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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12283
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64635
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuro_Naganuma.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

平成 27 年度

博士学位論文

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

北海道大学 大学院生命科学院

臨床薬学専攻

永沼　達郎

目次

略語 4

脚注 6

1. 序論 7

1-1. 表皮の構造と機能 7

1-1-1. 表皮の層構造 7

1-1-2. 角質細胞間脂質中のセラミド多様性 9

1-1-3. 表皮セラミドの生合成経路と皮膚疾患との密接な関係 11

1-2. Sjögren-Larsson 症候群 13

1-2-1. 疾患概要 13

1-2-2. 臨床症状と病態・病理 14

1-3. アルデヒド脱水素酵素 ALDH3A2 16

1-3-1. S1P 分解経路への関与 17

1-3-2. LTB_4 分解経路への関与 19

1-3-3. フィトール代謝への関与 19

1-3-4. エーテル型グリセロ脂質由来のアルデヒド代謝への関与 21

1-4. その他の ALDH3 ファミリー 21

1-5. 研究背景・目的 23

2. 結果 24

2-1. *Aldh3a2* KO マウスの作製 24

2-2. マウスの各組織における総 FALDH 活性に対する
Aldh3a2 の寄与は組織ごとに異なる 25

2-3. マウス，ヒトの各組織における *Aldh3* ファミリーの発現分布 27

2-4. *Aldh3a2* KO ケラチノサイトではスフィンゴ脂質から
グリセロ脂質への代謝が低下している 30

2-5. *Aldh3a2* KO マウスでは皮膚バリア機能の回復が遅延する 33

2-6. *Aldh3a2* KO マウスの表皮基底層では細胞間隙が拡大している 35

2-7. *Aldh3a2* KO マウスのケラチノサイトでは
細胞増殖と酸化ストレス応答が亢進している 35

3. 考察 38

3-1. Aldh3a2 の各組織における長鎖アルデヒド代謝への寄与と SLS 病態の組織限局性 39

3-2. ケラチノサイトの増殖亢進と SLS 病態との関連 41

4. 実験方法 44

4-1. *Aldh3a2* ノックアウトマウスの作製 44

4-2. ケラチノサイトの初代培養 44

4-3. マウステールからのゲノム抽出 45

4-4. マウスのジェノタイピング 45

4-5. RNA 抽出，cDNA作製 46

4-6. RT-PCR 46

4-7. ライセート調製 47

4-8. イムノブロッティング 48

4-9. *in vitro* FALDH 活性測定 49

4-10. [^{3}H]DHS ラベル 49

4-11. D7-スフィンゴシンラベル 50

4-12. マウス表皮からの脂質抽出 50

4-13. LC-MS/MS 50

4-14. トルイジンブルー染色 51

4-15. 経皮水分蒸散量測定 51

4-16. ヘマトキシリンエオジン染色 51

4-17. 電子顕微鏡観察 52

4-18. [^{3}H]チミジン取り込み 52

5. 参考文献 60

略語

ACS	acyl-CoA synthetase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
Alk-DG	alkyl/alkenyl-diacylglycerol
Alk-G	alkyl/alkenyl-glycerol
Alk-GPC	alkyl/alkenyl-glycerophosphocholine
Alk-GPE	alkyl/alkenyl-glycerophosphoethanolamine
Cer	ceramide
CERS	ceramide synthase
CoA	coenzyme A
CYP	cytochrome P450
DG	diacylglycerol
DHS	dihydrosphingosine
DHS1P	dihydrosphingosine 1-phosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELOVL	elongation of very long-chain fatty acid
ESI	electron spray ionization
FA	fatty acid
FADH	fatty alchol dehydrogenase
FALDH	fatty aldehyde dehydrogenase
GlcCer	glucosylceramide
HACL1	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1
HE	hematoxylin eosin
HRP	horseradish peroxidase
LC-MS	liquid chromatography tandem-mass spectrometry
LOX	lipoxigenase
LTB_4	leukotriene B_4

MBP	maltose binding protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRI	magnetic resonance imaging
MRM	multiple reaction monitoring
MRS	magnetic resonance spectroscopy
NAD^+	nicotinamide adenine dinucleotide
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PE	phosphatidylethanolamine
PHS	phytosphingosine
PlsC	plasmanyl/plasmenylcholine
PlsE	plasmanyl/plasmenylethanolamine
PMSF	phenylmethane sulfonylfluoride
PNPLA1	patatin like phospholipase domain containing 1
PUFA	polyunsaturated fatty acid
RT-PCR	reverse transcription PCR
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SK	sphingosine kinase
SLS	Sjögren-Larsson syndrome
SM	sphingomyelin
Sph	sphingosine
SPL	sphingosine 1-phosphate lyase
SPP	sphingosine 1-phosphate phosphatase
S1P	sphingosine 1-phosphate
TBS	tris-buffered saline
TER	*trans*-2-enoyl-CoA reductase
TG	triglyceride
TGM1	transglutaminase 1
TLC	thin layer chromatography

脚注

本研究では，ヒトのタンパク質を全て大文字で表記し，マウスのタンパク質は頭文字のみ大文字で表記した。また，遺伝子はイタリックで記した。

（例）ALDH3A2，ヒトのALDH3A2

Aldh3a2，マウスのALDH3A2

1. 序論

1-1. 表皮の構造と機能

1-1-1. 表皮の層構造

皮膚は生体の外表を覆う人体で最大の組織であり，内側から皮下組織，真皮，表皮の 3 層に大別される。皮膚の最外層に位置する表皮は皮膚のバリア機能に不可欠である。例えば，微生物や異物の侵入，太陽光への曝露，物理的侵襲など様々な外部からの脅威に対する障壁としての役割を持つだけでなく，体内からの水分蒸発防止など生体の内部環境の維持にも重要である。こうした皮膚のバリア機能は，表皮最外層（角質層）において多層に積層された表皮細胞とその隙間を埋める脂質分子との層状構造によって生み出されている。表皮に存在する細胞の 95 % 以上はケラチノサイトであり，他には表皮樹状細胞であるランゲルハンス細胞や，色素細胞であるメラノサイトが存在する。ケラチノサイトは表皮の最も内層側（基底層）で増殖し，分化とともに外層へと移行して，最終的に皮膚の最外表から脱落する。基底層のケラチノサイトが増殖し，角質層表面で脱落するまでの時間をターンオーバー時間と呼び，ヒトでおよそ 45 日である。表皮は，分化段階に特徴的な形態・機能を有するケラチノサイトが層状に積層された構造をもち，内側から基底層，有棘層，顆粒層，角質層の 4 層に分類される（Fig. 1A）。マウスの表皮はヒトと同様の層構造をもつが，体毛を有する部位では角質層が薄く，顆粒層が認められないこともある。しかし，体毛を有しない部位もしくは体毛が発達していない新生マウスでは表皮は厚く，全ての層が認められる。

▶基底層

基底層は表皮の最深部に位置し，分裂能を有するケラチノサイトが存在している。通常 1 層の細胞層からなり，円柱状のケラチノサイト同士がデスモソームを介して結合している。また，真皮と表皮を隔てる基底膜に基底層のケラチノサイトがヘミデスモソームを介して結合することで，基底層のケラチノサイトは表皮組織全体を支持している。

▶有棘層

基底層のケラチノサイトが基底膜との接着を消失して外層へと移行し，基底層の上部に有棘層を形成する。有棘層のケラチノサイトは基底層よりも扁平な形態であり，

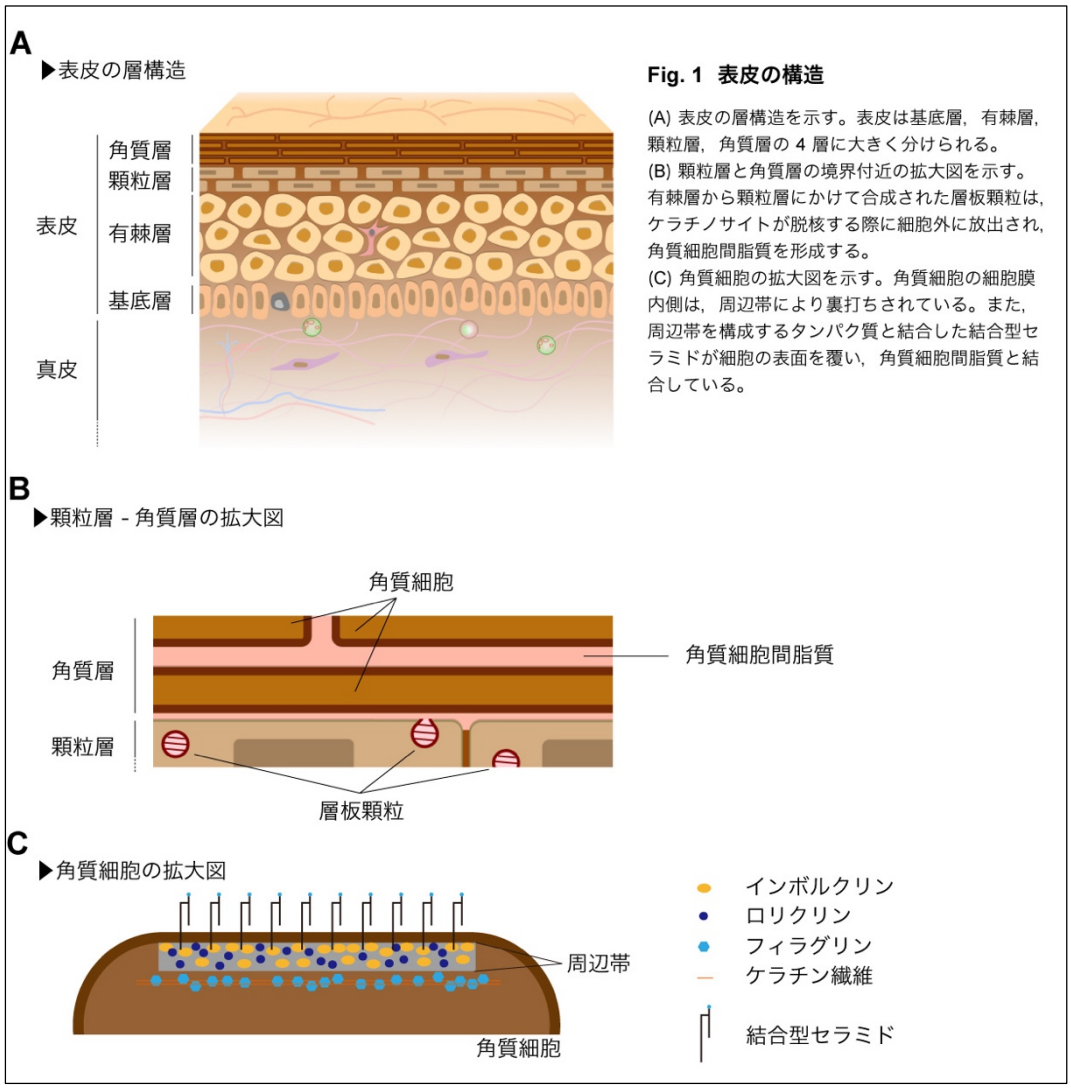


Fig. 1 表皮の構造

(A) 表皮の層構造を示す。表皮は基底層，有棘層，顆粒層，角質層の 4 層に大きく分けられる。
(B) 顆粒層と角質層の境界付近の拡大図を示す。有棘層から顆粒層にかけて合成された層板顆粒は，ケラチノサイトが脱核する際に細胞外に放出され，角質細胞間脂質を形成する。
(C) 角質細胞の拡大図を示す。角質細胞の細胞膜内側は，周辺帯により裏打ちされている。また，周辺帯を構成するタンパク質と結合した結合型セラミドが細胞の表面を覆い，角質細胞間脂質と結合している。

細胞同士が棘により接着しているような形態に見えることから有棘層と呼ばれる。有棘層は表皮の中で最も厚い層であり，ヒトでは数層から十数層にもなる。有棘層のケラチノサイトは基底層とは異なり増殖能はなく，皮膚バリア形成に必要なタンパク質や脂質を活発に合成し，バリア形成の初期準備を行っている。

▶顆粒層

有棘細胞の分化が進むとさらに扁平な形態の顆粒細胞となり，2-3 層の顆粒層を形成する。顆粒層のケラチノサイトには，皮膚バリアに必要なタンパク質や脂質が貯留された顆粒が多数観察される。顆粒層に見られる顆粒は主に 2 種類存在し，一つはケラトヒアリン顆粒，もう一つは層板顆粒と呼ばれる。ケラトヒアリン顆粒は，プロフィラグリンを主成分とする。プロフィラグリンはヒスチジンに富んだ好塩基性タンパク質であるため，ケラトヒアリン顆粒は HE 染色で青く濃染される。プロフィラグリン

は角質層においてプロセッシングを受け，保湿成分として機能するフィラグリン及び天然保湿因子（NMF）に変換される。層板顆粒は，角質層において細胞の隙間を埋める脂質分子の前駆体を含んだ顆粒であり，有棘層上部から顆粒層にかけて観察される。層板顆粒内の脂質は，顆粒層と角質層との境界で細胞外へと放出されて角質細胞間脂質を形成する（Fig. 1B）。フィラグリンや NMF，角質細胞間脂質は皮膚のバリア機能に不可欠であり，これらの前駆体であるプロフィラグリンや脂質分子の合成に異常を生じるとアトピー性皮膚炎や角化症などの皮膚疾患を引き起こすことが知られている(1-6)。

▶角質層

顆粒層のケラチノサイトは最終的に脱核して死細胞となり，表皮の最外層で積層してヒトでは約 10 層からなる角質層を形成する。細胞の内部が，中間径フィラメントを構成する繊維性タンパク質であるケラチンで満たされており，HE 染色では好酸性な層状構造として観察される。角質層のケラチノサイト（角質細胞）は細胞膜の内側をケラチンとフィラグリンの複合体，インボルクリンやロリクリンなどの架橋構造により裏打ちされており，これを周辺帯と呼ぶ（Fig. 1C）。一方，細胞の外側は層板顆粒に貯留されていた脂質分子によって満たされ，角質細胞間脂質の多層構造（脂質ラメラ）が形成される。角質細胞間脂質はセラミドを主成分とし，他にもアシルセラミドやコレステロール，硫酸コレステロール，遊離脂肪酸などを含んでいる(7,8)。また，角質細胞間脂質のうちアシルセラミドの一部は，角質細胞に裏打ちされたインボルクリンなどと架橋されて結合型セラミドとなる（Fig. 1C）。角質層の最外層では角質細胞間脂質や細胞接着分子が分解されることで，角質細胞が剥離，脱落し，ターンオーバーが繰り返されている。

1-1-2. 角質細胞間脂質中のセラミド多様性

角質細胞間脂質の主成分は，セラミドと呼ばれる脂肪酸と長鎖塩基がアミド結合により結合したスフィンゴ脂質の疎水性骨格である（Fig. 2A）。セラミドは，その炭素鎖長や不飽和度，水酸基の数に多様性を持つ。例えば，セラミドに含まれる脂肪酸の炭素鎖長は多くの組織では 16, 18, 24 のものが主要であるが，表皮では炭素数が 26-36 までの非常に鎖長の長い脂肪酸（超長鎖脂肪酸）を含むセラミド分子も豊富に存在する(9-11)。

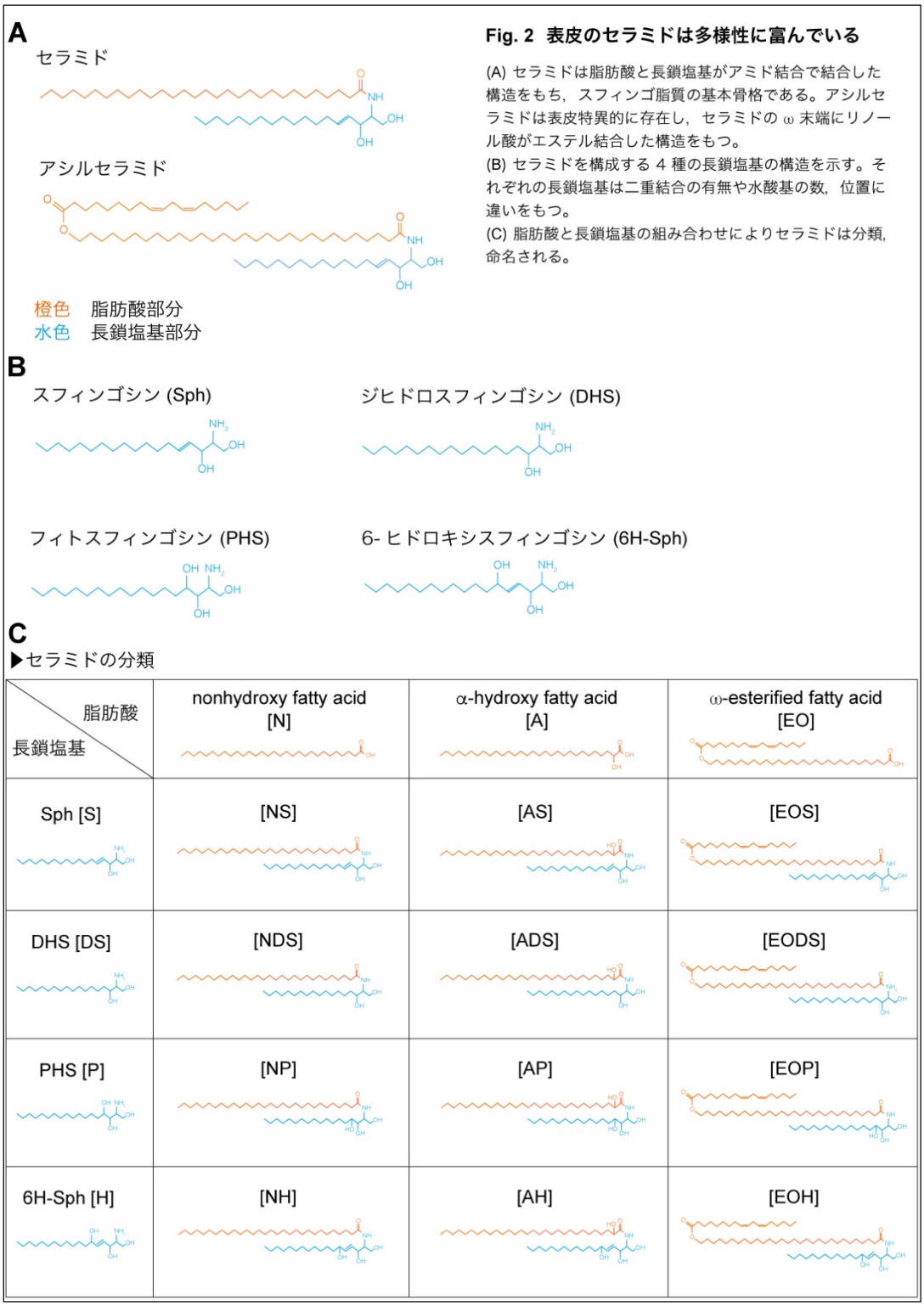


Fig. 2 表皮のセラミドは多様性に富んでいる

(A) セラミドは脂肪酸と長鎖塩基がアミド結合で結合した構造をもち，スフィンゴ脂質の基本骨格である。アシルセラミドは表皮特異的に存在し，セラミドの ω 末端にリノール酸がエステル結合した構造をもつ。
(B) セラミドを構成する 4 種の長鎖塩基の構造を示す。それぞれの長鎖塩基は二重結合の有無や水酸基の数，位置に違いをもつ。
(C) 脂肪酸と長鎖塩基の組み合わせによりセラミドは分類，命名される。

またα 位に水酸基を持つ脂肪酸を含む α-ヒドロキシセラミドや，ω 末端に水酸基を持つ脂肪酸を含む ω-ヒドロキシセラミドも存在し，水酸基の位置にも多様性を持つ。さらに，ω-ヒドロキシセラミドにリノール酸がエステル結合したアシルセラミドと呼ばれる非常に疎水性の高いセラミド分子も表皮特異的に存在しており，皮膚のバリア機能に不可欠であることが知られている（Fig. 2A, C）(9,12)。長鎖塩基側も脂肪酸と同様に多様性を

持ち，一価不飽和のスフィンゴシン（Sph），不飽和結合を持たないジヒドロスフィンゴシン（DHS），4 位に水酸基を持つフィトスフィンゴシン（PHS），一価不飽和で 6 位に水酸基を持つ 6-ヒドロキシスフィンゴシン（6H-Sph）の少なくとも 4 種が存在する（Fig. 2B）。このように，セラミドを構成する脂肪酸と長鎖塩基はそれぞれ多様な構造を持つため，その組み合わせにより多種多様なセラミドが産生される。セラミドは，構成する脂肪酸の種類と長鎖塩基の種類それぞれにアルファベットを当てはめて，その組み合わせにより分類される（Fig. 2C)。脂肪酸は，水酸基を持たない脂肪酸［N]，α 位に水酸基を持つ脂肪酸［A]，ω 末端にリノール酸がエステル結合した脂肪酸［EO］で表され，長鎖塩基は Sph [S]，DHS [DS]，PHS [P]，6H-Sph [H] で表される。例えば，水酸基を持たない脂肪酸と PHS がアミド結合してできたセラミドは NP，ω 末端にリノール酸がエステル結合した Sph タイプのアシルセラミドは EOS と表記される。多くの組織では NS が多いが，脳のミエリンは α-ヒドロキシ脂肪酸を含む AS タイプのセラミドに富んでいる(13)。また，小腸や腎臓では PHS を含む AP タイプのセラミドが多いなど，組織ごとに特徴的なセラミドが存在する。表皮には EODS 以外の 11 タイプのセラミドが存在しているため (14-16), 表皮はユニークなセラミドに富んだ組織であると言える。

1-1-3. 表皮セラミドの生合成経路と皮膚疾患との密接な関係

表皮のセラミドは多様性に富んでいるが，皮膚バリア機能に特に重要なのは炭素鎖長が 30 以上の超長鎖脂肪酸とリノール酸を含むアシルセラミドである。アシルセラミドの生合成は，有棘層から顆粒層のケラチノサイトの小胞体膜上で行われている。アシルセラミドの生合成経路の全貌は未だ明らかではないが，現在考えられている生合成経路を Fig. 3A に示した。まず，極長鎖脂肪酸伸長酵素である ELOVL1, ELOVL4 によって脂肪酸の活性化体であるアシルCoA が伸長され，超長鎖アシルCoA が合成される(17-19)。合成された超長鎖アシルCoA は，一度チオエステラーゼにより超長鎖脂肪酸へと変換された後，CYP4F22 により ω 位が水酸化されて ω-ヒドロキシ超長鎖脂肪酸となる(12)。ω-ヒドロキシ超長鎖脂肪酸は，アシルCoA 合成酵素により ω-ヒドロキシ超長鎖アシルCoA へと変換され, 次いで CERS3 が触媒する反応によって長鎖塩基と縮合し，ω-ヒドロキシ超長鎖セラミドとなる(8)。その後，アシルトランスフェラーゼもしくはトランスアシラーゼによりリノール酸が付加され，アシルセラミドとなる。こうして合成

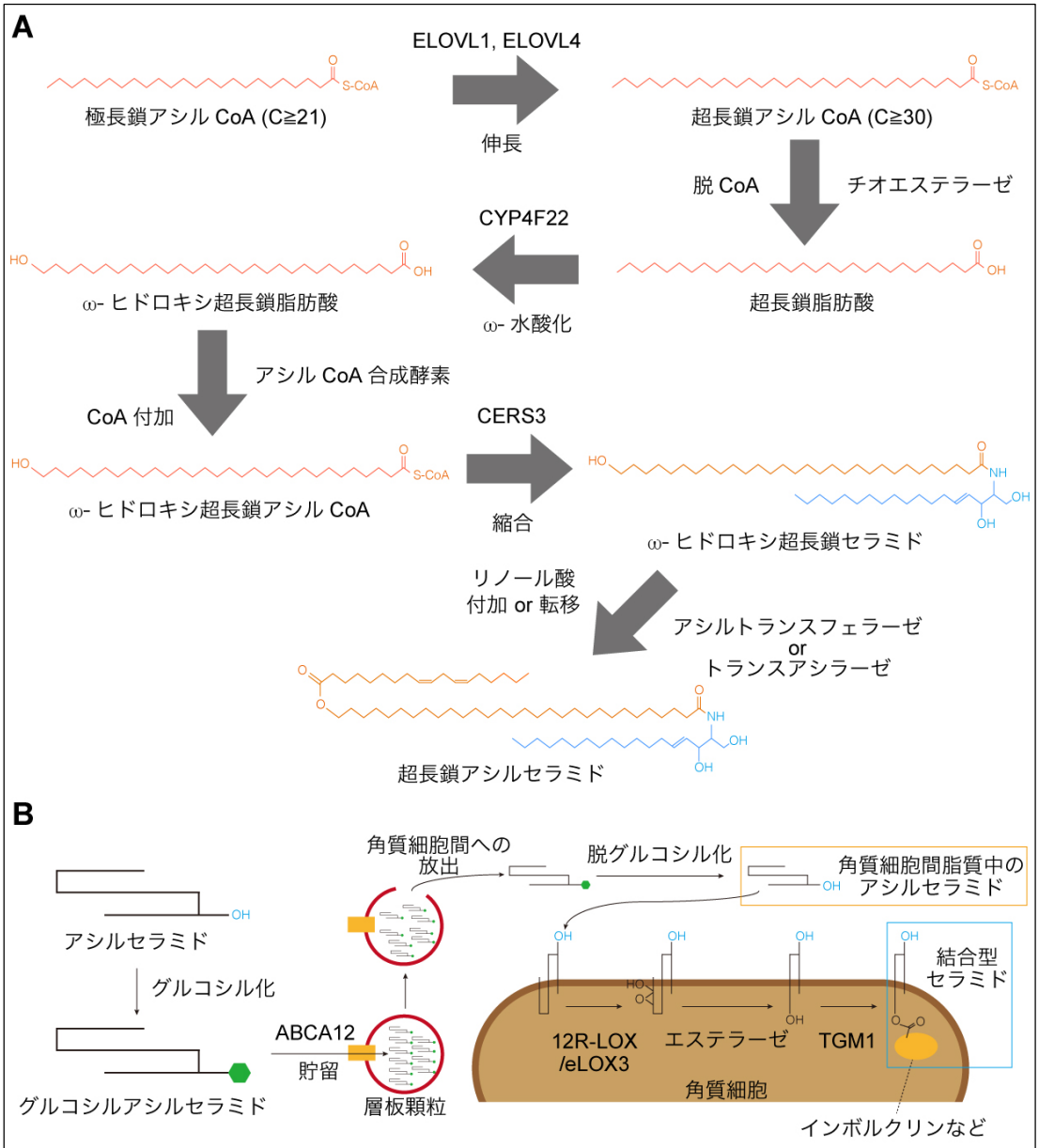


Fig. 3 アシルセラミドの生合成と結合型セラミドの形成

(A) 現在考えられているアシルセラミドの生合成経路を示す。極長鎖アシル CoA が脂肪酸伸長酵素 ELOVL1, 4 によって伸長され，超長鎖アシル CoA となる。超長鎖アシル CoA は超長鎖脂肪酸に変換された後，CYP4F22 により ω 末端を水酸化される。ω- ヒドロキシ超長鎖脂肪酸は CoA 付加された後，CERS3 が触媒する反応により長鎖塩基と縮合して ω- ヒドロキシ超長鎖セラミドとなり，最後にリノール酸が付加もしくは転移されてアシルセラミドが生成される。
(B) 合成されたアシルセラミドは，グルコシル化を受けたのち層板顆粒に貯留され，ケラチノサイトの脱核の際に細胞間に放出される。放出されたグルコシルアシルセラミドは，脱グルコシル化されてアシルセラミドとなり，脂質ラメラを形成する。また，アシルセラミドは，12R-LOX/eLOX3 による過酸化に伴いリノール酸が除去されて，ω- ヒドロキシセラミドとなり，次いで TGM1 によりインボルクリンなどと架橋されて結合型セラミドとなる。

されたアシルセラミドはグルコシル化を受けてグルコシルアシルセラミドに変換され，ABC トランスポーターである ABCA12 の働きにより層板顆粒へと貯留される（Fig. 3B）。その後層板顆粒中のグルコシルアシルセラミドは，ケラチノサイトの脱核の際に細胞外へと放出され，脱グルコシル化を受けることでアシルセラミドとなる。アシルセ

ラミドは，角質細胞間脂質中の主成分として重要であるとともに，結合型セラミドの前駆体としても重要である。角質細胞間脂質中のアシルセラミドのリノール酸部分がリポキシゲナーゼ 12R-LOX, eLOX3 によって過酸化状態になると，それがシグナルとして働き，エステラーゼによるリノール酸の切断が引き起こされる。次いでトランスグルタミナーゼ TGM1 によってインボルクリンなどと架橋されることで結合型セラミドが形成される（Fig. 3B）(20-22)。

アシルセラミドは非常に疎水性の高い分子であり，脂質ラメラの形成に重要である。一方，結合型セラミドは疎水性相互作用によって角質細胞間脂質と結合し，脂質ラメラの足場として機能する。そのため，アシルセラミドや結合型セラミドは皮膚のバリア機能に不可欠であり，その生合成や形成の異常は様々な皮膚疾患の発症につながっていると考えられている。実際，アシルセラミドや結合型セラミドの合成及び形成に関わる遺伝子の変異によって，アシルセラミドや結合型セラミドの量が大きく減少したり消失したりすると，皮膚バリア機能が著しく低下した先天性魚鱗癬を引き起こす。また，魚鱗癬と比べてバリア形成異常の程度が弱いアトピー性皮膚炎患者の皮膚においても，アシルセラミド量が健常者の半分程度に減少している(5,6,12,23-26)。以上のことから，アシルセラミドの合成，及び角質細胞間脂質や結合型セラミドの形成は，皮膚の健康維持に不可欠であることがうかがえる。

1-2. Sjögren-Larsson 症候群

1-2-1. 疾患概要

Sjögren-Larsson 症候群（SLS）は，1957 年に Sjögren と Larsson によってはじめて報告された常染色体劣性遺伝性の皮膚神経疾患である。主な症状として，生後まもなく皮膚症状である魚鱗癬を発症し，生後数年を経て精神遅滞や痙性対麻痺といった神経症状を呈する(27,28)。また，しばしば網膜変性を伴うことが知られている。発症頻度に性差はなく，発症率は人口 10 万人あたり 0.4 人程度の希少疾患である(29)。原因遺伝子である *ALDH3A2* は脂肪族アルデヒド脱水素酵素（FALDH）をコードし，脂肪族アルデヒドを脂肪酸へと酸化する役割を担っている。SLS を引き起こす変異として，これまでに 70 種以上が *ALDH3A2* 遺伝子内に見つかっているが，そのほとんどで FALDH 活性が 10 % 以下に低下していることが報告されている(30)。アルデヒド分子

は非常に反応性が高く，細胞毒性を示すことから，ALDH3A2 の機能低下により脂肪族アルデヒドが細胞内に蓄積することが SLS 発症の引き金となっていると考えられている。しかし，詳細な病態分子メカニズムは未だ不明である。そのため，現在全ての症状が難治性であるとされ，治療法としては皮膚症状に対して角質溶解剤や皮膚軟化剤，活性型ビタミンD_3 の外用による対症療法のみが行われている。また，皮膚・神経両症状に対して，食事療法として長鎖脂肪酸の制限及び中鎖脂肪酸の投与を行うことで改善されたとの報告はあるものの(31)，効果が認められない症例も存在し，確立された治療法は全くないのが現状である。

1-2-2. 臨床症状と病態・病理

▶皮膚症状

皮膚症状である魚鱗癬は出生直後から認められる(32,33)。魚鱗癬とは皮膚の乾燥，肥厚，落屑を特徴とした症状で，皮膚表面が魚の鱗状にみえることからその名がついた。SLS は多くの症例で皮膚の潮紅や紅斑，皮疹を伴うなど多様な皮膚症状を呈し，その臨床所見から先天性魚鱗癬様紅皮症として報告されることが多いが，紅皮症を伴わない葉状魚鱗癬もしくは黒色表皮腫様の魚鱗癬として報告されることもある。皮膚症状は頸部や腹部，四肢屈側に特に顕著であるが，顔面や掌蹠などでは発症頻度が低いなど全身性ではなく正常部位も散見される。SLS の病変部位では皮膚バリア機能が低下していることが知られている。

病理所見としては，SLS 患者の皮膚病変部位の HE 染色切片観察により，過角化と呼ばれる表皮角質層の異常積層や，不全角化，表皮肥厚，乳頭腫症を生じていることが示されている(34,35)。過角化は，ケラチノサイトの異常増殖や角質細胞のターンオーバーの異常により引き起こされる。SLS 患者の表皮ではケラチノサイトの増殖が亢進していることが報告されている(36,37)。しかし，それが過角化を引き起こす引き金となっているのか、もしくはバリア不全を相補するために増殖が亢進しているのかは定かではない。不全角化は錯角化とも呼ばれ，角化が不完全であるために角質層の細胞にも核が残存している状態である。不全角化はケラチノサイトの急速な角化によって，脱核が間に合わずに生じるとされている。さらに，電子顕微鏡解析によりミトコンドリア数の増加，層板顆粒の異常，角質細胞内の脂質空胞など種々の形態異常が観察されている(34,35)。正常な層板顆粒には，皮膚バリア機能に不可欠である角質細

胞間脂質の前駆体が積荷として含まれる。しかし，SLS 患者の表皮で観察される層板顆粒の多くは内部が空であり，顆粒周囲の膜が不完全もしくは消失している様子も観察されていることから，顆粒形成後に何らかの障害を受けていることが示唆されている。さらに，角質層との境界に位置する顆粒層のケラチノサイトおいて，角質層側の細胞膜近傍に層板顆粒が蓄積している様子が観察されている。このことから，層板顆粒積荷の細胞外への分泌にも異常を生じていることが示唆されており，実際 SLS 患者の角質層において，アシルセラミド量が大幅に低下していることが示されている(38)。ただし，アシルセラミドの生合成が SLS 患者でどのような影響を受けているかはこれまでに解析されていないため，角質間脂質生合成過程の異常が病態に関与する可能性もある。以上のように，SLS 患者の表皮では様々な形態異常が生じているだけでなく，角質細胞間脂質の組成が変化している。しかし，こうした異常が引き起こされる順序や分子メカニズムなどは明らかにされておらず，皮膚病態を生じる引き金となる真の原因は分かっていない。

▶神経症状

神経症状は生後数年を経て発症し，幼少期に精神発達の遅れや運動発達障害としてあらわれる(33)。多くの症例で IQ が 50 未満であり，言語障害を伴う重度の精神遅滞を呈する。痙性麻痺は上肢よりも下肢で強いとされ，左右対称性の対麻痺として生じる。また，患者の約 40 % に痙攣がみられ，歩行障害を認める例も多い(28)。

病理所見としては，SLS 患者の脳の CT 解析により，白質の密度が低くなっていることが示されている。また，脳の MRI 解析により大脳全体で無髄の神経線維が観察されている。こうした所見が見られる原因は，脱髄の亢進というよりむしろミエリンの形成過程に異常を生じたためであるとされている(28,39)。ただし，神経症状の程度とミエリン異常の程度とに明らかな相関は認められていない。また，^{1}H-MRS 解析により，SLS 患者の大脳白質において，健常人ではみられない特徴的な脂質のピークが検出されている(39,40)。ALDH3A2 の機能低下により蓄積した脂肪族アルデヒドや脂肪族アルコールにより修飾された脂質であると考えられており，病態への関与も推察されている。しかし，この異常脂質のピークの高さと神経症状の程度に相関は認められず，病態との関連は明らかではない。また，神経系の解析は CT や MRI などによる非侵襲的な画像解析と臨床症状の報告に限られているため，皮膚と比べてあまり進

んでおらず，神経症状を生じる分子メカニズムについては全く分かっていないのが現状である。

▶眼症状

眼症状は SLS 患者の 8 割以上という高頻度で生じることが報告されており，ほとんどの患者で視力低下が見られる(29,41)。色覚や網膜電図には異常は見られない。

病理所見としては，眼底検査において結晶状の光輝性小斑点が観察されるのが特徴である(42,43)。また，蛍光色素によって眼の血管を可視化すると，中心窩付近の無血管領域が縮小している様子も観察されている(29)。以上のように臨床的な異常所見は幾つか報告されているが，光輝性小斑点と網膜変性や色素変性との因果関係は分かっておらず，光輝性小斑点が蓄積する原因も不明である。また，視力低下が網膜変性によって引き起こされるのか，もしくは視神経系の異常によって引き起こされるのかも不明である。

1-3. アルデヒド脱水素酵素 ALDH3A2

アルデヒド分子は反応性が高く，タンパク質や脂質中の第一級アミンをはじめとする様々な求核性物質と反応してその機能を阻害し，細胞毒性を示すことから，細胞内から速やかに除去されなければならない。細胞内のアルデヒド除去には，アルデヒド脱水素酵素（ALDH）ファミリーが重要な役割を担っている。ALDH はヒトで 19 種類，マウスで 21 種類知られており(44,45)，それぞれ異なる代謝経路に由来する様々なアルデヒドをカルボン酸へと酸化することで除去している。*ALDH* 遺伝子の変異は様々な先天性疾患の原因となることが知られており(46-51) (Fig. 4)，細胞内からのアルデヒド除去が細胞機能に重要であることがわかる。

▶ *ALDH* 遺伝子と疾患との関連

	疾患名
ALDH1A3	小眼球症
ALDH3A2	シェーグレン・ラルソン症候群
ALDH4A1	2型高プロリン血症
ALDH5A1	γ-ヒドロキシ酪酸尿症
ALDH6A1	メチルマロン酸尿症
ALDH7A1	ピリドキシン依存性てんかん
ALDH18A1	皮膚弛緩症，痙性対麻痺

Fig. 4 *ALDH* と病態との関連

疾患原因遺伝子として報告されている *ALDH* と，その変異により発症する疾患を示した。

ALDH3A2 は，脂肪族アルデヒドを NAD^+ 依存的に脂肪酸へと酸化する働きを担う ALDH であり，その機能低下により SLS を発症する。ALDH3A2 は *in vitro* で炭素数 6-24 のアルデヒドを幅広く代謝するが，特に炭素数 16，18 の長鎖アルデヒドに高い活性を示すことが知られている(52,53)。ALDH3A2 には 2 種類のスプライシングアイソフォームが存在する。どちらも C 末端側に 1 回の膜貫通領域を持つが，その下流のアミノ酸配列の違いによりメジャーアイソフォームは小胞体膜，マイナーアイソフォームはペルオキシソーム膜に局在し，それぞれ異なる経路に由来するアルデヒドの代謝に関与すると考えられている(54)。ALDH3A2 は細胞内の様々な経路に由来するアルデヒドの代謝に関与することが示唆されており，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（LTB_4）の分解経路中で生じるアルデヒド，食事由来のフィトールに由来するアルデヒド，エーテル型グリセロ脂質に由来するアルデヒドの除去に関わることが報告されている(33,40,55-58)。

1-3-1. S1P 分解経路への関与

2012 年に当研究室の中原らは，ALDH3A2 が S1P 分解経路中で生じるトランス-2-ヘキサデセナールの酸化を担うことを報告した(55)。S1P は細胞増殖や細胞遊走などを制御する脂質メディエーターとして知られているが，スフィンゴ脂質からグリセロ脂質への変換経路の代謝中間体としての側面も持ちあわせている(59)。S1P は細胞内で 2 通りの代謝を受ける（Fig. 5）。一つは図中の青い矢印で示した経路で，S1P ホスファターゼ SPP1/2 によって脱リン酸化されてスフィンゴシンとなり，セラミド（Cer）やグルコシルセラミド（GlcCer），スフィンゴミエリン（SM）といったスフィンゴ脂質へと代謝される経路，もう一つは図中の赤い矢印で示したもので，S1P リアーゼ SPL により開裂されてトランス-2-ヘキサデセナールを生じた後，ALDH3A2 により酸化されてトランス-2-ヘキサデセン酸となり，アシル CoA 合成酵素 ACS による CoA 付加，トランス-2-エノイル CoA 還元酵素 TER による還元反応を経て，トリグリセリド（TG）やホスファチジルコリン（PC），ホスファチジルエタノールアミン（PE），ホスファチジルセリン（PS），ホスファチジルイノシトール（PI）といったグリセロ脂質へと代謝される経路（リアーゼ経路）である。リアーゼ経路は ALDH3A2 依存的な経路であり，小胞体膜上で行われる。*ALDH3A2* の酵母ホモログである *HFD1* の欠損酵母や CHO-K1 細胞の *ALDH3A2* 欠損株においてこのリアーゼ経路が遮断されることが明らかとなっ

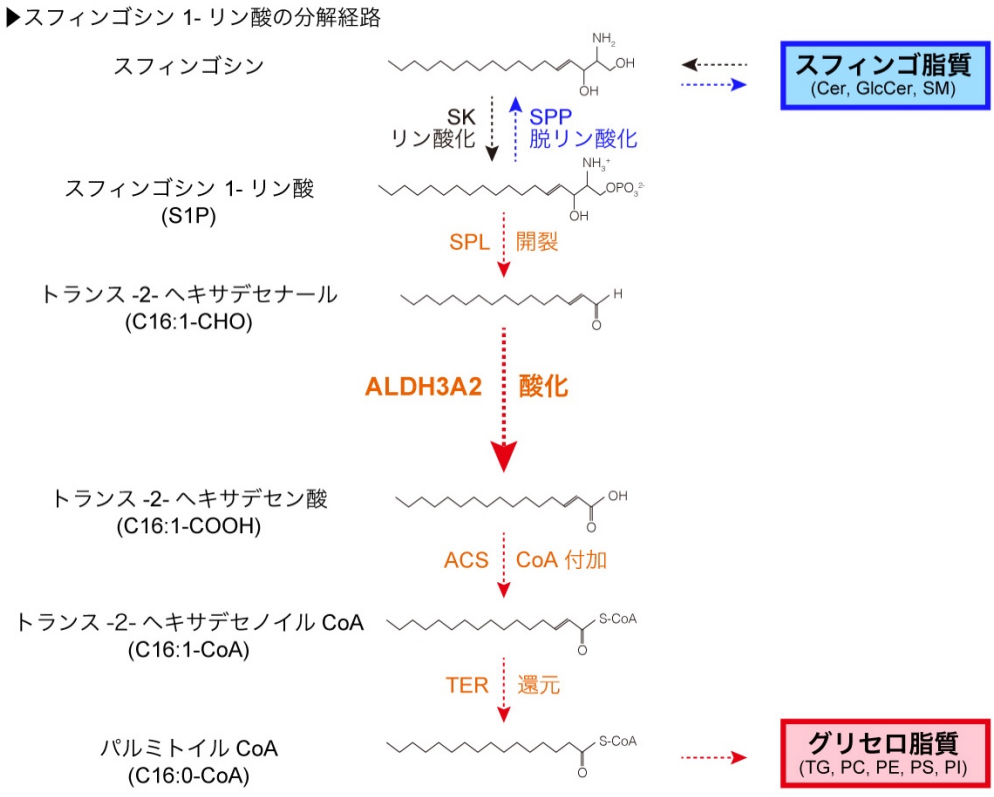


Fig. 5 ALDH3A2 は S1P 分解経路の中間体として生じるアルデヒドの代謝に関与する

スフィンゴシン 1- リン酸 (S1P) の分解経路を示す。ALDH3A2 は，S1P が SPL により開裂された際に生じるトランス -2- ヘキサデセナールの酸化を担っている。

ている(55)。この経路について最近まで， SPL による開裂反応以降は詳細が不明であったが，当研究室の中原，大國，若島らにより経路の中間体及び反応を触媒する酵素が明らかにされ，リアーゼ経路の全貌が解明された(55,60,61)。リアーゼ経路はスフィンゴ脂質を分解する唯一の代謝経路であり，スフィンゴ脂質量の調節という意味で非常に重要な経路である。そのため，SPL 経路は全身の組織で活発に働いている。リアーゼ経路の異常は個体レベルで様々な異常をきたすことが知られており，例えば S1Pリアーゼ *Spl* KO マウスは多臓器不全により生後約 1 ヶ月で死亡する(62)。また，リアーゼ経路に関わる遺伝子を原因遺伝子とする疾患も報告されており，*ALDH3A2* の変異による SLS 以外にも，*ACSL4*, *TER* の変異は精神遅滞を引き起こすことが報告されている(63,64)。しかし，これらの遺伝子はリアーゼ経路以外でも機能するため，疾患とリアーゼ経路との直接的な因果関係は定かではない。

1-3-2. LTB_4 分解経路への関与

LTB_4 は白血球の遊走を制御する炎症性脂質メディエーターの一つであり, アラキドン酸から 5-リポキシゲナーゼ（5-LOX）依存的な経路で産生される。LTB_4 は白血球において ω 酸化による分解経路を介して不活性化されることが知られており, この経路中で生じるアルデヒドの代謝に ALDH3A2 が関与する（Fig. 6A）。LTB_4 はまず, シトクロム P450 ファミリーに属する CYP4F2/3 により ω 位を水酸化されて ω-ヒドロキシ LTB4（ω-OH LTB_4）へと変換された後, ω 位の水酸基がアルデヒド（ω-CHO LTB_4）へと酸化され, 次いで ALDH3A2 によりカルボン酸へと酸化されることで, 生理活性を示さない ω カルボキシLTB_4 (ω-COOH LTB_4) に代謝される。SLS 患者では ALDH3A2 の活性が低下した結果, 尿中の LTB_4, ω-OH LTB_4 レベルが上昇していることが報告されている(40)。脳脊椎液中でも, LTB_4 レベルの弱い上昇が見られるが, ω-OH LTB_4 レベルは健常人と変わらない。また, SLS 患者由来の白血球で LTB_4 を代謝させると, 健常人と比べて LTB_4 及び ω-OH LTB_4 が蓄積し, ω-COOH LTB_4 にはほとんど代謝されなかったことから, ALDH3A2 が LTB_4 の分解に重要であることがわかる。さらに, LTB_4 の生合成に関わる 5-LOX の阻害剤を SLS 患者に投与することで, かゆみを抑える効果や, 大脳皮質において^{1}H-MRS 解析により観察される異常な脂質ピークを抑える効果があることから, LTB_4 と SLS 病態との関連が示唆されている(65)。しかし, 5-LOX を阻害すると多くのアラキドン酸代謝物の量が変動するため, 5-LOX による SLS 病態の改善効果には LTB_4 以外の脂質メディエーターの変化による効果も複合的に絡んでいると考えられる。そのため, LTB_4 分解経路と SLS 病態との直接的な因果関係は未だ証明されていない。

1-3-3. フィトール代謝への関与

フィトールは, 緑色野菜や藻類に豊富に含まれるクロロフィルが, 小腸で分解されることによって産生される分岐鎖脂肪族アルコールである。フィトールはまずフィテン酸に酸化される。フィテン酸は, CoA 付加を受けてフィテノイル CoA に変換された後, 二重結合を飽和されてフィタノイル CoA となり, その後脂肪酸の酸化経路によって分解される。フィタノイル CoA は β 位がメチル化された分岐鎖アシル CoA であるため, そのままでは β 酸化経路で分解することができない。そのため, フィタノイル CoA はまず, ペルオキシソームの α 酸化経路により炭素 1 つ分短いプリスタン酸に変換され,

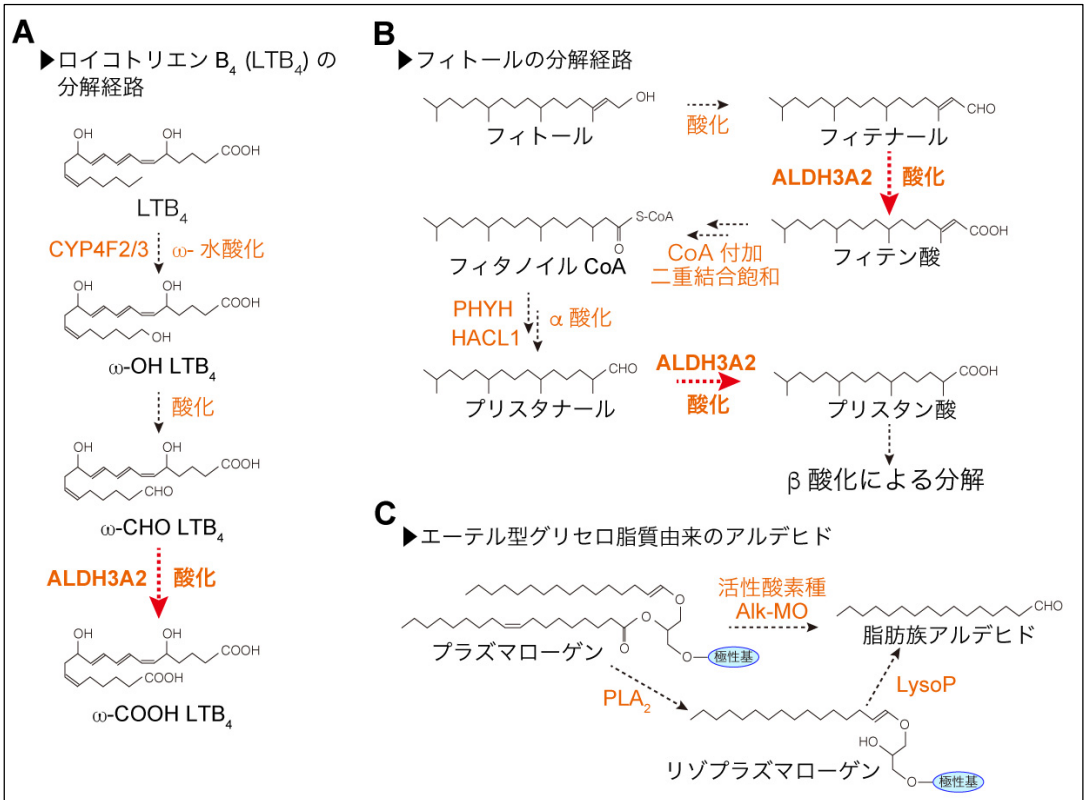


Fig. 6 ALDH3A2 は S1P 分解経路以外の様々な過程で生じるアルデヒドの代謝にも関与する

(A) ロイコトリエン B_4 (LTB_4) の分解経路を示す。LTB_4 の ω 末端が水酸化された後，水酸基がカルボン酸に酸化される過程で生じるアルデヒドの代謝に ALDH3A2 が関与する。
(B) フィトールの分解経路を示す。フィトールが酸化されて生じたフィテナールの酸化反応を ALDH3A2 が担っている。また，フィタノイル CoA が α 酸化されて生じたプリスタナールの酸化にも ALDH3A2 が関与する。
(C) エーテル型グリセロ脂質のうち，ビニルエーテル結合を有するものはプラズマローゲンと呼ばれる。活性非酵素的 / 酵素的反応により，プラズマローゲンから脂肪族アルデヒドを生じる。(Alk-MO, alkyl-monoxygenase; LysoP, lysoplasmalogenase; PLA_2, phospholipase A_2)

その後 β 酸化経路により分解される (Fig. 6B)。以上の分解過程において，フィトールからフィテン酸への酸化過程で中間体として生じるフィテナールの代謝に ALDH3A2 が関与する。さらに，α 酸化経路中で生じたプリスタナールの代謝に，ペルオキシソーム局在の ALDH3A2 マイナーアイソフォームが関与する。このことから，フィトールの分解経路中で ALDH3A2 は 2 つの異なる反応を触媒すると考えられている。フィタノイル CoA のような分岐鎖アシル CoA の分解は生理的にも重要であり，α 酸化経路の第一ステップを触媒するフィタノイル CoA ヒドロキシラーゼをコードする *PHYH* 遺伝子の変異により Refsum 症候群を引き起こし，先天性の魚鱗癬や多発性神経炎，聴覚障害，網膜色素変性などを生じる(66)。Refsum 症候群の患者では，フィタノイル CoA の分解が低下するため，フィタノイル CoA から CoA が脱離したフィタン酸の血中濃度が上昇している。このことから，フィタン酸の蓄積と魚鱗癬発症との関連が示唆されている。一方，SLS 患者ではフィタノイル CoA の α 酸化経路だけでなく，その上流のフ

ィトールからフィテン酸への代謝も低下する。そのため，SLS 患者ではフィタン酸の血中濃度は上昇せず，健常人と変わらないことが報告されており(58)，フィトール代謝とSLS 病態との因果関係は不明である。

1-3-4. エーテル型グリセロ脂質由来のアルデヒド代謝への関与

エーテル型グリセロ脂質は,通常のグリセロ脂質と異なり *sn*-1 位にエーテル結合を有するのが特徴である（Fig. 6C）。エーテル型グリセロ脂質の中では，*sn*-1 位にビニルエーテル結合をもつプラズマローゲンが主要であり，極性基にエタノールアミンまたはコリンを持つエタノールアミンプラズマローゲンまたはコリンプラズマローゲンが存在する。プラズマローゲンの割合は組織ごとに異なるが，脳や腎臓，心臓，骨格筋では豊富に存在し，総リン脂質の 15-20% を占める(67)。また，組織によっては総ホスファチジルエタノールアミンの 90% 以上を占める。プラズマローゲンは生体膜の構成成分となるだけでなく，*sn*-2 位に多価不飽和脂肪酸（PUFA）を含むものが多いことから，脂質メディエーターの前駆体である PUFA の貯蔵に重要であると考えられている。プラズマローゲン中のビニルエーテル結合は，活性酸素種による非酵素的反応やアルキルモノオキシゲナーゼ（Alk-MO）による酵素反応により切断され，脂肪族アルデヒドが産生する。また,プラズマローゲンの *sn*-2 位のエステル結合が切断されて生成したリゾプラズマローゲンも，リゾプラズマローゲナーゼ（Lyso-P）によりビニルエーテル結合が切断されて脂肪族アルデヒドを生じる(67-69)（Fig. 6C）。こうして産生した脂肪族アルデヒドは炭素数 15-17 の飽和アルデヒドが多い。そのため，ALDH3A2 がこれらのアルデヒドの代謝に関与すると考えられているが，実験的に証明されてはいない。

1-4. その他の ALDH3 ファミリー

ALDH3A2 は，前述のように様々な脂肪族アルデヒドに対して代謝活性を示すが，同様に FALDH 活性を持つ酵素として,ALDH3 ファミリーに属する ALDH3A1, ALDH3B1, ALDH3B2，ALDH3B3 が挙げられる（Fig. 7A）。ただし，ヒトの ALDH3B2 では，マウスに存在する N 末端 94 アミノ酸が欠失し，ALDH 活性を示さない。そのため，ヒト *ALDH3B2* は偽遺伝子であると考えられている。また，ALDH3B3 はげっ歯類特異的に存在する ALDH であり，ヒトには存在しない。これら 5 つの ALDH3 アイソザイムは中

鎖アルデヒド（炭素数 5-10）及び長鎖アルデヒド（炭素数 10-19）に対して活性を示すという点で基質特異性に重複が見られる。しかし，ALDH3A1 は長鎖よりも中鎖アルデヒドに対して高い活性を示す一方，ALDH3A2 及び ALDH3B サブファミリーは全て長鎖アルデヒドにより高い活性を示すといった違いがある(53)（Fig. 7B）。各アイソザイムの細胞内局在はそれぞれ異なり，ALDH3A1 はサイトゾルに，ALDH3A2 は小胞体膜に，ALDH3B1 と ALDH3B3 は細胞膜に，ALDH3B2 は脂肪滴に局在する(53,70)。ALDH3B ファミリーは C 末端付近で脂質修飾を受けて膜に局在する。こうしたことから，各アイソザイムは異なるオルガネラで発生したアルデヒドの代謝に寄与しているものと考えられている。また，ALDH3A1 は角膜に(71)，ALDH3A2 は肝臓に(52,72)，ALDH3B1 は白血球に多く発現するなど(73)，各アイソザイムの発現は組織ごとに特徴がある。このように，組織ごとに主要なアイソザイムが異なると考えられるが，各組織においてどの ALDH3 ファミリーが主要に発現しているかは明らかではない。

A

▶*ALDH3* ファミリーの特徴

ALDH3 ファミリー	ヒト	マウス	基質	細胞内局在
ALDH3A1	○	○	中鎖アルデヒド：◎ 長鎖アルデヒド：△	サイトゾル
ALDH3A2	○	○	中鎖アルデヒド：○ 長鎖アルデヒド：◎	小胞体膜
ALDH3B1	○	○	中鎖アルデヒド：○ 長鎖アルデヒド：◎	細胞膜
ALDH3B2	偽遺伝子	○	中鎖アルデヒド：○ 長鎖アルデヒド：◎	脂肪滴
ALDH3B3	×	○	中鎖アルデヒド：○ 長鎖アルデヒド：◎	細胞膜

B

▶マウス ALDH3 ファミリーの基質特異性

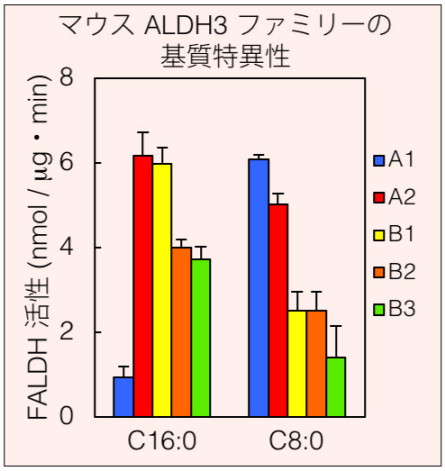


Fig. 7 *ALDH3* ファミリーの基質特異性と細胞内局在

(A) *ALDH3* ファミリーの特徴を表に示す。
(B) 当研究室の北村によるマウス Aldh3 ファミリーの精製標品を用いた *in vitro* FALDH 活性測定の結果を示す。C16:0 はヘキサデカナールを，C8:0 はオクタナールを表す。

1-5. 研究背景・目的

SLS は *ALDH3A2* の変異によって引き起こされる皮膚神経疾患であり，ALDH3A2 の機能低下に伴う脂肪族アルデヒドの蓄積が疾患発症の引き金であると考えられている。これまでに臨床検体を用いた症状の解析は数多くなされており，発症した結果どのような形態的・生化学的異常を生じるかについてはよく知られている。しかし，SLS が希少疾患であることから，患者の細胞を用いた基礎的な解析は不足している。また，ノックアウト（KO）マウスのようなモデル動物を用いた解析も報告されておらず，SLS 発症の分子メカニズムは未だ不明である。例えば，ALDH3A2 は細胞内の様々な経路に由来するアルデヒドの代謝に関与することが報告されているが，発症に大きく寄与するアルデヒド分子がどの経路に由来しているのか不明である。また，アルデヒドの蓄積が細胞内のどのようなプロセスを障害することが原因で SLS が引き起こされるのかもわかっていない。SLS で症状が見られる皮膚，脳，網膜においてそれぞれ特異的なタンパク質の機能が障害された結果，そのタンパク質に関連する細胞機能が低下したと考えられる。そのため，組織ごとの基礎的解析が必須である。さらに，ALDH3A2 がどの組織においてどの程度アルデヒド代謝に寄与するのかが不明であるため，SLS の症状が皮膚や脳，網膜に限局される原因も定かでない。そこで本研究では，*Aldh3a2* KO マウスを用いて，生後間もなく発症する皮膚症状に焦点をあて，その発症メカニズムの解明を目指した。

2. 結果

2-1. *Aldh3a2* ノックアウトマウスの作製

European Mouse Mutant Archive（EMMA）より，*Aldh3a2* のエキソン 4 が *loxP* 配列に挟まれたジーントラップ型のマウスを導入し，全身で Cre を発現する *CAG-Cre* マウスと交配することで，エキソン 4 が欠失した *Aldh3a2* KO マウスを作製した（Fig. 8A）。マウスの遺伝型はゲノム PCR により，野生型で 561 bp，KO で 285 bp のバンドが増幅されることを確認した（Fig. 8B）。また，野生型及び KO マウスの表皮から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行い，KO ではバンドが増幅されないことを確認した（Fig. 8C）。さらに，Aldh3a2 の発現量が高い肝臓のライセートを調製し，抗 Aldh3a2 抗体を用いたイムノブロッティングを行った。その結果，野生型では約 50 kDa の分子量にタンパク質のバンドが見られたが，KO ではバンドが検出されなかった。このように，*Aldh3a2* の欠損をタンパク質レベルでも確認した（Fig. 8D）。

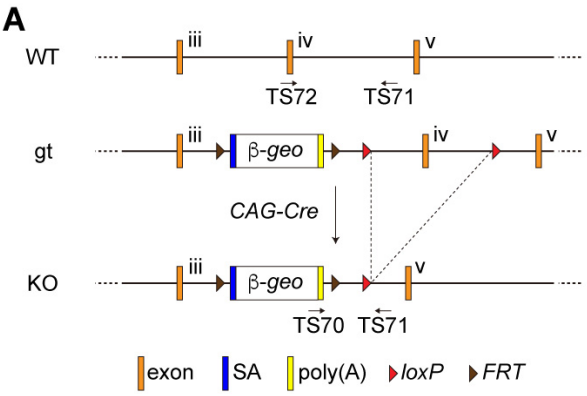


Fig. 8 *Aldh3a2* KO マウスの作製

(A) 本研究において使用した *Aldh3a2* KO マウスのゲノム構造と，遺伝型の決定に用いたプライマー (TS70, 71, 72) の位置を示す。
(B) 野生型，ヘテロノックアウト，ホモノックアウトのマウステールから抽出したゲノム DNA を鋳型に，プライマー TS70, 71, 72 を用いて PCR を行った。増幅した断片をアガロース電気泳動により分離し，臭化エチジウムで染色して観察した。
(C) 野生型及び KO マウスの表皮から抽出した RNA を鋳型として，*Aldh3a2*，*Gapdh* に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。
(D) 野生型及び KO マウスの肝臓から調製したライセート (20 μg) を SDS-PAGE により分離し，抗 Aldh-3a2 抗体もしくは抗 Calnexin 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。Calnexin はローディングコントロールとして用いた。

2-2. マウスの各組織における総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与は組織ごとに異なる

各組織における総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与の程度を明らかにするため，野生型及び *Aldh3a2* KO マウスの各組織から調製したライセートを用いて *in vitro* で FALDH 活性を測定した。Aldh3a2 は主に炭素数 6-24 のアルデヒドを基質とし，特に長鎖アルデヒドに高い活性を示すことが知られている(52,53)。そのため，基質として，炭素数 16 の長鎖飽和アルデヒドであるヘキサデカナール（C16:0），S1Pに由来する炭素数 16 で 2 位にトランス二重結合を有するヘキサデセナール（C16:1），炭素数 8 の中鎖飽和アルデヒドであるオクタナール（C8:0）を用いた。解析した組織の中で，長鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が最も高かったのは肝臓であり，次いで表皮，肺，腎臓の順に高い活性を示した（Fig. 9A）。小腸や精巣，脾臓，真皮，角膜では FALDH 活性は中程度であり，角膜では中鎖アルデヒドに非常に高い活性を示した（Fig. 9A）。一方，網膜や脳における FALDH 活性は他の組織に比べて低かった（Fig. 9A）。*Aldh3a2* の欠損により FALDH 活性に最も大きく影響したのは肝臓，腎臓，そしてSLSで症状が見られる網膜であり，*Aldh3a2* KO マウスのこれらの組織では長鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が野生型の 10 % 以下まで低下していた（Fig. 9A）。このことから，肝臓，腎臓，網膜において長鎖アルデヒドに対する FALDH 活性のほぼ全てを Aldh3a2 が担っていることが明らかとなった。一方，これらの組織における中鎖アルデヒドに対する FALDH 活性は，*Aldh3a2* が欠損していても半分以上残存していた。これは，Aldh3a2 が中鎖アルデヒドよりも長鎖アルデヒドに対して高い活性を持ち，中鎖アルデヒド代謝に対しては他の Aldh も寄与することを反映したものと考えられる。

小腸，脳，精巣，脾臓，真皮では，*Aldh3a2* が欠損することで長鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が野生型の 30-50 % 程度まで低下した（Fig. 9A）。このことから，これらの組織では総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与は中程度であることが示された。ただし，組織ごとに Aldh3a2 の寄与には大小があり，SLS で異常を生じる脳ではヘキサデカナールに対する活性が *Aldh3a2* KO マウスで野生型の約 30% まで低下していたことから（Fig. 9A），脳はこれらの組織の中では比較的 Aldh3a2 の寄与が大きいことが示唆された。また，これらの組織では *Aldh3a2* の欠損により中鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が部分的に低下していた。

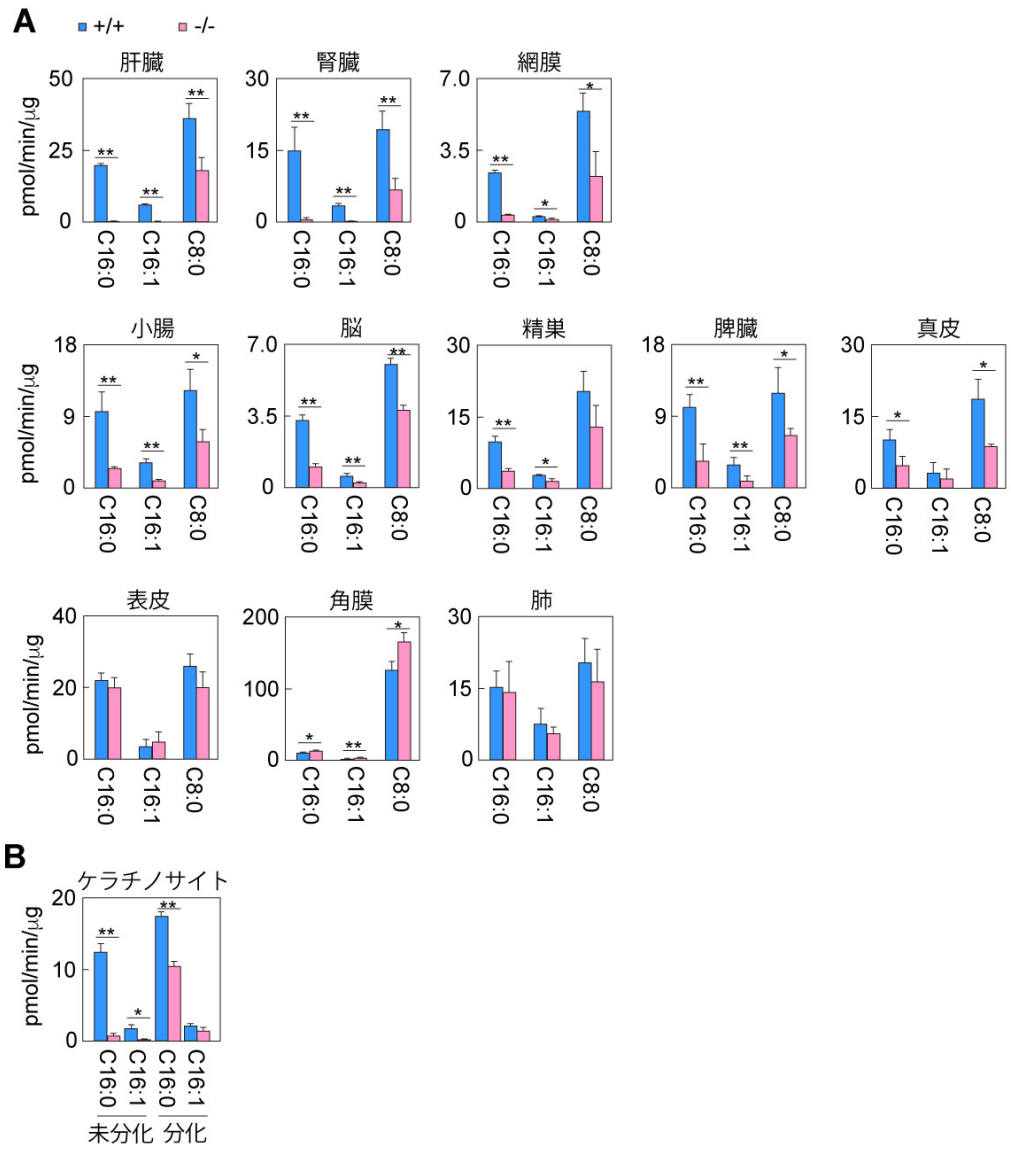


Fig. 9 Aldh3a2 の総 FALDH 活性に対する寄与の大きさは組織ごとに異なる

(A, B) 野生型及び KO マウスの肝臓，腎臓，網膜，小腸，脳，精巣，脾臓，真皮，表皮，角膜，肺 (A)，及び表皮から採取した未分化の初代培養ケラチノサイト，4 日間分化させた初代培養ケラチノサイト (B) からライセートを調製した。ライセート (肝臓，肺，ケラチノサイトは 5 μg，腎臓，小腸，精巣，脾臓，真皮，表皮，角膜は 10 μg，網膜，脳は 15 μg) を，500 μM NAD^+ 及び 100 μM アルデヒド (ヘキサデカナール (C16:0)，ヘキサデセナール (C16:1)，オクタナール (C8:0) のいずれか) と 37˚C で 15 分 (肝臓，腎臓，小腸，精巣，脾臓，肺) もしくは 30 分 (網膜，脳，真皮，表皮，角膜，ケラチノサイト) インキュベートした。Infinite M200 monochromator により NADH の蛍光を測定し，単位時間あたりに生成した NADH 量をタンパク量で除して FALDH 活性を算出した。縦軸は，実験から得られた平均値 ± 標準偏差を表す。(n=3; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; Student's *t*-test)

表皮，角膜，肺では，*Aldh3a2* が欠損しているにも関わらず，KO マウスで長鎖アルデヒドに対する FALDH 活性がほとんど低下しなかった（Fig. 9A）。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(74)，マウスとヒト患者の結果に違いが認められた。また，これらの組織では *Aldh3a2* が欠損しても中鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が低下せず，Aldh3a2 は長鎖，中鎖どちらのアルデヒド代謝にもほとんど寄与しないことが明らかとなった。以上の活性測定の結果から，Aldh3a2 の総 FALDH 活性に対する寄与の大きさは組織ごとに異なることが明らかとなった。

次に，SLS で症状が見られる表皮についてより詳細に解析すべく，野生型及び *Aldh3a2* KO マウスの表皮からケラチノサイトを採取して初代培養を行い，分化前後における FALDH 活性を前述と同様に *in vitro* で解析した。分化前のケラチノサイトでは，FALDH 活性が *Aldh3a2* の欠損により野生型の 10 % 以下まで低下しており（Fig. 9B），Aldh3a2 の総 FALDH 活性への寄与が非常に大きいことが示された。このことから，未分化のケラチノサイトが存在する表皮基底層では，長鎖アルデヒド代謝に Aldh3a2 が大きく寄与することが示唆された。一方，分化後では，KO ケラチノサイトにおいて FALDH 活性が野生型の半分以上残存しており（Fig. 9B），分化依存的に Aldh3a2 の寄与が小さくなっていることが明らかとなった。表皮において *Aldh3a2* が欠損していても FALDH 活性がほとんど低下しなかった（Fig. 9A）のは，表皮に存在するケラチノサイトの大部分が分化したケラチノサイトであることを反映したものと考えられる。以上より，マウスのケラチノサイトにおいて，Aldh3a2 の総 FALDH 活性に対する寄与の程度は分化前で非常に大きく，分化後では小さいことが示された。

2-3. マウス，ヒトの各組織における *Aldh3* ファミリーの発現分布

組織，細胞ごとに Aldh3a2 の総 FALDH 活性に対する寄与が異なるのは，他の Aldh3 ファミリーの発現プロファイルが異なるためであると考えられた。マウスには 5 種の Aldh3 ファミリー（Aldh3a1，Aldh3a2，Aldh3b1，Aldh3b2，Aldh3b3）が存在し，基質特異性に重複がある。特に Aldh3b サブファミリーは Aldh3a2 と同様，長鎖アルデヒドに特に高い活性を示すことを当研究室の北村らが明らかにしている(53)。そこで，活性測定を行った組織において，どの Aldh3 ファミリーが主要に発現しているかを明らかにするため，各組織から抽出した RNA を用いて定量的 RT-PCR を行った。その結果，*Aldh3a2* は肝臓において最も高い発現量（*Gapdh* 相対値）を示し，FALDH 活性が肝臓において最も高かったことと一致した（Fig. 10A）。*Aldh3a2* の発現量は，肝臓に次いで肺や精巣，腎臓，小腸，脾臓の順で高く，これらの組織でも FALDH 活性が高かったことから，各組織における FALDH 活性の大きさと *Aldh3a2* 発現量に相関が認められた（Fig. 9A，10A）。*Aldh3a2* の欠損により FALDH 活性が大きく低下した肝臓，腎臓，網膜では，ほとんど *Aldh3a2* のみが発現していた（Fig. 10A）。この結果は，*Aldh3a2* KO マウスのこれらの組織において FALDH 活性が著しく低下したことと一致した。

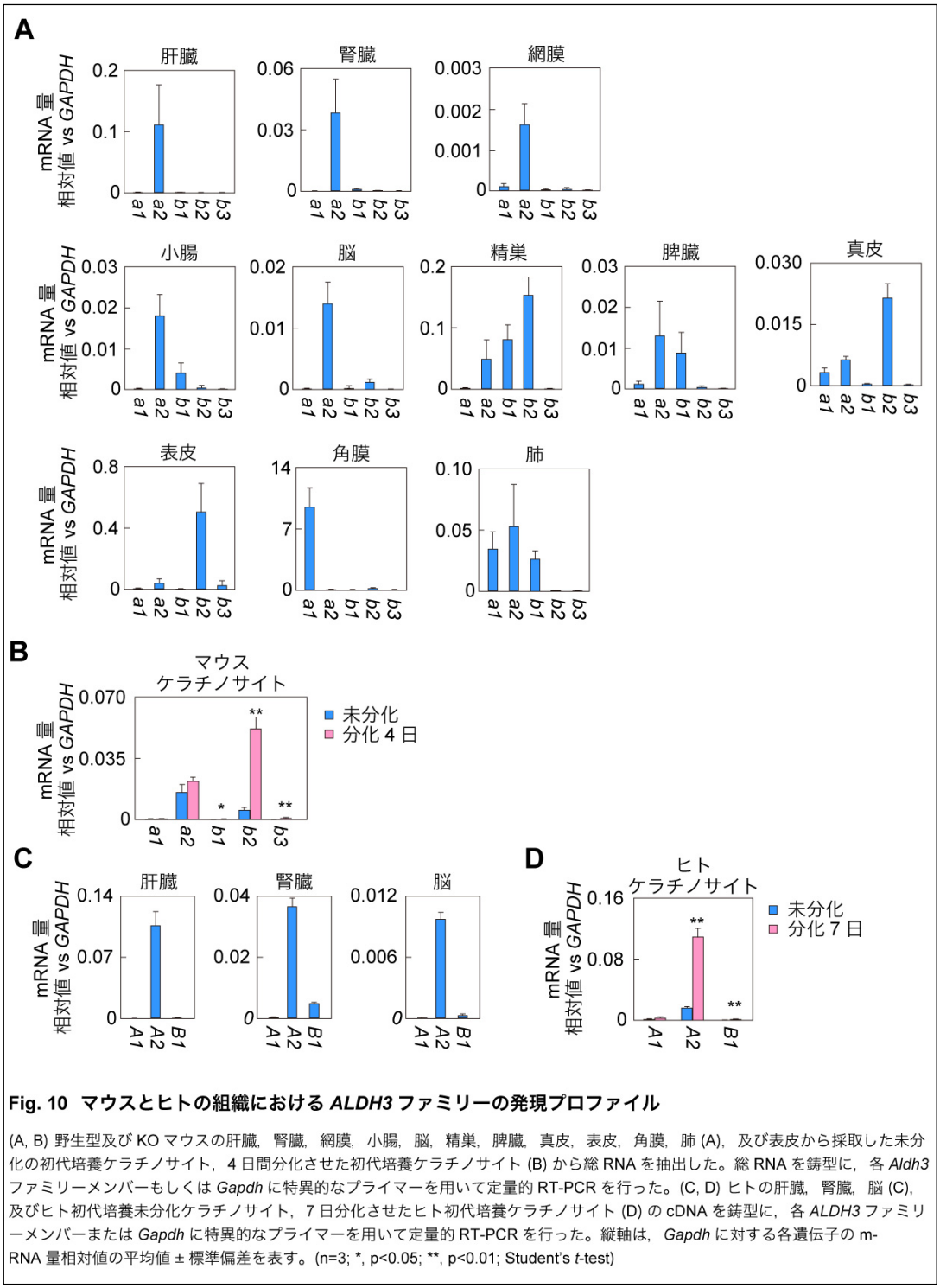


Fig. 10 マウスとヒトの組織における *ALDH3* ファミリーの発現プロファイル

(A, B) 野生型及び KO マウスの肝臓，腎臓，網膜，小腸，脳，精巣，脾臓，真皮，表皮，角膜，肺 (A)，及び表皮から採取した未分化の初代培養ケラチノサイト，4 日間分化させた初代培養ケラチノサイト (B) から総 RNA を抽出した。総 RNA を鋳型に，各 *Aldh3* ファミリーメンバーもしくは *Gapdh* に特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。(C, D) ヒトの肝臓，腎臓，脳 (C)，及びヒト初代培養未分化ケラチノサイト，7 日分化させたヒト初代培養ケラチノサイト (D) の cDNA を鋳型に，各 *ALDH3* ファミリーメンバーまたは *Gapdh* に特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。縦軸は，*Gapdh* に対する各遺伝子の m-RNA 量相対値の平均値 ± 標準偏差を表す。(n=3; *, p<0.05; **, p<0.01; Student's *t*-test)

一方，KO マウスにおいても FALDH 活性が一部残存した小腸，脳，脾臓，精巣，真皮においては，*Aldh3a2* 以外の *Aldh3* ファミリーのいずれかが発現していた（Fig. 10A）。例えば小腸，脳，及び脾臓では *Aldh3a2* が主要であるものの，小腸では *Aldh3b1*，脳では *Aldh3b2*，脾臓では *Aldh3b1* の発現も認められた。精巣及び真皮では *Aldh3a2* の発現が認められたが，どちらの組織においても *Aldh3b2* が主要に発現していた。このように，総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与が中程度であった組織では，*Aldh3a2*

以外の *Aldh3* ファミリーメンバーの発現が認められた。このことから，*Aldh3a2* KO マウスにおける残存活性の大きさと，*Aldh3* ファミリーメンバーの発現プロファイルとに相関が認められた。

肺では，*Aldh3a1*，*Aldh3a2*，*Aldh3b1* が同程度発現していた（Fig. 10A）。角膜と表皮では，*Aldh3a2* の発現レベルは他の *Aldh3* ファミリーメンバーに比べて非常に低く，総 FALDH 活性に対する *Aldh3a2* の寄与が小さかったこととよく一致した（Fig. 10A）。角膜ではこれまでの報告と一致して，中鎖アルデヒドに高い活性を示す *Aldh3a1* が高発現していた。この結果は，角膜において中鎖アルデヒドに対する FALDH 活性が高かったことと一致した。表皮では *Aldh3b2* が主要に発現しており，長鎖アルデヒドを代謝する表皮の主要な FALDH として機能していることが示唆された。以上の結果から，各組織における *Aldh3* ファミリーメンバーの発現プロファイルと総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与の大きさはよく相関することが示された。

次に，ケラチノサイトにおいて，総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与が分化前後で異なる原因を追究するため，分化前後における *Aldh3* ファミリーメンバーの発現量を定量的 RT-PCR により調べた。その結果，分化前のケラチノサイトでは *Aldh3a2* と *Aldh3b2* が主要に発現しており，特に *Aldh3a2* の発現が高いことが明らかとなった (Fig. 10B)。この結果は，未分化のケラチノサイトにおける長鎖アルデヒド代謝に Aldh3a2 が大きく寄与しているという前述の結果と一致している。一方，分化後では *Aldh3b2* の発現が大きく上昇し，*Aldh3a2* の二倍以上の転写量を示した（Fig. 10B）。このことから，分化後のケラチノサイトでは *Aldh3b2* が主要な FALDH として機能すると考えられた。また，この結果は，分化後のケラチノサイトにおいて，総 FALDH 活性への Aldh3a2 の寄与が小さかった結果と一致した。

さらに我々は，ヒトの肝臓，腎臓，脳，ケラチノサイト由来の cDNA を用いて *ALDH3* ファミリーメンバーの発現プロファイルを調べた。なお，ヒトでは *ALDH3B3* が存在しない。また，*ALDH3B2* が FALDH として機能しないことがわかっているため，*ALDH3A1*，*ALDH3A2*，*ALDH3B1* の発現量のみを解析した。その結果，ヒトの肝臓ではマウスと同様 *ALDH3A2* のみが発現していた（Fig. 10C）。また，ヒトの腎臓と脳では *ALDH3B1* の発現も見られたが *ALDH3A2* が主要に発現していた（Fig. 10C）。このことから，これらの組織においてもマウスと同様に ALDH3A2 が主要な FALDH として機能していることが示唆された。ヒトのケラチノサイトでは分化前後どちらにお

いても *ALDH3A2* が主要に発現していた（Fig. 10D）。また，ヒトのケラチノサイトでは分化に伴い *ALDH3A2* の発現量が大きく上昇した。マウスのケラチノサイトでは分化に伴い主要な FALDH が *Aldh3a2* から *Aldh3b2* にシフトしていたが，ヒトでは分化後のケラチノサイトにおいても *ALDH3A2* が主要に発現していた。このことから，ヒトではマウスと異なり，ケラチノサイトにおいて長鎖アルデヒドの代謝に大きく寄与するのは分化の状態に関わらず ALDH3A2 であることが示唆された。この結果は，SLS 患者の表皮では FALDH 活性が低下するが *Aldh3a2* KO マウスの表皮では低下しないという相反した結果の原因を説明するものであると考えられる。

2-4. *Aldh3a2* KO ケラチノサイトでは長鎖塩基からグリセロ脂質への代謝が低下する

ALDH3A2 は スフィンゴ脂質からグリセロ脂質への変換経路（リアーゼ経路）の中間体として生じるアルデヒドの代謝に関与することから(55)，我々は *Aldh3a2* の欠損によってケラチノサイトにおけるリアーゼ経路がどのような影響を受けるのかを調べた。野生型及び *Aldh3a2* KOマウス由来のケラチノサイト（未分化）を，トリチウム標識されたジヒドロスフィンゴシン（[^{3}H]DHS）でラベルし，抽出した脂質を TLC により分離後，オートラジオグラフィーによってラベルされた DHS 代謝物を検出した。DHS はスフィンゴシンと同様の経路で代謝され，スフィンゴ脂質もしくはグリセロ脂質へと変換される。野生型のケラチノサイトにおいて，DHS はセラミド（Cer）やグルコシルセラミド（GlcCer），スフィンゴミエリン（SM）といったスフィンゴ脂質へ代謝されただけでなく，トリグリセリド（TG）やホスファチジルエタノールアミン（PE），ホスファチジルイノシトール（PI），ホスファチジルセリン（PS），ホスファチジルコリン（PC）といったグリセロ脂質へも代謝された（Fig. 11A）。バンドの濃さを比較すると，グリセロ脂質のバンドがスフィンゴ脂質と同等以上であり，未分化ケラチノサイトにおいて長鎖塩基が活発にグリセロ脂質へと変換されることが明らかとなった。*Aldh3a2* KO ケラチノサイトでは，Cer, GlcCer, SM などのスフィンゴ脂質は野生型と同程度検出され（Fig. 11A），DHS からスフィンゴ脂質への代謝は正常であることが示された。一方，グリセロ脂質である PS/PI のバンドは消失したことから（Fig. 11A），KO ケラチノサイトでは DHS がグリセロ脂質へ殆ど代謝されていないことが示唆された。DHS がリアーゼ経路を経てグリセロ脂質へと取り込まれる場合，産生するグリセロ脂質は通常エ

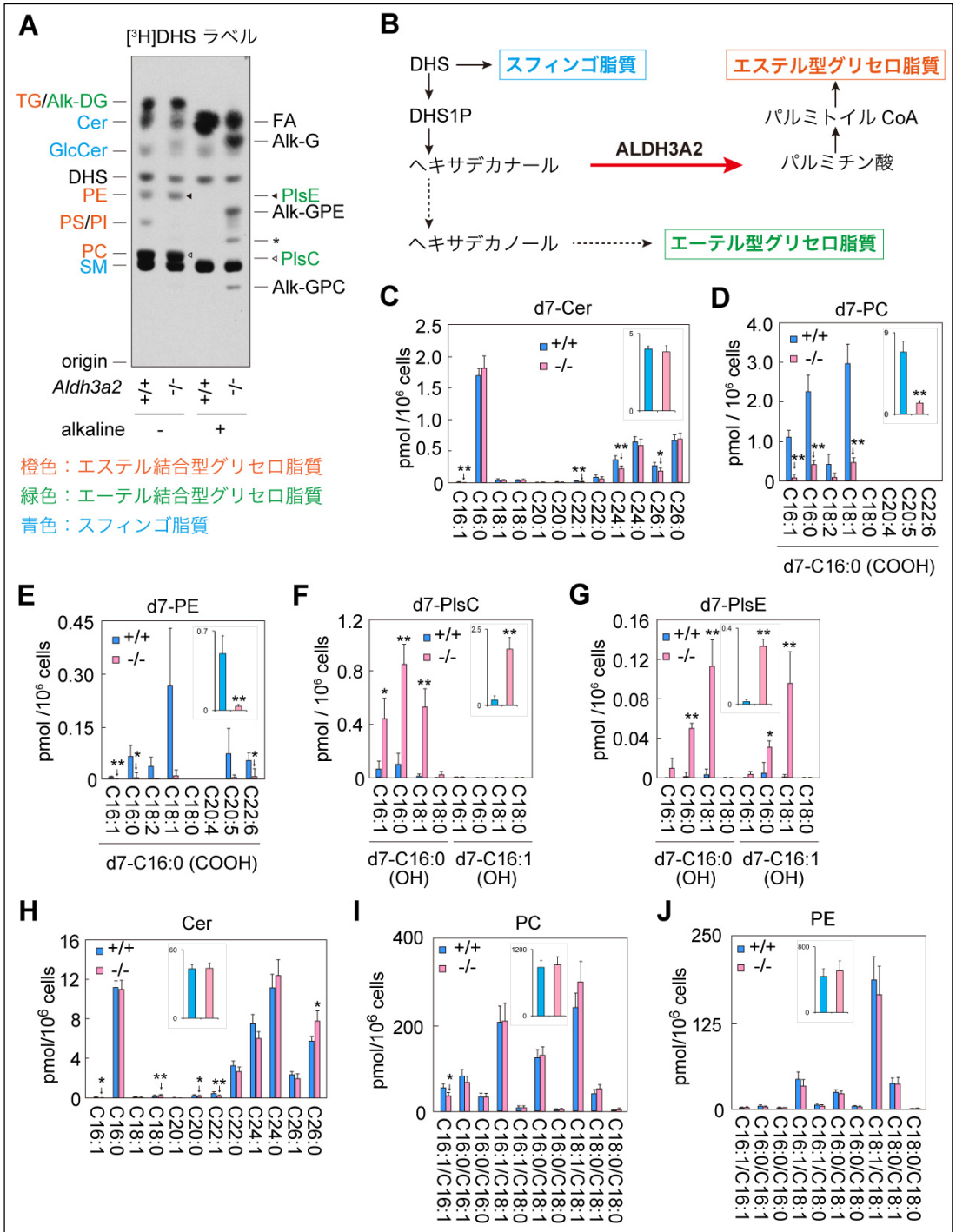


Fig. 11 *Aldh3a2* KO ケラチノサイトでは長鎖塩基の代謝に異常が生じる

(A) 野生型及び KO マウスから採取したケラチノサイト (未分化) に，[3H]DHS を加えて 37˚C で 4 時間ラベルした。脂質を抽出し，半量をアルカリ処理した後，TLC で展開し，オートラジオグラフィーで検出した。(*，PlsE をアルカリ処理した際に生じる分解副産物)

(B) DHS の代謝経路を示した。*ALDH3A2* が欠損するとヘキサデカナールが蓄積し，その一部はヘキサデカノールへと変換された後，エーテル型グリセロ脂質へと変換される。

(C-J) 野生型及び KO マウスから採取したケラチノサイト (未分化) に，重水素ラベルされたスフィンゴシン (d7-Sph) を加え，37˚C で 4 時間ラベルした。脂質を抽出し，LC-MS/MS により d7-Sph 代謝物を含む脂質分子 (d7-Cer(C), d7-PC(D), d7-PE(E), d7-PlsC(F), d7-PlsE(G)) と，内在性の脂質分子 (Cer(H), PC(I), PE(J)) を炭素鎖長ごと，不飽和度ごとに定量した。d7-PC と d7-PE は，d7-C16:0 脂肪酸を含む分子種を (D, E)，d7-PlsC と d7-PlsE は d7-C16:0 もしくは d7-C16:1 の脂肪族アルコールを含む分子種を (F, G) 定量した。Cer は，C18:1 スフィンゴシンを含むものを定量した (H)。図中のインセット (C-J) は，各脂質の総量を表す。縦軸は，1x10^6 細胞あたりの脂質量の平均値 ± 標準偏差を表す。(n=3; *, p<0.05; **, p<0.01; Student's *t*-test)

ステル型である。エステル結合はアルカリによって加水分解されるので，グリセロ脂質に取り込まれた DHS 由来脂肪酸はアルカリ処理によって遊離させることができる。野生型ではアルカリ処理時に脂肪酸が多く検出されたが，KO では野生型と比べてバンドが非常に薄かった（Fig. 11A）。このことからも，KO ケラチノサイトでは DHS からグリセロ脂質への代謝が滞っていることが示唆された。KO ケラチノサイトでは，TG，PE，PC の位置にバンドが検出されたが，これらのバンドはアルカリ処理によって野生型では認められないバンドにシフトした。これらのバンドは，移動度からアルカリに耐性なエーテル結合を有するエーテル型グリセロ脂質であると考えられた。つまり，アルカリ処理なしで検出されたバンドは上から順に，1-*O*-アルキルジアシルグリセロール（Alk-DG），プラズマニルもしくはプラズメニルエタノールアミン（PlsE），プラズマニルもしくはプラズメニルコリン（PlsC）であると考えられた（Fig. 11A）。また，アルカリ処理によって検出されたバンドは上から順に，1-*O*-アルキルグリセロール（Alk-G），1-*O*-アルキルグリセロホスホエタノールアミン（Alk-GPE），1-*O*-アルキルグリセロホスホコリン（Alk-GPC）であると考えられた（Fig. 11A）。KO ケラチノサイトで DHS がエーテル型グリセロ脂質へと代謝されたのは，おそらく *Aldh3a2* の欠損により DHS 由来のヘキサデカナールが蓄積し，アルコールデヒドロゲナーゼの逆反応によってアルコールへと変換された後，エーテル型グリセロ脂質へと代謝されたものと考えられる（Fig. 11B）。こうした代謝変化は，*Aldh3a2* が欠損した CHO-K1 細胞でも観察された(55)。

次に，*Aldh3a2* の欠損により引き起こされた代謝の変化を定量的に評価するために，重水素ラベルされたスフィンゴシン（D7-Sph）でケラチノサイトをラベルし，脂質を LC-MS/MS で解析した。野生型のケラチノサイトにおいて D7-Sph は，セラミドやエステル型 PC, PE に代謝されており，エーテル型グリセロ脂質である PlsC, PlsE にはほとんど代謝されていなかった（Fig. 11C-G）。D7-Sph のエステル型 PC, PE への代謝量は，セラミドへの代謝量の 1.8 倍であり，ケラチノサイトにおいて長鎖塩基は活発にグリセロ脂質へと代謝されることが示された。KO ケラチノサイトでは，D7-Sph からセラミドへの代謝は野生型と同程度であった（Fig. 11C）。一方，PC，PE への代謝は大きく低下しており，それぞれ野生型の17.9 %，6.9 % であった（Fig. 11D，E）。KO ケラチノサイトでは，代わりにエーテル型グリセロ脂質である PlsC，PlsE がそれぞれ野生型の 10.4 倍，22.2 倍検出された（Fig. 11F，G）。以上より，マウスの未分

化ケラチノサイトでは長鎖塩基がグリセロ脂質へと活発に代謝されていること, *Aldh3a2* の欠損によってこの代謝が低下すること，中間体として蓄積したアルデヒドがアルコールに変換されて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。

さらに，リアーゼ経路の変化が定常時の脂質総量に影響を与えるかどうかを調べるため, D7-Sph でラベルしたケラチノサイトから抽出した脂質のうち, D7-Sph 及びその代謝物を含まない内在性のセラミド，PC，PE 量を LC-MS/MS により定量した。その結果，定常時のセラミド量及び PC，PE 量には野生型と KO 間で差は認められなかった（Fig. 11H-J）。このことから，*Aldh3a2* の欠損により長鎖塩基からグリセロ脂質への代謝が変化しても，セラミドや PC, PE の全体量には影響を与えないことが明らかとなった。つまり，リアーゼ経路の低下によりグリセロ脂質やスフィンゴ脂質の全体量が変化することが SLS 発症の引き金となっているわけではないことが示唆された。

2-5. *Aldh3a2* KO マウスでは皮膚バリア機能の回復が遅延する

SLS 患者の角質細胞間脂質では，セラミド（NS）量に変化は認められないが，アシルセラミド（EOS）量が著しく減少し，皮膚のバリア機能が低下する(38)。そこで，野生型及び *Aldh3a2* KO マウスの表皮から脂質を抽出し，セラミド（NS），アシルセラミド（EOS）を LC-MS/MS により定量した。その結果，セラミド（NS），アシルセラミド（EOS）どちらにおいても野生型と KO マウスの間でほとんど差は認められなかった（Fig. 12A, B）。このことから，KO マウスの表皮のセラミド組成はほぼ正常であることが明らかとなった。

次に，KO マウスの皮膚バリア機能を評価するために，野生型及び KO の新生マウスをトルイジンブルー溶液に 24 時間浸し，色素の浸透を調べたところ，差は認められなかった（Fig. 12C）。また，体内からの経皮水分蒸散量（TEWL）を測定した結果でも，野生型と KO で差は認められなかった（Fig. 12D）。さらに，KO マウスの皮膚の形態をHE 染色によって観察したところ，SLS 患者で認められるような過角化や表皮の肥厚など，顕著な異常は観察されなかった（Fig. 12E）。以上の結果から，KO マウスではセラミド組成だけでなく, 皮膚バリア機能や表皮の形態にも SLS 様の異常は生じていないことが明らかとなった。この結果は，KO マウスの表皮において FALDH 活性がほとんど低下していなかった結果（Fig. 9A）を反映したものと考えられる。しかし，HE 染色切片を詳細に観察すると，KO マウスでは角質層よりも内側の有棘層から顆粒層におい

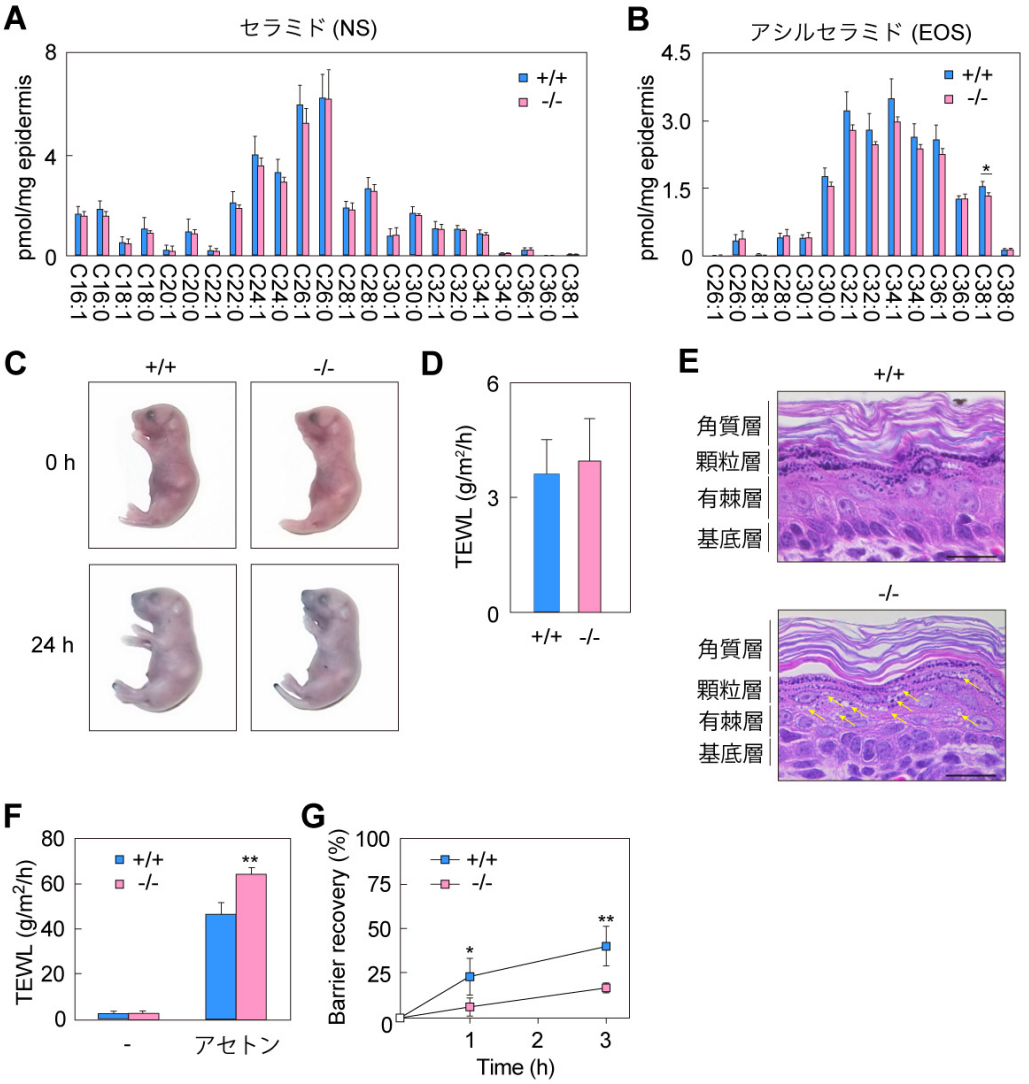


Fig. 12 *Aldh3a2* KO マウスでは皮膚バリアの回復が遅延する

(A, B) 野生型及び KO の新生児 (P0) マウスの表皮から脂質を抽出し，LC-MS/MS により NS(A) と EOS(B) を定量した。NS 分子種のうち C18:1 スフィンゴシンを含むもの，EOS 分子種のうち C18:1 スフィンゴシンとリノール酸を含むものを定量した。縦軸は，表皮 1 mg (湿重量) あたりの脂質量の平均値 ± 標準偏差を表す。(n=4; *, p<0.05; Student's *t*-test)
(C) 野生型及び KO の新生児 (P0) マウスを 0.1 % トルイジンブルー溶液に 24 時間浸した。トルイジンブルーの染色の程度により皮膚バリア機能を評価した。
(D) 野生型及び KO の新生児 (P0) マウスの背中における経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定した。縦軸は，実験から得られた TEWL 値の平均値 ± 標準偏差を表す。(野生型 , n=8; KO, n=6)
(E) 野生型及び KO の新生児 (P0) マウスの皮膚を 3.7 % ホルムアルデヒドで固定し，脱水処理の後，パラフィンに包埋した。マイクロトームにより薄切切片 (4 μm) を作製してパラフィンを除去した後 HE 染色を行い，光学顕微鏡 DM5000B により観察した。黄色の矢印は白い小空胞を表す。スケールバーは 20 μm を表す。
(F, G) 野生型及び KO の新生児 (P0) マウスの皮膚をアセトンもしくは生理食塩水 (コントロール) で処理した。アセトン処理の直後 (F, G), 1 時間後 (G)，3 時間後 (G) に TEWL を測定した。(F) はアセトン処理直後の TEWL 値を示している。(G) では皮膚バリア回復率を，アセトン処理直後の TEWL 値を 0 %，アセトン処理前の TEWL 値を 100 % として表している。縦軸は，それぞれの実験から得られた平均値 ± 標準偏差を表す。(野生型 , n=5; KO, n=4; *, p<0.05; **, p<0.01; Student's *t*-test)

て白く小さい空胞様の構造が観察された（Fig. 12E）。類似した所見が，*PNPLA1* 遺伝子の変異による魚鱗癬患者においても観察されている(75)。以上から，*Aldh3a2* KO マウスの表皮では SLS 様の顕著な角化異常は生じなかったものの，弱い形態異常が生じていることが示された。

KO マウスは通常時では皮膚バリア機能に異常を生じなかったため，次に我々は，野生型及び KO マウスの角質層をアセトンにより傷害して，角質層のバリア機能を低下させた状態で TEWL を測定した。野生型，KO ともにアセトン処理によって TEWL が大きく上昇したが，KO ではアセトン処理後の TEWL が野生型よりも有意に高かった（Fig. 12F）。また，アセトン処理後の TEWL の変化を経時的に測定することで，皮膚バリアの回復を評価した。野生型では 1 時間で 20 % 前後，3 時間で約 40 % までバリアが回復したのに対し，KO マウスでは 3 時間後でも 20 % 以下の回復率であった（Fig. 12G）。以上より，KO マウスは通常時では正常な皮膚バリア機能をもつが，角質を傷害した際のバリア機能は野生型より低く，さらにバリアの回復能が低いことが明らかとなった。このことから，KO マウスの表皮では角質層よりも内層に何らかの異常が生じている可能性が示唆された。

2-6. *Aldh3a2* KO マウスの表皮基底層では細胞間隙が拡大している

Aldh3a2 KO マウスの表皮では，弱いながらも光学顕微鏡レベルで形態異常が観察された（Fig. 12E）。そこで我々は，KO マウスの表皮のうち，*Aldh3a2* の欠損によって FALDH 活性が大きく低下した未分化のケラチノサイトが存在する基底層に着目し，電子顕微鏡により，形態を詳細に観察した。その結果，KO マウスの基底層では野生型と比べて細胞間隙が拡大している様子が観察された（Fig. 13A，B）。アセトンで角質層を障害した際に KO マウスで野生型よりも TEWL が高かったのは，このような形態異常を反映した結果であることが示唆された。また，細胞間隙の拡大は，細胞増殖が亢進しているケラチノサイトにしばしば見られる所見であることから(76-78)，KO マウスの表皮基底層では細胞増殖が亢進している可能性が示唆された。

2-7. *Aldh3a2* KO マウスのケラチノサイトでは細胞増殖と酸化ストレス応答が亢進している

Aldh3a2 の欠損がケラチノサイトの増殖に及ぼす影響を調べるため，野生型及び *Aldh3a2* KO マウスの表皮から採取したケラチノサイトの細胞増殖能を評価した。経時的に細胞数をカウントした結果，KO ケラチノサイトでは野生型よりも細胞数の増加が

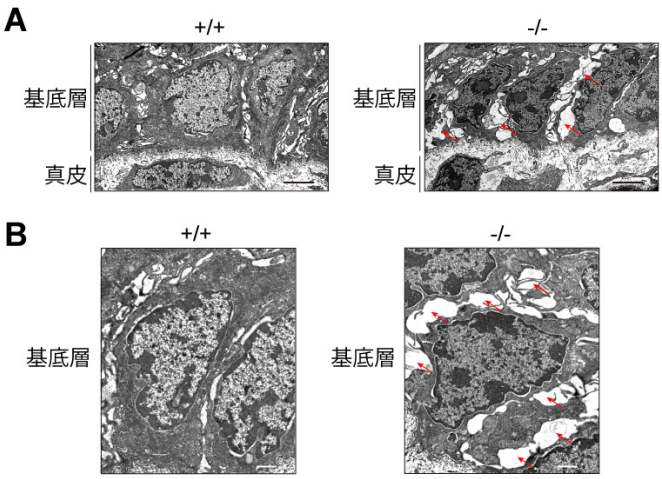


Fig. 13 *Aldh3a2* KO マウスの表皮基底層では細胞間隙が拡大している

(A, B) 野生型及び KO の新生児 (P0) マウスの皮膚を 5 % グルタールアルデヒド，1 % 四酸化オスミウム，及び 0.5 % 四酸化ルテニウムで固定し，脱水処理の後，Epon 812 レジンに包埋した。ウルトラマイクロトームにより超薄切片 (70 nm) を作製し，酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した後，透過型電子顕微鏡 JEM-1400 により観察した。赤い矢印は細胞間隙を表す。スケールバーは，3 μm(A)，1 μm(B) を表す。

速いことが明らかとなった（Fig. 14A）。また，細胞分裂依存的に細胞内へ取り込まれるチミジンのトリチウム標識体を用いて，ケラチノサイトへの取り込みを評価したところ，KO ケラチノサイトでは野生型に比べてチミジンの取り込みが有意に高かった（Fig. 14B）。さらに，細胞増殖マーカーである *Ki67* の mRNA 量を定量的 RT-PCR によって解析したところ，KO ケラチノサイトでは *Ki67* の mRNA 量が有意に増加していることが明らかとなった （Fig. 14C）。以上の結果から，KO ケラチノサイトでは細胞増殖が亢進していることが明らかとなった。

ケラチノサイトや癌細胞の増殖亢進には酸化ストレス応答が密接に関与することが報告されている(79,80)。そこで，野生型及び KO ケラチノサイトにおける酸化ストレス応答因子の mRNA 量を定量的 RT-PCR により解析した。酸化ストレス応答因子として，ヘムの分解に関わるヘムオキシゲナーゼ（*Hmox1*），活性酸素種の除去に関わるスーパーオキシドジスムターゼ（*Sod1*），抗酸化作用を有するグルタチオンの生合成を担う，グルタミルシステインリガーゼの触媒サブユニット(*Gclc*)と調節サブユニット(*Gclm*)，及びグルタチオン S-トランスフェラーゼ α1（*Gsta1*）を調べた。その結果，KO ケラチノサイトでは野生型と比べ，*Gsta1* の発現レベルは上昇傾向，*Hmox1*，*Sod1*，*Gclc*，*Gclm* の発現レベルは有意に高かった（Fig. 14D）。以上より，*Aldh3a2* KO マウスの未分化ケラチノサイトでは酸化ストレス応答が亢進していることが明らかとなり，細胞増殖の亢進の一因となっていることが示唆された。

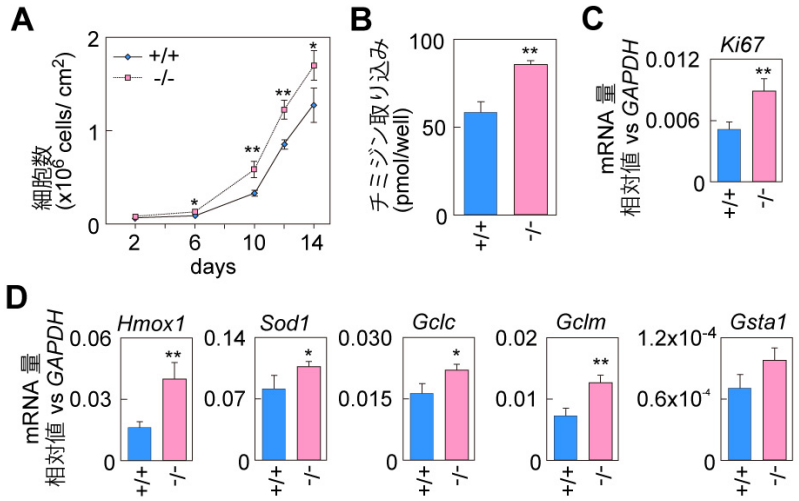


Fig. 14 *Aldh3a2* KO ケラチノサイトでは細胞増殖及び酸化ストレス応答が亢進している

(A) 野生型及び KO マウスから採取したケラチノサイト (未分化) を培養し，光学顕微鏡観察により細胞数をカウントした。各ディッシュにつき無作為に 3 視野を観察し，視野内に含まれる細胞数をカウントした。縦軸は，実験から得られた平均値 ± 標準偏差を表す。(n=4)

(B) 野生型及び KO マウスから採取したケラチノサイト (未分化) に [^{3}H] チミジンを加え，37˚C で 24 時間取り込ませた。培地及び細胞中の放射活性を，液体シンチレーションカウンター Micro Beta TriLux により測定し，チミジンの取込み率を算出した。取込み率とはじめに加えたチミジン量から，細胞に取り込まれたチミジン量を算出した。縦軸は，実験で得られた平均値 ± 標準偏差を表す。(n=3)

(C, D) 野生型及び KO マウスから採取したケラチノサイト (未分化) から総 RNA を抽出した。総 RNA を鋳型に，*Ki67*(C)，及び *Hmox1*, *Sod1*, *Gclc*, *Gclm*, *Gsta1*(D)，*Gapdh*(C, D) に特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。縦軸は *Gapdh* に対する各遺伝子の mRNA 量相対値の平均値 ± 標準偏差を表す。(n=3)

(*, p<0.05; **, p<0.01; Student's *t*-test)

3. 考察

SLS は FALDH をコードする *ALDH3A2* の変異によって引き起こされる遺伝性の皮膚神経疾患である。一般にアルデヒド分子は反応性が高く，細胞毒性を示すことから，SLS の発症は ALDH3A2 の機能低下に伴うアルデヒド分子の蓄積に起因すると考えられている。SLS の臨床検体を用いた症状の解析はこれまでに数多くなされてきたが，これらの先行研究のほとんどは発症した結果どのような異常を生じているのかを解析したものであり，発症に至るプロセスや，そこに潜む分子メカニズムは未だ不明である。本研究は，これまでに報告のなかった *Aldh3a2* KO マウスを用いた解析を行うことにより，SLS の病態分子メカニズムを明らかにしようとするものである。本研究において我々は，*Aldh3a2* の欠損が各組織の FALDH 活性に与える影響，皮膚機能・皮膚症状に与える影響について解析した。通常時の*Aldh3a2* KOマウスでは，皮膚バリア機能に異常は見られず，セラミド組成も正常であった（Fig. 12A-D）。また，この KO マウスでは形態学的にも SLS 患者に特徴的な過角化や表皮の肥厚は観察されなかった（Fig. 12E）。この原因として，マウスの表皮ではヒトでは機能しない Aldh3b2 の発現量が高発現し，Aldh3a2 の機能を一部相補したことが考えられる。実際，分化したケラチノサイトでは *Aldh3a2* が欠損していても FALDH 活性は野生型ケラチノサイトと比較して，ほとんど変化していなかった（Fig. 9B）。一方，ヒトのケラチノサイトでは，分化前後共に *ALDH3A2* が主要な FALDH であり（Fig. 10D），ALDH3A2 の機能が低下するとヒトでは表皮全体のケラチノサイトにおいて FALDH 活性が低下すると推察される。KO マウスが SLS 患者の病態を完全には再現しなかったのは，マウスとヒトそれぞれのケラチノサイトにおいて ALDH3B2 が機能するか否かという違いに起因していると考えられる。しかし，マウスの未分化のケラチノサイトではヒトと同様に *Aldh3a2* が主要に発現しており，KO 未分化ケラチノサイトでは FALDH 活性が大きく低下していた（Fig. 9B，10B）。その結果，未分化ケラチノサイトでは長鎖塩基の代謝に異常を生じていた（Fig. 11）。また，KO 未分化ケラチノサイトでは増殖の亢進や酸化ストレス応答の亢進が観察され，さらに個体レベルでも，角質層障害時の TEWL 高値，皮膚バリア回復の遅延，基底層における細胞間隙の拡大など，様々な異常が観察された（Fig. 12-14）。こうした結果から SLS の発症に表皮基底層の異常が関与する可能性が示唆された。

3-1. Aldh3a2 の各組織における長鎖アルデヒド代謝への寄与と SLS 病態の組織限局性

本研究で我々は，*Aldh3a2* KO マウスから 11 種類の組織及び分化前後の初代培養ケラチノサイトからライセートを調製して *in vitro* FALDH 活性測定を行い， *Aldh3a2* の欠損による FALDH 活性への影響を調べ，各組織における総 FALDH 活性に対する Aldh3a2 の寄与の大きさを明らかにした。FALDH 活性は肝臓において最も高く，次いで表皮，肺，腎臓の順に高かったが，そのうち肝臓と腎臓では *Aldh3a2* の欠損により FALDH 活性が大きく低下した（Fig. 9A）。このことから肝臓や腎臓では長鎖アルデヒド代謝に対する Aldh3a2 の寄与は非常に大きいことが示唆された。しかし，KO マウスにおいてこれらの組織に，組織の外見や形態の異常など顕著な表現型は観察されなかった。また，ヒトの肝臓及び腎臓における主要な FALDH もマウスと同様に ALDH3A2 であることが明らかとなった（Fig. 10C）。このことから，SLS 患者の肝臓や腎臓において FALDH 活性が大きく低下していることが推察されるが，これらの組織における臨床症状や異常はこれまでに報告されていない。SLS では主に表皮，脳，網膜において臨床症状が報告されているが，これらの組織において FALDH 活性が大きく低下していることは本研究における FALDH 活性測定やこれまでの報告から既に確認されている。つまり，SLS の病態が表皮や脳，網膜に限局する理由は FALDH 活性の低下のみでは説明することができない。SLS の症状が限局した組織に生じる理由の一つとして，ALDH3A2 による酸化反応以外の代謝経路や細胞外への排出などによってアルデヒドの細胞内への過剰な蓄積を防止する機構の強弱が組織ごと異なる可能性が考えられる。その一例として，蓄積したアルデヒドの還元反応によるアルコールへの変換が挙げられる。本研究において我々は，*Aldh3a2* KO ケラチノサイトでは DHS 由来の長鎖アルデヒドが脂肪族アルコールであるヘキサデカノールに代謝され，エーテル型グリセロ脂質へと代謝されることを明らかにした（Fig. 11）。また，同様の代謝変化が CHO-K1 細胞の *Aldh3a2* 欠損株でも見られることを当研究室の中原らが明らかにしている(55)。SLS 患者のケラチノサイトや線維芽細胞，血漿中においてもヘキサデカノールやオクタデカノールなどの脂肪族アルコール及び 1-*O*-アルキルジアシルグリセロールのようなエーテル型グリセロ脂質が蓄積していることが報告されている(81,82)。アルコールはアルデヒドと比べて反応性が低く，アルデヒドよりも細胞毒性が低いと考えられる。またプラズマローゲンは細胞を酸化ストレスなどから保護する働きを持つ。これらのことから，

Aldh3a2 KO マウスや SLS 患者で見られるようなアルデヒドからアルコールへの変換及びエーテル型グリセロ脂質への代謝は，SLS 発症の原因ではなく，むしろ過剰なアルデヒドの蓄積を防止した結果であると推察される。おそらく，SLS 患者中ではアルコールへの還元などのメカニズムでは除去しきれずに残存・蓄積したアルデヒドが，近傍のタンパク質や脂質を修飾することでその機能を低下させ，SLS の発症につながっていると考えられる。SLS において肝臓や腎臓に異常を生じないのは，これらの組織ではアルデヒドからアルコールへの還元反応を触媒する酵素の発現量や活性が，皮膚や脳に比べて高い可能性がある。ALDH3A2 は脂肪族アルコール脱水素酵素（FADH）と複合体を形成して機能していることが示唆されており，アルデヒドからアルコールへの還元反応はおそらく FADH による逆反応であると考えられるが，ALDH3A2 と共に機能する FADH は現在未同定である。

SLS の症状が皮膚や脳に限局する別の原因として，これらの組織の機能に重要な細胞内プロセスがアルデヒドの蓄積に対して高感受性である可能性も挙げられる。アルデヒド分子は非常に反応性が高く，1 級アミンと容易に反応してシッフ塩基を形成することが知られている(54)。実際, SLS 患者由来の線維芽細胞や CHO-K1 細胞の *Aldh3a2* 欠損株において, PE のアミノ基にアルデヒドが結合した脂質が検出されることが報告されている(83)。またアルデヒドのうち，S1P の開裂により生じるヘキサデセナールなど 2 位にトランス二重結合を有するものは，マイケル付加反応によりヒスチジン残基やシステイン残基とも反応することが知られている(68)。こうした反応性の高さから，アルデヒドはタンパク質中に含まれるリジンやアルギニン，ヒスチジン，システインなどのアミノ酸残基を修飾してその機能を阻害する可能性がある。SLS において症状が皮膚や神経系，網膜に限局するのは，これらの組織特異的にアルデヒドによる修飾を受けやすい特定のタンパク質が存在しているのかもしれない。各組織においてアルデヒド修飾を受けるタンパク質は現在未同定であるが，未分化のケラチノサイトでは，後述の Keap1 がターゲットとなっている可能性が本研究により示唆された。今後，分化したケラチノサイトや神経系，網膜においてアルデヒド修飾を受けるタンパク質を明らかにしていくことは，SLS の各症状に対する新規治療薬開発の分子基盤となることが期待される。

3-2. ケラチノサイトの増殖亢進と SLS 病態との関連

Aldh3a2 KO マウスでは SLS 様の顕著な症状は認められなかった。これは，KO 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，FALDH 活性がほとんど低下していなかったことが原因であると考えられる。しかし，マウスの表皮ケラチノサイトのうち，未分化のケラチノサイトでは *Aldh3a2* が主要に発現していた（Fig. 10B）。このことと一致して，未分化のマウスケラチノサイトでは *Aldh3a2* の欠損に伴い FALDH 活性が大きく低下し（Fig. 9B），Aldh3a2 依存的な経路である長鎖塩基からグリセロ脂質への代謝も低下していた（Fig. 11）。また，KO マウスの表皮のうち，未分化のケラチノサイトが存在している基底層において細胞間隙が拡大しており，形態学的にも異常が観察された（Fig. 13）。細胞間隙の拡大は，増殖が亢進したケラチノサイトの特徴的な所見であり(76-78)，実際に KO マウスの表皮から採取したケラチノサイトにおいて細胞増殖が亢進していることも明らかとなった（Fig. 14A-C）。ケラチノサイトの増殖亢進は SLS を含む多くの魚鱗癬患者においてしばしば見られることが知られており，KO マウスで見られたケラチノサイトの増殖亢進は SLS の皮膚病態を反映しているものと推察される。

ケラチノサイトの増殖亢進は酸化ストレス応答と密接に関係することが知られている。我々は，KO の未分化ケラチノサイトにおいて酸化ストレス応答に関わる遺伝子である *Hmox1*, *Sod1*, *Gclc*, *Gclm* の mRNA 量が増加していることを見出した（Fig. 14D）。これらの因子は全て，酸化ストレス時に活性化される転写因子である Nrf2 の標的遺伝子として知られていることから(80,84)，KO の未分化ケラチノサイトでは Nrf2 が活性化していることが示唆された。また，Nrf2 の恒常的な活性化は癌細胞の生存・増殖亢進に伴う悪性化に関与することが報告されている(85)。このことから，KO ケラチノサイトにおける Nrf2 の活性化が細胞増殖の亢進の原因である可能性が考えられる。Nrf2 は通常時，Keap1 と呼ばれる酸化ストレスのセンサーとして機能する E3 リガーゼアダプターとサイトゾルで結合しており，ユビキチン－プロテアソーム系により分解されることで不活性化されている(86)。しかし，細胞が酸化ストレスに曝され，活性酸素種や親電子性物質によって Keap1 のシステイン残基が修飾されると，Nrf2 と Keap1 の結合が解離する。解離した Nrf2 は核内へ移行し，標的遺伝子の転写を促進することで抗酸化ストレス応答を促進するほか，細胞の生存や増殖を正に制御する(80,87)。Nrf2 による酸化ストレス応答の過剰な活性化は様々な上皮細胞の異常増殖を引き起こすことが知られて

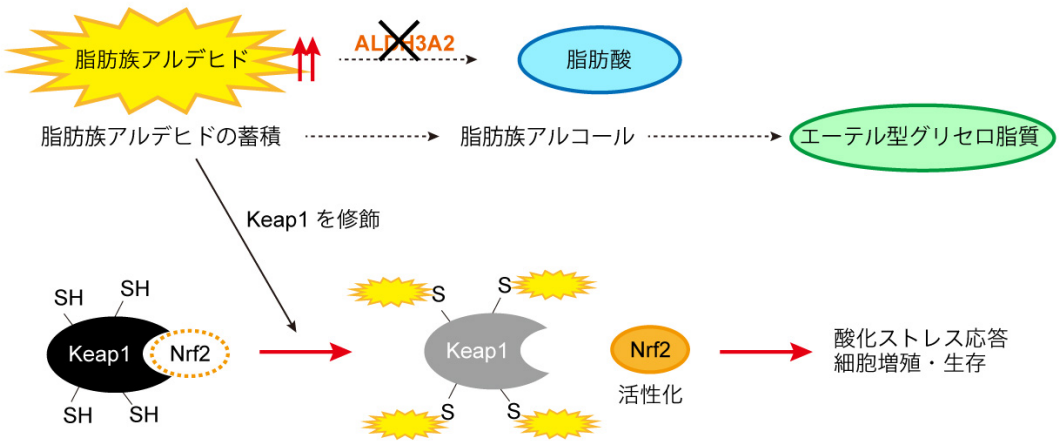


Fig. 15 SLS の皮膚病態の分子メカニズムモデル

本研究から推察された SLS の表皮下層における皮膚病態の分子メカニズムモデルを示す。SLS 患者では ALDH3A2 の機能低下に伴い，脂肪族アルデヒドが蓄積する。蓄積したアルデヒドの一部は，アルコールへと還元された後，エーテル型グリセロ脂質へと変換されることで除去される。しかし，除去できずに蓄積したアルデヒドは，Keap1 のシステイン残基を修飾する。その結果，Nrf2 が Keap1 から解離して核内へ移行し，酸化ストレス応答因子などの標的遺伝子の転写を活性化する。このような Nrf2-Keap1 システムの恒常的な亢進がケラチノサイトの過剰増殖を引き起こし，SLS 発症につながっている可能性がある。

いる。例えば，*Keap1* の欠損マウスや *Nrf2* トランスジェニックマウスは，表皮ケラチノサイトの増殖亢進，表皮の過角化，皮膚バリア機能の低下を生じ，魚鱗癬様の表現型を示すことが報告されている(88,89)。ヘキサデカナールやヘキサデセナールのような長鎖アルデヒドも Keap1 を修飾することが報告されていることから(87)，*Aldh3a2* の欠損により蓄積した長鎖アルデヒドが Keap1 のシステイン残基を修飾し，Nrf2 が恒常的に活性化することでケラチノサイトの増殖亢進が引き起こされている可能性がある（Fig. 15）。ケラチノサイトの増殖亢進は魚鱗癬の発症と密接に関わることから，本研究で得られた結果は，SLS の表皮基底層における病態メカニズムを説明する分子基盤になると期待される。また，*Nrf2* トランスジェニックマウスの表皮電子顕微鏡像において，角質細胞間脂質を貯留する層板顆粒が空であるものや，周囲を取り囲む膜が不完全もしくは消失しているものの蓄積が観察されており，SLS における層板顆粒の形態異常と酷似した結果が報告されている(88)。そのため，本研究から推察された Nrf2 の恒常的活性化仮説は，SLS 患者の分化したケラチノサイトにおける病態メカニズムの一端をも担っている可能性がある。

マウスの表皮ではケラチノサイトの分化に伴いヒトでは機能しない Aldh3b2 の発現が上昇して *Aldh3a2* の欠損を相補してしまうため，*Aldh3a2* の単独欠損マウスでは表皮上層（分化したケラチノサイト）における顕著な異常は見出すことができなかった。*Aldh3a2* KO マウスが SLS の皮膚病態を完全には再現しなかったことから，本研究に

て見出された表皮基底層の異常以外にも，分化したケラチノサイトにおける何らかの異常が SLS 発症に寄与していると考えられる。分化したケラチノサイトでは皮膚バリア機能に不可欠であるアシルセラミドの生合成が盛んに行われている。SLS 患者では角質細胞間脂質においてアシルセラミド量が減少しているため(38), 細胞増殖の亢進以外にアシルセラミド合成経路にも着目した解析が，今後必要であると考えられる。こうした課題を，*Aldh3a2 Aldh3b2* のダブル KO マウスの解析により解決していくことで，本研究の発展及び SLS 皮膚病態の全貌解明が期待される。

4. 実験方法

4-1. *Aldh3a2* ノックアウトマウスの作製

European Mouse Mutant Archive（EMMA; http://strains.emmanet.org/）より，*Aldh3a2* ジーントラップ型の C57BL/6N マウス（*Aldh3a2*$^{gt/+}$）を導入した。*Aldh3a2*$^{gt/+}$ マウスの gt アレルには, *Aldh3a2* 遺伝子のエキソン 4 の上流にスプライシングアクセプター（*SA*），β-ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* 遺伝子（*lacZ*），ネオマイシン耐性遺伝子（*neo*），ポリA 配列（*polyA*）が挿入されており，且つエキソン 4 の上流及び下流に *loxP* 配列が挿入されている。*Aldh3a2*$^{gt/+}$ マウスを，全身で Cre を発現する *CAG-Cre* トランスジェニックマウスと交配することで, エキソン 4 を欠失したヘテロノックアウトマウス（*Aldh3a2*$^{+/-}$）を作製した。*CAG-Cre* トランスジェニックマウスは, 理化学研究所バイオリソースセンターから入手した。*Aldh3a2*$^{+/-}$ マウスは, C57BL/6J と戻し交配を繰り返して系統維持した。解析に用いる *Aldh3a2*$^{-/-}$ マウスは *Aldh3a2*$^{+/-}$ マウス同士を交配することで得た。マウスの飼育は，Specific pathogen-free を満たす飼育室にて行い，室温 23 ˚C ± 1 ˚C，12 時間毎の明暗サイクルで，自由に摂餌できる状態で飼育した。本研究における動物実験は，国立大学法人北海道大学動物実験委員会規程に則って行った。

4-2. ケラチノサイトの初代培養

生後 0 日の新生マウス（P0）から採取した体幹の皮膚を，ケラチノサイトの増殖培地 CnT-Prime, Epithelial Culture Medium（CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland）に溶解した 5 mg/mL ディスパーゼ（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）3 mL に浸し，4 ˚C で 24 時間処理した。ディスパーゼ処理した皮膚を表皮と真皮に分け，表皮を増殖培地で洗浄した後，500 μL の TrypLE™ Select（1x）（Thermo Fisher Scientific）によって室温で 15 分処理した。トリプシン処理した表皮の基底層側を培養ディッシュに擦りつけてケラチノサイトを分散し，増殖培地に回収した後，細胞懸濁液を遠心（400 g，室温，5 分）して上清を除いた。 得られた細胞塊を増殖培地に懸濁し，5x10^4 cells/cm^2 の細胞密度となるようコラーゲンコートディッシュに播種した。培地交換は 3 日ごとに行った。マウスケラチノサイトの分化は，コンフルエント直前まで増殖培地で培養した後，培地を分化培地 CnT-Prime, 3D Barrier

Culture Medium（CELLnTEC Advanced Cell Systems AG）に置換することで誘導した。

ヒトの初代培養ケラチノサイト（CELLnTEC Advanced Cell Systems AG）の培養にはマウスのケラチノサイトと同じ増殖培地，分化培地を用いた。2x10^3 cells/cm^2 の細胞密度となるよう増殖培地で細胞を希釈してコラーゲンコートディッシュに播種した。培地交換は 2 日ごとに行った。継代は細胞密度が 100 % になる前に行った。培地を完全に除き, PBS で洗浄した後, アキュターゼ（Millipore, Billerica, MA）を加えて室温で 15 分処理した。その後，2 倍量の増殖培地で希釈して細胞を回収した。遠心（400 g，室温，5 分）後の細胞塊を増殖培地に懸濁し, 2x10^3 cells/cm^2 の細胞密度となるよう継代した。ヒトケラチノサイトの分化は，コンフルエント直前まで増殖培地で培養した後，培地を分化培地に置換することで誘導した。

4-3. マウステールからのゲノム抽出

マウステールに 200 μL の Lysis Buffer [100 mM Tris/HCl（pH 8.5）, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl, 200 μg/ml Proteinase K（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）] を加え, 56 ˚C で一晩インキュベートして溶解させた。600 μL TE$_{0.1}$ [10 mM Tris/HCl（pH 8.0），0.1 mM EDTA] を加えて 4 倍に希釈した後，遠心（100 g，室温，30 秒）を行い，上清をゲノム溶液として回収した。

4-4. マウスのジェノタイピング

マウステールから得られたゲノム溶液をテンプレートとし, プライマー TS70, TS71, TS72（Table 1，p52 参照）及び KOD FX（TOYOBO，Osaka，Japan）を用いて下記条件にて PCR を行った。

ゲノム溶液	0.5 μL
2xKOD FX Buffer	5.0 μL
2 mM dNTP	2.0 μL
50 μM TS70	0.06 μL
50 μM TS71	0.06 μL
50 μM TS72	0.06 μL
KOD FX	0.1 μL
H_2O	2.22 μL
合計	10 μL

94 ˚C	2分	
↓		
98 ˚C	10秒	x35 サイクル
60 ˚C	30秒	
68 ˚C	1分	
↓		
68 ˚C	2分	
4 ˚C	∞	

PCR 産物を 0.5 μg/mL エチジウムブロマイドを含有する 1.5 % アガロースゲルにて電気泳動し，紫外線により増幅断片（WT: 561 bp, KO: 285 bp）を発光させて検出した。

4-5. RNA 抽出，cDNA作製

5-12 週齢の野生型マウスから肝臓，腎臓，網膜，角膜，脳，小腸，精巣，脾臓，肺を摘出し，PBS で洗浄後，NucleoSpin RNA II Kit（Machery-Nagel, Dueren, Germany）を用いて総 RNA を抽出した。また，野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスの皮膚を回収し, PBS に浸して 50 ˚C で 5 分処理後, 表皮と真皮を分離し, NucleoSpin RNA II Kit を用いて総 RNA を抽出した。野生型及び KO の P0 マウスからケラチノサイトの初代培養を行い，分化誘導直前及び分化誘導してから 4 日後に，NucleoSpin RNA II Kit を用いて総 RNA を抽出した。

分化誘導直前及び分化誘導してから 7 日後のヒトケラチノサイトから，NucleoSpin RNA II Kit を用いて総 RNA を抽出後，Oligo dT プライマーを使用し，PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて cDNA を調製した。

4-6. RT-PCR

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスの表皮から抽出した総 RNA をテンプレートとし，*Aldh3a2* もしくは *Gapdh* に特異的なプライマーセット（Table 1，p52 参照）と One-Step PrimeScript RT-PCR Kit II（Takara Bio）を用いて，下記条件にて RT-PCR を行った。

50 ng/μL RNA 溶液	1.0 μL
2x1step Buffer	5.0 μL
5 μM each primer set	0.8 μL
PrimeScript Enzyme Mix 2	0.1 μL
H_2O	7.1 μL
合計	10 μL

50 ˚C	30分	
94 ˚C	2分	
↓		
94 ˚C	30秒	x24 or 33 サイクル*
66 ˚C	30秒	
72 ˚C	20秒	
↓		
72 ˚C	2分	
4 ˚C	∞	

(**Gapdh* は 24 サイクル, *Aldh3a2* は 33 サイクル)

PCR 産物を 0.5 μg/mL エチジウムブロマイドを含有する 1.5 % アガロースゲルにて電気泳動し，紫外線により増幅断片を発光させて検出した。

マウス組織及びマウスケラチノサイトから抽出した総 RNA を用いた定量的 RT-PCR は，各遺伝子に特異的なプライマーセット（Table 1，p52 参照）と One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II（Takara Bio）を用いて下記条件にて PCR を行い，CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad，Hercules，CA）により検出，定量した。

50 ng/μL RNA 溶液	1.0 μL	42 ˚C	5分	
2x1step SYBR RT-PCR Buffer 4	5.0 μL	95 ˚C	10秒	
5 μM each primer set	0.8 μL	↓		
PrimeScript 1step Enzyme Mix 2	0.1 μL	95 ˚C	5秒	x40 サイクル
H_2O	7.1 μL	63 ˚C	30秒	
合計	10 μL	72 ˚C	30秒	

ヒトケラチノサイトから抽出した cDNA 及びヒト肝臓，腎臓，脳の cDNA（Human MTC panel I，Lot# 1105031A; Takara Bio）を用いた定量的 RT-PCR は，各標的遺伝子に特異的なプライマーセット（Table 1，p52 参照）と KOD SYBR qPCR Mix（TOYOBO）を用いて下記条件にて PCR を行い，CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System により検出，定量した。

cDNA 溶液	0.5 μL	98 ˚C	2分	
KOD SYBR qPCR Mix	5.0 μL	↓		
5 μM each primer set	0.8 μL	98 ˚C	10秒	x40 サイクル
H_2O	3.7 μL	60 ˚C	10秒	
合計	10 μL	68 ˚C	30秒	

4-7. ライセート調製

5-12 週齢のマウスから肝臓，腎臓，網膜，角膜，脳，小腸，精巣，脾臓，肺を摘出し，PBS で洗浄後，組織を buffer A [50 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10 % glycerol，1 x protease inhibitor mixture（Complete，EDTA-free; Roche Diagnostics, Basel，Switzerland)，1 mM PMSF，and 1 mM DTT] に懸濁してホモジェナイザーで破砕し，超音波破砕（10 秒，2 回）を行った。遠心（200 g，3 分，4 ˚C）後の上清をライセートとして用いた。また，P0 マウスの皮膚を PBS に溶解した 5 mg/mL ディスパーゼ 3 mL に浸し, 4 ˚C で 24 時間処理した後, 表皮と真皮に分けて PBS で洗浄し，

それぞれ buffer A に懸濁して同様にライセートを回収した。さらに，初代培養ケラチノサイトは, 培地を除いて PBS で洗浄後, buffer A で細胞を回収し, 超音波破砕（10 秒，2 回）を行った。同様に，遠心（200 g，3 分，4 ˚C）後の上清をライセートとして用いた。

4-8. イムノブロッティング

野生型及び *Aldh3a2* KO マウスの肝臓から調製したライセート（20 μg）を 10 % アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE（レムリ法）により分子量で分離し, Immobilon-P Transfer membrane（Millipore）に定電流（メンブレン 1 cm^2 あたり 2 mA）で, transfer buffer [25 mM Tris，192 mM glycine，20 % CH_3OH] を用いたセミドライ式により転写した。転写したメンブレンを 5 % スキムミルク／TBS-T [20 mM Tris/HCl（pH 7.5），137 mM NaCl，0.05 % Tween 20] に浸して室温で 1 時間振盪させてブロッキングを行い，その後ブロッキング液に希釈した抗 Aldh3a2 ウサギ血清（1/5,000）もしくは 抗カルネキシンウサギポリクローナル抗体 H-70（0.8 mg/mL; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz，CA）に浸して 4˚C で一晩振盪させた。メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄後，ブロッキング液に希釈した HRP-conjugated anti-rabbit IgG F(ab')$_2$ fragment（1/7,500; GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK）に浸して室温で 1 時間振盪させ，TBS-T で 3 回洗浄後，Western Lightning ECL Pro（PerkinElmer Life Sciences，Waltham，MA）もしくは Western Lightning Plus-ECL（PerkinElmer Life Sciences）を用いて発光させ，X 線フィルム（Kodak，Tokyo，Japan）に感光させて検出した。

抗 Aldh3a2 血清の調整は, マウス Aldh3a2 タンパク質の 1-499 アミノ酸に MBP を付加したリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ，アミロースレジン（New England Biolabs，Beverly，MA）を用いて精製したものを抗原として用いた。ウサギ 1 羽あたり計 1 mg の抗原を 4 回に分けて免疫し，血清を回収した。なお，ウサギへの免疫及び血清の回収は，フロンティア研究所に委託して行った。

4-9. *in vitro* FALDH 活性測定

調製したライセート（5-20 μg）を，下記条件にて 37 ˚C で 15-30 分インキュベートし，生成した NADH の蛍光（励起光，356 nm; 蛍光，460 nm）を Infinite M200 monochromator（Tecan, Männedorf, Switzerland）を用いて検出，定量した。

ライセート（5-20 μg）
50 mM Tris/HCl（pH 8.5）
150 mM NaCl
10 % glycerol
0.1 % Triton X-100
500 μM NAD^+
100 μM 基質アルデヒド*

*基質アルデヒドとして，ヘキサデカナール（Wako Pure Chemical Industries），トランス-2-ヘキサデセナール(90)，オクタナール（Wako Pure Chemical Industries）を用いた。

4-10. [^{3}H]DHS ラベル

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスから採取した未分化のケラチノサイトの培地を新しい増殖培地 1 mL に交換し，37 ˚C で 1 時間プレインキュベートした。その後，0.1 μCi の [4,5-^{3}H]DHS（American Radiolabeled Chemical，St. Louis，MO）を加えて 37 ˚C で 4 時間インキュベートして DHS を代謝させた。インキュベート後，培地を除いて 1 mL の PBS で 2 回洗浄し，回収したサンプルを 225 μL ずつ 2 本に分け，一方をアルカリ処理した。アルカリ処理は，サンプル 225 μL に対して，16.9 μL 4 M NaOH，118.1 μL CH_3OH を加えて 37˚C で 1 時間インキュベートして行った。アルカリ処理後，13.5 μL 5 M HCl, 54 μL CH_3OH を加えて中和した。アルカリ処理なしのサンプルでは, 4 M NaOH の代わりに H_2O, 5 M HCl の代わりに 5 M NaCl を加えた。中和後のサンプルに 135 μL $CHCl_3$, 450 μL H_2O を加えて懸濁し, 遠心（2,600 g, 3 min, 室温）後の下層（有機層）を回収した。有機層の一部を液体シンチレーションカウンターによりカウントを測定し，サンプル間のカウントを揃えた。バキュームコンセントレーターを用いて脂質を乾燥させた後，20 μL $CHCl_3$/CH_3OH（2/1，v/v）に懸濁し，TLC on Silica Gel 60 high performance TLC（Merck，Whitestation，NJ）にスポットした後，1-butanol/acetic acid/H_2O（3/1/1，v/v）で展開し，脂質を分離した。展開後の TLC プレートに 2.8 mg/mL 2,5-ジフェニルオキサゾン/トルエンを噴霧し，-80 ˚C で X 線フィルムに 6 日間感光させ，オートラジオグラフィーにより検出した。

4-11. D7-Sph ラベル

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスから採取した未分化のケラチノサイトの培地を新しい増殖培地 1 mL に交換し, 37°C で 1 時間プレインキュベートした後, 1 μL の 1 mM sphingosine-d7（D7-Sph，final 1 μM; Avanti Polar Lipids，Alabaster，AL）を加えて 37 °C で 4 時間インキュベートして D7-Sph を代謝させた。インキュベート後，培地を除いて 1 mL PBS で洗浄後，再度 1 mL PBS に細胞を懸濁して血球計算板で細胞数をカウントし，LC-MS/MS による定量時に補正値として使用した。遠心（400 g，5 分，室温）後，細胞を 200 μL PBS で再度懸濁した後，750 μL $CHCl_3$/CH_3OH/HCl（100/200/1，v/v），250 μL $CHCl_3$，250 μL 1 % KCl を加えて撹拌し，遠心（2,600 g，3 min，室温）後の下層（有機層）を回収してバキュームコンセントレーターによって乾燥させた。乾燥させた脂質を 150 μL $CHCl_3$/CH_3OH（1/2，v/v）に懸濁し，LC-MS/MS 解析に用いた。

4-12. マウス表皮からの脂質抽出

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスの皮膚を PBS に溶解した 5 mg/mL ディスパーゼ 3 mL に浸し，4 °C で 24 時間処理した後，表皮を真皮から分離して PBS で洗浄し，600 μL buffer A にホモジェナイザーを用いて懸濁した。細胞懸濁液に 1 mL buffer A，6 mL $CHCl_3$/CH_3OH（1/2，v/v）を加えて 3 分撹拌し，50 °C で 10 分インキュベートした後，バスソニケーターにより超音波処理を 1 分行った。その後，3 分撹拌した後，2 mL $CHCl_3$，2 mL 1 % KCl を加えてさらに撹拌し，遠心（2,600 g，3 min，室温）後の下層（有機層）を回収した。残った水層に 4 mL $CHCl_3$ を加えて撹拌し，遠心（2,600 g，3 分，室温）後の下層（有機層）を先に回収した有機層と合わせ，バキュームコンセントレーターによって乾燥させた。乾燥させた脂質を 50 μL $CHCl_3$/CH_3OH（1/2，v/v）に懸濁し，LC-MS/MS 解析に用いた。

4-13. LC-MS/MS

LC は長さ 150 mm の逆相カラム AQUITY UPLC BEH C18 column（Waters，Milford，MA）を用いて，流速 0.1 mL/min，45 °C，80 分の条件で行った。移動相は A 液［アセトニトリル/水/メタノール（4/4/2，v/v/v, 0.1 % ギ酸，0.025 % アンモニア）］と B 液［2-プロパノール/メタノール（4/1, v/v, 0.1 % ギ酸, 0.025 % アンモニア）］を Table

2 (p53 参照) に示す比率で混合させた溶媒を用いた。LC により分離した脂質を ESI 法によってイオン化し, 三連四重極型の質量分析装置 Xevo TQ-S (Waters) を用いて MRM 解析によって定量，分析した。MRM 解析では，分子種ごとに特異的な親イオン，娘イオンの質量電荷比を Table 3（p53-57 参照）に示すように設定した。データ解析及び定量は，MassLynx を用いて行った。

4-14. トルイジンブルー染色

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスをメタノールに 5 分間浸し，PBS で洗浄後，0.1 % トルイジンブルー／PBS に 4 ˚C で 24 時間浸した。トルイジンブルー溶液に浸す直前と直後に，マウスを PBS で洗浄し，デジタルカメラで撮影した。

4-15. 経皮水分蒸散量測定

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスの背中に蒸発計 AS-VT100RS (Asahi Biomed, Yokohama，Japan）を密着させ，経皮水分蒸散量（TEWL）を測定した。マウス 1 個体につき 3-5 回 TEWL の測定を行い，その平均値を各個体の TEWL 値とした。

4-16. ヘマトキシリン／エオジン染色

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスを 3.7 % ホルムアルデヒド/生理食塩水によって灌流固定し，皮膚を回収した後，皮膚をカミソリで約 5 mm 角にトリミングし，3.7 % ホルムアルデヒド／PBS に浸して 4 ˚C で 48 時間以上後固定を行った。固定した皮膚を脱水した後，パラフィン包埋し，マイクロトームによって切片を作製した。作製した皮膚切片からパラフィンを除去した後, Tissue-Tek DRS 2000 (Sakura, Torrance, CA）を用いてヘマトキシリン及びエオジンによる染色を行った。なお，固定した皮膚片の脱水からヘマトキシリンとエオジンによる染色までの過程は，株式会社ジェネティックラボに委託した。作製した染色切片を，DFC295 デジタルカラーカメラを備え付けた光学顕微鏡 Leika DM5000B（Leica Microsystems，Wetzlar，Germany）を用いて観察，撮影した。

4-17. 電子顕微鏡観察

野生型及び *Aldh3a2* KO の P0 マウスから皮膚を回収し，カミソリで約 5 mm 角にトリミングした後，5 % グルタールアルデヒド／0.1 M カコジル酸ナトリウム buffer（pH 7.4）に浸して 4 ˚C で 72 時間以上固定を行った。1 % OsO_4／0.05 M カコジル酸ナトリウム buffer（pH 7.4）で 1 時間処理した後，0.5 % RuO_4 で 30 分，次いで 0.1 M カコジル酸ナトリウム buffer（pH 7.4）に一晩浸して後固定を行った。固定した皮膚片をエタノールとプロピレンオキシドにより段階的に脱水し，Epon 812 レジン（TAAB Laboratories，Berkshire，United Kingdom）に包埋した後，70 ˚C で 4 日以上インキュベートした。Leica EM UC7 ultramicrotome（Leica Microsystems）を用いて超薄切切片（70 nm）を作製し，酢酸ウランとクエン酸鉛にて染色した後，CCD カメラを備え付けた JEM-1400 透過型電子顕微鏡（Jeol，Tokyo，Japan）を用いて観察，撮影した。

4-18. [^{3}H]チミジン取り込み

野生型及び *Aldh3a2* KO マウスから採取した未分化ケラチノサイトの培地を新しい増殖培地 1 mL に交換し，37 ˚C で 1 時間プレインキュベートした後，0.2 μCi の [^{3}H] チミジン（2.0 Ci/mmol; PerkinElmer Life Sciences）を加えて 37˚C で 24 時間インキュベートした。培地を回収した後，細胞を PBS で洗浄し，1xSDS sample buffer [62.5 mM Tris/HCl（pH 6.8），2 % SDS，10 % glycerol] を用いて細胞を懸濁して回収した。培地中及び細胞懸濁液中の放射活性を液体シンチレーションカウンター Micro Beta TriLux（PerkinElmer Life Sciences）により測定し，チミジンの細胞内への取り込み率を算出した。はじめに加えたチミジン量と取り込み率から，細胞内への取り込み量を算出した。

Table 1.　本研究において使用したプライマー

Primer	Sequence
TS70	5’- CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC -3’
TS71	5’- GTGAACACAATGCCCTTCCAACTGAG -3’
TS72	5’- TGGAAGCTGCTGCCAAGCATCTGAC -3’
Aldh3a1-F	5’- CGGTGATGCCCATTGTGTGTGTTCG -3’
Aldh3a1-R	5’- TTCTTCATTCCGCAGAGACCTCACC -3’
Aldh3a2-F	5’- TTCTCGTAACAATAAGCTCATCAAACG -3’
Aldh3a2-R	5’- CAGCATCCCCAGCCTTCCTTTGTTG -3’
Aldh3b1-F	5’- GCTGTATGCCTTCTCCAAGAGAAGC -3’
Aldh3b1-R	5’- GCAGCTGCAGCACCTCTCCTCCATGG -3’
Aldh3b2-F	5’- TGAGTTCATCAACCGGCGGGAGAAGC -3’
Aldh3b2-R	5’- GTTGTTGGTTCCAGGGACCATAAGG -3’
Aldh3b3-F	5’- CTTTATGCCTATTCCAACAACGCAG -3’
Aldh3b3-R	5’- GGGTGCAGCTCTCAGAGCCGATAGC -3’
Ki67-F	5’- CCTCAGCTCCTGCCTGTTTGGAAGG -3’
Ki67-R	5’- GTTCCTTTCCAAGGGACTTTCCTGG -3’
Hmox1-F	5’- ATGACACCTGAGGTCAAGCACAGGG -3’
Hmox1-R	5’- TTACATGGCATAAATTCCCACTGCC -3’
Sod1-F	5’- TTAACTGAAGGCCAGCATGGGTTCC -3’
Sod1-R	5’- TCTTTGTACTTTCTTCATTTCCACC -3’
Gclc-F	5’- GAGAACATGAAAGTGGCCCAGAAGC -3’
Gclc-R	5’- GTCCACATCAACTTCCATGTTCTCC -3’
Gclm-F	5’- AGTTGGAGCAGCTGTATCAGTGGGC -3’
Gclm-R	5’- ACGATGACCGAGTACCTCAGCAGCC -3’
ALDH3A1-F	5’- CCTGGCCCTCTACATGTTCTCCAGC -3’
ALDH3A1-R	5’- TGCTGGGTCATCTTGGCCGGGCTCG -3’
ALDH3A2-F	5’- AATGACGTCATTATGCACTTCACGC -3’
ALDH3A2-R	5’- AAGCACAGCGGCTACAATACCCAGG -3’
ALDH3B1-F	5’- GGTCAAGCGGGTGCTGACCCAGACC -3’
ALDH3B1-R	5’- TGTGCAGCTGCAGCCTTGGGCCTCC -3’
Gapdh-F/GAPDH-F	5’- GAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCC -3’
Gapdh-R/GAPDH-R	5’- TGTCATACCAGGAAATGAGCTTGAC -3’

Table 2.　LC-MS/MS 解析の各時間における移動相の A 液/B 液比率

時間	0 分	…	10 分	…	50 分	…	55 分	…	65 分	…	66 分	…	80 分
A/B	95/5	↘	40/60	↘	20/80	↘	0/100	→	0/100	↗	95/5	→	95/5

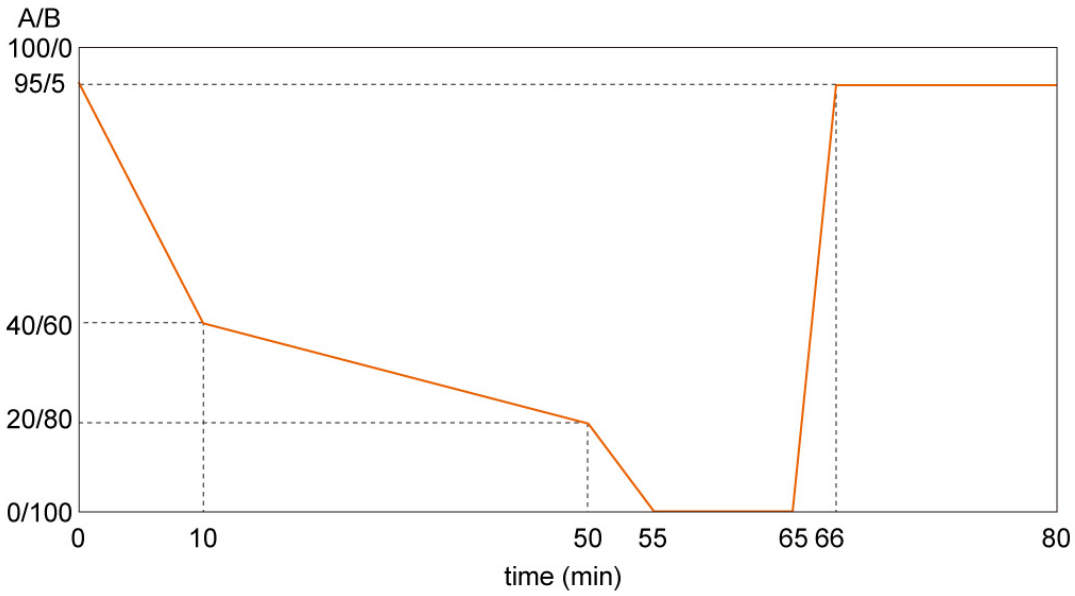


Table 3.　MS/MS 解析における親イオンと娘イオンの m/z 値

セラミド			
FA	親イオン（Q1）		娘イオン（Q3）
	$[M\text{-}H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$	
C16:1	518.2	536.2	264.2
C16:0	520.2	538.2	264.2
C18:1	546.2	564.2	264.2
C18:0	548.2	566.2	264.2
C20:1	574.2	592.2	264.2
C20:0	576.2	594.2	264.2
C22:1	602.2	620.2	264.2
C22:0	604.2	622.2	264.2
C24:1	630.2	648.2	264.2
C24:0	632.2	650.2	264.2
C26:1	658.2	676.2	264.2
C26:0	660.2	678.2	264.2
C28:1	686.2	704.2	264.2
C28:0	688.2	706.2	264.2
C30:1	714.2	732.2	264.2
C30:0*	716.2	734.2	264.2
C32:1	742.2	760.2	264.2
C32:0	744.2	762.2	264.2
C34:1	770.2	788.2	264.2
C34:0	772.2	790.2	264.2
C36:1	798.2	816.2	264.2
C36:0	800.2	818.2	264.2
C38:1	826.2	844.2	264.2

D7-セラミド			
FA	親イオン（Q1）		娘イオン（Q3）
	$[M-H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$	
C16:1	525.2	543.2	271.2
C16:0	527.2	545.2	271.2
C18:1	553.2	571.2	271.2
C18:0	555.2	573.2	271.2
C20:1	581.2	599.2	271.2
C20:0	583.2	601.2	271.2
C22:1	609.2	627.2	271.2
C22:0	611.2	629.2	271.2
C24:1	637.2	655.2	271.2
C24:0	639.2	657.2	271.2
C26:1	665.2	683.2	271.2
C26:0	667.2	685.2	271.2

*Cer (C30:0; Matreya, State College, USA）を外部標準として用いた

EOS			
FA	親イオン（Q1）		娘イオン（Q3）
	$[M-H_2O+H]^+$	$[M+H]^+$	
C26:1	936.9	954.9	264.2
C26:0	938.9	956.9	264.2
C28:1	964.9	982.9	264.2
C28:0	966.9	984.9	264.2
C30:1	992.9	1010.9	264.2
C30:0*	994.9	1012.9	264.2
C32:1	1020.9	1038.9	264.2
C32:0	1022.9	1040.9	264.2
C34:1	1048.9	1066.9	264.2
C34:0	1050.9	1068.9	264.2
C36:1	1076.9	1094.9	264.2
C36:0	1078.9	1096.9	264.2
C38:1	1104.9	1122.9	264.2
C38:0	1106.9	1124.9	264.2

*EOS (C30:0; Matreya）を外部標準として用いた

PlsE		
d7-Alcohol/FA	親イオン（Q1）	娘イオン(Q3)
d7-C16:1/C16:1	679.34	253
d7-C16:0/C16:1	681.34	253
d7-C16:1/C16:0	681.34	255
d7-C16:0/C16:0	683.34	255
d7-C16:1/C18:1	707.34	281
d7-C16:0/C18:1	709.34	281
d7-C16:1/C18:0	709.34	283
d7-C16:0/C18:0	711.34	283
C18:1/C18:1*	728.34	281

*PlsE（C18:1/C18:1; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL）を外部標準として用いた

PlsC		
d7-Alcohol/FA	親イオン（Q1）	娘イオン（Q3）
d7-C16:1/C16:1	767.38	253
d7-C16:0/C16:1	769.38	253
d7-C16:1/C16:0	769.38	255
d7-C16:0/C16:0	771.38	255
d7-C16:1/C18:1	795.38	281
d7-C16:0/C18:1	797.38	281
d7-C16:1/C18:0	797.38	283
d7-C16:0/C18:0	799.38	283
C18:1/C18:1*	816.38	281

*PlsC（C18:1/C18:1; Avanti Polar Lipids）を外部標準として用いた

PE		
FA/FA	親イオン（Q1）	娘イオン(Q3)
C16:1/C16:1	686.45	253
C16:0/C16:1	688.45	255
C16:0/C16:0	690.45	255
C16:1/C18:1	714.45	253
C16:1/C18:0	716.45	253
C16:0/C18:1	716.45	255
C16:0/C18:0	718.45	255
C18:1/C18:1*	742.45	281
C18:1/C18:0	744.45	283
C18:0/C18:0	746.45	283

D7-PE		
d7-FA/FA	親イオン（Q1）	娘イオン（Q3）
d7-C16:0/C16:1	695.45	262
d7-C16:0/C16:0	697.45	262
d7-C16:0/C18:2	721.45	262
d7-C16:0/C18:1	723.45	262
d7-C16:0/C18:0	725.45	262
d7-C16:0/C20:5	743.45	262
d7-C16:0/C20:4	745.45	262
d7-C16:0/C22:6	769.45	262

*PE (C18:1/C18:1; Avanti Polar Lipids) を外部標準として用いた

PC		
FA/FA	親イオン（Q1）	娘イオン（Q3）
C16:1/C16:1	774.4	253
C16:0/C16:1	776.4	255
C16:0/C16:0	778.4	255
C16:1/C18:1	802.4	253
C16:1/C18:0	804.4	253
C16:0/C18:1*	804.4	255
C16:0/C18:0	806.4	255
C18:1/C18:1	830.4	281
C18:1/C18:0	832.4	283
C18:0/C18:0	834.4	283

D7-PC		
FA1/FA2	親イオン（Q1）	娘イオン（Q3）
d7-C16:0/C16:1	783.4	262
d7-C16:0/C16:0	785.4	262
d7-C16:0/C18:2	809.4	262
d7-C16:0/C18:1	811.4	262
d7-C16:0/C18:0	813.4	262
d7-C16:0/C20:5	831.4	262
d7-C16:0/C20:4	833.4	262
d7-C16:0/C22:6	857.4	262

*PC (C16:0/C18:1; Avanti Polar Lipids) を外部標準として用いた

5. 参考文献

1. Irvine, A. D., McLean, W. H., and Leung, D. Y. (2011) Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* **365**, 1315-1327
2. Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M., and Hidano, A. (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* **96**, 523-526
3. De, D., and Handa, S. (2012) Filaggrin mutations and the skin. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **78**, 545-551
4. Presland, R. B., Boggess, D., Lewis, S. P., Hull, C., Fleckman, P., and Sundberg, J. P. (2000) Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol* **115**, 1072-1081
5. Traupe, H., Fischer, J., and Oji, V. (2014) Nonsyndromic types of ichthyoses - an update. *J Dtsch Dermatol Ges* **12**, 109-121
6. Akiyama, M., Sugiyama-Nakagiri, Y., Sakai, K., McMillan, J. R., Goto, M., Arita, K., Tsuji-Abe, Y., Tabata, N., Matsuoka, K., Sasaki, R., Sawamura, D., and Shimizu, H. (2005) Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *J Clin Invest* **115**, 1777-1784
7. Feingold, K. R., and Elias, P. M. (2014) Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 280-294
8. Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **91**, 784-790
9. Uchida, Y., and Holleran, W. M. (2008) Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J Dermatol Sci* **51**, 77-87
10. Kihara, A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem* **152**, 387-395
11. Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., van der Hoeven, F., Imgrund, S., Kirsch, J., Nickel, W., Willecke, K., Riezman, H., Grone, H. J., and Sandhoff, R. (2012) Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet* **21**, 586-608
12. Ohno, Y., Nakamichi, S., Ohkuni, A., Kamiyama, N., Naoe, A., Tsujimura, H., Yokose, U., Sugiura, K., Ishikawa, J., Akiyama, M., and Kihara, A. (2015) Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for

skin permeability barrier formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7707-7712

13. Maier, H., Meixner, M., Hartmann, D., Sandhoff, R., Wang-Eckhardt, L., Zoller, I., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2011) Normal fur development and sebum production depends on fatty acid 2-hydroxylase expression in sebaceous glands. *J Biol Chem* **286**, 25922-25934
14. Farwanah, H., Wohlrab, J., Neubert, R. H., and Raith, K. (2005) Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS. *Anal Bioanal Chem* **383**, 632-637
15. Masukawa, Y., Narita, H., Shimizu, E., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y., Kitahara, T., Takema, Y., and Kita, K. (2008) Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* **49**, 1466-1476
16. t'Kindt, R., Jorge, L., Dumont, E., Couturon, P., David, F., Sandra, P., and Sandra, K. (2012) Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **84**, 403-411
17. Sassa, T., Ohno, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nishioka, C., Kashiwagi, T., Hirayama, T., Akiyama, M., Taguchi, R., Shimizu, H., Itohara, S., and Kihara, A. (2013) Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking elovl1, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol* **33**, 2787-2796
18. Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zerfas, P., Hoffmann, V., Ding, B. C., Proia, R. L., and Deng, C. X. (2007) Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int J Biol Sci* **3**, 120-128
19. Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., and Kihara, A. (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18439-18444
20. Munoz-Garcia, A., Thomas, C. P., Keeney, D. S., Zheng, Y., and Brash, A. R. (2014) The importance of the lipoxygenase-hepoxilin pathway in the mammalian epidermal barrier. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 401-408
21. Zheng, Y., Yin, H., Boeglin, W. E., Elias, P. M., Crumrine, D., Beier, D. R., and Brash, A. R. (2011) Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J Biol Chem* **286**, 24046-24056
22. Krieg, P., and Furstenberger, G. (2014) The role of lipoxygenases in epidermis.

Biochim Biophys Acta **1841**, 390-400

23. Aldahmesh, M. A., Mohamed, J. Y., Alkuraya, H. S., Verma, I. C., Puri, R. D., Alaiya, A. A., Rizzo, W. B., and Alkuraya, F. S. (2011) Recessive mutations in ELOVL4 cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. *Am J Hum Genet* **89**, 745-750
24. Eckl, K. M., Tidhar, R., Thiele, H., Oji, V., Hausser, I., Brodesser, S., Preil, M. L., Onal-Akan, A., Stock, F., Muller, D., Becker, K., Casper, R., Nurnberg, G., Altmuller, J., Nurnberg, P., Traupe, H., Futerman, A. H., and Hennies, H. C. (2013) Impaired epidermal ceramide synthesis causes autosomal recessive congenital ichthyosis and reveals the importance of ceramide acyl chain length. *J Invest Dermatol* **133**, 2202-2211
25. Russell, L. J., DiGiovanna, J. J., Rogers, G. R., Steinert, P. M., Hashem, N., Compton, J. G., and Bale, S. J. (1995) Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat Genet* **9**, 279-283
26. Jobard, F., Lefevre, C., Karaduman, A., Blanchet-Bardon, C., Emre, S., Weissenbach, J., Ozguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J. F., and Fischer, J. (2002) Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum Mol Genet* **11**, 107-113
27. Rizzo, W. B., and Craft, D. A. (1991) Sjogren-Larsson syndrome. Deficient activity of the fatty aldehyde dehydrogenase component of fatty alcohol:NAD^+ oxidoreductase in cultured fibroblasts. *J Clin Invest* **88**, 1643-1648
28. Rizzo, W. B. (2007) Sjögren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* **90**, 1-9
29. Bhallil, S., Chraibi, F., Andalloussi, I. B., and Tahri, H. (2012) Optical coherence tomography aspect of crystalline macular dystrophy in Sjögren-Larsson syndrome. *Int Ophthalmol* **32**, 495-498
30. Rizzo, W. B., and Carney, G. (2005) Sjögren-Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). *Hum Mutat* **26**, 1-10
31. Hooft, C., Kriekemans, J., van Acker, K., Devos, E., Traen, S., and Verdonk, G. (1967) Sjögren-Larsson syndrome with exudative enteropathy. Influence of medium-chain triclycerides on the symptomatology. *Helv Paediatr Acta* **22**, 447-458
32. Rizzo, W. B. (2011) The role of fatty aldehyde dehydrogenase in epidermal structure and function. *Dermatoendocrinol* **3**, 91-99

33. Rizzo, W. B. (2014) Fatty aldehyde and fatty alcohol metabolism: review and importance for epidermal structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 377-389

34. Ito, M., Oguro, K., and Sato, Y. (1991) Ultrastructural study of the skin in Sjögren-Larsson syndrome. *Arch Dermatol Res* **283**, 141-148

35. Rizzo, W. B., S'Aulis, D., Jennings, M. A., Crumrine, D. A., Williams, M. L., and Elias, P. M. (2010) Ichthyosis in Sjögren-Larsson syndrome reflects defective barrier function due to abnormal lamellar body structure and secretion. *Arch Dermatol Res* **302**, 443-451

36. Jagell, S., and Liden, S. (1982) Ichthyosis in the Sjögren-Larsson syndrome. *Clin Genet* **21**, 243-252

37. Haug, S., and Braun-Falco, M. (2006) Restoration of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency in Sjögren-Larsson syndrome. *Gene Ther* **13**, 1021-1026

38. Nakajima, K., Sano, S., Uchida, Y., Akiyama, M., Morita, Y., and Shimizu, H. (2011) Altered lipid profiles in the stratum corneum of Sjögren-Larsson syndrome. *J Dermatol Sci* **63**, 64-66

39. Willemsen, M. A., Van Der Graaf, M., Van Der Knaap, M. S., Heerschap, A., Van Domburg, P. H., Gabreels, F. J., and Rotteveel, J. J. (2004) MR imaging and proton MR spectroscopic studies in Sjögren-Larsson syndrome: characterization of the leukoencephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* **25**, 649-657

40. Willemsen, M. A., Rotteveel, J. J., de Jong, J. G., Wanders, R. J., L, I. J., Hoffmann, G. F., and Mayatepek, E. (2001) Defective metabolism of leukotriene B_4 in the Sjögren-Larsson syndrome. *J Neurol Sci* **183**, 61-67

41. Willemsen, M. A., L, I. J., Steijlen, P. M., Rotteveel, J. J., de Jong, J. G., van Domburg, P. H., Mayatepek, E., Gabreels, F. J., and Wanders, R. J. (2001) Clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of 19 patients with the Sjögren-Larsson syndrome. *Brain* **124**, 1426-1437

42. van der Veen, R. L., Fuijkschot, J., Willemsen, M. A., Cruysberg, J. R., Berendschot, T. T., and Theelen, T. (2010) Patients with Sjögren-Larsson syndrome lack macular pigment. *Ophthalmology* **117**, 966-971

43. Aslam, S. A., and Sheth, H. G. (2007) Ocular features of Sjögren-Larsson syndrome. *Clin Experiment Ophthalmol* **35**, 98-99

44. Jackson, B., Brocker, C., Thompson, D. C., Black, W., Vasiliou, K., Nebert, D. W., and Vasiliou, V. (2011) Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* **5**, 283-303

45. Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D., and Vasiliou, V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 697-720

46. Fares-Taie, L., Gerber, S., Chassaing, N., Clayton-Smith, J., Hanein, S., Silva, E., Serey, M., Serre, V., Gerard, X., Baumann, C., Plessis, G., Demeer, B., Bretillon, L., Bole, C., Nitschke, P., Munnich, A., Lyonnet, S., Calvas, P., Kaplan, J., Ragge, N., and Rozet, J. M. (2013) ALDH1A3 mutations cause recessive anophthalmia and microphthalmia. *Am J Hum Genet* **92**, 265-270

47. Geraghty, M. T., Vaughn, D., Nicholson, A. J., Lin, W. W., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Flynn, M. P., Valle, D., and Hu, C. A. (1998) Mutations in the Delta1-pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase gene cause type II hyperprolinemia. *Hum Mol Genet* **7**, 1411-1415

48. Mills, P. B., Struys, E., Jakobs, C., Plecko, B., Baxter, P., Baumgartner, M., Willemsen, M. A., Omran, H., Tacke, U., Uhlenberg, B., Weschke, B., and Clayton, P. T. (2006) Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nat Med* **12**, 307-309

49. Akaboshi, S., Hogema, B. M., Novelletto, A., Malaspina, P., Salomons, G. S., Maropoulos, G. D., Jakobs, C., Grompe, M., and Gibson, K. M. (2003) Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency. *Hum Mutat* **22**, 442-450

50. Sass, J. O., Walter, M., Shield, J. P., Atherton, A. M., Garg, U., Scott, D., Woods, C. G., and Smith, L. D. (2012) 3-Hydroxyisobutyrate aciduria and mutations in the ALDH6A1 gene coding for methylmalonate semialdehyde dehydrogenase. *J Inherit Metab Dis* **35**, 437-442

51. Baumgartner, M. R., Hu, C. A., Almashanu, S., Steel, G., Obie, C., Aral, B., Rabier, D., Kamoun, P., Saudubray, J. M., and Valle, D. (2000) Hyperammonemia with reduced ornithine, citrulline, arginine and proline: a new inborn error caused by a mutation in the gene encoding delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase. *Hum Mol Genet* **9**, 2853-2858

52. Kelson, T. L., Secor McVoy, J. R., and Rizzo, W. B. (1997) Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification, and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* **1335**, 99-110

53. Kitamura, T., Takagi, S., Naganuma, T., and Kihara, A. (2015) Mouse aldehyde dehydrogenase ALDH3B2 is localized to lipid droplets via two C-terminal

tryptophan residues and lipid modification. *Biochem J* **465**, 79-87

54. Ashibe, B., Hirai, T., Higashi, K., Sekimizu, K., and Motojima, K. (2007) Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing. *J Biol Chem* **282**, 20763-20773
55. Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R. A., and Kihara, A. (2012) The Sjögren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway. *Mol Cell* **46**, 461-471
56. Rizzo, W. B., Heinz, E., Simon, M., and Craft, D. A. (2000) Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjögren-Larsson syndrome. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 1-9
57. van den Brink, D. M., van Miert, J. N., Dacremont, G., Rontani, J. F., Jansen, G. A., and Wanders, R. J. (2004) Identification of fatty aldehyde dehydrogenase in the breakdown of phytol to phytanic acid. *Mol Genet Metab* **82**, 33-37
58. Verhoeven, N. M., Jakobs, C., Carney, G., Somers, M. P., Wanders, R. J., and Rizzo, W. B. (1998) Involvement of microsomal fatty aldehyde dehydrogenase in the alpha-oxidation of phytanic acid. *FEBS Lett* **429**, 225-228
59. Kihara, A. (2014) Sphingosine 1-phosphate is a key metabolite linking sphingolipids to glycerophospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1841**, 766-772
60. Ohkuni, A., Ohno, Y., and Kihara, A. (2013) Identification of acyl-CoA synthetases involved in the mammalian sphingosine 1-phosphate metabolic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **442**, 195-201
61. Wakashima, T., Abe, K., and Kihara, A. (2014) Dual functions of the trans-2-enoyl-CoA reductase TER in the sphingosine 1-phosphate metabolic pathway and in fatty acid elongation. *J Biol Chem* **289**, 24736-24748
62. Bektas, M., Allende, M. L., Lee, B. G., Chen, W., Amar, M. J., Remaley, A. T., Saba, J. D., and Proia, R. L. (2010) Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J Biol Chem* **285**, 10880-10889
63. Meloni, I., Muscettola, M., Raynaud, M., Longo, I., Bruttini, M., Moizard, M. P., Gomot, M., Chelly, J., des Portes, V., Fryns, J. P., Ropers, H. H., Magi, B., Bellan, C., Volpi, N., Yntema, H. G., Lewis, S. E., Schaffer, J. E., and Renieri, A. (2002) FACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nat Genet* **30**, 436-440

64. Caliskan, M., Chong, J. X., Uricchio, L., Anderson, R., Chen, P., Sougnez, C., Garimella, K., Gabriel, S. B., dePristo, M. A., Shakir, K., Matern, D., Das, S., Waggoner, D., Nicolae, D. L., and Ober, C. (2011) Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13. *Hum Mol Genet* **20**, 1285-1289

65. Willemsen, M. A., Rotteveel, J. J., Steijlen, P. M., Heerschap, A., and Mayatepek, E. (2000) 5-Lipoxygenase inhibition: a new treatment strategy for Sjögren-Larsson syndrome. *Neuropediatrics* **31**, 1-3

66. Mihalik, S. J., Morrell, J. C., Kim, D., Sacksteder, K. A., Watkins, P. A., and Gould, S. J. (1997) Identification of PAHX, a Refsum disease gene. *Nat Genet* **17**, 185-189

67. Braverman, N. E., and Moser, A. B. (2012) Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1442-1452

68. Catala, A. (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* **157**, 1-11

69. Wallner, S., and Schmitz, G. (2011) Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids* **164**, 573-589

70. Kitamura, T., Naganuma, T., Abe, K., Nakahara, K., Ohno, Y., and Kihara, A. (2013) Substrate specificity, plasma membrane localization, and lipid modification of the aldehyde dehydrogenase ALDH3B1. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1395-1401

71. Estey, T., Piatigorsky, J., Lassen, N., and Vasiliou, V. (2007) ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Exp Eye Res* **84**, 3-12

72. Lin, Z., Carney, G., and Rizzo, W. B. (2000) Genomic organization, expression, and alternate splicing of the mouse fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Mol Genet Metab* **71**, 496-505

73. Marchitti, S. A., Brocker, C., Orlicky, D. J., and Vasiliou, V. (2010) Molecular characterization, expression analysis, and role of ALDH3B1 in the cellular protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **49**, 1432-1443

74. Judge, M. R., Lake, B. D., Smith, V. V., Besley, G. T., and Harper, J. I. (1990) Depletion of alcohol (hexanol) dehydrogenase activity in the epidermis and jejunal mucosa in Sjogren-Larsson syndrome. *J Invest Dermatol* **95**, 632-634

75. Grall, A., Guaguere, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., Hitte, C., Le Gallo, M., Derbois, C., Kim, G. J., Lagoutte, L., Degorce-Rubiales, F., Radner, F. P., Thomas, A., Kury, S., Bensignor, E., Fontaine, J., Pin, D., Zimmermann, R., Zechner, R., Lathrop, M., Galibert, F., Andre, C., and Fischer, J. (2012) PNPLA1 mutations

cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat Genet* **44**, 140-147

76. Hernandez-Quintero, M., Kuri-Harcuch, W., Gonzalez Robles, A., and Castro-Munozledo, F. (2006) Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res* **325**, 77-90
77. Li, D., Zhang, W., Liu, Y., Haneline, L. S., and Shou, W. (2012) Lack of plakoglobin in epidermis leads to keratoderma. *J Biol Chem* **287**, 10435-10443
78. White, F. H., and Gohari, K. (1984) Alterations in the volume of the intercellular space between epithelial cells of the hamster cheek-pouch: quantitative studies of normal and carcinogen-treated tissues. *J Oral Pathol* **13**, 244-254
79. George, J., and Shukla, Y. (2013) Emptying of Intracellular Calcium Pool and Oxidative Stress Imbalance Are Associated with the Glyphosate-Induced Proliferation in Human Skin Keratinocytes HaCaT Cells. *ISRN Dermatol* **2013**, 825180
80. Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **16**, 123-140
81. Rizzo, W. B., and Craft, D. A. (2000) Sjögren-Larsson syndrome: accumulation of free fatty alcohols in cultured fibroblasts and plasma. *J Lipid Res* **41**, 1077-1081
82. Rizzo, W. B., Craft, D. A., Somer, T., Carney, G., Trafrova, J., and Simon, M. (2008) Abnormal fatty alcohol metabolism in cultured keratinocytes from patients with Sjögren-Larsson syndrome. *J Lipid Res* **49**, 410-419
83. James, P. F., and Zoeller, R. A. (1997) Isolation of animal cell mutants defective in long-chain fatty aldehyde dehydrogenase. Sensitivity to fatty aldehydes and Schiff's base modification of phospholipids: implications for Sjögren-Larsson syndrome. *J Biol Chem* **272**, 23532-23539
84. Dreger, H., Westphal, K., Wilck, N., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K., and Meiners, S. (2010) Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovasc Res* **85**, 395-403
85. Mitsuishi, Y., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2012) The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol* **2**, 200
86. Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**,

7130-7139

87. Abiko, Y., Mizokawa, M., and Kumagai, Y. (2014) Activation of the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/NF-E2-related factor 2 (Nrf2) pathway through covalent modification of the 2-alkenal group of aliphatic electrophiles in Coriandrum sativum L. *J Agric Food Chem* **62**, 10936-10944

88. Schafer, M., Farwanah, H., Willrodt, A. H., Huebner, A. J., Sandhoff, K., Roop, D., Hohl, D., Bloch, W., and Werner, S. (2012) Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol Med* **4**, 364-379

89. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D. R., Harada, T., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* **35**, 238-245

90. Kariya, Y., Kihara, A., Ikeda, M., Kikuchi, F., Nakamura, S., Hashimoto, S., Choi, C. H., Lee, Y. M., and Igarashi, Y. (2005) Products by the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase pathway but not S1P stimulate mitogenesis. *Genes Cells* **10**, 605-615

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始御指導，御鞭撻を賜りました，北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室 木原章雄教授に深謝申し上げます。木原章雄教授には，充実した環境にて研究させて頂いたのみならず，実験手法や研究戦略，論理的な考え方，プレゼンテーション，並びに論文執筆等，研究全般にわたり懇切丁寧に御指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

また，本研究を進めるにあたり，懇切な御指導，的確な御助言をくださいました，北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室 佐々貴之准教授，同研究室 小原圭介助教，同研究室 大野祐介助教に，厚く御礼申し上げます。佐々貴之准教授には，本論文の審査もして頂きました。併せて御礼申し上げます。

本論文を御精読，審査して頂き，有益な御助言を頂きました，北海道大学大学院薬学研究院 薬物動態解析学研究室 菅原満教授，並びに同大学院 臨床薬剤学研究室 小林正紀准教授に深く感謝申し上げます。

本研究中の電子顕微鏡観察を行うにあたり，多大な御協力，有益な御助言を頂きました，北海道大学大学院医学研究科 皮膚科第 1 研究室 鈴木翔多朗氏に，心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり，日常の議論を通じて多くの有益な知識や示唆を頂きました，生化学研究室の皆様に深く感謝致します。

本大学入学から博士課程修了までの 10 年間，勉学及び研究環境を整備してくださいました，北海道大学職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に，これまで私を支え，励まし続けてくださいました家族，友人に，心より感謝致します。