検出されなかった。検出された OAHFA について，コントロールマウスでは C16:1（図 20D，G），C18:1（図 20E，G），C18:2（図 20F，G）FA を構造中に有する OAHFA（C16:1 OAHFA，C18:1 OAHFA，C18:2 OAHFA）が検出され，C16:0 と C18:0 FA を含む OAHFA はみられなかった（図 20G）。また，いずれの OAHFA 分子種も C30–36 の鎖長の ω-OH FA を有することが示された。検出された OAHFA のうち，C16:1 OAHFA を構成する ω-OH FA はほとんどが一価不飽和型であり C34:1 を含む分子種が最も多く

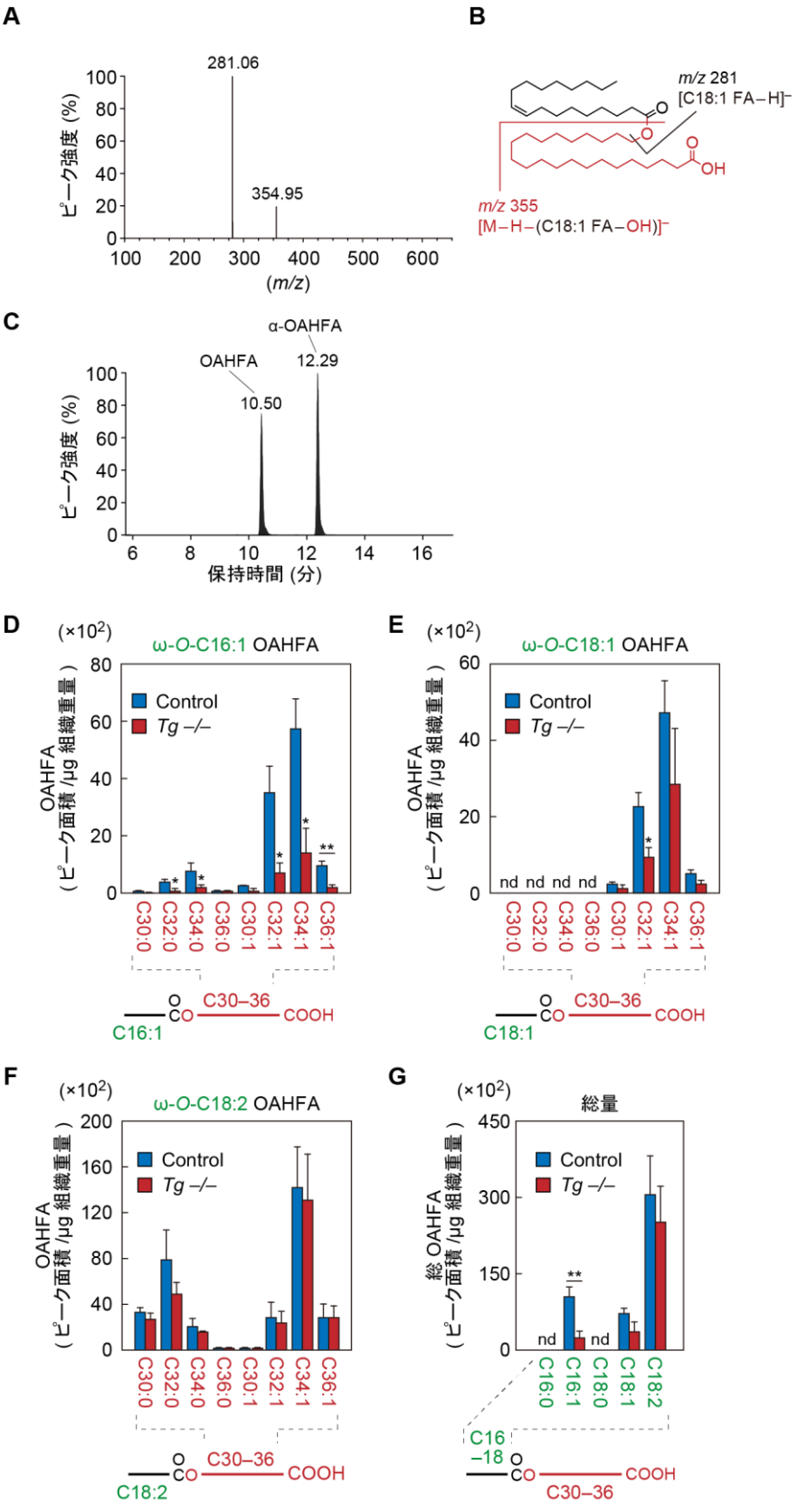

A
281.06
354.95
ピーク強度 (%)
(m/z)
B
m/z 281
[C18:1 FA−H]−
m/z 355
[M−H−(C18:1 FA−OH)]−
OH
C
α-OAHFA
OAHFA
12.29
10.50
ピーク強度 (%)
保持時間 (分)
D
(×10²)
ω-O-C16:1 OAHFA
OAHFA
(ピーク面積 /μg 組織重量)
Control
Tg −/−
C30:0
C32:0
C34:0
C36:0
C30:1
C32:1
C34:1
C36:1
C30–36
COOH
C16:1
E
(×10²)
ω-O-C18:1 OAHFA
nd nd nd nd
C18:1
F
(×10²)
ω-O-C18:2 OAHFA
C18:2
G
(×10²)
総量
総 OAHFA
(ピーク面積 /μg 組織重量)
nd nd
C16:0
C16:1
C18:0
C18:1
C18:2
C16
–18

図 20. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスマイボーム腺における OAHFA の減少

（A，B）OAHFA [(*O*-C18:1)-ω-OH C22:0 FA]の LC-MS/MS を用いたプロダクトイオンスキャン結果。プレカーサーイオンとして[M–H]$^-$（*m/z* 619.5）を選択し，測定を行った際の MS スペクトルグラム（A）と予想される開裂位置（B）。赤色は水酸化 FA を示す。（C）OAHFA 構造異性体 [(*O*-C18:1)-ω-OH C22:0 FA と(*O*-C18:1)-α-OH C22:0 FA] の LC による分離。合成した標準品を AMPP 誘導体化したのちに MRM で検出を行った。（D–G）12 ヶ月齢のコントロールマウス [*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=3）] と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）のマイボーム腺から脂質を抽出し，AMPP 誘導体化を行ったのちに，ω 末端に C16:0（G），C16:1（D, G），C18:0（G），C18:1（E，G），C18:2（F，G）FA を有する OAHFA 分子種について LC-MS/MS による MRM 解析を行った。OAHFA を構成する ω-OH FA の鎖長および不飽和度ごとのピーク面積（D–F）と ω 末端の FA 分子種ごとのピーク面積の合計（G）。グラフの下に各 OAHFA の簡略化した構造を示す。グラフの値は平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。**P*<0.05; ***P*< 0.01; nd, not detected

検出された一方で，飽和型は一価不飽和型に比べて少量が検出されたのみであった（図 20D）。C18:1 OAHFA も C16:1 OAHFA と同様に ω-OH FA は一価不飽和型が多く，飽和型は検出されず，C34:1 を含む分子種が主要であった（図 20E）。C18:2 OAHFA については，C16:1，C18:1 OAHFA と異なり飽和型，一価不飽和型いずれの ω-OH FA を含むものも検出され，飽和型では C32:0 が，一価不飽和型では C34:1 を有する分子種が主要であった（図 20F）。

Tg-Cyp4f39$^{-/-}$マウスについてもコントロールマウスと同じ測定を行った。その結果，C16:1 OAHFA についてはすべての分子種でコントロールマウスと比較して減少が確認された（図 20D）。また，飽和型の ω-OH FA を有する分子種では C30 と C32:0 において，一価不飽和型では C32–36:1 において有意な減少が示され，C16:1 OAHFA の全体量としてはコントロールマウスの約 20%であった（図 20G）。その一方で *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，コントロールマウスと比較して，C18:1 OAHFA については全体で約 50%，C18:2 OAHFA については 90%以上が残存していた。C18:1 および C18:2 OAHFA は，表皮でも発現していることが報告されており [29]，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスで検出された C18:1 および C18:2 OAHFA は，混入している表皮に由来するものと考えられる。各 OAHFA について分子種別に解析を行った場合でも，C18:1 OAHFA では C32:1 の ω-OH FA を有する分子種に減少がみられたものの，その他の分子種については有意な差はみられなかった（図 20E）。C18:2 OAHFA については，すべての分子種で *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスに

おいて減少はみられなかった（図 20F）。したがって，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて明らかな減少の確認された C16:1 OAHFA が，マウスのマイバム脂質における主要な OAHFA であると考えられる。

3.2.5. *Cyp4f39* の欠損によるマイバム脂質中の Type 2ω WdiE の消失

WE は一般に FAl と 1 分子の FA から構成されるモノエステルを指す。その一方で，FAl と FA を構造中に含み，かつ，エステル結合を 2 つ有するワックスエステルクラスが存在し，ワックスジエステル（WdiE）と呼ばれる。WdiE はさらに Type 1 および Type 2 WdiE の 2 種類に分けられる [81]。Type 1 WdiE は，水酸化 FA に FAl と FA がそれぞれ 1 分子結合しているのに対し，Type 2 WdiE は，脂肪族ジオールに 2 分子の FA が結合していることが両者の違いである（図 21A, B）。さらに WdiE には，1 位と ω 位にエステル結合をもつ Type 1/2ω WdiE および 1 位と α 位にエステル結合をもつ Type 1/2α WdiE が構造異性体として存在する。マイバム脂質においては，Type 1 および Type 2 WdiE のいずれも存在が示唆されているものの [51,53]，エステル結合の位置異性体（α または ω 位）について分離分析はされていない。

まず，Type 2 WdiE について，位置異性体を分離したうえで，マイバム脂質中に存在する分子種を特定することとした。OAHFA 同様，Type 2α および Type 2ω WdiE のいずれも標準品は市販されていないため，hexadecane-1,16-diol または hexadecane-1,2-diol と oleoyl (C18:1) chloride から，Type 2ω WdiE [(1,ω-*O*-C18:1)-C16:0]と Type 2α WdiE [(1,α-*O*-C18:1)-C16:0]の 2 つの標準品を作製した。これら 2 つの標準品に対して, LC-MS/MS によるプロダクトイオンスキャンを行った結果, (1,ω-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE については$[M+H-(C18:1\ FA-OH)]^+$（$m/z = 523.25$）と$[M+H-(C18:1\ FA-OH)-H_2O]^+$（$m/z = 505.20$）が，(1,α-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE については$[M+H-(C18:1\ FA-OH)-H_2O]^+$（$m/z = 505.20$）がそれぞれフラグメントイオンとして検出された（図 22A–D）。さらに，LC の移動相条件についても検討を行った結果, 本研究で用いている移動相およびグラジエント条件では, (1,ω-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE は保持時間 13.44 分に，(1,α-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE は 14.31 分に検出され，0.87 分の保持時間の差がみられた（図 22E）。したがって，この分析系を使用することで，同一質量を有する Type 2 WdiE の立体異性体に対して, LC で分離した上で MS/MS による分子種分析が可能であることが示された。

マイバム脂質中の Type 2ω および Type 2α WdiE の検出は LC-MS/MS を用いた MRM によって行った。MRM 条件としては, プレカーサーイオンと$[M+H-(C18:1$ または C16:1 FA−OH)−$H_2O]^+$を選択した（表 9）。この条件でコントロールマウスおよび *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスのマイバム脂質中の Type 2 WdiE の分子種解析を行った結果，コントロールマウスにおいて総炭素数が 62–72，総二重結合数が 2 つま

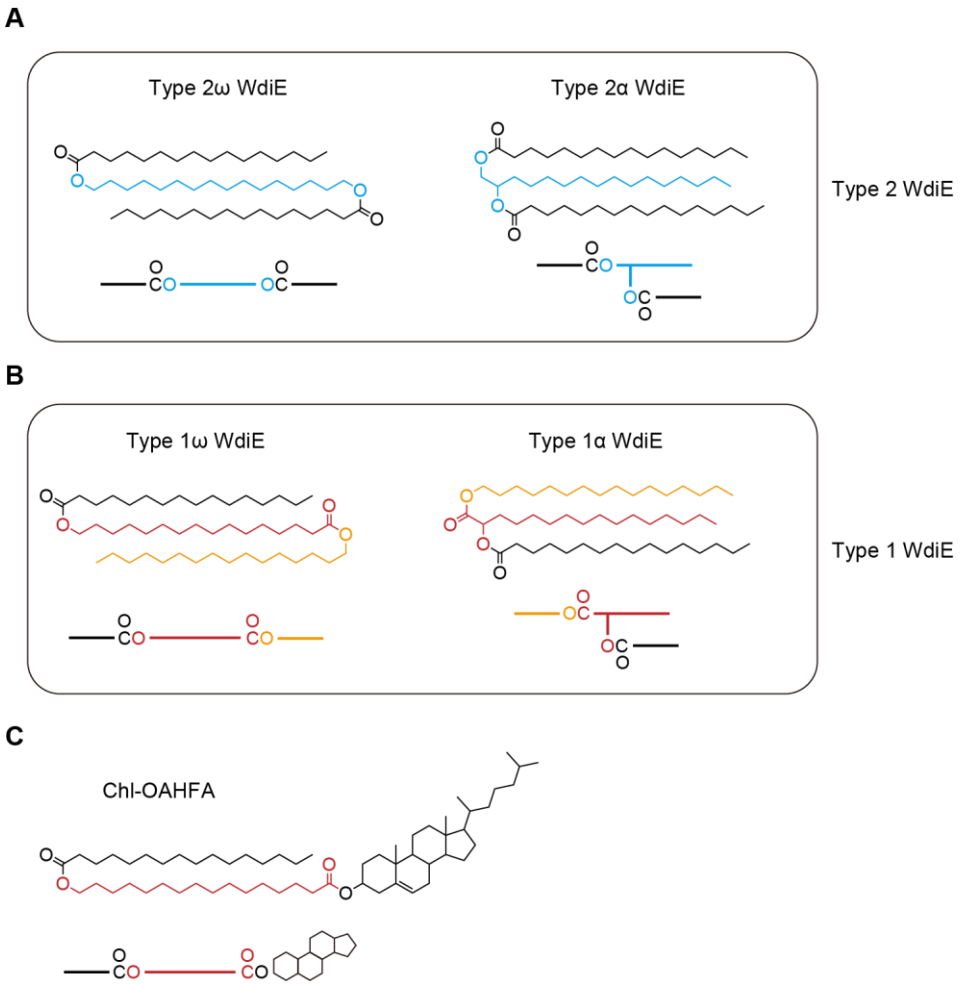


図 21. WdiE と Chl-OAHFA の構造

（A–C）Type 2 WdiE，Type 1 WdiE，Chl-OAHFA の構造式と簡略化した模式図。Type 2ω WdiE および Type 2α WdiE（A）。Type 1ω WdiE および Type 1α WdiE（B）。Chl-OAHFA（C）。明るい青色は脂肪族ジオール，赤色は水酸化 FA，橙色は FAl を示す。

たは 3 つの Type 2ω WdiE が存在することが示され，C66:3 WdiE が最も主要であった（図 23A）。検出された Type 2ω WdiE を構成する FA と脂肪族ジオールの構造を明らかとするために，最も多く検出された C66:3 WdiE についてプロダクトイオンスキャンを行い，得られたフラグメントイオンの解析を行った。その結果，C16:1 または C18:1 FA に関連する 3 つのフラグメントイオン（C16:1 FA 関連; *m/z* = 237.14，727.48，745.49，C18:1 FA 関連; *m/z* = 265.16，699.44，717.47）が検出された（図 24A）。C16:1 FA に関連するフラグメントイオンのイオン強度はい

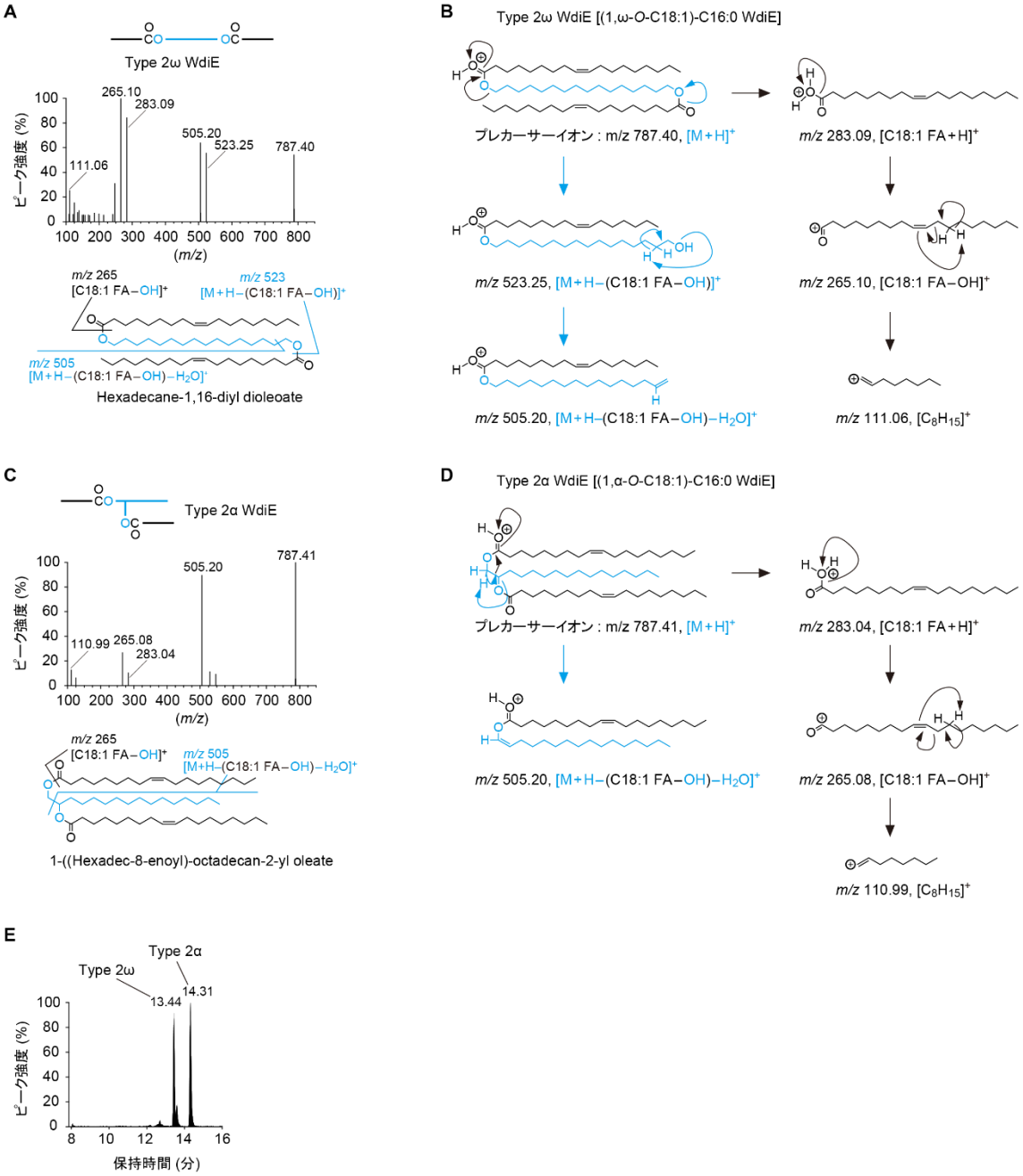


図 22. Type 2 WdiE のフラグメンテーション解析

（A–E）有機化学的に合成した Type 2 WdiE に対してプレカーサーイオンとして $[M + H]^+$ （*m/z* 787.7）を選択し，LC-MS/MS を用いたプロダクトイオンスキャンを行った。(1,ω-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE の MS スペクトルグラム（A）およびフラグメンテーション予測（B）。(1,α-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE の MS スペクトルグラム（C）およびフラグメンテーション予測（D）。A と C は上段に各 Type 2 WdiE の簡易構造式，下段に開裂位置の予想を示す。(1,ω-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE と(1,α-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE の LC クロマトグラム（E）。青色は脂肪族ジオールに由来

する構造を示し，巻き矢印は電子対の移動を意味する。

ずれも，C18:1 FA に関連するフラグメントイオンのイオン強度の約 4 倍であった。この結果は，C66:3 WdiE を構成するすべての FA のうち，78%が C16:1 FA，残る 22%が C18:1 FA であり，検出された C66:3 Type 2ω WdiE は 3 つの Type 2ω WdiE 分子種（C16:1 FA/C34:1 脂肪族ジオール/C16:1 FA，C16:1 FA/C32:1 脂肪族ジオール/C18:1 FA，C18:1 FA/C30:1 脂肪族ジオール/C18:1 FA）の混合物であることを示している。さらに C16:1 FA と C18:1 FA の強度比から，C66:3 Type 2ω WdiE のうち，マイバム脂質中に最も多く含まれる分子種は C16:1 FA/C34:1 脂肪族ジオール/C16:1 FA であることが示された（表 13）。同様の解析を他の分子種についても行った結果，マイバム脂質中に含まれる Type 2ω WdiE を構成する脂肪族ジオールは C30–36 の鎖長であり，飽和型が 14%，一価不飽和型が 86%を占め，2 つの FA については C16:1 FA が主要であり，C18:1 FA が占める割合は小さいことが明らかとなった。*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスに対しても同じ測定を行った結果，コントロールマウスで検出された Type 2ω WdiE のすべての分子種において著しい減少が確認され，総量ではコントロールマウスの 0.4%であった（図 23A，C）。したがって，*Cyp4f39* はマイボーム腺における Type 2ω WdiE の産生に重要であることが明らかとなった。

コントロールマウスにおいて Type 2ω WdiE に加えて Type 2α WdiE も検出された。検出された Type 2α WdiE は，総炭素数が 52–62 であり，Type 2ω WdiE と比較して短い鎖長の分子種が多くみられ，中でも C56:2 および C58:2 WdiE が多くみられた（図 23B）。Type 2α WdiE についても Type 2ω WdiE と同様に，プロダクトイオンスキャンで得られたフラグメントイオンの解析を行った結果，構造中の脂肪族ジオールとして C20–30 の鎖長を有し，飽和型が 87%，一価不飽和型が 13%であった。また 2 つの FA については，ほとんどが C16:1 FA であることが明らかとなった（表 13）。その一方で，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて Type 2α WdiE は，総量でコントロールマウスの約 1.5 倍に増加が確認され（図 23B，C），特に総炭素数≥56 の分子種で増加率が大きいという結果であった。以上の結果より，マイバム脂質中には Type 2α および Type 2ω WdiE の両方が存在し，*Cyp4f39* は Type 2ω WdiE の産生に関わる一方で，Type 2α WdiE の産生には関与しないことが示された。*Cyp4f39* は≥C30 の FA を基質とすることから，≤C30 の鎖長の脂肪族ジオールを中核とする Type 2α WdiE の産生に関わらないことは妥当である。そのため，Type 2α WdiE の産生には *Cyp4f39* とは異なる FA またはアシル CoA の水酸化酵素が関与することが予想される。

3.2.6. *Cyp4f39* の欠損によるマイバム脂質中の Type 1ω WdiE およびコレステロール OAHFA の消失

C66:3 Type 2ω WdiE に対するプロダクトイオンスキャンを行った際に，LC ク

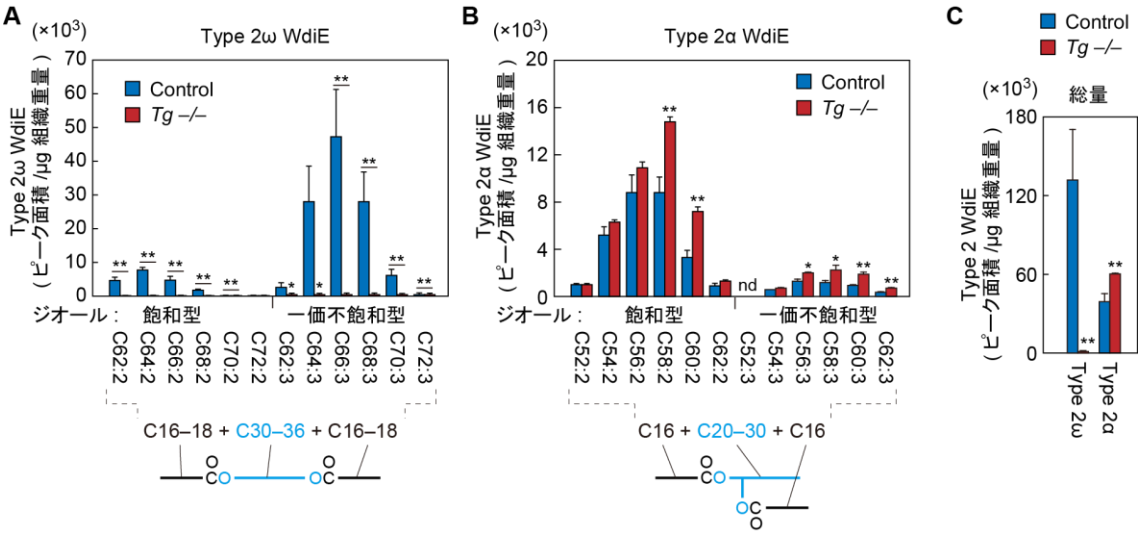


図 23. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスマイボーム腺における Type 2ω WdiE の消失

（A–C）12 ヶ月齢のコントロールマウス [*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=3）] と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）のマイボーム腺から脂質を抽出し，Type 2ω WdiE（A，C）および Type 2α WdiE（B，C）について LC-MS/MS による MRM 解析を行った。Type 2 WdiE を構成する脂肪族ジオールと FA の総炭素数と総不飽和度ごとのピーク面積（A，B）と構造異性体ごとのピーク面積の合計（C）を示す。グラフの下に各 Type 2 WdiE の簡略化した構造を示す。グラフの値は平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。*P<0.05; **P< 0.01; nd, not detected

ロマトグラム上に Type 2ω WdiE のピーク（保持時間 17.70 分）と異なる位置（保持時間 16.72 分）に未知のピークが検出された（図 24B）。このピークに含まれるフラグメントイオンを解析した結果，分子イオンピークに加えて *m/z* 237.14 と 741.46 の 2 つのプロダクトイオンが確認された（図 24C）。*m/z* 237.14 は，C16:1 FA に由来する質量（[C16:1 FA–OH]$^+$）に相当することから，このピーク中の化合物には最低 1 分子の C16:1 FA が含まれることが予想された。さらに，分子イオン（*m/z* 981.67）とフラグメントイオン *m/z* 741.46 の差が 240.21 であり，この質量は C16:1 FAl に相当する。したがって，*m/z* 741.46 は[M＋H–C16:1 FAl]$^+$と考えられる。プレカーサーイオンとして C66:3 WdiE を指定していることから，C66:3 から構造中に含まれることが予想された C16:1 FA と C16:1 FAl の炭素数および二重結合数を引くと，C34:1 となる。これらの解析結果より，保持時間 16.72 分に検出された未同定ピークは，C16:1 FA/C34:1 ω または α-OH FA/C16:1

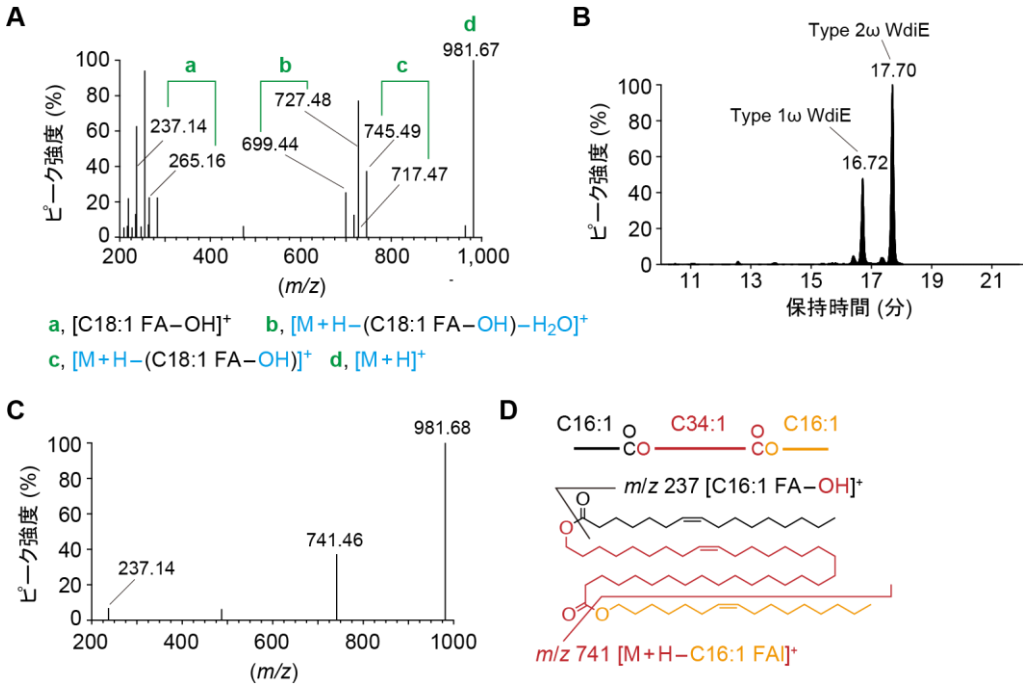


図 24. Type 1 WdiE および Type 2ω WdiE の LC-MS/MS による測定とフラグメントイオン解析

（A–D）12 ヶ月齢の *Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$のマイボーム腺から脂質を抽出し，[C66:3 WdiE + H]$^+$（*m/z* 981.7）を選択し，LC-MS/MS を用いたプロダクトイオンスキャンを行った。Type 2ω WdiE（A）と Type 1 WdiE（C）の MS スペクトルグラムと LC クロマトグラム（B）を示す。Type 1ω WdiE の簡略化した構造と C のフラグメントイオンから予想される開裂位置（D，下段）。赤色は水酸化 FA を，橙色は FAl を示す。

FAl からなる Type 1 WdiE であることが示唆された（図 24D）。

マイバム脂質中の Type 1 WdiE について，[M + H–C16:1 FAl]$^+$を Type 1 WdiE 特異的なフラグメントイオンとして検出するように設定し（表 10），LC-MS/MS を用いた MRM を行った。その結果，コントロールマウスのマイボーム腺からは，C16:1 または C18:1 FA と C30–36 の水酸化 FA，C16:1 FAl からなる Type 1 WdiE（構成する FA と水酸化 FA の炭素数の合計は C42–52）が検出された（図 25A）。また，水酸化 FA は一価不飽和型が主要であり，飽和型は検出されなかった。*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスについても同じ測定を行った結果，コントロールマウスで検出されたすべての Type 1 WdiE 分子種について顕著な減少が確認され，総量ではコントロールマウスの約 4%であった。この結果は，検出された Type 1 WdiE は構造中に Cyp4f39 が産生に関与する ω 水酸基を有することを示しており，すなわち，FA/ω-OH FA/FAl から構成された Type 1ω WdiE であることが明らかとな

った。

CE についても，WE と同様にエステル結合を 2 つ有するコレステロールジエステルが存在する（図 21C）。マイバム脂質中のコレステロールジエステルとして，Chl と OAHFA が結合したコレステロール OAHFA（Chl-OAHFA）の存在を示唆する報告がある [51,53]。しかしながら，Chl-OAHFA を構成する水酸化 FA の水酸基の位置（α または ω 位）は不明であり，詳細な分子種分析が必要である。本研究では Cyp4f39 の Chl-OAHFA 産生への関与を明らかとするために，LC-MS/MS を用いてコントロールマウスと *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスのマイバム脂質中の Chl-OAHFA 解析を行った（表 11）。その結果，コントロールマウスのマイバム脂質中からは，OAHFA 側の鎖長として C46–54，二重結合数は 1 個または 2 個の分子種が検出され，一方の *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，すべての分子種が消失していた（図 25B）。したがって，本研究で検出された Chl-OAHFA は構造中に Cyp4f39 が産生に関わる ω-OH FA を有していることが明らかとなった。本研究の中で OAHFA は，C30–36 の ω-OH FA と C16:1 FA からなる分子種がマイバム脂質中では主要であることが明らかとなっている（図 20）。そのため，コントロールマウスで検出された Chl-OAHFA もまた C30–36 の ω-OH FA と C16:1 FA からなる OAHFA を主要な構成要素としていると考えられる。以上の結果より，Cyp4f39 は OAHFA や Type 2ω WdiE だけではなく，Type 1ω WdiE や Chl-OAHFA の産生にも関与し，マイバム脂質中のすべての ω 水酸化脂質産生に重要であることが示された。

3.2.7. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおける CE および WE 量の増加

Cyp4f39 の欠損による OAHFA および OAHFA 代謝物（Type 1/2ω WdiE と Chl-OAHFA）以外のマイバム脂質産生への影響を明らかとするために，コントロールマウスと *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスのマイバム脂質を順相系の薄層クロマトグラフィー（TLC）によって分離した。順相系 TLC では，薄層板表面のシラノール基との相互作用によって，極性物質がより強く保持されるため，疎水性の高い物質の移動度は大きくなる。本研究では，マイバム脂質全体を分離するための展開系（展開系 1）と CE や WE といった疎水性の高い脂質の分離を目的とした展開系（展開系 2）の 2 種類の展開系を使用した。分離の結果，CE や WE はいずれの展開系でも最も移動度の大きい位置に検出されたことから，マイバム脂質の中でも最も疎水性が高い脂質クラスであることが確認された（図 26A）。一方の OAHFA は Chl やリン脂質などの高極性脂質と同様に，いずれの展開系でも移動度は小さかった。OAHFA 代謝物については，代謝物間で分離はほとんどみられず，CE/WE と OAHFA の中間の移動度の位置に検出された。したがって，WdiE や Chl-OAHFA は CE や WE と OAHFA の中間程度の極性を有していると考えら

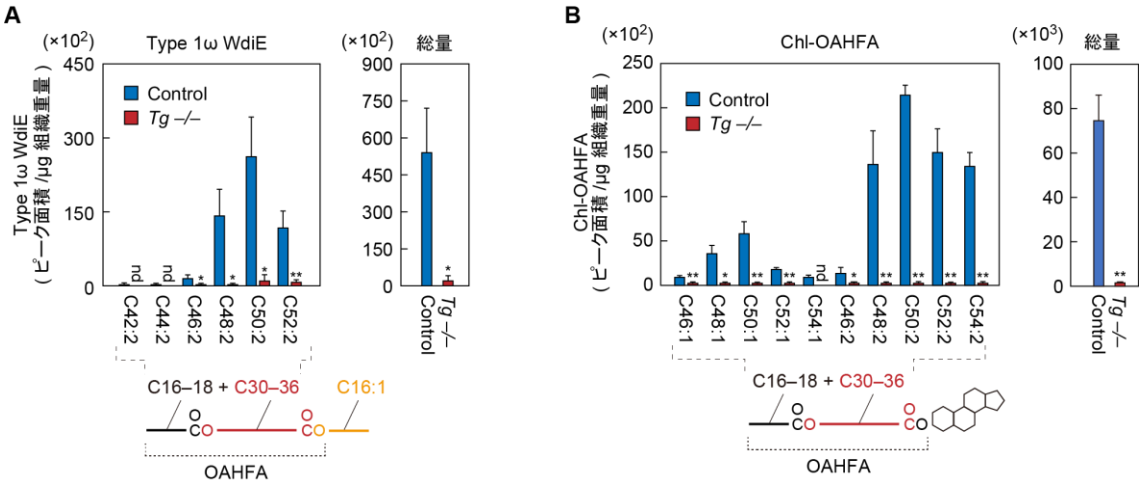


図 25. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスマイボーム腺における Type 1ω WdiE および Chl-OAHFA の消失

（A，B）12 ヶ月齢のコントロールマウス［*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=3）］と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）のマイボーム腺から脂質を抽出し，Type 1 WdiE（A）および Chl-OAHFA（B）について LC-MS/MS による MRM 解析を行った。Type 1 WdiE を構成する FA，水酸化 FA，FAl および Chl-OAHFA を構成する FA，水酸化 FA の総炭素数と総不飽和度ごとのピーク面積（A, B 左図）とピーク面積の合計（A, B 右図）を示す。グラフの下に各脂質クラスの簡略化した構造を示す。グラフの値は平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。*P<0.05; **P< 0.01; nd, not detected

れる。

TLC によるマイバム脂質の分離と検出の結果，CE と WE について *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでコントロールマウスよりも増加がみられた。そこで，増加している分子種の詳細を明らかとするために，CE について LC-MS/MS による解析を行った。コントロールマウスにおいては C16–30 の飽和 FA および C16–36 の一価不飽和 FA を含む CE が検出された（図 26B）。一方の *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，多くの分子種がコントロールマウスよりも多く検出され，CE の総量ではコントロールの約 1.7 倍に増加していた。また，特に一価不飽和型の≥C32 の FA を含む分子種について顕著な増加がみられた。この結果は，≥C32 FA が通常は Cyp4f39 の基質として使用されるのに対し，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，*Cyp4f39* の欠損によってこれらの FA が ω-OH FA とならずに，CE 合成に使用されたためと考えられる。

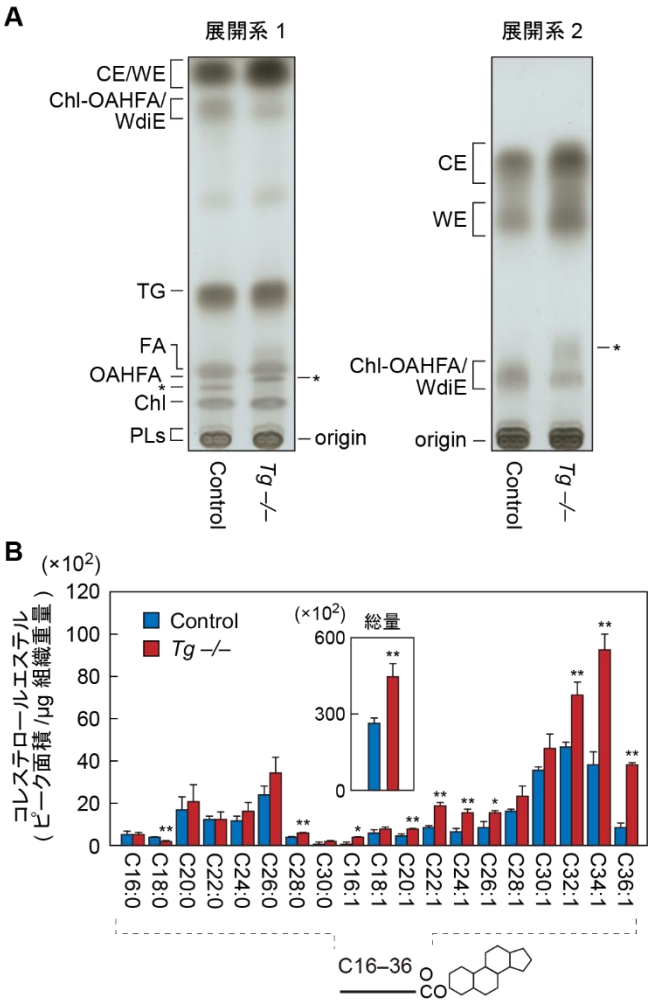


図 26. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスマイボーム腺における CE と WE の増加

（A）12 ヶ月齢のコントロールマウス（*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$）および *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの眼瞼からマイバム脂質を抽出し，展開系 1 [hexane/diethyl ether/acetic acid (90:25:1, v/v)] または展開系 2 [hexane/toluene (1:1, v/v)] を用いて TLC による分離を行い，銅リン酸試薬による検出を行った。アスタリスクは未同定の脂質分子種を示す。（B）12 ヶ月齢のコントロールマウス [*Tg-Cyp4f39*$^{+/+}$（n=3）] と *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウス（n=3）のマイボーム腺から脂質を抽出し，CE 分子種について LC-MS/MS による MRM 解析を行った。CE を構成する FA の総炭素数と総不飽和度ごとのピーク面積と，図中にピーク面積の合計を示す。グラフの下に CE の簡略化した構造を示す。グラフの値は平均値±標準偏差を示し，Student's *t*-検定によって有意差を求めた。**P*<0.05; ***P*< 0.01; TG，トリアシルグリセロール; PL，リン脂質

3.3. 考察

涙液油層において最も主要なマイバム脂質は CE や WE といった非極性脂質であり，外界と接する油層の外層側において非極性脂質層を形成している。OAHFA は，両親媒性脂質層の構成脂質として液層側に広がっており，非極性脂質層と液層の間で双方と相互作用することで涙液全体の安定性の維持に関わっていると考えられている [38]（図 6）。しかしながら，OAHFA の産生経路が明らかとなっていないことから, 涙液中で OAHFA を欠損したモデルが作製されておらず，実験的に OAHFA の機能を証明した報告はされていなかった。本研究では，脂肪酸 ω 水酸化酵素 Cyp4f39 が OAHFA の産生に関わることを明らかとした（図 20）。作製した *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは，涙液層の不安定化や角膜上皮障害，マイボーム腺の閉塞が観察され, ドライアイであることが示された（図 17）。また，Cyp4f39 が OAHFA だけではなく OAHFA の代謝物（Type 1ω WdiE, Type 2ω WdiE, Chl-OAHFA）の産生にも重要であることが明らかとなり（図 23A, 25）, *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスで観察されたドライアイは, OAHFA や OAHFA 代謝物（ω 水酸化脂質）の減少による複合的な影響によるものと考えられる。

3.3.1. マイバム脂質中の ω 水酸化脂質生合成経路

OAHFA の生合成経路はこれまで明らかとはなっていなかった。しかしながら, 本研究により *Cyp4f39* の欠損によってマイバム脂質中の OAHFA が顕著に減少したことから, Cyp4f39 による脂肪酸 ω 水酸化が OAHFA 生合成に関わっていることが明らかとなった。本研究では Cyp4f39 がヒト CYP4F22 のオルソログであることを示しており（図 8A），ヒトにおいても OAHFA の生合成に CYP4F22 が関わることが予想される。*CYP4F22* は ARCI の原因遺伝子であり，魚鱗癬症状に言及した報告が挙がっている [25]。これらの報告においては，変異患者におけるドライアイ症状について言及はされていないものの，臨床的には魚鱗癬患者の多くでドライアイ症状を呈することが知られている。

CYP4F22 およびマウスオルソログの Cyp4f39 は，表皮脂質ラメラ形成に重要なアシルセラミドの生合成経路に関わる唯一の脂肪酸 ω 水酸化酵素であり，C30–36 の FA を基質に ω-OH FA を合成する（図 13）。*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて検出された OAHFA 分子種は C30–36 の超長鎖 ω-OH FA を有しており, OAHFA の生合成にはアシル CoA の伸長反応が必須となるため，OAHFA の生合成経路は以下のように予想される。はじめに，ELOVL1 および ELOVL3 によって長鎖アシル CoA から極長鎖アシル CoA が産生され，さらに ELOVL4 によって≥C30 のアシル CoA に伸長される。≥C30 ω-OH FA の産生に CYP4F22（Cyp4f39）が関わることが本研究によって明らかとなったことから，ELOVL4 によって伸長されたアシル CoA は CoA の脱離によって超長鎖 FA となったのちに CYP4F22 に

よる脂肪酸 ω 水酸化を受ける。最終的に ω-OH 超長鎖 FA の ω 末端に C16:1-CoA が付加することで OAHFA となる（図 27）。

アシル CoA の伸長はマロニル CoA との縮合，還元，脱水，還元の 4 段階からなる脂肪酸伸長サイクルで行われる [82]。このサイクルの律速段階は最初のマロニル CoA との縮合過程であり，脂肪酸伸長酵素 ELOVL によって行われる [1]。ELOVL には，哺乳類では 7 つのアイソザイムが存在し，それぞれが鎖長や不飽和度の異なるアシル CoA を基質とすることが知られている [82]。ELOVL アイソザイムの中でも ELOVL1，ELOVL3，ELOVL4 の 3 つが OAHFA を構成する ω-OH FA の基質となる超長鎖の一価不飽和 FA の産生に関わることが予想されていた。3 つの ELOVL アイソザイムの基質認識の特徴として, ELOVL1 と ELOVL3 は C22–24 のアシル CoA を [54,83]，ELOVL4 は≥C24 のアシル CoA を基質とすることが明らかとなっている [33,84]。不飽和度による基質認識の違いとしては，ELOVL1 については, 特に飽和型の極長鎖アシル CoA に活性が高く [54], ELOVL3 や ELOVL4 は一価不飽和アシル CoA に対しても活性を有することが報告されている [33,55,84]。そのため，*Elovl1* 欠損マウスでは，OAHFA を構成する ω-OH FA が主に一価不飽和型であるため，OAHFA への影響は少ない。加えて，*Elovl3* mRNA の発現上昇が確認されており，Elovl1 の機能を Elovl3 が相補しているため，OAHFA の減少はみられていない [54]。しかしながら，CE や WE はそれぞれ飽和型の極長鎖 FA または FAl から構成される分子種も多いため, *Elovl1* 欠損マウスにおいてアシル鎖の短鎖化が生じ，ドライアイ様の表現型が観察されている [54]。また，*Elovl4* 欠損マウスについてもマイボーム腺開口部の閉塞（Plugging）が観察されており，マイバム脂質産生に関与することが明らかとなっている [85]。なお，OAHFA 産生経路における CoA の脱離に関わるチオエステラーゼと，最終段階の ω-OH 超長鎖 FA とアシル CoA のエステル化反応を担う酵素は明らかとなっていない。

Type 2 WdiE がマイボーム腺に存在することはすでに示唆されてきた [51,53]。しかしながら，Type 2 WdiE のもつ 2 つのエステル結合の位置異性体（Type 2α および Type 2ω WdiE）について分離分析はされていなかった。本研究では，Type 2α および Type 2ω WdiE の分離分析法を確立し，マイバム脂質中にはいずれも存在することを示すとともに，Type 2ω WdiE の産生に Cyp4f39 が関わることを明らかとした（図 23A）。さらに，Type 1 WdiE やコレステロールジエステルについても解析を行い，マイバム脂質中に Type 1ω WdiE および Chl-OAHFA が存在することを証明し，いずれも Cyp4f39 が産生に関わることを見出した（図 25）。

検出された Type 1ω WdiE，Type 2ω WdiE，Chl-OAHFA はいずれも，OAHFA に類似した炭素鎖長や不飽和度を有していたことから，OAHFA 代謝物と考えられ，以下のような産生経路が予想される（図 27）。はじめに，OAHFA 生合成経路に

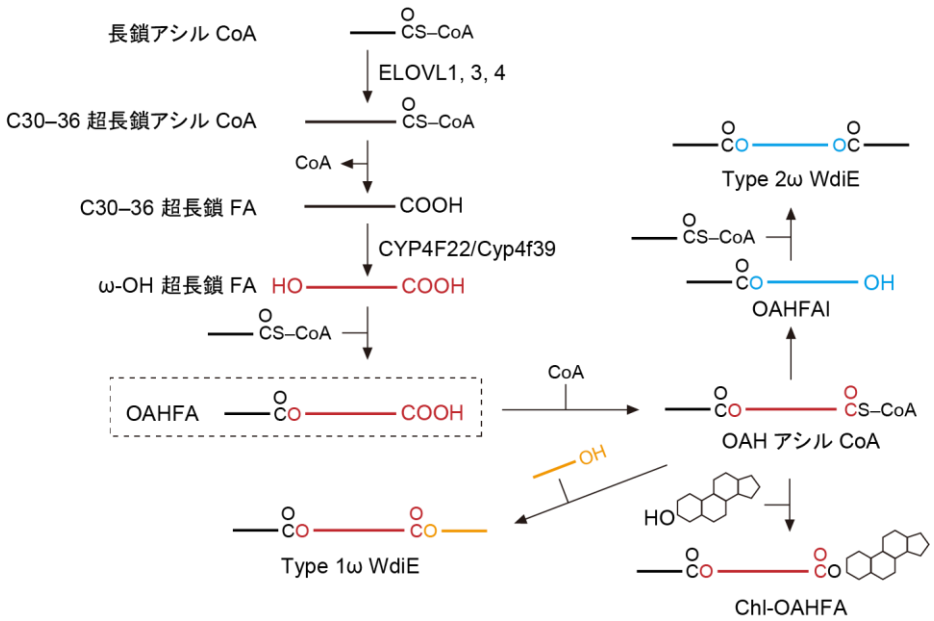


図 27. OAHFA および OAHFA 代謝物の生合成経路モデル

OAHFA および OAHFA 代謝物の生合成経路の予想モデル。長鎖アシル CoA の脂肪酸伸長酵素 ELOVL1/3/4 による伸長に続く CoA 脱離によって C30–36 の超長鎖 FA が産生される。超長鎖 FA は CYP4F22/Cyp4f39 による ω 水酸化を受け，ω-OH 超長鎖 FA となる。ω-OH 超長鎖 FA に FA が付加することで OAHFA が合成される。OAHFA はさらに CoA 付加を受け，OAH アシル CoA となる。OAH アシル CoA が還元され OAHFAl となり，さらにもう 1 分子の FA が付加することで Type 2ω WdiE が，OAH アシル CoA に FAl または Chl が付加することでそれぞれ Type 1ω WdiE と Chl-OAHFA が合成される。図中の構造はすべて簡略化した構造で示し，赤色は ω-OH FA，青色は ω-OH FAl，橙色は FAl を意味する。OAH アシル CoA, (*O*-アシル)-ω-OH アシル CoA; OAHFAl, (*O*-アシル)-ω-OH 脂肪族アルコール

よって産生された OAHFA に CoA が付加され，OAH アシル CoA [(*O*-アシル)-ω-OH（OAH）アシル-CoA]となる。この OAH アシル CoA が FAl またはコレステロールに転移することで, それぞれ Type 1ω WdiE と Chl-OAHFA が産生される。一方で OAH アシル CoA がアシル CoA 還元酵素によって OAHFAl となり，最終的に FA とエステル結合を形成することで Type 2ω WdiE が産生される。本稿においては，Type 1ω WdiE，Type 2ω WdiE，Chl-OAHFA は OAHFA から派生した代謝物と予想しているものの，OAHFA を経由せずに ω-OH FA から派生する可能性も，現在のところ否定はできない。その場合，CoA 付加を受けた後 FAl や Chl と結合し, 最後に ω 末端に FA が付加することで Type 1ω WdiE や Chl-OAHFA

が，ω-OH アシル CoA が還元され脂肪族ジオールとなったのちに両端がエステル化されることで Type 2ω WdiE となる。以上より，OAHFA 代謝物の生合成経路については，さらなる研究が必要である。また，本研究で存在が確認された Type 2α WdiE は，C20–30 の α-OH FA を構造中に有しており，*Cyp4f39* の欠損によって減少しなかった（図 23B，C）。したがって，Type 2α WdiE を構成する α-OH FA は Cyp4f39 とは異なる酵素によって産生されていることが予想される。脂肪酸の α 位に水酸基を導入する酵素としては，脂肪酸 2 位水酸化酵素（FA2H）が知られている [80,86]。FA2H のマイボーム腺における発現は明らかとはなっていないものの，表皮での発現が報告されており，極長鎖 FA に対して活性を有することが報告されている。野生型マウス表皮における水酸化 FA を構造中に有するセラミドの解析結果では，Fa2h に由来する α-OH セラミドは C16–26 の鎖長の分子種が検出され（図 14B），一方の Cyp4f39 に由来する ω-OH セラミドおよびアシルセラミドは C30–36 の鎖長の分子種が検出されており（図 14A），それぞれ Type 2α WdiE と Type 2ω WdiE の鎖長分布と近似している。したがって，直接の関係を示すデータはないものの，Type 2α WdiE の産生には FA2H が関与することが予想される。

3.3.2. 涙液層の形成と OAHFA

涙液は瞬目時，閉眼動作の際に分泌される。涙液層の形成は，開眼直後から始まり，大きく 2 つのステップで行われることが知られている [41,87]。1 つ目のステップは，液層の眼球表面への伸展である（図 28A, 左図）。開眼直後，液層を構成する液性成分は下眼瞼側に貯留した状態である。開眼動作が進むと，上眼瞼側が陰圧となっていくため，下眼瞼側の液層成分が引き上げられ，眼球表面全体へと伸展される。この時，油層脂質の大部分は上眼瞼側へは伸展せずに下眼瞼側に貯留したままになっている。これにより，表面圧勾配が形成され，この圧勾配が 2 つ目のステップである油層の液層表面への伸展の駆動力となる。油層の液層表面への伸展は，表面圧勾配を打ち消すように上眼瞼側に向かって生じ（Gibbs-Marangoni 効果），液層を伴って広がることで均一な厚さの涙液層が形成される [87,88]（図 28A, 右図）。OAHFA は，疎水鎖と親水基によって両親媒性を示す脂質である。そのため OAHFA を含む両親媒性脂質は，涙液層の形成時，1 つ目のステップの際に液層表面に広がっていることが予想される。OAHFA は，水相の表面張力を低下させることが報告されており [89]，涙液層の形成時に液層表面に広がることで，液層の表面張力を低下させ，続く油層の伸展を容易にしていると考えられる。OAHFA が減少した場合，液層の表面張力が上昇し，油層の液層表面への伸展性が低下する可能性がある（図 28B）。したがって，本研究で *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいて観察された涙液の貯留（図 16D，E）は OAHFA の減少

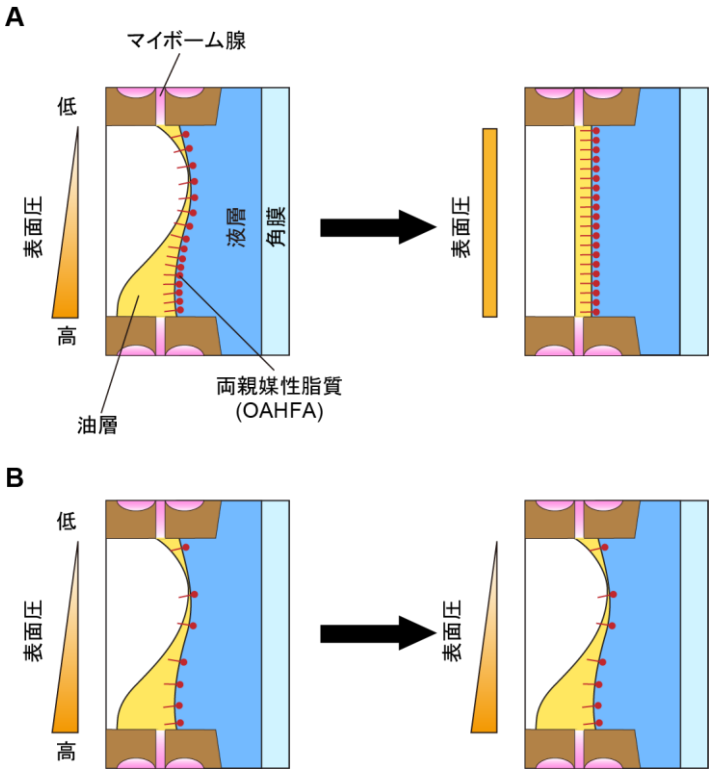


図 28. 瞬目後の涙液層形成の 2 ステップモデル

（A）涙液組成の恒常性が維持されている場合の涙液層の形成モデル。瞬目によって分泌された涙液は瞬目直後，不均一に角膜表面に伸展している。OAHFA を含む両親媒性脂質量が十分に存在する場合，両親媒性脂質は瞬目直後から開眼動作中に液層成分とともに伸展し，液層表面の表面張力を低下させる（A，左図）。その後，油層の不均一な分布で生じた表面圧勾配を打ち消すように油層が液層表面に伸展し，均一な涙液層が形成される（A，右図）。（B）両親媒性脂質が減少した状態における涙液層の形成モデルの予想。両親媒性脂質が減少することで，液層表面の表面張力の低下が生じない（B，左図）。その結果，液層表面に伸展するはずの油層の伸展性が低下し，涙液層全体が不均一な状態が続く（B，右図）。

に起因した油層の伸展異常と考えられる。

3.3.3. ω 水酸化脂質を介する油層中の脂質極性勾配の形成

油層と液層には界面が存在する。しかしながら，油層を構成するマイバム脂質の大部分を占める CE や WE は，非極性脂質に分類され，非常に低い極性（高い疎水性）であることから，液層との安定な界面の形成は困難である。また，涙液層形成時に液層とともに広がる極性脂質のうち，リン脂質はマイバム脂質中で

の存在量が極端に少なく，十分に非極性脂質層と液層の安定化を行うことができない[51]。OAHFA は，マイバム脂質中に 1–5%存在するとされており[51]，界面における安定化には十分な量と考えられる。さらに，長い疎水鎖と極性基によって，非極性脂質層，液層の双方と相互作用が可能であることから，非極性脂質層と液層の安定化にも重要であると考えられる。本研究ではさらに，CE/WE と OAHFA の中間程度の極性を有する OAHFA 代謝物（Type 1ω WdiE, Type 2ω WdiE, Chl-OAHFA）の存在が明らかとなった（図 26A）。この知見は，OAHFA 代謝物が CE/WE と OAHFA の間に分布し，双方と相互作用していることを示唆している。Type 2 WdiE については，表面張力の低下作用が低く，水相上での分散性も低いことが報告されている[89]。そのため，OAHFA 代謝物は，涙液層形成の 2 つ目のステップにおいて，CE や WE とともに OAHFA を含む液層上に伸展することが予想される。したがって，最終的に完成した涙液層は，外界側から順に CE/WE，OAHFA 代謝物，OAHFA，リン脂質というように徐々に極性を変化させていくことで極性勾配が形成され，油層と液層という極性の大きく異なる 2 層間の界面を安定化させていると考えられる（図 29）。*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスにおいては，OAHFA の減少とともに OAHFA 代謝物が消失したことで，極性勾配の形成異常が生じ，その結果としてマイバム脂質が眼瞼縁に蓄積し，マイバム脂質のマイボーム腺からの分泌異常と，最終的にマイボーム腺閉塞をきたしていると考えられる。また，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスでは Type 2ω WdiE の消失とともに，Type 2α WdiE の増加も確認されているが（図 23B，C），結果としてドライアイ症状を呈していることから，エステル結合をアシル鎖の両端に持つ直線的な構造（ω タイプ）であることが CE/WE および OAHFA との相互作用に有効であり，Type 2α WdiE の分岐したようなアシル鎖構造では極性勾配の形成を代替することができないと考えられる。

3.3.4. 今後の展望

本研究によって，OAHFA および OAHFA 代謝物（Type 1ω WdiE, Type 2ω WdiE, Chl-OAHFA）の産生に Cyp4f39/CYP4F22 が関わることが明らかとなり，これまで不明であった ω 水酸化脂質の生合成経路解明の一端となった。さらに，本研究で得られた知見を基に，油層から液層にかけての脂質極性勾配が油層の液層上における安定性の維持に関わるという新たな涙液層モデルを提唱するに至った。

ドライアイは，全世界で年々患者数が増加している疾患である。コンタクトレンズの装用やコンピューター，スマートフォンの普及により，マイボーム腺機能不全を呈するドライアイ患者は今後も増加することが予想される。現行の点眼薬は，液層を主標的としたものが大部分であり，マイバム脂質によって形成され

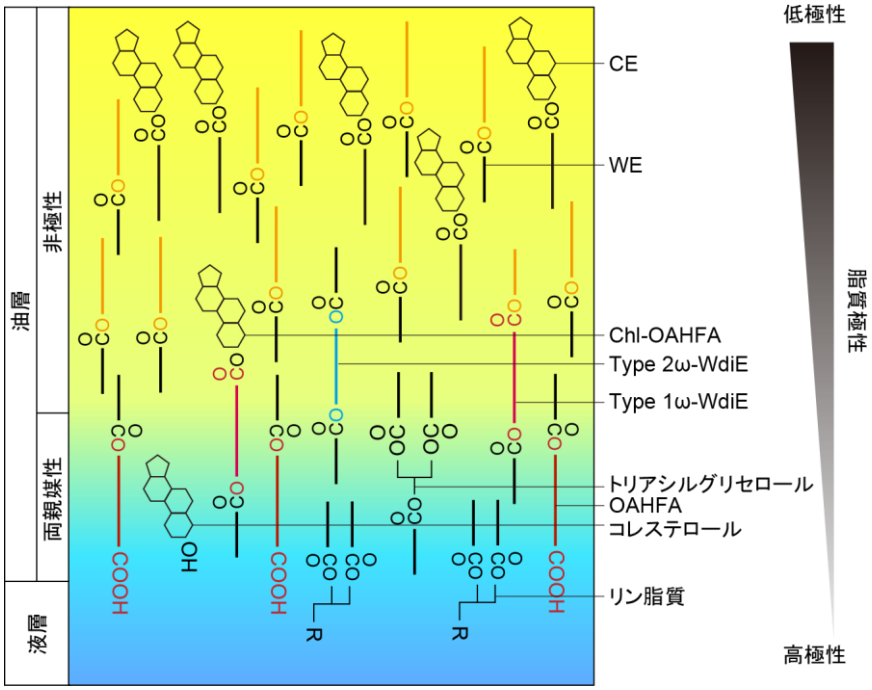


図 29. OAHFA および OAHFA 代謝物を介した涙液油層中の脂質極性勾配の形成モデル

涙液油層中の脂質極性勾配モデル。非極性脂質である CE や WE は非極性脂質層の中でも最も外界側に広がっている。一方で両親媒性脂質である OAHFA，リン脂質，コレステロール，トリアシルグリセロールは，極性部を介して液層と相互作用が可能であるため，両親媒性脂質層として油層中の液層側に広がる。Chl-OAHFA や WdiE は非極性脂質層に含まれるものの，非極性脂質層中では両親媒性脂質層側に広がる。Chl-OAHFA や WdiE は CE/WE と OAHFA の間の極性を示し，かつ，両端に有する 2 つのエステル結合を介したアシル鎖によって CE/WE と両親媒性脂質の双方と相互作用する。マイバム脂質を構成する多様な極性の脂質クラスによって，涙液油層から液層にかけて脂質極性勾配が形成されている。

る油層を標的とした治療薬の開発は進んでいない。この原因として，マイバム脂質組成の詳細が十分に明らかとなっていないことが挙げられる。本研究では，特に解析が困難であった OAHFA や OAHFA 代謝物の解析法の確立に成功した。OAHFA や OAHFA 代謝物といった ω 水酸化脂質は，油層の伸展性の維持や油層/液層の安定な界面形成のために重要な脂質であることから，CYP4F22 など，これらの産生に関わる遺伝子の発現を増加させるような点眼薬の開発や，ω 水酸化脂質を配合した点眼薬と，従来から使用されている液層を標的とした点眼薬を組み合わせるといった，新たな治療戦略の確立が期待される。

3.4. 材料と方法

3.4.1. *Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの作製

IVL プロモーターの制御下で *3×FLAG-Cyp4f39* を発現するトランスジーン（*Tg-Cyp4f39*）の作製過程を以下に示す。マウス精巣の cDNA を鋳型に PCR によって *Cyp4f39* を増幅し，3×FLAG ベクター（pCE-puro 3×FLAG-1）[90]にクローニングすることで pCE-puro 3×FLAG-Cyp4f39 プラスミドを作製した。pCE-puro 3×FLAG-Cyp4f39 プラスミド中の *3×FLAG-Cyp4f39* フラグメントを切り出し，ヒト *IVL* プロモーターを有する pH3700-pL2 ベクター[91]に挿入し，pH3700-pL2-3×FLAG-Cyp4f39 プラスミドを作製した。pH3700-pL2-3×FLAG-Cyp4f39 プラスミド中の *IVL* promoter-*3×FLAG-Cyp4f39*-polyA トランスジーンを切り出し，精製したのち，BDF1 マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。トランスジーンフラグメント（678 bp）を増幅させるプライマーペア [Involucrin-Tg-forward (F)および Cyp4f39-reverse (R); 表 1] を用いてゲノミック PCR を行った結果，4 匹の 3×FLAG-Cyp4f39 タンパク質を発現しているファウンダーマウスが得られた。ファウンダーマウスと *Cyp4f39*$^{+/-}$マウスを交配させ，トランスジェニックマウス（*Tg-Cyp4f39*$^{+/-}$マウス）を作製した。さらに *Tg-Cyp4f39*$^{+/-}$マウスを C57BL/6J 系のマウスと交配し，トランスジーンを有する 4 系統を確立した。4 系統それぞれについて *Tg-Cyp4f39*$^{+/-}$マウス同士を交配させ，*Tg-Cyp4f39*$^{-/-}$マウスの表皮において 3×FLAG-Cyp4f39 タンパクが発現していることがイムノブロッティングにより確認された 1 系統を解析に使用した（図 16C）。*Tg-Cyp4f39* のジェノタイピングは，2.4.1.と同様に p1 と p2 の 2 つのプライマーを用いてゲノミック PCR によって行った。マウスの飼育は 2.4.1.と同様に行った。

3.4.2. イムノブロッティング

マウス組織から 1×SDS サンプルバッファー[62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 2 % SDS, 10 %グリセロール, 5 % 2-メルカプトエタノール, 少量のブロモフェノールブルー] を用いて総ライセートを調製し，SDS-PAGE（レムリ法）によってタンパク質を分離した。その後，PVDF メンブレン（Immobilon, Merck）にタンパク質をセミドライ方式で転写した。メンブレンをさらにブロッキング液 [5 %スキムミルク in TBS-T; 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.0 5% Tween20] で室温 1 時間インキュベートした。anti-FLAG antibody M2（1 μg/mL, 200471; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）または anti-GAPDH monoclonal antibody（1:2000 dilution, 016-25523; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan）を一次抗体として使用し，室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体として horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG F(ab')$_2$ fragment（1:7500dilution, NA9310; GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom）を使用し，

室温で 1 時間インキュベートした。Western Lightning Plus-ECL（Thermo Fischer Scientific）を用いて，X 線フィルムにて化学発光を検出した。

3.4.3. BUT の測定と角膜上皮障害のスコア化

0.5 % liquid sodium fluorescein（Tokyo Chemical Industry, Japan）3 μL をマウスの眼球に滴下し，手で強制的にまばたきを 3 回させ，フルオレセイン溶液が眼球表面全体を覆ったことを確認したのちに，コバルトブルーフィルター下で細隙灯顕微鏡（Slitlamp RO800; Luneau Technology operations, Pont-de-l'Arche, France）観察を行った。BUT は，眼球表面をフルオレセイン溶液が覆った瞬間を 0 秒として，涙液層が破壊されるまでの秒数を測定した。

BUT の測定後ただちに 0.5 mg/mL のペントバルビタール（Tokyo Chemical Industry）100 μL/g（body weight）の腹腔内注射による麻酔を行った。角膜上皮障害のスコア化は，コバルトブルーフィルターおよびイエローフィルター下で細隙灯顕微鏡観察により行った。スコア化は，露出している眼球表面を過去の報告を参考に 5 区画にわけ [92]，各区画を 0~3 点で評価したのち，5 区画の合計スコアを求めた。スコアは以下を基準とする; 0＝ 障害の範囲が<1/3，1＝ 障害の範囲が 1/3≤障害範囲<2/3，2＝2/3≤障害範囲<3/3，3＝ 障害の範囲が全体に及ぶもの。

3.4.4. 涙液量の測定

マウスの涙液量測定は，イソフルラン（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan）の吸入による麻酔後，Zone-Quick（Showa Yakuhin Kako, Tokyo, Japan）を用いて，添付のマニュアルに従って，フェノールレッド糸法で行った。

3.4.5. マイボーム腺および角膜のヘマトキシリン/エオジン染色

眼瞼および眼球を摘出し，Super Fix（Kurabo, Osaka, Japan）で 4 °C，24 時間以上固定を行った。ヘマトキシリン/エオジン溶液による染色および観察は 2.4.3.と同様の方法で行った。

3.4.6. 定量的 RT-PCR

マウスの片側の上下眼瞼からマイボーム腺を実体顕微鏡（Stemi DV4; Carl Zeiss, Germany）下で摘出したのち，2.4.5.と同様の方法で総 RNA の抽出を行った。RT-PCR は，50 ng/μL に調製した総 RNA と特異的なプライマー（表 2），One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II を用いて，2.4.5.と同様の方法で行った。

3.4.7. LC-MS/MS による脂質解析

マウスの上下眼瞼からマイボーム腺を実体顕微鏡下で摘出し，脂質抽出に使用した。摘出したマイボーム腺のうち 2.0–3.8 mg をジルコニアビーズ入りチューブ（SARSTEDT, Nümbrecht, Germany）に量り取り，Chloroform/Methanol/12 M formic acid（100:200:1, v/v/v）450 µL を加え，マイクロスマッシュ MS-100（TOMY Seiko, JAPAN）によって，4 °C，5000 rpm で 120 秒間破砕を行った。ジルコニアビーズの除去後，Chloroform 150 µL と H_2O 270 µL 加え，撹拌したのち，室温，20,400 × g で 5 分間遠心を行い二層に分離した。有機層を回収したのち，残った水層に Chloroform 150 µL 加え再度抽出操作を行い，有機層を回収した。有機層をまとめて乾固したのち, hexane 200 µL で再溶解し, H_2O を 200 µL 加え, 室温，20,400 × g で 3 分間遠心を行い，二層に分離した。有機層を回収したのち，残った下層に hexane を 200 µL 加え，再度抽出操作を行い，室温，20,400 × g で 3 分間遠心を行い，二層に分離した。有機層を回収後，まとめて乾固させ，マイバム脂質とした。

OAHFA は AMP+ MaxSpec Kit（Cayman Chemical, Ann Arbor, USA）を用いて AMPP 誘導体化を行った。Chloroform/Methanol (1:2, v/v) で 0.1 mg tissue/µL となるように再溶解したマイバム脂質 0.1 mg 分に, acetonitrile/dimethyl formamide (4:1, v/v) 5 µL，EDC 5 µL，HOBt 2.5 µL，AMP^+ 7.5 µL を加え，60 °C，30 分反応させたのち，acetonitrile を加えて 100 µL とした。

LC-MS/MS 解析は 2.4.4.と同様の装置, イオン化法, カラムにより行った。UPLC による分離は，2.4.4.と同様の移動相（移動相 A および移動相 B）を使用し，異なる混合比で行った（表 3, 4）。AMPP-OAHFA はマイボーム腺 5 µg 分，Type 2 WdiE, Type 1 WdiE, Chl-OAHFA, CE は 50 µg 分を測定に使用した。AMPP-OAHFA, Type 2 WdiE，Type 1 WdiE，Chl-OAHFA，CE 分子種の解析は，MRM によって行った（表 8–12）。OAHFA のフラグメント解析には，ネガティブイオンを発生させ，また，Type 2 WdiE および Type 1 WdiE のフラグメントイオン解析には，ポジティブイオンを発生させ，それぞれ$[M-H]^-$と$[M + H]^+$に対してプロダクトイオンスキャンを使用した。データの解析は MassLynx software (Waters)を用いて行った。

3.4.8. マイバム脂質の TLC による分離

マウスの上下眼瞼を摘出したのち, 氷上にて組織を十分に冷却させた。氷上にて組織の冷却を続けながら，実体顕微鏡下で 2 本のピンセットを用いてマイボーム腺を傷つけないように，マイボーム腺開口部からマイバム脂質を絞り出した。上下および両眼瞼から採取したマイバムは, すべて Chloroform/Methanol（1:2, v/v）に溶解させたのち，乾固させ，総マイバムとした。総マイバム全量を

Chloroform/Methanol/12 M formic acid (100:200:1, v/v/v) 450 µL で溶解し，Chloroform 150 µL と H_2O 270 µL 加え，撹拌したのち，室温，20,400 × g で 5 分間遠心を行い，二層に分離した。有機層を回収し，乾固させたものを Chloroform/Methanol (1:2, v/v) 100 µL で再溶解し, 20 µL を HPTLC プレート（Glass HPTLC Silica gel 60 plates; MilliporeSigma）を用いて分離した。分離には展開系 1 [hexane/diethyl ether/acetic acid (90/25/1,v/v/v)] または展開系 2 [hexane/toruen (1:1,v/v)]を用いた。分離した脂質は銅リン酸試薬 [3 % (w/v) $CuSO_4$ in 8 % (v/v)リン酸溶液]を噴霧したのち，180° C で加熱することで検出した。

3.4.9. OAHFA および Type 2 WdiE の合成

OAHFA [(*O*-C18:1)-ω-OH C22:0 FA]の合成は以下の手順で行った。22-hydroxy docosanoic acid（ω-OH C22:0 FA; 1.2 mg, 3.4 µmol; Larodan AB, Solna, Sweden）を tetrahydrofuran 400 µL で溶解し，氷上で triethylamine（3.7 µL, 27.0 µmol; FUJIFILM Wako Pure Chemical）と oleoyl chloride（4.5 µL, 13.5 µmol; FUJIFILM Wako Pure Chemical）を加えたのち，室温で 48 時間撹拌し，octadec-10-enoic-22-(octadic-10-enoyloxy)-docosanoic anhydride を得た。さらに飽和重曹水 200 µL を加え室温で半日撹拌し，sodium 22-(octadec-10-enoyloxy)-docosanoate を得た。ナトリウム塩に対して 1 M 塩酸を pH<3 となるまで滴下し，22-(octadec-10-enoyloxy)-docosanoic acid [(ω-*O*-C18:1)-hC22:0-FA]を作製した（図 30A）。反応液に Chloroform 300 µL を加え，撹拌したのち，室温，20,400 × g で 3 分間遠心し，有機層の回収と乾固を行い，OAHFA 標準品とした。α-OAHFA [(*O*-C18:1)-α-OH C22:0 FA]の合成は，2-hydroxy docosanoic acid（α-OH C22:0 FA; 1.1 mg, 3.1 µmol; Larodan AB, Solna, Sweden）を出発基質とし，OAHFA と同様の手順で行った。

Type 2ω WdiE [(1,ω-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE]および Type 2α WdiE [(1,α-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE]は以下の手順で合成した。1,16-hexadecanediol (12.2 mg, 47.2 µmol; Tokyo Chemical Industry）と 1,2-hexadecanediol（11.2 mg, 43.3 µmol; Tokyo Chemical Industry）を 1-methyl-2-pyrrolidone（NMP）500 µL で溶解し，さらに氷上にて 4-dimethylaminopyridine（FUJIFILM Wako Pure Chemical）1 mg（8.2 µmol）と oleoyl chloride（100 µL, 298.9 µmol）を加え，室温で一晩撹拌を行い，hexadecane-1,16-diyl dioleate [(1,ω-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE]と 1-((hexadec-8-enoyl)oxy)-octadecan-2-yl oleate [(1,α-*O*-C18:1)-C16:0 WdiE]を合成した（図 30B）。反応液に ethyl acetate 400 µL と H_2O 400 µL を加え撹拌したのち，室温，20,400 × g で 3 分間遠心し，有機層を回収した。water/NMP 層に ethyl acetate 300 µL を加え，再抽出したのち，室温，20,400 × g で 3 分間遠心し，有機層を回収した。回収した有機層をまとめ，H_2O 400 µL を加え撹拌したのち，室温，20,400 × g で 3 分間遠心し，再度有機層の回収と乾固を行い，Type 2ω および Type 2α WdiE 標準品とした。

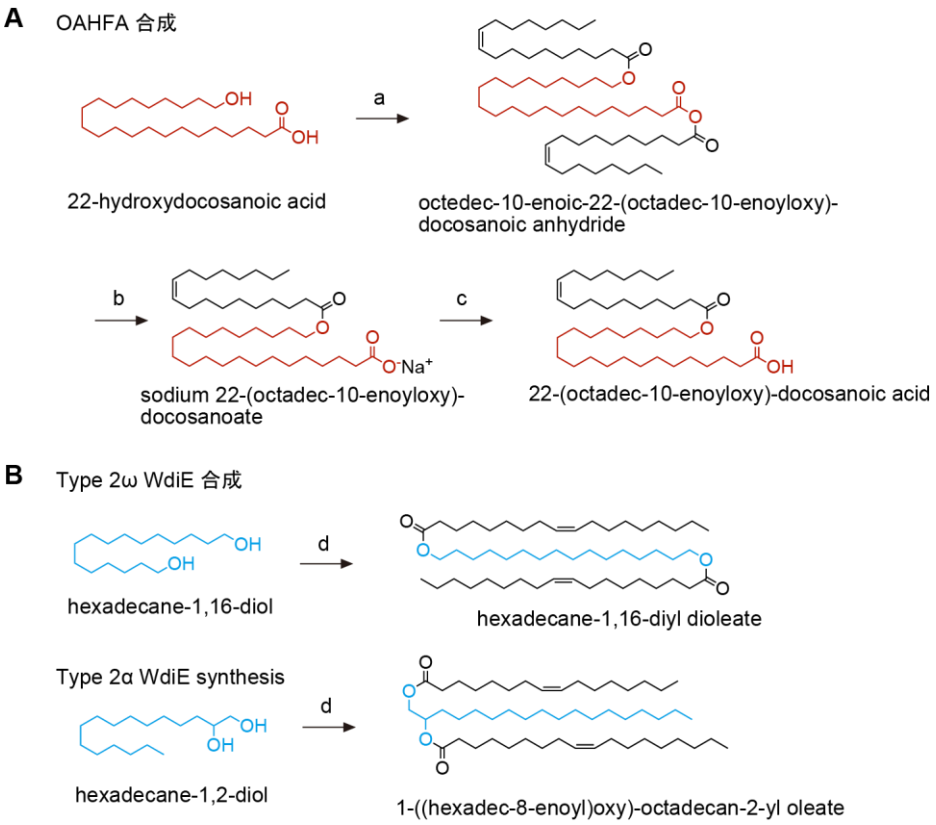


図 30. OAHFA および Type 2 WdiE の有機化学的合成

（A）OAHFA [(*O*-C18:1)-ω-OH C22:0 FA] および反応中間体の合成過程と反応条件を図示した。反応条件を以下に示す。a，基質に氷上にて triethylamine および oleoyl chloride を添加，室温で反応; b，飽和重曹水を添加，室温で反応; c，1M 塩酸を滴下，pH<3 で反応。（B）Type 2ω WdiE [(1,ω-*O*-C18:1)-C16:0; 上図] および Type 2α WdiE [(1,α-*O*-C18:1)-C16:0; 下図] の合成過程と反応条件を図示した。反応条件を以下に示す。d; 基質に氷上にて 4-dimethylaminopyridine および oleoyl chloride を添加，室温で反応。

4. 総括

本研究によって，脂肪酸 ω 水酸化酵素（CYP4F22/Cyp4f39）によって産生される C30–36 の ω-OH FA はアシルセラミド，ω-OH セラミド，OAHFA，OAHFA 代謝物へと代謝されることで皮膚バリアおよび涙液バリア形成に重要であることが示された。皮膚バリア形成においてアシルセラミドは重要な ω 水酸化脂質であり，脂質ラメラ形成や表皮の正常な成熟に関わることが明らかとなった。本研究の知見は，魚鱗癬の病態発症メカニズムの解明に寄与するものである。一方の涙液バリア形成においては OAHFA をはじめとして，Type 1ω WdiE, Type 2ω WdiE, Chl-OAHFA といった OAHFA 代謝物が重要であることが示された。これら ω 水酸化脂質が，涙液中に脂質極性勾配を形成することで涙液層の安定性に関わるという新たな涙液層モデルも示唆された。

本研究は，体表面透過性バリア（皮膚や涙液）に共通して存在する ω 水酸化脂質に着目し，その役割の解明を目指したものである。この研究を通して，ω 水酸化脂質がバリア機能の形成・維持に大きく寄与していることが証明された。したがって，ω 水酸化脂質を応用した治療薬や治療法は，魚鱗癬，アトピー性皮膚炎，ドライアイなど多くのバリア機能異常に対する新たな治療標的となりうることが示された。投与法の確立や製剤化といった技術革新も合わせて，本研究がバリア異常患者への新たな治療法の確立に有用な示唆を与えることが期待される。

5. 表一覧

表 1. 遺伝子欠損マウスの作製のために使用したプライマー

遺伝子	プライマー	ヌクレオチド
Cyp4f39	f1	5'-CACCGCCTCATCTCTCGTCGCTGCACAG-3'
Cyp4f39	r1	5'-AAACCTGTGCAGCGACGAGAGATGAGGC-3'
Cyp4f39	p1	5'-GGATCCTTGTGATTGGTGGATGGACAGATAG-3'
Cyp4f39	p2	5'-TCATGTCTCTGTCACTCTGACTCCTCTGC-3'
3× FLAG-Cyp4f39	Involucrin-Tg-F	5'-CTAGGAGGACCTTTCTCTGC-3'
3× FLAG-Cyp4f39	Cyp4f39-R1	5'-TTGCGACAGGTAATGCGGAAGTCAC-3'

F, Forward; R, Reverse

表 2. RT-PCR に使用したプライマー

遺伝子	プライマー	ヌクレオチド
Krt1	Krt1-F	5'-TGAGCTGAAGAACATGCAAGA-3'
Krt1	Krt1-R	5'-CATGTAAGCTGAATCCACATCC-3'
Krt10	Krt10-F	5'-GTGTCCACTGGTGATGTGAATGTGG-3'
Krt10	Krt10-R	5'-TTCTGTTTCTGCCAAGGAGGCTTCC-3'
Krt5	Krt5-F	5'-CAGAGCTGAGGAACATGCAG-3'
Krt5	Krt5-R	5'-CATTCTCAGCCGTGGTACG-3'
Krt14	Krt14-F	5'-CAACAGCGAGCTGGTGCAGAGCGGC-3'
Krt14	Krt14-R	5'-TAGGTGGCGATCTCCTGCTCCAGCC-3'
Flg	Flg-F	5'-CAACAATACTCAACCAGTGATAAGG-3'
Flg	Flg-R	5'-CAGTTTTACTTCTCCCATTTGATCC-3'
Lor	Lor-F	5'-GGTTGCAACGGAGACAACA-3'
Lor	Lor-R	5'-CATGAGAAAGTTAAGCCCATCG-3'
Ivl	Ivl-F	5'-ACACACTGCCAGTGACTGTTCCAGC-3'
Ivl	Ivl-R	5'-CTTCTCCAGATGCAGTTCCTGTTCC-3'
Elovl1	Elovl1-F	5'CATGCTTTCCAAGGTCATTGAGCTG-3'
Elovl1	Elovl1-R	5'-TCTCAGTTGGCCTTGACCTTGGTGG-3'
Elovl4	Elovl4-F	5'-GAGGAAGAAAAACAACCAAGTCTCC-3'
Elovl4	Elovl4-R	5'-AATTTACTCTCCTTTTGGCTTCCCG-3'
Fatp4	Fatp4-F	5'-GCCCTGGACCCAGGTGGGATTCTCC-3'
Fatp4	Fatp4-R	5'-GAGTACTCATCCAGCTGGCGGAAGG-3'
Cers3	Cers3-F	5'-CTGGCTTCCTCCAACAATAAAGTGG-3'
Cers3	Cers3-R	5'-TCAAGTTACACTTCTTTGCCAGTCC-3'
Pnpla1	Pnpla1-F	5'-CCCCACAAGCCTCTGCTGGTGGAGG-3'
Pnpla1	Pnpla1-R	5'-TGGCCACTCACTCCCTCGGGGTAGC-3'
Abhd5	Abhd5-F	5'-ATCACACCTTAAAGAAGCTGAAGAG-3'
Abhd5	Abhd5-R	5'-AATGGATTCCACAAACTGATTCTCC-3'
Abca12	Abca12-F	5'-CTCACAGCATGGAAGAATGTGAAGC-3'
Abca12	Abca12-R	5'-ATTTAAAGCAGTCTTGTTGGTTTCC-3'
Aloxe3	Aloxe3-F	5'-CCCAACTACCACTACCGAGACGACG-3'
Aloxe3	Aloxe3-R	5'-GGGCATCCAGGCCCCAAAGTCATGC-3'
Dsp	Dsp-F	5'-CCTCACCTGCCCCAAAACCAAGTTA-3'
Dsp	Dsp-R	5'-GTACCCCCCAATGGAGCTACTGCTA-3'
Dsc1	Dsc1-F	5'-CTTCCCAGATGATGTAGCTCAGCAA-3'
Dsc1	Dsc1-R	5'-CAAGCCGAGGTTGAGTGAAAGTTTG-3'

Dsc3	Dsc3-F	5'-GAAGCACCTGGGGATGACAGAGTGT-3'
Dsc3	Dsc3-R	5'-TGGCACAGTTTCACTCAACCCCGAC-3'
Dsg1	Dsg1-F	5'-CCCTCTGTCCACTTTCATGATAA-3'
Dsg1	Dsg1-R	5'-GCCTATCATGCCAGAGGTTGGTTGG-3'
Dsg3	Dsg3-F	5'-CACGCTGTCAGGCAACCAAGAAACT-3'
Dsg3	Dsg3-R	5'-GGAACAGGTTTCTTTTGTATAGAGC-3'
Awat1	Awat1-F	5'-GGAGAAACAGAGGTATATGACCAGG-3'
Awat1	Awat1-R	5'-TCACAAGAATATCAGCTTCTGGGTGTTGG-3'
Awat2	Awat2-F	5'-GGAGAGACAGACCTCTATGACCAGC-3'
Awat2	Awat2-R	5'-TCAAACTATCACCAGCTCCTGGGTC-3'
Far1	Far1-F	5'-GATAATGTCAATATGTTAATGAACC-3'
Far1	Far1-R	5'-TCAGTATCTCATAGTGCTGGATGCTCG-3'
Far2	Far2-F	5'-TCCATGCTGGAGTATTTCATCAACC-3'
Far2	Far2-F	5'-TTGAACAAGGGACAAATGAAGAACC-3'
Soat1	Soat1-F	5'-GCCGTCTTCGCCCTGTCGGCTGTGG-3'
Soat1	Soat1-R	5'-CTAAAACACGTACCGACAAGTCCAGG-3'
Cyp4f39	Cyp4f39-F	5'-AGCATCTACGGGACCCACCACAACC-3'
Cyp4f39	Cyp4f39-R2	5'-TGAGGGTAGAGGCTCTACATTGAGC-3'
Fa2h	Fa2h-F	5'-GATGGGCCACCTCACAGACACTCCG-3'
Fa2h	Fa2h-R	5'-CTCGATGAGGTCTGAGTGGAAGAGG-3'
Hprt	Hprt-F	5'-GCTGACCTGCTGGATTACATTAAAG-3'
Hprt	Hprt-R	5'-CTTAACCATTTTGGGGCTGTACTGC-3'

F, Forward; R, Reverse

表 3. 使用した UPLC グラジエントシステムによる移動相の混合比の設定（セラミド，α/ω-OH セラミド，アシルセラミド，AMPP-OAHFA）

時間（分）	流速（mL/分）	移動相 A（%）	移動相 B（%）	グラジエントタイプ
Initial	0.3	60	40	
18.00	0.3	0	100	linear
23.00	0.3	0	100	linear
30.00	0.3	60	40	step

表 4. 使用した UPLC グラジエントシステムによる移動相の混合比の設定（Type 1/2 WdiE，Chl-OAHFA，CE）

時間（分）	流速（mL/分）	移動相 A（%）	移動相 B（%）	グラジエントタイプ
Initial	0.3	40	60	
21.00	0.3	0	100	linear
25.00	0.3	0	100	linear
30.00	0.3	40	60	step

表 5. アシルセラミドの MRM に使用した *m/z*

	プレカーサーイオン（Q1）		プロダクトイオン（Q3）
ω-OH FA 分子種 [a]	$[M + H]^+$	$[M + H-H_2O]^+$	$[LCB-3H_2O]^+$
C26:0	938.9	920.9	264.3
C28:0	966.9	948.9	264.3
C30:0	995.0	977.0	264.3
C32:0	1023.0	1005.0	264.3
C34:0	1051.0	1033.0	264.3
C36:0	1079.1	1061.1	264.3
C26:1	936.9	918.9	264.3
C28:1	964.9	946.9	264.3
C30:1	993.0	975.0	264.3
C32:1	1021.0	1003.0	264.3
C34:1	1049.0	1031.0	264.3
C36:1	1077.1	1059.1	264.3

a; ω 末端はすべて C18:2 FA

表 6. α/ω-OH セラミドの MRM に使用した *m/z*

	プレカーサーイオン（Q1）		プロダクトイオン（Q3）
FA 分子種	$[M + H]^+$	$[M + H-H_2O]^+$	$[LCB-3H_2O]^+$
C16:0	554.5	536.5	264.3
C18:0	582.6	564.6	264.3
C20:0	610.6	592.6	264.3
C22:0	638.6	620.6	264.3
C24:0	666.6	648.6	264.3
C26:0	694.7	676.7	264.3
C28:0	722.7	704.7	264.3
C30:0	750.7	732.7	264.3
C32:0	778.8	760.8	264.3
C34:0	806.8	788.8	264.3
C36:0	834.8	816.8	264.3
C24:1	664.6	646.6	264.3
C26:1	692.7	674.7	264.3
C28:1	720.7	702.7	264.3
C30:1	748.7	730.7	264.3
C32:1	776.8	758.8	264.3
C34:1	804.8	786.8	264.3
C36:1	832.8	814.8	264.3

表 7. セラミドの MRM に使用した *m/z*

	プレカーサーイオン（Q1）		プロダクトイオン（Q3）
FA 分子種	$[M + H]^+$	$[M + H-H_2O]^+$	$[LCB-3H_2O]^+$
C16:0	538.5	520.5	264.3
C18:0	566.6	548.6	264.3
C20:0	594.6	576.6	264.3
C22:0	622.6	604.6	264.3
C24:0	650.6	632.6	264.3
C26:0	678.7	660.7	264.3
C28:0	706.7	688.7	264.3
C30:0	734.7	716.7	264.3
C32:0	762.8	744.8	264.3
C34:0	790.8	772.8	264.3
C36:0	818.8	800.8	264.3
C24:1	648.6	630.6	264.3
C26:1	676.7	658.7	264.3
C28:1	704.7	686.7	264.3
C30:1	732.7	714.7	264.3
C32:1	760.8	742.8	264.3
C34:1	788.8	770.8	264.3
C36:1	816.8	798.8	264.3

表 8. AMPP-OAHFA の MRM に使用した *m/z*

ω-OH FA/FA	プレカーサーイオン（Q1）	プロダクトイオン（Q3）
	$[M + AMPP]^+$	$[M + AMPP-(FA-OH)-H_2O]^+$
ω-OH C28:0/C16:0	845.7	589.2
ω-OH C30:0/C16:0	873.7	617.2
ω-OH C32:0/C16:0	901.7	645.3
ω-OH C34:0/C16:0	929.8	673.3
ω-OH C36:0/C16:0	957.8	701.3
ω-OH C28:1/C16:0	843.7	587.2
ω-OH C30:1/C16:0	871.7	615.2
ω-OH C32:1/C16:0	899.7	643.2
ω-OH C34:1/C16:0	927.8	671.3
ω-OH C36:1/C16:0	955.8	699.3
ω-OH C28:0/C16:1	843.7	589.2
ω-OH C30:0/C16:1	871.7	617.2
ω-OH C32:0/C16:1	899.7	645.3
ω-OH C34:0/C16:1	927.8	673.3
ω-OH C36:0/C16:1	955.8	701.3
ω-OH C28:1/C16:1	841.6	587.2
ω-OH C30:1/C16:1	869.7	615.2
ω-OH C32:1/C16:1	897.7	643.2
ω-OH C34:1/C16:1	925.7	671.3
ω-OH C36:1/C16:1	953.8	699.3
ω-OH C28:0/C18:0	873.7	589.2
ω-OH C30:0/C18:0	901.7	617.2
ω-OH C32:0/C18:0	929.8	645.3
ω-OH C34:0/C18:0	957.8	673.3
ω-OH C36:0/C18:0	985.8	701.3
ω-OH C28:1/C18:0	871.7	587.2
ω-OH C30:1/C18:0	899.7	615.2
ω-OH C32:1/C18:0	927.8	643.2
ω-OH C34:1/C18:0	955.8	671.3
ω-OH C36:1/C18:0	983.8	699.3

ω-OH C28:0/C18:1	871.7	589.2
ω-OH C30:0/C18:1	899.7	617.2
ω-OH C32:0/C18:1	927.8	645.3
ω-OH C34:0/C18:1	955.8	673.3
ω-OH C36:0/C18:1	983.8	701.3
ω-OH C28:1/C18:1	869.7	587.2
ω-OH C30:1/C18:1	897.7	615.2
ω-OH C32:1/C18:1	925.7	643.2
ω-OH C34:1/C18:1	953.8	671.3
ω-OH C36:1/C18:1	981.8	699.3
ω-OH C28:0/C18:2	869.7	589.2
ω-OH C30:0/C18:2	897.7	617.2
ω-OH C32:0/C18:2	925.7	645.3
ω-OH C34:0/C18:2	953.8	673.3
ω-OH C36:0/C18:2	981.8	701.3
ω-OH C28:1/C18:2	867.7	587.2
ω-OH C30:1/C18:2	895.7	615.2
ω-OH C32:1/C18:2	923.7	643.2
ω-OH C34:1/C18:2	951.8	671.3
ω-OH C36:1/C18:2	979.8	699.3

表 9. Type 2 WdiE の MRM に使用した *m/z*

総炭素数：総不飽和度	プレカーサーイオン（Q1）	プロダクトイオン（Q3）	
	$[M + H]^+$	$[M + H-(C16:1\ FA-OH)-H_2O]^+$	$[M + H-(C18:1\ FA-OH)-H_2O]^+$
C52:2	787.7	561.4	533.3
C54:2	815.7	589.4	561.4
C56:2	843.8	617.4	589.4
C58:2	871.8	645.5	617.4
C60:2	899.8	673.5	645.5
C62:2	927.9	701.5	673.5
C64:2	955.9	729.6	701.5
C66:2	983.9	757.6	729.6
C68:2	1012.0	785.6	757.6
C70:2	1040.0	813.7	785.6
C72:2	1068.0	841.7	813.7
C52:3	785.7	559.3	531.3
C54:3	813.7	587.4	559.3
C56:3	841.7	615.4	587.4
C58:3	869.8	643.4	615.4
C60:3	897.8	671.5	643.4
C62:3	925.8	699.5	671.5
C64:3	953.9	727.5	699.5
C66:3	981.9	755.6	727.5
C68:3	1009.9	783.6	755.6
C70:3	1038.0	811.6	783.6
C72:3	1066.0	839.7	811.6

表 10. Type 1 WdiE の MRM に使用した *m/z*

	プレカーサーイオン（Q1）	プロダクトイオン（Q3）
FA + ω-OH FA/C16:1 FAl	$[M + H]^+$	$[M + H-C16:1\ FAl]^+$
C32:2/C16:1	729.6	489.1
C34:2/C16:1	757.7	517.2
C36:2/C16:1	785.7	545.2
C38:2/C16:1	813.7	573.2
C40:2/C16:1	841.8	601.3
C42:2/C16:1	869.8	629.3
C44:2/C16:1	897.8	657.3
C46:2/C16:1	925.9	685.4
C48:2/C16:1	953.9	713.4
C50:2/C16:1	981.9	741.4
C52:2/C16:1	1010.0	769.5

表 11. Chl-OAHFA の MRM に使用した *m/z*

	プレカーサーイオン（Q1）	プロダクトイオン（Q3）
OAHFA 分子種	$[M + NH_4]^+$	$[Chl-H_2O]^+$
C42:1	1018.0	369.4
C44:1	1046.0	369.4
C46:1	1074.0	369.4
C48:1	1102.1	369.4
C50:1	1130.1	369.4
C52:1	1158.1	369.4
C54:1	1186.2	369.4
C42:2	1016.0	369.4
C44:2	1044.0	369.4
C46:2	1072.0	369.4
C48:2	1100.1	369.4
C50:2	1128.1	369.4
C52:2	1156.1	369.4
C54:2	1184.2	369.4

表 12. CE の MRM に使用した *m/z*

	プレカーサーイオン（Q1）	プロダクトイオン（Q3）
FA 分子種	$[M + NH_4]^+$	$[Chl-H_2O]^+$
C16:0	625.6	369.4
C18:0	653.6	369.4
C20:0	681.7	369.4
C22:0	709.7	369.4
C24:0	737.7	369.4
C26:0	765.8	369.4
C28:0	793.8	369.4
C30:0	821.8	369.4
C32:0	849.9	369.4
C34:0	877.9	369.4
C36:0	905.9	369.4
C16:1	623.6	369.4
C18:1	651.6	369.4
C20:1	679.7	369.4
C22:1	707.7	369.4
C24:1	735.7	369.4
C26:1	763.8	369.4
C28:1	791.8	369.4
C30:1	819.8	369.4
C32:1	847.9	369.4
C34:1	875.9	369.4
C36:1	903.9	369.4

表 13. マイバム脂質中に存在する Type 2ω/α WdiE を構成する FA 組成と主要な分子種の推測

WdiE タイプ	総炭素数：総不飽和度	FA 組成（%）		最も主要と予測される分子種	
		C16:1 FA	C18:1 FA	ω/α-OH ジオール	FA-FA[a]
2ω	C62:2	95	5	C30:0	C16:1-16:1
2ω	C64:2	78	22	C32:0	C16:1-16:1
2ω	C66:2	55	45	C32:0	C16:1-18:1
2ω	C68:2	14	86	C32:0	C18:1-18:1
2ω	C70:2	25	75	C34:0	C18:1-18:1
2ω	C72:2	93	7	C36:0	C16:1-20:1
2ω	C62:3	99	1	C30:1	C16:1-16:1
2ω	C64:3	96	4	C32:1	C16:1-16:1
2ω	C66:3	78	22	C34:1	C16:1-16:1
2ω	C68:3	44	56	C34:1	C16:1-18:1
2ω	C70:3	7	93	C34:1	C18:1-18:1
2ω	C72:3	14	86	C36:1	C18:1-18:1
2α	C52:2	98	2	C20:0	C16:1-16:1
2α	C54:2	68	32	C22:0	C16:1-16:1
2α	C56:2	91	9	C24:0	C16:1-16:1

2α	C58:2	90	10	C26:0	C16:1-16:1
2α	C60:2	70	30	C28:0	C16:1-16:1
2α	C62:2	69	31	C30:0	C16:1-16:1
2α	C54:3	90	10	C22:1	C16:1-16:1
2α	C56:3	73	27	C24:1	C16:1-16:1
2α	C58:3	98	2	C26:1	C16:1-16:1
2α	C60:3	93	7	C28:1	C16:1-16:1
2α	C62:3	83	17	C30:1	C16:1-16:1

a: Type 2ω/α WdiE を構成する FA における最も主要と予測される分子種の組み合わせ

6. 参考文献

1) Kihara A. (2016) Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog Lipid Res*, **63**, 50-69.
2) Mizutani Y., Mitsutake S., Tsuji K., Kihara A., and Igarashi Y. (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*, **91**, 784-790.
3) Ishida-Yamamoto A. and Igawa S. (2015) The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res*, **360**, 477-482.
4) Feingold K. R. and Elias P. M. (2014) Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 280-294.
5) Bouwstra J. A. and Honeywell-Nguyen P. L. (2002) Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*, **54 Suppl 1**, S41-55.
6) Lundborg M., Narangifard A., Wennberg C. L., Lindahl E., Daneholt B.*, et al.* (2018) Human skin barrier structure and function analyzed by cryo-EM and molecular dynamics simulation. *J Struct Biol*, **203**, 149-161.
7) Hirabayashi T., Murakami M., and Kihara A. (2019) The role of PNPLA1 in omega-*O*-acylceramide synthesis and skin barrier function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1864**, 869-879.
8) Miyamoto M., Itoh N., Sawai M., Sassa T., and Kihara A. (2019) Severe Skin Permeability Barrier Dysfunction in Knockout Mice Deficient in a Fatty Acid omega-Hydroxylase Crucial to Acylceramide Production. *J Invest Dermatol*,
9) Ohno Y., Kamiyama N., Nakamichi S., and Kihara A. (2017) PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid omega-*O*-acylceramide. *Nat Commun*, **8**, 14610.
10) Ohno Y., Nara A., Nakamichi S., and Kihara A. (2018) Molecular mechanism of the ichthyosis pathology of Chanarin-Dorfman syndrome: Stimulation of PNPLA1-catalyzed omega-*O*-acylceramide production by ABHD5. *J Dermatol Sci*, **92**, 245-253.
11) Oji V., Tadini G., Akiyama M., Blanchet Bardon C., Bodemer C.*, et al.* (2010) Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *J Am Acad Dermatol*, **63**, 607-641.
12) Hoppe T., Winge M. C., Bradley M., Nordenskjold M., Vahlquist A.*, et al.* (2015) Moisturizing treatment of patients with atopic dermatitis and ichthyosis vulgaris improves dry skin, but has a modest effect on gene expression regardless of *FLG* genotype. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **29**, 174-177.

13) Vahlquist A., Fischer J., and Torma H. (2018) Inherited Nonsyndromic Ichthyoses: An Update on Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. *Am J Clin Dermatol*, **19**, 51-66.
14) Akiyama M. (2011) Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthiyoses. *Nagoya J Med Sci*, **73**, 79-90.
15) Sniegorska D., Kowalewski C., and Wertheim-Tysarowska K. (2016) [Epidermal barrier - molecular structure and disorders in selected ichthyoses]. *Postepy Biochem*, **62**, 36-45.
16) Aldahmesh M. A., Mohamed J. Y., Alkuraya H. S., Verma I. C., Puri R. D.*, et al.* (2011) Recessive mutations in *ELOVL4* cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. *Am J Hum Genet*, **89**, 745-750.
17) Klar J., Schweiger M., Zimmerman R., Zechner R., Li H.*, et al.* (2009) Mutations in the fatty acid transport protein 4 gene cause the ichthyosis prematurity syndrome. *Am J Hum Genet*, **85**, 248-253.
18) Kutkowska-Kazmierczak A., Rydzanicz M., Chlebowski A., Klosowska-Kosicka K., Mika A.*, et al.* (2018) Dominant *ELOVL1* mutation causes neurological disorder with ichthyotic keratoderma, spasticity, hypomyelination and dysmorphic features. *J Med Genet*, **55**, 408-414.
19) Lefevre C., Jobard F., Caux F., Bouadjar B., Karaduman A.*, et al.* (2001) Mutations in *CGI-58*, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet*, **69**, 1002-1012.
20) Takeichi T., Hirabayashi T., Miyasaka Y., Kawamoto A., Okuno Y.*, et al.* (2019) SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation. *J Clin Invest*,
21) Zheng Y., Yin H., Boeglin W. E., Elias P. M., Crumrine D.*, et al.* (2011) Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J Biol Chem*, **286**, 24046-24056.
22) Shigehara Y., Okuda S., Nemer G., Chedraoui A., Hayashi R.*, et al.* (2016) Mutations in *SDR9C7* gene encoding an enzyme for vitamin A metabolism underlie autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mol Genet*, **25**, 4484-4493.
23) Ohno Y., Nakamichi S., Ohkuni A., Kamiyama N., Naoe A.*, et al.* (2015) Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 7707-

7712.

24) Lefevre C., Bouadjar B., Ferrand V., Tadini G., Megarbane A.*, et al.* (2006) Mutations in a new cytochrome P450 gene in lamellar ichthyosis type 3. *Hum Mol Genet*, **15**, 767-776.

25) Hotz A., Bourrat E., Kusel J., Oji V., Alter S.*, et al.* (2018) Mutation update for *CYP4F22* variants associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mutat*, **39**, 1305-1313.

26) Sugiura K., Takeichi T., Tanahashi K., Ito Y., Kosho T.*, et al.* (2013) Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by *CYP4F22* mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. *J Dermatol Sci*, **72**, 193-195.

27) Noguera-Morel L., Feito-Rodriguez M., Maldonado-Cid P., Garcia-Minaur S., Kamsteeg E. J.*, et al.* (2016) Two Cases of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis due to *CYP4F22* Mutations: Expanding the Genotype of Self-Healing Collodion Baby. *Pediatr Dermatol*, **33**, e48-51.

28) Grond S., Eichmann T. O., Dubrac S., Kolb D., Schmuth M.*, et al.* (2017) *PNPLA1* Deficiency in Mice and Humans Leads to a Defect in the Synthesis of Omega-*O*-Acylceramides. *J Invest Dermatol*, **137**, 394-402.

29) Hirabayashi T., Anjo T., Kaneko A., Senoo Y., Shibata A.*, et al.* (2017) PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun*, **8**, 14609.

30) Jennemann R., Rabionet M., Gorgas K., Epstein S., Dalpke A.*, et al.* (2012) Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet*, **21**, 586-608.

31) Pichery M., Huchenq A., Sandhoff R., Severino-Freire M., Zaafouri S.*, et al.* (2017) *PNPLA1* defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain *PNPLA1* irreplaceable function in epidermal omega-*O*-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Hum Mol Genet*, **26**, 1787-1800.

32) Sassa T., Ohno Y., Suzuki S., Nomura T., Nishioka C.*, et al.* (2013) Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *elovl1*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol*, **33**, 2787-2796.

33) Vasireddy V., Uchida Y., Salem N., Jr., Kim S. Y., Mandal M. N.*, et al.* (2007) Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids (> or =C28) and the unique omega-*O*-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum Mol Genet*, **16**, 471-482.

34) Radner F. P., Streith I. E., Schoiswohl G., Schweiger M., Kumari M.*, et al.* (2010)

Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (*CGI-58*). *J Biol Chem*, **285**, 7300-7311.

35) Cwiklik L. (2016) Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochim Biophys Acta*, **1858**, 2421-2430.

36) Gipson I. K. (2004) Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*, **78**, 379-388.

37) King-Smith P. E., Fink B. A., Fogt N., Nichols K. K., Hill R. M.*, et al.* (2000) The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 3348-3359.

38) King-Smith P. E., Bailey M. D., and Braun R. J. (2013) Four characteristics and a model of an effective tear film lipid layer (TFLL). *Ocul Surf*, **11**, 236-245.

39) Butovich I. A. (2013) Tear film lipids. *Exp Eye Res*, **117**, 4-27.

40) Knop E., Knop N., Millar T., Obata H., and Sullivan D. A. (2011) The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 1938-1978.

41) Willcox M. D. P., Argueso P., Georgiev G. A., Holopainen J. M., Laurie G. W.*, et al.* (2017) TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*, **15**, 366-403.

42) Georgiev G. A., Eftimov P., and Yokoi N. (2019) Contribution of Mucins towards the Physical Properties of the Tear Film: A Modern Update. *Int J Mol Sci*, **20**

43) Craig J. P., Nelson J. D., Azar D. T., Belmonte C., Bron A. J.*, et al.* (2017) TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul Surf*, **15**, 802-812.

44) Dana R., Bradley J. L., Guerin A., Pivneva I., Stillman I. O.*, et al.* (2019) Estimated Prevalence and Incidence of Dry Eye Disease Based on Coding Analysis of a Large, All-age United States Health Care System. *Am J Ophthalmol*, **202**, 47-54.

45) Gayton J. L. (2009) Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol*, **3**, 405-412.

46) Bron A. J. and Tiffany J. M. (2004) The contribution of meibomian disease to dry eye. *Ocul Surf*, **2**, 149-165.

47) Craig J. P., Nichols K. K., Akpek E. K., Caffery B., Dua H. S.*, et al.* (2017) TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf*, **15**, 276-283.

48) Labetoulle M., Bourcier T., Doan S., and group D. (2019) Classifying signs and symptoms of dry eye disease according to underlying mechanism via the Delphi method: the DIDACTIC study. *Br J Ophthalmol*, **103**, 1475-1480.

49) Horwath-Winter J., Berghold A., Schmut O., Floegel I., Solhdju V.*, et al.* (2003) Evaluation of the clinical course of dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol*, **121**, 1364-1368.

50) Lam S. M., Tong L., Yong S. S., Li B., Chaurasia S. S.*, et al.* (2011) Meibum lipid composition in Asians with dry eye disease. *PLoS One*, **6**, e24339.

51) Butovich I. A. (2017) Meibomian glands, meibum, and meibogenesis. *Exp Eye Res*, **163**, 2-16.

52) Nicolaides N., Kaitaranta J. K., Rawdah T. N., Macy J. I., Boswell F. M., 3rd*, et al.* (1981) Meibomian gland studies: comparison of steer and human lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **20**, 522-536.

53) Chen J., Green K. B., and Nichols K. K. (2013) Quantitative profiling of major neutral lipid classes in human meibum by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **54**, 5730-5753.

54) Sassa T., Tadaki M., Kiyonari H., and Kihara A. (2018) Very long-chain tear film lipids produced by fatty acid elongase ELOVL1 prevent dry eye disease in mice. *FASEB J*, **32**, 2966-2978.

55) Butovich I. A., Wilkerson A., Bhat N., McMahon A., and Yuksel S. (2019) On the pivotal role of Elovl3/ELOVL3 in meibogenesis and ocular physiology of mice. *FASEB J*, **33**, 10034-10048.

56) Meiner V. L., Cases S., Myers H. M., Sande E. R., Bellosta S.*, et al.* (1996) Disruption of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14041-14046.

57) Turkish A. R., Henneberry A. L., Cromley D., Padamsee M., Oelkers P.*, et al.* (2005) Identification of two novel human acyl-CoA wax alcohol acyltransferases: members of the diacylglycerol acyltransferase 2 (*DGAT2*) gene superfamily. *J Biol Chem*, **280**, 14755-14764.

58) Yagyu H., Kitamine T., Osuga J., Tozawa R., Chen Z.*, et al.* (2000) Absence of *ACAT-1* attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem*, **275**, 21324-21330.

59) Butovich I. A., Wojtowicz J. C., and Molai M. (2009) Human tear film and meibum. Very long chain wax esters and (*O*-acyl)-omega-hydroxy fatty acids of meibum. *J Lipid Res*, **50**, 2471-2485.

60) Am M., Ra F., El-Naggar A. H., Tm A., and Akhtar S. (2018) Structure and microanalysis of tear film ferning of camel tears, human tears, and Refresh Plus.

Mol Vis, **24**, 305-314.

61) Leiske D. L., Miller C. E., Rosenfeld L., Cerretani C., Ayzner A.*, et al.* (2012) Molecular structure of interfacial human meibum films. *Langmuir*, **28**, 11858-11865.

62) Millar T. J. and King-Smith P. E. (2012) Analysis of Comparison of Human Meibomian Lipid Films and Mixtures with Cholesteryl Esters In Vitro Films using High Resolution Color Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **53**, 4710-4719.

63) Jones L., Downie L. E., Korb D., Benitez-Del-Castillo J. M., Dana R.*, et al.* (2017) TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf*, **15**, 575-628.

64) Nakamura M., Hikida M., Nakano T., Ito S., Hamano T.*, et al.* (1993) Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea*, **12**, 433-436.

65) Cowlen M. S., Zhang V. Z., Warnock L., Moyer C. F., Peterson W. M.*, et al.* (2003) Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by in situ hybridization. *Exp Eye Res*, **77**, 77-84.

66) Pendergast W., Yerxa B. R., Douglass J. G., 3rd, Shaver S. R., Dougherty R. W.*, et al.* (2001) Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 157-160.

67) Urashima H., Okamoto T., Takeji Y., Shinohara H., and Fujisawa S. (2004) Rebamipide increases the amount of mucin-like substances on the conjunctiva and cornea in the N-acetylcysteine-treated in vivo model. *Cornea*, **23**, 613-619.

68) Goto E., Shimazaki J., Monden Y., Takano Y., Yagi Y.*, et al.* (2002) Low-concentration homogenized castor oil eye drops for noninflamed obstructive meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology*, **109**, 2030-2035.

69) Akiyama M., Smith L. T., Yoneda K., Holbrook K. A., Hohl D.*, et al.* (1999) Periderm cells form cornified cell envelope in their regression process during human epidermal development. *J Invest Dermatol*, **112**, 903-909.

70) Ishida-Yamamoto A. and Igawa S. (2014) Genetic skin diseases related to desmosomes and corneodesmosomes. *J Dermatol Sci*, **74**, 99-105.

71) Basel-Vanagaite L., Attia R., Ishida-Yamamoto A., Rainshtein L., Ben Amitai D.*, et al.* (2007) Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis caused by a mutation in *ST14*, encoding type II transmembrane serine protease matriptase. *Am J Hum Genet*, **80**, 467-477.

72) Descargues P., Deraison C., Bonnart C., Kreft M., Kishibe M.*, et al.* (2005) *Spink5*-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet*, **37**, 56-65.

73) Sales K. U., Masedunskas A., Bey A. L., Rasmussen A. L., Weigert R.*, et al.*

(2010) Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. *Nat Genet*, **42**, 676-683.

74) Deraison C., Bonnart C., Lopez F., Besson C., Robinson R.*, et al.* (2007) LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell*, **18**, 3607-3619.

75) Chan A. and Mauro T. (2011) Acidification in the epidermis and the role of secretory phospholipases. *Dermatoendocrinol*, **3**, 84-90.

76) Krien P. M. and Kermici M. (2000) Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human stratum corneum -an unexpected role for urocanic acid. *J Invest Dermatol*, **115**, 414-420.

77) Adhikary G., Crish J. F., Gopalakrishnan R., Bone F., and Eckert R. L. (2005) Involucrin expression in the corneal epithelium: an essential role for Sp1 transcription factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**, 3109-3120.

78) Su Y., Liang Q., Su G., Wang N., Baudouin C.*, et al.* (2018) Spontaneous Eye Blink Patterns in Dry Eye: Clinical Correlations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **59**, 5149-5156.

79) Cheng J. B. and Russell D. W. (2004) Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *J Biol Chem*, **279**, 37789-37797.

80) Hama H. (2010) Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochim Biophys Acta*, **1801**, 405-414.

81) Nikkari T. (1974) Comparative chemistry of sebum. *J Invest Dermatol*, **62**, 257-267.

82) Kihara A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem*, **152**, 387-395.

83) Ohno Y., Suto S., Yamanaka M., Mizutani Y., Mitsutake S.*, et al.* (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 18439-18444.

84) Agbaga M. P., Brush R. S., Mandal M. N., Henry K., Elliott M. H.*, et al.* (2008) Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12843-12848.

85) McMahon A., Lu H., and Butovich I. A. (2014) A role for ELOVL4 in the mouse meibomian gland and sebocyte cell biology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **55**, 2832-2840.

86) Uchida Y., Hama H., Alderson N. L., Douangpanya S., Wang Y.*, et al.* (2007) Fatty acid 2-hydroxylase, encoded by *FA2H*, accounts for differentiation-associated

increase in 2-OH ceramides during keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, **282**, 13211-13219.

87) Brown S. I. and Dervichian D. G. (1969) Hydrodynamics of blinking. In vitro study of the interaction of the superficial oily layer and the tears. *Arch Ophthalmol*, **82**, 541-547.

88) King-Smith P. E., Fink B. A., Nichols J. J., Nichols K. K., Braun R. J.*, et al.* (2009) The contribution of lipid layer movement to tear film thinning and breakup. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50**, 2747-2756.

89) Bland H. C., Moilanen J. A., Ekholm F. S., and Paananen R. O. (2019) Investigating the Role of Specific Tear Film Lipids Connected to Dry Eye Syndrome: A Study on *O*-Acyl-omega-hydroxy Fatty Acids and Diesters. *Langmuir*, **35**, 3545-3552.

90) Kihara A., Anada Y., and Igarashi Y. (2006) Mouse sphingosine kinase isoforms SPHK1a and SPHK1b differ in enzymatic traits including stability, localization, modification, and oligomerization. *J Biol Chem*, **281**, 4532-4539.

91) Carroll J. M., Albers K. M., Garlick J. A., Harrington R., and Taichman L. B. (1993) Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10270-10274.

92) Lemp M. A. (1995) Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J*, **21**, 221-232.

謝辞

本研究の遂行にあたり，終始懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました，北海道大学大学院薬学研究院　生化学研究室　木原章雄教授に深く御礼申し上げます。木原章雄教授には，試薬，器材等充実した環境の中で，非常に自由な研究活動を行わせていただきました。その上で，実験における手技・手法，論理的思考に基づくプレゼンテーションや論文執筆法など，研究活動全般にわたり，豊富な知識と経験に基づいた懇切丁寧な御指導を頂戴いたしましたこと，心より御礼を申し上げるとともに，今後の糧といたします。

本研究におきまして，日々，有益な御助言と御指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　生化学研究室　佐々貴之准教授，並びに，同研究室　大野祐介助教に，心より感謝を申し上げます。佐々貴之准教授には，マウスに関する実験の多くにおきまして，重要な御助力を頂きました。また，本論文の審査にも携わって頂き，併せて御礼を申し上げます。大野祐介助教には，特に質量分析等の分析技術全般にわたり，示唆に富んだご助力を頂きましたこと，感謝申し上げます。

本研究において有機化学的手法による標準品合成を行うにあたり，合成手法や試薬の選択など，研究室の垣根を越えた御助言と御助力を頂きました北海道大学大学院薬学研究院　創薬科学研究教育センター　有機合成医薬学部門　市川聡教授，並びに，同部門　勝山彬助教に，厚く御礼申し上げます。

本論文を審査して頂き，有益な御教示と御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　生体分子機能学研究室　前仲勝実教授，並びに，同研究室　黒木喜美子准教授に，心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，日頃より多くの議論を重ね，私の未熟な部分を支え，有益な示唆と教示を頂いた生化学研究室の皆様に，心より感謝いたします。特に澤井恵氏，野尻光希氏，伊藤成美氏，丹野歩乃佳氏，大塚賢人氏とは，日頃より活発な討論を行い，御助言を頂きましたこと，深く感謝申し上げます。

最後に，これまでのあらゆる面において私を支援してくださった家族と友人に心より感謝いたします。