



Title	アシルトランスフェラーゼAwat1およびAwat2が生み出すマイバム脂質多様性とドライアイ防止における役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	澤井, 恵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14848号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85648">https://hdl.handle.net/2115/85648</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Megumi_Sawai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(臨床薬学) 氏名 澤井 恵

## 学位論文題名

アシルトランスフェラーゼ *Awat1* および *Awat2* が生み出すマイバム脂質多様性と  
ドライアイ防止における役割

涙液油層は水分蒸散防止、涙液の表面張力低下、涙液に適度な粘弾性を付与するといった役割を担う。油層を構成する脂質の大部分はマイボーム腺から分泌され、総称してマイバム脂質と呼ばれる。ドライアイ患者の約8割がマイボーム腺機能不全を示していることが報告されているものの、マイバム脂質の質や量を改善するような医薬品は未だ上市されていない。マイバム脂質の主成分はコレステリルエステル(CE)とワックスモノエステル(WE)であり、合わせて9割程度を占めると報告されている。また、これら以外にも *O*-アシル- $\omega$ -水酸化脂肪酸(OAHFA)やエステル結合の向き・水酸基の位置が異なる3種類のワックスジエステル(WdiE)などの多様なエステル分子クラスが存在する。これまでにCEについてはエステル結合を形成する酵素および生理的意義が明らかにされているが、その他のエステル分子クラスについては不明である。AWAT (Acyl-CoA wax alcohol acyltransferase) 1および2は、*in vitro* の解析からWE合成酵素活性を有することが報告されている。しかし、これらがWE、あるいはOAHFA、WdiEなどのエステル結合含有マイバム脂質の産生に参与しているかは明らかにされていない。また、WEを含む多くのエステル結合含有マイバム脂質のドライアイ防止における役割は不明である。そこで本研究では、*Awat1* および *Awat2* の各単独ノックアウト(KO)マウス(A1 KOおよびA2 KO)、*Awat1 Awat2* 二重KOマウス(DKO)を作製し、上記不明点の解明を目指した。

CRISPR/Cas9システムを用いて上記KO/DKOマウスを作製した。野生型マウス(WT)が大きく目を開いていたのに対し、A1 KOは目をやや閉じ気味にしており、A2 KOおよびDKOはさらに目を閉じた状態であった。WTのマイボーム腺開口部には塞栓は観察されなかったが、A2 KOおよびDKOでは白い練り歯磨き状、A1 KOでは半液状の塞栓が観察された。融点を測定すると、WT由来のマイバム脂質が34℃であったのに対し、A2 KOが62℃、DKOが57℃と大幅に上昇しており、A1 KOでも39℃と上昇していた。また、A2 KOおよびDKOマイボーム腺は全体的に肥大化していた。これらのマイボーム腺ではマイバム脂質の固化によって分泌が著しく阻害され、マイバム脂質が腺内部に蓄積していると考えられる。1分間あたりの瞬目回数を計数すると、WTがほとんど瞬目しなかったのに対し、A1 KOでは4回程度、A2 KOでは8回程度、DKOでは10回程度とそれぞれ瞬目回数が有意に増加していた。続いて、点眼した蛍光溶液が眼表面に一樣に広がってから破壊されるまでの時間を測定する涙液安定性試験を行った結果、A1 KOおよびA2 KOどちらにおいても涙液層破壊時間の短縮すなわち涙液層の不安定化が認められた。一方、眼表面からの水分蒸散についてはA2 KO、DKOのみで亢進していた。これらの結果より、*Awat1* および *Awat2* の欠損はどちらもマイボーム腺機能不全を引き起こし、特に *Awat2* の欠損による影響が強いことが明らかになった。

液体クロマトグラフィー連結タンデム質量分析 (LC-MS/MS) によって WT, A1 KO, A2 KO, DKO のマイバム脂質中の WE とタイプ 2 $\omega$  WdiE を測定した。その結果, A2 KO, DKO では WE が消失していたのに対し, A1 KO では減少していなかった。タイプ 2 $\omega$  WdiE については, A2 KO で WT の 1 割程度, DKO で 1 割未満にまで減少していたが, A1 KO では減少していなかった。これらの結果より, *Awat2* が WE とタイプ 2 $\omega$  WdiE 産生に中心的な役割を果たすことが明らかになった。OAHFA を LC-MS/MS で測定した結果, A1 KO で WT の 3 割程度にまで減少しており, A2 KO でも 6 割程度にまで減少していた。したがって, *Awat1* が OAHFA 産生において主要に働き, *Awat2* も補助的に関与することが明らかとなった。LC-MS/MS によるタイプ 1 $\omega$  WdiE の測定系はこれまで確立されていなかったため, 本研究において標準品を合成し, 測定系を確立した。WT マイボーム腺におけるタイプ 1 $\omega$  WdiE 組成を調べたところ, 飽和アルコールを有し, 残りの脂肪酸と  $\omega$  水酸化脂肪酸部分の不飽和度の合計が三価あるいは二価のものが豊富であることが明らかになった。この系を用いて A1 KO, A2 KO および DKO のマイボーム腺中の三価不飽和タイプ 1 $\omega$  WdiE を測定したところ, A2 KO で WT の 2 割程度, A1 KO で WT の 3 割程度にまで減少しており, DKO では消失していた。一方, 二価不飽和については A1 KO で WT の 5 割程度にまで減少, DKO でほぼ消失していたのに対し, A2 KO では減少していなかった。これらの結果より, 三価および二価不飽和タイプ 1 $\omega$  WdiE 産生において, *Awat1* と *Awat2* がそれぞれ異なる寄与を示すことが明らかになった。

ヒト涙液中の WdiE 組成についてはタイプごとに区別して測定された報告がなかったため, 確立した測定系を用い, ヒト涙液中の WE, OAHFA, タイプ 2 $\omega$  WdiE およびタイプ 1 $\omega$  WdiE の包括的な LC-MS/MS 測定を行った。その結果, 一部の違いはあったものの, 鎖長分布などはヒト・マウス間で概ね似ていることが明らかになった。

WE と OAHFA についてはそれぞれ A2 KO および A1 KO で消失あるいは大きく減少していたことから, *Awat2* および *Awat1* がそれぞれ産生を主要に担うことが明らかになった。WdiE についてはタイプ 2 $\omega$  WdiE が A2 KO で大きく減少し, 三価および二価不飽和タイプ 1 $\omega$  WdiE がそれぞれ A2 KO および A1 KO で大きく減少していた。このことから, *Awat1* および *Awat2* がタイプや不飽和度の違う WdiE の産生において異なる寄与を示すことが明らかになった。マイバム脂質で最も主要な WE が消失した A2 KO はマイボーム腺開口部の閉塞, マイバム脂質の著しい融点上昇, 眼表面からの水分蒸散の亢進といった激しいマイボーム腺機能不全を示した。一方, OAHFA やタイプ 1 $\omega$  WdiE といった主要ではない分子クラスが減少した A1 KO もマイボーム腺機能不全を示した。したがって, マイバム脂質の多様性を生み出す *Awat1* と *Awat2* が共にドライアイ防止に必須であることが明らかになった。ヒト・マウス間でマイバム脂質の組成が似ていたことから, A1 KO や A2 KO はマイボーム腺機能不全のモデル動物として有用であり, 今後の新規治療開発への貢献が期待される。