



## 成果の概要

医学研究科 助教 岡野純子

皮膚は、生体を外界から遮断、保護することにより体内の恒常性維持を可能にする重要な器官である。皮膚の層構造は複雑で、厳密に制御された胎生器の皮膚組織発生により形成され、毛包や乳腺等の付属器は上皮-間葉相互作用によって発生する。

ビタミン A 誘導体の一つであるレチノイン酸(retinoic acid: RA) は、正常発生に不可欠である一方、RA 過剰状態は胎児に催奇形性を及ぼし、ヒトおよび実験動物共通に皮膚・毛髪の異常をはじめとした様々な先天異常を誘発する。

本研究ではレチノイン酸分解酵素 Cyp26b1 を欠損させた遺伝子改変マウス(以下 Cyp26b1 ノックアウトマウスと呼ぶ)を用いて、皮膚発生異常のメカニズムの解析を行っている。同マウスは内因的に遺伝子を欠損させることで、恒常的に RA 過剰状態が持続されることにより、ヒトの RA 過剰状態による先天異常の症例と極めて類似した表現型が得られる。胎生 18.5 日の発生後期にて、Cyp26b1 ノックアウトマウスでは組織学的には表皮の肥厚がみられ、毛包は「毛包原基」と呼ばれる極めて未熟な状態(正常マウスでは胎生 15.5 日頃で観察される)で発生が停止しているのが観察された。

次にバリア機能の解析を行った。バリア機能は外界からの様々な病原菌等の進入を防ぐとともに体内環境を恒常的に保つため必要不可欠であり、マウスでは胎生 16.5 日から背部を始めとして腹部に向かって徐々に形成され、胎生 18.5 日の出生前には完全にその形成を終える。しかし、Cyp26b1 ノックアウトマウスでは出生直前でも尾の遠位一部を除き全くバリアが形成されていなかった。体内水分量を測定したところ、Cyp26b1 ノックアウトマウスでは正常マウスと比べ有意に減少していた。Cyp26b1 ノックアウトマウスは出生と同時に口蓋裂のため致死となるが、バリア機能欠落による脱水症状もその死亡を早めていると考えられた。

また、角化層最上層は「コーニファイドエンベロップ」(以下 CE : cornified envelope) と呼ばれる表皮最下層の顆粒細胞から分化してきた最終構造物がみられる。これは分化に際し、脱核しオルガネラも分解された皮膚細胞の最終分化物である。ヒトでは CE の形成異常が葉状魚鱗癬、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症等の重症皮膚先天異常疾患の発症に関わることが知られている。出生直前

のCyp26b1ノックアウトマウスのCEを採取したところ、数は有意に正常マウスと比べ減少していた。さらに正常マウスのCEの80%以上を占める「成熟型CE」は全体の10%で、残り90%は脆弱な、不完全なCEであった。これをアミノ酸解析したところ、正常マウスと比べグリシン、セリンが明らかにCyp26b1ノックアウトマウスでは低下していた。グリシン、セリンはCEの主要構成蛋白であるロリクリンを主に構成するアミノ酸である。ロリクリンの免疫染色を行ったところ、Cyp26b1ノックアウトマウスの表皮では有棘層、顆粒層でロリクリンの異常貯留がみられた。これは本来であればCEの裏打ちに使用されるロリクリンがCyp26b1ノックアウトマウスではCE内部に組み込まれないため、CEより下層である有棘層、顆粒層に停滞しているか、ネガティブフィードバック機構のためにロリクリンの生成が刺激されていると考えられた。また、他のCE前駆蛋白であるフィラグリン、インボルクリンの免疫染色を行ったところ、ロリクリンと同様の結果を得た。これは先の仮説を支持するものである。したがって更に微細構造を解析するために、現在電子顕微鏡を用いた解析を行っている。

Cyp26b1の(機能する)抗体はまだ存在しないため、皮膚発生におけるCyp26b1の発現パターンは不明である。このため、申請者はCyp26b1のタンパク配列を解析し、特異性の高い(Cyp26ファミリーにはCyp26b1の他Cyp26a1, Cyp26c1が存在する)と考えられる抗原を認識する抗体をニワトリにて作成した。ニワトリを用いた抗体作成は6ヶ月かかるため、最近抗体ができあがった。これが本当に解析に使える、すなわち抗原を認識する抗体であるかを調べている最中である。

Cyp26b1ノックアウトマウスは出生直後に死亡するため、以降の解析が不可能である。しかし、出生直前では発生が停止していた毛包が出生以降どうなるのか、バリア機能の欠落は改善が見られるのか、それとも代償機能としてしばしばヒトでは乾癬に見られるように角化細胞の異常増殖が起こるのかは大変興味のあるところである。この問題を解決するために、現在ヌードマウスにCyp26b1ノックアウトマウスの皮膚を移植する実験を進めている。米国国立衛生研究所はこの種の動物実験は独自のプロトコール提出が義務づけられており、許可が出ないと実験を施行することはできない。現在許可待ちの状況である。

皮膚発生におけるRAシグナリングの役割の解析はこれまでにほとんど例がない。しかし、ヒトにおいてもRA過剰による胎児の皮膚発生異常が報告されていることから、以上の実験が遂行できれば発生学のみならず先天奇形学、小児科

学及び皮膚科学に大きく貢献することが期待できる。また、正常および異常皮膚発生の分子メカニズムの解析は、米国をはじめ各国で盛んに研究されているが、我が国では極めて少ない状況を考えると、帰国以降、京都大学の研究室にその成果を還元することが十分可能であり、貴財団の意図に叶ったものであると確信している。