

学位論文要旨

表皮のバリア機能に対するスフィンゴミエリンの役割の解明

学 位 申 請 者 氏 名 板谷 友里奈

皮膚は表皮と真皮から構成される。皮膚最外層である角層は、角質細胞とその隙間を埋める細胞間脂質からなり、細胞間脂質は主にセラミド、コレステロール、脂肪酸、コレステロール硫酸から構成されている。セラミドは細胞間脂質重量の約 40-50%を占め、コレステロールや脂肪酸と共に外界からの異物侵入や体内からの水分蒸散を防ぐバリア機能を担う。セラミドの生成・代謝異常は、アトピー性皮膚炎や魚鱗癬など様々な皮膚疾患と関与するため、皮膚中セラミド量の維持は皮膚疾患および皮膚バリア機能の維持に重要である。皮膚において、セラミドはスフィンゴミエリン (sphingomyelin: SM) やグルコシルセラミド (glucosylceramide: GlcCer) から生成される (*De novo* 合成経路)。これまでに、SM を皮膚に塗布することで皮膚中セラミド量が増加することが明らかになってきた。このことから、皮膚中セラミド量の制御には内因性 SM が重要である可能性が高い。しかし、外因的 SM 適用後の皮膚中セラミド量の増加に対する機構や、内因性 SM の皮膚における役割について、詳細は不明である。本研究では、セラミド前駆体である SM のセラミド生成促進機構や表皮バリア機能に対する役割の解明を目的とし、以下の 3 章に分けて検討を行った。

第1章 SM の 3 次元培養皮膚中脂質量におよぼす影響とその機構解明

SM はセラミドの前駆体であり、スフィンゴミエリナーゼ (sphingomyelinase: SMase) によりセラミド[NS]および[AS]に代謝される。一方、GlcCer は β -グルコセレブロシダーゼ (β -glucocerebrosidase: β -GCase) により、ヒト角層中に存在する全てのセラミド種に代謝されることが知られている。これまでに、ミルク由来 SM 単独で作製したリポソームを 3 次元培養表皮へ適用することで、表皮中セラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]を増加させることが報告されている。SM のセラミド生成促進機構は不明であるため、本章ではその機構解明を行った。本研究で用いたミルク由来 SM リポソームと *bacillus cereus* 由来 SMase を反応させると、セラミド[NS]のみ生成が認められた。また、SM リポソームを 3 次元培養表皮角層側へ適用し、リアルタイム PCR によりセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量を経時的に測定した。その結果、セラミド生成の律速酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (serine-palmitoyl transferase: SPT) の遺伝子発現量は経時的に減少し、SMase、 β -GCase の遺伝子発現量は経時的に増加した。また、濃度の異なる SM リポソームを 3 次元培養表皮の角層側へ適用し、同様に遺伝子発現量を測定した結果、SPT の遺伝子発現量は濃度依存的に減少し、SMase、 β -GCase の遺伝子発現量は濃度依存的に増加した。さらに、培地に β -GCase の競合阻害剤である conduritol B epoxide (CBE) を添加し、SM リポソームを併用して 3 次元培養表皮を培養後、表皮中セラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]を high performance thin-layer chromatography (HPTLC) により定量した。その結果、CBE の添加によりセラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]量は減少した。しかし、CBE 単独処理群と比較して、CBE と SM リポソーム併用群ではセラミド[NS]のみ有意に増加した。また、その他のセラミド種は増加しなかった。これらのことから、外因性 SM は、セラミド代謝関連酵素の発現に影響を与え、SM や GlcCer の代謝に関与することでセラミド生成を促進する可能性が示された。

第2章 スフィンゴミエリン合成酵素 2 ノックアウトマウス皮膚表現型の基礎的検討

スフィンゴミエリン合成酵素 (sphingomyelin synthase: SMS) はセラミドとホスホコリンから SM とジアシルグリセロールを生成する酵素である。SMS には SMS1、SMS2、SMSr の 3 種類のアイソザイムが存在する。現在、SMS 遺伝子のノックアウト (knockout: KO) マウスが作製され、SMS の機能解析を目的とした研究が進んでいるが、SMS2KO マウスの皮膚での表現型や、SMSKO マウスを用いた皮膚中 SMS 機能解析については未だ報告されていない。本章では、SMS2KO マウス皮膚表現型を明らかにするための基礎的検討を行った。実験には C57BL/6 を遺伝的背景とし、相同組替えを用いた SMS2KO マウスを用いた。4、8、12 週齢の SMS2KO マウスの角層中セラミド[NS]、[NP]量を HPTLC により定量した。その結果 4、8 週齢 SMS2KO マウスのセラミド[NS]、[NP]量は各週齢野生型 (wild type: WT) と比較して減少した。一方、12 週齢 SMS2KO マウスのセラミド[NS]、[NP]量は WT と差がなかった。また、SMS2KO マウスは週齢依存的にセラミド[NS]、[NP]量が増加した。次に、皮膚バリア機能の指標である経表皮水分損失量 (transepidermal water loss: TEWL) を測定した結果、4、8 週齢 SMS2KO マウスの TEWL は WT と比較して上昇した。しかし、12 週齢 SMS2KO マウスの TEWL は WT と差がなかった。また、hematoxylin-eosin (HE) 染色により各週齢 SMS2KO マウスの表皮厚を測定したところ、4、8 週齢での表皮厚は WT と差がなかったが、12 週齢において SMS2KO マウスの表皮が厚くなった。さらに、UVB 照射やテープストリッピングによる皮膚バリア破壊を行うことで、SMS2KO マウスの TEWL は、同処理 WT と比較して著明に上昇した。これらの結果から、SMS2KO マウスの皮膚バリア機能は WT と比較して弱いことが示され、その表現型は週齢によって異なることが示された。また、12 週齢において認められた表皮肥厚により、SMS2 が炎症や分化に関与する可能性も見いだした。

第3章 スフィンゴミエリン合成酵素 1 ノックアウトマウス皮膚表現型の基礎的検討

本章では、SMS1KO マウスの皮膚表現型を明らかにすることを目的とした。実験には C57BL/6 を遺伝的背景とし、Cre/loxP システムにより作製した 30 週齢前後の SMS1KO マウスを用いた。はじめに、SMS1KO マウスの TEWL を測定した。次に、角層中セラミド量を HPTLC により定量し、WT と比較した。その結果、SMS1KO マウスの TEWL は WT と比較して上昇した。しかし、SMS1KO マウス角層中のセラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]の量は、WT と差がなかった。さらに、SMS1KO マウスに対し 5% SM リポソームを 400 mg/kg で 4 週間腹腔内投与を行い、TEWL の測定、角層セラミド量の定量、表皮厚の測定を行った。その結果、SM の投与により SMS1KO マウスの TEWL は非投与 SMS1KO マウスよりも減少傾向を示し、WT に近い値になった。一方角層セラミド量、表皮厚は WT と SMS1KO、SM 投与、非投与に関わらず差はなかった。SMS2KO マウスでは若齢週において皮膚表現型に差が認められたため、今後は若齢 SMS1KO マウスを用いた検討が望ましい。しかし、SM の投与により、TEWL の改善傾向が認められたことから、SM は皮膚バリア機能に関与する因子であることが考えられる。

本研究で得られた結果から、外的に投与した SM は表皮中セラミド量を増加させることが示され、体内の SM の不足は表皮バリア機能を低下させることが明らかとなった。これらのことから、SM は皮膚バリア機能や恒常性の維持に重要な要因のひとつであることが考えられる。今後、さらに深く SM の機能を調査し、皮膚における SM の重要性がより明らかになることを期待する。

Abstract of Ph.D. thesis

Elucidation of the role of the sphingomyelin for the epidermal barrier function.

学 位 申 請 者 氏 名 Itaya Yurina

The skin comprises the epidermal and dermal layers, which act as a barrier. The stratum corneum (SC) is the outer layer of the epidermis and comprises keratinocytes and intercellular lipids such as ceramide, cholesterol, fatty acids and cholesterol ester. Intracellular lipids-ceramide in particular play the most important role in the barrier function of the stratum corneum. A lack of ceramide or deficiency of ceramide metabolic enzymes can causes diseases including atopic dermatitis and ichthyosis. Ceramide species are generated through either the glucosylceramide (GlcCer) pathway or the sphingomyelin (SM) pathway. It was revealed that the application of SM to a skin increased ceramide content. Thus, endogenous SM may be important for regulation of ceramide content in skin. However, it is the unclear that how exogenous SM increased ceramide content in skin and the role of endogenous SM to skin. In the present study, I focus on the precursor of ceramide-SM- to elucidate the mechanism controlling increased ceramide levels in the skin and to elucidate the role on epidermal barrier function.

1. Influence of SM and the mechanism analysis to lipid content in a three-dimensional cultured human epidermis model.

SM is a precursor of the ceramide [NS] and [AS], metabolized by sphingomyelinase (SMase). GlcCer is a precursor of all ceramide type in the SC, metabolized by β -glucocerebrosidase (β -GCCase). Previously, the application of sphingomyelin-based liposomes (SM-L) to a three dimensional cultured human epidermis model increased levels of ceramides [NS], [NP], [AS] and [AP]. However, why the application of SM-L induced an increase ceramides in the three dimensional cultured human epidermis model is unknown. In this chapter, I applied SM-L to a three dimensional cultured human epidermis model to clarify the influence of SM-L on ceramide metabolic enzymes on three dimensional cultured human epidermis. First, mixtures of SM-L and *B. cereus* derived SMase were developed by HPTLC. Only ceramide [NS] was generated from SM-L. Next, I applied SM-L to a three dimensional cultured human epidermis model and measured levels of SPT, SMase and β -GCCase mRNA expression. SPT mRNA expression level was decreased 24 h after application of 30 mg/mL SM-L. Otherwise, SMase and β -GCCase mRNA expression levels were increased 24 h after application of 30 mg/mL SM-L. Finally, I added the β -GCCase inhibitor CBE to the medium and applied SM-L to the three dimensional cultured human epidermis model. Ceramide [NS], [NP], [AS] and [AP] contents were decreased compared with control group following treatment with CBE. Contrastingly, only ceramide [NS] content was significantly increased following treatment with CBE and SM-L compared with the CBE-alone treatment group. Thus, the application of SM-L to skin influences the ceramide metabolism pathway.

2. Phenotype of skin on sphingomyelin synthase 2 knockout mice.

Sphingomyelin synthase (SMS) converts ceramide to SM. SMS are classified into SMS1, 2 and SMS related protein (SMSr). SMS knockout (KO) mice are generated and investigated to clarify the SMS function. Although various phenotypes in SMSKO mice have been reported, however, phenotypes of SMSKO mice skin and SMS function in skin have not been reported. In this chapter, I performed basic study to clarify SMS2KO mice skin phenotypes. SMS2KO mice were generated by homologous recombination. First, ceramide [NS] and [NP] content in various week age SMS2KO mice SC were determined by HPTLC. Ceramide [NS] and [NP] contents in SMS2KO mice SC at 4 and 8 week age were decreased compared with WT mice. However, ceramide [NS] and [NP] contents in SMS2KO mice SC at 12 week age were not changed compared with WT mice. TEWL in SMS2KO mice at 4 and 8 week age were significantly higher than WT mice. Epidermal thickness in SMS2KO mice at 4 and 8 week age were not changed compared with WT mice. Contrastingly, at 12 week age SMS2KO mice, epidermal thickness was significantly increased compared with WT mice. Additionally, after UVB irradiation and tape stripping treatment, TEWL of SMS2KO mice at 8 week age was significantly increased compared with UVB irradiated WT mice. These results suggested that SMS2KO mice skin phenotype was different at week age respectively and skin barrier function was weak compared with WT mice. Furthermore, result of epidermal thickness suggested that SMS2 may associate with inflammation, epidermal proliferation and differentiation.

3. Phenotype of skin on sphingomyelin synthase 1 knockout mice.

In this chapter, I performed basic study to clarify SMS1KO mice skin phenotypes. SMS1KO mice at 30 week age were generated by using Cre/loxP system. SMS1KO mice TEWL were higher than WT mice. However, ceramide [NS], [NP], [AS] and [AP] contents in SMS1KO mice SC were not changed compared with WT mice. Next, SMS1KO mice were injected intraperitoneally a single dose (400 mg/kg) for 4 weeks. After SM-L injection, SMS1KO mice TEWL were slightly decreased compared with non-injection SMS1KO mice. But, ceramide content of SM injection SMS1KO mice SC were not changed compared with non-injection SMS1KO mice. Additionally, epidermal thickness of SM injection SMS1KO mice was not changed too. In young (4 or 8 week age) SMS2KO mice, skin phenotypes were different from WT mice. Thus, young SMS1KO mice using are desirable in future. However, TEWL of SMS1KO mice were recovered by SM injection. These results suggested that SM is the factor for skin barrier function.

The present study indicated that exogenous SM increased ceramide content in the epidermis and endogenous SM deficiency induced degradation of epidermal barrier function. These finding suggested that SM is the one of important factor for sustentation of skin barrier function and homeostasis. In the future, I hope that more detailed investigation of SM will clear SM importance in skin.

論文審査の結果の要旨

皮膚最外層にある角層は、角質細胞とその隙間を埋める細胞間脂質からなり、また、細胞間脂質は主にセラミド、コレステロール、脂肪酸、コレステロール硫酸などから構成されている。このうちセラミドは約 40-50%（重量比）を占め、コレステロールや脂肪酸と共に外界からの異物侵入や体内からの水分蒸散を防ぐバリア機能を担う。セラミドの生成・代謝異常は、アトピー性皮膚炎や魚鱗癬など様々な皮膚疾患に関与するため、皮膚中セラミド量の適正化は皮膚疾患および皮膚バリア機能の維持に特に重要である。皮膚において、セラミドはスフィンゴミエリン (SM) やグルコシルセラミド (GlcCer) から生合成される。これまでに、SM を皮膚表面に塗布することで皮膚中セラミド量が増加することが報告されている。このことから、皮膚中セラミド量の制御には内因性 SM が重要である可能性が高いと考えられた。しかし、外因的 SM 適用後の皮膚中セラミド量の増加に対する詳細な機構や、内因性 SM の皮膚における種々役割についてはいまだ不明である。このような背景下、板谷友里奈氏はセラミド前駆体である SM に着目し、SM のセラミド生成促進機構や表皮バリア機能に対する役割の解明を目的とし、その結果を 3 章構成で論じている。以下、各章別に申請者の成果と審査結果を示す。

第 1 章では、3 次元培養表皮中の脂質量に対する SM の影響およびその機構を調べた。はじめに、ミルク由来 SM 単独のリポソーム (SM-L) を作製し、*bacillus cereus* 由来スフィンゴミエリナーゼ (SMase) と反応させた。その結果、SM-L と SMase の反応ではセラミド[NS]のみ生成された。また、3 次元培養表皮の角層側から SM-L を適用後、セラミド代謝に関連する酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、SM-L の適用によりセラミド生成の律速酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) の遺伝子発現量は減少し、一方で、SMase と β -グルコセレブロシダーゼ (β -GCCase) の遺伝子発現量が増加した。また、 β -GCCase の競合阻害剤である conduritol B epoxide (CBE) を添加し、SM-L を併用して 3 次元培養表皮を培養後、HPTLC により表皮中セラミド含有量を測定した。その結果、CBE の添加によりセラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]量は減少したが、CBE 単独処理群と比較して、CBE と SM-L 併用群ではセラミド[NS]のみ有意に増加した。以上のことから、外因性 SM は、セラミド代謝関連酵素の発現に影響を与え、SM や GlcCer の代謝に関与することでセラミド生成を促進する可能性があると考えた。

第 2 章では、表皮バリア機能に与える内因性 SM の影響を解明するために、スフィンゴミエリン合成酵素 2 (SMS2) ノックアウト (KO) マウスの皮膚表現型を調べた。その結果、4、8 週齢 SMS2KO マウスのセラミド[NS]、[NP]量は各週齢野生型 (WT) と比較して低かった。一方、12 週齢 SMS2KO マウスのセラミド[NS]、[NP]量は WT と差がなかつ

た。また、SMS2KO マウスのセラミド[NS]、[NP]量は週齢依存的に増加した。次に、皮膚バリア機能の指標である経表皮水分損失（TEWL）を測定した結果、4、8 週齢 SMS2KO マウスの TEWL は WT と比較して上昇した。しかし、12 週齢 SMS2KO マウスの TEWL は WT と差がなかった。また、hematoxylin-eosin（HE）染色により各週齢 SMS2KO マウスの表皮厚を測定した。その結果、4、8 週齢での表皮厚は WT と差がなかったが、12 週齢において SMS2KO マウスの表皮が厚くなった。これらより、SMS2KO マウスの皮膚表現型には週齢差が見られることが明らかになった。さらに、UVB 照射やテープストリッピングによって皮膚バリアの破壊を行うことで、SMS2KO マウスの TEWL は、同処理 WT と比較して著明に高くなった。以上のことから、SMS2KO マウスの皮膚バリア機能は WT と比較して弱いことが示され、その表現型は週齢によっても異なると考えた。なお、12 週齢において認められた表皮肥厚により、SMS2 が炎症や分化に関与する可能性についても考察した。

第 3 章では SMS1KO マウスの皮膚表現型について評価した。SMS1KO マウスの TEWL を測定したところ WT と比較して高かった。しかし、HPTLC により角層中セラミド含有量を測定した結果、セラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]の量は、WT と差がなかった。次に、SMS1KO マウスに対する外因性 SM の影響を調べた。SMS1KO マウスに SM-L を長期間腹腔内投与し、投与後の TEWL、角層中セラミド量および表皮厚を測定した。その結果、SMS1KO マウスの TEWL は非投与 SMS1KO マウスよりも減少傾向を示し、WT に近い値になった。一方、角層セラミド量や表皮厚は WT と SMS1KO、SM-L 投与群、非投与群に関わらず差はなかった。以上の結果から、SMS2KO マウスでは若週齢において皮膚表現型に差が認められたため、今後は若齢 SMS1KO マウスを用いた検討が望ましいと考察した。しかしながら、SM-L の投与により、TEWL の改善傾向が認められたことから、SM は皮膚バリア機能に関与する因子であることも併せて示唆した。

以上、板谷友里奈氏は、本論文において、外的に投与した SM が種々セラミド代謝酵素の発現に影響を与えることで表皮中セラミド量を増加させることを明らかにした。さらに、体内の SM の不足は表皮バリア機能を低下させることを示した。本論文結果より、SM は皮膚バリア機能や恒常性の維持に重要な要因のひとつであることが解明された。また、本研究は皮膚機能改善を目的とした機能性化粧品などの開発にも貢献できると期待できる。

以上をまとめると、本論文は新規性が高く、本研究科課程による博士（薬科学）論文に十分値するものであると判断した。