

博士論文

スフィンゴシンの  
角層中セラミド含量に及ぼす影響  
およびそのメカニズム解明

野本 晃司

# 目次

略語	1
緒言	3
第1章 スフィンゴシンの角層中セラミド含量に及ぼす影響	
第1節 緒論	8
第2節 実験方法	10
2-1. 実験動物	10
2-2. 試薬および実験材料	10
2-3. マウス皮膚および三次元培養ヒト表皮ホモジネートの作成	11
2-4. セラミダーゼ活性の測定	11
2-5. マウス背部へのアルカリセラミダーゼ阻害剤の適用および角 層中脂質の抽出	12
2-6. 三次元培養ヒト表皮へのアルカリセラミダーゼ阻害剤の適用 および表皮中脂質の抽出	13
2-7. マウス角層中および三次元培養ヒト表皮中のセラミド定量	13
2-8. 統計処理	14
第3節 結果	15
3-1. スフィンゴシンのマウス皮膚ホモジネート中セラミダーゼ阻 害活性	15
3-2. スフィンゴシン適用後のマウス角層中セラミド含量	18
3-3. スフィンゴシンの三次元培養ヒト表皮ホモジネート中アルカ	20

リセラミダーゼ阻害活性	
3-4. スフィンゴシン適用後の三次元培養ヒト表皮中セラミド含量	23
第4節 考察	25
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を用いたスフィンゴシンによる角層中セラミド含量増加メカニズムの解明	
第1節 緒論	30
第2節 実験方法	32
2-1. 実験動物	32
2-2. 試薬および実験材料	32
2-3. 遺伝子検査	33
2-4. 皮膚中スフィンゴ脂質代謝酵素活性の測定	35
2-5. 皮膚中および角層中脂質の抽出	36
2-6. 皮膚中および角層中脂質の定量	37
2-7. 経表皮水分損失量の測定	37
2-8. スフィンゴシン適用後における角層中セラミドの定量	37
2-9. 統計処理	38
第3節 結果	39
3-1. 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中のスフィンゴ脂質代謝酵素活性	39
3-2. 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中のスフィンゴミエリンおよびグルコシルセラミド含量	41
3-3. スフィンゴミエリン合成酵素 2 ノックアウトマウス角層中のセラミド含量	42

3-4. スフィンゴリエリン合成酵素 2 ノックアウトマウス背部の経表皮水分損失量	44
3-5. スフィンゴシン適用後のスフィンゴリエリン合成酵素 2 ノックアウトマウス角層中セラミド含量	45
第4節 考察	47
結論	50
謝辞	53
参考文献	54

## 略語

aCDase: acidic ceramidase

AD: atopic dermatitis

alkCDase: alkaline ceramidase

aSMase: acidic sphingomyelinase

BGCase:  $\beta$ -glucocerebrosidase

CDase: ceramidase

CER: ceramide

CerS: ceramide synthase

D-MAPP: (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol

DMPC: dimyristoylphosphatidylcholine

DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine

DPPG: dipalmitoylphosphatidylglycerol

DSPH: dihydrosphingosine

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FA: fatty acid

GC: glucosylceramide

GCS: glucosylceramide synthase

HPLC: high performance liquid chromatography

HPTLC: high performance thin layer chromatography

IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration

KO: knockout

LC/MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

NBD: nitrobenzoxadiazole

OEA: oleoylethanolamide

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PSPH: phytosphingosine

S1P: sphingosine-1-phosphate

SC: stratum corneum

S.D.: standard deviation

SM: sphingomyelin

SMase: sphingomyelinase

SMS: sphingomyelin synthase

SMSr: sphingomyelin synthase-related protein

SPH: sphingosine

SPHK: sphingosine kinase

TEWL: transepidermal water loss

TLC: thin layer chromatography

Tris: 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

UDP: uridine diphosphate

WT: wildtype

## 緒言

皮膚は表皮および真皮より構成され、さらに表皮は基底層、有棘層、顆粒層および角層の4層に分類される。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) などの脂質により構成されるラメラ構造は、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。また、CER は細胞のアポトーシスやストレス応答などに関与する細胞内シグナル伝達分子としての機能も持つ<sup>1,2)</sup>。

スフィンゴ脂質とは、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、スフィンゴイドおよびスフィンゴイドの C-2 位アミノ基に *N*-アシル結合した脂肪酸 (fatty acid: FA) より構成される (Fig. 1)。角層に存在する CERs は、4 種のスフィンゴイド (スフィンゴシン (sphingosine: SPH) [S]、ジヒドロスフィンゴシン (dihydrosphingosine: DSPH) [DS]、フィトスフィンゴシン (phytosphingosine: PSPH) [P]、6-ヒドロキシスフィンゴシン [H])、および 3 種の FA (非ヒドロキシ FA[N]、 $\alpha$ -ヒドロキシ FA[A]、エステル化  $\omega$ -ヒドロキシ FA[EO]) により構成され、その組み合わせから 12 種類に分類される<sup>3)</sup> (Table 1)。近年では、例えばスフィンゴイドとして[S]、FA として[EO]を有する CER は、CER[EOS]と表記される。

皮膚におけるスフィンゴ脂質生合成の模式図を Chart 1 に示す。スフィンゴ脂質生合成の第一段階は、表皮顆粒層の小胞体におけるセリンとパルミトイル CoA の縮合反応である。この反応はセリンパルミトイルトランスフェラーゼにより触媒され、スフィンゴ脂質生合成の律速段階であると考えられている<sup>4)</sup>。その後、3-ケトスフィンガニンレダクターゼ、セラミド合成酵素 (ceramide synthase:

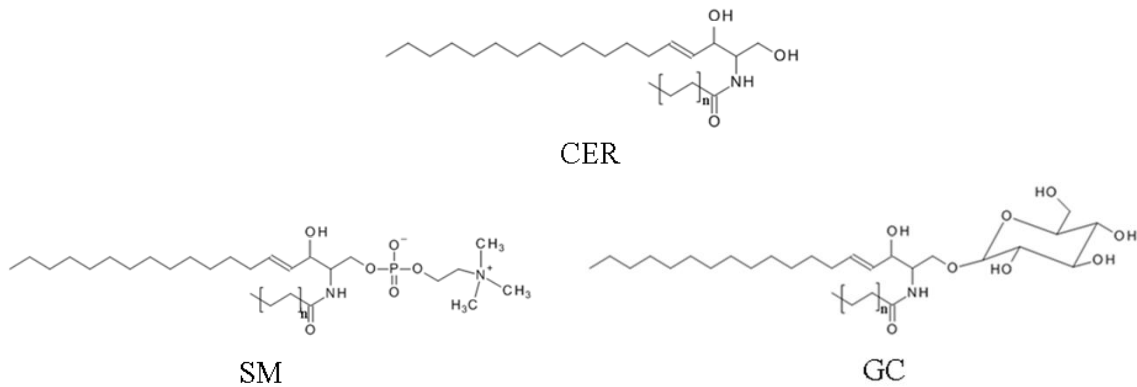









Fig. 1. Structure of sphingolipids.

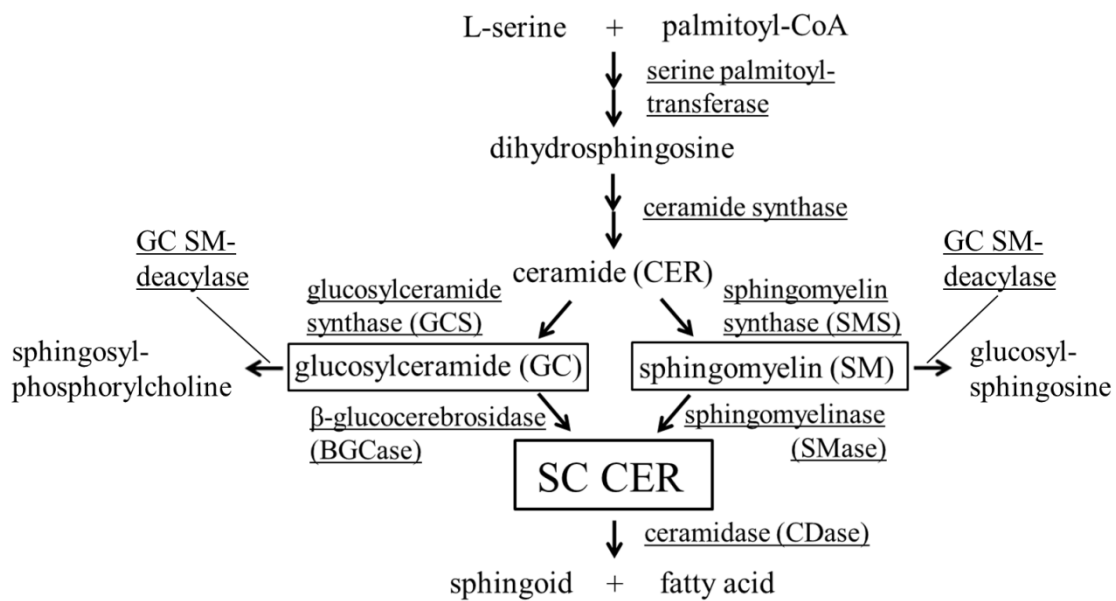
CerS) およびジヒドロセラミドデサチラーゼによる代謝を受け、CER が生成される。さらに、CER はゴルジ装置において、グルコシルセラミド合成酵素 (glucosylceramide synthase: GCS) またはスフィンゴミエリン合成酵素 (sphingomyelin synthase: SMS) により GC または SM へと変換される<sup>5-7)</sup>。GC および SM は層板顆粒にパッケージングされ、顆粒層と角層の境界で放出された後に  $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ ( $\beta$ -glucocerebrosidase: BGCse) およびスフィンゴミエリナーゼ (sphingomyelinase: SMase) により再び CER へと変換され (角層 CER)、角層細胞間においてコレステロール、遊離 FA などの脂質と共にラメラ構造を形成する。CER は、セラミダーゼ (ceramidase: CDase) により分解され、スフィンゴイドおよび FA へと代謝される。さらに、スフィンゴイドはリン酸化酵素によりスフィンゴシン 1 リン酸 (sphingosine-1-phosphate: S1P) などの生理活性の高い脂質へと変換され、細胞の分化、増殖および生存などの調節を行う<sup>8,9)</sup>。

SPH は、哺乳類におけるスフィンゴ脂質を構成する主要なスフィンゴイドである (Fig. 2)。PSPH は真菌や植物に多く含まれるスフィンゴイドであるが<sup>10)</sup>、



Table 1. Nomenclature of CERs in human stratum corneum<sup>11)</sup>

fatty acid			
sphingoid	non-hydroxy fatty acid [N]	$\alpha$ -hydroxy fatty acid [A]	esterified $\omega$ -hydroxy fatty acid [EO]
 dihydrosphingosine [DS]	CER[NDS]	CER[ADS]	CER[EODS]
 sphingosine [S]	CER[NS]	CER[AS]	CER[EOS]
 phytosphingosine [P]	CER[NP]	CER[AP]	CER[EOP]
 6-hydroxy sphingosine [H]	CER[NH]	CER[AH]	CER[EOH]



SC: stratum corneum

Chart 1. Metabolic pathway of sphingolipids.

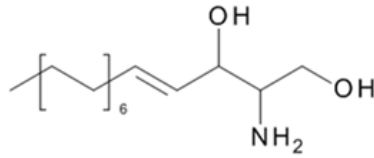


Fig. 2. Structure of SPH.

ヒト角層やラット小腸などの哺乳類の組織にも PSPH が存在することが報告されている<sup>11, 12)</sup>。生体内における遊離型の SPH は、CDase による CER の分解反応によってのみ生成する。ブタ角層中および生きた表皮における総脂質中には、それぞれ 0.44、0.09% の SPH が存在することが報告されている<sup>13)</sup>。また、ヒト足部胼胝中には  $3.4 \pm 0.6$  mg/g lipid の SPH が存在することが報告されている<sup>14)</sup>。SPH は、モルモット表皮由来の CDase やマウス由来のアルカリ CDase (alkaline CDase: alkCDase) (maCER1) 活性を阻害することが報告されている<sup>15, 16)</sup>。また、SPH は *Staphylococcus aureus* などに対する抗菌活性を持つことが報告されており<sup>17, 18)</sup>、皮膚における抗菌機構に寄与していると考えられている。さらに、SPH はホルボールエステルにより誘導される皮膚炎を抑制することが報告されている<sup>19)</sup>。

前述の通り、角層中 CER は皮膚バリア機能に寄与している。アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) 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いことが報告されている<sup>20, 21)</sup>。また、角層中 CER 含量は加齢や季節などの要因によっても変動することが知られている<sup>20, 22)</sup>。AD 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が報告されていることから<sup>23)</sup>、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（キュレルシリーズ（花王株式会社）、ヒフミドシリーズ（小林製薬株式会社）、アスタリフトシリーズ（富士フイルム株式会社）および DHC 薬用ベビーセラミド（株式会社 DHC）など）。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 章では、皮膚にとって有益な作用を持つと考えられる SPH を CDase 阻害剤として用いた。ヘアレスマウスおよび三次元培養ヒト表皮ホモジネートを作成し、SPH の CDase に対する阻害活性を評価した。また、SPH 適用後におけるヘアレスマウス角層中および三次元培養ヒト表皮中 CER 含量を測定した。

第 2 章では、SPH 適用による CER 増加メカニズム解明を目的として、SMS2 ノックアウト（knockout: KO）マウスへの SPH 適用後における角層中 CER 含量の測定、表皮中脂質定量および酵素活性の測定を行った。

以下に、得られた結果を報告する。

# 第 1 章

## スフィンゴシンの角層中セラミド含量に及ぼす影響

### 第 1 節 緒論

CDase は、CER 分子内の *N*-アシル結合を加水分解してスフィンゴイドおよび FA へと変換する酵素である (Fig. 3)。CDase は、至適 pH により酸性 CDase (acidic CDase: aCDase)、中性 CDase および alkCDase に分類される。また、alkCDase には 3 種のアイソザイムが存在する (alkCDase1、alkCDase2 および alkCDase3)。aCDase はリソソームに局在する酵素であり、pH 4.5 で高い活性を持つ<sup>24)</sup>。遺伝性疾患である Farber 病の患者においては、aCDase 活性は低下していることが報告されている<sup>25)</sup>。一方で alkCDase1 は小胞体に局在し、pH 8.5 で高い活性を持つ。

ヒト表皮は、alkCDase および aCDase 活性を持つことが報告されている<sup>26, 27)</sup>。また、Houben らは、ヒト表皮における alkCDase1 の mRNA 発現量が他の組織と比較して多く存在すること、また表皮細胞の分化に伴い total alkCDase および aCDase 活性が上昇すること、alkCDase1 および aCDase の mRNA 発現量が増加すると報告している<sup>28)</sup>。

加齢や AD などの疾患により、角層中 CER 含量は減少する<sup>20, 22)</sup>。Jin らは、ヒト角層中 alkCDase 活性 (pH9.0) は加齢により上昇すると報告している<sup>29)</sup>。また、AD 患者皮膚における TEWL は健常人と比較して高いことが報告されている<sup>30)</sup>。GC および SM を、それぞれグルコシルスフィンゴシンおよびスフィンゴシルホスホリルコリンへと代謝するグルコシルセラミドスフィンゴミエリンデアシラーゼの活性亢進は AD の原因であると報告されているが<sup>31)</sup>、Okino らは

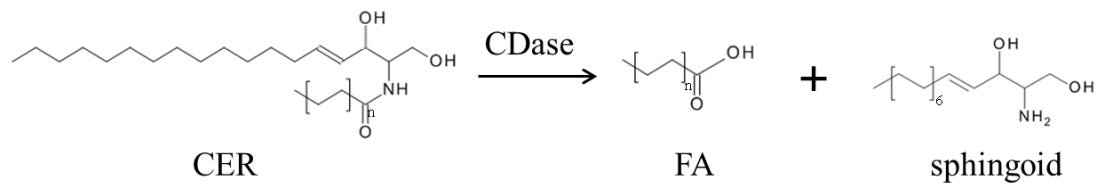


Fig. 3. Degradation of CER by CDase.

AD患者皮膚には *Pseudomonas aeruginosa* より分泌された alkCDase が存在することを報告しており<sup>32, 33)</sup>、CER 量が減少することの一因であると考察している<sup>34)</sup>。

そこで著者は、CDase 阻害剤の適用により角層中 CER 含量を制御できる可能性があると考えた。Oleylethanolamide (OEA)、ceramidastin および (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol (D-MAPP) など、CDase 阻害活性を持つ化合物は多数報告されているが<sup>26, 35, 36)</sup>、それらを用いた皮膚中 CER 含量の制御に関しては現在までに報告されていない。SPH はモルモット表皮由来の CDase やマウス由来の alkCDase (maCER1) 活性を阻害することが報告されている<sup>15, 16)</sup>。また、SPH は抗菌活性<sup>17, 18)</sup>や抗炎症作用<sup>19)</sup>を持つことから、皮膚にとって有益な化合物であると考えられる。第 1 章では 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。

## 第2節 実験方法

### 2-1. 実験動物

4 および7週令の雄性ヘアレスマウス (Hos:HR-1) は株式会社星野試験動物飼育所 (坂東、茨城) より購入した。なお、飼育は室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間毎の明暗サイクルの環境で行い、飼料および水は自由摂取とした。動物実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得て、「城西大学動物実験規定」に従って行った。

### 2-2. 試薬および実験材料

三次元培養ヒト表皮である LabCyte EPI-MODEL 6 日間エアリフト品は株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (蒲郡、愛知) より購入した。nitrobenzoxadiazole (NBD) 基で蛍光標識した FA である C6-NBD-FA および C12-NBD-FA は Invitrogen (Waltham, MA, U.S.A.) より購入した。C12-NBD-CER は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, U.S.A.) より購入した。Oleoylethanolamide は Enzo Biochem, Inc. (New York, NY, U.S.A.) より購入した。D-erythro-sphingosine (SPH) は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。

CER 定量の標準物質として使用した non-hydroxy ceramide および hydroxy ceramide は Matreya, LLC (Pleasant Gap, PA, U.S.A.) より購入した。Ceramide III および ceramide VI は Evonik Industries (Essen, North Rhine-Westphalia, Germany) より購入した。Ceramide II (TIC-001) は、高砂香料工業株式会社 (東京) より供与された。Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) および dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) は、日本精化株式会社 (大阪) より供与された。

その他の試薬は和光純薬工業株式会社、第一三共株式会社 (東京)、東京化成

工業株式会社（東京）、Alfa Aesar (Heysham, Lancashire, U.K.)、Sigma-Aldrich Co., LLC. (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。

### 2-3. マウス皮膚および三次元培養ヒト表皮ホモジネートの作成

7週令のマウスを1週間予備飼育した。マウスを頸椎脱臼により屠殺し、皮膚を採取した。皮下脂肪を除去した後に解剖用ハサミで破碎した。1% Triton X-100を含む0.25 M Sucroseを加え、氷中でPT 1200 E (Kinematica AG, Luzernerstrasse, Lucern, Switzerland) を用いてホモジナイズ (25,000 rpm、1分) した。ホモジナイズ後に遠心分離 (500 × g、1分、4°C) を行い、得られた上清を実験に使用するまで凍結保存した。

LabCyte EPI-MODEL 6日間エアリフト品を、トランスウェルよりスパーテルを用いて回収し、同様にホモジネートを作成した。

### 2-4. CDase 活性の測定

Houben らの方法<sup>26)</sup>を一部改変して行った。CDaseの基質としてC12-NBD-CERを用いた。Methanolに溶解したC12-NBD-CER (最終濃度は250 μM) およびSPHまたはOEAを窒素気流下で乾固し、detergent mixture (40 mg/mL Triton X-100、16 mg/mL Tween 80) を12.5 μL加えバス型超音波洗浄器 (FU-6H、東京硝子器械株式会社、東京) を用いて超音波処理することにより溶解した。Buffer (alkCDase: 125 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)、aCDase: 125 mM acetate buffer (pH 4.2)) を25 μL添加し、再び超音波処理を行った。プレインキュベート後 (37°C、2分)、マウス皮膚または三次元培養ヒト表皮ホモジネート (タンパク質濃度は15 μg/mL) を12.5 μL加えてインキュベートした (37°C)。インキュベート時間は、マウス皮膚ホモジネートでは1時間、三次元培養ヒト表皮ホモジネートでは10時間と

した。内部標準物質として C6-NBD-FA を含む chloroform/methanol (2:1) を 300  $\mu$ L 加えることにより酵素反応を停止させ、酵素反応液を窒素気流下で乾固した。

Methanol を 100  $\mu$ L 加えて脂質を再溶解し、超音波処理を行った。酵素反応生成物である C12-NBD-FA を HPLC (Prominence HPLC system、株式会社島津製作所、京都、京都) により分離し、蛍光検出器 (RF-10AXL、株式会社島津製作所) を用いて定量した (励起波長: 460 nm、蛍光波長: 534 nm)。分離用カラム (L-Column 2 ODS (5  $\mu$ m、2.1 $\times$ 150 mm)、化学物質評価研究機構、東京) は 30 $^{\circ}$ C で保温した。移動相はグラジエント遊離法のために acetonitrile (0.1% formic acid) および精製水 (0.1% formic acid) の 2 種類を用い、流速は 0.4 mL/min とした。30% acetonitrile から 100% acetonitrile へ 5 分までグラジエントさせ、14.5 分まで 100% acetonitrile を維持した。再び 30% acetonitrile へ戻し、再平衡化を 15 分行った。検量線は、酵素反応生成物と内部標準物質のピーク高さの比で作成した。マウス皮膚および三次元培養ヒト表皮ホモジネート中のタンパク質濃度は Lowry 法により測定した。

## 2-5. マウス背部への alkCDase 阻害剤の適用および角層中脂質の抽出

Houben らの方法を参考にした<sup>37)</sup>。4 週令のマウス背部に propylene glycol/ethanol (7:3) に溶解した 40 mM SPH または OEA を 50  $\mu$ L 滴下し、指で軽く叩くことにより適用した (1 日 2 回、3 日間)。Cyanoacrylate により alkCDase 阻害剤適用部位の角層を採取し、Imokawa らの方法を参考にして、マウス角層中 CER の定量を行った<sup>20)</sup>。採取した角層を hexane/ethanol (95:5) に浸し、超音波処理を行った。処理後、脂質抽出液をフィルター (SLGN033NS MILLEX-GV Syringe Driven Filter Unit、Merck Millipore Corporation、Darmstadt、Germany) により濾過し、試験管に移した。同様の操作をもう一度繰り返し、窒素気流下で



有機溶媒を除去した。さらに、試験管内の脂質に chloroform/methanol (2:1) を加え、超音波処理を行った。処理後、脂質抽出液を 1.5 mL チューブに移した。同様の操作をもう一度繰り返し、窒素気流下で乾固した。Cyanoacrylate により採取した角層をフィルターにより回収し、重量を測定した。

## 2-6. 三次元培養ヒト表皮への alkCDase 阻害剤の適用および表皮中脂質の抽出

薄膜法により、SPH/DPPC/DPPG (4:4:1) から構成されるリポソームを調製した (SPH および DPPC: 10 mM、DPPG: 2.5 mM)<sup>38)</sup>。有機溶媒に溶解した各脂質をナス型フラスコに添加し、エバポレータを用いて溶媒を除去することにより脂質の薄膜を作成した。脂質薄膜に PBS を添加し、機械的振動を与えることにより調製したリポソームを実験に用いた。三次元培養ヒト表皮は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。三次元培養ヒト表皮の角層側より、SPH 含有リポソーム 50 μL を 2 日おきに適用した。初回の SPH 含有リポソーム適用日を 0 日目とし、培地交換は 6 日目まで毎日行った。7 日目に ascorbic acid 含有培地 (25 μg/mL) を添加した。24 時間後にメスを用いてトランスウェルより三次元培養ヒト表皮を回収した。三次元培養ヒト表皮を chloroform/methanol (2:1) に浸漬し、氷中で SONIFIRE 250 (Branson、Danbury、CT、U.S.A.) により超音波処理を行った。脂質抽出液をフィルターにより濾過し、試験管に移した。その後は、マウス試料と同様の処理を行った。

## 2-7. マウス角層中および三次元培養ヒト表皮中の CER 定量

薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography: TLC) 法により、脂質の分離を行った。展開条件は、Imokawa らの報告に従った<sup>20)</sup>。1.5 mL チューブ内の脂質を chloroform/methanol (2:1) に再溶解し、キャピラリーを用いて HPTLC Silica

gel 60 (Merck Millipore Corporation) にスポットした。展開溶媒として chloroform/methanol/acetic acid (190:9:1) を用いて TLC プレーートの下端より 9 cm まで展開した。展開は 2 回行った。TLC プレーートに染色液 (10% copper sulfate、8% phosphoric acid) を噴霧し、ホットプレート (TLC Plate Heater III、CAMAG、Muttentz、Basel-Landschaft、Switzerland) で加熱 (180°C、10 分) することにより脂質のバンドを可視化した。TLC プレーートをルミノイメーリアナライザー (LAS1000-plus、富士フイルム株式会社、東京) により画像化し、Multi Gauge Version 3.0 (富士フイルム株式会社) を用いてバンド密度より各 CER を定量した。

## 2-8. 統計処理

SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.) を用いて Turkey's test、Dunnett's test および Student's *t*-test により統計処理を行った。危険率 5% 未満 ( $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$  および  $***p < 0.001$ ) を有意差ありとした。

### 第3節 結果

#### 3-1. SPH のマウス皮膚ホモジネート中 CDase 阻害活性

10 mM SPH 存在下における 8 週令マウス皮膚ホモジネート中 alkCDase 活性を測定した。Normal 群の alkCDase 活性 ( $6.7 \pm 1.7$  nmol/mg protein/h) と比較して、CDase 阻害剤として汎用されている OEA の存在下では、alkCDase 活性は 45.6% 低下した ( $3.6 \pm 0.9$  nmol/mg protein/h、 $p < 0.05$ )。また、10 mM SPH 存在下においては 88.0% 低下した ( $0.8 \pm 0.4$  nmol/mg protein/h、 $p < 0.001$ )。さらに、SPH 存在下における alkCDase 活性は、OEA 存在下と比較して 78.0% ( $p < 0.05$ ) 低下した (Fig. 4a)。また、同様の実験により aCDase 活性に対する SPH の影響について評価した。SPH 群における aCDase 活性は  $3.3 \pm 0.6$  nmol/mg protein/h であり、normal 群 ( $4.9 \pm 1.4$  nmol/mg protein/h) と比較して減少傾向を示したが ( $p = 0.07$ )、有意な差ではなかった (Fig. 4b)。

マウス皮膚ホモジネート中 alkCDase 活性に対する SPH の阻害活性を評価した。マウス皮膚ホモジネート中 alkCDase 活性は、SPH および OEA の濃度依存的に低下した (Fig. 5)。また、マウス皮膚ホモジネート中 alkCDase 活性に対する SPH の  $IC_{50}$  は  $0.09 \pm 0.01$  mM であり、OEA の  $IC_{50}$  ( $11.1 \pm 1.6$  mM) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.001$ ) (Table 2)。

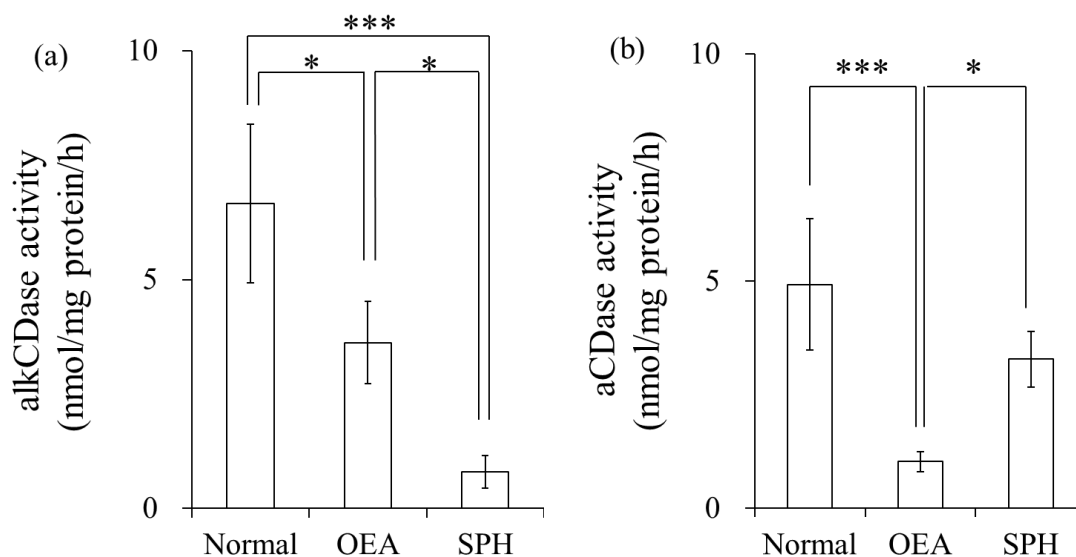


Fig. 4. Effects of SPH on the CDase activities in hairless mice skin homogenate.

OEA was used as positive control. OEA and SPH concentrations were 10 mM. The alkCDase activity at pH 8.5 (a) and the aCDase activity at pH 4.2 (b). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $p$  < 0.05, \*\*\* $p$  < 0.001, as determined by Turkey's test.

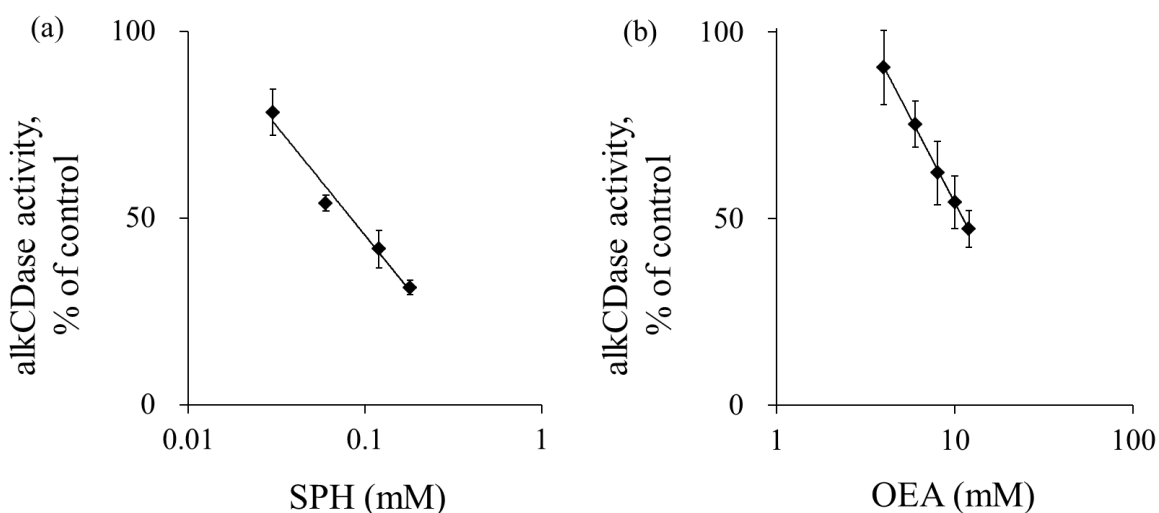


Fig. 5. The alkCDase activity in hairless mice skin homogenate in the presence of alkCDase inhibitors at various concentrations.

OEA was used as positive control. The alkCDase activity of control was measured in an alkCDase inhibitor-free condition. SPH (0.03–0.18 mM) (a) and OEA (4–12 mM) (b). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4).

Table 2. IC<sub>50</sub> of alkCDase inhibitors on the hairless mice skin homogenate.

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (mM)
OEA	11.1 ± 1.6
SPH	0.09 ± 0.01 ***

Values are expressed as the mean ± S.D. (n = 4). \*\*\**p* < 0.001, determined by Student's *t*-test.

### 3-2. SPH 適用後のマウス角層中 CER 含量

40 mM の SPH および OEA をマウス背部に 3 日間適用した後、角層中 CER 含量を測定した。Control 群には溶媒 (propylene glycol/ethanol (7:3)) を適用した。SPH および OEA 適用後における角層中 CER[NS]および CER[NP]含量は、control 群と比較して変化はみられなかった (Fig. 6a、b)。一方、CER[AS]含量は SPH を適用することにより、control 群 ( $3.9 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$  stratum corneum (SC)) と比較して有意に増加した ( $7.1 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mg}$  SC、 $p < 0.01$ ) (Fig. 6c)。同様に、CER[AP] 含量は SPH の適用により control 群 ( $10.5 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{mg}$  SC) と比較して有意に増加した ( $17.1 \pm 2.6 \mu\text{g}/\text{mg}$  SC、 $p < 0.001$ ) (Fig. 6d)。

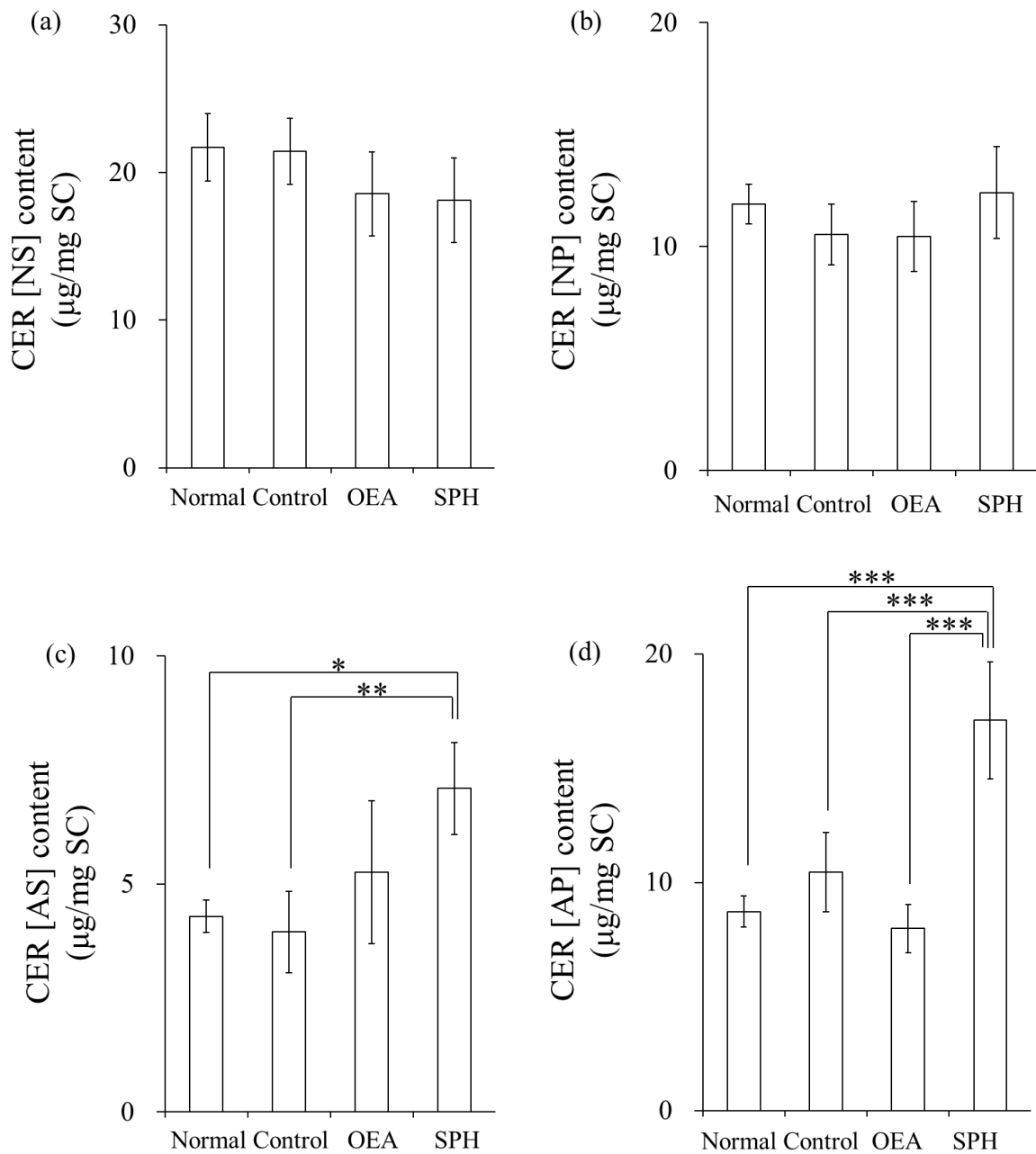


Fig. 6. The CERs content in SC of hairless mice after topical application of OEA or SPH.

OEA and SPH concentrations were 40 mM. Control group was applied with propylene glycol/ethanol (7:3). Content of CER [NS] (a), CER [NP] (b), CER [AS] (c), and CER [AP] (d). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, determined by Turkey's test.

### 3-3. SPH の三次元培養ヒト表皮ホモジネート中 alkCDase 阻害活性

SPH 存在下における三次元培養ヒト表皮ホモジネート中 alkCDase 活性を測定した (Fig. 7)。Normal 群における alkCDase 活性 ( $125 \pm 16.4$  pmol/mg protein/h) と比較して、10 mM OEA の存在下では alkCDase 活性は 55.5% 低下した ( $55.5 \pm 3.5$  pmol/mg protein/h、 $p < 0.001$ )。また、10 mM SPH 存在下においては 83.2% ( $21.0 \pm 7.1$  pmol/mg protein/h、 $p < 0.001$ ) 低下した。さらに、SPH 存在下における alkCDase 活性は、OEA 存在下と比較して 62.2% 低下した ( $p < 0.01$ )。

三次元培養ヒト表皮ホモジネート中 alkCDase 活性に対する SPH の阻害活性を評価した。三次元培養ヒト表皮ホモジネート中 alkCDase 活性は、SPH および OEA の濃度依存的に低下した (Fig. 8)。また、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  $IC_{50}$  は  $0.11 \pm 0.03$  mM であり、OEA の  $IC_{50}$  ( $7.8 \pm 1.2$  mM) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.01$ ) (Table 3)。



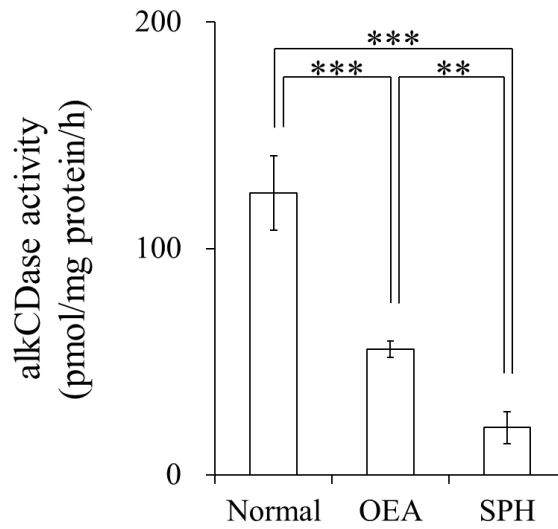


Fig. 7. Effect of SPH on the alkCDase activity in three-dimensional cultured epidermis homogenate.

OEA was used as a positive control. OEA and SPH concentrations were 10 mM. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, determined by Turkey's test.

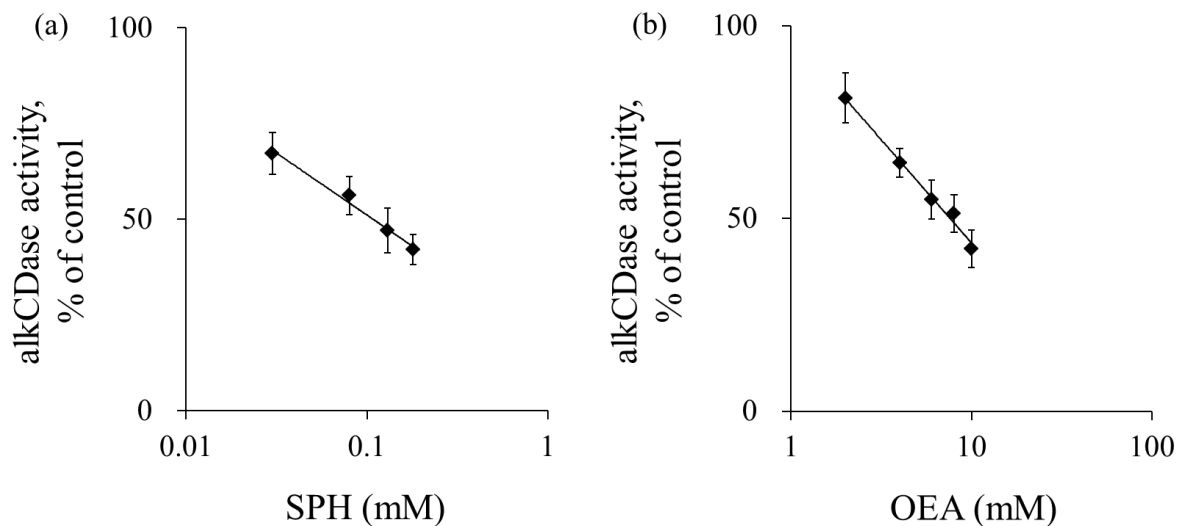


Fig. 8. The alkCDase activity in three-dimensional cultured epidermis homogenate in the presence of alkCDase inhibitors at various concentrations.

OEA was used as a positive control. The alkCDase activity of control was measured in an alkCDase inhibitor-free condition. SPH (0.03–0.18 mM) (a) and OEA (2–10 mM) (b). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4).

Table 3. IC<sub>50</sub> of alkCDase inhibitors in the three-dimensional cultured epidermis homogenate.

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (mM)
OEA	7.8 ± 1.2
SPH	0.11 ± 0.03 **

Values are expressed as the mean ± S.D. (n = 4). \*\**p* < 0.01, determined by Student's *t*-test.

### 3-4. SPH 適用後の三次元培養ヒト表皮中 CER 含量

10 mM の SPH を含有したリポソームを調製し、三次元培養ヒト表皮に適用した。培養後に培養表皮中 CER 含量を測定した。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[NS]、CER[NP]、CER[AS]および CER[AP]含量は、control 群と比較して変化はみられなかった (Fig. 9a-d)。一方、SPH 含有リポソーム適用群における CER[NDS]含量は  $15.8 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  であり、control 群 ( $7.8 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) と比較して有意に高値を示した ( $p < 0.001$ ) (Fig. 9e)。

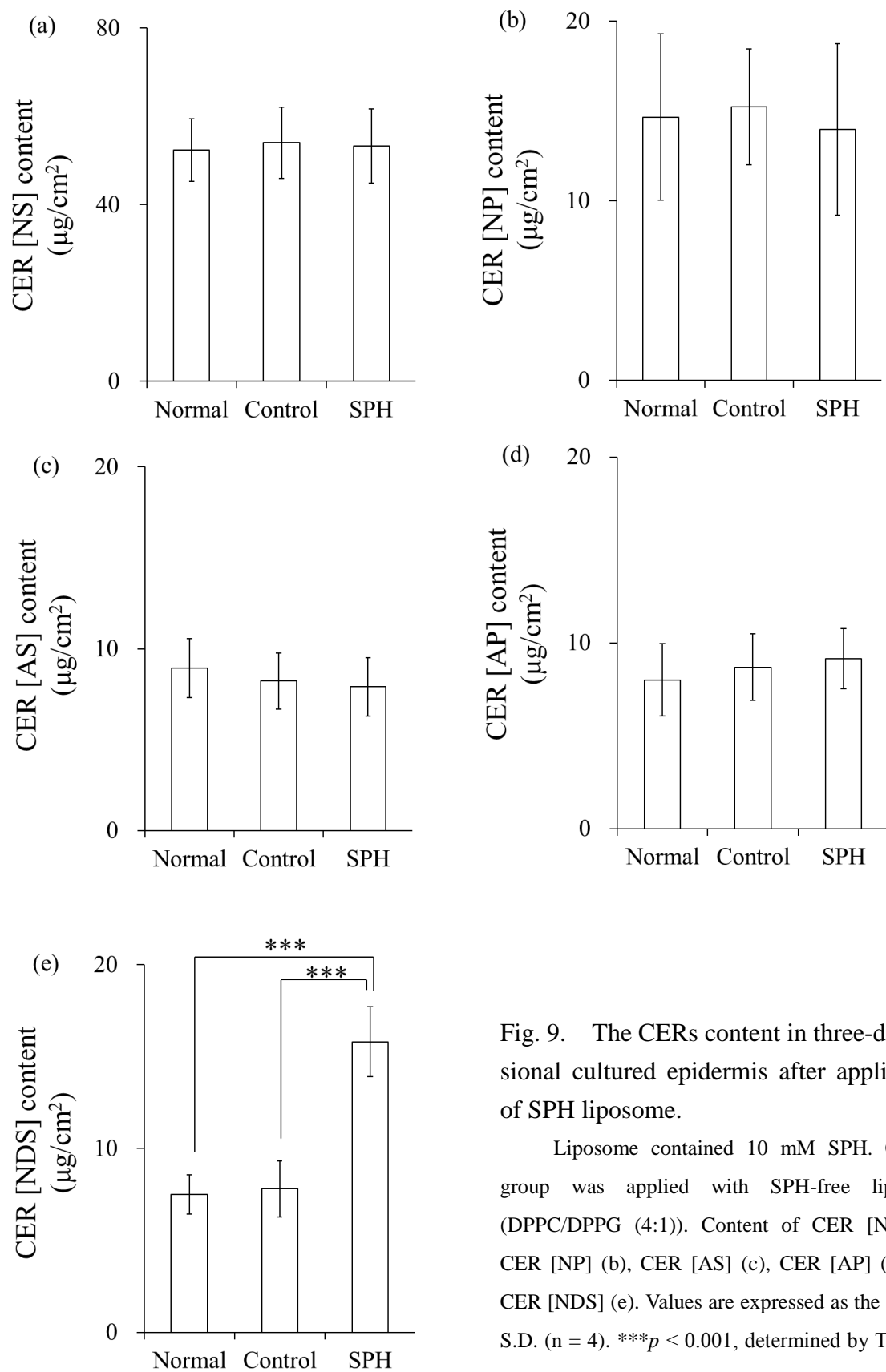


Fig. 9. The CERs content in three-dimensional cultured epidermis after application of SPH liposome.

Liposome contained 10 mM SPH. Control group was applied with SPH-free liposome (DPPC/DPPG (4:1)). Content of CER [NS] (a), CER [NP] (b), CER [AS] (c), CER [AP] (d), and CER [NDS] (e). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*\*\* $p < 0.001$ , determined by Turkey's test.

#### 第4節 考察

CER などの角層細胞間脂質は、皮膚バリアを維持するために重要である。加齢により角層中 CER 含量は減少すること<sup>20, 22)</sup>、角層中 alkCDase 活性は上昇することが報告されている<sup>29)</sup>。また、AD 患者皮膚には *Pseudomonas aeruginosa* より分泌された alkCDase が存在し<sup>32-34)</sup>、角層中 CER 含量は健常人と比較して少ないことが報告されている<sup>20)</sup>。これらのことから著者は、alkCDase 活性を阻害することで角層中 CER 含量を制御できる可能性があると考えた。第1章では CDase 活性の阻害という観点から、ヘアレスマウスおよび三次元培養ヒト表皮を用いて SPH の CDase 活性および CER 含量に与える影響について調査した。

まず、SPH のマウス皮膚ホモジネート中 alkCDase および aCDase に対する阻害活性を評価した。CDase 活性の測定には、蛍光基質である C12-NBD-CER を用いた。Positive control には CDase 阻害剤として汎用されている OEA を選択した。10 mM SPH 存在下における alkCDase 活性は、同濃度の OEA 存在下における alkCDase 活性と比較して有意に低下した (Fig. 4a)。また、alkCDase 活性に対する SPH の IC<sub>50</sub> は、OEA の IC<sub>50</sub> と比較して有意に低値を示した (Table 2)。Mao らは、maCER1 遺伝子を導入した COS1 細胞のミクロソーム画分における maCER1 活性に対する SPH の IC<sub>50</sub> は約 0.08 mM であると報告している<sup>16)</sup>。興味深いことに、本研究においてはマウス全層皮膚ホモジネートを用いて alkCDase 活性に対する SPH の IC<sub>50</sub> を測定したが、Mao らの報告と近い値 (0.09 mM) が得られた。10 mM SPH 存在下におけるマウス皮膚ホモジネート中 aCDase 活性は、normal 群と比較して減少傾向を示したが ( $p = 0.07$ )、有意な差は認められなかった (Fig. 4b)。またマウス皮膚ホモジネート中 alkCDase 活性と同様に、SPH は同濃度の OEA と比較して三次元培養ヒト表皮中 alkCDase 活性を有意に低下させた (Fig. 7)。また、alkCDase 活性に対する OEA または SPH の IC<sub>50</sub> は、マウス

皮膚ホモジネートおよび三次元培養ヒト表皮中ホモジネート間で近い値を示した (Table 2、3)。これらの結果より、SPH は aCDase 活性よりも alkCDase 活性を強く阻害すること、また SPH は OEA よりも優れた alkCDase 阻害を持つことが示唆された。

次に、propylene glycol/ethanol (7:3) に溶解した 40 mM OEA または SPH の適用後におけるマウス角層中 CER 含量を測定した。SPH の適用により control 群と比較して CER[AS]は有意に増加した (Fig. 6c)。Mao らは、C12-NBD-CER を用いた実験により、maCER1 (pH 8.0) は SPH を骨格とする CER に基質特異性を持つが、PSPH および DSPH を骨格とする CER は分解しないことを報告している<sup>16)</sup>。alkCDase のスフィンゴイドに対する基質特異性から、SPH の適用によりマウス皮膚における alkCDase 活性が阻害された結果、CER[AS]の分解が抑制されたことが示唆された。また、マウスへの SPH の経皮適用により PSPH を骨格として有する CER[AP]も有意に増加した (Fig. 6d)。この結果より、角層中 CER 含量の変化には alkCDase 活性阻害以外の要因も関係していると予想されるが、角層中 CER 分子種ごとの生成について詳細は明らかとなっていない。また、角層脂質膜モデルを用いた実験より、CER[AP]は膜の安定化に寄与することが報告されている<sup>39)</sup>。SPH の適用により角層中 CER[AP]含量が増加した結果、皮膚バリア機能は改善すると予想される。

さらに、三次元培養ヒト表皮への SPH の適用後に CER 含量を測定した。10 mM SPH を含有させたリポソームを調製し、三次元培養ヒト表皮へ適用した。Control として DPPC/DPPG (4:1) リポソームを適用したところ、いずれの CER 分子種にも変化はみられなかった (Fig. 9)。SPH 適用後におけるマウス角層中 CER 含量の結果 (Fig. 6) とは異なり、三次元培養ヒト表皮では SPH 含有リポソーム適用後における CER[AS]および CER[AP]含量の増加は認められなかったが、

CER[NDS]は有意に増加した (Fig. 9c-e)。

また、0.1 mM SPH 含有リポソーム適用後の三次元培養ヒト表皮において、normal 群と比較して TLC 分析における CER[NDS]のバンド密度には変化はみられなかったが、1 mM SPH 含有リポソームの適用により CER[NDS]のバンド密度は 24.5%増加した (data not shown)。TLC によるマウス角層中脂質分析では、CER[NDS]のバンドを確認することはできなかった。t'Kindt らは、ヒト前腕角層における CER 分子種組成について、CER[NP] (22.1%)、CER[NH] (14.5%) および CER[AH] (10.8%) が多く存在すること、また CER[EOS]は角層中 CER 全体の 6.5%を占めることを報告している<sup>40)</sup>。Shimotoyodome らも、ヒト前腕角層中 CER の中で、CER[NH] (約 26.0%) や CER[NP] (約 19.0%) が多く存在することを報告している<sup>41)</sup>。一方、Liou らは、ヌードマウス皮膚より抽出した脂質における CER 組成について、CER[EOS]が (76.2%) 多く存在することを報告している<sup>42)</sup>。ヒトとマウス間における皮膚中 CER 分子種の組成が異なるというこれらの研究報告から、ヒトとマウス間において各 CER 分子種の生成プロフィールは異なると考えられるため、同じ被験物質 (SPH) を適用したにも関わらず、適用後のマウス角層と三次元培養ヒト表皮間で異なる CER 分子種が変動したと考えている。

Duan らは、包皮由来正常ヒト皮膚表皮細胞に DSPH、SPH およびトウモロコシ由来の GC より精製した *trans*-4,*cis*-8-sphingadienine を適用すると CerS2、CerS3 および CerS4 の mRNA 発現量が増加することを報告している<sup>43)</sup>。Shirakura らは、コンニャク由来 GC より精製したスフィンゴイド (4, 8-sphingadienine および 4-hydroxy-8-sphinganine) 存在下で三次元培養ヒト表皮を培養すると、CER 代謝酵素の mRNA 発現量が control と比較して増加すること、また脂質抽出液の TLC 分析により、control と比較して CER[EOS]、CER[NS]および CER[NP]のバンド密

度が増加することを報告している<sup>44)</sup>。Sigruener らは、ヒト表皮細胞を DSPH、SPH または PSPH 存在下で培養することで、種々 CER 代謝酵素 mRNA 発現量および CER 量が増加することを報告している<sup>45)</sup>。これらの研究報告より、本研究においても SPH がマウスおよび三次元培養ヒト表皮における CER の *de novo* 合成を活性化した可能性が考えられる。また、Sigruener らは SPH を含有させた培地中でヒト表皮細胞を培養すると、スフィンゴイドとして SPH または PSPH を有する CER が増加することを報告している<sup>45)</sup>。しかし、本研究では三次元培養ヒト表皮角層側から SPH を適用することで、スフィンゴイドとして DSPH を有する CER[NDS]は有意に増加した (Fig. 9e)。Sigruener らの報告と本研究における実験結果が異なる理由は不明であるが、SPH の適用方法など実験方法の細かな差異が影響している可能性がある。

スフィンゴシンキナーゼ (sphingosine kinase: SPHK) は、SPH を S1P へと変換する酵素である。Hong らは、SPHK のアクチベータである K6PC-5 を不死化ヒト角化細胞およびマウス皮膚に適用することにより、表皮細胞の分化マーカーの発現は増加することを報告している<sup>46)</sup>。Schuppel らは、S1P は表皮細胞の増殖を抑制することを報告している<sup>8)</sup>。また、Kim らは培養ヒト表皮細胞の分化後期における細胞内 S1P 濃度は、SPH と共に劇的に増加することを報告している<sup>47)</sup>。これらのことを総合的に考えると、本研究においてマウスおよび三次元培養ヒト表皮に適用した SPH が S1P に変換され、表皮細胞の分化を促進した結果として CER 含量が増加したという可能性も考えられる。また、CerS の働きにより SPH がアシル CoA と結合し、再び CER に戻る経路 (サルベージ経路<sup>48)</sup>) も存在することが知られている。マウスまたは三次元培養ヒト表皮に適用した SPH が、CER に変換された可能性も考えられるが、SPH より変換された CER が皮膚バリアに寄与し得るのかなどについては詳細に分かっていない。



今回の結果から、**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、マウス角層および三次元培養ヒト表皮間において分子種は異なるが、**SPH** の適用により **CER** 含量は増加することが明らかとなった。これらの結果から、マウスおよび三次元培養ヒト表皮への **SPH** 適用後における **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。本研究より、**SPH** は角層中 **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。

第 2 章では、**SPH** の適用による角層中 **CER** 含量増加メカニズムの詳細を明らかにすることを目的として、**SMS2KO** マウスを用いた検討を行った。

## 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を用いたスフィンゴシンによる角層中セラミド含量増加メカニズムの解明

### 第1節 緒論

SMSは、CERにホスホコリンを付加してSMへと変換する酵素である(Fig. 10)。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。SMS1およびSMS2は6回膜貫通型タンパク質であり、組織発現はユビキタスである<sup>6)</sup>。細胞内局在はSMS1ではゴルジ装置、SMS2ではゴルジ装置および形質膜であることが報告されている<sup>6,49)</sup>。また、マウスとヒト間における相同性は、SMS1で97.8%、SMS2で91.5%であることが知られている。SMSrはSM合成能を持たず、CERをセラミドホスホエタノールアミンに変換することにより小胞体のCER含量を制御する役割を持つと考えられている<sup>50)</sup>。

現在、SMSの機能解明を目的としてSMS1またはSMS2遺伝子を欠損したマウスを用いた研究が行われている。現在までに、SMS1KOマウスでは中程度の新生児致死、体重減少、インスリン分泌能の低下<sup>51)</sup>および血漿、肝臓、マクロファージにおけるSM量の減少<sup>52)</sup>などの表現型が報告されている。また、SMS2KOマウスにおける表現型は、マクロファージおよび脳におけるSM量の減少<sup>53, 54)</sup>、高脂肪食により誘導される脂肪肝の減少<sup>55)</sup>およびリポ多糖誘導性肺障害の緩和<sup>56)</sup>などが報告されている。しかし、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。

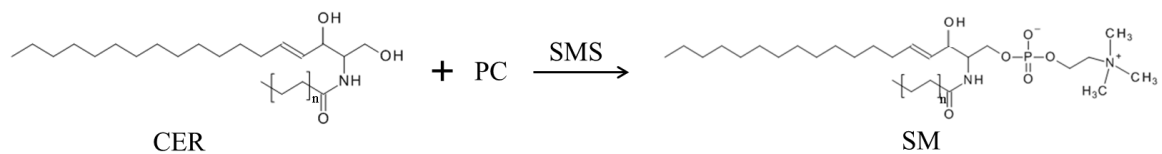


Fig. 10. Synthesis of SM by SMS.

SM は、細胞形質膜においてコレステロールと共に細胞内へのシグナル伝達の場と考えられている脂質ラフトと呼ばれる膜ドメインを構成しているが<sup>57)</sup>、皮膚においては皮膚バリア機能に関与する角層中 CER の前駆体として存在する。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。そこで第 2 章では、維持および繁殖が比較的容易である SMS2KO マウスを用いて研究を行った。まず、SMS2KO マウスにおける皮膚中スフィンゴ脂質代謝酵素活性 (SMS、GCS、酸性 SMase (acidic SMase: aSMase)、BGCase、aCDase および alkCDase)、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。

## 第2節 実験方法

### 2-1. 実験動物

C57BL/6 を遺伝的背景とし、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された SMS2KO マウス<sup>55)</sup>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。4週令の雄性マウスを実験に用いた。飼育は室温 22±2°C、湿度 55±5%、12時間毎の明暗サイクルの環境で行い、飼料および水は自由摂取とした。動物実験および飼育は、城西大学動物実験管理委員会および城西大学組換え DNA 実験安全委員会の承諾を得て「城西大学動物実験規定」に従って行った。また、PIA レベルの拡散防止措置を講じた。

### 2-2. 試薬および実験材料

C12-NBD-SM および C12-NBD-GC は Avanti Polar Lipids, Inc., (Alabaster, AL, U.S.A.) より購入した。C12-NBD-CER は Cayman Chemical Company より購入した。Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) は日本精化株式会社より供与された。Uridine diphosphate (UDP) -glucose は Sigma-Aldrich Co., LLC.より購入した。Aprotinin、leupeptin および cOmplete, Mini (Protease inhibitor cocktail tablets) は Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Baden-Württemberg, Germany) より購入した。D-erythro-sphingosine (SPH) および phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) は和光純薬工業株式会社より購入した。

TLC 分析の標準物質として使用した sphingomyelin (C18:0/d18:1) および glucosylceramide (C18:0/d18:1) は Avanti Polar Lipids, Inc.より購入した。non-hydroxy ceramide および hydroxy ceramide は Matreya, LLC より購入した。ceramide III および ceramide VI は Evonik Industries より購入した。

その他の試薬は和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社、第一三共株

株式会社、共立製薬株式会社（東京）、Alfa Aesar および Invitrogen より購入した。

### 2-3. 遺伝子検査

遺伝子検査は PCR 法により行った。解剖用ハサミを用いて SMS2KO マウス尾を 1 mm 程度採取した。得られたマウス尾を 25 mM NaOH、0.2 mM EDTA-2Na 75  $\mu$ L 中で加温（98°C、1 時間）することにより鋳型 DNA を抽出した。40 mM Tris-HCl (pH5.3) 75  $\mu$ L を添加し、遠心分離（1,000 $\times$ g、10 分、4°C）後の上清を使用するまで凍結保存した。Prime STAR® Max DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社、草津、滋賀）12.5  $\mu$ L、10 pmol/ $\mu$ L プライマー (forward および reverse) 各 1.25  $\mu$ L（最終濃度は 0.5  $\mu$ M）、オートクレーブ水 5.5  $\mu$ L、鋳型 DNA 溶液 4.5  $\mu$ L を 8 連チューブ内で混合し、サーマルサイクラー（Veriti、Thermo Fisher Scientific Inc.、Waltham, MA, U.S.A.）を用いて SMS2 の WT allele または KO allele を増幅した。

プライマー配列は以下の通りである。

GOR1 SA<sub>pcr1</sub>: 5'-AGCCACCGTGTCTCCTGCCGTTTGTTC-3'

NLSlacZ-R1: 5'-CTCTTCTTTTTTTCGCGAATTGCGGAACAC-3'

GOR1-R1: 5'-CCAAGTGCCTTCAAGTTTTGCTGTCTC-3'

各 allele の増幅を目的としたプライマーの組み合わせは以下の通りである。

WT allele: GOR1 SA<sub>pcr1</sub>、GOR1-R1

KO allele: GOR1 SA<sub>pcr1</sub>、NLSlacZ-R1

PCR 条件は以下の通りである。

98°C、7 分

98°C、10 秒\*

51°C、15 秒\*

72°C、48 秒\*

72°C、10 分

10°C、∞

\*サイクルは 40 とした。

PCR 後の反応液 10  $\mu$ L および 6 $\times$  Loading Buffer 2.0  $\mu$ L を混合し、混合液 10  $\mu$ L を 1  $\mu$ g/mL ethidium bromide 含有 1.5% agarose gel にアプライし、電気泳動を行った。トランスイルミネータを用いて agarose gel 中のバンドを確認した。Fig. 11 に遺伝子検査の結果の一例を示す。Lane 1 および 2、lane 3 および 4 はそれぞれ同一のマウス由来 DNA を鋳型とした。また lane 1 および 3 は WT allele、lane 2 および 4 は KO allele の増幅を目的としたプライマーの組み合わせを用いた。Lane 1 および 2 は SMS2 (+/+), lane 3 および 4 は SMS2 (-/-) であることを示している。

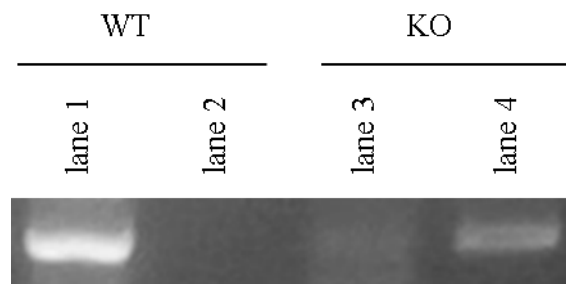


Fig. 11. Confirmation of SMS2 genotype.

WT allele and KO allele of SMS2 were amplified (lane 1 and 4).

## 2-4. 皮膚中スフィンゴ脂質代謝酵素活性の測定

### SMS および GCS 活性の測定

Yamaoka らおよび Villani らの方法を改変して行った<sup>7, 58)</sup>。マウスを屠殺し、背部の体毛を除去した後に全層皮膚を採取した。皮下脂肪を除去した後に解剖用ハサミで破碎した。Buffer A (50 mM Tris-HCl (pH7.4)、2.5 mM EDTA-2Na、25 µg/mL leupeptin、25 µg/mL aprotinin、0.1 tablets/mL cOmplete Mini、1 mM PMSF、1% isopropanol in PBS) を添加し、氷中でホモジナイズ (25,000 rpm、1 分) した。遠心分離 (800×g、10 分、4°C) を行い、上清を酵素活性の測定に用いた。C12-NBD-CER および DMPC をコーティングした 1.5 mL チューブに buffer B (120 mM Tris-HCl (pH7.4)、6 mM EDTA-2Na、60 mM KCl) 20.9 µL を添加し、超音波処理を行うことにより溶解した (最終濃度は 40 および 200 µM)。3.5 mM UDP-glucose (最終濃度は 215 µM) 3.1 µL、皮膚ホモジネート 25 µL を添加し、インキュベートした (37°C、3 時間)。内部標準物質を含有した chloroform/methanol (2:1) を添加することにより酵素反応を停止させた。HPLC による反応生成物 (C12-NBD-SM および C12-NBD-GC) の定量は、第 1 章 第 2 節 2-4. と同様に行った。

### aSMase、BGCase、aCDase および alkCDase 活性の測定

第 1 章 第 2 節 2-3. および 2-4. と同様に実験操作を行った。マウスを屠殺し、背部の体毛を除去した後に全層皮膚を採取した。1% Triton X-100 in 0.25 M sucrose を添加し、ホモジネートを作成した。1.5 mL チューブにコーティングした種々の蛍光基質に detergent mixture (40 mg/mL Triton X-100、16 mg/mL Tween 80) 12.5 µL を添加し、溶解した。C12-NBD-GC は 64 mg/mL sodium cholate、40 mg/mL Triton X-100、16 mg/mL Tween 80 を用いて溶解した。Buffer 25 µL および皮膚ホモジネート 12.5 µL を加えてインキュベート (37°C、1 または 3 時間) した。HPLC

により、酵素反応生成物の定量を行った。Table 4 に種々スフィンゴ脂質代謝酵素活性の測定条件を示す。

Table 4. Conditions for measurement of sphingolipid metabolism enzyme activities.

Enzyme	Substrate	Product	Buffer	Incubation time (h)	References
SMS	C12-NBD-CER, DMPC (50, 200 $\mu$ M)	C12-NBD-SM	Tris-HCl buffer (50 mM, pH7.4)	3	7, 58
GCS	C12-NBD-CER, UDP-glucose (50, 215 $\mu$ M)	C12-NBD-GC	Tris-HCl buffer (50 mM, pH7.4)	3	7, 58
aSMase	C12-NBD-SM (5 $\mu$ M)	C12-NBD-CER	acetate buffer (100 mM, pH5.2)	3	59
BGCase	C12-NBD-GC (5 $\mu$ M)	C12-NBD-CER	phosphate-citrate buffer (100 mM, pH5.6)	1	59
aCDase	C12-NBD-CER (50 $\mu$ M)	C12-NBD-FA	acetate buffer (125 mM, pH4.0)	1	26
alkCDase	C12-NBD-CER (50 $\mu$ M)	C12-NBD-FA	Tris-HCl buffer (125 mM, pH8.5)	1	26

## 2-5. 皮膚中および角層中脂質の抽出

### 皮膚中脂質の抽出

屠殺後、体毛を除去したマウス背部における全層皮膚を採取した。皮下組織を除去し、秤量した。以降は第 1 章 第 2 節 2-6. と同様に実験操作を行い、皮膚中脂質を抽出した。

### 角層中脂質の抽出

頸椎脱臼による屠殺後、マウス背部を抜毛した。以降は第 1 章 第 2 節 2-5. と同様に実験操作を行い、角層中脂質を抽出した。



## 2-6. 皮膚中および角層中脂質の定量

脂質の再溶解および TLC プレートへのスポットは第 1 章 第 2 節 2-7. と同様に行った。脂質の展開後、バンド密度より定量を行った。SM および GC の展開条件は以下の通りである<sup>60)</sup>。Uchida らの報告を参考にして SM の定性を行った<sup>61)</sup>。Vasireddy らの報告を参考にし<sup>60)</sup>、またオルシノール硫酸法により GC の定性を行った。CER の定量は第 1 章 第 2 節 2-7. と同様に行った。

### SM の定量

chloroform/methanol/acetic acid/water (50:30:8:4)

### GC の定量

- ①chloroform/methanol/water (40:10:1)
- ②chloroform/methanol/acetic acid (47:2:0.5)
- ③hexane/diethylether/acetic acid (65:35:1)

## 2-7. TEWL の測定

0.65% ペントバルビタールナトリウムをマウス腹腔内に投与 (45 mg/kg) することにより麻酔した。麻酔下において、ピンセットを用いてマウス背部を抜毛した。2 日後に Tewameter TM300 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Cologne, Nordrhein-Westfalen, Germany) を用いて抜毛部位の TEWL を測定した。

## 2-8. SPH 適用後における角層中 CER の定量

第 1 章 第 2 節 2-5. と同様の実験操作を行った。麻酔下においてマウス背部を抜毛した。マウス抜毛部位に 40 mM SPH を 50  $\mu$ L 滴下し、指で軽く叩くことにより適用した (1 日 2 回、3 日間)。SPH の適用終了後、角層を採取し、CER 含量の測定を行った。

## 2-9. 統計処理

SAS University Edition を用いて Turkey's test および Student's *t*-test により統計処理を行った。危険率 5% 未満 ( $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$  および  $***p < 0.001$ ) を有意差ありとした。

### 第3節 結果

#### 3-1. SMS2KO マウス皮膚中のスフィンゴ脂質代謝酵素活性

SMS2KO マウス皮膚中のスフィンゴ脂質代謝酵素活性を WT マウスと比較した。SMS2KO マウス皮膚中における SMS 活性は  $11.6 \pm 3.4$  pmol/mg protein/h であり、WT マウス ( $62.1 \pm 11.0$  pmol/mg protein/h) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.001$ ) (Fig. 12a)。また、SMS2KO マウス皮膚中における GCS 活性は  $86.8 \pm 20.4$  pmol/mg protein/h であり、WT マウス ( $135.8 \pm 15.6$  pmol/mg protein/h) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.01$ ) (Fig. 12b)。SMS2KO マウスおよび WT マウス間における皮膚中 aSMase、BGCase、aCDase、alkCDase 活性には差はみられなかった (Fig. 12c-f)。

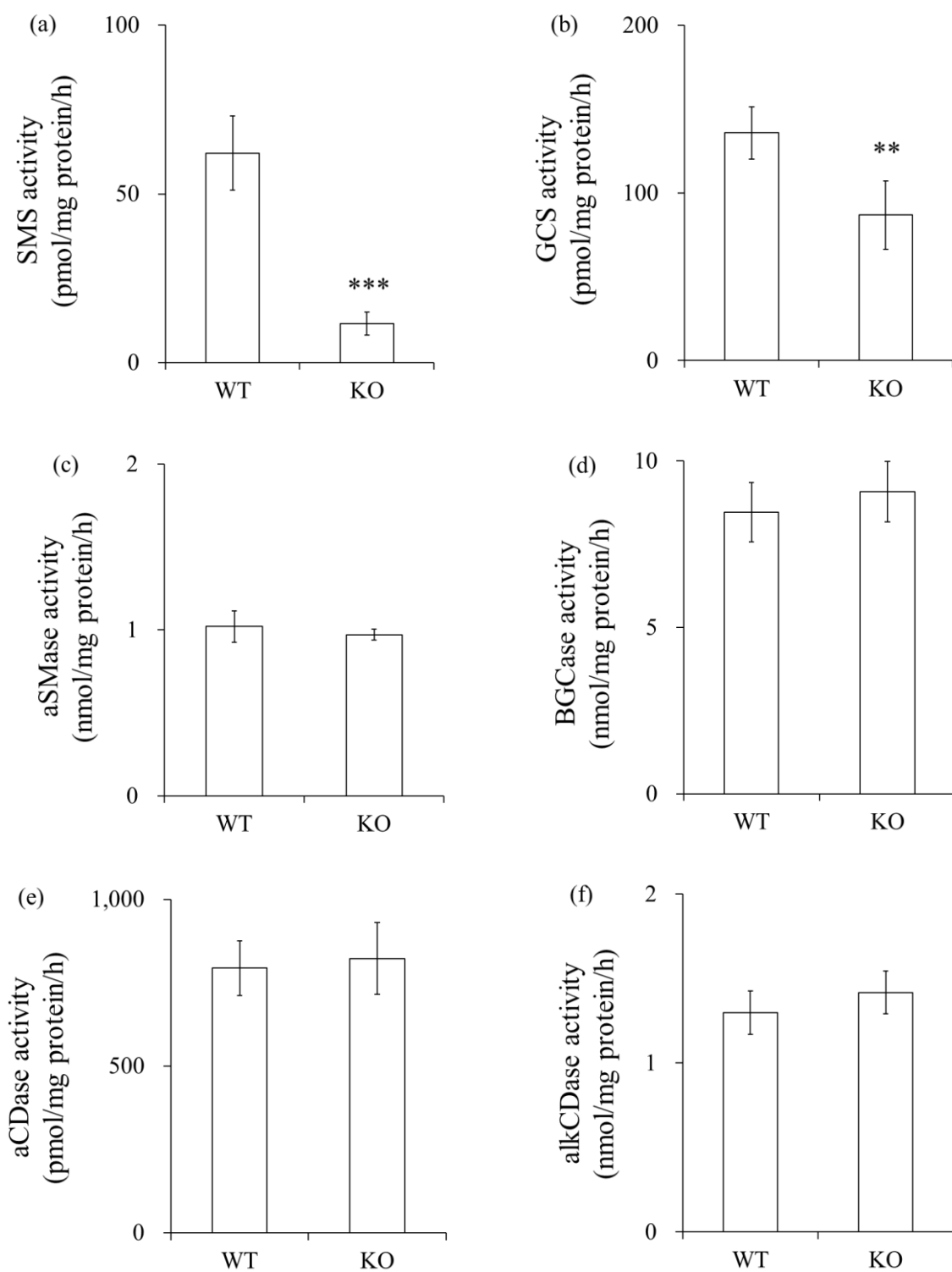


Fig. 12. The sphingolipid metabolism enzyme activities in skin of SMS2KO and WT mice.

Specific activity of SMS (a), GCS (b), BGCCase (c), aSMase (d), aCDase (e) and alkCDase (f). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, as determined by Student's  $t$ -test.

### 3-2. SMS2KO マウス皮膚中の SM および GC 含量

SMS2KO マウス全層皮膚中の SM および GC 含量を、WT マウスと比較した。SMS2KO マウス全層皮膚中における SM 含量は  $2.2 \pm 0.3 \mu\text{g/mg skin}$  であり、WT マウス ( $2.3 \pm 0.2 \mu\text{g/mg skin}$ ) との差はみられなかった (Fig. 13a)。また、SMS2KO マウス全層皮膚中における GC 含量は  $1.1 \pm 0.2 \mu\text{g/mg skin}$  であり、WT マウス ( $1.5 \pm 0.3 \mu\text{g/mg skin}$ ) と比較して減少傾向を示した ( $p = 0.08$ ) (Fig. 13b)。

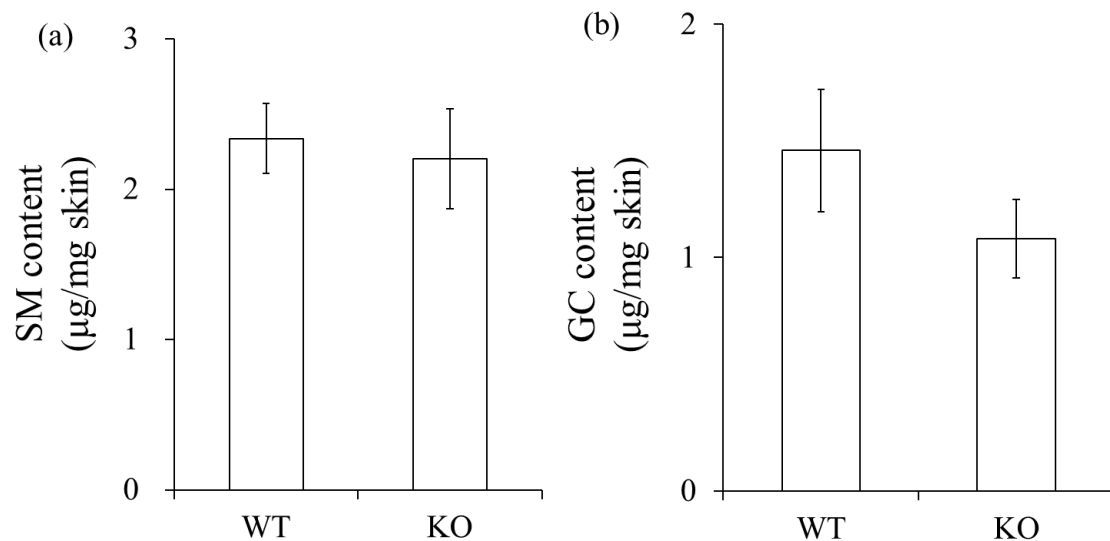


Fig. 13. The SM and GC content in skin of SMS2KO and WT mice. Content of SM (a), GC (b). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3-4).

### 3-3. SMS2KO マウス角層中の CER 含量

SMS2KO マウス角層中の CER 含量を、WT マウスと比較した。SMS2KO マウス角層中における CER[NS]および CER[NP]含量はそれぞれ  $28.2 \pm 6.5$ 、 $2.7 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  SC であり、WT マウス ( $47.8 \pm 4.7$ 、 $4.2 \pm 1.2$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  SC) と比較して有意に低い値を示した ( $p < 0.001$ 、 $p < 0.05$ ) (Fig. 14a、b)。SMS2KO マウスおよび WT マウス間における角層中 CER[AS]および CER[AP]含量には差はみられなかった (Fig. 14c、d)。

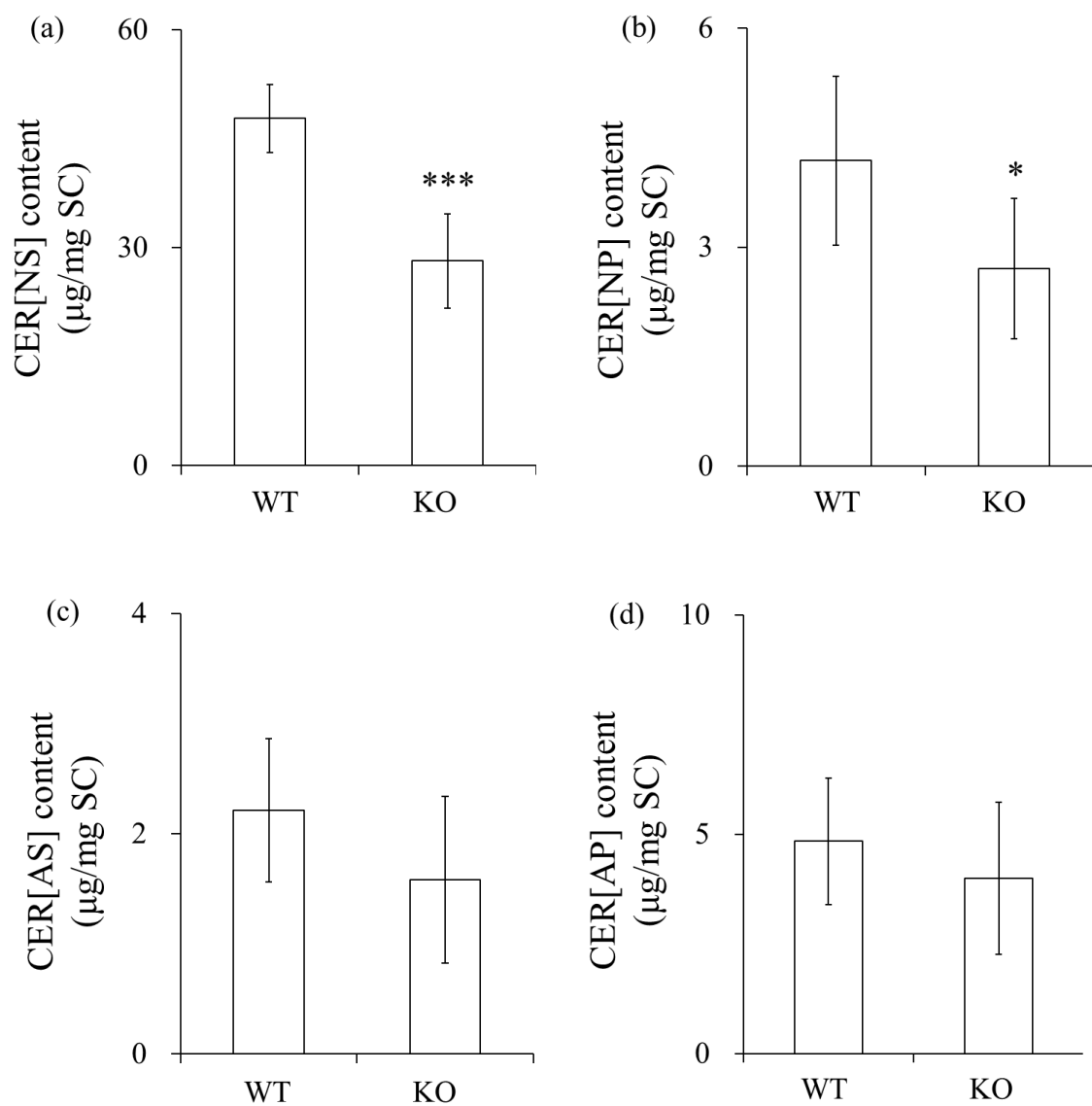


Fig. 14. The CERs content in SC of SMS2KO and WT mice.

Content of CER [NS] (a), CER [NP] (b), CER [AS] (c), and CER [AP] (d). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 6). \* $p$  < 0.05, \*\*\* $p$  < 0.001, determined by Student's  $t$ -test.

### 3-4. SMS2KO マウス背部の TEWL

SMS2KO マウス背部の TEWL を WT マウスと比較した。SMS2KO マウス背部の TEWL ( $13.6 \pm 4.6$  g/m<sup>2</sup>/h) は WT マウス ( $8.8 \pm 2.3$  g/m<sup>2</sup>/h) よりも有意に高い値を示した ( $p < 0.01$ ) (Fig. 15)。

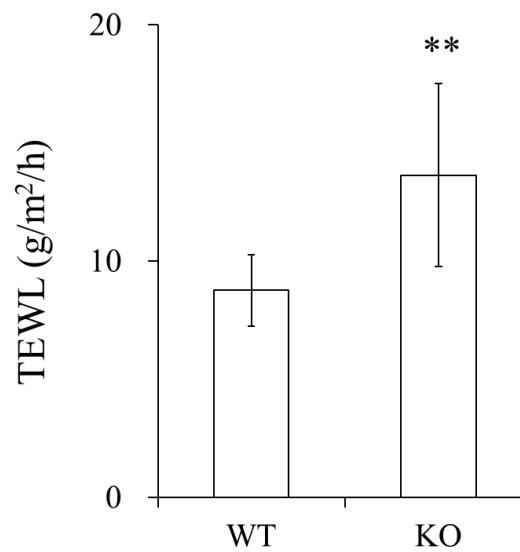


Fig. 15. TEWL on dorsal skin of WT and SMS2KO mice.

Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 12-15). \*\* $p < 0.01$ , determined by Student's *t*-test.



### 3-5. SPH 適用後の SMS2KO マウス角層中 CER 含量

SMS2KO マウスへの SPH 経皮適用後の角層中 CER 含量を、WT マウスと比較した。SMS2KO マウスおよび WT マウスへの SPH 適用後における角層中 CER[NS]、CER[NP]および CER[AS]含量は、normal 群と比較して差はみられなかった (Fig. 16a-c)。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 ( $4.6 \pm 1.9$ 、 $5.3 \pm 1.4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  SC) と比較し、SPH 適用群 ( $7.1 \pm 1.1$ 、 $7.5 \pm 1.5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  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 (Fig. 16d)。

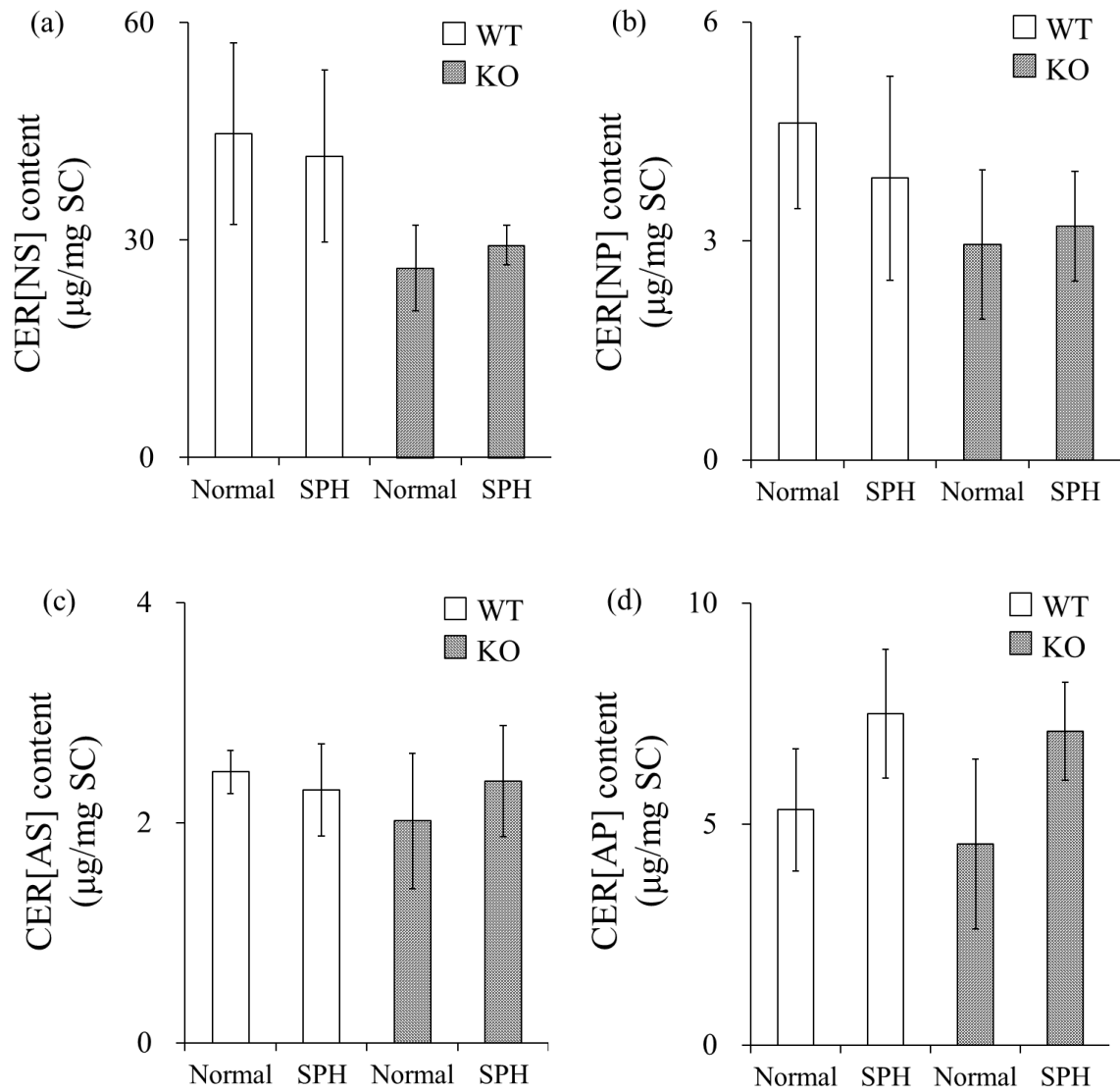


Fig. 16. The CERs content in SC of SMS2KO and WT mice after topical application of SPH.

SPH concentrations was 40 mM. Content of CER [NS] (a), CER [NP] (b), CER [AS] (c), and CER [AP] (d).

Values are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4).

## 第4節 考察

第1章の結果および考察より、SPH適用によるマウス角層中CER含量の増加には、alkCDase活性の阻害以外の要因も関与しているものと考えられた。そこで、第2章では、CER生合成に関与する酵素のひとつであるSMS2を欠損させたマウスを用い、SPH適用による角層中CER増加メカニズムを解明することを目的として研究を行った。

まず、SMS2KOマウスおよびWTマウス間において、皮膚中スフィンゴ脂質代謝酵素活性、皮膚中SMおよびGC含量を比較した。SMS2KOマウス皮膚中SMS活性は、WTマウスと比較して81.3%低下した (Fig. 12a)。SMS2KOマウスのマクロファージ、脳および肺におけるSMS活性は、WTマウスと比較してそれぞれ18.0、17.0および57.0%低下、また脳におけるSM含量はWTマウスと比較して25.0%低下していることが報告されている<sup>54, 56, 62</sup>)。これらの報告と比較すると、本研究におけるSMS2KOマウス皮膚中SMS活性はWTマウスと比較して大きく低下していた。しかし、皮膚中SM含量はSMS2KOマウスおよびWTマウス間において差は認められなかった (Fig. 13a)。これらの結果から、皮膚中SMS2活性の低下は、皮膚中SM含量に大きな影響を与えないことが示唆された。また、SMS2KOマウスにおいて報告されている表現型は、SMS1KOマウスよりも比較的軽度であることも関与している可能性がある。本研究ではSMS2KOマウス全層皮膚中SM含量の測定を行ったが、全層皮膚より単離した表皮中におけるSM含量においては本研究とは異なる結果を示す可能性がある。SMを含むスフィンゴ脂質には分子内におけるスフィンゴイドのタイプ、アシル基の鎖長や二重結合の有無により多数の分子種が存在する。UchidaらはTLCによるマウスおよびヒト表皮中SMの分離の際に現れる3つの画分 (SM-1、SM-2およびSM-3)のうち、SM-1はCER[NS]に変換されることを報告している<sup>61</sup>)。

また、Abeらはマウス表皮中 SM-1 画分において C24:0/d18:1 (「C24:0」は SM 分子内のアシル基の炭素鎖長が 24 であり二重結合数が 0 であること、また「d18:1」は分子内のスフィンゴイドは SPH であることを示す) という分子種が最も多く含まれている (30.8%) ことを報告している<sup>63)</sup>。スフィンゴ脂質の分離および定量には液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC/MS/MS) や TLC が繁用されている。スフィンゴ脂質を分種ごとに詳細に分析する場合には LC/MS/MS が適している一方で、TLC 法ではスフィンゴ脂質を様々な分子種を含んだバンドとして観察することができる。本研究では SMS2KO マウス皮膚中 SM の総量を測定するため脂質の分離法として TLC 法を選択したが、LC/MS/MS を用いて SMS2KO マウス皮膚中 SM 含量を分子種ごとに定量した場合には、WT マウスと比較して皮膚中含量が減少している SM 分子種 (特に C24:0/d18:1) が観察される可能性がある。SMS または GCS はどちらも角層中 CER の前駆体である SM または GC を合成する酵素であるので、SMS2KO マウス皮膚中における SMS 活性の低下を補うために GCS 活性は増加することを予想したが、GCS 活性は WT マウスと比較して 36.1%低下した (Fig. 12b)。また、皮膚中 GCS 活性の低下に伴い、SMS2KO マウス皮膚中の GC 含量は WT マウスと比較して 26.0%低下した ( $p = 0.08$ ) (Fig. 13b)。SMS2KO マウス皮膚中において GCS 活性が低下した理由については不明であるが、SMS2KO マウス皮膚中における SMS 活性の低下を補うために GCS 活性は増加しないことが示唆された。SMS2KO マウス皮膚中 aSMase、BGCase、aCDase および alkCDase 活性は、WT マウスと比較して差はみられなかった (Fig. 12c-f)。これらの結果から、WT マウスと比較して SMS2KO マウス皮膚におけるスフィンゴ脂質代謝酵素活性は、SMS および GCS を除いて大きく変化しないことが示唆された。

次に、SMS2KO マウスにおける角層中 CER 含量および TEWL を WT マウスと比較した。SMS2KO マウス角層中 CER[NS]および CER[NP]の含量は、WT マウスと比較して有意に低い値を示した (Fig. 14a、b)。Uchida らは、ヘアレスマウス角層における CER[NS]分子内の FA 組成について、C24:0 (38.1%) は C26:0 (47.3%) に次いで二番目に多いことを報告している<sup>61)</sup>。SM は、SMase による加水分解反応を受け CER およびホスホコリンへと変換される。SM より変換された CER 分子内におけるスフィンゴイドおよび FA は元の SM と同一であるので、この結果からも WT マウスと比較して SMS2KO マウス皮膚中における SM (C24:0/d18:1) 含量は減少していることが予想される。また、WT マウスと比較して SMS2KO マウス皮膚中の GC 含量は減少傾向にあったことも角層中 CER 含量の減少に寄与している可能性がある。角層中 CER 含量の減少に対応して、SMS2KO マウス背部における TEWL は WT マウスよりも有意に高い値を示した (Fig. 15)。これらの結果より、SMS2KO マウスでは角層中 CER 含量の低下に伴い皮膚バリア機能は低下することが示唆された。

最後に、SPH 適用後における角層中 CER 含量を比較した。第 1 章の結果とは異なり、SMS2KO マウスおよび WT マウスのどちらにおいても SPH の適用による CER[AS]含量の増加はみられなかった (Fig. 6c、16c)。この結果には、第 1 章で用いた HOS:HR-1 マウスと第 2 章で用いた C57BL/6 マウス間の系統差が影響している可能性があると考えた。また、SPH 適用群における SMS2KO マウスおよび WT マウス角層中 CER[AP]含量は、normal 群と比較してそれぞれ 56.0、41.0%の増加を示したが、有意な差ではなかった (Fig. 16d)。SMS2KO マウスおよび WT マウス間において、SPH の適用による角層中 CER 分子種の変動パターンに差はみられなかったことから、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

CER は、皮膚の最外層に位置する角層において、遊離 FA やコレステロールなどの脂質と共にラメラ構造を形成しており、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役割を担っている。また、CER は細胞のアポトーシスやストレス応答などに関与する細胞内シグナル伝達分子としての機能も持つ<sup>1, 2)</sup>。角層における CER 生合成は、セリンとパルミトイル CoA の縮合反応より開始される。その後、種々酵素反応による代謝を受けて角層中 CER が生成されるが、角層中 CER は CDase によりスフィンゴイドおよび FA へと分解される。老人性乾皮症や AD の患者角層における CER 含量は健常人と比較して少なく、皮膚バリア機能は低下していることが知られている<sup>20, 30)</sup>。角層中 CER 減少の原因の一つとして、CDase 活性の上昇が考えられている<sup>29, 32-34)</sup>。よって、CDase 活性を阻害することにより角層中 CER 含量を制御できると考えた。CER の分解産物である SPH は、モルモット表皮由来の alkCDase などの活性を阻害することが報告されている<sup>15, 16)</sup>。また、SPH は皮膚において抗菌活性<sup>17, 18)</sup>および抗炎症作用<sup>19)</sup>などを持つことが報告されている。よって、SPH は皮膚にとって有益な化合物であると考え本研究に用いた。

第 1 章では、皮膚中 CDase 活性の阻害という観点から、皮膚中 CER 含量の増加を目的として研究を行った。まず、ヘアレスマウスを用いた皮膚中 alkCDase 活性に対する SPH の阻害活性を評価し、次にヘアレスマウスへ SPH を経皮適用し、角層中 CER 含量を評価した。その結果、SPH は CDase の阻害剤として汎用されている OEA よりも高い alkCDase 阻害活性を示した (Table 2)。また、SPH 適用群における角層中 CER[AS]および CER[AP]含量は、control 群と比較して有意に増加した (Fig. 6c, d)。さらに、三次元培養ヒト表皮を用いて同様の実験を

行った。OEA と比較して、SPH は三次元培養ヒト表皮中 alkCDase 活性に対しても高い阻害活性を示した (Table 3)。しかし、ヘアレスマウスでの実験結果とは異なり、SPH 含有リポソームの適用後における三次元培養ヒト表皮中 CER[AS] および CER[AP] 含量は、control 群と比較して変化はみられなかった (Fig. 9c, d)。一方、SPH 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、control 群と比較して有意に増加した (Fig. 9e)。SPH を含むスフィンゴイドは皮膚における CER 合成を促進させることが報告されているが<sup>43-45)</sup>、SPH 適用後における 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考えられた。本研究より SPH は alkCDase 活性を阻害し、角層中 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 は、加齢や AD などの要因により減少した角層中 CER 含量の改善を目的とした臨床応用や、保湿を目的とした化粧品および医薬部外品への応用が可能であると考えられる。

第 2 章では、SPH の適用による角層中 CER 含量増加メカニズムの詳細を明らかにすることを目的として研究を行った。皮膚中 CER の前駆体である SM を合成する酵素のひとつである SMS2 を欠損させたマウスを用いて、皮膚中スフィンゴ脂質代謝酵素活性、角層中 CER 含量、皮膚中 SM および GC 含量および皮膚バリア機能の測定を行った。その結果、SMS2KO マウス皮膚中における SMS および GCS 活性は WT マウスと比較して有意に低下した (Fig. 12a, b)。また、SMS2KO マウス皮膚中における aSMase、BGCase、aCDase および alkCDase 活性は、WT マウスと比較して差はみられなかった (Fig. 12c-f)。SMS2KO マウス皮膚中における SM 含量は WT マウスと近い値を示したが、GC 含量は減少傾向を示した (Fig. 13)。また、角層中 CER[NS] および CER[NP] 含量は有意に低下した (Fig. 14a, b)。さらに、SMS2KO マウス背部における TEWL は WT マウスと比

較して増加した (Fig. 15)。これらの結果から、SMS2KO マウスは角層中 CER 含量の減少に伴う皮膚バリア機能の低下を呈することが示唆された。次に、SPH 適用後の SMS2KO マウス角層中 CER 含量を測定した。SMS2KO マウスおよび WT マウスにおける SPH 経皮適用後の角層中 CER 含量の変動パターンに差はみられなかったことから (Fig. 16)、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。

本研究で得られた結果から、SPH は角層中 CER 含量を増加させ、そのメカニズムのひとつとして alkCDase 活性の阻害が関与していることが示唆された。また、SPH 適用後における、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。今後、SPH の適用による CER 分子種ごとの増加メカニズムの詳細が明らかになることを期待する。



## 謝辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 薬粧品動態制御学講座 杉林堅次 教授に深く感謝致します。

また、本研究に際して有益な御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部 皮膚生理学講座 徳留嘉寛 教授に深甚なる感謝の意を表します。

博士論文研究第 2 章にて用いたスフィンゴミエリン 2 合成酵素ノックアウトマウスの供与並びに情報、御助言を賜りました金沢医科大学医学部 血液免疫内科学教室 岡崎俊朗 特任教授、麻布大学獣医学部 生化学教室 山下匡教授に感謝致します。

最後に、本研究のために犠牲になった動物に感謝し、追悼の意を表します。

## 参考文献

- 1) Obeid L. M., Linardic C. M., Karolak L. A., Hannun Y. A., Programmed cell death induced by ceramide, *Science*, **259**, 1769-1771 (1993)
- 2) Hannun Y. A., Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress, *Science*, **274**, 1855-1859 (1996)
- 3) van Smeden J., Hoppel L., van der Heijden R., Hankemeier T., Vreeken R. J., Bouwstra J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery, *J. Lipid Res.*, **52**, 1211-1221 (2011)
- 4) Holleran W. M., Williams M. L., Gao W. N., Elias P. M., Serine-palmitoyl transferase activity in cultured human keratinocytes, *J. Lipid Res.*, **31**, 1655-1661 (1990)
- 5) Futerman A. H., Pagano R. E., Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver, *Biochem. J.*, **280**, 295-302 (1991)
- 6) Huitema K., van den Dikkenberg J., Brouwers J. F., Holthuis J. C., Identification of a family of animal sphingomyelin synthases, *EMBO J.*, **23**, 33-44 (2004)
- 7) Yamaoka S., Miyaji M., Kitano T., Umehara H., Okazaki T., Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 18688-18693 (2004)
- 8) Schueppel M., Kuerschner U., Kleuser U., Schaefer K. M., Kleuser B., Sphingosine 1-phosphate restrains insulin-mediated keratinocyte proliferation via inhibition of Akt through the S1P<sub>2</sub> receptor subtype, *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 1747-1756 (2008)
- 9) Edsall L. C., Pirianov G. G., Spiegel S., Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation, *J. Neurosci.*, **17**,

- 6952-6960 (1997)
- 10) Dickson R. C., Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 27-48 (1998)
  - 11) Masukawa Y., Narita H., Shimizu E., Kondo N., Sugai Y., Oba T., Homma R., Ishikawa J., Takagi Y., Kitahara T., Takema Y., Kita K., Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum, *J. Lipid Res.*, **49**, 1466-1476 (2008)
  - 12) Okabe K., Keenan R. W., Schmidt G., Phytosphingosine groups as quantitatively significant components of the sphingolipids of the mucosa of the small intestines of some mammalian species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 137-143 (1968)
  - 13) Wertz P. W., Downing D. T., Free sphingosines in porcine epidermis, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1002**, 213-217 (1989)
  - 14) Wertz P. W., Downing D. T., Free sphingosine in human epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 159-161 (1990)
  - 15) Yada Y., Higuchi K., Imokawa G., Purification and biochemical characterization of membrane-bound epidermal ceramidases from guinea pig skin, *J. Biol. Chem.*, **270**, 12677-12684 (1995)
  - 16) Mao C., Xu R., Szulc Z. M., Bielawski J., Becker K. P., Bielawska A., Galadari S. H., Hu W., Obeid L. M., Cloning and characterization of a mouse endoplasmic reticulum alkaline ceramidase: An enzyme that preferentially regulates metabolism of very long chain ceramides, *J. Biol. Chem.*, **278**, 31184-31191 (2003)
  - 17) Bibel D. J., Aly R., Shinefield H. R., Antimicrobial activity of sphingosines, *J. Invest. Dermatol.*, **98**, 269-273 (1992)
  - 18) Fischer C. L., Drake D. R., Dawson D. V., Blanchette D. R., Brogden K. A., Wertz P. W., Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against Gram-positive

- and Gram-negative bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 1157-1161 (2012)
- 19) Gupta A. K., Fisher G. J., Elder J. T., Nickoloff B. J., Voorhees J. J., Sphingosine inhibits phorbol ester-induced inflammation, ornithine decarboxylase activity, and activation of protein kinase C in mouse skin, *J. Invest. Dermatol.*, **91**, 486-491 (1988)
- 20) Imokawa G., Abe A., Jin K., Higaki Y., Kawashima M., Hidano A., Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?, *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 523-526 (1991)
- 21) Motta S., Monti M., Sesana S., Mellesi L., Ghidoni R., Caputo R., Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions, *Arch. Dermatol.*, **130**, 452-456 (1994)
- 22) Rogers J., Harding C., Mayo A., Banks J., Rawlings A., Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons, *Arch. Dermatol. Res.*, **288**, 765-770 (1996)
- 23) Umeda Y., Mizutani H., Imokawa G., Shimizu M., Topical ceramide corrected epidermal cell hyperproliferation and stratum corneum dysmaturation in atopic eczema, *New Trends Allergy*, **4**, 237-239 (1997)
- 24) He X., Okino N., Dhami R., Dagan A., Gatt S., Schulze H., Sandhoff K., Schuchman E. H., Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase: catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 32978-32986 (2003)
- 25) Sugita M., Williams M., Dulaney J. T., Moser H. W., Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum: Description of a new alkaline ceramidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 125-131 (1975)
- 26) Houben E., Uchida Y., Nieuwenhuizen W. F., De P. K., Vanhaecke T., Holleran W.

- M., Rogiers V., Kinetic characteristics of acidic and alkaline ceramidase in human epidermis, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **20**, 187-194 (2007)
- 27) Lin T. K., Crumrine D., Ackerman L. D., Santiago J. L., Roelandt T., Uchida Y., Hupe M., Fabrias G., Abad J. L., Rice R. H., Elias P. M., Cellular changes that accompany shedding of human corneocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **132**, 2430-2439 (2012)
- 28) Houben E., Holleran W. M., Yaginuma T., Mao C., Obeid L. M., Rogiers V., Takagi Y., Elias P. M., Uchida Y., Differentiation-associated expression of ceramidase isoforms in cultured keratinocytes and epidermis, *J. Lipid Res.*, **47**, 1063-1070 (2006)
- 29) Jin K., Higaki Y., Takagi Y., Higuchi K., Yada Y., Kawashima M., Imokawa G., Analysis of beta-glucocerebrosidase and ceramidase activities in atopic and aged dry skin, *Acta Derm. Venereol.*, **74**, 337-340 (1994)
- 30) Werner Y., Lindberg M., Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis, *Acta. Derm. Venereol.*, **65**, 102-105 (1985)
- 31) Higuchi K., Hara J., Okamoto R., Kawashima M., Imokawa G., The skin of atopic dermatitis patients contains a novel enzyme, glucosylceramide sphingomyelin deacylase, which cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide, *Biochem. J.*, **350**, 747-756 (2000)
- 32) Okino N., Tani M., Imayama S., Ito M., Purification and characterization of a novel ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 14368-14373 (1998)
- 33) Okino N., Ichinose S., Omori A., Imayama S., Nakamura T., Ito M., Molecular cloning, sequencing, and expression of the gene encoding alkaline ceramidase from

- Pseudomonas aeruginosa*. Cloning of a ceramidase homologue from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 36616-36622 (1999)
- 34) Ohnishi Y., Okino N., Ito M., Imayama S., Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 101-104 (1999)
- 35) Inoue H., Someno T., Kato T., Kumagai H., Kawada M., Ikeda D., Ceramidastin, a novel bacterial ceramidase inhibitor, produced by *Penicillium* sp. Mer-f17067, *J. Antibiot.*, **62**, 63-67 (2009)
- 36) Bielawska A., Greenberg M. S., Perry D., Jayadev S., Shayman J. A., McKay C., Hannun Y. A., (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 12646-12654 (1996)
- 37) Houben E., Hachem J. P., De P. K., Rogiers V., Epidermal ceramidase activity regulates epidermal desquamation via stratum corneum acidification, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **21**, 111-118 (2008)
- 38) Tokudome Y., Endo M., Hashimoto F., Application of glucosylceramide-based liposomes increased the ceramide content in a three-dimensional cultured skin epidermis, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **27**, 18-24 (2013)
- 39) Kiselev M. A., Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the stratum corneum, *Crystallogr. Rep.*, **52**, 525-528 (2007)
- 40) t'Kindt R., Jorge L., Dumont E., Couturon P., David F., Sandra P., Sandra K., Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **84**, 403-411 (2012)

- 41) Shimotoyodome Y., Tsujimura H., Ishikawa J., Fujimura T., Kitahara T., Variations of ceramide profile in different regions of the body of Japanese females, *Nippon Koshohin Gakkaishi*, **38**, 3-8 (2014)
- 42) Liou Y. B., Sheu M. T., Liu D. Z., Lin S. Y., Ho H. O., Quantitation of ceramides in nude mouse skin by normal-phase liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **401**, 107-113 (2010)
- 43) Duan J., Sugawara T., Hirose M., Aida K., Sakai S., Fujii A., Hirata T., Dietary sphingolipids improve skin barrier functions via the upregulation of ceramide synthases in the epidermis, *Exp. Dermatol.*, **21**, 448-452 (2012)
- 44) Shirakura Y., Kikuchi K., Matsumura K., Mukai K., Mitsutake S., Igarashi Y., 4,8-Sphingadienine and 4-hydroxy-8-sphingenine activate ceramide production in the skin, *Lipids in Health and Disease*, **11**, 108 (2012)
- 45) Sigruener A., Tarabin V., Paragh G., Liebisch G., Koehler T., Farwick M., Schmitz G., Effects of sphingoid bases on the sphingolipidome in early keratinocyte differentiation, *Exp. Dermatol.*, **22**, 677-679 (2013)
- 46) Hong J. H., Youm J. K., Kwon M. J., Park B. D., Lee Y. M., Lee S. I., Shin D. M., Lee S. H., K6PC-5, a direct activator of sphingosine kinase 1, promotes epidermal differentiation through intracellular  $Ca_2^+$  signaling, *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 2166-2178 (2008)
- 47) Kim J., Yun H., Cho Y., Analysis of ceramide metabolites in differentiating epidermal keratinocytes treated with calcium or vitamin C, *Nutr. Res. Pract.*, **5**, 396-403 (2011)
- 48) Kitatani K., Idkowiak B. J., Hannun Y. A., The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling, *Cell. Signal.*, **20**, 1010-1018 (2008)

- 49) Yeang C., Ding T., Chirico W. J., Jiang X. C., Subcellular targeting domains of sphingomyelin synthase 1 and 2, *Nutr. Metab. (Lond.)*, **8**, 89 (2011)
- 50) Vacaru A. M., Tafesse F. G., Ternes P., Kondylis V., Hermansson M., Brouwers J. F., Somerharju P., Rabouille C., Holthuis J. C., Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER, *J. Cell Biol.*, **185**, 1013-1027 (2009)
- 51) Yano M., Watanabe K., Yamamoto T., Ikeda K., Senokuchi T., Lu M., Kadomatsu T., Tsukano H., Ikawa M., Okabe M., Yamaoka S., Okazaki T., Umehara H., Gotoh T., Song W. J., Node K., Taguchi R., Yamagata K., Oike Y., Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice, *J. Biol. Chem.*, **286**, 3992-4002 (2011)
- 52) Li Z., Fan Y., Liu J., Li Y., Huan C., Bui H. H., Kuo M. S., Park T. S., Cao G., Jiang X. C., Impact of sphingomyelin synthase 1 deficiency on sphingolipid metabolism and atherosclerosis in mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**, 1577-1584 (2012)
- 53) Liu J., Huan C., Chakraborty M., Zhang H., Lu D., Kuo M. S., Cao G., Jiang X. C., Macrophage sphingomyelin synthase 2 deficiency decreases atherosclerosis in mice, *Circ. Res.*, **105**, 295-303 (2009)
- 54) Zhang Y., Dong J., Zhu X., Wang W., Yang Q., The effect of sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency on the expression of drug transporters in mouse brain, *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 287-294 (2011)
- 55) Mitsutake S., Zama K., Yokota H., Yoshida T., Tanaka M., Mitsui M., Ikawa M., Okabe M., Tanaka Y., Yamashita T., Takemoto H., Okazaki T., Watanabe K., Igarashi Y., Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes, *J. Biol. Chem.*, **286**, 28544-28555 (2011)



- 56) Gowda S., Yeang C., Wadgaonkar S., Anjum F., Grinkina N., Cutaia M., Jiang X. C., Wadgaonkar R., Sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency attenuates LPS-induced lung injury, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **300**, 430-440 (2011)
- 57) Simons K., Ikonen E., Functional rafts in cell membranes, *Nature*, **387**, 569-572 (1997)
- 58) Villani M., Subathra M., Im Y. B., Choi Y., Signorelli P., Del Poeta M., Luberto C., Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi, *Biochem. J.*, **414**, 31-41 (2008)
- 59) Sawada E., Yoshida N., Sugiura A., Imokawa G., Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: an implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis, *J. Dermatol. Sci.*, **68**, 25-35 (2012)
- 60) Vasireddy V., Uchida Y., Salem N. Jr., Kim S. Y., Mandal M. N., Reddy G. B., Bodepudi R., Alderson N. L., Brown J. C., Hama H., Dlugosz A., Elias P. M., Holleran W. M., Ayyagari R., Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids (> or = C28) and the unique omega-O-acylceramides in skin leading to neonatal death, *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 471-482 (2007)
- 61) Uchida Y., Hara M., Nishio H., Sidransky E., Inoue S., Otsuka F., Suzuki A., Elias P. M., Holleran W. M., Hamanaka S., Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides, *J. Lipid Res.*, **41**, 2071-2082 (2000)
- 62) Hailemariam T. K., Huan C., Liu J., Li Z., Roman C., Kalbfleisch M., Bui H. H., Peake D. A., Kuo M. S., Cao G., Wadgaonkar R., Jiang X. C., Sphingomyelin synthase 2 deficiency attenuates NFkappaB activation, *Arterioscler. Thromb. Vasc.*

*Biol.*, **28**, 1519-1526 (2008)

- 63) Abe M., Oshima E., Sakai S., Hirabayashi Y., Tsuchida T., Hamanaka S.,  
Sphingolipids of the murine hair, *J.Soci. Jap. Women Scientists*, **12**, 32-43 (2012)