

皮膚の恒常性や疾患を調節する新しい脂質メディエーター

山本 圭

1. はじめに

脂質は皮膚のホメオスタシスを考える上で非常に重要な生体成分である。外界に接する表皮は主に分化段階の異なる表皮角化細胞（ケラチノサイト）により構成される基底層、有棘層、顆粒層、角質層からなる重層構造を形成しており、体内からの水分の蒸散または病原体などの侵入から体を守っている。ケラチノサイトは多様な抗菌ペプチドやサイトカインを産生することで、外部からの異物侵入に対するバリアとしても機能している。このような皮膚の恒常性が破綻すると難治性疾患に代表される乾癬や接触性皮膚炎などの表皮肥厚性疾患につながる。セラミドは表皮の脂質分子の中でも皮膚バリア形成に重要であるが、セラミド以外の脂質が皮膚でどのような役割をしているかについては十分理解されていなかった。筆者らは分泌性ホスホリパーゼA₂ (sPLA₂) の生体内機能および疾患との関わりについて研究を進める過程でsPLA₂が皮膚に複数局在し固有の機能を担うことに気がついた。本稿では皮膚の恒常性や疾患を制御するsPLA₂を中心に最新の研究成果を交えて概説したい。

2. 分泌性ホスホリパーゼA₂

sPLA₂は、グリセロリン脂質のsn-2位のアシル結合を加水分解し脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素であり、11種類のアイソザイムからなる。sPLA₂は、1) 細胞外に分泌される、2) 酵素活性にmMオーダーのCa²⁺を必要とする、3) アイソザイムごとに異なる局在を示す、4) 基質となるリン脂質の極性基および脂肪酸に対して各アイソザイムの基質特異性が異なる、などの観点から、その主たる機能は組織固有に存在する細胞外リン脂質環境の制御であ

り、各アイソザイムが固有の機能を担うものであると考えられてきた。実際に筆者らの研究室では、sPLA₂遺伝子改変マウスに疾患モデルと脂質メタボロームを展開することにより、各アイソザイムがこれまでの概念では想定できない脂質ネットワークを動かし、生体応答を多様に制御することを明らかにしてきている¹⁾。そのうち皮膚領域では、PLA2G2F (sPLA₂-IIF) が表皮に局在し、ユニークなりゾリン脂質を産生することで表皮肥厚性疾患の調節に機能する「Epidermal sPLA₂」であること²⁾、PLA2G2E (sPLA₂-IIE) が毛包に局在し、毛包の発育に寄与する「Hair follicular sPLA₂」であること³⁾、を見いだしてきており、各々のアイソザイムが組織固有の機能を有することが示されている。ここでは、それぞれからみたsPLA₂の生理機能について解説する。

3. Epidermal sPLA₂の発見

皮膚のsPLA₂は脂肪酸を供給し表皮角質層の酸性度を保つと提唱されている⁴⁾が、個々のsPLA₂アイソザイムレベルでの解析は不十分である。さらに、PLA2G10 (sPLA₂-X)⁵⁾やPLA2G2A (sPLA₂-IIA)⁶⁾の過剰発現マウスは、炎症とは無関係に表皮の肥厚、皮脂腺膨張、脱毛などの皮膚異常を示す。しかしながら、これらのアイソザイムは表皮に内在性の発現がほとんどもしくはまったく認められず、PLA2G10過剰発現マウスで観察された表現型の意義に関しては不明であった。そこでマウス皮膚のマイクロアレイ解析を行うと、従来機能未知のsPLA₂であったPLA2G2Fの発現が野生型マウスの皮膚において他の脂質代謝関連遺伝子と比較して高く、さらにその発現量はPLA2G10過剰発現マウスにおいて亢進されることを見いだした。定量的PCRおよび免疫組織学的な解析の結果、PLA2G2Fは表皮の顆粒層から角質層に局在する主要なsPLA₂であった(図1A)。また、PLA2G2Fの発現はヒト乾癬の表皮肥厚部位で増加していた(図1B)。このことはPLA2G2Fが表皮肥厚性疾患に関与することを示唆している。そこで、本酵素の遺伝子改変マウスを作製し、皮膚における役割について詳細に解析した。

PLA2G2F過剰発現マウスは脱毛や肥厚を伴う強い皮膚異常を示し、マイクロアレイ解析や組織学的な解析の結果、乾癬様の症状を呈していた(図1C)。一方、PLA2G2F

徳島大学大学院生物資源産業学研究部生体分子機能学分野
(〒770-8513 徳島市南常三島2-1)

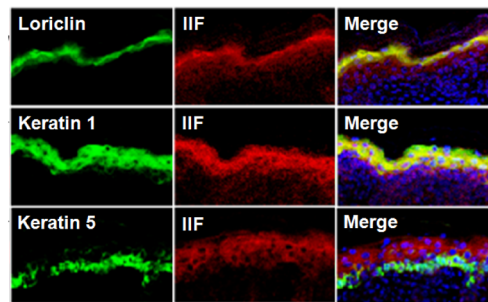
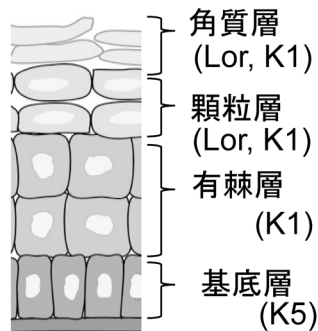
The new lipid mediators that modulate skin homeostasis and diseases

Kei Yamamoto (Graduate School of Bioscience and Bioindustry, Tokushima University, 2-1 Minami-kyosanjima, Tokushima 770-8513, Japan)

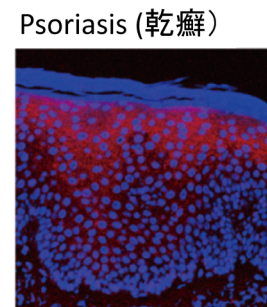
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880786

© 2016 公益社団法人日本生化学会

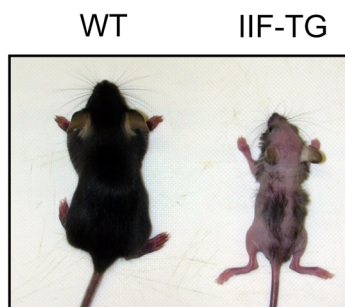
A マウス表皮



B ヒト表皮



C PLA2G2F過剰発現マウス



D PLA2G2F欠損マウス(乾癬)

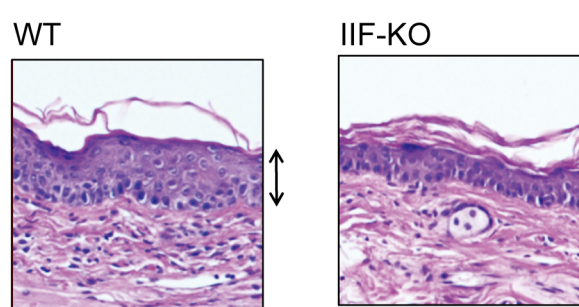


図1 PLA2G2Fの局在と遺伝子改変マウスの表現型 (文献2を改変)

(A)表皮は基底層の表皮角化細胞(ケラチノサイト)から有棘層,顆粒層,角質層へと分化する。Keratin 5 (K5)は基底層, Keratin 1 (K1)は有棘層から角質層, Loriclin (Lor)は分化マーカーである。免疫組織染色の結果, PLA2G2Fは比較的分化の進んだ表皮に局在している。(B)PLA2G2Fはヒト乾癬の表皮肥厚部位に広く局在している。(C)PLA2G2F過剰発現マウス(IIF-TG)は乾癬様の表現型を示す。(D)PLA2G2F欠損マウス(IIF-KO)に乾癬モデルを惹起すると表皮の肥厚が軽減され,病態が改善する。

欠損マウスの皮膚は一見正常であったが,腹部皮膚の角質剥離および体外への水分漏出量の増加を伴う皮膚バリア機能の低下が認められた。野生型マウス由来の初代培養ケラチノサイトでは分化に依存してPLA2G2Fの発現が著しく誘導されたが, PLA2G2F欠損マウス由来のケラチノサイトでは分化および活性化マーカーの発現が低下していた。これらの結果は, PLA2G2Fがケラチノサイトの分化や活性化に関与することを示唆している。次に, PLA2G2F欠損マウスに表皮肥厚性疾患モデルを惹起してPLA2G2Fの病態時における機能を精査した。乾癬はTh17応答を介する表皮肥厚性疾患であり, 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ことが知られている⁷⁾。この乾癬モデルをPLA2G2F欠損マウスの耳介に施行すると, 野生型と比較して表皮肥厚の軽減(図1D)および乾癬の発症や悪化に関与する*S100a9*や*Il1f6* mRNA量の増加抑制が認められ, 病態が有意に改善した。さらにケラチノサイトにTh17サイトカインであるIL-22を添加するとPLA2G2Fの発現が強く誘導されたが, PLA2G2F欠損ケラチノサイトでは細胞の活性化がほぼ完全に消失し, IL-22によるケラチノサイトの活性

化にPLA2G2Fが関与することが示唆された。一方, かぶれや金属アレルギーに代表される接触性皮膚炎は, 表皮肥厚を伴うTh1応答性の皮膚免疫疾患であり, マウス腹部にアレルゲンとしてジニトロフルオロベンゼンを塗布した5日後に, 同じアレルゲンを耳介に塗布することでアレルギー性の炎症による耳介の腫れを惹起させる⁸⁾。この接触性皮膚炎モデルを惹起したPLA2G2F欠損マウスでは野生型と比較して耳介の肥厚とケラチノサイトの活性化および炎症が抑制された。さらに皮膚がんについてPLA2G2Fの寄与を検証した。マウス背部にDMBA(7,12-dimethylbenz[a]anthracene)を塗布することでDNAに傷害を起こし, その後, 炎症物質のTPA(12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate)を連続塗布することで腫瘍形成を惹起させる⁹⁾。この二段階皮膚がんモデルをPLA2G2F欠損マウスに施行すると, 野生型と比較して発症する腫瘍の数には差はなかったが, 大きな腫瘍が低減し, 炎症性細胞浸潤, 血管新生, 炎症および表皮肥厚の低下傾向が認められた。以上の結果から, PLA2G2Fは表皮肥厚性疾患の進行に促進的に作用することが明らかとなった。

表皮肥厚性疾患におけるPLA2G2Fの機能には, この酵

素が産生する脂質代謝物が関与することが想定される。そこで、筆者らはPLA2G2Fが動員する責任脂質パスウェイを同定するため、PLA2G2F過剰発現マウスの皮膚について網羅的脂質メタボローム解析を行った。その結果、過剰発現マウスの皮膚ではドコサヘキサエン酸 (DHA) を持つホスファチジルエタノールアミン (PE) およびプラズマローゲン型ホスファチジルエタノールアミン (P-PE) が特徴的に低下しており、これらのリン脂質がPLA2G2Fの選択的基質である可能性が示唆された。一方、各種病態を惹起したPLA2G2F欠損マウスの皮膚について脂質メタボローム解析を施行した結果、P-PEのPLA₂代謝産物として想定される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 (P-LPE) が対照とほぼ同じレベルにまで低下し、PLA2G2F欠損マウスの表現型と合致する唯一の脂質代謝産物であることを突き止めた。さらに、ケラチノサイトについて脂質メタボローム解析を行ったところ、ケラチノサイトの分化に応じてP-PEが培養上清中に分泌されることを見いだした。実際、培養上清および皮膚から抽出したリン脂質にリコンビナントPLA2G2Fを作用するとP-LPEが選択的に産生された。以上のことから、PLA2G2Fはケラチノサイトから分泌されるDHA含有P-PEを優先的に加水分解し、DHAとP-LPEを産生することが示唆された (図2A)。P-LPEの生理機能を明らかにするために、PLA2G2F欠損マウスにP-LPEを添加して乾癬を惹起すると遺伝子欠損による抑制の表現型が回復し、表皮の

肥厚およびケラチノサイトの活性化が亢進した。さらにPLA2G2F欠損ケラチノサイトにP-LPEを添加するとケラチノサイトの活性化が亢進され、遺伝子欠損による表現型の回復が認められた。

以上の結果から、ケラチノサイトから分泌されるP-PEはPLA2G2Fの作用によってP-LPEを産生し、このP-LPEがケラチノサイトの活性化を引き起こして表皮肥厚性疾患を制御する (図2B) のものと結論した。PLA2G2Fはケラチノサイトから分泌されるリン脂質に作用し、DHAを持つアルケニル型リン脂質 (P-PE) をリゾリン脂質 (アルケニル型リゾリン脂質, P-LPE) に代謝する。P-LPEは表皮肥厚性疾患の新規バイオマーカーのみならず、新規生理活性脂質としても位置づけられる。P-LPEの前駆体であるP-PEはプラズマローゲンとも呼ばれ、グリセロール骨格のsn-1がエステル結合でなくビニルエーテル結合により脂肪酸と結合しているリン脂質である。プラズマローゲンは生体内に約2割存在し、脳神経系、心筋、リンパ球、マクロファージでの含量が多く、プラズマローゲンの生合成不全症は致死性の神経疾患を呈することが知られている¹⁰⁾。筆者らの研究はプラズマローゲンの代謝産物が生理活性を持つことを示した初めての報告であり、これを理論基盤として、P-LPEおよびPLA2G2Fが皮膚疾患治療薬としての標的となることが期待される。

4. Hair follicular sPLA₂の発見

PLA2G2Fの解析を行う過程で、PLA2G2E (sPLA₂-IIe) が毛包に局在することに気がついた (図3A, B)³⁾。PLA2G2Eは高脂肪食負荷マウスの白色脂肪で発現が亢進し、リポタンパク質を加水分解することにより肥満・脂肪肝・高脂血症の増悪に関わる¹¹⁾が、皮膚に関する知見は得られていない。毛包は成長期、退行期、休止期の複数の相からなる毛周期をもつ。皮膚におけるsPLA₂の発現を調べると、表皮に局在するPLA2G2Fは出生前から出生後にかけて一定の発現量を保っていた (図3C)。一方、PLA2G2Eの発現は出生前にはほとんど認められなかったが、成長期に高く、退行期、休止期と進むに連れて低下し、毛周期に応じて発現量が変化した (図3C)。この結果はPLA2G2Eが毛包の機能に寄与する可能性を示唆している。実際に成長期におけるPLA2G2E欠損マウスの毛包では、毛小皮 (cuticle) と体毛 (hair shaft) の乖離が認められ (図3D)、本欠損マウスに表皮の肥厚を伴う乾癬や接触性皮膚炎を惹起させても表現型に変化が認められなかった。さらに、脂質メタボローム解析の結果、PLA2G2Eは高度不飽和脂肪酸、LPEやP-LPEを分子種非特異的に遊離することがわかり、表皮角質層に局在するPLA2G2Fとは違う機能を有することが示唆された。しかしながら、PLA2G2Eがヒ

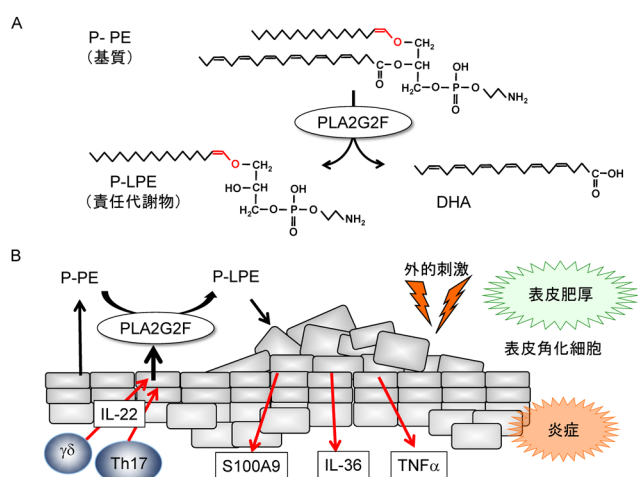


図2 PLA2G2Fの作用機序

(A) PLA2G2FはDHA含有プラズマローゲン型ホスファチジルエタノールアミン (P-PE) を優先的に加水分解し、プラズマローゲン型リゾリン脂質 (P-LPE) を産生する。(B) 乾癬で増加するTh17サイトカイン (IL-22) により発現誘導されたPLA2G2Fは、表皮角化細胞 (ケラチノサイト) から分泌されたプラズマローゲン (P-PE) をリゾ型 (P-LPE) に変換する。P-LPEは表皮角化細胞に作用して表皮の肥厚および炎症を悪化させる。

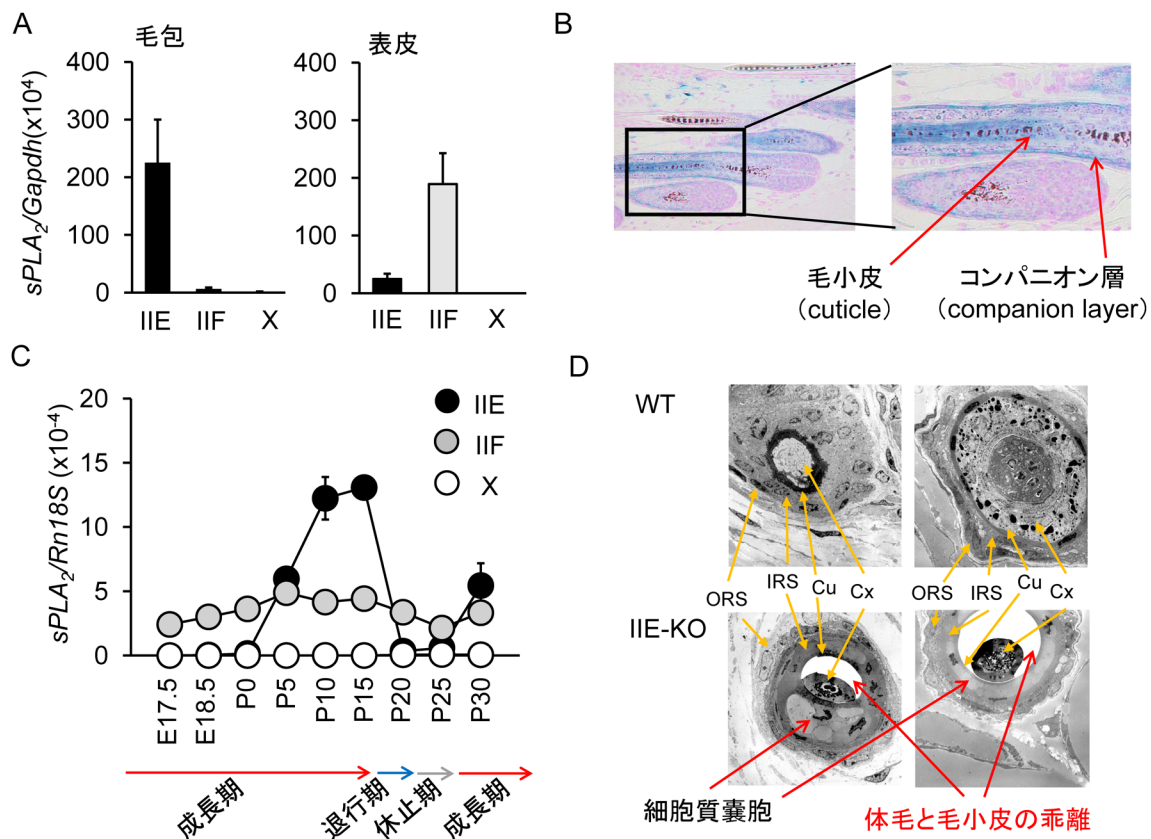


図3 PLA2G2Eは毛包に局在するHair follicular sPLA₂であり、毛包の発育を制御する(文献3を改変)
 (A)マイクロダイセクションにより切り出された毛包画分には*Pla2g2e* (IIE)が、表皮画分には*Pla2g2f* (IIF)が発現している。(B)*Pla2g2e*はマウスの毛小皮(cuticle)とコンパニオン層(companion layer)に局在する。(C)毛包は成長期、退行期、休止期の複数の相からなる毛周期をもつ。*Pla2g2e* (IIE)の発現は毛周期に応じて変化する。(D)PLA2G2E欠損マウス(IIE-KO)では毛包の微細構造が乱れている。ORS:外根鞘, IRS:内根鞘, Cu:毛小皮, Cx:毛髄質。

トの皮膚および白色脂肪組織で発現している事実は現時点では得られていない。PLA2G2Eに近いホモログであるPLA2G2Aがヒトの皮膚²⁾および白色脂肪組織¹¹⁾で発現していること、C57BL/6系統マウスではフレームシフト変異のためPLA2G2Aは発現していないこと¹²⁾、BALB/c系統では小腸に局限して局在していることから、筆者らは遺伝子改変マウスで得られたPLA2G2Eの機能は、ヒトにおいてはPLA2G2Aが代償していると考えている。

5. おわりに

筆者らはPLA2G2Fが表皮の顆粒層から角質層に局在し、特殊なリゾリン脂質を動員して表皮肥厚性疾患を制御する「Epidermal sPLA₂」であること、PLA2G2Eが毛周期に応じて毛包に発現誘導され、毛包の発育に寄与する「Hair follicular sPLA₂」であることを明らかにした。このことは皮膚に強く発現する二つのsPLA₂が固有に脂質を動員し、皮膚の恒常性と病態に寄与する重要性を示唆している。これ

らの知見は皮膚および脂質の研究領域に新規概念を提唱するものであり、今後は作用点の同定を中心とした生理的意義の解析と創薬への展開が待たれる。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、東京都医学総合研究所脂質代謝プロジェクトにおいて村上誠チームリーダーのもとで行われたものであり、その他多くの共同研究者の協力のもとで実施したものであります。この場をお借りして、御指導、御支援いただきましたすべての先生方と大学院生・卒業研究生の皆様に厚く御礼申し上げます。

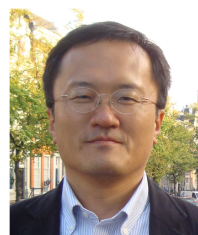
文 献

- 1) Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., & Taketomi, Y. (2015) *J. Lipid Res.*, **56**, 1248-1261.
- 2) 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., & Mu-

- rakami, M. (2015) *J. Exp. Med.*, **212**, 1901–1919.
- 3) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Nishito, Y., Gelb, M.H., Taketomi, Y., & Murakami, M. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**, 15602–15613.
 - 4) Fluhr, J.W., Mao-Qiang, M., Brown, B.E., Hachem, J.P., Moskowitz, D.G., Demerjian, M., Haftek, M., Serre, G., Crumrine, D., Mauro, T.M., Elias, P.M., & Feingold, K.R. (2004) *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 140–151.
 - 5) Yamamoto, K., Taketomi, Y., Isogai, Y., Miki, Y., Sato, H., Masuda, S., Nishito, Y., Morioka, K., Ishimoto, Y., Suzuki, N., Yokoya, Y., Hanasaki, K., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Fukami, K., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., & Murakami, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 11616–11631.
 - 6) Grass, D.S., Felkner, R.H., Chiang, M.Y., Wallace, R.E., Nave-lainen, T.J., Bennett, C.F., & Swanson, M.E. (1996) *J. Clin. Invest.*, **97**, 2233–2241.
 - 7) Tortola, L., Rosenwald, E., Abel, B., Blumberg, H., Schafer, M., Coyle, A.J., Renauld, J.C., Werner, S., Kisielow, J., & Kopf, M. (2012) *J. Clin. Invest.*, **122**, 3965–3976.
 - 8) 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. (2012) *J. Exp. Med.*, **210**, 1217–1234.
 - 9) Modi, B.G., Neustadter, J., Binda, E., Lewis, J., Filler, R.B., Roberts, S.J., Kwong, B.Y., Reddy, S., Overton, J.D., Galan, A., Tigelaar, R., Cai, L., Fu, P., Shlomchik, M., Kaplan, D.H., Hayday, A., & Girardi, M. (2012) *Science*, **335**, 104–108.
 - 10) Braverman, N.E. & Moser, A.B. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1442–1452.
 - 11) Sato, H., Taketomi, Y., Ushida, A., Isogai, Y., Kojima, T., Hirabayashi, T., Miki, Y., Yamamoto, K., Nishito, Y., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hara, S., Ida, S., Miyamoto, Y., Watanabe, M., Baba, H., Miyata, K., Oike, Y., Gelb, M.H., & Murakami, M. (2014) *Cell Metab.*, **20**, 119–132.
 - 12) MacPhee, M., Chepenik, K.P., Liddell, R.A., Nelson, K.K., Siracusa, L.D., & Buchberg, A.M. (1995) *Cell*, **81**, 957–966.

著者寸描

●山本 圭 (やまもと けい)



徳島大学大学院生物資源産業学研究部准教授。博士（工学）。

■略歴 1993年徳島大学生物工学科卒業。98年同大学院工学研究科博士後期課程修了。98年徳島大学医学部助手。2001年米国ミシガン大学医学部博士研究員。02年産業技術総合研究所特別研究員。05年東京都臨床医学総合研究所主席研究員。11年東京都医学総合研究所主席研究員。15年より現職。

■研究テーマと抱負 ホスホリパーゼA₂の生理的役割の解明を目指して様々な側面からアプローチしてきました。独立研究室を主宰することになり、脂質メタボローム解析の技術を駆使して発見した新規生理活性リゾリン脂質を軸に精力的に研究をすすめていきたいと思っています。

■ウェブサイト <http://www.bb.tokushima-u.ac.jp/>

■趣味 日々の晩酌と旅行。