HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	皮膚神経疾患シェーグレン・ラルソン症候群原因遺伝子Aldh3a2のノックアウトマウスを用いた皮膚病態解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	永沼, 達郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第12283号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62157
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuro_Naganuma_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（臨床薬学）　氏 名　永 沼　達 郎

学 位 論 文 題 名

皮膚神経疾患シェーグレン・ラルソン症候群原因遺伝子 *Aldh3a2* のノックアウトマウスを用いた皮膚病態解析

シェーグレン・ラルソン症候群（SLS）は，皮膚症状として魚鱗癬，神経症状として精神遅滞や痙性対麻痺を生じる遺伝性の皮膚神経疾患である。原因遺伝子は，脂肪族アルデヒド脱水素酵素（FALDH）をコードする *ALDH3A2* であり，脂溶性のアルデヒドを脂肪酸に酸化する役割を担っている。例えば，生理活性脂質であるスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）やロイコトリエン B_4 に由来するアルデヒドの代謝に関与する。アルデヒド分子は反応性が高く，生体内の様々な分子を修飾して細胞機能を障害することで，細胞毒性を示す恐れがある。そのため，細胞におけるアルデヒド代謝は重要なプロセスである。SLS 患者では *ALDH3A2* の変異により FALDH 活性が大きく低下しており，生体内におけるアルデヒドの蓄積が SLS 発症の引き金であると考えられている。しかし，発症に大きく寄与するアルデヒド分子種とその発生源，蓄積したアルデヒドにより障害される細胞機能など，病態の分子メカニズムは未だ不明である。そこで本研究では，*Aldh3a2* ノックアウトマウス（KO）を用いた解析により，SLS の病態，特に生後間もなく発症する皮膚症状に着目し，その発症メカニズムの解明を目指した。

Aldh3a2 のエキソン 4 が *loxP* 配列に挟まれたジーントラップマウスを European Mouse Mutant Archive より導入後，全身で Cre を発現する *CAG-Cre* マウスと交配することで，*Aldh3a2* が欠損した KO マウスを作製した。次に，作製したマウスの各組織において，*Aldh3a2* の欠損が FALDH 活性に与える影響を明らかにするため，野生型及び KO マウスの様々な組織から調製したライセートを用いて *in vitro* FALDH 活性測定を行った。その結果，肝臓，腎臓，及び SLS で症状が見られる網膜では *Aldh3a2* の欠損により FALDH 活性がほぼ完全に消失した。このことから，これらの組織における総 FALDH 活性のほとんど全てが Aldh3a2 によって示されていることが明らかとなった。脳や小腸，脾臓，精巣，真皮では，KO マウスにおいて FALDH 活性が野生型の 30-50 % 程度に低下しており，これらの組織における総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与は中程度であった。SLS で異常を生じる脳では長鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が野生型の約 30 % まで低下しており，比較的 Aldh3a2 の寄与が大きい組織であった。一方，表皮，肺，角膜では，*Aldh3a2* が欠損しても FALDH 活性はほとんど低下しなかった。SLS 患者の表皮では FALDH 活性が大きく低下していることが報告されており，我々の結果とは相反する結果となった。この原因を追究するために，活性に重複性を示す *Aldh3* ファミリーメンバー全ての発現量を定量的 RT-PCR により解析した。その結果，マウスの表皮ではヒトでは機能しない *Aldh3b2* が高発現しており，主要な FALDH として機能していることが示された。しかし，*Aldh3a2* KO マウスの表皮から採取した未分化のケラチノサイトでは FALDH 活性が大きく低下しており，主要に発現している FALDH は *Aldh3a2* であった。

このことから，表皮の中でも未分化のケラチノサイトでは，総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与が大きいことが明らかとなった。

近年，当研究室の中原らは，スフィンゴ脂質がグリセロ脂質へと変換される経路（リアーゼ経路）の中間体である S1P が開裂して生じるヘキサデセナールの代謝に，ALDH3A2 が関与することを報告した。我々は，*Aldh3a2* の欠損がリアーゼ経路に与える影響を調べるため，野生型及び *Aldh3a2* KO マウスから採取した未分化のケラチノサイトを，重水素ラベルされたスフィンゴシン（D7-Sph）でラベルし，その代謝物であるスフィンゴ脂質，グリセロ脂質を LC-MS/MS により定量した。その結果，野生型では D7-Sph がスフィンゴ脂質及びグリセロ脂質にほぼ同程度代謝されており，ケラチノサイトにおいて長鎖塩基がグリセロ脂質へと活発に代謝されることが明らかとなった。一方，*Aldh3a2* KO ケラチノサイトでは，D7-Sph が通常のエステル型グリセロ脂質にはほとんど代謝されず，エーテル結合を介してグリセロール骨格に結合した構造を持つエーテル型グリセロ脂質に代謝された。おそらく，*Aldh3a2* の欠損により蓄積したヘキサデセナールがアルコールに還元され，エーテル脂質に取り込まれたものと考えられた。このことから，*Aldh3a2* の欠損によりケラチノサイトではリアーゼ経路が遮断されて，長鎖塩基のエステル型グリセロ脂質への代謝が滞り，代わりにエーテル型グリセロ脂質へと代謝されることが明らかとなった。

SLS 患者の表皮では，皮膚バリア機能に重要なセラミド分子種の組成に異常が認められる。このことを踏まえて，我々は野生型及び *Aldh3a2* KO マウスの表皮のセラミド組成を LC-MS/MS により解析したが，野生型と KO マウスの間に差は見られなかった。また，KO マウスの皮膚バリア機能を色素透過性試験及び経皮水分蒸散量（TEWL）測定により評価したが，KO マウスの皮膚バリア機能は正常であった。HE 染色により形態を観察しても，過角化などの SLS 様の顕著な形態異常は観察されなかった。しかし，KO マウスの有棘層から顆粒層にかけて小さな空胞用の構造が観察され，弱いながらも何らかの異常が生じていることが示唆された。そこで次に，角質層をアセトン処理により障害して皮膚バリア機能を低下させた状態で TEWL を測定したところ，KO マウスでは野生型よりも TEWL が有意に高かった。さらに，アセトン処理後に継時的に TEWL を測定することで皮膚バリア機能の回復を評価したところ，KO マウスでは回復が遅延していた。このことから，KO マウスの表皮では角質層よりも内側で何らかの異常が生じていることが示唆された。そこで，*Aldh3a2* の欠損により FALDH 活性が大きく低下する，未分化のケラチノサイトが存在する基底層を電子顕微鏡により詳細に形態観察したところ，KO マウスでは細胞間隙が拡大していることが明らかになった。こうした所見は増殖が亢進したケラチノサイトにしばしば見られるものであるため，我々は野生型及び KO マウスの表皮から採取したケラチノサイトの増殖を評価した。その結果，KO ケラチノサイトでは実際に増殖が亢進しており，増殖マーカーである *Ki67* の転写量も上昇していた。ケラチノサイトの増殖亢進や癌細胞の悪性化には酸化ストレス応答が関与することが報告されている。実際，KO ケラチノサイトにおいて酸化ストレス応答因子である *Hmox1*，*Sod1*，*Gclc*，*Gclm*，*Gsta1* の転写量が上昇しており，酸化ストレス応答が亢進していることが示唆された。以上の結果から，未分化のケラチノサイトにおいて *Aldh3a2* が欠損すると， FALDH 活性の低下，酸化ストレス応答の上昇，細胞増殖の亢進が引き起こされることが示唆された。これらは SLS の皮膚症状の基底層における病態メカニズムの一端を担っている可能性がある。