

皮膚制御に関わる新規機能性脂質の同定と脂質フローによる皮膚疾患制御機構の解明

東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻細胞情報学分野

武富 芳隆

Epidermal lipids are important for skin homeostasis. However, the overall view of the roles of lipids, particularly nonceramide lipid species, in epidermal biology still remain obscure. Here we show that epidermal sPLA₂ (Ep-PLA₂), a functionally phospholipase A₂ expressed in the stratum granulosum of the mouse and human epidermis, regulates epidermal permeability barrier homeostasis and protects against atopic dermatitis through mobilization of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In a survey of knockout mouse lines of the various PLA enzymes, global and keratinocyte-selective Ep-PLA₂ knockout mice has a defect of the epidermal barrier, due to reduced synthesis of natural moisturizing factor, combined with abnormal type 2 immune responses and showed exacerbated antigen-induced atopic dermatitis. Primary keratinocytes from Ep-PLA₂-null mice had signs of aberrant cell proliferation, differentiation, and activation in association with skin barrier defect. Several screening approaches by lipidomics analysis of mouse skin, phenotypic analyses of mouse lines deficient in various lipid receptors and biosynthetic enzymes, and gene expression profiling in keratinocytes revealed that Ep-PLA₂ is coupled with the production of a large pool of cutaneous PUFA-derived lipid mediators. The constitutive levels of PUFAs and their metabolites in the skin were lower in Ep-PLA₂-null than in wild-type mice. Actually, an abnormality in epidermal permeability barrier observed in mice lacking Ep-PLA₂ were phenocopied in lipid X receptor-deficient mice. The expression of Ep-PLA₂ and the lipid receptor are upregulated during keratinocyte differentiation. Treatment with the lipid receptor agonist restored defective differentiation and/or activation of Ep-PLA₂-null keratinocytes. In human atopic dermatitis lesions, the expression levels of Ep-PLA₂ was inversely correlated with the severity of atopic dermatitis. Thus, our results underscore a previous unrecognized role of nonceramide lipid species in skin allergy, and the novel role of a particular Ep-PLA₂-driven lipid metabolism in epidermis.

1. 緒言

環境因子に常に曝されている皮膚には、皮膚バリアによって異物の侵入や水分蒸散を防ぐなどの固有の防御機構が備わっている。皮膚のバリア機能が損なわれることにより環境因子が過度に体内に侵入すると、2型免疫系が過剰に活性化し、難治性の慢性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎へと遷移するとともに、遠隔組織に喘息や鼻炎などの様々なアレルギー性疾患を招く。したがって、皮膚バリアあるいはその異常に基づく過剰な免疫応答を適切に統制することは、皮膚の健康の増進のみならずアレルギー性疾患の克服を目指す上で重要である。

脂質の量的・質的な異常は皮膚の調節に大きな影響を与えるが、皮膚における生理的環境下での機能性脂質の固有の動員経路やその生物学的意義は体系的に理解されているとは言いがたい。脂質メディエーターをはじめとする生理活性脂質の多くはホスホリパーゼA₂ (PLA₂: グリセリン脂質を分解して脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素群)により量と質が規定される。著者が所属する研究チ

ームは、数多く存在するPLA₂分子群の固有の機能に着目し、本酵素群の欠損マウスの網羅的な導入と各欠損マウスが発症する表現型の一斉解析を実施すると同時に、これにPLA₂を起点とした脂質代謝フローを同定するための脂質網羅的分析(リポドミクス)を組み合わせた解析アプローチを展開することにより、各種PLA₂に固有の脂質代謝産物の同定とそれにより制御される生体応答の動作原理を解明してきた。皮膚との関連について我々は、①リンパ組織中のII D型分泌性PLA₂がドコサヘキサエン酸(DHA)などのω3脂肪酸あるいはそれ由来の脂質メディエーターの動員を介してTh1型またはTh17型免疫応答依存的に接触性皮膚炎または乾癬を抑制すること^{1,2)}、②毛包のII E型sPLA₂が毛の育毛に関わること³⁾、③表皮角化細胞由来のII F型分泌性PLA₂が表皮中にリゾリン脂質(プラズマローゲン型リゾホスファチジルエタノールアミン)を動員することにより乾癬や皮膚癌などの表皮肥厚疾患を増悪すること⁴⁾、④表皮角化細胞に発現している細胞内酵素PLPLA1(カルシウム非依存性PLA₂の一種)がアシルセラミドの生合成を通じて角層バリアの形成に必須の役割を担うこと⁵⁾、などを報告した。我々はさらに、PLA(PLA₁またはPLA₂)群欠損マウスの皮膚の網羅的解析の過程において、epidermal PLA₂(Ep-PLA₂)が皮膚のバリア機能の調節に関わる予備的知見を得た。

そこで本研究では、PLA₂の新機能を切り口として、未解明であった皮膚における機能性脂質の動員機序とそれによる皮膚の恒常性・変容の新しい制御機構を解明すること、



Epidermal phospholipase A₂-driven lipid metabolism regulates skin barrier homeostasis and atopic dermatitis

Yoshitaka Taketomi

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

ならびに当該脂質代謝の量的・質的な変動がアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患に占める位置付けを確立することを目的とした。

2. 方法

2.1. マウスの皮膚バリア機能

マウスの皮膚のバリア機能は、①テヴァメーターを用いた経表皮水分蒸散、②ラマン分光法による皮膚中の角質細胞間脂質(セラミドやコレステロール)、天然保湿因子の測定、③タンパク質抗原の皮膚透過試験、④一次刺激性皮膚炎に関する表現型、などにより評価した。

2.2. アトピー性皮膚炎モデル

アトピー性皮膚炎モデルとして抗原誘導アトピー性皮膚炎を採用した。マウスの皮膚への抗原の反復塗布により生じるTh2型免疫応答(血中の抗原特異的IgEや所属リンパ節におけるTh2サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)産生など)ならびに皮膚におけるアレルギー性炎症(好酸球浸潤や皮膚肥厚など)について解析した。

2.3. 表皮角化細胞を用いた解析

表皮角化細胞は、新生児マウスの皮膚より単離した初代培養表皮角化細胞またはヒト表皮由来初代角化細胞を用い、カルシウムによる分化刺激に伴う応答性について解析した。

2.4. リピドミクス解析

マウスの皮膚中の高度不飽和脂肪酸(PUFAs)やそれ由来の脂質メディエーター、アシルセラミドなどの脂質成分は液体クロマトグラフィー/質量分析法LC-MS/MSを用いて測定した。

2.5. ヒト検体を用いた解析

東京大学医学部附属病院皮膚科との連携のもと、ヒトアトピー性皮膚炎の皮膚検体を用い、脂質代謝関連分子の発現を検討した。

3. 結果

3.1. 皮膚バリアに関わるPLA₂の網羅的スクリーニング

皮膚のバリア機能が損なわれると体内の水分が損失し、乾燥状態が生じる。通常飼育環境下における成体のPLA群欠損マウスの経表皮水分蒸散量を測定した結果、唯一Ep-PLA₂欠損マウスで経表皮水分蒸散の亢進が認められた。

皮膚バリアの乱れによって刺激物質に対する過敏反応が生じるが、経表皮水分蒸散の場合と同じく、PLA群欠損マウスの中でEp-PLA₂欠損マウスでのみ野生型マウスと

比べ一次刺激性皮膚炎の増悪が認められた。

これらのPLA群欠損マウスの網羅的スクリーニングを通じて、Ep-PLA₂が皮膚バリアの調節に関与する可能性が浮上した。

3.2. 皮膚におけるEp-PLA₂の発現

皮膚は表層より表皮、真皮、皮下組織に分けられ、このうち表皮は下層から表層へ向けて基底層、有棘層、顆粒層、角層の4層から構成される。マウス皮膚を用いた免疫染色の結果、Ep-PLA₂は主に表皮に発現しており、顆粒層マーカーであるロリクリンと同一の局在性を示した。マウスまたはヒトの表皮角化細胞において、Ep-PLA₂の発現は分化に伴い表皮角化細胞に特有の分化マーカー(ケラチン1など)と同様に誘導された。したがって、Ep-PLA₂は表皮角化細胞の分化に伴い発現誘導され、顆粒層に局在することが明らかとなった。

3.3. Ep-PLA₂欠損マウスが呈する皮膚バリア異常

皮膚のバリア機能の維持にはセラミドを中心とする脂質ラメラによる角層バリアと、タイトジャンクションを中心とする顆粒層の表皮バリアが関わる。角質細胞間脂質(セラミド、脂肪酸、コレステロール)および天然保湿因子は角層で水分を保つ上で重要な働きを担う。これらの成分について解析した結果、Ep-PLA₂欠損マウスではセラミドやコレステロールは野生型マウスと同様に正常であったが、天然保湿因子が減少していた。さらに、野生型マウスの皮膚にタンパク質抗原を塗布すると表皮の顆粒層バリアによって抗原の浸透が妨げられたが、欠損マウスでは抗原が容易に顆粒層を超え真皮にまで達した。

欠損マウスの皮膚では、表皮の基底層マーカー(ケラチン5)の発現は正常であったが、有棘層マーカー(ケラチン1)の発現が野生型マウスより増加し、反対に顆粒層マーカー(ロリクリン)の発現が減少しており、分化異常を生じていた。

我々はコンディショナルEp-PLA₂欠損マウスを樹立し、表皮角化細胞(ケラチン14プロモーター)選択的に本酵素を欠損させ、当該皮膚解析を実施した。その結果、全身性のEp-PLA₂欠損マウスにおいて認められる表皮バリア異常は皮膚選択的Ep-PLA₂欠損マウスにおいても同様に認められた。したがって、表皮角化細胞に発現しているEp-PLA₂が表皮バリアの恒常性の維持に重要であることが強く示唆された。

3.4. Ep-PLA₂欠損マウスの表皮角化細胞の異常

マウスの皮膚より表皮角化細胞を単離し、表皮角化細胞の機能におけるEp-PLA₂欠損の影響について解析した。欠損細胞では野生型細胞と比べ増殖および遊走能が低下し

ており、分化刺激に対して分化マーカー（ケラチン1、ケラチン10）の発現誘導が亢進した状態、すなわち分化異常（過分化）を生じた。さらに、欠損細胞では2型免疫応答に関わるサイトカイン（IL-33、TSLP）の発現（活性化の指標）が亢進した。

マウスの皮膚あるいはそれ由来の表皮角化細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果、Ep-PLA₂欠損では細胞間接着分子（クローディンやタイトジャンクションタンパク質など）の発現が全体的に減少傾向を示すと同時に、これらの分子を分解するプロテアーゼ（カリクレインなど）の発現が野生型より増加していたことから、顆粒層のバリアが損なわれていることが想定された。

これらの結果から、Ep-PLA₂欠損マウスの表皮角化細胞は、増殖分化異常、活性化亢進、遊走不全、ジャンクション形成不良を生じることが示唆された。

3. 5. Ep-PLA₂欠損マウスのアトピー性皮膚炎に関する表現型

Ep-PLA₂欠損による表皮バリア異常ならびに2型免疫応答の増強がアトピー性皮膚炎などの慢性アレルギー病態を進展させるかについて検討した。Ep-PLA₂欠損マウスにアトピー性皮膚炎モデルを施行した結果、野生型マウスと比べ抗原曝露に伴う血中の抗原特異的IgEの産生が亢進するとともに、所属リンパ節における抗原依存的なTh2サイトカインの産生が増強され、Th2型免疫応答が亢進していた。さらに、欠損マウスでは抗原曝露に伴う皮膚肥厚や真皮中への好酸球浸潤の増多などのアトピー性皮膚炎に特徴的なアレルギー性炎症の増悪が認められた。これら一連の結果より、Ep-PLA₂欠損マウスでは表皮バリアの恒常性が異常を生じることで、抗原曝露に伴う2型免疫系の活性化が亢進し、アトピー性皮膚炎の慢性アレルギー病態が進展したものと考えられる。

3. 6. Ep-PLA₂が動かす脂質代謝経路の包括的探索

Ep-PLA₂欠損マウスは通常飼育下で表皮バリア異常を呈することから、Ep-PLA₂の下流で機能する責任脂質は欠損マウスの皮膚中で構成的に減少していることが予想された。そこで、通常飼育下の野生型およびEp-PLA₂欠損マウスの皮膚を用いてリピドミクス解析を行ったところ、野生型マウスと比べ欠損マウスの皮膚中では、PUFAs（リノール酸、アラキドン酸、 ω 3脂肪酸など）ならびにそれら由来の代謝物の多くが部分的に減少していた。したがって、Ep-PLA₂は正常皮膚においてPUFAsまたはその代謝物を動員することが示唆された。

Ep-PLA₂の下流で産生される何らかの責任脂質が表皮バリアに関わるならば、脂質メディエーターの生合成酵素・

受容体の欠損マウスの中にEp-PLA₂欠損マウスと同様の表現型を示す系統が存在するはずである。そこで我々は、各種脂質代謝酵素・受容体の欠損マウスの皮膚バリア機能を網羅的に解析した。その結果、あるPUFA由来の脂質メディエーターの受容体の欠損マウスにおいてEp-PLA₂欠損マウスと同様の皮膚バリア異常、すなわち経表皮水分蒸散の亢進と一次刺激性皮膚炎の増悪が認められた。

皮膚バリアに関わる責任脂質受容体は表皮角化細胞に発現しているはずである。そこで、マウス皮膚由来表皮角化細胞の分化に伴い発現誘導される脂質受容体を定量的PCRにより網羅的にスクリーニングしたところ、当該脂質受容体の発現が表皮角化細胞の分化に伴い最も著明に誘導された。

以上の結果を統合すると、Ep-PLA₂は表皮中においてPUFA由来脂質メディエーター経路を始動することが考えられる。

3. 7. Ep-PLA₂を起点とした脂質代謝フローの検証

Ep-PLA₂欠損による表皮角化細胞の異常は当該脂質シグナルの低下を原因として生じることが想定される。そこで、上記3. 4.のEp-PLA₂欠損マウスの表皮角化細胞の異常が、当該脂質受容体シグナルの賦活化によって正常化するかについて検証した。欠損表皮角化細胞の分化培養系に当該脂質受容体の作動薬を添加したところ、Ep-PLA₂欠損により生じる表皮角化細胞の分化（過分化：ケラチン10の発現亢進）および活性化（2型免疫亢進：IL-33の誘導増強）の異常が野生型細胞が示す応答性と同等まで正常化した。したがって、当該PUFA由来脂質シグナルは表皮角化細胞の適切な分化および過剰な2型免疫応答の抑制に関与することが示唆された。

3. 8. ヒトアトピー性皮膚炎におけるEp-PLA₂の発現

Ep-PLA₂のヒトアトピー性皮膚炎との関連について検討を行った。健常人ならびにアトピー性皮膚炎患者の皮膚検体におけるEp-PLA₂の発現を免疫染色あるいは定量PCRにより解析した。健常人の皮膚において、Ep-PLA₂の染色はマウス皮膚の場合と同様に表皮に強く認められた。一方、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では表皮全体が弱く染色され、これに加え真皮に浸潤した免疫細胞にも陽性所見が認められた。定量解析において、Ep-PLA₂の皮膚における発現は、健常人では発現分布および強度ともに健常人と比べアトピー性皮膚炎では減少した。本酵素の発現強度は、健常人では表皮の厚さと正の相関を示したのに対し、アトピー性皮膚炎患者では表皮の肥厚度（病態の重症度）と逆相関した。

さらに、Ep-PLA₂ mRNAの発現は角層で分解されて天

然保湿因子を生成するフィラグリンあるいは当該脂質受容体の mRNA 発現と正の相関を示した。

したがって、Ep-PLA₂ の皮膚における発現は皮膚バリアと連関すること、ならびにアトピー性皮膚炎の発症進展に伴い減少することが明らかとなり、Ep-PLA₂ 欠損マウスの結果と合致した。

4. 考 察

Ep-PLA₂ は表皮顆粒層において表皮角化細胞から分泌され、PUFAs ならびにそれら由来の脂質メディエーターを動員することにより、皮膚バリアの恒常性の維持に重要な役割を担うことが明らかとなった (図)。この Ep-PLA₂ を起点とする脂質代謝に不全が生じると、顆粒層の表皮バリアが損なわれ、環境因子の曝露に対して過剰な 2 型免疫応答が生じることによってアレルギー病態が慢性化し、アトピー性皮膚炎へと遷延化するものと考えられる。本研究の結果から、Ep-PLA₂ の下流で動員される脂質経路を賦活化する戦略は、皮膚バリアを向上させることでアトピー性皮膚炎を予防するのに役立つことが期待される。また、Ep-PLA₂ の発現は皮膚の健康状態の診断マーカーあるいはアトピー性皮膚炎の病態バイオマーカーとなり得る。

角質細胞間脂質のひとつである脂肪酸の皮膚における役割においては、リノール酸が皮膚バリア機能に必須なアシルセラミドに構成要素として取り込まれる必要があり、こ

の欠乏は重篤な皮膚バリア異常をもたらすことが広く知られてきた⁶⁾。また、リノール酸はさらに不飽和化・伸長化を受け、アラキドン酸や ω 3 脂肪酸などの PUFAs に代謝され、生体膜に取り込まれる。しかしながら、一旦リン脂質に取り込まれた PUFAs が皮膚局所環境のいつ、どこで、いかなる経路を通じてどのような機能性脂質に変換され、皮膚の恒常性または変容機構の調節にどのように関わるのかについては定見が得られていなかった。これまでに、免疫応答との関連を中心にこれらの PUFA 由来脂質メディエーターの機能が解析されてきたが、表皮角化細胞における役割については未解明な点が多い。最近、アラキドン酸代謝物である 12-HHT が表皮角化細胞の遊走制御を通じて皮膚恒常性に関与することが報告され⁷⁾、改めて非セラミド脂質による表皮角化細胞の調節に関心が向けられているが、本研究で見出した機能性脂質の受容体の欠損による皮膚バリア機能の異常は 12-HHT の欠損と比べてはるかに顕著である。総じて本研究は、皮膚恒常性の調節に関わる新しい PLA₂ 依存的脂質メディエーター経路を明らかにしたものである。今後は、Ep-PLA₂ が始動する脂質経路の異常による皮膚バリアの破綻からアトピー性皮膚炎、さらには肺における喘息など遠隔組織へとアレルギーが伝播するプロセスをさらに解明し、「皮膚の新規脂質経路によるアレルギーマーチの統制」に関する論文としてまとめた

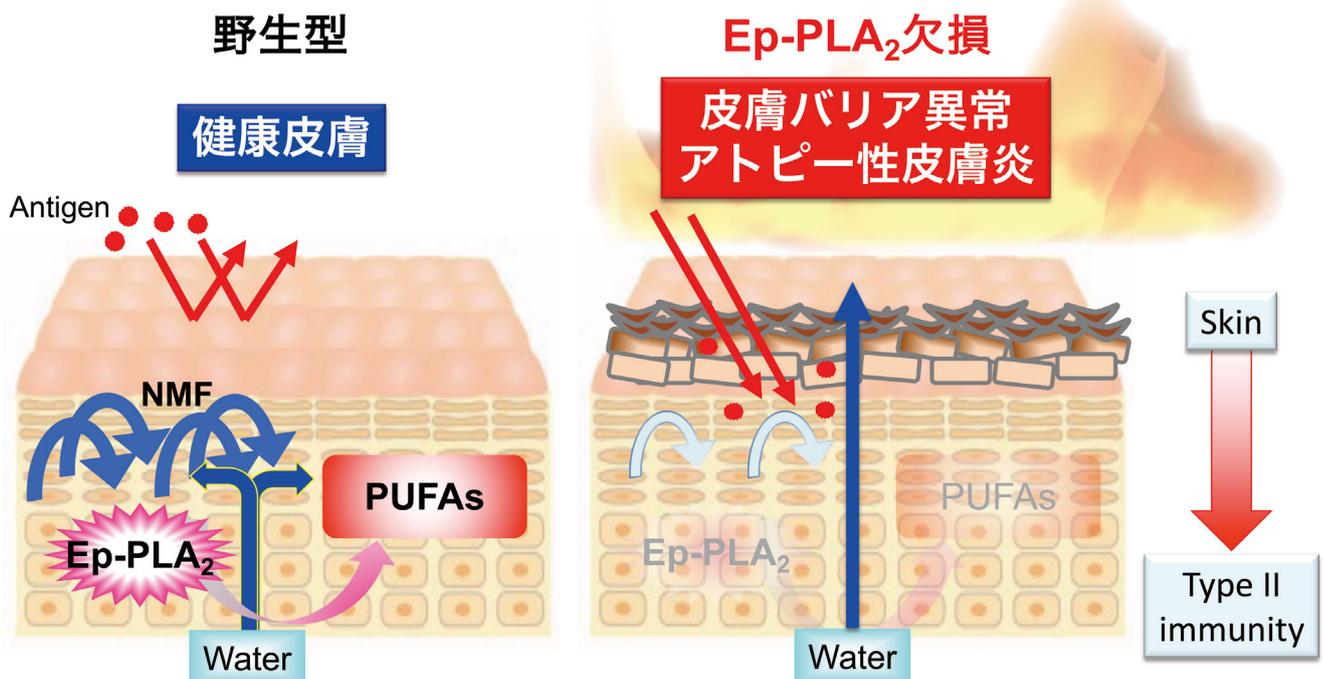


図 Ep-PLA₂ は表皮バリアの恒常性を維持することによりアトピー性皮膚炎を抑制する

(引用文)

- 1) Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J. M., Hara, S., Gelb, M. H., Murakami, M. Lymphoid tissue phospholipase A₂ group IID resolves contact hypersensitivity by driving anti-inflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.* 210, 1217-1234 (2013).
- 2) Miki, Y., Kidoguchi, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Gelb, M. H., Yamamoto, K., Murakami, M. Dual roles of group IID phospholipase A₂ in inflammation and cancer. *J. Biol. Chem.* 291, 15588-15601 (2016).
- 3) Yamamoto, K., Miki, Y., Satao, H., Nishito, Y., Gelb, M. H., Taketomi, Y., Murakami, M. Expression and function of group IIE phospholipase A₂ in mouse skin. *J. Biol. Chem.* 291, 15602-15613 (2016).
- 4) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Nishito, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., Kambe, N., Kabashima, K., Lambeau, G., Gelb, M. H., Murakami, M. The role of group IIF secreted phospholipase A₂ in epidermal homeostasis and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 212, 1901-1919 (2015).
- 5) Hirabayashi, T., Anjo, T., Kaneko, A., Senoo, Y., Shibata, A., Takama, H., Yokoyama, K., Nishito, Y., Ono, T., Taya, C., Muramatsu, K., Fukami, K., Munoz-Garcia, A., Rrash, A. R., Ikeda, K., Arita, M., Akiyama, M., Murakami, M. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat. Commun.* 8, 14609 (2017).
- 6) Melton, J. L., Wertz, P. W., Swartzendruber D. C., Downing, D. T. Effects of essential fatty acid deficiency on epidermal O-acyl-sphingolipids and transepidermal water loss in young pigs. *Biochim. Biophys. Acta.* 921, 191-197 (1987).
- 7) Liu, M., Saeki, K., Matsunobu, T., Okuno, T., Koga, T., Sugimoto, Y., Nakamizo, S., Yokoyama, C., Kabashima, K., Narumiya, S., Shimizu, T., Yokomizo, T. 12-Hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J. Exp. Med.* 211, 1063-1078 (2014).