

表皮バリア脂質の代謝異常が炎症を惹起する機序の解明

公益財団法人東京都医学総合研究所

平林 哲也

Epidermal lipids play an essential role for skin barrier function. Especially, the linoleate-containing ω -O-acylceramide is required for formation of both corneocyte lipid envelope (CLE) and the long periodicity phase with a repeat distance of ~ 13 nm present in the intercellular multilamellar lipid layers of the stratum corneum. Disturbances in epidermal ceramide metabolism contribute to dry sensitive skin, dermatitis, atopic dermatitis, and ichthyosis, but how they affect skin conditions including inflammation is not yet fully understood. In the process of identifying PNPLA1 as an enzyme responsible for ω -O-acylceramide biosynthesis, and SDR9C7 as a dehydrogenase essential for the formation of CLE, we noticed that keratinocyte activation and induced expression of proinflammatory cytokines and chemokines occur only in mice lacking the former, even though both knockout mice are models for congenital ichthyosis with significantly reduced permeability barrier function. This implies that impaired permeability barrier function does not necessarily lead to the induction of inflammatory responses, suggesting the existence of a mechanism that induces activation of keratinocytes and resident immune cells such as Langerhans cells in response to specific metabolic abnormalities of barrier lipids. In this study, we sought to identify metabolic abnormalities of epidermal barrier lipids that trigger proinflammatory responses and to elucidate the molecular mechanisms by which immune cells are activated in recognition of these metabolic abnormalities. ω -Hydroxyceramide, a precursor for ω -O-acylceramide biosynthesis, was accumulated in the epidermis of *Pnpla1*-deficient mice, and stimulated the keratinocyte expression of BMP7 and GM-CSF, which can facilitate the maturation and activation of epidermal Langerhans cells, consequently initiating inflammatory responses. Our findings can be applied to new skin care strategies to maintain beautiful skin by retaining moisture, strengthening barrier function and preventing from inflammation, thereby contributing to further advances in cosmetology.

1. 緒 言

美しく健やかな肌を保つには、保湿や正常なバリア機能の維持に加えて、表皮の代謝異常や炎症応答を抑制して肌トラブルを回避する必要がある。角質細胞間脂質の主要成分であるセラミドは、保湿や透過性バリア機能に不可欠な脂質であり、化粧品やスキンケア用品へのセラミド配合は、乾燥性敏感肌や皮膚炎などの改善・予防効果が期待されている。しかしながら、表皮特有のセラミド代謝経路の乱れがどのようにして皮膚の状態に影響するかについては未だ十分に解明されているとは言えず、脂質代謝経路の制御を指向した肌質改善方法も確立していないのが現状である。

表皮に存在するセラミド分子種は、脂肪酸の鎖長、二重結合や水酸基の有無や位置などの違いにより極めて多様性に富むが、中でもスフィンゴイド塩基に超長鎖脂肪酸（炭素数 28～36 程度）がアミド結合し、さらにその ω 末端に必須脂肪酸のリノール酸がエステル結合したアシルセラミド（ ω -O-アシルセラミド）が皮膚バリア機能に不可欠である（図 1）。この特殊な化学構造を持つ脂質の代謝経路は

非常に複雑であるが、遺伝的にアシルセラミド合成経路のいずれかの箇所に異常が生じて十分量のアシルセラミドを生合成できなくなると、バリア機能に不可欠な角層細胞間脂質の長周期ラメラ構造（ ~ 13 nm）や corneocyte lipid envelope (CLE) を失い、皮膚バリア機能の障害と角層の肥厚を特徴とする皮膚疾患である先天性魚鱗癬の原因となることが知られている。

我々はアシルセラミドの生合成酵素 PNPLA1 や^{1,2)}、アシルセラミドのリノール酸部分を修飾して結合型セラミド（角層細胞表面のタンパク質に共有結合する CLE の主成分）の形成に重要な酸化還元酵素 SDR9C7 を同定する過程で³⁾、両者の欠損マウスはどちらも透過性バリア機能が著しく低下するにもかかわらず、ケラチノサイトの活性化や炎症性サイトカインの誘導発現は前者の欠損マウスでのみ生じることを見出した。このことは、透過性バリア機能の低下が必ずしも炎症応答の惹起に繋がるとは限らないことを意味し、バリア脂質の特定の代謝異常に応答してケラチノサイトの活性化や免疫反応を誘導する仕組みが存在することを示唆するものである。そこで本研究では、炎症応答の引き金となる表皮バリア脂質の代謝異常を同定するとともに、その代謝異常を認識して免疫細胞が活性化する分子機序を解明することを目指した。

2. 方 法

2.1. 発現量解析

マウス皮膚における発現遺伝子の網羅的解析は、Mouse



Aberrant metabolism of epidermal barrier lipids causes inflammation

Tetsuya Hirabayashi

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

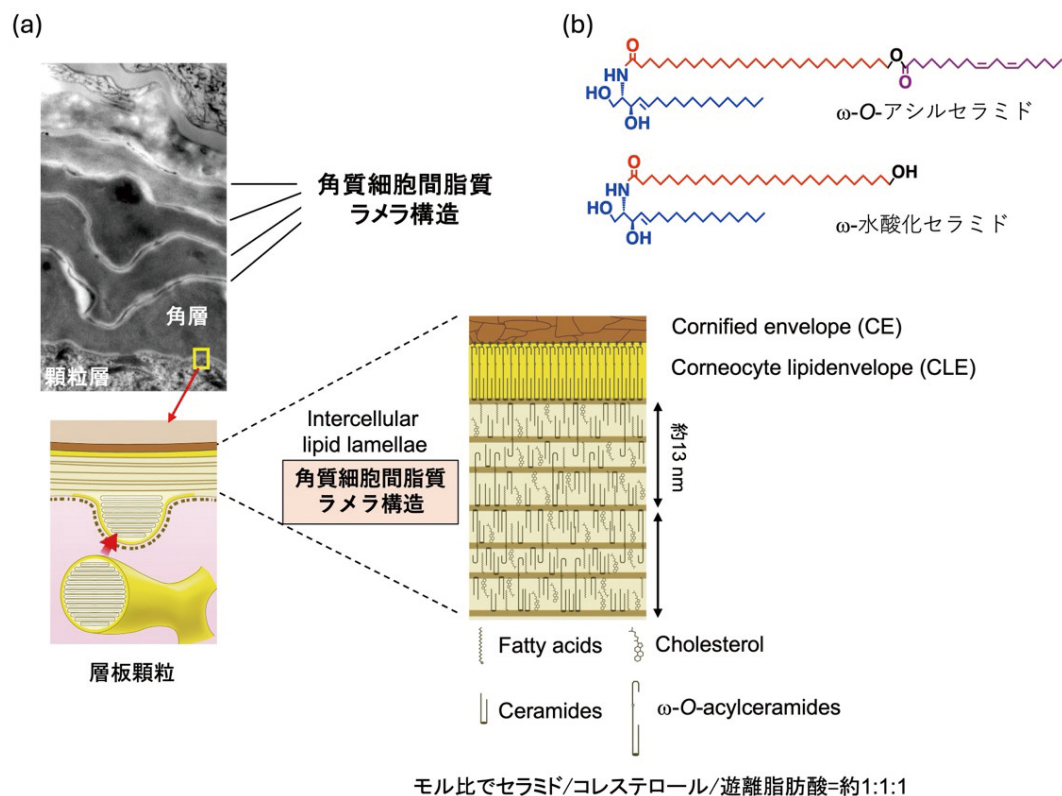


図1 皮膚バリア機能を担う角層微細構造と脂質代謝物

Gene Expression 4×44K v2 Microarray (G4846A, Agilent Technologies) を用いたDNAマイクロアレイ法によって行った。定量的PCRでは、細胞からtotal RNAを抽出後、ReverTra Ace qPCR RT (東洋紡) を用いてcDNAを合成し、これを鋳型として各種遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットとTHUNDEBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) によって遺伝子を増幅し、遺伝子発現量を解析した。ケラチノサイトの培養上清に含まれるGM-CSF量はMouse GM-CSF DuoSet (R & D systems) を用いたELISA法により定量した。

2.2. フローサイトメトリー

胎生19.5日のマウスの表皮および真皮を含む皮膚を剥離し、コラゲナーゼとDNase Iの存在下、37℃、2時間酵素処理することで細胞を単離した。100 μ mセルストレイナーで濾過し、DAPIおよび蛍光標識抗体により染色した。得られた細胞集団をFACScelestaまたはAria II (BD Bioscience) にて解析した。

2.3. 細胞培養

MPEK (mouse progenitor epidermal keratinocyte) をCnT-PR培地 (CELLnTEC) によって培養し、コンフルエントになった時点でCnT-PR 2D培地 (CELLnTEC) に交

換するとともに1 mM CaCl_2 を添加し、3日間分化誘導した。分化ケラチノサイトに対し、各種脂質を γ -シクロデキストリン存在下で培地中に加え、細胞内に取り込ませた。

2.4. 脂質分析

Folch法に準じた方法で表皮から抽出した脂質画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートにスポットし、展開溶媒で展開した。5%硫酸銅溶液をスプレーして180℃に加熱することで、展開された脂質のバンドを可視化した。

3. 結果

3.1.

アシルセラミド代謝経路が障害される先天性魚鱗癬モデルマウス4系統の皮膚から抽出したRNAを用いてマイクロアレイ解析により網羅的に遺伝子発現を比較すると、ケラチノサイトの活性化と炎症性免疫応答を起こす系統 (*Pnpla1* 欠損マウス、*Abca12* 欠損マウス) と、ほとんど起こさない系統 (*Cyp4f39* 欠損マウス、*Sdr9c7* 欠損マウス) に明確に分類された (図2)。炎症応答を起こす系統においては、サイトカインの *Il1b*、*Il6*、*Il23a*、*Il33*、*Tnfa*、ケモカインの *Cxcl1*、*Cxcl5*、*Cxcl10*、およびケラチノサイト活性化マーカーである *Krt6a*、*Krt6b*、*Krt16*、*S100a8*、*S100a9*、*Tslp* などが共通に上昇して

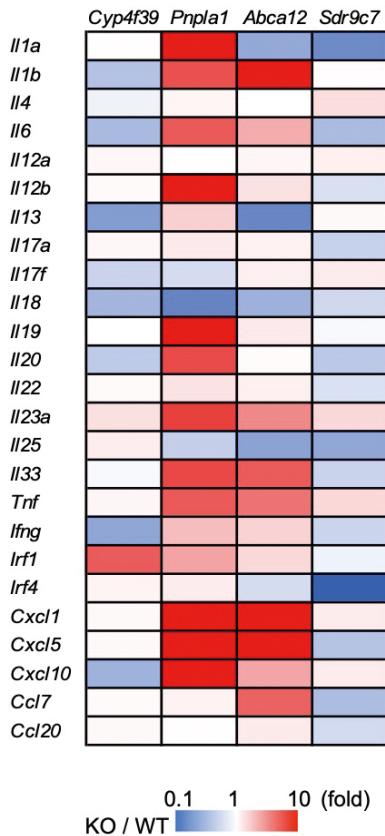


図2 先天性魚鱗癬モデルマウスの皮膚における発現遺伝子のマイクロアレイ解析

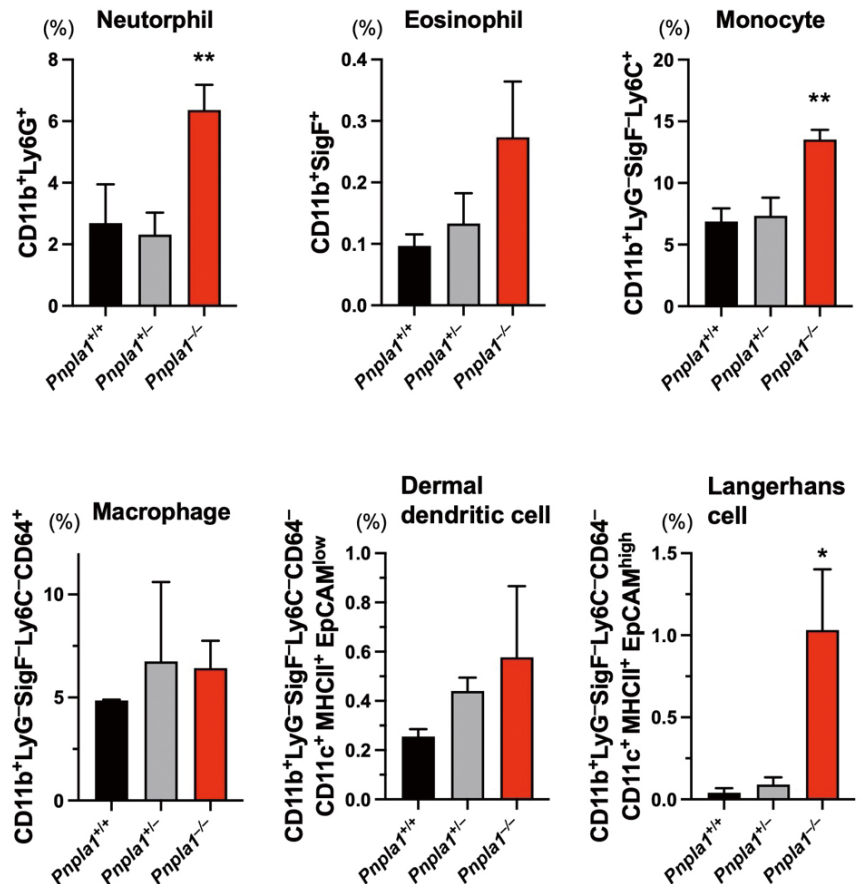


図3 *Pnpla1* 欠損マウスの皮膚における免疫細胞集団の解析

いた。一方、ケラチノサイト分化マーカーに関しては、フィラグリン類似の *Flg2* が減少するのに対し、角化細胞の周辺帯 (cornified cell envelope) の構成要素である *Lce3b*, *Lce3c*, *Sprr1a*, *Sprr1b*, *Sprr2b*, *Sprr2e*, *Sprr2g* などが増加するという特徴が見られた。

3.2. *Pnpla1* 欠損マウスにおける免疫系細胞集団の変化

炎症応答が最も顕著だった *Pnpla1* 欠損マウスを用いて、胎生19.5日齢における皮膚の免疫細胞プロファイルをマルチカラーフローサイトメトリーにて解析した。CD11b陽性の免疫系細胞集団のうち、*Pnpla1* 欠損マウスでは好中球と単球の割合が2倍程度に増加していたのに対し、好酸球、マクロファージ、樹状細胞の割合には有意な変化は見られなかった (図3)。さらには、CD11b⁺CD11c⁺MHCII⁺EpCAM^{high} の特徴を持つ成熟型ランゲルハンス様細胞が *Pnpla1* 欠損マウスの皮膚において顕著に増加していることが判明した。この集団の表面抗原をさらに詳細に解析すると、CD11b、CD11c、CD326 (EpCAM: 上皮細胞接着因子) に加えて成熟型ランゲルハ

ンス細胞のマーカーである CD86、F4/80、CX3CR1 などが高発現していたのに対し、好中球マーカーの Ly-6G、単球・マクロファージマーカーの CD64 (FcγRI)、樹状細胞マーカーである CD209 (DC-SIGN) の発現レベルは低かった。

3.3. 先天性魚鱗癬モデルマウスの表皮脂質成分の比較

Pnpla1、*Abhd5*、*Abca12*、*Sdr9c7* を欠損するマウスの表皮由来脂質を薄層クロマトグラフィーで展開して比較すると、*Pnpla1* 欠損マウスおよび *Abhd5* 欠損マウスでは ω-水酸化セラミド、ω-水酸化グルコシドセラミド、グルコシドセラミド、ω-水酸化脂肪酸などが顕著に増加していた。また、*Abca12* 欠損マウスではグルコシルセラミドが特に増加していた。一方、*Sdr9c7* 欠損マウスでは、アシルセラミドのリノール酸部分が3箇所水酸化されたトリオール型アシルセラミドが蓄積していた。これらの先天性魚鱗癬モデルマウスで変動が見られたこれらの脂質分子のうち、皮膚の炎症応答と正の相関が見られたのは3つの脂質クラス、すなわち ω-水酸化セラミド、ω-水酸化グルコ

シドセラミド、グルコシドセラミドであった。

3. 4. アシルセラミド代謝関連脂質の蓄積によるケラチノサイトの活性化

炎症応答が最も強い *Pnpla1* 欠損マウスにおいて、特に ω -水酸化セラミド、 ω -水酸化グルコシドセラミド、グルコシドセラミドの増加が顕著であったため、これらの脂質が分化ケラチノサイトに蓄積した場合にどのような作用をもたらすかを評価した。 γ -シクロデキストリンを担体としてケラチノサイト内に脂質を導入すると、 ω -水酸化セラミドの投与により、TGF β ファミリーに属する Bone morphogenetic protein 7 (*Bmp7*) や *S100a9* の遺伝子発現上昇が見られた (図4)。これに対して、ケラチノサイトの最終分化マーカーであるロリクリン (*Lor*) や活性化マーカーであるケラチン 6a (*Krt6a*) の発現は、いずれの脂質の投与によっても有意な変化は見られなかった。加えて、ELISA 測定により ω -水酸化セラミドによりケラチノサイトからの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の分泌が増加することが分かった。BMP7 はランゲルハンス細胞の分化誘導能を持つサイトカインであり、GM-CSF はランゲルハンス細胞の増殖や活性化を促進することから、*Pnpla1* 欠損マウスではケラチノサイト

内に蓄積した ω -水酸化セラミドによってこれらのサイトカインの発現や分泌が増加し、その結果ランゲルハンス細胞の増殖や成熟が促進され、炎症応答が促進されている可能性が示唆された。

4. 考察・総括

近年の精力的な研究により、皮膚バリア機能に重要な ω -O-アシルセラミドの生合成経路や CLE の形成のメカニズムの全容が明らかになりつつある。これらの代謝経路を担う酵素群やトランスポーターの遺伝子変異は先天性魚鱗癬の原因となるが、この皮膚疾患には先天性魚鱗癬様紅皮症状などの炎症を伴うタイプと、葉状魚鱗癬などの炎症をほとんど伴わないタイプが存在し、その違いが何に起因するかは明確になっていない。アシルセラミド代謝経路の異常によってケラチノサイトや免疫細胞がどのような応答を引き起こすかという観点での研究はこれまで非常に限られているが、本研究により先天性魚鱗癬モデルマウスである *Pnpla1* 欠損マウスの表皮では、 ω -O-アシルセラミド生合成の前駆体である ω -水酸化セラミドなどが蓄積すること、ランゲルハンス細胞が顕著に増加すること、 ω -水酸化セラミドがケラチノサイト内に蓄積すると、GM-CSF や BMP7 の産生が促進されることなどを見出した。これ

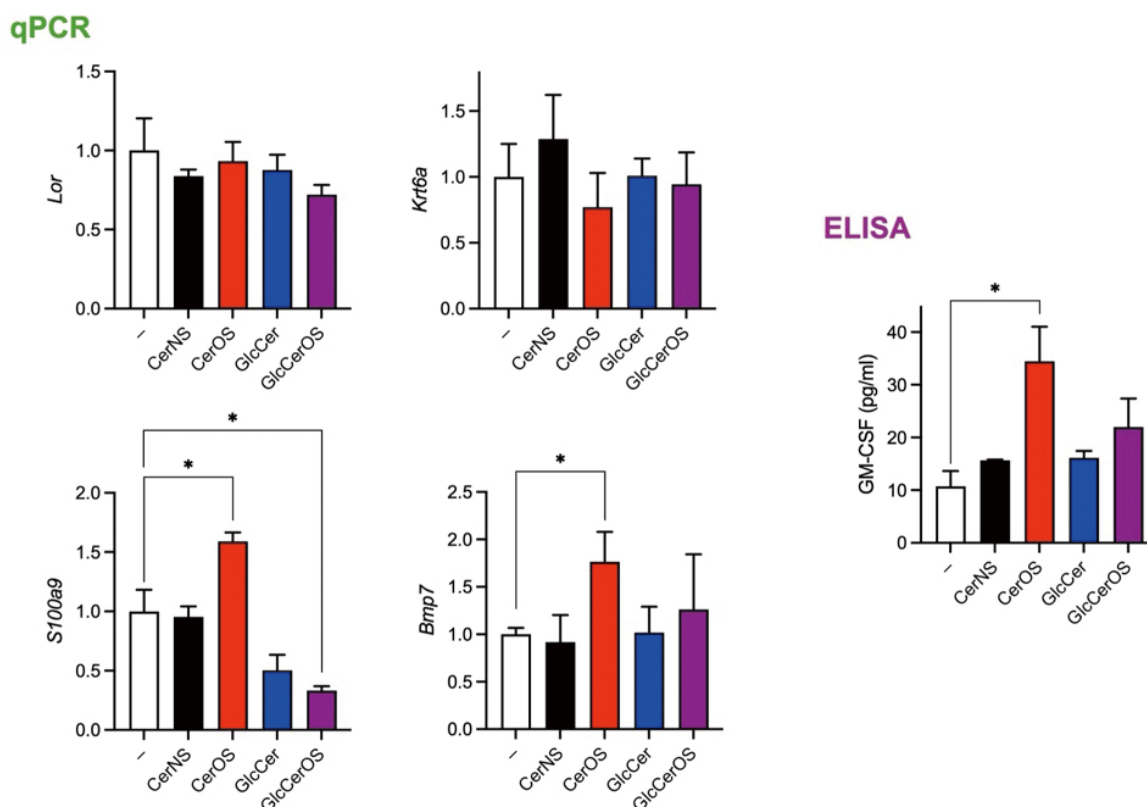


図4 アシルセラミド関連代謝物を作用させた時のケラチノサイトの応答
CerNS: 通常のセラミド、CerOS: ω -水酸化セラミド、GlcCer: グルコシドセラミド、GlcCerOS: ω -水酸化グルコシドセラミド

らのサイトカインはランゲルハンス細胞の成熟や活性化を促進する作用を持つため、今後はアシルセラミド代謝に異常が生じた際に、*in vivo*で実際にこのような分子機序によって炎症応答が促進されるか、ランゲルハンス細胞欠損マウスなどを用いて検証する必要があると考えている。

Pnpla1 欠損マウスの皮膚では炎症応答が亢進している一方で、抗炎症性脂質メディエーターである *N*-アシルエタノールアミンの産生に関わる細胞質型ホスホリパーゼ A2G4E⁴⁾ の発現が誘導されており、加えて様々な分泌性ホスホリパーゼ A₂ の発現量も増減していることから、炎症病態は非常に複雑であることが予想される。実際、いくつかの先天性魚鱗癬のタイプでは、皮膚におけるサイトカインの発現パターンは、Th17 応答が深く関わりとされる乾癬に似ているという報告が複数なされているが、*Pnpla1* 欠損マウスの場合は炎症性角化症の 1 つである毛孔性紅色乾癬 CARD14 ノックインマウスと極めて類似しているものの⁵⁾、IL17 の発現誘導は非常に弱く、炎症の起点は T 細胞の活性化ではないことが示唆される。また、*Pnpla1* 欠損マウスの表皮由来の脂質成分によって骨髓由来樹状細胞のサイトカイン産生が増強されることも見出し、今後の研究の発展により炎症惹起の原因となる脂質代謝異常の責任分子とを同定できれば、皮膚の状態を評価する新しい指標となるとともに、表皮上層という局所で生じた脂質代謝異常が真皮や免疫細胞などの内層細胞に認識される分子機序についての理解も深まるであろう。本研究を契機として、アシルセラミド代謝経路の適切な制御によって皮膚バリア機能の強化と炎症の抑制を両立する方策の理論基盤を構築することができれば、その知見を炎症やアレルギーを予防して美しい肌を維持するための新たなスキンケア戦略に応用することで、コスメトロジーのさらなる進展への寄与が期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より御礼申し上げます。また多大なご助言とご協力を頂きました順天堂大学アトピー疾患研究センターの北浦次郎先生、伊沢久未先生、貝谷綾子先生、先天性魚鱗癬モデルマウスをご供与頂きました名古屋大学医学系研究科皮膚 秋山真志先生、武市拓也先生に深く感謝致します。

(引用文献)

- 1) Hirabayashi T, Anjo T, et al. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun* 8, 14609, 2017
- 2) Hirabayashi T, Kihara A, Murakami M. The role of PNPLA1 in ω -O-acylceramide synthesis and skin barrier function. *Biochim. Biophys. Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864 (6), 869-879, 2019
- 3) Takeichi T, Hirabayashi T, et al. SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation. *J Clin Invest* 130, 890-903, 2020
- 4) Liang L, Takamiya R, Miki Y, Heike K, Sugimoto N, Yamaguchi M, Shitara H, Nishito Y, Kobayashi T, Hirabayashi T, Murakami M. Group IVE cytosolic phospholipase A₂ limits psoriatic inflammation by mobilizing the anti-inflammatory lipid *N*-acylethanolamine. *FASEB J*, 36, e22301, 2022
- 5) Yoshikawa T, Takeichi T, Hirabayashi T, Muro Y, Miyasaka Y, Ohno T, Akiyama M. Hyperactivation of the IL-17 axis and IL-36 signaling in *Card14*-mutant pityriasis rubra pilaris model mice. *J Invest Dermatol* 145 (2): 427-432, 2025