

# 上皮型脂肪酸結合タンパク遺伝子欠損マウスにおける表皮水バリアー機能の変化

東北大学大学院 医学系研究科細胞生物学講座 細胞組織学分野

大和田 祐二

We have generated mutant mice for epidermal type fatty acid binding protein (E-FABP) by the gene targeting technique and examined in detail the phenotype. In spite of lack in the expression of E-FABP mRNA and its protein in the skin and other tissues of the mutant mice, the animals appeared normal in gross and histological examination. Northern blot analysis of other FABPs revealed a distinct elevated gene expression of heart-type FABP (H-FABP) in the skin of the homozygous mice. In analyses of the skin, differences were not observed in contents of major fatty acids, electron microscopic appearances as well as inflammatory responses in ear skin between the mutant and wild type mice. Basal transepidermal water loss (TEWL) of homozygous mice was lower as compared with that of the wild mice. When acetone was applied to the skin for disruption of the water permeability barrier, the recovery in TEWL was delayed, despite maximum TEWL upon acetone treatment was similar between the homozygous and wild type mice in terms of the size and time course. The molecular mechanism by which E-FABP contributes to the water barrier function of the skin remains to be elucidated.

## 1 緒言

表皮角層の細胞間脂質（脂肪酸・セラミド・コレステロール）は、表皮の保湿（water barrier function: WBF）に深く関与することが知られている。これらの細胞間脂質は、表皮ケラチンで合成される層板小体（lamellar body）の形で細胞間隙に分泌され、主に表皮顆粒層の表面に分布する脂質層を形成する<sup>1) 2) 3)</sup>。

脂肪酸結合蛋白（fatty acid binding protein: FABP）は、これまでにげっ歯類で11種類のアイソフォームが同定されている。FABPは、脂肪酸、胆汁酸、レチノイドなどに結合能を示す細胞内低分子タンパク（14-15kDa）であり、細胞機能としては、脂肪酸の細胞内担体として脂肪酸の細胞内取り込み、細胞内貯蔵、核の脂肪酸受容体への情報伝達制御、さらにはセラミドやコレステロールなどの代謝制御に関与することが示唆されている<sup>4) 5)</sup>。このうち上皮型脂肪酸結合タンパク（epidermal-type FABP: E-FABP）は、表皮のみならず脳、肺、消化管、眼球、胸腺などに広く発現することがこれまでの我々の発現解析結果から明らかとなっている<sup>6) 7) 8) 9)</sup>。今回の解析では、E-FABPの表皮における生理機能を明らかにするために、我々が樹立したE-FABP遺伝子欠損マウス（E-FABPマウス）の皮膚における表現型を種々の観点から検討を加えた。WBFの測定からは、野生型に比べて著明なtransepidermal water loss (TEWL)の低下が観察された。また表皮アセトン処理後の

TEWLの回復が野生型に比して遅延していた。皮膚の超微形態像、構成脂肪酸の測定結果、アラキドン酸に対する炎症反応には野生型と比して大きな差異を認めなかった。本研究結果から、E-FABP分子の表皮WBFへの関与が示唆された。

## 2 実験

### 2.1 E-FABPマウスの作成

Fig. 1にマウスE-FABP遺伝子の構造と、E-FABP遺伝子ターゲティングに用いたベクターおよびrecombination後の変異遺伝子の構造を示す。embryonic stem cell (ES cell)にターゲティングベクターを遺伝子導入後、陽性ESクローンをサザンブロット法にてスクリーニングした。遺伝子組換えES cellをマウスblast cystに注入し、これを偽妊娠マウスの子宮に注入した。得られたオスキメラマウスをメスC57B6マウスと交配し、得られたマウスの遺伝子型を確認することによりヘテロ接合型マウスを得た。雌雄ヘテロマウスの交配により得られたマウスをPCR法およびサザンブロット法により遺伝子型を確認した。本研究で使用した野生型およびE-FABPノックアウトマウスはこの雌雄ヘテロマウスの交配により得られたものである。

### 2.2 サザンブロット、ノザンブロット、ウェスタンブロット

野生型、ヘテロ接合型、ホモ接合型マウスの皮膚を採取し、genomic DNA、total RNAおよびタンパクを従って抽出し、それぞれ定法に従って解析した（Fig.1b）。使用したプローブおよび特異抗体の詳細は、発表論文の中で記載済みである<sup>10)</sup>。

### 2.3 形態学的解析

野生型およびE-FABPマウスの背部皮膚を4%パラホルムアルデヒドにて固定し、凍結切片およびパラフィン切



Altered water barrier function in epidermal-type fatty acid binding protein deficient mice.

Yuji Owada, MD, PhD

Division of Histology, Department of Cell Biology, Graduate School of Medical Science, Tohoku University

片を作成した。パラフィン切片は、定法に従ってE-FABP特異抗体による免疫組織化学染色に付し顕微鏡観察を行った。凍結切片はエボン包埋後超薄切片を作成し、電子顕微鏡観察を施行した。

## 2.4 表皮 WBF の測定

ヘテロマウスの交配により得られたメス生後10週齢、野生型マウスおよびE-FABP ノックアウトマウスを使用した。transepidermal water loss (TEWL) の測定は、evaporimeter (ServoMed, Stockholm, Sweden) を用いてマウス背部の剃毛した皮膚で施行した。表皮脂質バリアー除去前後の WBF の相違を評価するために、アセトンを綿球に浸して2分間皮膚に暴露し、暴露前と暴露後30分、2、4、12、36、48、96時間後に測定を施行した。

## 2.5 脂肪酸成分測定

野生型およびE-FABP マウスの背部皮膚をサンプリングし、クロロホルム・メタノール溶液にて脂質を抽出後、測

定はガスクロマトグラフィー (Hewlett-Packard Model 5890 gas chromatograph, Avondal, PA, USA) を用いて施行した。

## 2.6 Standard infirmation assay

生後10週齢の野生型およびE-FABP マウスを使用した。マウス耳介皮膚にアラキドン酸溶液 (1 mg/10ul) を塗布し、塗布1時間後に microruler (Mitsutoyo, Kasugai, Japan) を用いて耳介皮膚の厚さを測定した。

## 3 結果

野生型、ヘテロ型、E-FABP マウスの皮膚におけるサザン、ノザン、ウェスタンプロットの結果をFig1bに示す。ヘテロ型ではE-FABP mRNA およびタンパクの発現は野生型に比べて50%に減少していた。E-FABP マウス皮膚ではmRNA、タンパクの発現とも完全に消失していた (Fig. 1)。

E-FABP マウスは、肉眼的観察および皮膚を含めた各組織に対する顕微鏡的観察において明らかな発達異常を示さなかった。体重増加や生殖能にも大きな異常を認めなかった。

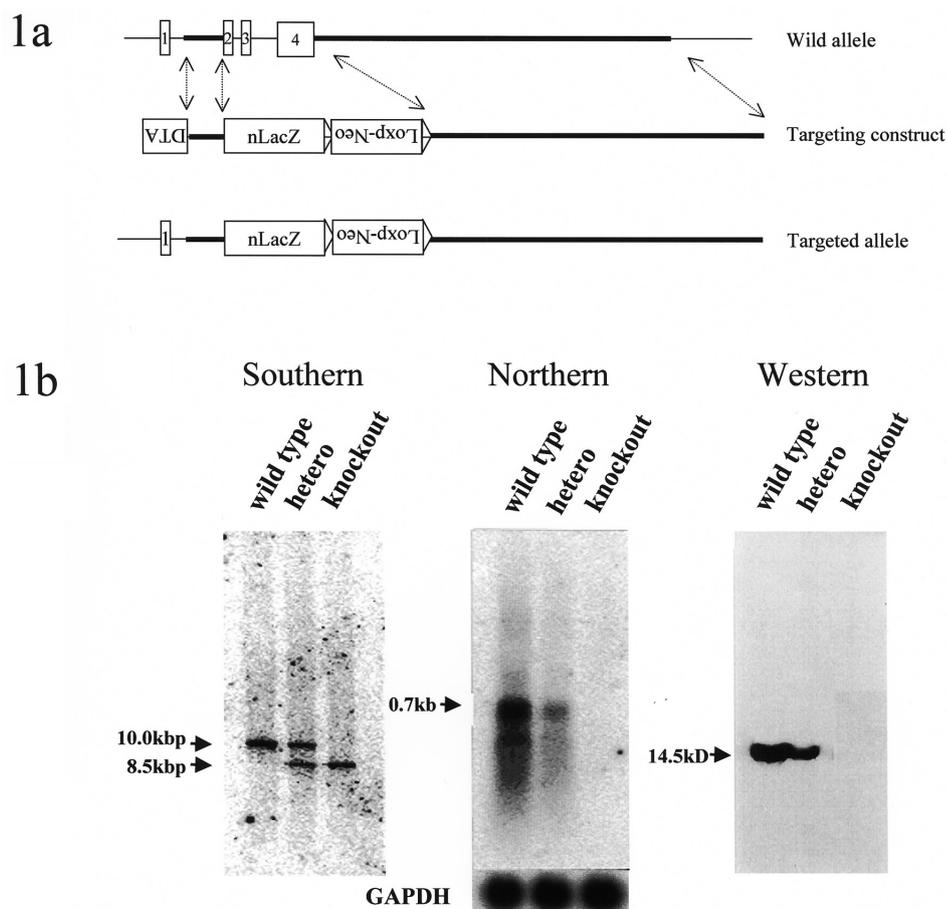


Fig. 1 (a) Intron/exon structure of murine E-FABP gene and representation of target construct. Homologies (bold lines) between targeting construct and genomic DNA, and the probe used for Southern blotting are indicated. (b) Southern blot of BamHI-digested skin DNAs from each genotype mouse. Northern blot of total RNA (30ug) from skins probed with labeled mouse E-FABP cDNA or GAPDH (glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase) cDNA as a loading control. Western blot of skin lysates with anti-rat E-FABP antibody. 10ug of protein from skins of each genotype mice were applied.

### 3.1 E-FABP マウスにおける表皮水バリアー機能の変化

野生型および E-FABP マウスにおけるアセトン塗布前後の表皮水バリアー機能の時間的変化を Fig. 2 に示す。アセトン塗布以前では、E-FABP マウスの TEWL 値は野生型に比して有意に低下していた。アセトン塗布後は、30分、2、4、12、36、48 時間後の TEWL 値は有意な差異を認めないものの、36 時間後の TEWL 値は野生型ではほぼ前値に復しているのに対してノックアウトマウスでは回復の遅れが認められた。96 時間後には野生型、E-FABP マウスともほぼ塗布前の TEWL 値に復していた。

### 3.2 超微形態像

表皮ケラチノサイトの超微形態像をアセトン処理前後で

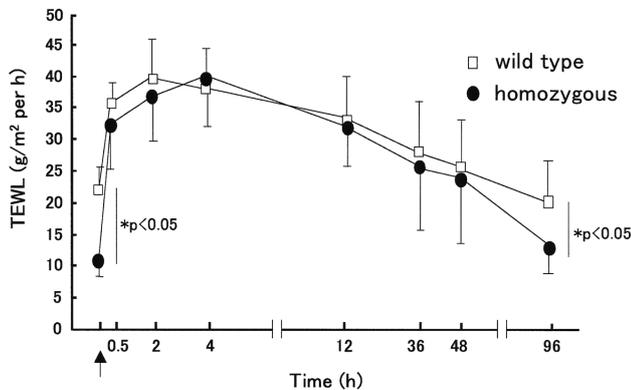


Fig. 2 Chronological changes of TEWL measured in the dorsal skin of wild type and homozygous mice following acetone treatment. The time of acetone application is indicated by an arrow, the values at this point represent pretreatment levels. Closed circles: homozygous mice, open squares: wild type mice. Statistical significance in a two-tailed Student's t test comparing homozygous and wild type mice is indicated by \* ( $P < 0.05, n = 6$ ).

Table 1 Constituent fatty acid of mouse skin lipids

fatty acid <sup>a</sup>	wild type	homozygous
	wt % <sup>b</sup>	
14:0	1.9 ± 0.15	1.8 ± 0.33
16:0	29.2 ± 0.17	27.9 ± 1.44
18:0	4.3 ± 0.47	3.4 ± 0.14
18:1	29.7 ± 0.71	29.6 ± 0.33
18:2	26.3 ± 1.16	28.2 ± 1.91
20:4	0.7 ± 0.08	0.8 ± 0.21
22:6	0.5 ± 0.06	0.6 ± 0.20

<sup>a</sup>number of carbone atoms : number of double bonds,  
<sup>b</sup>mean values ± SD (n=3)

Table 2 Thickness of the ear after arachidonic acid treatment

	wild type	homozygous
control	1.1 ± 0.12 mm	1.0 ± 0.09 mm
1h after treatment	1.8 ± 0.16 mm	1.7 ± 0.14 mm

mean ± SD (n=6)

電子顕微鏡にて観察した。アセトン処理前の表皮顆粒層の電顕像は、野生型と比して E-FABP マウスとも大きな差異を認めなかった。層板小体の構造、数、分泌像とも明らかな差異は認めなかった。アセトン処理後の層板小体の分泌亢進も野生型との差異は認められなかった (data not shown)。

### 3.3 脂肪酸成分分析

ガスクロマトグラフを用いた皮膚の脂肪酸測定結果を Table 1 に示す。各種脂肪酸の構成には野生型と E-FABP マウスの間に有意な差異を認めなかった。

### 3.4 炎症反応

脂肪酸およびその代謝産物であるエンコサノイドは、皮膚の炎症過程に深く関与することが示唆されている。E-FABP 分子の炎症反応に対する関与を明らかにするために、野生型および E-FABP マウスの耳介におけるアラキドン酸誘発炎症反応の測定を施行した。耳介厚の測定結果は、野生型と E-FABP マウスの間に有意な差異を認めなかった (Table 2)。

### 3.5 心臓型 FABP (heart-type FABP: H-FABP) の発現増強

E-FABP マウスにおける他の FABP アイソフォームの代償的発現増強を評価するために、ノザンプロットを施行した。野生型では、E-FABP のみの発現が皮膚において認められた。

一方野生型では発現を示さない H-FABP 遺伝子は、ヘテロ型および E-FABP マウスの皮膚において発現増強を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。

## 4 考察

表皮の保湿や WBF については、角質細胞間の脂肪酸、

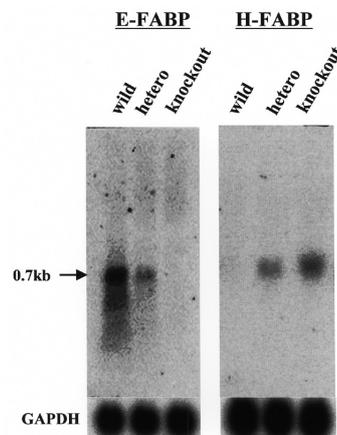


Fig. 3 Northern blot analyses of E- and H-FABP in the skin of each genotype mouse. Note the increased expression of H-FABP in the skin of heterozygous and homozygous mice of 0.7kb. As the internal control, the expression of GAPDH mRNA is shown.

コレステロール、セラミドなどの脂質が重要な役割を担っていることは既に知られているものの、これらの代謝・輸送に関わる分子の生体レベルでの研究は、いまだ数少ない。E-FABP はこれまでに、表皮 WBF 形成への関与のみならず、乾癬をはじめとする炎症性疾患への関与も示唆されている<sup>11) 12) 13)</sup>。E-FABP の細胞生物学的特性 (種々の脂肪酸に対する結合能、脂肪酸の細胞内取り込み、脂肪酸を介した情報伝達制御など) を考えると、我々が世界に先駆けて樹立した E-FABP ノックアウトマウスは、WBF 形成機構の生体レベルでの解明のみならず、炎症や細胞の分裂・分化などの解明に大きな貢献をするものと思われる。

ノックアウトマウスではしばしば欠損蛋白の機能を、他の構造類似蛋白がその機能を補完することが知られている。事実、既報の脂肪細胞型 FABP (A-FABP) ノックアウトマウスでは脂肪細胞において E-FABP の顕著な発現増強が観察されている<sup>14)</sup>。E-FABP ノックアウトマウスにおいても、皮膚、肝臓、腎臓などにおいて H-FABP の発現が著明に増強していることが確認された (一部未発表データ)。E-FABP と H-FABP は、FABP 分子ファミリーの中でも、蛋白構造や脂肪酸との結合能において高い類似性を有することが知られている<sup>5)</sup>。E-FABP ノックアウトマウスは、発達期を通じて明らかな形態学的異常を示さなかったが、この原因として H-FABP が E-FABP の機能を代償した可能性が示唆された。E-FABP の生体機能を解明するため、現在 E-H-FABP ダブルノックアウトマウスの表現型解析を施行中である。

E-FABP ノックアウトマウスで観察された WBF の変化は、1) 野生型に比べて basal TEWL が低値を示す。2) アセトン処理による表皮水分バリアーの破壊後に処理前値に回復する時間が延長する。の 2 点である。これらの原因については、E-FABP ノックアウトマウス皮膚の脂肪酸含有率の測定結果や電子顕微鏡による超微形態観察からはその原因を明らかにすることが出来なかった。詳細な脂質成分解析 (リン脂質、セラミド、コレステロールなど) あるいは初代培養ケラチノサイトを用いた脂肪酸の取り込み解析などを現在施行中である。

#### (参考文献)

- 1) Landmann L: The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol* 178: 1-13, 1988
- 2) Elias PM, Feingold KR: Lipid related barriers and gradients in the epidermis. *Endocrine, metabolic and immunologic functions of keratinocytes. Ann NY Acad Sci* 548: 4-13, 1988
- 3) Feingold KR: The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res* 24:57-82, 1991
- 4) Glatz JFC, van der Vusse GJ: Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 35: 243- 282, 1996
- 5) Coe NR, Bernlohr DA: Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1391: 287-306, 1998
- 6) Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H: Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brain. *J Chem Neuroanat* 12: 113-122, 1996
- 7) Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H: Increased expression of the mRNA for brain- and skin-type but not heart-type fatty acid binding proteins following kainic acid systemic administration in the hippocampal glia of adult rats. *Mol Brain Res* 42: 156-160, 1996
- 8) Owada Y, Abdelwahab S, Suzuki R, Iwasa H, Sakagami H, Spener F, Kondo H: Localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in the alveolar macrophages and some of the alveolar type II epithelial cells in mouse lung. *Histochem J* 33: 453-457, 2002
- 9) Owada Y, Suzuki R, Iwasa H, Spener F, Kondo H: Localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in the thymic epithelial cells of mice. *Histochem Cell Biol* 117: 55-60, 2002
- 10) Owada Y, Takano H, Yamanaka H, Kobayashi H, Sugitani Y, Tomioka Y, Suzuki I, Suzuki R, Terui T, Mizugaki M, Tagami H, Noda T, Kondo H: Altered water barrier function in epidermal fatty acid binding protein deficient mice. *J Invest Dermatol* 118 : 430-435, 2002
- 11) Yamaguchi H, Yamamoto A, Watanabe R, Uchiyama N, Fujii H, Ono T, Ito M: High transepidermal water loss induces fatty acid synthesis and cutaneous fatty acid-binding protein expression in rat skin. *J Dermatol Sci* 17: 205-213, 1998
- 12) Masouye I, Saurat JH, Siegenthaler G: Epidermal fatty-acid-binding protein in psoriasis, basal and squamous cell carcinomas: an immunohistochemical study. *Dermatology* 192: 208-213, 1996
- 13) Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Didierjean L, Hellman U, Saurat JH: Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. *Biochem J* 302: 363-371, 1994
- 14) Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM: Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274: 1377-1379, 1996