

アシル CoA 合成酵素 ACSVL4 による皮膚バリア形成機構

北海道大学大学院薬学研究院

木原 章雄

Acylceramides are lipids that play an essential role in the formation of the permeability barrier in the skin, and the impairment of their synthesis causes the skin disorder ichthyosis. However, the acyl-CoA synthase (ACS) that converts ω -hydroxy fatty acid to ω -hydroxy acyl-CoA in the acylceramide synthesis pathway still remained unidentified. In the present study, we examined the possibility that *ACSVL4* (ACS very long-chain, member 4), which is the causative gene for ichthyosis prematurity syndrome, is the unidentified ACS involved in acylceramide production. *Acsvl4* knockout (KO) mice exhibited neonatal lethality and severe skin barrier defect phenotype. Histological analyses showed hyperkeratosis and abnormal lipid lamellar formation in *Acsvl4* KO mouse epidermis. The amount of acylceramides in *Acsvl4* KO mice was reduced to about 10% of that in wild-type mice. In addition to the role as an ACS, ACSVL4 has been implicated in a fatty acid transporter, and reduced fatty acid uptake has been assumed to be a cause of the ichthyosis pathogenesis. However, the amount of fatty acids and triglycerides were not decreased in the epidermis of *Acsvl4* KO mice. *In vitro* experiments revealed that ACSVL4 indeed exhibits ACS activity toward ω -hydroxy fatty acids. From these results, we conclude that the skin symptom of ichthyosis prematurity syndrome is not caused by decreased fatty acid uptake, but by impaired acylceramide synthesis. Our findings contribute to the elucidation of the molecular mechanism of skin barrier formation and the pathogenesis of hereditary ichthyosis.

1. 緒言

皮膚は強力な透過性バリアを有し、外界からの病原体やアレルゲン、化学物質などの異物の透過を阻止することで、感染症やアレルギーの防止に重要な働きを担っている。また、この皮膚の透過性バリアは体内からの水分の損失も防いでおり、この機能は陸上動物の生命維持に必須である。皮膚の透過性バリアは極めて強力なため、通常皮膚からの感染はほとんど起きない。しかし、火傷により皮膚バリアが損なわれると感染症のリスクは大幅に上昇する。また、先天的に皮膚バリア異常を示す疾患として乾燥、肥厚、鱗屑を主徴とする魚鱗癬がある。アトピー性皮膚炎患者では皮膚バリア機能が低下して、アレルゲンが侵入しやすくなっている。

脂質の高い疎水性は物質の透過を阻むことから、脂質は透過性バリアの形成に適している。実際、表皮の最外層(角質層)には脂質の多層構造体(脂質ラメラ)が存在し、皮膚バリア形成において中心的な役割を果たしている。脂質ラメラは主にセラミド、脂肪酸、コレステロールで構成されている。セラミドは生体膜脂質スフィンゴ脂質の疎水骨格であり、長鎖塩基と脂肪酸の2本の疎水鎖から構成される。表皮にはこの通常のセラミドに加え、皮膚バリア形成に特

化した特殊なセラミドクラス、アシルセラミド(オメガ-O-アシルセラミド)が存在する。アシルセラミドはセラミドの脂肪酸部分(炭素数(C)30-36)のオメガ位にリノール酸が結合した3本鎖構造をもつ(図1)。アシルセラミドの特殊な構造は脂質ラメラを形成し、維持するために重要である。アシルセラミドは皮膚バリア形成に必須であり、アシルセラミド産生に関わる遺伝子の変異はヒトでは魚鱗癬の中でも重症なタイプの魚鱗癬(常染色体潜性先天性魚鱗癬)を引き起こし、マウスでは皮膚バリア異常によって新生致死を引き起こす^{1,2)}。また、ヒトのアトピー性皮膚炎患者ではアシルセラミド量の減少が観察されている³⁾。

アシルセラミドの皮膚バリアにおける重要性にも関わらず、アシルセラミド産生の分子機構が解明され始めたのは最近のことである。アシルセラミド中のC30-36脂肪酸の伸長には脂肪酸伸長酵素ELOVL1およびELOVL4、アミド結合形成にはセラミド合成酵素CERS3、脂肪酸オメガ水酸化にはシトクロームP450の1つであるCYP4F22、リノール酸とのエステル結合形成にはトランスアシラーゼPNPLA1が関わっている^{2,4-6)}。表皮は四層で構成されており、内側から基底層、有棘層、顆粒層、角質層である。ケラチノサイトは基底層で増殖後、分化しながら外側に向



Skin barrier formation by the acyl-CoA synthetase ACSVL4

Akio Kihara

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

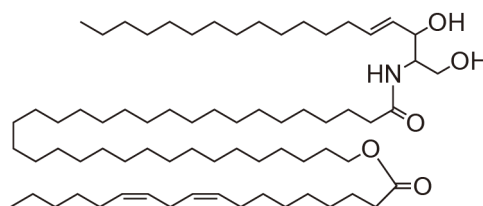


図1 アシルセラミドの構造

けて移動する。有棘層から顆粒層にかけてアシルセラミドは産生される。アシルセラミドはグルコースの付加を受け、アシルグルコシルセラミドへ変換後、層板顆粒内に蓄えられる。アシルグルコシルセラミドはその後顆粒層と角質層の境界部で細胞外へ放出され、グルコースが除去されて再度アシルセラミドとなり、脂質ラメラの構成成分となる。

我々は上述のアシルセラミドのC30-36脂肪酸のオメガ位を水酸化する脂肪酸オメガ水酸化酵素遺伝子 *CYP4F22* を同定した⁵⁾。*CYP4F22*は先天性魚鱗癬の原因遺伝子であり、*CYP4F22* 遺伝子変異をもつ患者ではアシルセラミド量が大きく減少していた。また、我々は *in vitro* における解析から *CYP4F22* の基質が脂肪酸であることを見出した。脂肪酸はアシルCoAの状態では脂肪酸伸長酵素によって伸長される。そのため、脂肪酸伸長酵素によって産生された超長鎖アシルCoAが *CYP4F22* の基質になるためには、一旦CoAが加水分解される必要がある。一方、脂肪酸と長鎖塩基間のアミド結合を形成するセラミド合成酵素の基質はアシルCoAであるため、*CYP4F22* によって産生されたオメガヒドロキシ超長鎖脂肪酸は再度CoA体へ変換される必要がある。しかし、この反応に関与するアシルCoA合成酵素(ACS)は未だ不明なままである。

アシルセラミドの皮膚バリア機能における重要性を考えると、アシルセラミド産生経路上の未同定ACS遺伝子の変異は先天性魚鱗癬を引き起こすと予想される。哺乳類には26種のACSが存在する。その中で *ACSVL4* (別名 *FATP4*, *SLC27A4*) は症候性魚鱗癬である魚鱗癬未熟児症候群の原因遺伝子である⁷⁾。魚鱗癬未熟児症候群は魚鱗癬症状に加えて早産および新生児の呼吸停止を特徴とし、*Acsvl4* KOマウスは無気肺および皮膚バリア異常を伴って新生致死となる⁸⁾。我々はこのヒトとマウスにおける症状/表現型から、*ACSVL4*こそがアシルセラミド産生経路上で働く未同定ACS遺伝子であると考えた。これまで、*ACSVL4* 遺伝子変異が魚鱗癬未熟児症候群の魚鱗癬症状を引き起こすメカニズムは不明であった。*ACSVL4* がアシルセラミド合成へ関与することは考えられたことがなく、*Acsvl4* KOマウスの表皮において通常のセラミドクラスの短鎖化は観察されているものの、アシルセラミドの測定はなされていない。これまでではむしろ、*ACSVL4* の別名である *FATP4* (Fatty acid transporter 4) の名前が示す通り、*ACSVL4* が脂肪酸の取り込みに関与し、その異常が魚鱗癬未熟児症候群の症状を引き起こすという説が有力であった。

本研究では、*ACSVL4* 変異による魚鱗癬未熟児症候群の皮膚症状発症の原因がこれまで提唱されてきた脂肪酸のトランスポート活性低下なのか、我々が新たに提唱したアシルセラミド産生不全によるものかを明らかにするために *Acsvl4* KOマウスの解析を行った。

2. 方法

2.1. マウスの作製と飼育

本実験ではC57BL/6JマウスおよびCRISPR/Cas9システムを用いて作成した *Acsvl4* KOマウスを使用した。マウスの飼育は、室温23±1℃、湿度50±5%、明/暗12時間サイクルに維持された飼育室において、摂餌は自由に摂取できる条件下で行った。

2.2. 皮膚透過性バリアアッセイ

経皮水分蒸散量(TEWL)は経皮水分蒸散量測定器VAPO SCAN (Asch Japan)を用いて胎生18.5日(E18.5)のマウスの背中に密着させることで測定した。トルイジンブルー染色はE18.5マウスをメタノールに5分間浸し、PBSで洗浄後、0.1%トルイジンブルーPBS溶液に4℃で2時間浸すことで行った。

2.3. 形態学的解析

E18.5マウスから採取した皮膚を3.7%ホルムアルデヒドで固定し、アルコールで脱水後、パラフィンに包埋した。マイクロトームで厚さ4μmのホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、Tissye-Tek DRS 2000 (Sakura Torrance)を用いてヘマトキシリン/エオジン(H/E)染色を行った。

2.4. プラスミド

N末端に3×FLAGタグを融合したタンパク質を発現させる哺乳類発現用ベクター pCE-puro 3×FLAG-1の *Bam*HI-*Not*I 切断部位へ *ACSVL4* 遺伝子を導入し、pCE-puro 3×FLAG-*ACSVL4* を作製した。

2.5. 脂質解析

脂質の解析は液体クロマトグラフィー(LC)連結タンデム質量分析(MS/MS)によって行った。LCには逆相カラム(AQUITY UPLC CSH C18 column: 粒径1.7μm, 内径2.1mm, 長さ100mm; Waters)を用いた。カラム温度は55℃に設定し、イオン化はエレクトロスプレーイオン化法を用い、三連四重極型質量分析計(Xevo TQ-S; Waters)を用いて検出した。各脂質分子種は、多重反応モニタリング(MRM)モードで分子種ごとに特異的な親イオン(Q1)、娘イオン(Q3)の質量電荷比、コリジョンエネルギーを設定し、ポジティブイオンモードで検出した。データの解析にはMassLynx software (Waters)を使用し、定量は内部標準との割合を計算して行った。

2.6. *In vitro*アシルCoA合成アッセイ

HEK 293T細胞にpCE-puro 3×FLAG-1(ベクター)またはpCE-puro 3×FLAG-*ACSVL4*をトランスフェクシ

ョンして24時間後、膜画分を回収した。酵素反応は膜画分(20 μ g)に基質である脂肪酸(1 μ M リグノセリン酸, 1 μ M ネルボン酸, または30-ヒドロキシトリアコンタン酸)と0.5mM CoAを加えて、インキュベート(37 $^{\circ}$ C, 1時間)することで行った。生成されたアシルCoAはLC-MSMSで解析した。

3. 結果

3.1. *Acsvl4* KOマウスにおける皮膚バリア機能と表皮形態の異常

Acsvl4 KOマウスは、野生型(WT)マウスに比べて皮膚にしわが少なく張っており、新生致死であった。E18.5日に帝王切開により得られたマウスの生存率を経時的に調べたところ、KOマウスは摘出後2時間以内に全て死亡した。親元から離してミルクが飲めないこの条件ではWTマウスは摘出後22時間まで生存していた。このように、*Acsvl4* KOマウスは出生後極めて短時間で死亡することが明らかとなった。帝王切開によって得られたE18.5のKOマウスはWTに比べて体重が軽く、体内から体外への皮膚透過性バリア機能の指標であるTEWLはWTマウスの4.4倍高い値を示した(図2A)。次にトルイジンブルー染色により体外から体内への皮膚透過性バリア機能を調べたところ、WTマウスでは色素の浸透は見られなかったのに対し、KOマウスでは強い色素の浸透が見られた(図2B)。これらの結果から、*Acsvl4* KOマウスでは皮膚バリア機能が低下していることが確認された。

次に*Acsvl4* KOマウスの表皮の形態学的な変化を調べるため、H/E染色を行った。WTマウスの角質層では、脂質ラメラの存在を示す角質細胞間の空隙が観察され、10層未満の角質層が存在していた(図3)。一方、KOマウスでは角質層の数の増加が観察され、角質細胞間の空隙は不明瞭であった。このことは、過角化と脂質ラメラ形成不全を示していた。また、KOマウスでは有棘層が顕著に肥厚していた。

3.2. *Acsvl4* KOマウス表皮におけるアシルセラミド量の低下

*Acsvl4*のアシルセラミド産生への関与を調べるために、マウス表皮中のアシルセラミド量をLC-MS/MSによって解析した。*Acsvl4* KOマウスではすべてのアシルセラミド分子種がWTマウスに比べて減少しており、総量では約9.8%にまで低下していた(図4A)。飽和と一価不飽和のアシルセラミドは共に同程度減少していた(飽和, 7.4%; 一価不飽和, 11%)。次にアシルグルコシルセラミドを測定したところ、*Acsvl4* KOマウス中の総アシルグルコシルセラミド量は野生型マウスの約37%であった(図4B)。特に飽和タイプではアシルセラミドと同様にKOマウスで

大きく減少しており、野生型マウスの9.1%であった。一方、一価不飽和タイプではアシルセラミドの時とは異なってKOマウス中での減少が小さく、合計量は野生型マウスの46%であった。以上のことから、ACSVL4がアシルセラミド合成に関与することが明らかとなった。

3.3. *Acsvl4*遺伝子欠損は表皮への脂肪酸の取り込みを低下させない

脂肪酸の組成をLC-MS/MSによって解析したところ、*Acsvl4* KOマウスではC24以下の鎖長の殆どの脂肪酸の量がWTマウスに比べて増加していた(図5A)。一方、C26以上の飽和脂肪酸の量は差が見られず、一価不飽和脂肪酸では増加していた。脂肪酸総量では*Acsvl4* KOマウスではWTマウスに比べて約2.1倍増加していた。これまで、ACSVL4の脂肪酸トランスポーターとしての機能が想定されてきたが、*Acsvl4* KOマウスでの脂肪酸量の増加はこの可能性を否定した。アシルセラミドの構成要素であるリノール酸(C18:2)は、哺乳類の生体内では合成できない必須脂肪酸であるため、表皮の細胞は外部から取り込む必要がある。リノール酸の量に関しても*Acsvl4* KOマウス表皮中で増加していた。

アシルセラミド中のリノール酸はトリグリセリドに由来し、トランスアシラーゼPNPLA1がトリグリセリド中のリノール酸をオメガ水酸化セラミドに転移する⁶⁾。*Acsvl4* KOマウスの表皮におけるリノール酸含有トリグリセリド量を調べた結果、いずれの分子種もWTマウスよりも増加していた(図5B)。これらの結果は*Acsvl4* KOマウスにおける皮膚バリア形成不全とアシルセラミド量の減少がリノール酸の取り込み異常に起因するのではないことを示している。

3.4. ACSVL4はオメガ水酸化脂肪酸に対してACS活性を示す

ACSVL4はアシルセラミド合成経路上でオメガ水酸化脂肪酸をオメガ水酸化アシルCoAへ変換させるACSであると考えられる。これまで、ACSVL4は長鎖から極長鎖の非水酸化脂肪酸に対して活性を示すことは報告されているが、アシルセラミドに使用されるオメガ水酸化超長鎖脂肪酸に活性があるかは調べられていない。そこで、本実験ではヒトACSVL4のオメガ水酸化C30脂肪酸に対するACS活性を、ACSVL4を過剰発現させたHEK 293T細胞の膜画分を用いた*in vitro*の実験によって調べた。その結果、コントロールに比べ、ACSVL4過剰発現によってオメガ水酸化C30:0脂肪酸に対するACS活性は9.8倍増加した(図6)。また、ACSVL4過剰発現により、C24:0脂肪酸へのACS活性は6.6倍、C24:1脂肪酸へのACS活性は3.6倍増加した。これらの結果からACSVL4は、アシル

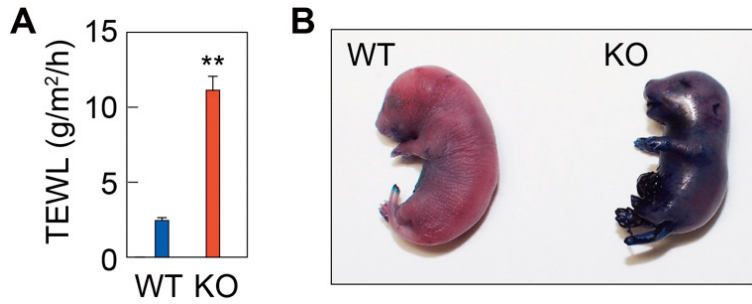


図2 *Acsvl4* KOマウスにおける皮膚バリア異常
 A. TEWLの測定 (n=4; Student's t-test; **P<0.01)。
 B. トルイジンブルー染色。

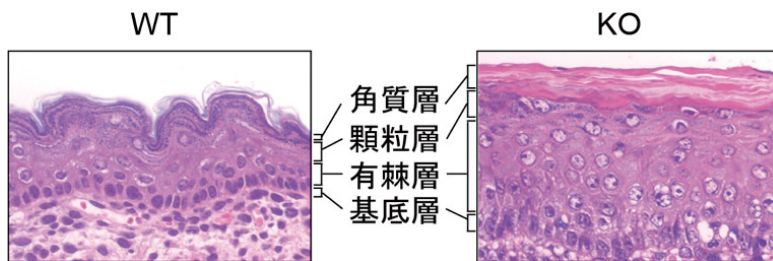


図3 *Acsvl4* KOマウスにおける過角化と脂質ラメラ形成不全

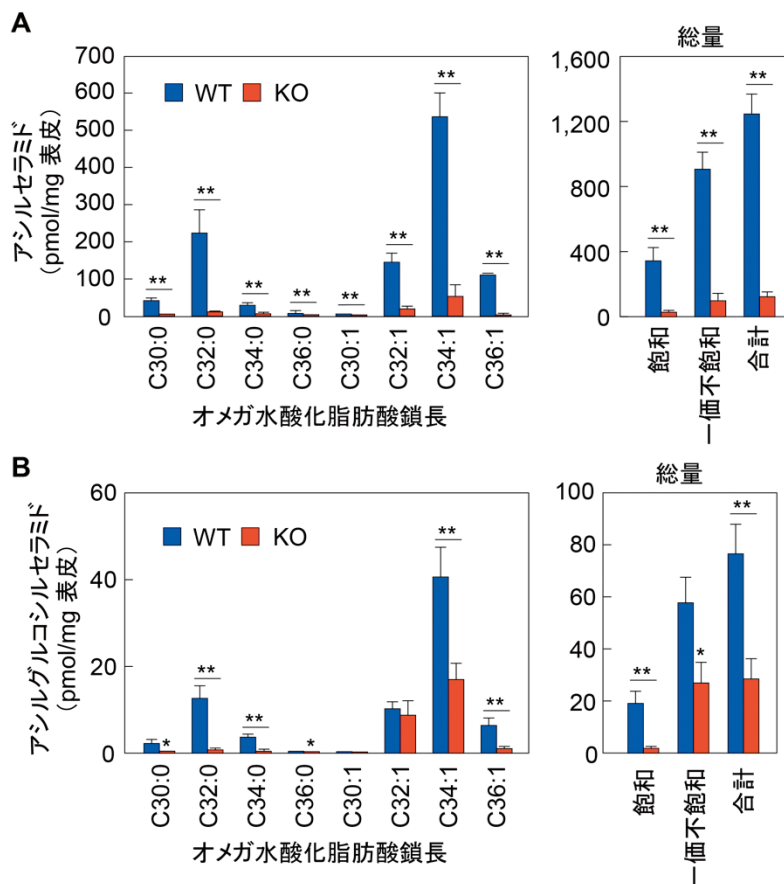


図4 セラミド組成

A. アシルセラミド量, B. アシルグルコシルセラミド量 (n=3; Student's t-test; *P<0.05, **P<0.01)。

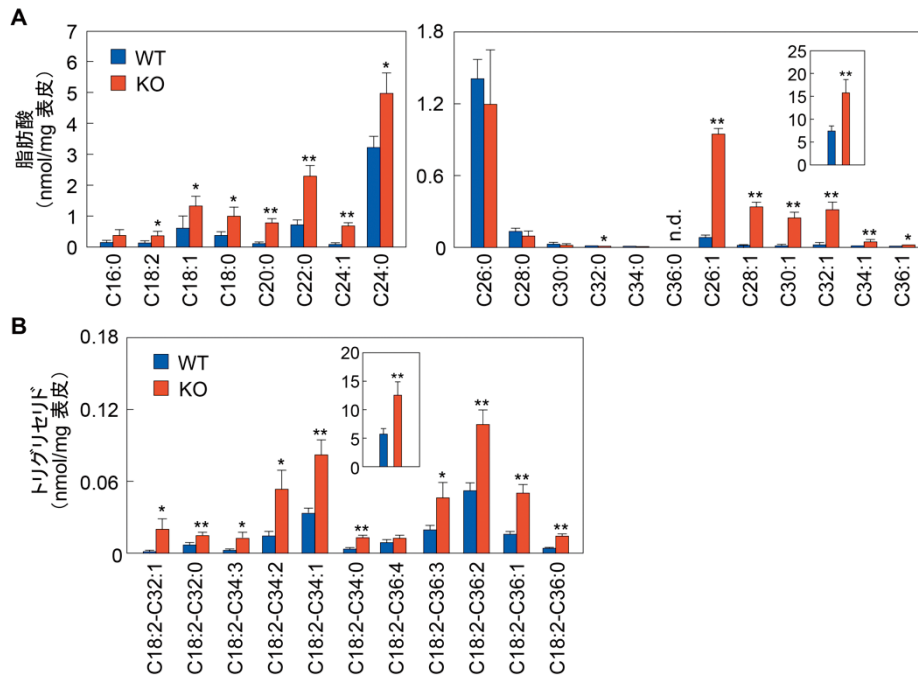


図5 脂肪酸とトリグリセリド量

A. 脂肪酸量, B. トリグリセリド量 (挿入は総量; n = 3; Student's t-test; *P<0.05, **P<0.01)。

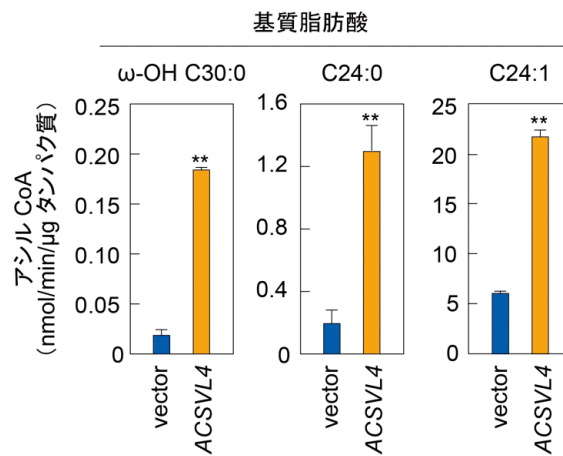


図6 アシルCoA合成酵素活性

セラミド合成に必要なオメガ水酸化アシルCoAの合成活性を示すことが明らかになった。また、ACSVL4は非水酸化/オメガ水酸化に関わらず、長鎖から超長鎖に至るまでの幅広い脂肪酸に対して活性を示すことも示された。

4. 考察

アシルセラミドは皮膚透過性バリア形成に必須な脂質分子であり、その産生異常はヒトにおいては魚鱗癬、マウスにおいては新生致死を引き起こす。しかし、アシルセラミドの産生に関わる遺伝子の全ては明らかになっていない。アシルセラミド産生経路にはC30-C36アシルCoAがチオ

エステラーゼによるC30-C36脂肪酸への変換、脂肪酸オメガ水酸化酵素CYP4F22によるオメガ水酸化脂肪酸への変換、ACSによるオメガ水酸化アシルCoAへの変換ステップが含まれる。これらのうち、チオエステラーゼとACSは未同定であった。本研究ではアシルセラミド合成に関わるACSとしてACSVL4を同定した。

Acsvl4 KOマウスは15年以上前に作成され、激しい皮膚バリア異常を示すことが報告されたが、その原因は不明なままであった⁸⁾。これまではACSVL4/FATP4の脂肪酸トランスポーター活性の低下が皮膚バリア異常の原因であるという説が有力であった。近年、多くのアシルセラミ

ド関連遺伝子の同定が同定され、そのKOマウスが作成された。それらのKOマウスで観察された激しい皮膚バリア異常は、*Acsvl4* KOマウスで見られるものと極めて類似していた。そこで我々は*Acsvl4* KOマウス／魚鱗癬未熟児症候群で見られる魚鱗癬症状はアシルセラミド合成低下に起因すると考え、実際本研究においてこのことを実証した。*Acsvl4* KOマウスの表皮ではリノール酸を含む多くの脂肪酸およびリノール酸含有トリグリセリドの量は低下しておらず、むしろ増加していた。これらの結果から*Acsvl4* 遺伝子欠損による脂肪酸の取り込み低下が皮膚バリア異常を引き起こされるという説は否定された。

5. 総括

本研究によって、アシルセラミド産生経路のうちのミッシングリンクの1つを解明した。また、魚鱗癬未熟児症候群の原因がこれまで想定されていた脂肪酸の取り込み低下ではなく、アシルセラミド産生不全であることが明らかとなった。我々の発見は魚鱗癬未熟児症候群の皮膚症状発症の機構を解明しただけではなく、皮膚バリア形成の分子機構の解明に寄与した。

(本研究助成により得られた成果)

・ Yamamoto H, Hattori M, Chamulitrat W, Ohno Y, Kihara A. Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene *FATP4* through formation of the barrier lipid ω -*O*-acylceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 2914-2922 (2020).

(引用文献)

1) Akiyama M, Shimizu H. An update on molecular aspects of the non-syndromic ichthyoses. *Exp. Dermatol.*, **17**, 373-382 (2008).
 2) Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.*, **63**, 50-69 (2016).

3) Ishikawa J, Narita H, Kondo N, Hotta M, Takagi Y, Masukawa Y, Kitahara T, Takema Y, Koyano S, Yamazaki S, Hatamochi A. Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 2511-2514 (2010).
 4) Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S, Kihara A. Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *Elovl1*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2787-2796 (2013).
 5) Ohno Y, Nakamichi S, Ohkuni A, Kamiyama N, Naoe A, Tsujimura H, Yokose U, Sugiura K, Ishikawa J, Akiyama M, Kihara A. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, 7707-7712 (2015).
 6) Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid ω -*O*-acylceramide. *Nat. Commun.*, **8**, 14610 (2017).
 7) Klar J, Schweiger M, Zimmerman R, Zechner R, Li H, Törma H, Vahlquist A, Bouadjar B, Dahl N, Fischer J. Mutations in the fatty acid transport protein 4 gene cause the ichthyosis prematurity syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 248-253 (2009).
 8) Herrmann T, van der Hoeven F, Gröne 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 (*Fatp4*, *Slc27a4*) gene show features of lethal restrictive dermopathy. *J. Cell Biol.*, **161**, 1105-1115 (2003).