

**【緒言】**皮膚の最外層に位置する角層細胞間において、セラミド (ceramide: CER)、脂肪酸 (fatty acid: FA) およびコレステロールなどの脂質は、体内の水分保持や外界からの生体異物、細菌およびウイルスの侵入を防ぐ物理的バリアとしての役割を持つ。スフィンゴ脂質は、共通骨格としてスフィンゴイドを有する CER、スフィンゴミエリン (sphingomyelin: SM) およびグルコシルセラミド (glucosylceramide: GC) などの脂質の総称である。CER は、セラミダーゼ (ceramidase: CDase) によりスフィンゴイドおよび脂肪酸へと分解される。スフィンゴシン (sphingosine: SPH) は哺乳類における主要なスフィンゴイドであり、mouse alkaline ceramidase (maCER1) やモルモット表皮などにおけるアルカリ CDase (alkaline CDase: alkCDase) 活性に対する阻害作用を示す。アトピー性皮膚炎および乾癬などの患者角層中 CER 含量は健常人よりも少なく、皮膚バリア機能は低下している。アトピー性皮膚炎患者への CER 含有クリームを経皮適用により、皮膚バリア機能の指標の一つである経表皮水分損失量 (transepidermal water loss: TEWL) は健常人と同等のレベルまで改善することから、角層中 CER 含量を制御することにより皮膚バリア機能の改善が可能であると考えられる。現在、CER の直接的な補給を目的として、CER を含有した化粧品または医薬部外品が様々なメーカーより販売されている。しかし、CER の分解抑制という観点からの角層中 CER 含量制御については現在までに報告されていない。そこで、著者は皮膚中 CDase 活性の阻害による CER 含量の制御に着目した。

**【第1章】**ヒト表皮は、alkCDase および酸性 CDase (acidic CDase: aCDase) 活性を持つ。ヒト角層中 alkCDase 活性 (pH9.0) は加齢により上昇する。アトピー性皮膚炎患者皮膚には *Pseudomonas aeruginosa* より分泌された alkCDase が存在しており、CER 量減少の一因であると考えられている。本研究では CDase 阻害剤として SPH を選択し、ヘアレスマウス皮膚および三次元培養ヒト表皮中の alkCDase 活性および CER 含量への影響を調査した。すなわち、SPH または oleoylethanolamide (OEA) (positive control)、125 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) およびヘアレスマウス皮膚または三次元培養ヒト表皮ホモジネートを C12-NBD-CER (250  $\mu$ M) をコーティングした 1.5 mL チューブに添加し、インキュベート (37°C、1 または 10 時間) した。酵素反応を停止させ、生成物である C12-NBD-FA を HPLC により分離し、蛍光検出器 (励起波長: 460 nm、蛍光波長: 534 nm) を用いて定量することにより alkCDase 活性を測定した。ヘアレスマウス背部に 40 mM SPH または OEA を適用 (1 日 2 回、3 日間) した後に角層を採取し、脂質を抽出した。薄膜法により、SPH/DPPC/DPPG (4:4:1) から構成されるリポソーム (SPH および DPPC: 10 mM、DPPG: 2.5 mM) を調製した。SPH 含有リポソームを三次元培養ヒト表皮へ添加し、7 日間培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) した後に脂質を抽出した。脂質抽出液中の CER は薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography: TLC) 法により分離し、バンド密度より定量した。その結果、マウス皮膚ホモジネート中 alkCDase 活性に対する SPH の IC<sub>50</sub> は 0.09 mM であり、OEA の IC<sub>50</sub> (11.1 mM) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.001$ )。SPH 適用後における角層中 CER[AS]含量は SPH を適用することにより、normal 群 (4.3  $\mu$ g/mg stratum corneum (SC)) と比較して有意に増加した (7.1  $\mu$ g/mg SC、 $p < 0.01$ )。同様に、CER[AP]含量は SPH の適用により normal 群 (8.7  $\mu$ g/mg SC) と比較して有意に増加した (17.1  $\mu$ g/mg SC、 $p < 0.001$ )。三次元培養ヒト表皮ホモジネート中 alkCDase 活性に対する SPH の IC<sub>50</sub> は 0.11 mM であり、OEA の IC<sub>50</sub> (7.8 mM) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.01$ )。SPH 含有リポソーム適用後における三次元培養ヒト表

皮中 CER[NDS]含量は 15.8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であり、normal 群 (7.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) と比較して有意に高値を示した ( $p < 0.001$ )。以上より、SPH は OEA よりも優れた alkCDase 阻害剤となり得ることが明らかとなった。また、SPH の適用によりマウス角層および三次元培養ヒト表皮の CER 含量は増加することが明らかとなった。SPH の適用による CER 含量の増加メカニズムのひとつとして、皮膚中 alkCDase 活性の阻害が関与していることが示唆された。

**【第 2 章】** スフィンゴミエリン合成酵素 (sphingomyelin synthase: SMS) は、CER を SM へと変換する酵素である。SMS には SMS1、SMS2 および SMS 関連タンパク質 (SMS related proteins: SMSr) の 3 種類のアイソザイムが存在する。現在、SMS の機能解明を目的として SMS 遺伝子を欠損したマウスを用いた研究が行われており、様々な表現型が報告されているが、現在までに SMSKO マウスを用いた皮膚中 SMS 機能については報告されていない。SMS を欠損したマウス角層中における CER 含量は、野生型 (wildtype: WT) マウスとは異なることが予想される。また、SPH 適用後における SMSKO マウス角層中 CER 含量を WT マウスと比較することにより、SPH の適用による CER 増加メカニズムを明らかにすることができると考えた。本研究では、SMS2KO マウスにおける皮膚中スフィンゴ脂質代謝酵素活性、CER 前駆体である SM および GC 含量、角層中 CER 含量および皮膚バリア機能 (TEWL) を測定した。さらに、SMS2KO マウス皮膚への SPH 適用後における角層中 CER 含量を測定した。ターゲティングベクターを用いた相同組換えにより作成した SMS2KO マウスは山下匡 教授 (麻布大学獣医学部獣医学科生化学教室) より供与された。C12-NBD-CER (40  $\mu\text{M}$ ) および DMPC (200  $\mu\text{M}$ ) をコーティングした 1.5 mL チューブに buffer (120 mM Tris-HCl (pH7.4)、6 mM EDTA-2Na、60 mM KCl)、UDP-glucose (215  $\mu\text{M}$ ) および SMS2KO マウス皮膚ホモジネートを添加し、インキュベートした (37°C、3 時間)。酵素反応を停止させ、HPLC により反応生成物 (C12-NBD-SM および C12-NBD-GC) を定量することにより SMS および GC 合成酵素 (GC synthase: GCS) 活性の測定を行った。マウス背部の皮膚または角層を採取後、脂質を抽出し、TLC により SM、GC および CER を定量した。マウス背部を抜毛し、2 日後に TEWL を測定した。マウス背部への SPH 適用後、角層を採取し CER を定量した。その結果、SMS2KO マウス皮膚中の SMS および GCS 活性は 11.6、86.8 pmol/mg protein/h であり、WT マウス (62.1、135.8 pmol/mg protein/h) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ )。SMS2KO マウス全層皮膚中における SM 含量は 2.2  $\mu\text{g}/\text{mg skin}$  であり、WT マウス (2.3  $\mu\text{g}/\text{mg skin}$ ) との差はみられなかった。また、SMS2KO マウス全層皮膚中における GC 含量は 1.1  $\mu\text{g}/\text{mg skin}$  であり、WT マウス (1.5  $\mu\text{g}/\text{mg skin}$ ) と比較して減少傾向を示した ( $p = 0.08$ )。SMS2KO マウス角層中における CER[NS]および CER[NP]含量は 28.2、2.7  $\mu\text{g}/\text{mg SC}$  であり、WT マウス (47.8、4.2  $\mu\text{g}/\text{mg SC}$ ) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.001$ 、 $p < 0.05$ )。SMS2KO マウス背部の TEWL (13.6 g/m<sup>2</sup>/h) は WT マウス (8.8 g/m<sup>2</sup>/h) よりも有意に高い値を示した ( $p < 0.01$ )。SMS2KO マウスおよび WT マウスの normal 群における角層中 CER[AP]含量 (4.6、5.3  $\mu\text{g}/\text{mg SC}$ ) と比較し、SPH 適用群 (7.1、7.5  $\mu\text{g}/\text{mg SC}$ ) ではそれぞれ 56.0、41.0% 増加した。また、SPH 適用群における角層中 CER[AP]含量は、SMS2KO マウスおよび WT マウス間で差はみられなかった。以上より、SPH の適用による角層中 CER の増加に対する SMS の寄与は小さいことが示唆された。

**【結論】** SPH は alkCDase 活性を阻害し、皮膚中 CER 含量を増加させるために有用な化合物であることが示唆された。SPH の適用によるその他の皮膚中 CER の増加メカニズムとして CER 生合成経路の活性化が予想されるが、SMS の寄与は小さいことが示唆された。

**【Introduction】** Ceramide (CER) in the outermost layer of skin, stratum corneum (SC) has an important role in water retention as well as physical barrier. Sphingolipids, such as CER, sphingomyelin (SM), glucosylceramide (GC) have sphingoid. Ceramidase (CDase) hydrolyzes CER to sphingoid and fatty acid (FA). Sphingosine (SPH) is the major sphingoid in mammalian. SPH has inhibitory activity for mouse alkaline ceramidase (maCER1) and guinea pig epidermal alkaline CDase (alkCDase). Compared with healthy volunteers, CER content in SC is decreased in patients such as atopic dermatitis (AD) and psoriasis, and thus the skin barrier function is impaired. Transepidermal water loss (TEWL), as an indicator of skin barrier function is recovered in AD patients to normal level by topical application of CER cream. It is expected from this evidence that skin barrier function could be improved by regulation of CER content in SC. CER cosmetics and quasi drugs have already in the market to directly apply it, although little reports are found on the regulation of CER content in SC by inhibition of the CDase. I then start this study by a hypothesis that CDase inhibitor may increase the CER content in SC.

**【Section 1】** Human epidermis exhibits alkCDase and acidic CDase (aCDase) activities. The alkCDase activity is elevated by aging. Since alkCDase is secreted from *Pseudomonas aeruginosa* in skin of AD patients, the enzyme subsequently decreases the CER content. In the present study, SPH was selected as a CDase inhibitor and the effects of SPH were evaluated on the alkCDase activity in skin homogenate and the SC together on the epidermal CER content of hairless mice or three-dimensional cultured epidermis model. C12-NBD-CER was used as a substrate of alkCDase. SPH or oleoylethanolamide (OEA) (positive control), 125 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) and homogenate of hairless mice skin or three-dimensional cultured epidermis model were added to an 1.5 mL tube coated with C12-NBD-CER (250  $\mu$ M). The reaction mixture was incubated (37°C, 1 or 10 h) to determine enzymatic reaction product (C12-NBD-FA) by HPLC with fluorescence detector (Ex/Em = 460/534 nm). 40 mM SPH or OEA was applied on the dorsal skin of hairless mouse (twice a day for three days) to extract lipids from the stripped SC. SPH liposome (SPH/dipalmitoylphosphatidylcholine/dipalmitoylphosphatidylglycerol at a molar ratio of 4:4:1) was prepared by a thin layer method and applied to three-dimensional cultured epidermis. The cultured epidermis model was cultured under 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 7 days to extract lipids. CER in the lipid extract was separated by thin layer chromatography (TLC) and quantified from the band density. As results, IC<sub>50</sub> of SPH for mice skin alkCDase (0.09±0.01 mM) was significantly lower than that of OEA (11.1±1.6 mM,  $p < 0.001$ ). Both CER [AS] and CER [AP] contents in SC of SPH applied group (7.1±1.0, 17.1±2.6  $\mu$ g/mg SC) were significantly increased compared to the normal group (4.3±0.4, 8.7±0.7  $\mu$ g/mg SC) ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). IC<sub>50</sub> of SPH for alkCDase in three-dimensional cultured epidermis model (0.11±0.03 mM) was significantly lower than that of OEA (7.8±1.2 mM,  $p < 0.01$ ). CER [NDS] content in the SPH liposome group (15.8±1.9  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) was significantly increased compared to normal group (7.5±1.1  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ ). These data indicated that SPH is a stronger

inhibitor of alkCDase than OEA and suppresses degradation of CER by inhibition of alkCDase.

**【Section 2】** Sphingomyelin synthase (SMS) converts CER to SM. SMS are classified into SMS1, SMS2 and SMS related proteins (SMSr). To reveal SMS function, SMS-knockout (KO) mice are generated and investigated. Although various phenotypes in SMS-KO mice have been reported, SMS function in skin has not been clarified. The CER content in SC of SMS-KO mice is estimated to be different from wildtype (WT) mice. Mechanism of increasing CER content by SPH application could be revealed by experiments with SMS-KO mice. In the present study, SMS2-KO mice were used to determine sphingolipid metabolism enzyme activities, SM and GC (precursor of SC CER) contents in skin, SC CER content and TEWL. In addition, SC CER content after application of SPH was determined. SMS2-KO mice generated by homologous recombination using targeting vectors were gifted from Prof. Tadashi Yamashita (Azabu University, Sagami-hara, Kanagawa, Japan). Buffer (120 mM Tris-HCl (pH7.4), 6 mM EDTA-2Na and 60 mM KCl), UDP-glucose (215  $\mu$ M) and SMS2-KO mice skin homogenate were added to an 1.5 mL tube coated with C12-NBD-CER (40  $\mu$ M) and dimyristoylphosphatidylcholine (200  $\mu$ M). Reaction mixture was incubated (37°C, 3 h) to determine enzymatic reaction products (C12-NBD-SM and C12-NBD-GC) by HPLC. SC and skin were obtained from SMS2-KO mice, and lipids like SM, GC and CER were extracted and determined by TLC. TEWL was measured 2 days after dorsal hair of SMS2-KO mice was removed by forceps. SPH was applied to the dorsal skin of SMS2-KO mice (twice a day for three days) after removing hair to obtain SC. Lipids were extracted and CER were determined. As results, activities of SMS and glucosylceramide synthase (GCS) in skin homogenate of SMS2-KO mice ( $11.6 \pm 3.4$  and  $86.8 \pm 20.4$  pmol/mg protein/h) were significantly lower than WT mice ( $62.1 \pm 11.0$  and  $135.8 \pm 15.6$  pmol/mg protein/h) ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ). No significant difference was observed in SM content in skin between SMS2-KO mice ( $2.2 \pm 0.3$   $\mu$ g/mg skin) and WT mice ( $2.3 \pm 0.2$   $\mu$ g/mg skin). GC content in skin of SMS2-KO mice ( $1.1 \pm 0.2$   $\mu$ g/mg skin) was slightly decreased compared to WT mice ( $1.5 \pm 0.3$   $\mu$ g/mg skin,  $p = 0.08$ ). Both CER[NS] and CER[NP] contents in SC of SMS2-KO mice ( $28.2 \pm 6.5$ ,  $2.7 \pm 1.0$   $\mu$ g/mg SC) were significantly lower than WT mice ( $47.8 \pm 4.7$ ,  $4.2 \pm 1.2$   $\mu$ g/mg SC). TEWL from dosal skin of SMS2-KO mice ( $13.6 \pm 4.6$  g/m<sup>2</sup>/h) was significantly higher than WT mice ( $8.8 \pm 2.3$  g/m<sup>2</sup>/h). SC CER [AP] content was increased in both WT mice (56.0 %) and SMS2-KO mice (41.0 %) by SPH application compared with normal, in spite of no significance. SC CER [AP] content in SPH group was not different between SMS2-KO mice and WT mice. The present data indicated that SMS is not much contributed to the CER increase by SPH application.

**【Conclusion】** SPH must be a beneficial compound to increase skin CER by inhibition of alkCDase. Although SPH may also be affected by another pathways, like *de novo* synthesis, it is expected that SMS does not much contribute.

## 論文審査の結果の要旨

皮膚最外層の角層細胞間のセラミド (CER)、脂肪酸およびコレステロールなどの脂質は、体内の水分保持や外界からの異物、細菌およびウイルスの侵入を防ぐ物理的バリアとしての役割を持つ。CER は、スフィンゴミエリン (SM) やグルコシルセラミド (GC) とともにスフィンゴイド塩基を含む複合脂質であることから、スフィンゴ脂質 (SL) に分類される。また、CER には、非ヒドロキシ脂肪酸とスフィンゴシン (SPH) からなる CER[NS]、 $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸と SPH からなる CER[AS]、 $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸とフィトスフィンゴシンからなる CER[AP]、非ヒドロキシ脂肪酸とフィトスフィンゴシンからなる CER[NP]、非ヒドロキシ脂肪酸とジヒドロスフィンゴシンからなる CER[NDS] など複数の分子種が存在する。また、哺乳類においては、SPH は主要なスフィンゴイドである。いずれの分子種の CER も、セラミダーゼによりスフィンゴイドと脂肪酸に分解される。一方、スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) は、CER を SM へと変換する。SMS には SMS1、SMS2 および SMS 関連タンパク質の 3 種類のアイソザイムの存在が知られており、SMS 遺伝子を欠損したマウスを用いた研究が行われている。

アトピー性皮膚炎および乾癬などの患者の皮膚角層中 CER 含量とその分子種の構成比は健常人と異なる。また、アトピー性皮膚炎患者への CER 含有クリームを経皮的適用は、皮膚バリア機能の指標の一つである経表皮水分損失量 (TEWL) を健常人と同等のレベルまで改善する。このことから、角層中 CER 含量は、皮膚バリア機能と相関すると考えられ、CER の直接的な補給を目的として、CER を含有した化粧品などが様々なメーカーから販売されている。しかし、SL 代謝特に CER 分解抑制という観点からの角層中 CER 含量制御に関する報告は現在までない。このため、野本晃司氏は、皮膚の CER 分解抑制機構に着目し、SPH の角層中 CER 含量に及ぼす影響を *in vitro* 実験系およびマウスを用いた *in vivo* 実験系で解析を行い、その結果を 2 章構成で論じている。

第 1 章では、ヘアレスマウス皮膚および三次元培養ヒト表皮を用いた *in vitro* 実験系で SPH のアルカリセラミダーゼ (alkCDase) 活性阻害作用を解析した。さらに、ヘアレスマウスを用いた *in vivo* 実験系で SPH を背部皮膚に塗布し皮膚中 CER 含量への影響を調べた。

その結果、alkCDase 活性に対する SPH の  $IC_{50}$  は、ポジティブコントロールのオレオイルエタノールアミド (OEA) の  $IC_{50}$  に比較して約 1/120 倍低い値を示した。また、*in vivo* 実験系において、コントロール群と比較して、OEA 塗布群では有意な影響は

なかったが、SPH 塗布群では角層中 CER[AS]含量は約 1.8 倍、CER[AP]含量は約 1.6 倍増加していることを見出した。さらに、三次元培養ヒト表皮 *in vitro* 培養系に SPH 含有リポソームを角層側からアプライしたところ、CER[NDS]のみがコントロールと比較して約 2 倍増加していた。

以上、*in vitro* 実験系で、SPH は OEA よりも優れた alkCDase 阻害剤である可能性を示した。また、*in vivo* 実験系および *in vitro* 実験系で SPH が皮膚角層中の特定の CER 分子種量を増加させることを明らかにした。このことから、SPH による角層中 CER 量増加メカニズムの一つとして、SPH による皮膚中 alkCDase 活性阻害が一部関与していると考察した。

第 2 章では、麻布大学獣医学部獣医学科生化学教室山下 匡教授から供与を受けた SMS2 ノックアウト (SMS2KO) マウスの皮膚の SL 代謝を解析した後、SPH を背部皮膚に塗布し、皮膚中 CER 含量への影響を調べた。

その結果、SMS2KO マウス皮膚中の SMS 活性およびグルコシルセラミド合成酵素活性は、野生型 (WT) マウスと比較して有意に低値を示したが、他の SL 代謝酵素活性および SM 含量と GC 含量に大きな差は見られなかった。一方、WT と比較して、SMS2KO マウス皮膚中の CER[NS]含量および CER[NP]含量は、有意に低値を示したが、他の CER 含量は大きな差はなかった。また、WT と比較して SMS2KO マウス背部の TEWL は有意に高値を示し、皮膚バリア機能が低下している可能性を明らかにした。

WT および SMS2KO マウスの背部皮膚に SPH を塗布した結果、統計的に有意な差は見られなかったが、CER[AP]のみが、WT および SMS2KO マウスの両方で増加傾向が見られたが、WT と SMS2KO マウスの間では差は見られなかった。

以上、SMS2 は皮膚の SL 代謝に大きな影響を与えるものの、SPH の適用による角層中 CER の増加に対する SMS2 の関与の可能性は小さいと考察した。

以上、野本氏は、本論文において、*in vitro* 実験系およびヘアレスマウスを用いた *in vivo* 実験系で、SPH は alkCDase の活性を阻害し、皮膚中の特定 CER 分子種量を増加させ、皮膚バリア機能を向上させる可能性を示した。また、SMS2KO マウスを用いた研究で、SPH による皮膚中 CER 含量の上昇作用には、SMS2 は関与しない可能性を示した。本論文では、皮膚の SL 代謝の一部を解明するとともに、SPH 経皮的適用による皮膚機能改善作用機構の一部を明らかにすることができた。また、本研究は、皮膚機能改善を目的とした医薬品や機能性化粧品の開発にも貢献できると期待できる。よって、本論文は、本研究科課程による博士 (薬科学) 論文に十分値すると判定した。