

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06604

研究課題名(和文) 表皮中スフィンゴミエリンの皮膚ラメラ構造と化合物の皮膚浸透性に対する影響

研究課題名(英文) Skin lamellar structure of sphingomyelin in epidermis and its effect on skin penetration of compounds

研究代表者

徳留 嘉寛 (Tokudome, Yoshihiro)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：70409390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴミエリン合成酵素欠損マウス(SMS KOマウス)のセラミドの定量、皮膚を介した化合物の皮膚透過性、高輝度X線、FTIRなどを用いたラメラ構造の解析を行った。SMS KOマウス角層中のスフィンゴミエリン含量は低下していた。また、角層中セラミドも減少していた。水分蒸散量はKOマウスで高値を示した。また、水溶性化合物の皮膚透過性はKOマウスで増加した。一方で、脂溶性化合物では変わらなかった。角層のX線構造解析でもKOマウスと野生型マウスではことなる構造を示唆するデータが得られた。これらのことから、スフィンゴミエリンはバリア機能に影響することが示唆される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎患者の角層中セラミド(Cer)は減少している。そのCerの前駆物質のスフィンゴミエリン(SM)については多くの報告がない。今回はSMを合成する酵素を欠損したマウスを用いて、バリア機能に関わる評価を行うことで、SMとバリア機能の関係の一端の解明を目指して検討を行った。角層中のSM、Cerの減少によって、水溶性化合物の皮膚透過性は激的に増加した。また、角層の結晶構造をX線回折法で観察した。角層中SM、Cerが減少すると角層ラメラ構造の結晶性は向上した。結晶性の向上は皮膚ラメラ構造中に「ひずみ」を引き起こすことで、水溶性化合物jに対するバリアが不安定化することを想定した。

研究成果の概要(英文)：The content of sphingomyelin in the stratum corneum of SMS KO mice was found to be decreased. Ceramide in the stratum corneum was also decreased. Transepidermal water loss (TEWL) was higher in KO mice. The skin permeability of water-soluble compounds was increased in KO mice. On the other hand, the liposoluble compounds did not change. X-ray structural analysis of the stratum corneum also showed different structures between KO mice and wild-type mice. These results suggest that sphingomyelin affects the barrier function.

研究分野：薬剤学、化粧品科学、生物科学

キーワード：スフィンゴミエリン セラミド バリア機能 高輝度X線 皮膚透過

1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層に存在する角層は皮膚バリア機能や保湿機構の維持に極めて重要です。角層バリア機能には、セラミドなどをはじめとする角層細胞間脂質が重要な役割を担っていることがわかっています。例えば、アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症患者の角層セラミドは減少していることが報告されており、角層中のセラミドを増加させることは極めて重要です。

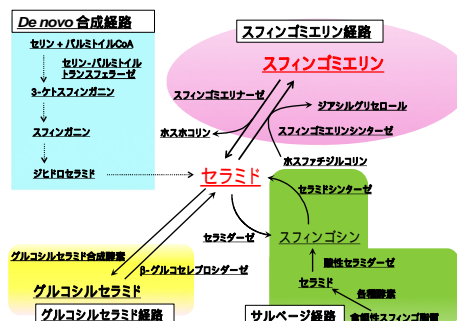
しかし、セラミドは脂溶性が高く、製剤化が困難で、高価であることから、アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症の治療には、ステロイドなどの対処療法が主となっているのが現状です。

角層中のセラミドはグルコシルセラミドとスフィンゴミエリンを前駆物質として合成されます。そこで、申請者はこれまでに、スフィンゴミエリンやグルコシルセラミドを三次元培養皮膚に適用することで、それらが生きた表皮にまで送達され、角層中セラミドを増加させること、また、そのメカニズムとしてセラミド生成代謝関連遺伝子の発現レベルが変動することを報告してきました。

スフィンゴミエリンは生体内でセラミドに変換されることは、いくつかの論文がありますが、スフィンゴミエリン自身が皮膚バリア機能にどのような役割を示すかについては、未だに明らかになっておらず、皮膚科学領域などで重要な課題となっています。

スフィンゴミエリンは一般的に角層には存在ませんが、申請者の一連の研究の中で、生きた表皮までスフィンゴミエリンを送達することで、角層中セラミドが増加し、皮膚バリア機能が増加することが明らかとなりました。従って、表皮中のスフィンゴミエリンが減少すると、角層中のセラミドが減少し、角層バリア機能は低下することが推察されます。

本研究では、スフィンゴミエリンを合成する唯一の酵素であるスフィンゴミエリン合成酵素を欠損させたマウスを用いて、野生型マウスと総合的に比較検討することで、スフィンゴミエリンの皮膚バリア機能に対する役割の一端を明らかにすることを目的としています。また、その成果はアトピー性皮膚炎や老人性乾皮症の根治療法への手がかりとなる可能性があると考えております。



2. 研究の目的

本研究課題では、スフィンゴミエリン合成酵素欠損マウス (SMS-KO マウス) を用いた皮膚バリア機能に関わる検証を、以下の方法で行います。

- (1) SMS-KO マウス摘出皮膚を介した水溶性および脂溶性化合物の皮膚浸透性評価
- (2) 経表皮水分損失量 (皮膚バリア機能) の測定 (Vaposcan)
- (3) 角層ラメラ構造の詳細解明 (放射光 X 線および FTIR)
- (4) 表皮中のセラミドおよびスフィンゴ脂質含量の定量 (TLC または LC/MS/MS)

最初にスフィンゴミエリン合成酵素欠損マウス (SMS-KO マウス) の摘出皮膚を用いた皮膚透過試験を行うことで、体外から体内への化合物皮膚透過性挙動を把握します。これは、申請者の化合物の皮膚浸透性に関連する論文を参考にして検討を進めます。また、バリア能の把握方法は、Vaposcan を用いて、体内からの水分蒸散を測定することで行います。これらの方法は申請者らが以前に報告してきたので、当研究室で検討が可能です。

続いて、放射光 X 線やフーリエ変換赤外分光光度計 (Fourier transform infrared spectrometer: FTIR) を駆使して、SMS-KO マウスの角層構造 (ラメラ脂質充填構造、分子振動、相転移) を明らかにします。

最後にバリア機能には角層中のセラミド類や表皮中のスフィンゴミエリンやグルコシルセラミドの定量が必要です。これらは、申請者らが以前に報告してきた方法を参考にして行います。

以上、SMS-KO マウス角層構造の多角的な詳細観察、皮膚中のスフィンゴ脂質の定量、マウスの野生型マウスと比較することで、スフィンゴミエリンの皮膚バリア機能に対する役割の一端を明らかにすることが目的の課題です。

3. 研究の方法

スフィンゴミエリン合成酵素欠損マウス (SMS-KO マウス) を用いた皮膚バリア機能に関わる検証を、以下の方法で検証しました。

- (1) Vaposcan による経表皮水分損失量 (皮膚バリア機能) の測定
最初に Vaposcan で軽表皮水分損失量 (Transepidermal water loss, TEWL) を測定しました。

TEWL はヒトをはじめマウスなどの生物を生きたまま計測できます。これは、体内からの体外に向けての水の移動（蒸散）を測定することで、皮膚のバリア機能を予測できるとされています。角層のバリア機能がしっかりしていれば、体内からの水分蒸散は少なく、バリア機能が弱くなっている場合は、体内からの水分蒸散量は多くなります。このため、体内からの水分蒸散量を測定することで（水分）バリア機能を把握することが可能です。スフィンゴミエリン合成酵素欠損マウス（SMS-KO マウス）と野生型マウス（WT マウス）の両方の TEWL を測定しました。

（ 2 ）SMS-KO マウス摘出皮膚を介した水溶性および脂溶性化合物の皮膚浸透性評価

次に、スフィンゴミエリン合成酵素欠損マウス（SMS-KO マウス）の摘出皮膚を用いた皮膚透過試験を行いました。具体的には、SMS-KO マウスの全層皮膚を剥離し、改良型フランツセルに装着します。試験用溶液には、低分子水溶性化合物（フルオレセインナトリウム）および脂溶性化合物（ナイルレッド）を用いて、SMS-KO マウスまたは WT マウス皮膚を介した化合物の透過性を評価しました。必要に応じて角層剥離皮膚でも検討を行いました。SMS-KO マウスまたは WT マウスの皮膚透過挙動を把握することで、バリア機能変化機構を推測しました。

（ 3 ）角層ラメラ構造の詳細解明（放射光 X 線および FTIR）

マウス角層ラメラ構造の放射光 X 線解析は、八田ら（*Biochim. Biochem. Acta*, 1758, 1830 (2006)）の方法を参考に検討しました。具体的には、トリプシンを用い通常の方法により SMS-KO マウスまたは WT マウスの角層を採取し、ガラス製のキャピラリー内に入れ、SPRING-8 の BL40B2 にて測定しました。評価は、小角 X 線と広角 X 線回折像を同時に測定することで、角層ラメラ構造中の脂質が作り出す構造体の長周期および短周期ラメラ構造、炭化水素充填構造である斜方晶と六方晶の量的、質的变化を SMS-KO マウス、WT マウスで比較検討しました。さらに、温度走査させると同時に高輝度 X 線を照射して検討をしました。

さらに、マウス角層サンプルを全反射型 FTIR で、角層ラメラの官能基の差異を分子レベルで解析しました。さらに、温度変化をさせた状態で CH 伸縮振動、CH 逆対称性伸縮振動を観察し、角層細胞間脂質の流動性を観察しました。

（ 4 ）表皮中のセラミドおよびスフィンゴ脂質含量の定量（TLC および LC/MS/MS）

今回ターゲットとしているスフィンゴミエリンは、角層の前駆体として重要であることが UCSF の内田先生らから報告されています。SMS-KO マウスおよび WT マウス表皮中のセラミドやスフィンゴ脂質含量を TLC または LC/MS/MS を用いて測定しました（LC/MS/MS は技術の確立が遅れたため一部のみ）。具体的には、マウスの表皮からセラミドまたはスフィンゴミエリンを Bligh and Dyer の方法で抽出し、それを TLC または LC/MS/MS で定量しました。

4 . 研究成果

（ 1 ）Vaposcan による経表皮水分損失量（皮膚バリア機能）

マウスの尾の一部を採取後に、ジェノタイプングし、対象のマウスの遺伝子型を確認したのちにすべての実験に使用しました。SMS-KO マウスの TEWL が WT マウスと比較して有意に高い結果が得られました。このことから、SMS-KO マウスはバリア機能が低下していることが示唆されました。

（ 2 ）SMS-KO マウス摘出皮膚を介した水溶性および脂溶性化合物の皮膚浸透性

最初に水溶性化合物のフルオレセインナトリウム（FL-Na）皮膚透過性を評価しました。SMS-KO マウスの FL-Na 皮膚透過性（累積透過量、透過速度）は WT と比較して有意に増加しました。一方、驚くべきことに脂溶性化合物のナイルレッド（NR）を用いた検討では、SMS-KO マウスと WT マウスで差はありませんでした。水溶性化合物のバリアのみが変化していることが示唆される結果が得られました。この水溶性化合物のバリア機能変化が、角層に依存しているのかを明らかにするために、角層剥離皮膚を介した FL-Na の透過試験を行いました。その結果、FL-Na の皮膚透過性は SMS-KO マウスと WT マウスに差はありませんでした。これらのことから、SMS-KO マウスは水溶性化合物のバリアが低下していること、さらにそのバリア機能には角層の構造が関与していることが示唆されました。

（ 3 ）角層ラメラ構造の詳細解明（放射光 X 線および FTIR）

放射光 X 線（SPRING-8, BL40B2）で角層構造の把握を行いました。SMS-KO マウス角層のラメラ構造、炭化水素鎖の充填構造は WT マウス角層と比較して、結晶性が高まっている可能性があるデータが得られました。さらに温度走査しながら構造解析をしたところ、SMS-KO マウスの角層では高温時にも結晶構造が維持される結果が得られました。一般的に結晶性が高いほうがバリア機能は高いことが報告されています。一方で、角層ラメラ構造の結晶性の高い部分と低い部分が存在した場合、その間に「歪み」が存在することで構造的な変化が起こるといった報告があるので、今回の結果は結晶性の高い部分と低い部分が存在することで、そこに歪みが発生して水分子水そのものや水溶性化合物の移動が起こったことが考えられます。

FTIR での検討では、通常の皮膚温度（32℃）では SMS-KO マウスと WT の CH 伸縮振動、CH 逆対称性伸縮振動には有意な差はありませんでした（差がある傾向はありました）。測定温度を

32 ,42 ,52 ,62 と変化させると,SMS2-KO マウスと WT マウスともに温度依存的に伸縮振動は増加しました。しかし,温度を変化させた際のシフトの変動幅は SMS-KO マウスの方が,WT マウスよりも大きくシフトしました。このことは,SMS を欠損させることで角層細胞間脂質の脂質組成が変化し,温度の影響を受けやすくなったことが示唆されます。

(4) 表皮中のセラミドおよびスフィンゴ脂質含量の定量 (TLC および LC/MS/MS)

表皮中のセラミド,スフィンゴリエリンを TLC および LC/MS/MS で測定しました。その結果,表皮中のスフィンゴリエリンは SMS-KO マウスで有意に減少しました。さらに,多くのセラミドも減少していました。このことから,SMS を欠損させることで,スフィンゴリエリンを初めとするセラミドが減少することがわかりました。

結論)

今回は SMS を欠損させたマウスを用いてそのバリア機能に関する検討を行いました。SMS-KO マウスはスフィンゴリエリンやセラミドが有意に減少しました。その結果として,体内からの水分蒸散量は増加し,体外からの水溶性化合物のみ,経皮吸収性が増加しました。この現象は角層構造が関わっていることが想定されました。詳細はまだ不明ですが,角層の結晶性が高まることで角層構造に歪みが発生することがこの原因の一員であることが示唆されました。

スフィンゴリエリンは皮膚バリア機能に極めて重要な役割をしている可能性が示されました。今後はこの動物にスフィンゴリエリンやセラミドを経口または経皮的に適用した際に,この現象が回復するのかを検討することで,アトピー性皮膚炎患者などに応用できる可能性があると考えられています。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢口 真帆、渡辺 研、山下 匡、岡崎 俊朗、徳留 嘉寛
2. 発表標題 皮膚の炎症反応に対するスフィンゴミエリン合成酵素2欠損の影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤 史歩、鹿毛 まどか、徳留 嘉寛
2. 発表標題 正常ヒト表皮ケラチノサイトの脂質代謝に対するスフィンゴミエリン合成酵素の影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 紗歩、渡辺 研、岡崎 俊朗、徳留 嘉寛
2. 発表標題 表皮特異的スフィンゴミエリン合成酵素1欠損マウスは皮膚バリア機能が低下する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 圭祐、渡辺 研、岡崎 俊朗、徳留 嘉寛
2. 発表標題 表皮中のスフィンゴミエリン合成酵素1欠損によりアシルセラミドを減少させ、皮膚バリア機能を低下させる
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間 希、八田 一郎、渡辺 研、山下 匡、岡崎 俊朗、徳留 嘉寛
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素2 の角層の相転移と微細構造に対する役割
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平沼 健永、渡辺 研、山下 匡、岡崎 俊朗、徳留 嘉寛
2. 発表標題 真皮中コラーゲンに及ぼすスフィンゴミエリン合成酵素2 の影響
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平沼 健永、渡辺 研、山下 匡、岡崎 俊朗、徳留 嘉寛
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素2欠損マウスはコラーゲンの分解を促進することでシワを形成する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 圭祐、渡辺 研、岡崎 俊朗、徳留 嘉寛
2. 発表標題 表皮中のスフィンゴミエリン合成酵素 1 の欠損は角層のセラミド量を減少させ、バリア機能を低下させる
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間 希, 八田 一郎, 渡辺 研, 山下 匡, 岡崎 俊朗, 徳留 嘉寛
2. 発表標題 温度変化放射光 X 線回折による角層ラメラの相転移と微細構造に対するスフィンゴミエリン合成酵素 2 の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 紗歩, 本間 希, 渡辺 研, 山下 匡, 岡崎 俊朗, 徳留 嘉寛
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素 2 欠損マウスの皮膚透過性に対する皮膚温度の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

城西大学薬学部皮膚生理学研究室 https://www.josai.ac.jp/~tokudome/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------