

## ヒト角質層セラミド分子種の全容の解明

～皮膚疾患の診断、肌美容とセラミド組成の関係解明に期待～

### ポイント

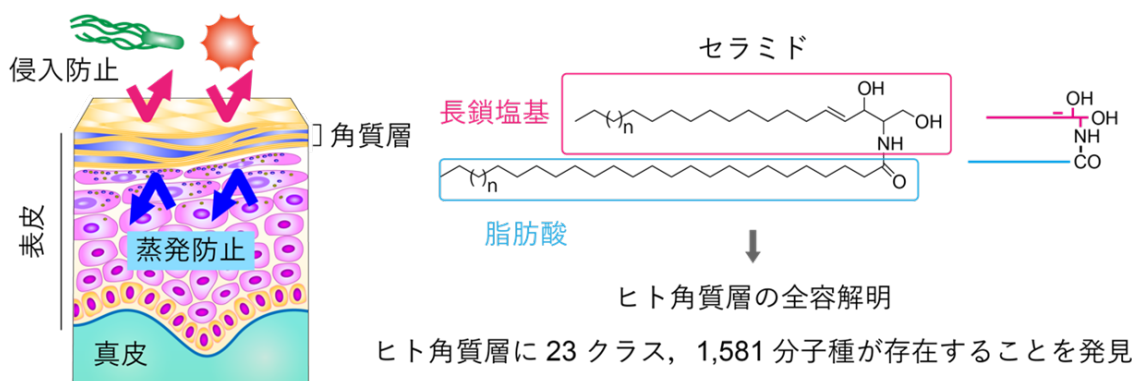
- ・セラミドの構成要素（脂肪酸、長鎖塩基）の炭素鎖長を区別して測定できる分析法を開発。
- ・ヒト角質層におけるセラミド分子種の全容を解明（1,581 分子種の同定）。
- ・多様な炭素鎖長をもつ長鎖塩基が産生される分子機構を解明。

### 概要

北海道大学大学院薬学研究院の木原章雄教授らの研究グループは、セラミド分子種を網羅的に解析する方法を開発し、ヒト角質層に 1,581 分子種が存在することを明らかにしました。

皮膚の最外層に存在する角質層（角層）には脂質の多層構造体が存在し、透過性バリア（皮膚バリア）を形成しています。この皮膚バリアは外界からの病原体、アレルゲンなどの侵入及び体内からの水分の損失を防ぐという私たちの健康にとって重要な働きをしており、その異常は感染症、アトピー性皮膚炎、乾燥肌、魚鱗癬<sup>\*1</sup>といった疾患の発症あるいはリスク増大につながります。角質層にはセラミドと呼ばれる脂質が多量に存在し、皮膚バリア形成において中心的な役割を果たしています。セラミドは長鎖塩基と脂肪酸という 2 本の疎水鎖が結合した構造をしていますが、25 クラス（長鎖塩基 5 種類、脂肪酸 5 種類の組み合わせの違い）に分類されます。また、それぞれのクラスの中にも長鎖塩基あるいは脂肪酸部分に炭素鎖長の違いが存在するため、全体の分子種としては 1,000 を超えると予測されていましたが、これまではその全容が明らかにされていませんでした。研究グループは液体クロマトグラフィー<sup>\*2</sup>（LC）とタンデム質量分析（MS/MS）を組み合わせた測定法により、今回初めてヒト角質層に 23 クラス、1,581 分子種が存在することを見出し、ヒト角質層セラミドの全容を解明することに成功しました。長鎖塩基側の炭素鎖長（C）としては C16 から C26 のものが存在していましたが、研究グループはそれらが産生される分子機構についても明らかにしました。本研究成果は皮膚疾患や肌状態とセラミド組成との関係の解明につながり、開発したセラミド測定法は皮膚疾患の診断や肌状態の計測に有用です。今後、医療や美容関連産業への応用が期待されます。

なお、本研究成果は、2022 年 5 月 30 日（月）公開の *Journal of Lipid Research* 誌に掲載されました。



本研究の概要図

## 【背景】

最近、セラミドを配合した化粧品のコマーシャルなどをよく聞くようになり、セラミドが皮膚に良いというイメージが定着してきました。実際、セラミドは皮膚の角質層に存在し、皮膚バリア形成に必須な脂質分子です。セラミドは単一の分子であると思われがちですが、実際は様々な種類が存在します。

セラミドは長鎖塩基と脂肪酸が結合した構造をもち、ヒトには長鎖塩基として5種類、脂肪酸として5種類存在しているため（図1）、これらの異なった組み合わせからなる25クラスにセラミドは分類されます。各セラミドクラスは構成する脂肪酸と長鎖塩基の略称の併記によって表します（例、NS、EOPなど）。これらのうち、P-Oタイプ以外の脂肪酸をもつセラミドを遊離セラミドと呼び、角質層の細胞（角質細胞）の間に存在する脂質の多層構造体中に存在しています。一方、P-Oタイプのセラミドは角質細胞の細胞表面をタンパク質と共有結合することで覆い、結合型セラミドと呼ばれます。EOタイプの脂肪酸をもつセラミド（アシルセラミド）と結合型セラミドは皮膚バリア形成において特に重要であり、これらの産生不全は魚鱗癬につながります。アトピー性皮膚炎患者ではセラミドの全体量の減少とクラス組成変化が起こることが知られています。

長鎖塩基、脂肪酸部分は共に、長い炭素鎖長をもつ炭化水素鎖で構成されています。これまで、脂肪酸部分の炭素鎖長の多様性に関しては既に知られていましたが、長鎖塩基側の炭素鎖長については主要であるC18のみしか詳細に解析されていませんでした。ヒト角質層にはこれらの長鎖塩基、脂肪酸部分の炭素鎖長の違いによる1,000を超えるセラミド分子種が存在すると推測されてきましたが、その実際の数や具体的に存在する分子種など、全体像は不明でした。

セラミドを含む脂質の分析には、液体クロマトグラフィー（LC）と質量分析（MS）を組み合わせた解析技術が近年急速に発展してきました。LCでは疎水性度などの性質の違いによって物質を分離し、MSでは質量（より正確には質量電荷比<sup>\*3</sup>）の異なる分子を分離して検出することができます。これまでの角質層セラミドの分析ではこのLC-MSによる解析が主流でした。しかし、ヒト角質層に1,000を超えるセラミド分子種が存在していることから、疎水性度の違いと質量の違いだけではすべての分子種を分離することはできませんでした。MSでの質量による分離では長鎖塩基と脂肪酸部分の質量の合計値が使用されるため、同じ合計値をもつ複数のセラミドは区別されずに測定されます。このため、従来のLC-MSによる解析では、ヒト角質層セラミドの分析には不十分でした。研究グループは三連四重極型質量分析計と呼ばれる質量分析計を用いることによって、二段階の質量分析（タンデム質量分析；MS/MS）を行い、炭素鎖長の合計が同じセラミドでも異なる分子種を区別して測定することができるようになりました。三連四重極型質量分析計には3つの部屋（Q1、Q2、Q3）があり、Q1で特定の質量をもつセラミド（プリカーサーイオン）を選択後、Q2で不活性ガス<sup>\*4</sup>を衝突させて分解（衝突誘起解離）させ、その壊れた断片のうち、特定の質量を持つもの（プロダクトイオン）だけをQ3で検出することができます（多重反応モニタリング）（図2）。研究グループはこの方法を用いて以前、ヒト角質層において遊離セラミド345分子種、結合型セラミド63分子種の計408分子種が存在することを見出し、報告しました。しかし、この時の測定では長鎖塩基の鎖長を主要と思われていたC18に絞って解析していたため、ヒト角質層セラミドの全体像解明には至っていませんでした。

## 【研究手法】

皮膚疾患がないヒトの腕からテープストリッピング<sup>\*5</sup>によって角質層を採取し、有機溶媒を用いて遊離セラミドを含む脂質を抽出しました。また、残った残渣をアルカリ処理することによって結合型セラミドを溶出させました。これらのセラミドはLC-MS/MSによって解析しました。細胞に4種類のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ<sup>\*6</sup>をそれぞれ発現させた後、細胞から脂質を抽出し、セラミドを

LC-MS/MSによって解析しました。

### 【研究成果】

研究グループはこれまでの長鎖塩基鎖長を C18 に絞った測定から他の鎖長にも拡大し、ヒト角質層の遊離セラミドの測定を行いました。その結果、ヒト角質層には C16 から C26 までの幅広い鎖長の長鎖塩基をもつ遊離セラミドが存在することが明らかとなりました (図 3A)。量的には C18 と C20 の長鎖塩基をもつ遊離セラミドが最も多く存在し、続いて C22、C17、C16、C21、C19、C24、C26、C23、C25 の順でした。脂肪酸と長鎖塩基の鎖長の異なった分子種の数では遊離セラミドクラスの中で NS セラミドが最も多く分子種を含んでおり、216 分子種でした (図 3B)。これに NDS (176 分子)、NP (164 分子種)、EOS (149 分子種) が続いていました。全体としては 18 クラス、1,327 分子種の遊離セラミドが存在していました。量的には NP (全体のセラミドの 29%)、NH (23%)、NDS (11%)、AH (9%)、EOS (8%) の順でした (図 3C)。

結合型セラミドにも遊離型セラミドと同様に C16 から C26 までの幅広い鎖長の長鎖塩基をもったセラミドが存在していました (図 3D)。量的に最も多かった結合型セラミドは C20 の長鎖塩基を含有したものであり、次いで C18 でした。分子種の数では P-OS が最も多くて 138 分子種、次いで P-OH (61 分子種)、さらに P-OSD (29 分子種)、P-OP (17 分子種)、P-ODS (9 分子種) であり、これら 5 クラスの分子種の合計は 254 でした (図 3B)。量的には P-OS が結合型セラミド全体の 82% を占め、P-OH が 15% でした (図 3E)。これらの結果をまとめると、遊離セラミドと結合型セラミドの合計で 23 クラス、1,581 分子種のセラミドがヒト角質層には存在し、C18 以外の鎖長をもつ長鎖塩基を含有するセラミドも数多く存在することが初めて明らかになりました。

研究グループは長鎖塩基の炭素鎖長の多様性を生み出す分子機構についても調べました。セラミド産生経路の最初のステップでは、セリンと呼ばれるアミノ酸と脂肪酸の活性化型であるアシル CoA が縮合します。この反応によってセリンから C2 が供与され、アシル CoA から残りの炭素鎖長が供与されず (例えば C16 アシル CoA、別名パルミトイル CoA からは C16 など)。このアシル CoA の長さの違いによって、様々な長さの長鎖塩基が生み出されます。この反応はセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) と呼ばれる酵素によって触媒されます。研究グループは今回、これら 4 種類の SPT の酵素活性を測定し、SPTLC1、SPTLC3、SPTSSB を構成タンパク質としてもつ SPT のみが C22 と C24 という長い炭素鎖長の長鎖塩基の産生を行うことができることを明らかにしました (図 4A、B)。

### 【今後への期待】

本研究は初めて角質層セラミドの全容を解明し、皮膚バリア形成の分子機構の解明に大きく寄与しました。本研究における角質層のサンプル調製はテープストリッピングという被験者の負担の少ない方法を用いました。今後、本測定を様々な皮膚疾患あるいは肌状態の患者・被験者から採取した角質層へ拡大することにより、セラミド組成と病態あるいは肌状態 (水分保湿量、肌理など) との関係が明らかになることが期待されます。

### 【謝辞】

本研究は日本学術振興会 (科学研究費補助金: JP18H03976、JP22H04986)、武田科学振興財団 (生命科学科学研究助成) から助成を受けて行われました。

論文情報

論文名 Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases (長鎖塩基の鎖長多様性を含むヒト角質層セラミドの全容解明)  
 著者名 鈴木まどか<sup>1</sup>、大野祐介<sup>1</sup>、木原章雄<sup>1</sup> (1北海道大学大学院薬学研究院)  
 雑誌名 Journal of Lipid Research (脂質生化学の専門誌)  
 DOI 10.1016/j.jlr.2022.100235  
 公表日 2022年5月30日(月)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 木原章雄 (きはらあきお)  
 TEL 011-706-3754 FAX 011-706-4900 メール kihara@pharm.hokudai.ac.jp  
 URL http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/index.html

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)  
 TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

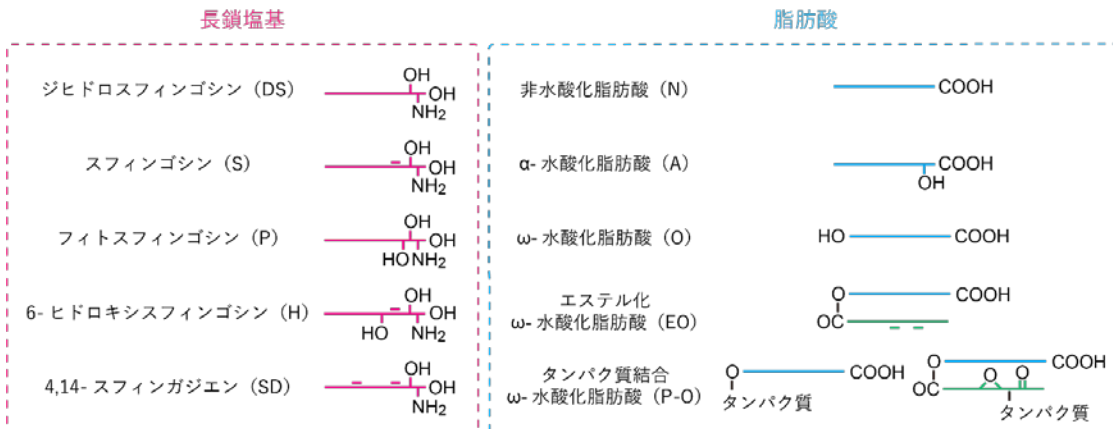


図1. セラミドの構成要素である長鎖塩基と脂肪酸の種類と構造模式図。

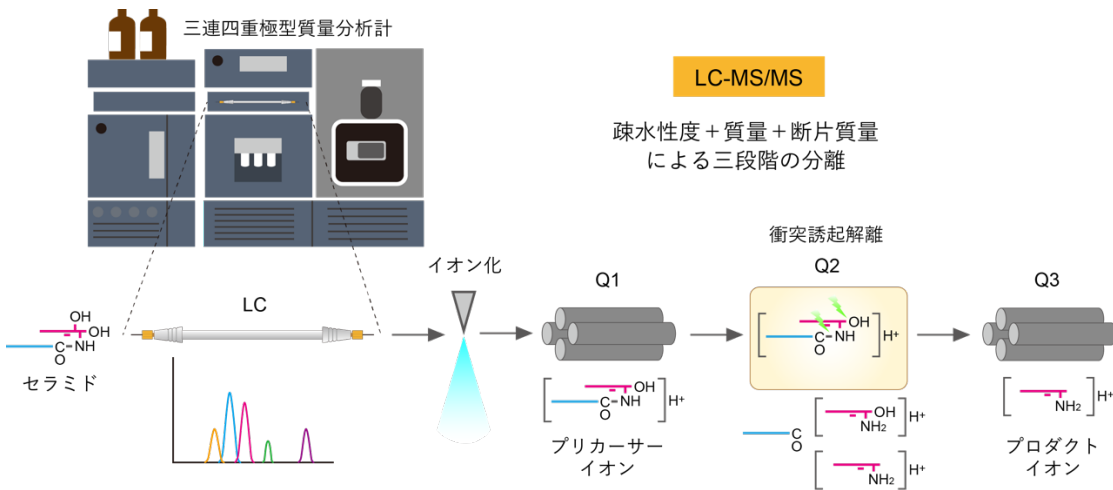


図2. LC-MS/MSによるセラミドの分離の模式図。

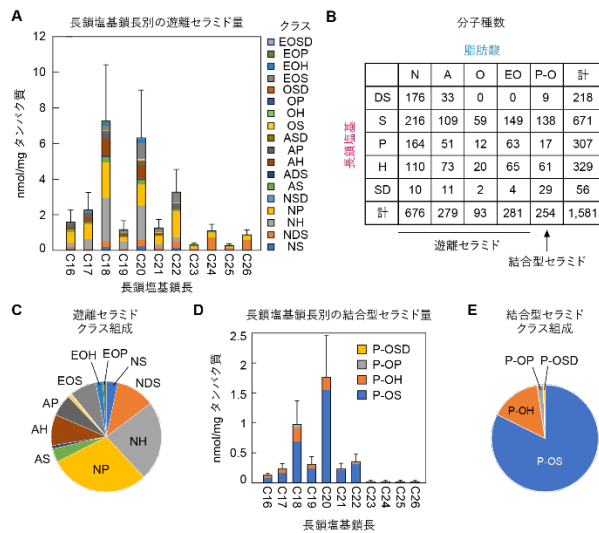


図 3. ヒト角質層セラミドの測定結果。遊離セラミドの長鎖塩基鎖長ごとの量 (A)、クラスごとのセラミド分子種の数 (B)、遊離セラミドのそれぞれのクラスの量が占める割合 (C)、結合型セラミドの長鎖塩基鎖長ごとの量 (D)、結合型セラミドのそれぞれのクラスの量が占める割合 (E) を示す。

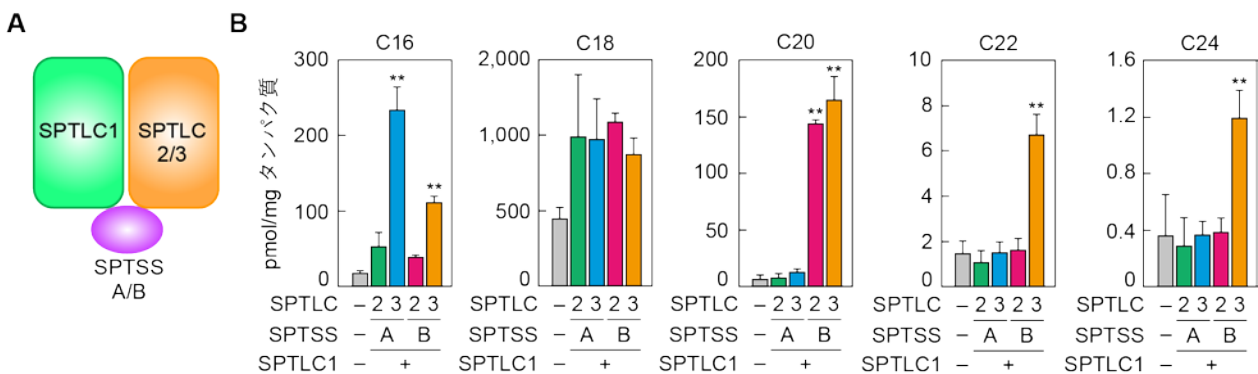


図 4. SPT による異なった鎖長の長鎖塩基産生。(A) SPT を構成するタンパク質。4 つの SPT はそれぞれ 3 つの構成タンパク質、すなわち SPTLC1、SPTLC2 または 3、SPTSSA または B が会合して形成される。(B) SPT を構成するタンパク質を図に記した組み合わせで発現させた細胞中で産生されたセラミドの量を長鎖塩基の鎖長ごと (それぞれのグラフの上に記載) に示す。アスタリスクは統計的な有意差を示す (\*\* $P < 0.01$ )。

### 【用語解説】

- \*1 魚鱗癬 … 角質層が肥厚する角化症で、皮膚が魚の鱗のように見えることからその名がついた。
- \*2 液体クロマトグラフィー … 物質を特定の性質の違いにより、分離する方法。今回は疎水性の違いにより分離している。移動相に液体を用いる。
- \*3 質量電荷比 … イオンの質量を電荷で割った値。
- \*4 不活性ガス … アルゴンのような化学反応性の低い気体のこと。
- \*5 テープストリッピング … テープを皮膚に貼り、剥がすことで角質層を採取する方法。
- \*6 セリンパルミトイルトランスフェラーゼ … 酵素の一種。トランスフェラーゼとは転移酵素の意味。セリンとアシル CoA から長鎖塩基の前駆体である 3-ケトジヒドロスフィンゴシンを産生する。