



Title	Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function
Author(s)	高木, 誠司
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44618
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	高 木 誠 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 18278 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 1 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific <i>Arnt</i> -deficient mice affects skin barrier function (表皮角化細胞特異的 <i>Arnt</i> 欠失マウスの作成と解析: 同マウスにおける 表皮セラミド 4-sphingenine 基の異常は皮膚バリア機能の障害を導く)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 細 川 互 (副査) 教 授 岡 本 光 弘 教 授 金 田 安 史

論 文 内 容 の 要 旨

[目的] ARNT は bHLH PAS タンパクファミリーに属する核内転写因子であり、AhR や HIF1 α をはじめとする他の PAS タンパクとヘテロダイマーを形成し、遺伝子の発現調節を行っている。ダイオキシン等のリガンドの AhR への結合により形成される AhR/ARNT は生体異物代謝に関する遺伝子を活性化するし、酸素濃度の低下で誘導される HIF1 α /ARNT は低酸素状態に適応するための遺伝子を活性化する。これらのことから、PAS タンパクファミリーは外環境に対するセンサーとしての機能を有するとの考え方がある。皮膚は、外からの微生物や有害な化学薬品の侵入や体外への生体水分の消失を防ぐなど、生体・外環境間のバリアとして重要な器官であり、特に表皮がこの機能維持に重要であることが知られている。マウス皮膚では早くも胎生 9.5 日において *Arnt* mRNA の発現が認められており、このことから皮膚バリア機能における PAS タンパクファミリーの何らかの関与が想像される。そこでわれわれは、表皮における ARNT、さらにはそのパートナーたる PAS タンパクの機能を探るために、*Cre-loxP* システムを用いた臓器特異的遺伝子破壊法を用いて、表皮角化細胞特異的 *Arnt* 欠失マウスを作成した。なお conditional にした理由は、conventional な *Arnt* ノックアウトマウスは、胎盤や卵黄嚢の血管発達不良が主な原因で胎生致死であるからである。

[方法ならびに成績] 既に確立されている 2 種類のトランスジェニックマウス、つまり *K5-Cre* マウス (Tarutani-M et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1997) と *Arnt-floxed* マウス (Tomita-S et al. Mol Endocrinol. 2000) を用いた。*K5-Cre+;Arnt+/-* マウスと *Arnt flox/flox* マウスの交配で生まれる *K5-Cre+;Arnt flox/-* マウスが目的とする表皮角化細胞特異的 *Arnt* 欠失マウス (以下 *Arnt* ノックアウトマウス) であり、これはメンデルの法則で予想される確率で生まれてくることがわかった。*Arnt* ノックアウトマウスは、出生直後は一見正常で他の遺伝子型の仔と区別が付かないが、急激にその体重を減じ、24 時間以内には例外なく死亡した。Tewameter で測定した経皮水分蒸散量は高値で、またトルイジンブルーを用いた表皮透過性分析法では透過性が亢進しており、*Arnt* ノックアウトマウスでは表皮バリア機能が著しく障害されていることが示された。角層は表皮の最外層を構成し、さらに詳細には最終分化し脱核した表皮角化細胞 (角質細胞) と、それらの間隙を埋める角質細胞間脂質から成り、表皮バリア機能において極めて重要な役割を果たしていることが知られている。*Arnt* ノックアウトマウスでは角層が薄くなっていた。しかしながら電子顕微鏡による観察では、表皮バリア機能障害時には乱れていることが多いとされる角質細胞間脂質のラメラ構造

も比較的保たれ、著しいバリア機能障害を裏付けるような組織学的構造変化は見られなかった。角層タンパク成分には異常を認めず、続いて角層脂質成分（角質細胞間脂質）の生化学的分析を行った。角質細胞間脂質は主にセラミド・コレステロール・遊離脂肪酸から構成される。薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー/イオントラップマスマススペクトロメトリーを用いてこれらを個別に分析したところ、マウス表皮セラミドは通常 4-sphingenine か 4-hydroxyshinganine を含んでいるが *Arnt* ノックアウトマウスの表皮においては、4-sphingenine の大部分が 4 位の二重結合を欠いた sphinganine に置換されており、さらに 4-hydroxysphinganine を含むセラミドの量は大きく減少していた。このことは sphinganine 含有セラミドから 4-sphingenine や 4-hydroxyshinganine を含むセラミドへの反応を触媒する酵素 dihydroceramide desaturase の欠損を示唆した。現在この desaturase のアイソザイムとして二つ (Des-1 と Des-2) が知られており、上記を説明し得るのは DES-2 の欠損である。実際、*Arnt* ノックアウトマウスの培養表皮角化細胞を用いて定量的 RT-PCR を行ったところ、*des-2* の転写レベルは有意に減少していた。

〔総括〕表皮において、ARNT は desaturase の発現レベルを調節することでセラミドの生合成に関与しており、この反応が障害された結果生じるセラミドの構造および組成異常は、表皮バリア機能の重大な欠陥を生じることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

Per/AHR/ARNT/Sim ファミリーの転写因子である ARNT は、生体異物や低酸素を含む環境シグナルに反応して遺伝子発現を調節している。皮膚の表皮角化細胞においてもこの ARNT が発現していることは既に知られていたが、ARNT ノックアウトマウスが胎生致死であることもあり、その機能についてはこれまで未知であった。今回、申請者は、臓器特異的遺伝子破壊法として Cre-loxP システムを用い、表皮角化細胞特異的 ARNT 欠失マウス (*K5-Cre⁺Arnt^{fllox/-}*) を作成、その解析を行った。その結果、表皮における ARNT の重要な機能の一つとして皮膚バリア機能の維持が挙げられることを示した。また、さらなる生化学的検討により、ARNT が dihydroceramide desaturase のひとつである DES2 の発現を調節することで表皮角層セラミドの生合成に関与しており、このことが上記皮膚バリア機能の維持に重要である可能性を示唆した。

本研究はこれまで報告されていなかった ARNT の機能を提示したとともに、今後の表皮角層セラミドの生合成経路の解明に寄与することが期待され、学位授与に値すると考えられる。