【解説】

リポミクスが紐解く新たな脂質代謝 難治性皮膚疾患を調節する新しいリゾリン脂質の発見

山本 圭

脂質は核酸・タンパク質・糖質と並ぶ生命活動に必須な生体物質であり、エネルギー源・細胞膜成分・シグナル物質として機能する一方で、その代謝系の破綻は多岐にわたる疾患と関連する。近年、質量分析計を用いた脂質分子の網羅的メタボローム分析（リポミクス）が可能となり、遺伝子改変マウスの表現型の解析に導入することで、これまでの手法では観察できなかった微量脂質の発見が相次いでいる。本稿では、リン脂質代謝に着目したリポミクス解析から明らかとなった乾癬や皮膚がんなどの難治性皮膚疾患を制御する新しいリゾリン脂質について紹介する。

リポミクス

脂質は、ゲノムにコードされない、極めて微量で半減期が短いなどの理由で困難な研究対象であった。近年、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分離技術の向上と質量分析（MS）の普及によって、LC-MSによ

る脂質分子の高感度・高選択的な網羅的メタボローム分析が可能となった。この脂質分子のメタボローム解析はリポミクスと呼ばれ、分子種の多様性をもつ脂質の包括的な研究手法として注目されている。しかしながら、脂質には脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度の違いの組み合わせが多様であり、同じグループ内の分子群でも物理化学的性質が大きく異なることから、すべての脂質分子を対象にした網羅的解析は非常に困難である。そのため対象分子種によってはガスクロマトグラフィー（GC）と組み合わせたGC-MS法による分析も必要となる。LC-MS法はクロマトグラフィーの分離度としてはGCに劣るが、試料の誘導体化が不要であり三連四重極質量分析計を用いたMS/MS検出が可能である。さらに近年の質量分析計の技術革新により、質量精度の高いLC-MSを用いた包括的な定量技術が開発され、新しい脂質分子群の発見につながっている。本稿では後述のホスホリパーゼA₂（PLA₂）の機能解析に合わせ、われわれが開発してきた三連四重極質量分析計を用いたリン脂質、リゾリン脂質、脂肪酸および脂肪酸代謝産物の定量系⁽¹⁾について紹介する。

一般的に大気圧イオン化法の一つであるエレクトロス

The Technology of Lipidomics Elucidates New Lipid Pathways: Discovery of New Lysophospholipid as a Regulator of Epidermal-Hyperplastic Diseases
Kei YAMAMOTO, 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生体分子機能学分野

◆◆◆ コ ラ ム ◆◆◆

筆者が学生だった頃、卒業研究でお世話になった医学部生化学教室では生体試料から酵素を分離精製し、種々の脂肪酸に対する基質特異性を、酸素電極法、薄層クロマトグラフィー法や高速液体クロマトグラフィー法を用いて調べていた。研究試料のブタの血液や脳（頭蓋骨）を分けていただくために食肉センターに何度も通った。研究室に持ち帰った血液から調製した白血球から酵素を精製し、精製した酵素と脂肪酸を反応させて得られた脂質過酸化体を高速液体クロマトグラフィー法を用いて分離精製し、別の日にいただいたブタ頭蓋骨から調製した下垂体初代培養細胞に脂肪酸代謝産物を片っ端から添加し、生理活性を調べる泥臭い実験の日々が続いた。研究室には、脂質抽出用の大きなガラスカラムやエバポレーターが林立し、有機溶媒臭が漂い、医学部といえども生化学教室はどちらかというと有機化学の研究室であったことが思い出される。それから20年後、質量分析法の躍進は脂質の研究手法を大きく転換させた。従来の高速液体クロマトグラフィーによ

る測定では紫外外部吸収のある脂質分子あるいは蛍光標識した脂質分子に限られていたが、現在では質量分析法により1,000倍以上の感度で水酸基の位置や脂肪酸の側鎖情報も含めた脂質分子の定性定量が可能となり、リン脂質やリゾリン脂質であれば組織1mgもあれば十分である。特に遺伝子改変マウスの表現型解析では威力を発揮し、新しい脂質の機能が次々と発見されている。一方、リピドミクスを行うと膨大なデータを得ることになり、そこから何かを語ろうとするとパソコンのデータ処理能力のみならず研究者自身の知的能力の向上も必要となってくる。遺伝子改変マウスの表現型が語る知見とリピドミクス情報を結びつけ、解が得られたときの達成感は何ものにも代えがたい。脂質領域以外の生命科学の研究者にとっては、「脂質は手をつけることが難しい領域」のようである。われわれのような脂質研究者にとって、そうした方々の参入や若い研究者の柔軟な考えが、リピドミクス情報という宝の山から新しい脂質の概念を導き出す原動力となることは確かである。

プレーイオン化法（ESI）はイオン性・高極性化合物に対して有効であり、測定の障害となる不揮発性の水溶性低分子化合物と容易に分離できることから、脂質の分析に非常に適している。三連四重極分析計は2つの四重極質量分析計（Q）と衝突室（q）を挟んで直列（Q1-q2-Q3）に連結したものである。一つ目の四重極（Q1）で定量分析対象のイオン（プレカーサーイオン）のみを選択させ、アルゴンや窒素などの不活性ガスを衝突ガス（コリジョンガス）として導入した衝突室内でイオンはガスと衝突し（衝突誘起解離）、化学結合の弱い部位で開裂する。開裂したイオン群（プロダクトイオン）を2つ目の四重極（Q3）でさらに質量分析を行う。Q3においてプロダクトイオンのみを透過させると選択的反応検出（MRMまたはSRM）法となり、高感度な定量分析が可能となる。脂質の分子量関連イオンは $[M+H]^+$ および $[M-H]^-$ で観察されるが、一般に負イオンで観察されるイオン強度は正イオンのそれと比べて弱い傾向がある。しかしながら、酸化脂肪酸や脂肪酸の場合では、脂肪酸由来のフラグメントは $[RCOO]^-$ となり、負イオンでのみ検出可能である。また、リン脂質の場合、MS/MSの開裂により産生された脂肪酸フラグメントが負イオンで観察され、リン脂質に含まれる脂肪酸種を特定することが可能となる（図1A）。

脂肪酸、リゾリン脂質およびリン脂質の分析はBligh

& Dyer法により抽出した総脂質を用いる。酸化脂肪酸は脂質とはいえ比較的極性が高いため水層に残ってしまうことがあり適当ではない。また生体試料中に含まれる酸化脂肪酸は非常に微量であるためメタノール抽出の後に固相抽出法によりクリーンアップおよび濃縮を行うことにより高感度な分析が可能となる。

リン脂質は親水性の極性頭部および疎水性のアシル基を有するため、順相カラムでは極性基による分離が、逆相カラムでは脂肪酸の鎖長や不飽和度の違いによる分離が可能である。リピドミクスでは、脂質をHPLCにより分離した後にMSを用いて定量分析することからイオン化が容易な逆相系を用いる。逆相系のHPLCにより脂質を分析した場合、大まかに極性の高い順番、すなわちプロスタグランジン（PG）類などの酸化脂肪酸、脂肪酸、リゾリン脂質、リン脂質の順で溶出してくる（図1B）。しかしながら、これらの脂質分子を同じ条件で測定すると保持時間の長い脂質分子のピーク幅が広がる。また同一の溶媒で測定すると酸化脂肪酸とリン脂質のイオン化効率が違うため一部の脂質の測定感度が低下する。そこで酸化脂肪酸とそれ以外の脂質分子の測定を分け、それぞれの脂質分子群に適合した溶媒とイオン化の条件を選択している。酸化脂肪酸の代表格の一つであるPGE₂とPGD₂は水酸基とケト基に関する位置異性体である。低エネルギーによる衝突誘起解離ではPGのMS/MSでは

図1 ■ LC-MSによる脂質の同定

(A) PE (18:0/20:4), PE (18:0/22:6), P-PE (18:0/22:6) のMS/MSスペクトル。リン脂質分子の分子量関連イオンは $[M-H]^-$ で観察される。MS/MSの開裂により産生された脂肪酸フラグメントは、負イオンで観察される。それゆえにQ1として $[M-H]^-$ 、Q3として脂肪酸フラグメントと設定すれば、脂肪酸種を特定したリン脂質の同定が可能となる。(B) リン脂質、リゾリン脂質、脂肪酸のクロマトグラム。C18系の逆相カラムおよびアセトニトリル/メタノール/2-プロパノール系の溶媒を用いて分析した。(C) PGE₂とPGD₂のクロマトグラム。C18系の逆相カラムおよびアセトニトリル/メタノール系の溶媒を用いて分析した。PGE₂とPGD₂は位置異性体の関係にあり、高感度分析を行うためには共通のフラグメント (Q1: 351.2, Q3: 271.2) を用いる。両者の区別はHPLCの保持時間により行う。(D) キラルカラムを用いた分析。逆相系でも使用できるキラルカラムを用いるとリノール酸代謝産物の9R-HODEと9S-HODEを分離することができる。

五員環部分での開裂は起きにくいいため、高感度の分析を行うためには共通のフラグメントを用いている。そのためPGE₂とPGD₂の区別はHPLCの保持時間により行うことになる(図1C)。また、アラキドン酸(AA)やリノール酸のリボキシゲナーゼ代謝産物であるヒドロキシエイコサテトラエン酸(HETE)類やヒドロキシオクタデカエン酸(HODE)のような光学異性体をもつ脂質分子を分析する場合は、逆相系でも使用できるアミロース誘導体を固定化したキラルカラムを用いている(図1D)。

ここに紹介したシステムは後述のPLA₂の生体内機能の網羅的解析に合わせたものである。脂質は分子によって物理的性質が大きく異なるものであり、研究目的によってシステムを選択する必要がある。リポドミクスの詳細についてはほかの総説を参考にさせていただきたいが、高感度の質量分析計と脂質のイオン化法の開発が脂質研究を大きく転換させ、これまでの手法では観察でき

なかった微量脂質の発見が相次いでいる。また、最近では質量分析情報と位置情報を統合した質量顕微鏡も大きく進歩し、組織内や細胞内での脂質分子の局在を観察することが可能となりつつある。

ホスホリパーゼA₂ (PLA₂)

PLA₂は、グリセロリン脂質のsn-2位のエステル結合を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である(図2)。この反応は、一般にはAA代謝の初発反応として認識されており、PLA₂により膜リン脂質のsn-2位から遊離されたAAは、下流の代謝酵素によりPGやロイコトリエン(LT)などの脂質メディエーターへと変換され、さまざまな生命応答と関連する。しかしながら、この概念はPLA₂の全体像を語るには不十分である。哺乳動物のゲノムにはPLA₂に相応する名称をもつ分子が30種類以上存在し、各PLA₂は固有の発現

図2 ■ ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)

PLA₂はリン脂質のsn-2位のエステル結合を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を産生する。産生された脂質分子は代謝酵素によって脂質メディエーターに変換される。PLA₂の基質となるリン脂質はPC, PE, PSなどの極性基(X)の違いだけでなく、グリセロール骨格のsn-1位の結合様式によっても複数のサブクラスが存在する。

分布と基質選択性を示し、生体内局所環境に応じて多様な脂質代謝産物を動員する。

PLA₂の基質となるリン脂質は、ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)などの極性基の違いだけでなく、グリセロール骨格のsn-1位の炭化水素鎖がエステル結合したもののほかにO-アルキル結合(エーテル型)あるいはO-アルケニル結合(ビニルエーテル型)をもつサブクラスも存在する(図2)。これに加えてsn-1位とsn-2位に結合している脂肪酸の違いを考慮すると膨大な数の分子種を構成する。PLA₂の多くは基質としてこれらのリン脂質を選択的に認識する。PLA₂分子群は構造上および局在の違いから、細胞質PLA₂(cytosolic phospholipase A₂: cPLA₂; 6種類)、Ca²⁺非依存性PLA₂(Ca²⁺-independent phospholipase A₂: iPLA₂; 9種類)、分泌性PLA₂(secretory phospholipase A₂: sPLA₂; 11種類)血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ(Platelet-activating factor acetyltransferase: PAF-AH; 4種)およびその他のファミリーに分類される。さらに、広義のPLA₂ファミリーの中には、リン脂質のsn-2位のエステル結合を加水分解する活性だけでなく、sn-1位を切るPLA₁活性や中性脂質を分解するリパーゼ活性、さらにはPLA₂の逆反応であるトランスアシラーゼまたはアシルトランスフェラーゼ活性を有する酵素もある。そのため、生体内におけるPLA₂の機能を把握するためには、各サブタイプの酵素学的・構造学的特徴を理解したうえで、その発現細胞や標的基質の存在状態を考慮する必要がある。

cPLA₂ファミリーのプロトタイプであるcPLA₂αは、

細胞質Ca²⁺とMAPキナーゼによるリン酸化により活性化し、生体内のさまざまな局面でAA代謝に必須であることがわかっている。本酵素の調節機構と生体内機能については優れた総説があるのでそちらを参照されたい⁽²⁾。cPLA₂ファミリーには6種のサブタイプを有するが、cPLA₂α以外のサブタイプの機能は不明であった。最近、*in vitro*の生化学的研究から、cPLA₂εが脂質メディエーターの一群であるN-アシル脂肪酸(広義のエンドカンナビノイド)の産生にかかわる可能性が提唱された⁽³⁾。すなわち、cPLA₂εはCa²⁺依存的にリン脂質のsn-2位ではなくsn-1位の脂肪酸をPEの極性アミノ基に転移するトランスアシラーゼとして働き、生じたN-アシルPEがさらに代謝されてN-アシル脂肪酸を生じる。N-アシル脂肪酸には抗炎症、鎮痛、食欲調節作用があり、cPLA₂εが生体内において実際にこれらの現象にかかわるのかについては本酵素の欠損マウスを用いた*in vivo*の解析が待たれる。

Ca²⁺非依存性PLA₂(iPLA₂)は別名PNPLA(patatin-like phospholipase A)とも呼ばれ、真核生物に普遍的に存在していることから、生体膜の新陳代謝やエネルギー代謝といった本質的には生命の維持に必須の脂質代謝にかかわるものと推察されている。哺乳動物には9種のiPLA₂サブタイプが存在するが、このファミリーには定義上のPLA₂反応とは異なる酵素活性を示すものが多く、PLA₂としての役割が実証されているのはPNPLA9(iPLA₂β)のみである⁽⁴⁾。PNPLA8(iPLA₂γ)はPLA₂活性を有するが、リン脂質のsn-2位が高度不飽和脂肪酸(PUFA)の場合には主にPLA₁として作用する⁽⁵⁾。

PNPLA1は表皮に特異的に発現しているサブタイプで、角質に特有のバリア脂質であるアシルセラミドの生成にかかわるトランスアシラーゼであり⁽⁶⁾、本酵素の欠損または変異による表皮バリアの破綻は魚鱗癬と関連する⁽⁷⁾。そのほかのPNPLAについてはほかの総説があるのでそちらを参照されたい⁽⁸⁾。

分泌性PLA₂ (sPLA₂)は哺乳動物において11種のサブタイプが存在する。一般にsPLA₂は細胞外に存在するリン脂質（たとえば膜小胞、リボタンパク質、肺サーファクタント、細菌膜、食事中脂質など）をCa²⁺依存的に加水分解する。プロトタイプであるsPLA₂-IBは膵臓から腸管内腔に分泌されて食事リン脂質の消化にかかわり⁽⁹⁾、一方、sPLA₂-IIAは感染や炎症時に発現誘導され、細菌膜リン脂質を分解して生体防御にかかわるとともに、膜小胞リン脂質を分解してAA代謝物を動員することで炎症を増悪する^(10, 11)。両酵素とも基質となるリン脂質の脂肪酸には選択性を示さないが、sPLA₂-IIAに関してはPEのほうがPCよりもはるかに分解されやすい。さらにホスファチジルグリセロールも良い基質であり、これは本酵素が強い溶菌活性をもつ要因となっている。リポドミクスにより脂肪酸種を含むリン脂質の解析が可能となり、sPLA₂はcPLA₂αほどではないが脂肪酸にある程度選択性を示すこと、極性基だけでなくリン脂質のグリセロール骨格の結合様式に選択性を示すことがわかってきた。

PLA₂の基質選択性

酵素の基質選択性を知るためには反応初速度を見る必要があり、このためには適切な酵素濃度、基質の濃度と組成、反応時間を設定する必要がある。従来の酵素活性測定系では生体内に存在しない単一の標識リン脂質や鎖長の短い脂肪酸をもつリン脂質が用いられており問題がある。筆者らは、sPLA₂サブタイプの基質選択性を*in vitro*の系で評価するにあたって、当該sPLA₂が本来局在している組織あるいは細胞から抽出した全リン脂質に異なる濃度のPLA₂を添加し、基質であるリン脂質分子種の減少ならびに代謝産物である脂肪酸とリゾリン脂質の増加をリポドミクスにより定量している。高濃度ではすべてのリン脂質が一樣に加水分解されてしまうが、酵素濃度を下げると明らかな基質選択性が見られる。試験管内での評価系はあくまでも人為的条件なので、後に述べるマウスを使った解析結果と照合して総合評価する必要があるが、PLA₂を理解する上で*in vitro*の系は重要な情報を提供してくれる。一般に*in vivo*のほうが*in*

*vitro*よりも明確な基質選択性が見える場合が多く、これは*in vivo*におけるPLA₂の局所濃度が*in vitro*の系で用いられる酵素濃度よりも低いことが一因と考えられる。実際に生体膜は多種多様なリン脂質により構成されているため、従来の生体内に存在しないリン脂質を基質とした活性評価は本来のsPLA₂の姿を反映しているとはいえない。*In vivo*では標的となる局所膜のリン脂質組成、sPLA₂の下流に位置する脂質代謝酵素の発現や局在、脂質代謝産物の不安定性、さらには酵素活性調節因子の有無が脂質プロファイルに影響を及ぼすため、状況は複雑である。

sPLA₂過剰発現マウスを使ったりリポドミクス解析は、*in vivo*におけるsPLA₂の基質特異性をスクリーニングするうえで有益である。各sPLA₂過剰発現マウスの表現型はすべて同一ではない⁽¹²⁻¹⁷⁾。このことは個々のsPLA₂が酵素固有の表現型をもつことを示している。一般にsPLA₂過剰発現マウスの組織を用いて得られた脂質プロファイルの変化は容易に捉えられるが、過剰発現マウスでは本来内因性の酵素が発現していない細胞や組織においても強制的に発現させていることから、リポドミクスで得られた結果は注意を払って解釈する必要がある。一方、sPLA₂欠損マウスの対象組織のリポドミクスを行った結果、野生型マウスと比較して遺伝子欠損による表現型が認められれば、当該sPLA₂の基質と生成産物が決まる。この戦略は単純明快であるが、いくつかの問題を慎重に考慮する必要がある。①対照マウスと欠損マウスにおける脂質プロファイルが、直接的な影響によるものなのか、あるいは間接的なものであるか区別する必要がある。すなわち、観察される脂質の変化が、当該sPLA₂の本質的な基質と生成物を反映しているものか、あるいは単にほかのPLA₂やリパーゼの補填的影響を反映しているか考慮する。②パルミチン酸やステアリン酸は組織全体における絶対量が高い。また、一般的に不安定な酸化脂肪酸代謝物は即座に別の代謝産物に分解されるとともにリゾリン脂質はリン脂質に再利用される。このようにバックグラウンドが高かったり代謝回転の速い脂質は、局所における時空間的な脂質代謝の本質的解明に影響を与える。③仮に脂質プロファイルの表現型が得られたとしても、当該組織において対象となるsPLA₂の発現が認められず、酵素反応の本質を反映しない場合がある。そのような場合、遠隔地にある臓器の影響が考えられ、対象となるsPLA₂が内在的に発現する遠隔臓器を使った分析が必要となる。④sPLA₂は微少環境組織から分泌される細胞外のリン脂質に作用する。*In vivo*で得られた結果を*in vitro*において

適切に証明できない場合がある。一つ目はターゲットとなるリン脂質がsPLA₂分泌細胞そのものである可能性があり、基質となるリン脂質およびsPLA₂の発現量および分泌細胞自体の状態を注意深く検討する必要がある。2つ目はsPLA₂分泌細胞あるいは近隣の細胞から分泌されたマイクロベシクルの生体膜を基質とする可能性があり、適切なsPLA₂分泌細胞とリン脂質供与細胞を使った共培養システムがsPLA₂の反応を評価するのに必要である。

筆者らのグループでは数年にわたってsPLA₂分子群の網羅的遺伝子改変マウスを作出し、リポミクス技術を組み合わせて網羅的に解析することで、sPLA₂は局所的かつ時期特異的な発現をすること、その微少環境中の固有のリン脂質を動員し、さまざまな生命応答にかかわることを明らかとしてきた⁽¹²⁻¹⁹⁾。本稿ではsPLA₂-IIFの解析を通して明らかにした難治性皮膚疾患を調節する新しいリゾリン脂質について紹介する⁽¹⁶⁾。

難治性皮膚疾患を調節する新しいリゾリン脂質の発見

脂質は皮膚のホメオスタシスを考えるうえで非常に重要な生体成分である。外界に接する皮膚表面の表皮角化細胞（ケラチノサイト）はセラミドの層を作り、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。ケラチノサイトは分化と増殖を繰り返し、このサイクルが壊れると皮膚のバリアが乱れ、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。しかしながら、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。sPLA₂-X⁽¹³⁾やsPLA₂-IIA⁽²⁰⁾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認められず、sPLA₂-X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sPLA₂-IIFの発現が野生型マウスの皮膚においてほか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sPLA₂-X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、sPLA₂-IIFは表皮の顆粒層から角質層に局在する主要なsPLA₂であり、ヒト乾癬の表皮肥厚部位で増加していた。このことはsPLA₂-IIFが表皮肥厚性疾患に関与することを示唆しており、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。

sPLA₂-IIF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。一方、sPLA₂-IIF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sPLA₂-IIFの発現が著しく誘導されたが、sPLA₂-IIF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、sPLA₂-IIF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、sPLA₂-IIF欠損マウスに表皮肥厚性疾患のモデルとなるような乾癬、接触性皮膚炎および皮膚がんを惹起してsPLA₂-IIF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⁽²¹⁾。この乾癬モデルをsPLA₂-IIF欠損マウスの耳介に施行すると、野生型と比較して表皮の肥厚および乾癬の発症や悪化に関与する*SI100a9*や*Il1f6* mRNA量の増加が抑制され、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sPLA₂-IIFの発現が強く誘導されたが、sPLA₂-IIF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sPLA₂-IIFが関与することが示唆された。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⁽¹⁸⁾。この接触性皮膚炎モデルを惹起したsPLA₂-IIF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sPLA₂-IIF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⁽²²⁾。この二段階皮膚がんモデルを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、sPLA₂-IIF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sPLA₂-IIFの機能には、この

図3 ■ sPLA₂-IIIFの作用機序

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sPLA₂-IIIF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。

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sPLA₂-IIIFが動員する責任脂質パスウェイを同定するため、sPLA₂-IIIF過剰発現マウスの皮膚についてリポドミクスを行った。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) をもつ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sPLA₂-IIIF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sPLA₂-IIIF欠損マウスの皮膚についてリポドミクスを施行した結果、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、sPLA₂-IIIF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リポドミクスを行ったところ、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sPLA₂-IIIF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、sPLA₂-IIIF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。P-LPEの生理機能を明らかにするために、sPLA₂-IIIF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sPLA₂-IIIF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sPLA₂-IIIF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ものと結論した (図3)。sPLA₂-IIIFはケラチノサイトから分泌されるリン脂質に作用し、DHAをも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⁽²³⁾。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もつことを示した初めての報告であり、今後は、P-LPEおよびsPLA₂-IIIF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。

おわりに

リポドミクス解析技術の急速な進歩が、これまで想定されていなかった未知の脂質代謝経路を明らかにしてきた。紙面の都合上、sPLA₂-IIIFのみの紹介にとどまったが、各PLA₂が生体内の異なる局面で固有の脂質代謝を動員し、多彩な生命現象にかかわることが明らかにされつつある⁽¹⁹⁾。また、本稿で紹介したリポドミクス解析のストラテジーはリン脂質代謝のみならずほかの生理活性物質の機能解析にもつながることが想定され、新たな疾患バイオマーカーや創薬の創成につながることが期待される。

文献

- 1) K. Yamamoto, Y. Miki, H. Sato, R. Murase, Y. Taketomi & M. Murakami: *Methods Enzymol.*, **583**, 101 (2017).
- 2) T. Shimizu: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **49**, 123 (2009).
- 3) Y. Ogura, W. H. Parsons, S. S. Kamat & B. F. Cravatt: *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 669 (2016).
- 4) M. Basselin, A. O. Rosa, E. Ramadan, Y. Cheon, L. Chang, M. Chen, D. Greenstein, M. Wohltmann, J. Turk & S. I. Rapoport: *J. Lipid Res.*, **51**, 3166 (2010).
- 5) W. Yan, C. M. Jenkins, X. Han, D. J. Mancuso, H. F. Sims, K. Yang & R. W. Gross: *J. Biol. Chem.*, **280**, 26669 (2005).
- 6) T. Hirabayashi, T. Anjo, A. Kaneko, Y. Senoo, A. Shibata, H. Takama, K. Yokoyama, Y. Nishito, T. Ono, C. Taya *et*

- al.: Nat. Commun.*, **8**, 14609 (2017).
- 7) A. Grall, E. Guaquere, S. Planchais, S. Grond, E. Bourrat, I. Hausser, C. Hitte, M. Le Gallo, C. Derbois, G. J. Kim *et al.: Nat. Genet.*, **44**, 140 (2012).
 - 8) P. C. Kienesberger, M. Oberer, A. Lass & R. Zechner: *J. Lipid Res.*, **50**(Suppl.), S63 (2009).
 - 9) E. D. Labonté, R. J. Kirby, N. M. Schildmeyer, A. M. Cannon, K. W. Huggins & D. Y. Hui: *Diabetes*, **55**, 935 (2006).
 - 10) E. Pernet, L. Guillemot, P. R. Burgel, C. Martin, G. Lambeau, I. Sermet-Gaudelus, D. Sands, D. Leduc, P. C. Morand, L. Jeammet *et al.: Nat. Commun.*, **5**, 5105 (2014).
 - 11) L. H. Boudreau, A. Duchez, N. Cloutier, D. Soulet, N. Martin, J. Bollinger, A. Paré, M. Rousseau, G. S. Naika, T. Lévesque *et al.: Blood*, **124**, 2173 (2014).
 - 12) M. Ohtsuki, Y. Taketomi, S. Arata, S. Masuda, Y. Ishikawa, T. Ishii, Y. Takanezawa, J. Aoki, H. Arai, K. Yamamoto *et al.: J. Biol. Chem.*, **281**, 36420 (2006).
 - 13) K. Yamamoto, Y. Taketomi, Y. Isogai, Y. Miki, H. Sato, S. Masuda, Y. Nishito, K. Morioka, Y. Ishimoto, N. Suzuki *et al.: J. Biol. Chem.*, **286**, 11616 (2011).
 - 14) Y. Taketomi, N. Ueno, T. Kojima, H. Sato, R. Murase, K. Yamamoto, S. Tanaka, M. Sakanaka, M. Nakamura, Y. Nishito *et al.: Nat. Immunol.*, **14**, 554 (2013).
 - 15) H. Sato, Y. Taketomi, A. Ushida, Y. Isogai, T. Kojima, T. Hirabayashi, Y. Miki, K. Yamamoto, Y. Nishito, T. Kobayashi *et al.: Cell Metab.*, **20**, 119 (2014).
 - 16) K. Yamamoto, Y. Miki, M. Sato, Y. Taketomi, Y. Nishito, C. Taya, K. Muramatsu, K. Ikeda, H. Nakanishi, R. Taguchi *et al.: J. Exp. Med.*, **212**, 1901 (2015).
 - 17) R. Murase, H. Sato, K. Yamamoto, A. Ushida, Y. Nishito, K. Ikeda, T. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Taketomi & M. Murakami: *J. Biol. Chem.*, **291**, 6895 (2016).
 - 18) Y. Miki, K. Yamamoto, Y. Taketomi, H. Sato, K. Shimo, T. Kobayashi, Y. Ishikawa, T. Ishii, H. Nakanishi, K. Ikeda *et al.: J. Exp. Med.*, **210**, 1217 (2013).
 - 19) M. Murakami, H. Sato, Y. Miki, K. Yamamoto & Y. Taketomi: *J. Lipid Res.*, **56**, 1248 (2015).
 - 20) D. S. Grass, R. H. Felkner, M. Y. Chiang, R. E. Wallace, T. J. Navelainen, C. F. Bennett & M. E. Swanson: *J. Clin. Invest.*, **97**, 2233 (1996).
 - 21) L. Tortola, E. Rosenwald, B. Abel, H. Blumberg, M. Schaffer, A. J. Coyle, J. C. Renauld, S. Werner, J. Kisielow & M. Kopf: *J. Clin. Invest.*, **122**, 3965 (2012).
 - 22) B. G. Modi, J. Neustadter, E. Binda, J. Lewis, R. B. Filler, S. J. Roberts, B. Y. Kwong, S. Reddy, J. D. Overton, A. Galan *et al.: Science*, **335**, 104 (2012).
 - 23) N. E. Braverman & A. B. Moser: *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1442 (2012).

プロフィール

山本 圭 (Kei YAMAMOTO)

<略歴>1993年徳島大学生物工学科卒業／1998年同大学院工学研究科博士後期課程修了／同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／2002年産業技術総合研究所特別研究員／2005年東京都臨床医学総合研究所主席研究員／2011年東京都医学総合研究所主席研究員／2015年徳島大学大学院社会産業理工学研究部准教授，現在に至る<研究テーマと抱負>健康と病態にかかわる脂質ネットワークの研究<趣味>日々の晩酌と旅行，愛犬との散歩<所属研究室ホームページ><http://www.bb.tokushima-u.ac.jp/>

Copyright © 2017 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.668