

極長鎖脂肪酸含有セラミドの表皮バリア形成における機能と分子機構の解明

大阪市立大学複合先端研究機構
中台(鹿毛) 枝里子

In multicellular organisms, the surface barrier is essential for maintaining the internal environment. In mammals, the barrier is the stratum corneum. Fatty acid transport protein 4 (FATP4) is a key factor involved in forming the stratum corneum barrier. Mice lacking *Fatp4* display early neonatal lethality with features such as tight, thick, and shiny skin, and a defective skin barrier. FATP4 is a member of the FATP family that possesses acyl-CoA synthetase activity for very long chain fatty acids. How *Fatp4* contributes to skin barrier function, however, remains to be elucidated. In the previous study, we characterized two *Caenorhabditis elegans* genes, *acs-20* and *acs-22*, that are homologous to mammalian FATPs. Animals with mutant *acs-20* exhibited defects in the cuticle barrier, which normally prevents the penetration of small molecules. We demonstrated that the incorporation of exogenous very long chain fatty acids into sphingomyelin was reduced in *acs-20* and *acs-22* mutants. In the present study, we further analyzed the skin barrier of *acs-20* and *acs-22* mutants. We also developed *C. elegans* infection models against human skin flora such as *Propionibacterium* and *Malassezia*.

1. 緒言

セラミドは表皮の細胞間脂質として表皮バリア形成に重要な役割を果たすと考えられている。実際に、ゴースェ病やアトピー性皮膚炎患者では皮膚のセラミド含有量が減少し、易感染性や水分保持能低下が起こる。2003年、Herrmannらのグループにより、角質細胞において機能する極長鎖アシルCoAシンターゼFATP4のノックアウトマウスでは、低分子化合物の皮膚透過性が異常な高値を示すこと¹⁾(図1)、表皮のセラミドに含まれる極長鎖脂肪酸量が有意に低下することがわかり(極長鎖脂肪酸:一般に炭素数24以上の脂肪酸)、セラミドのなかでも極長鎖脂肪酸を含むものが表皮バリア形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかし、マウス研究は遺伝学的手法が煩雑であり、研究コストも高いことなどから、表皮バリアと脂質に関する分子遺伝学的基盤の全体像は未だ明らかになっていない。

そこで申請者は表皮バリア形成の解析のためのモデル動物として線虫*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)を用いることを着想し、FATP4ホモログ遺伝子*acs-20*のノックアウト線虫の作製および解析を行った。その結果、ノックアウト線虫ではHoechstをはじめとする種々の化合物の表皮透過性が顕著に上昇していた²⁾(図2)。また極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質量が低下していた²⁾。本研究は上

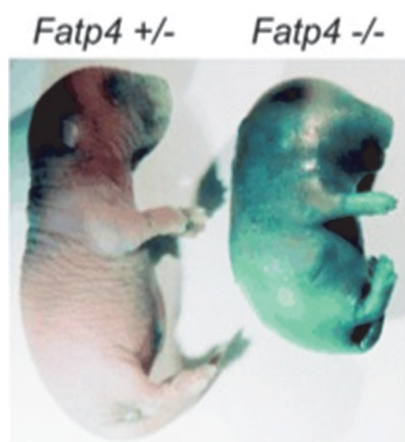


図1 表皮バリア異常によりX-galで真っ青に染まったFATP4ノックアウトマウス

記知見に立脚し、線虫をモデル動物として用いて極長鎖脂肪酸含有セラミドの表皮バリア形成/機能における役割と分子的基盤を明らかにすることを目的とする。また線虫を代替モデル宿主とした、ヒトの皮膚フローラを構成する細菌、真菌の感染実験系を構築し、脂質や表皮バリアの役割について明らかにすることを目指した。

2. 方法

2.1. 実験動物(線虫)

野生型*Caenorhabditis elegans*としてN2株(*Caenorhabditis Genetics Center* (CGC)より分与)を使用した。*acs-20*変異体として、*tm3232*株または*tm3278*株²⁾を使用した。*acs-22*変異体として、*tm3236*株²⁾を使用した。レスキュー実験には、*tm3232*株に*acs-20*プラスミドDNAをマイクロインジェクションにより導入し、株化したものを使用した。線虫の飼育はBrenner (1974)に準じて行った。線虫は、餌となる大腸菌OP50株を培養したNGMプレー



The role of very long chain fatty acid containing ceramides in the epidermal barrier and the underlying molecular mechanisms

Eriko Kage-Nakadai

The OCU Advanced Research Institute of Natural Science and Technology, Osaka City University

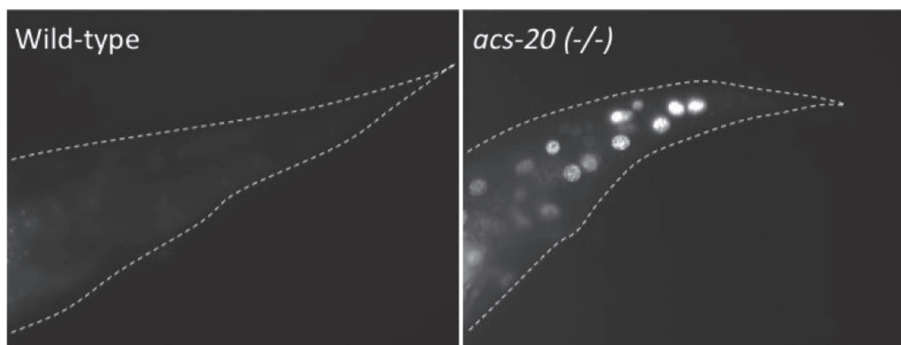


図2 *acs-20* ノックアウト線虫の表皮バリア破綻
Hoechst バイタル染色により核が簡単に染まってしまう(線虫尾部の写真。白破線で縁をかたどっている)。

ト上で飼育した。飼育温度は、通常の維持では20℃とし、生存分析および感染実験においては25℃にて行った。

2. 2. 1% SDS感受性試験

耐性幼虫を得るため、液体培養にて餌枯渇状態となつてから、さらに4日間20℃飼育を行った線虫を用いた。線虫は1% SDS溶液に15分間浸した後、M9バッファー (5 mM potassium phosphate, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, and 0.5 g/L gelatin) を用いて3回洗い、餌のないNGMプレート上に置いた。20℃24時間培養後、生存する虫の数をカウントした。

2. 3. マラセチア真菌感染実験

産卵期にある成虫より卵を回収し、孵化同調させた後、25℃3日間培養し、1日齢成虫を得た。マラセチア真菌株として *Malassezia furfur* NBRC0656株を用いた。培養はクロモアガーを用い28℃にて行った。寒天上のコロニーをかきとりM9バッファーに懸濁、調整、10 mg/plateとなるように5 cm NGM プレートに塗布した。対照群として、OP50株をTSA培地で37℃一晩培養後、M9バッファーで調整し、10 mg/plateとなるように5 cm NGM プレートに塗布した。同調した1日齢成虫を、各菌株を塗布したNGMプレート上に移し、25℃培養を行った。その後2日毎に新しく菌を塗布したプレートに移しながら経日的に観察し、ピッカーで軽く触れて反応のない個体を死亡とした。観察により得られた結果はKaplan-Meier法により生存率を計算後、Log-rank testにより各群間の生存率の差を比較した。

2. 4. アクネ菌感染実験

アクネ菌株として *Propionibacterium acnes* NBRC107605株を用いた。液体培養はGAMブイヨンを用い、アネロパックおよびアネロパックジャーを用いて37℃嫌気培養を行った。培養液をGAM寒天培地上にコンラージし、2日

間37℃嫌気培養を行った。寒天上のコロニーをかきとりM9バッファーに懸濁、調整し、10 mg/plateとなるように5 cm NGM プレートに塗布した。他は2. 3. の方法に準じて行った。

3. 結果

3. 1. *acs-20* ノックアウト線虫は1% SDS高感受性である

線虫は餌の枯渇した環境や高温度環境において耐性幼虫化することが知られている。耐性幼虫では体表のクチクラ層が口まで覆っており、高温、乾燥、界面活性剤などの薬剤に耐性となる。そこで、野生型線虫、*acs-20* ノックアウト線虫、*acs-20* のパラログであり主に腸において機能する *acs-22* 遺伝子のノックアウト線虫について耐性幼虫化条件における1% SDS感受性試験を行った。その結果、*acs-20* ノックアウト線虫は1% SDSに対し感受性を示すことがわかった。一方、野生型線虫と *acs-22* ノックアウト線虫においては耐性を示す虫が出現した。*acs-20* ノックアウト線虫の1% SDS耐性は、*acs-20* の導入により回復した(図3、図4)。

3. 2. マラセチア真菌 *M. furfur* は線虫 *C. elegans* に対し病原性を示す

マラセチア真菌はヒトや動物の皮膚に常在する担子菌系の不完全酵母である。*Malassezia* 属のほとんどの種は増殖に脂質を要求することから皮脂の多い部位に定着しやすく、癬風や脂漏性皮膚炎等の原因となる。これまでにマラセチア真菌のモデル宿主として線虫 *C. elegans* が用いられた報告はないため、本研究において実験系の確立を行った。25℃において *Malassezia furfur* NBRC0656 接種群は2日ほどで死滅した(図5)。20℃においても同様の結果が得られた (data not shown)。標準的な餌である大腸菌 OP50 株の接種では寿命は2~3週間であることから、*M. furfur* は線虫 *C. elegans* に対し強い病原性を示すことが示唆され

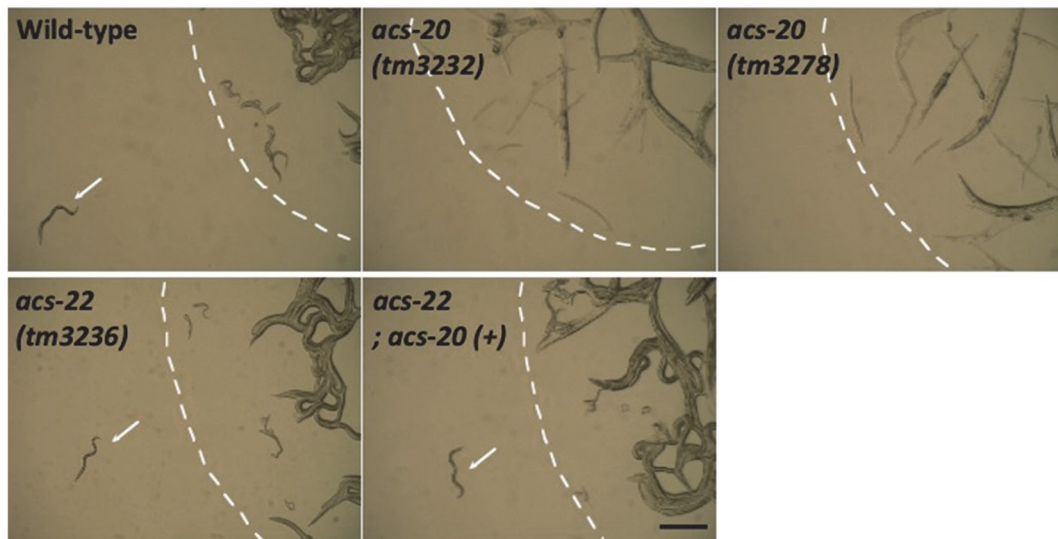


図3 1% SDS 感受性試験
 白い矢印は1% SDS に対し耐性を示し、生存している線虫を示す。

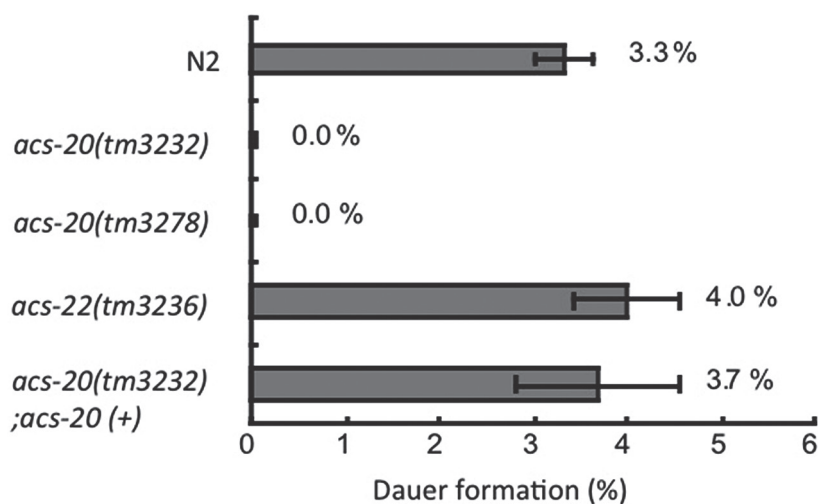


図4 1% SDS 耐性率 (耐性幼虫化率)
 Mean ± SE (n=3)

た。*acs-20* ノックアウト線虫においては野生型線虫と比較し、生存率が高い傾向はあったが、両者の間に有意な差はみとめられなかった(図5)。

3. 3. アクネ菌 *P. acnes* は線虫 *C. elegans* に対し病原性を示す

アクネ菌 *Propionibacterium acnes* はヒトの皮膚に常在するグラム陽性桿菌である。プロピオン酸を産生することから、寝たきりの高齢者などにみられる悪臭の原因となる。また近年、ディープシーケンス法の適用により、アクネ菌の特定の株がニキビ発症に関連している可能性が指摘されはじめた⁴⁾。これまでにアクネ菌のモデル宿主として線虫 *C. elegans* が用いられた報告はないため、本研究において実験系の確立を行った。実験には *Propionibacterium*

acnes NBRC107605 を用いた。その結果、標準的な餌である大腸菌 OP50 株の接種に比較し、生存率が有意に減少した ($p < 0.01$) (図6)。*P. acnes* は嫌気性細菌であるが、実験環境(好気条件)において少なくとも2日間は生菌が回収されることも確認した。*P. acnes* 接種群の生存個体は OP50 接種群と比較し、体が小さく透明度が高かった (data not shown)。

3. 4. アクネ菌接種による生存曲線は *acs-20* ノックアウト線虫と野生型線虫とは異なるキネティクスを示す

アクネ菌接種に対する感受性について野生型線虫と *acs-20* ノックアウト線虫を比較したところ、両者において有意な生存率の差はみとめられなかった。しかしながら、両

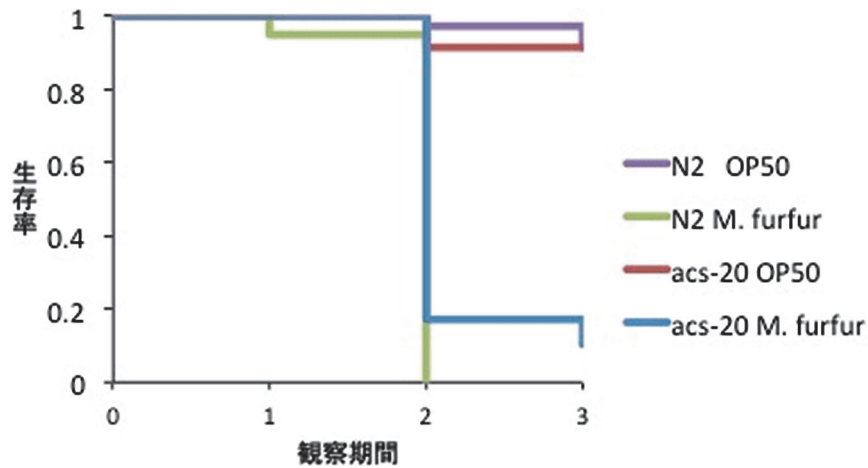


図5 マラセチア真菌感染実験

1日齢線虫に標準餌である大腸菌 OP50 またはマラセチア真菌 *M. furfur* を接種した。
1群あたりの個体数 n>50

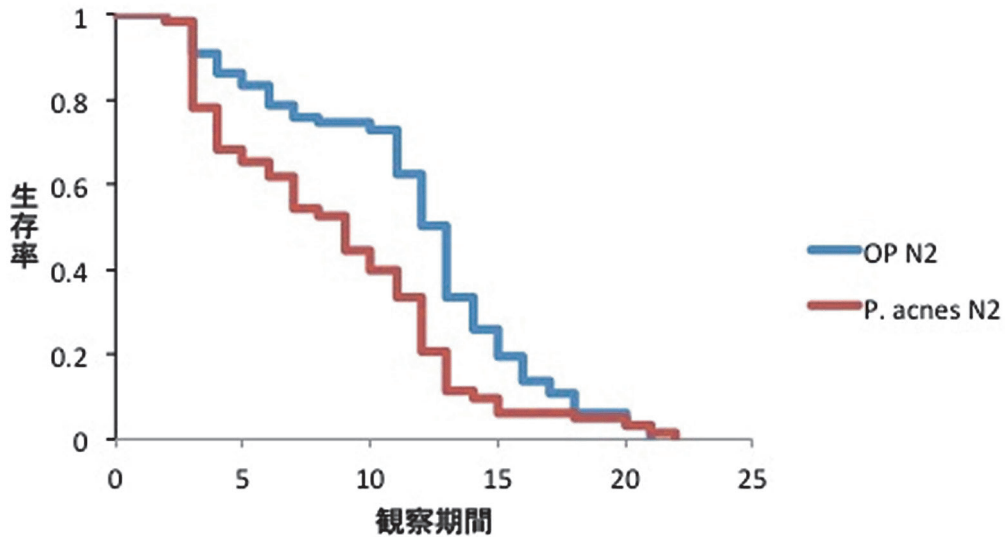


図6 アクネ菌感染実験

1日齢野生型線虫 N2 株に標準餌である大腸菌 OP50 またはアクネ菌 *P. acnes* を接種した。1群あたりの個体数 n>50

者の生存曲線は異なるキネティクスを示した。*acs-20* ノックアウト線虫は野生型線虫と比較し観察期間10日ころまでは生存率が高い傾向を示し、10日以降は逆に低い傾向を示した(図7)。

4. 考察

皮膚の角質層に存在する細胞間脂質は感染防御に重要な役割を果たすと考えられている。一方でヒトの皮膚の常在菌には好脂質性、脂質要求性の細菌、真菌が少なくない。*Propionibacterium acnes* (アクネ菌) は皮脂を好み、皮脂腺において増殖する性質を有する。*Malassezia* 属(マラセチア真菌)の多くは脂質存在下においてのみ増殖が可能である。このような菌、真菌については、有効な感染モデル

動物が存在せず、宿主との相互作用について未解決の課題が多く残されている。

線虫はわずか1,000細胞の単純な多細胞生物であるが、筋肉系、神経系、消化管系など多様な組織から構成されヒトと本質的には共通の生物学的特性を持っており、体表の構造もヒトの皮膚と類似点が多い。体表面には、ヒトの皮脂と同様に中性脂肪やリン脂質、スフィンゴ糖脂質などで構成される脂質層を有する。これまでに、哺乳類において皮膚バリアに重要な役割を果たす極長鎖アシルCoAシンターゼに着目し、その線虫ホモログである*acs-20* 遺伝子のノックアウト線虫の作製・表現型解析を行ってきた。

本研究においては、*acs-20* ノックアウト線虫が耐性幼虫化条件において1% SDS 高感受性を示すことを明らかに

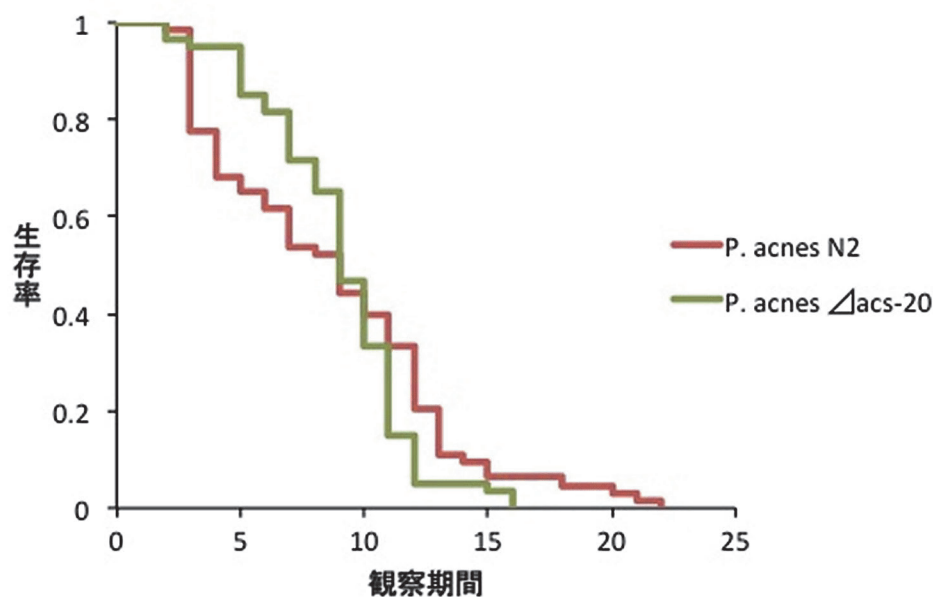


図7 *acs-20* ノックアウト線虫に対するアクネ菌感染実験
 1日齢 *acs-20* ノックアウト線虫に標準餌である大腸菌 OP50 またはアクネ菌 *P.acnes* を接種した。1群あたりの個体数 $n > 50$

した。この結果は *acs-20* ノックアウト線虫の表皮バリアが低下するというこれまでの知見を支持する。また、線虫 *C. elegans* がヒト皮膚常在菌、真菌の感染モデルとなる可能性を考え、種々の細菌、真菌の線虫への感染実験を行った。その結果、マラセチア真菌やアクネ菌が線虫に対して顕著な病原性を発揮することが明らかとなった。また *acs-20* ノックアウト線虫は、アクネ菌に対して野生型線虫と異なる生存キネティクスを示した。アクネ菌やマラセチア真菌は様々な脂質を基質とするリパーゼを分泌し、加水分解により生じた脂肪酸が炎症を誘発、増悪する可能性が指摘されている。以上のことから、*acs-20* ノックアウト線虫は、リパーゼの基質となる体表面脂質の変化により、アクネ菌やマラセチア真菌に対し野生型線虫と異なる反応を示す可能性が考えられた。

(引用文献)

- 1) Herrmann T1, van der Hoeven F, Grone HJ, Stewart AF, Langbein L, Kaiser I, Liebisch G, Gosch I, Buchkremer F, Drobnik W, Schmitz G, Stremmel W. Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermatopathy. *J Cell Biol.* 161,1105-1115, 2003
- 2) Kage-Nakadai E, Kobuna H, Kimura M, Gengyo-Ando K, Inoue T, Arai H, Mitani S. Two very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase genes, *acs-20* and *acs-22*, have roles in the cuticle surface barrier in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5, e8857, 2010
- 3) Tomida S, Nguyen L, Chiu BH, Liu J, Sodergren E, Weinstock GM, Li H. Pan-genome and comparative genome analyses of *propionibacterium acnes* reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio* 4, e00003-13, 2013