



HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---------------------|---|
| Title | 皮膚透過性バリア形成におけるセラミド分解経路の関与とその異常による病態の解明 [論文内容及び審査の要旨] |
| Author(s) | 野尻, 光希 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(薬科学) |
| Dissertation Number | 甲第14840号 |
| Issue Date | 2022-03-24 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/85627 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Koki_Nojiri_abstract.pdf, 論文の要旨 |



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 野尻 光希

学位論文題名

皮膚透過性バリア形成におけるセラミド分解経路の関与とその異常による病態の解明

【目的】

皮膚は微生物やアレルゲンなどの侵入と体内からの水分蒸散を防止するといった物質透過性に対するバリア機能(皮膚バリア)を有する。皮膚バリアの形成には、皮膚最外層に位置する表皮角質層が重要な役割を果たす。角質層には角質細胞とその間隙を埋める脂質の多層構造体(脂質ラメラ)が存在しており、脂質ラメラは皮膚バリア機能において中心的な役割を果たしている。脂質ラメラにはセラミド、コレステロール、遊離脂肪酸がおおよそ等モル比ずつで存在する。

シェーグレン・ラルソン症候群(SLS)は常染色体潜性遺伝性の皮膚神経疾患であり、皮膚症状である魚鱗癬は皮膚の乾燥や落屑を主症状とする。SLSは脂肪族アルデヒド脱水素酵素(FALDH)をコードする*ALDH3A2*を原因遺伝子とする。当研究室では、*ALDH3A2*がセラミドの構成成分である長鎖塩基の分解経路で生じる脂肪族アルデヒドの酸化に関わることをこれまで明らかにしてきた。SLSの発症には*ALDH3A2*の基質である脂肪族アルデヒドの蓄積が関与すると考えられているが、詳細な発症の分子機構は明らかとされていない。当研究室で作製した*Aldh3a2*欠損(KO)マウスは明確な魚鱗癬様の皮膚表現型を示さず、表皮におけるFALDH活性も野生型マウス(WT)に比べて減少していなかった。これはヒトでは偽遺伝子化している*Aldh3b2*がマウス表皮において*Aldh3a2*の機能を相補したためであると考えられた。そこで、本研究では*Aldh3a2 Aldh3b2*二重欠損(DKO)マウスを作製・解析することでSLS皮膚病態モデルマウスを確立するとともに、SLS皮膚病態発症メカニズムを解明することを目的に研究を行った。

表皮のセラミドはセラミダーゼによる分解を受け、長鎖塩基と脂肪酸(多くはC21以上の極長鎖脂肪酸)になる。表皮には酸性セラミダーゼ*ASAH1*と塩基性セラミダーゼ*ACER1*が高発現しているが、どちらが*ALDH3A2*の基質である長鎖アルデヒドの前駆体である長鎖塩基の産生に主に働いているかは不明である。遊離脂肪酸はセラミドと並び、脂質ラメラの主要な構成脂質であり、表皮には極長鎖脂肪酸が豊富に存在する。しかし、表皮における極長鎖脂肪酸の産生経路も不明である。本研究では、表皮における長鎖塩基と極長鎖脂肪酸産生における*ASAH1*と*ACER1*の関与についても解析した。

【結果】

1. SLS皮膚症状発症の分子機構の解明

CRISPR/Cas9システムを用いて*Aldh3b2* KOマウスを作製し、*Aldh3a2* KOマウスとの交配によってDKOマウスを得た。*Aldh3b2* KOマウスは明らかな表現型を示さなかったが、DKOマウスは新生致死であり、新生マウスは皮膚の肌理が粗いという外見上の特徴を示した。次に皮膚バリア機能を評価するため、新生マウスの経皮水分蒸散量を測定したところ、*Aldh3b2* KOマウスと野生型(WT)マウスとの間に有意な差は見られなかったが、DKOマウスではWTマウスに比べて経皮水分蒸散量が約2倍に増加していた。この結果より、*Aldh3b2* KOマウスが正常な皮膚バリア機能を有する一方、DKOマウスは皮膚バリア機能の異常を示すことが明らかとなった。

次に、WTマウス、*Aldh3b2* KOマウス、DKOマウス表皮のヘキサデセナールに対するFALDH活性を測定した。その結果、FALDH活性は*Aldh3b2* KOマウス表皮においてWTの20%程度に減少し、DKOマウス表皮において活性がほとんど検出されなかった。この結果より、マウス表皮

において *Aldh3b2* が主要な FALDH であることが明らかとなった。

透過型電子顕微鏡観察により DKO マウス表皮の組織学的解析を行った。その結果、DKO マウスではコントロールマウスと比較して表皮角質層の細胞層数が増加しており、脂質ラメラが狭小化していた。この結果は、SLS 患者において見られる表皮の過角化と脂質ラメラの形成不全に合致しており、DKO マウスが SLS 皮膚病態モデルマウスとして有用であることが明らかとなった。

DKO マウス表皮において脂質ラメラの形成不全が観察されたため、マウス表皮の脂質組成を測定した。液体クロマトグラフィー-連結型タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて各種セラミドを定量した結果、DKO マウス表皮においてアシルセラミド量が WT に比べて約 60% に減少し、アシルセラミドの前駆体である ω 水酸化セラミドが約 5 倍に増加していることを見出した。アシルセラミドは脂質ラメラ形成に必須の脂質分子種であるため、DKO マウスにおける皮膚バリア機能異常はこのアシルセラミドの減少に起因すると考えられる。また、アシルセラミド合成のもう一つの基質であるリノール酸含有トリグリセリド量を測定した結果、DKO マウスではトリグリセリド量が WT の約 2 倍に増加していた。このことから、DKO マウスにおけるアシルセラミドの減少は基質の減少によるものではないことが示された。

2. 表皮における長鎖塩基/極長鎖脂肪酸産生に働くセラミダーゼの研究

表皮における長鎖塩基/極長鎖脂肪酸産生に関わるセラミダーゼの同定のため、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*ASAHI* または *ACERI* KO ヒト不死化ケラチノサイトを作製した。作製したセラミダーゼ KO ケラチノサイトを 14 日間分化させ、脂質を回収し、LC-MS/MS によってセラミド量を定量した。その結果、コントロールに比べ *ASAHI* KO ケラチノサイトではセラミド量が大きく増加した一方、*ACERI* KO ケラチノサイトではセラミド量に変化は見られなかった。次に長鎖塩基である SPH 量を定量した結果、コントロールに比べ *ASAHI* KO ケラチノサイトでは SPH 量が大きく減少した一方、*ACERI* KO ケラチノサイトでは SPH 量に変化は見られなかった。また極長鎖脂肪酸について定量した結果、*ASAHI* KO および *ACERI* KO ケラチノサイトともにコントロールと比較して、極長鎖脂肪酸量に大きな変化は見られなかった。

これらの結果から、ケラチノサイトにおける極長鎖脂肪酸はセラミド分解経路に由来しないが、酸性セラミダーゼ *ASAHI* が分化ケラチノサイトにおいてセラミド分解に働き、*ALDH3A2* の基質である脂肪酸アルデヒドの前駆体である長鎖塩基を産生していることが明らかとなった。

【考察】

本研究では、SLS 皮膚病態モデルマウスとして DKO マウスが有用であることを示し、アシルセラミド量の減少が SLS 皮膚病態発症の主要な要因となっていることを明らかにした。アシルセラミドはトリグリセリド中のリノール酸が ω 水酸化セラミドへ転移されることで産生され、その反応はトランスアシラーゼ *PNPLA1* によって触媒される。また、*ABHD5* は *PNPLA1* によるトリグリセリド利用を促進する働きがあると考えられている。本研究の結果から、DKO マウスにおいてこのトランスアシレーション反応が阻害されていることが示唆された。定量的 RT-PCR の結果、DKO マウスにおいて *Pnpl1* および *Abhd5* の発現量は低下していなかった (データ非掲載)。このことから、DKO マウスでは遺伝子発現ではなく、これらのいずれかの酵素の活性が蓄積したアルデヒドの攻撃を受け、阻害されたと考えられる。

また、本研究により、*ASAHI* が表皮における主要なセラミダーゼであること、表皮の極長鎖脂肪酸はセラミド分解経路由来でないことが示された。また、*ASAHI* によって表皮セラミドが分解され、*ALDH3A2* の基質である長鎖アルデヒドの前駆体である長鎖塩基が産生されることが示された。このことから、*ASAHI* の阻害剤が SLS の治療薬となりうる可能性がある。

以上、本研究ではセラミド/長鎖塩基代謝経路に着目し、SLS 皮膚病態発症メカニズムおよび表皮の長鎖塩基/極長鎖脂肪酸の産生経路に関する新たな知見を得ることに成功した。