

# ヒト特有の表皮セラミド合成経路および生理機能の解明

北海道大学大学院薬学研究院

大野 祐介

The stratum corneum, which constitutes the outermost layer of the epidermis, consists of corneocytes and lipid lamellae. The lipid lamellae, comprising a multi-layered lipid structure, are important for the skin permeability barrier that protects against the invasion of pathogens and foreign substances and prevents water loss through the skin. Ceramides account for approximately 50% of the lipid lamellae (by weight) and play a pivotal role in the skin permeability barrier function. In contrast to most tissue, a variety of ceramides exist in the stratum corneum. Ceramides containing a 6-hydroxy long-chain base (H-ceramides) are unique to the human stratum corneum and are the predominant ceramides. However, the biosynthetic pathway and physiological function of H-ceramides remain unclear.

In this study, we demonstrated that H-ceramide production increases in a keratinocyte-differentiation-dependent manner, and treatment with ascorbic acid enhances its production. Meanwhile, treatments with cosmetic ingredients that have antioxidant properties, such as kojic acid, coenzyme Q<sub>10</sub>, and astaxanthin, did not enhance the production of H-ceramides, indicating that antioxidative effects are not involved in the H-ceramide production. By comprehensive expression analysis using RNA sequencing, we identified i) 1073 genes increased ( $\geq 2$ -folds) during keratinocyte differentiation, ii) 159 genes increased ( $\geq 2$ -folds) by a treatment with ascorbic acid, and iii) 87 genes increased in both conditions. Among them, we cloned 16 genes and investigated their activity to produce H-ceramides by an overexpression assay using HEK 293T cell. However, H-ceramides were not produced at least in our assay condition. Therefore, further analyses, including to establishment *in vitro* and *in vivo* assay systems, are required to identify the gene responsible for H-ceramide synthesis. Our finding contributes to future studies identifying an H-ceramide synthase, elucidating the mechanisms of its production, and developing novel cosmetic materials/products.

## 1. 緒言

セラミドは単一の分子の名称ではなく、長鎖アミノアルコール（長鎖塩基）と脂肪酸がアミド結合した構造をもつ脂質の総称である<sup>1)</sup>。ヒトのセラミドは長鎖塩基および脂肪酸の構造（二重結合・水酸基の有無、位置）の違いにより30のセラミドクラス（遊離セラミド25クラス、結合型セラミド5クラス）に分類され、各クラスには炭素鎖長の異なるセラミド分子種が存在する。皮膚の最外層である表皮の角質層は、角質細胞および脂質ラメラと呼ばれる脂質の多層構造体によって構成されており、脂質ラメラは皮膚を介した生体内外の物質の透過（体外からの病原体・異物の侵入、体内からの水分蒸散）を制限するバリアとして特に重要である。セラミドは脂質ラメラの約50%（重量比）を占め、多くの組織とは異なり角質層には多様なセラミド分子種が存在することが知られていたが、各分子種の詳細な存在量・組成比については不明な点が多く残されていた。長鎖塩基の6位に水酸基をもつセラミド（Hセラミド）は1994年にヒトの皮膚に存在することが明らかにされ<sup>2)</sup>、

我々のグループをはじめとする解析により、Hセラミドはヒトの角質層に特有であり、かつヒトの角質層では主要なセラミドクラスであることが明らかとなった（図1）<sup>3,4)</sup>。

セラミドは皮膚の透過性バリア機能の向上を目的として、化粧品、美容液、ドリンク等様々なセラミド配合製品が市販され、広く認知されるようになってきた。しかし、配合されているセラミドの殆どはヒトの角質層セラミドとは分子種や組成が異なっており、セラミドによるバリア機能を十分に発揮できていない可能性が高い。ヒト角質層セラミド組成を反映した製品開発の障壁となっていた主たる要因として、ヒト角質層に存在する多様なセラミド分子種の存在量・組成の詳細とその多様性を生み出す分子機構が不明であったことがあげられる。特にHセラミドはヒト角質層で最も多いセラミドクラスであるにもかかわらず、その発見から30年を経た現在においてもその合成経路および生理機能は依然不明である。そこで本研究では、Hセラミドの合成酵素を同定し、産生経路を解明することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞培養

ヒト不死化ケラチノサイト（Evercyte, NHEK-SVTERT3-5）はCnT-prime epithelial proliferation medium (CELLnTEC) を用いて培養することで増殖させた。細胞の分化はCnT-prime epithelial 3D barrier medium (CELLnTEC) を用いて培養することで誘導し、14日間培養した。HEK 293T



Synthetic pathway and physiological function of human-specific epidermal ceramides

Yusuke Ohno

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

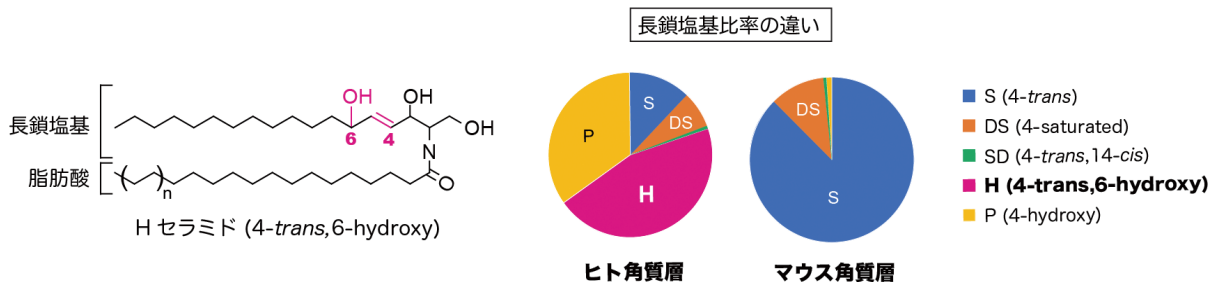


図1 Hセラミドの構造と角質層での存在比率

細胞は、10% 仔ウシ血清, 100units/mL penicillin および 100μg/mL streptomycin (Merck) を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium (D6429; Merck) を用いて培養した。遺伝子導入には Lipofectamine plus (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

## 2.2. RNA シークエンス

分化させたヒト不死化ケラチノサイトより NucleoSpin RNA (Takara) を用いて RNA の抽出を行った。NEBNext® Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs), NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いてシーケンスライブラリーの調製を行った。Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) を用いて測定を行い、両端 150bp のペアエンドリードでリード数 6Gb のデータを取得した。データのクオリティチェック, トリミング, マッピング, リードカウント, TPM の算出はそれぞれ FastQC (バージョン 0.11.7), Trimmomatic (バージョン 0.38), HISAT2 (バージョン 2.1.9), featureCounts (バージョン 1.6.3) を用いて行った。

## 2.3. セラミドの測定

14日間分化させたヒト不死化ケラチノサイトを 100μL H<sub>2</sub>O に懸濁させ、375μL CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH=1:2 (v/v) を加えて激しく攪拌した。125μL H<sub>2</sub>O および 125μL CHCl<sub>3</sub> を加えて激しく攪拌後、遠心により二層に分離させた。下層を回収し、溶媒を留去後、200μL CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH=1:2 (v/v) に再懸濁させ、液体クロマトグラフィー-連結型タンデム質量分析 (LC-MS/MS; Xevo TQ-S, Waters) によるセラミドの検出, 定量を行った。

## 2.4. 候補遺伝子のクローニング

ヒト不死化ケラチノサイト (分化7日) の cDNA および各遺伝子特異的なプライマーを用いて各候補遺伝子を PCR により増幅し (KOD FX, TOYOBO), dA 付加後, pGEM-T Easy vector (Promega) にクローニングした。配列の確認後, 目的遺伝子を制限酵素により切り出し, 動

物細胞発現用ベクター pCE puro 3 × FLAG-1 にサブクローニングした。

## 3. 結果

### 3.1. アスコルビン酸によるHセラミドの増加

ケラチノサイトの分化時にアスコルビン酸を添加すると Hセラミドと予想されるセラミド量が増加することが TLC を用いた解析により示唆されていた<sup>5,6)</sup>。そこでまず、アスコルビン酸が Hセラミド産生増加に関与することを証明するため、アスコルビン酸存在下/非存在下において各日数分化させたケラチノサイトより脂質を抽出し、LC-MS/MS により Hセラミド量を定量した。その結果、分化日数依存的に Hセラミド量が増加し、アスコルビン酸非添加群に比べ、添加群では顕著に増加した (図2 7日, 3.7倍; 10日, 7.1倍; 14日, 11.3倍; 21日, 6.7倍)。

アスコルビン酸は抗酸化物質, 分化促進または水酸化酵素の補酵素として働くことが知られている<sup>7,8)</sup>。そこで、アスコルビン酸による Hセラミドの産生増加が抗酸化作用によるものかどうかを明らかにするため、抗酸化作用を目的とした化粧品材料として用いられるコウジ酸, コエンザイム Q<sub>10</sub> およびアスタキサンチンの Hセラミド産生への影響を調べた。各抗酸化剤を不死化ケラチノサイト分化時に添加し、脂質を抽出後、Hセラミド量を調べたところ (図3),

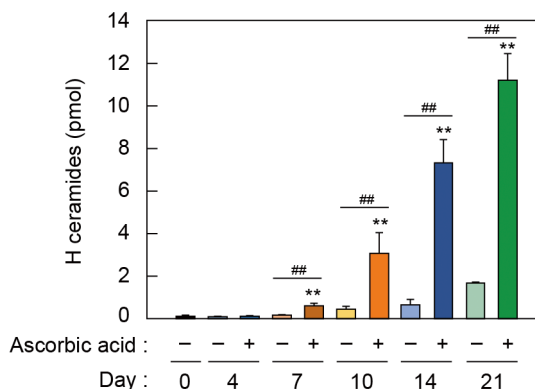


図2 分化, アスコルビン酸依存的なHセラミドの産生増加

いずれの化合物もHセラミド産生を増加させないことが明らかとなった。

### 3.2. アスコルビン酸依存的な遺伝子発現変動の網羅的解析

Hセラミド量がケラチノサイトの分化依存的に増加したことから、未同定のHセラミド合成酵素は分化依存的に発現が増加すると考えられる。また、アスコルビン酸存在下でHセラミド産生が増加したことから、アスコルビン酸がHセラミド合成酵素の発現を増加させた可能性が考えられる。そこで、Hセラミド合成酵素の候補を探索するため、RNAシーケンスによりケラチノサイトの分化による発現変動を網羅的に調べた。各分化日数におけるケラチノサイトからRNAを抽出し、RNA濃度、純度を調べたところ、分化日数10日、14日、21日のRNAは分解が進んでいた。これは皮膚では角質層を形成する段階までケラチノサイトは分化が進行すると、DNAやRNAの分解が進行するためであると考えられる。分化日数7日ではRNAの分解が進んでおらず、アスコルビン酸依存的なHセラミドの増加が見られたため、分化7日におけるRNAを用いてRNAシーケンス解析を行った。その結果、i) 分化依存的に発現増加(2倍以上)する1073遺伝子、ii) アスコルビン酸依存的に発現増加(2倍以上)する159遺伝子、i) かつii) の条件を満たす87遺伝子を同定した(図4)。

### 3.3. 水酸化酵素候補遺伝子の活性解析

RNAシーケンス解析により発現増加していた遺伝子のうち、脂質代謝関連遺伝子(*SPTLC3*, *SPTSSB*, *PSAPL1*, *CLN8*, *PTGS1*, *FADS6*, *ABHD12B*, *ABHD17B*)、脂質トランスポーター(*GLTP*, *STARD5*)、水酸化および不飽和化関連遺伝子(*CYP1A1*, *CYP2C18*, *CYP2E1*, *CYP2W1*, *CYP561D1*, *SDR16C5*)をHセラミド合成酵素の候補遺伝子としてクローニングし、哺乳類発現細胞発現用ベクターに組み込んだ。HEK 293T細胞に各プラスミドをそれぞれ導入し、脂質を抽出後、LC-MS/MSによりHセラミドの検出を行った。しかし、いずれの遺伝子の発現によってもHセラミドは検出限界以下であった。ジヒドロセラミド水酸化/不飽和化酵素であるDEGS2は水酸基および二重結合共にもたないセラミドの長鎖塩基部分の6位に水酸基を導入する酵素である。DEGS2が別の因子の存在によってセラミドの4位に水酸基を導入する活性を発揮する可能性を考え、DEGS2と上記の各候補因子をHEK 293T細胞に共過剰発現させた。細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MSによりHセラミド産生を調べたところ、Hセラミドは検出限界以下であった。これらの結果から、クローニングした各遺伝子は少なくとも今回用いた実験系ではHセラミド合成活性を示さな

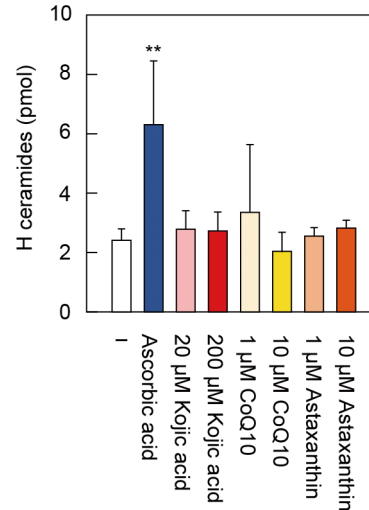


図3 Hセラミド産生への抗酸化剤の影響

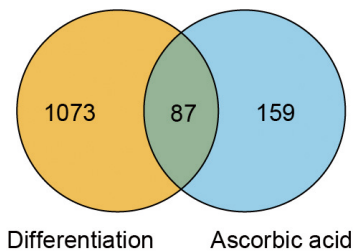


図4 ケラチノサイトの分化依存的、アスコルビン酸依存的な遺伝子発現の増加

いことが明らかとなった。

## 4. 考察, 総括

Hセラミドはヒト特有かつ角質層で最も多いセラミドクラスであるにもかかわらず、産生経路や生理機能は不明であり、Hセラミドを配合した製品もこれまで販売されていない。本研究では、Hセラミドの産生量がケラチノサイトの分化依存的に増加すること、さらにその産生量はアスコルビン酸添加によって大幅に増加することを見出した。アスコルビン酸は抗酸化作用を目的として食品等に用いられるが、抗酸化作用をもつ化粧品材料であるコウジ酸、コエンザイムQ<sub>10</sub>、アスタキサンチンはHセラミド産生を亢進しなかったことから、アスコルビン酸の作用は抗酸化作用以外によることを明らかにした。アスコルビン酸の抗酸化作用以外の機能として、ケラチノサイトの分化に関与することが知られていることから<sup>7,9)</sup>、網羅的な発現解析を行ったところ、ケラチノサイトの分化依存的かつアスコルビン酸依存的に発現増加する87の遺伝子を同定することに成功した。これまでにアスコルビン酸により発現が増加する遺伝子の網羅的解析を行った報告はなされておらず、ケ

ラチノサイトの分化メカニズムには不明な点が多く残されていることから、詳細な本研究で得られた結果はHセラミド産生酵素の同定のみならず、ケラチノサイトの分化メカニズムを理解するための重要な知見となることが予想される。

網羅的遺伝子発現解析の結果をもとに、Hセラミド合成酵素の候補として16遺伝子を選択し、HEK 293T細胞へ過剰発現させることで活性を調べたが、いずれの遺伝子も発現させてもHセラミドは産生されなかった。その要因として以下の3つの可能性を考えている：i) 選択した候補遺伝子はいずれもHセラミド合成酵素でない、ii) 候補遺伝子にHセラミド合成酵素が含まれているが、単独では活性を発揮できない(HEK 293T細胞には活性に必要な別の因子が発現していない)、iii) Hセラミド産生におけるアスコルビン酸の役割は遺伝子発現ではなく、水酸化活性の補助因子である。そのため今後はこれら3つの可能性を検証するため、i) HセラミドをもたないマウスケラチノサイトのRNA発現とヒトRNA発現の比較解析による別の候補遺伝子のスクリーニングと活性解析、ii) HEK 293T細胞ではなく、ケラチノサイトを用いた過剰発現実験もしくはノックアウト細胞の作成とHセラミド産生量の解析、iii) 分化ケラチノサイトの総細胞抽出液もしくは膜画分を用いた*in vitro*の活性解析系の構築とアスコルビン酸添加時のHセラミド産生活性解析、をそれぞれ行う必要があると考えている。

本研究期間中においてHセラミド合成酵素の同定には至らなかったが、Hセラミド産生におけるアスコルビン酸の関与を証明し、アスコルビン酸依存的に発現変動する遺伝子を同定することに成功した。今後は上述の可能性を検証することでHセラミド合成酵素、合成経路および産生の分子メカニズムが明らかになることで、Hセラミドの生理機能の解明およびヒトセラミドとしての新たなコスメトロジー製品への応用へ発展することが期待される。

#### (引用文献)

- 1) Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.*, **63**, 50-69 (2016)
- 2) Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.*, **35**, 2060-2068 (1994)
- 3) Kawana M, Miyamoto M, Ohno Y, Kihara A. Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.*, **61**, 884-895 (2020).
- 4) Suzuki M, Ohno Y, Kihara A. Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases. *J. Lipid Res.*, **63**, 100235 (2022)
- 5) Ponc M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris GS, Bouwstra J, Mommaas AM. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J. Invest. Dermatol.*, **109**, 348-355 (1997)
- 6) Uchida Y, Behne M, Quiec D, Elias PM, Holleran WM. Vitamin C stimulates sphingolipid production and markers of barrier formation in submerged human keratinocyte cultures. *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1307-1313 (2001)
- 7) Catani MV, Savini I, Rossi A, Melino G, Avigliano L. Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutr. Rev.*, **63**, 81-90 (2005)
- 8) Wang K, Jiang H, Li W, Qiang M, Dong T, Li H. Role of Vitamin C in Skin Diseases. *Front. Physiol.*, **9**, 819 (2018)
- 9) Pasonen-Seppanen S, Suhonen TM, Kirjavainen M, Suihko E, Urtti A, Miettinen M, Hyttinen M, Tammi M, Tammi R. Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier. *Histochem. Cell Biol.*, **116**, 287-297 (2001).