

プラズマローゲン型リゾリン脂質代謝系を基軸とした皮膚の恒常性と疾患調節の作用機序の解明

徳島大学大学院社会産業理工学研究部 (生物資源産業学域)

山本 圭

Epidermal lipids play important roles in skin homeostasis and diseases. We herein report that lysoplasmalogen (P-LPE), preferentially produced by group IIF secreted phospholipase A₂ (sPLA₂-IIF; an “epidermal sPLA₂”) that is expressed in the suprabasal epidermis, promotes epidermal hyperplasia. In both mice and humans, the expression of sPLA₂-IIF is increased in inflamed skin in correlation with that of several inflammatory markers such as *S100A9* and TNF. *Pla2g2f*^{-/-} mice had a fragile stratum corneum and were strikingly protected against psoriasis, atopic dermatitis. Conversely, global and keratinocyte-specific *Pla2g2f*-transgenic mice developed psoriasis-like epidermal hyperplasia spontaneously. Primary keratinocytes from *Pla2g2f*^{-/-} mice showed defective differentiation and activation. sPLA₂-IIF was induced by calcium or Th17 cytokines (IL-17A and IL-22) in keratinocytes and preferentially hydrolyzed ethanolamine plasmalogen secreted from keratinocytes to give rise to P-LPE. Treatment with P-LPE restored defective activation of *Pla2g2f*^{-/-} keratinocytes both *in vitro* and *in vivo*, while forcible degradation of P-LPE by topical application of recombinant lysophospholipase D from *Thermocrispum*, a lysoplasmalogen-specific hydrolase, prevented psoriasis and atopic dermatitis by in wild-type skin. Moreover, P-LPE markedly facilitated upward proliferation and differentiation of human primary keratinocytes in three-dimensional culture. Diagnostically, the increase of several P-LPE species, but not other lysophospholipids, was readily detectable in the tape-stripped stratum corneum obtained from psoriatic and atopic skins. Overall, our results highlight P-LPE as a previously unrecognized bioactive lysophospholipid and point to the sPLA₂-IIF/P-LPE axis as a novel drug or biomarker target for psoriasis and atopic dermatitis and possibly other epidermal-hyperplastic diseases.

1. 緒言

皮膚、とりわけ表皮は体内の生命環境と非生命環境との間の境界バリアの役目を持ち、体内からの水分の蒸発、体液の漏出あるいは病原体などの侵入から体を守っている。表皮角質層は表皮角化細胞(ケラチノサイト)の周囲をセラミドやコレステロールからなる角質細胞間脂質により満たされているために物理的・化学的刺激に対して非常に安定であり、また脂肪酸などにより表皮は酸性に保たれている。しかし、一旦ケラチノサイトの分化および増殖のサイクルが壊れると皮膚のバリアが乱れ、魚鱗癬などの重篤な角質不全疾患を呈する他に、乾癬やアトピー性皮膚炎などの慢性炎症性皮膚疾患につながり、その克服が望まれている。

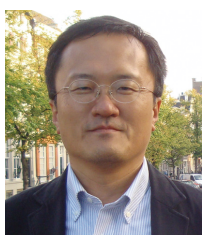
栄養素として摂取された脂肪酸はグリセロール骨格に結合した形でリン脂質や中性脂肪に蓄えられ、必要時に脂質分解酵素群によって遊離される。我々は、リン脂質分解酵素の一群であるホスホリパーゼA₂(PLA₂)群の網羅的欠損マウスの表現型解析に脂質質量分析(リポドミクス)を用いることで、各PLA₂により動員される疾患固有の脂質代謝とその生物学的意義を解明してきた^{1,2)}。その中

で、表皮角化細胞の間隙に分泌される表皮リン脂質代謝酵素(sPLA₂-IIF)が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(リゾプラズマローゲン:P-LPE)を生じ、このP-LPEが表皮角化細胞の分化に寄与すること、さらに表皮肥厚性疾患を惹起する新規リゾリン脂質であることを報告した³⁾(図1)。しかし表皮におけるP-LPEの機能については未だ未解明な部分が多い。そこで本研究ではP-LPEの分子メカニズムを詳細に解析することを目的とした。

2. 方法

2.1. ヒト表皮角化初代培養細胞

実験には不死化ヒト表皮角化細胞株 NHEK/SVTERT3-5 (Evercyte)を用いた。細胞の継代は正常ヒト表皮角化細胞増殖用培地 HuMedia-KG2 (クラボウ)を用いて 37℃、7% CO₂ 条件下でおこなった。三次元培養は、角化細胞分化専用培地 CnT-PR-3D:CnT-Prime 3D Barrier (CELLnTEC) に懸濁した細胞を 2.0 × 10⁵ cells/well になるように 24 well セルカルチャーインサートに播種し、翌日、セルカルチャーインサート内の培地を除去した後、気相培養をおこなった。siRNA による抑制実験では、三次元化する前日に Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo) を用いて siRNA を導入した細胞を用いた。三次元培養開始から 3 日後、終濃度 10 ng/mL の TNF-α、IL-1β、IL-22、IL-17A、IL-17F、IL-6 (PEPROTECH)、あるいは 10 nM P-LPE を加え、48 時間培養した。



Elucidation of mechanism of skin homeostasis and disease regulation by plasmalogen-type lysophospholipid pathway

Kei Yamamoto

Division of Bioscience and Bioindustry, Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

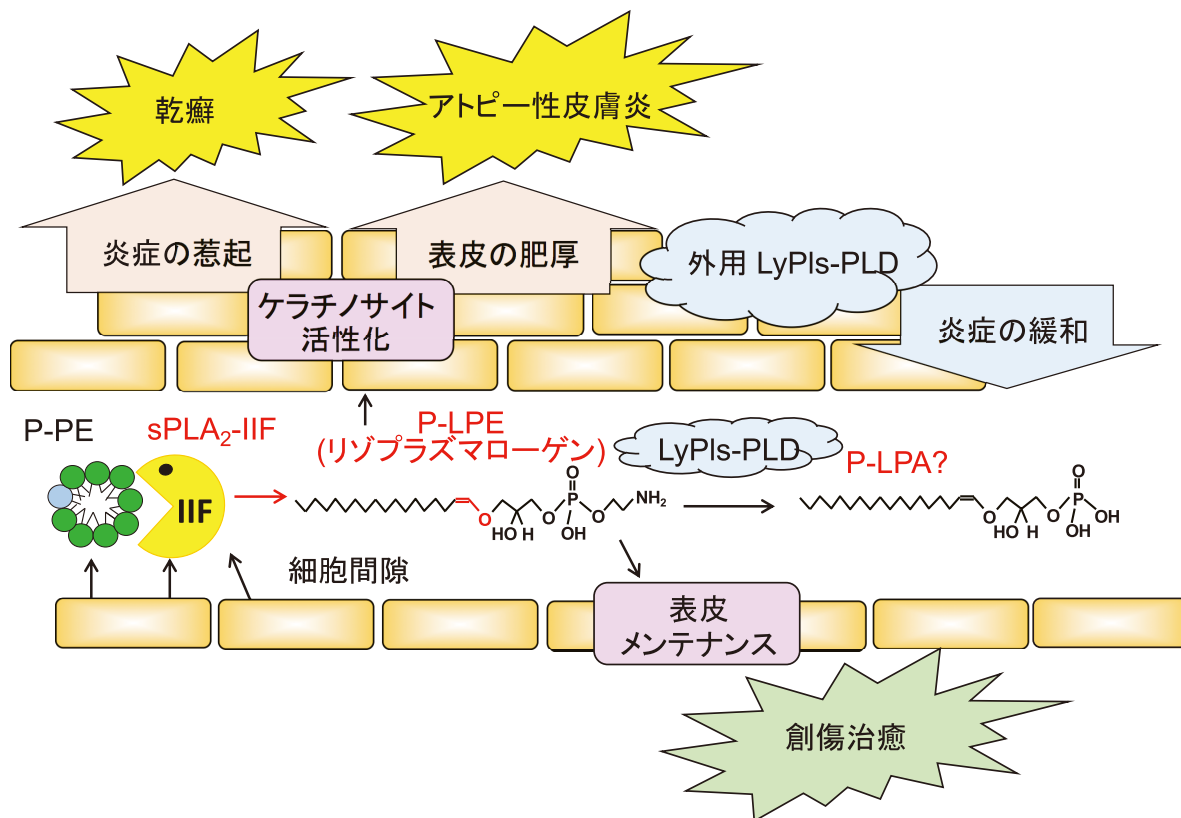


図1 sPLA₂-IIF/p-LPE 経路は皮膚バリアを構築するマスターレギュレーターである

2.2. 創傷治癒モデル

実験にはC57BL/6背景の野生型マウスおよびsPLA₂-IIF 遺伝子欠損マウス³⁾を使用した。バリカンを用いてマウス背部の体毛を剃り、露出させた皮膚に5mm生検トレパンを用いて穿孔し、経時的に穿孔径を測定した。また、sPLA₂-IIF 遺伝子欠損マウスの患部に10nM P-LPE (5% エタノール/生理食塩水) を添加し、遺伝子欠損による表現型の回復を評価した。

2.3. 乾癬モデル

Balb/c背景の野生型マウスおよびsPLA₂-IIF 遺伝子欠損マウス³⁾の耳介に5% イミキモド (ベセルナクリーム、持田製薬) を5日間連続して塗布して乾癬モデルを作成した。阻害剤およびリゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼD (LyPls-PLD)⁴⁾ は後述に従って塗布した。耳介厚の測定を行うとともに、回収した耳介からmRNAを抽出し定量的PCR法を用いてsPLA₂-IIFならびに乾癬に関わる遺伝子を測定して評価した。

2.4. アトピー性皮膚炎モデル

Balb/c背景の野生型マウスおよびsPLA₂-IIF 遺伝子欠損マウス³⁾の耳介に80nM カルシポトリオール (MC903、Cayman) を連続3日間かつ3週繰り返して塗布し、4週目

に再びカルシポトリオールを塗布して翌日に解析した。阻害剤およびLyPls-PLD⁴⁾ は後述に従って塗布した。ビデオカメラを用いて30分間マウスを撮影し、前肢および後肢による耳介の搔痒回数を測定した。耳介厚の測定および回収した耳介からmRNAを抽出し定量的PCR法を用いてsPLA₂-IIFならびにアトピー性皮膚炎に関わる遺伝子を測定して評価した。

2.5. 角質脂質を用いたリポドミクス解析

マウス耳介から1検体につきテープ約0.7cm × 0.7cm、5枚分の角質を採取した。ヒトの場合は健常者、アトピー性皮膚炎患者、乾癬皮膚炎患者から1検体につきテープ約2.5cm × 6cm、5枚分の角質を採取した。裁断したテープから総脂質を抽出し、質量分析装置 (4000QTrap, Sciex) を用いて分析した³⁾。内部標準としてd7-LPE (18:1)、d5-EPAを用い、各測定値はサンプルの総蛋白量を用いて補正した。

3. 結果

3.1. ヒト表皮角化初代培養細胞におけるsPLA₂-IIF/P-LPE経路の役割

表皮角化細胞株NHEK/SVTERT3-5を高密度の濃度でトランスウェルに播種し、三次元化専用培地のCnT-PR-

3Dを用いて、気相培養をおこなった。その結果、細胞の著しい三次元化の亢進および分化マーカー *KRT1* の誘導が認められるものの基底層の *KRT14* の発現には変化はなく、細胞の三次元化が適切におこなわれていることが示された。この条件下において *sPLA₂-IIF* の発現は細胞の三次元化に伴って増加した。表皮細胞の *PLA2G2F* をノックダウンすると細胞の三次元増殖および分化マーカー *KRT1* の発現増加が抑制されたが、*KRT14* の発現には影響がなかった。さらに、三次元化した表皮角化細胞に Th17 応答性のサイトカインを含む 6 種類のサイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-22, IL-17A, IL-17F, IL-6; 各 10ng/mL) を添加して乾癬を誘導させると、細胞活性化マーカー *SI00A9* とともに *sPLA₂-IIF* の発現が著しく増加した。この *SI00A9* の発現増加は *PLA2G2F* のノックダウンにより抑制された。一方、乾癬は JAK/STAT3 経路を介して惹起されることが知られている。本実験モデルにおいてサイトカイン添加による STAT3 リン酸化の亢進は *PLA2G2F* のノックダウンにより消失した。さらに *sPLA₂-IIF* ノックダウン細胞に P-LPE を添加すると細胞活性化マーカー *SI00A9* の発現が増加し、ノックダウンによる影響をレスキューした。以上の結果から、*sPLA₂-IIF/P-LPE* 経路は表皮角化細胞の活性化に寄与することが示された。

3.2. 創傷治癒における *sPLA₂-IIF/P-LPE* 経路の役割

sPLA₂-IIF/P-LPE 経路はケラチノサイトを活性化し、皮膚バリアの形成に寄与する重要な役割をもつことが示唆されていることから、皮膚創傷治癒に関与することが想定される。バリカンを用いてマウス背部の毛を剃り、背部皮膚に 5mm の生検パンチで円形の創傷を作成し経時的に観察した。創傷面積の測定を行い創傷閉鎖の動態を元の創傷面積に対する割合として評価した。その結果、野生型マウスの創傷部は経時的に改善され創傷から 3 日目にそのほとんどが閉じたが、*sPLA₂-IIF* 遺伝子欠損マウスの創傷閉鎖速度は野生型マウスと比較して有意に遅延した。さらに *sPLA₂-IIF* 遺伝子欠損マウスの創傷部に 10nM P-LPE を塗布すると創傷閉鎖の遅延が有意に回復した。以上の結果から、*sPLA₂-IIF/P-LPE* 経路はケラチノサイトの分化に寄与し創傷治癒を促進することが明らかとなった。

3.3. 乾癬における *sPLA₂-IIF/P-LPE* 経路の役割

乾癬は Th17 応答を介する表皮肥厚性疾患であり、表皮角化細胞の異常増殖と異常角化や毛細管の拡張、T 細胞や好中球などの浸潤を特徴とする。マウスの皮膚にイミキモドを連続塗布することによりヒト乾癬と類似した皮膚炎が誘導される。乾癬モデルを *sPLA₂-IIF* 欠損マウスに施行すると、野生型と比較して表皮の肥厚およびケラチノサイ

トの活性化が抑制され、病態が有意に改善した³⁾。*sPLA₂-IIF* は乾癬の表皮肥厚部に発現していることから、*sPLA₂-IIF* の酵素反応産物である P-LPE は表皮角質に局在することが想定される。そこで、Balb/c マウスの耳介にイミキモドを塗布し、塗布 5 日目の表皮角質のリビドミクス解析をおこなった。その結果、P-LPE 群がイミキモドを塗布した表皮角質で増加し、そのうち LPE (P-18:0) は 7.0pmol/cm² であった。さらに *sPLA₂-IIF* 欠損マウスの角質では野生型で増加した P-LPE 群は有意に低下した。以上の結果から、P-LPE が表皮角質層に局在し病態に応じた変化が認められたことから、P-LPE は乾癬のバイオマーカーとして期待できることが示唆された。

リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D (LyPls-PLD) は P-LPE を特異的に分解しプラズマローゲン型リゾホスファチジン酸 (P-LPA) を産生する放線菌由来の酵素である⁴⁾。精製した組換え LyPls-PLD を乾癬を惹起させたマウス耳介に外用塗布すると P-LPE の低下を伴って、表皮の肥厚および炎症マーカー TNF の発現が低下した。この低下のレベルはデキサメサゾンによる表皮の肥厚抑制と同程度であった。すなわち *sPLA₂-IIF/P-LPE* 経路は乾癬に寄与すること、この経路はデキサメサゾンに代わる新規創薬ターゲットになる可能性があることが示唆された。

3.4. アトピー性皮膚炎における *sPLA₂-IIF/P-LPE* 経路の役割

アトピー性皮膚炎は、好酸球や Th2 細胞の増多、高 IgE 血症などの症状が認められる表皮肥厚性疾患であり、皮膚の肥厚に加え痒みの特徴で、掻くことによりさらにバリア機能が低下するという悪循環に陥ってしまう。胸腺間質性リンパ球新生因子 (TSLP) はケラチノサイト由来のアトピー性皮膚炎の病態を形成する最も重要なケモカインの一つとして位置付けられ、ビタミン D 受容体アナログのカルシポトリオール (MC903) の反復塗布により TSLP が誘導されアトピー性皮膚炎モデルが成立する。Balb/c マウスにアトピー性皮膚炎モデルを適用すると耳介の肥厚、*Tslp*、*Tnf*、*SI00A9*、*Il31* の発現の亢進とともに、*sPLA₂-IIF* が増加した。野生型マウスの掻痒行動は 30 分あたり 22.8 回であったが、*sPLA₂-IIF* 欠損マウスでは有意に低下し 6.6 回であった。*sPLA₂-IIF* 欠損マウスに P-LPE を塗布すると掻痒行動が有意に増加した。免疫抑制剤のタクロリムス (FK506) を耳介に塗布すると、マウスの掻痒行動が濃度依存的に低下し、0.01% FK506 の塗布で *sPLA₂-IIF* 欠損マウスと同じレベルになった。この結果は、アトピー性皮膚炎のモデルにおいて、*sPLA₂-IIF* の阻害が FK506 の効果と匹敵するほどの抑制効果をもつことを示唆している。上述の LyPls-PLD を MC903 反復塗布アトピー性皮膚炎モデルに塗布すると表皮角質の P-LPE 低下を伴っ

て搔痒行動が有意に低下した。以上の結果から、sPLA₂-IIF/P-LPE経路がアトピー性皮膚炎の搔痒に寄与すること、タクロリムスに代わる新規創薬ターゲットになる可能性があることが示唆された。

3.5. ヒト慢性皮膚炎症疾患におけるsPLA₂-IIF/P-LPE経路の役割

ヒト角質検体を用いてP-LPE量を測定した結果、健康人の角質ではP-LPEが0.84pmol/mg、アトピー性皮膚炎の検体ではP-LPEが3.54pmol/mgの量で検出され、健康人と比較してアトピー性皮膚炎の患者で有意に高値であった。一方、乾癬検体のP-LPEは健康人と比較して若干増加していたが、無疹部と皮疹部には差がなかった。このことは乾癬の病態において無疹部と皮疹部の区別なくP-LPEが増加しており、乾癬の素地がある皮膚ではP-LPEが多いことを示している。この結果は、マウスを用いた実験によって提唱された乾癬およびアトピー性皮膚炎におけるsPLA₂-IIF/P-LPE経路がヒトにも存在することを示唆している。まだ例数が少ないため測定検体を増やす必要があるが、P-LPEが慢性皮膚炎症疾患のバイオマーカーとして、またテープストリッピングを用いたP-LPEの検出法がP-LPEを標的とした軽微侵襲測定法として活用できる可能性がある。

4. 考 察

体表全体を覆う皮膚は、外界からの病原菌、アレルゲン、環境物質の侵入ならびに体内からの水分の蒸散を防ぐ物質透過性バリアを形成するとともに、外界から侵入した異物に対する免疫応答が始まる場でもある⁵⁾。皮膚は他の臓器には見られないユニークな脂質分子を多く含み、また皮膚だけに発現している脂質代謝酵素が多数存在する。このことは、皮膚は新しい機能性脂質を探索するための宝の山であり、脂質を標的とすることで皮膚疾患の新しい診断法の開発や創薬が可能であることを示唆している。

リン脂質代謝酵素のうち、表皮角化細胞に発現している細胞内酵素PNPLA1（カルシウム非依存性ホスホリパーゼA₂の一つ）はアシルセラミドの生合成を通じて角質バリアの形成に必須の役割を担う⁶⁾。体毛に発現する細胞外型ホスファチジン酸ホスホリパーゼA₁α（PA-PLA₁α）は2-アシル型のリゾホスファチジン酸を産生し、リゾホスファチジン酸受容体（LPA6）を介して、体毛の形成に重要な機能をもつ⁷⁾。また体毛に発現するsPLA₂-IIEは高度不飽和脂肪酸をもつリゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）の産生を介して体毛形成に寄与している⁸⁾。一方、リンパ組織の樹状細胞に高発現しているsPLA₂-IIDは、抗炎症性のω3脂肪酸代謝物を構成的に動員することで接触性皮膚炎におけるTh1免疫応答を抑制する⁹⁾。sPLA₂-IIDの

欠損および過剰発現マウスを用いて、本酵素の免疫抑制機能の普遍性について検証するとsPLA₂-IIDはリンパ組織の脂質バランスを構成的に免疫抑制の方向にシフトさせることにより、リンパ節炎症（急性炎症）、接触性皮膚炎（Th1応答）、乾癬（Th17応答）の各炎症病態を改善する。一方で、抗腫瘍免疫を抑制して皮膚癌を促進する。このことは、ω3脂肪酸代謝物動員酵素としてのsPLA₂-IIDの免疫抑制作用は病態に応じて体に良い方向にも悪い方向にも作用し得ることを示唆している¹⁰⁾。ω6脂肪酸のアラキドン酸代謝産物である12(S)-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸（12-HHT）は表皮角化細胞の遊走を制御することで皮膚バリア機能を制御することが報告されている¹¹⁾。

本研究では、sPLA₂-IIFが表皮顆粒層から角質層にかけて分泌され、角質細胞の細胞間隙にP-LPEを動員することにより、皮膚バリアの恒常性維持に重要な役割をもつことを示した。このP-LPEが過剰に産生すると表皮角化細胞が活性化され、Th17応答性の乾癬や環境因子の暴露による過剰なTh2型免疫応答性のアレルギー性皮膚疾患につながる。すなわち角質に局在するsPLA₂-IIF/P-LPE経路は外来からの攻撃を守る役割を担う皮膚バリアを構築するマスターレギュレーターであることが示唆された（図1）。またこのsPLA₂-IIF/P-LPE経路は角質に局在することから、本経路を標的とした軽微侵襲性診断法としての医療応用が期待できる。

このように表皮に局在する脂質代謝酵素は、特徴的な基質特異性ならびに産生されるリゾリン脂質分子種の違いにより、厳密に生命現象を制御している。最近のリピドミクス解析技術の急速な進歩が、これまで想定されなかった未知の脂質代謝経路を紐解き、それぞれの脂質代謝酵素が生体内の異なる局面で固有の脂質代謝を動かし、多彩な生命現象に関与することが明らかになりつつある。今後は、ヒト疾患との関連性を含めて解明することで、新たなバイオマーカーや創薬への展開が期待される。

(引用文献)

- 1) Murakami, M., Yamamoto, K., Miki, Y., Murase, R., Sato, H., and Taketomi, Y. The roles of secreted phospholipase A₂ gene family in immunology. *Adv. Immunol.* 132, 91-134 (2016).
- 2) Murakami, M., Miki, Y., Sato, H., Murase, R., Taketomi, Y., and Yamamoto, K. Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A₂s. *Biochim. Biophys. Acta*, 1864, 6, 803-818 (2019).
- 3) 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., and Murakami, M. The role

- of group IIF secreted phospholipase A₂ in epidermal homeostasis and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 212, 1901-1919 (2015).
- 4) Matsumoto Y, Kashiwabara N, Oyama T, Murayama K, Matsumoto H, Sakasegawa SI, Sugimori D. Molecular cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of lysoplasmalogen-specific phospholipase D from *Thermocrispum* sp. *FEBS Open Bio.* 6, 1113-1130 (2016).
- 5) Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A, Nakajima S, Nomura T, Kaplan DH, Kabashima K. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol.* 19, 1286-1298 (2018).
- 6) PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. Hirabayashi T, Anjo T, Kaneko A, Senoo Y, Shibata A, Takama H, Yokoyama K, Nishito Y, Ono T, Taya C, Muramatsu K, Fukami K, Muñoz-Garcia A, Brash AR, Ikeda K, Arita M, Akiyama M, Murakami M. *Nat Commun.* 8, 14609 (2017).
- 7) Inoue A, Arima N, Ishiguro J, et al. LPA-producing enzyme PA-PLA (1) alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J.* 30, 4248-4260 (2011).
- 8) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) Liu M, Saeki K, Matsunobu T, Okuno T, Koga T, Sugimoto Y, Yokoyama C, Nakamizo S, 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).