

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08699

研究課題名（和文）皮膚角層微細構造解析を基盤とする炎症性皮膚疾患治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic formulation for inflammatory dermatitis based on structure analysis of stratum corneum

研究代表者

小幡 誉子（Obata, Yasuko）

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20260979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、皮膚表面の薄い膜である「角層」に焦点をあて、その微細構造を詳細解析により基盤情報を構築し、皮膚疾患の治療に寄与する製剤の調製を目標とした。角層細胞間脂質の微細構造について、放射光X線回折、顕微赤外分光を用いて検討した。とくに、セラミド、コレステロールおよびパルミチン酸による細胞間脂質モデルを調製し、そのキラリティーの重要性を光学活性体とラセミ体で比較した。その結果、光学活性体では、パルミチン酸の融点を超える温度になるとセラミドとコレステロールによるあらたな構造が形成されて皮膚のバリア機能を維持する可能性が示唆された。これらの結果は、治療薬開発の成分選択において重要な基盤情報である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角層の微細構造に関する研究論文は、世界的にみて未だそれほど多くはないことから、放射光X線回折、顕微赤外分光ならびに示差走査熱量測定を利用した構造解析の学術的な意義は大きい。また、微細構造とバリア機能との関連を知ることで、有効な外用剤、経皮吸収型製剤ならびに化粧料の開発につながる事が可能である。より積極的にバリア機能の制御ができれば、皮膚から体内へと送達できる薬物量を増加させることや、バリア機能不全が問題となる炎症性皮膚疾患の治療に寄与する製剤の開発を加速できる。皮膚表面の詳細な解析は、超高齢社会におけるセルフメディケーションやアンチエイジングの発展に有用な社会的基盤情報である。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focused on the stratum corneum, which is a thin layer on the surface of the skin, and aimed to construct basic information through detailed analysis of its microstructure, and to prepare formulations that contribute to the treatment of skin diseases. Ultrastructure of stratum corneum intercellular lipids was investigated using synchrotron radiation X-ray diffraction and infrared microscopic spectroscopy. In particular, intercellular lipid models with ceramide, cholesterol and palmitic acid was prepared, and compared the importance of chirality between the optically active form and the racemic form. As a result, it was suggested that in the optically active form, when the temperature exceeds the melting point of palmitic acid, a new structure of ceramide and cholesterol is formed to maintain the barrier function of the skin. These results provide important basic information for the selection of ingredients for drug development.

研究分野：製剤設計学

キーワード：皮膚角層 細胞間脂質 ラメラ構造 セラミド コレステロール 炎症性皮膚疾患 バリア機能 外用剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角層は皮膚表面に存在する薄い膜であり、生体を脱水や異物侵入から保護する役割をもつ。角層は角層細胞と細胞間脂質から構成され、細胞間脂質は規則正しい配列、すなわちラメラ構造を形成し、このラメラ構造は、実質的に皮膚の物理的バリア機能の中核となっている。角層の細胞間脂質は、約 13 nm の長周期ラメラと約 6 nm の短周期ラメラがあり、それらの充填構造は六方晶あるいは直方晶である。細胞間脂質は、セラミド (CER)、コレステロール、遊離脂肪酸を主成分としており、それらの脂質が概ね 1:1:1 の割合であることが明らかになっているが、実際の角層内では、CER として 21 種類のサブクラスがあり、炭化水素鎖の鎖長の変動をあわせれば 1250 種類以上にのぼる化合物が同定されている。今後さらにあらたな CER が見出されてくるとも予想されている。炎症性皮膚疾患の角層では、脂質成分が健常角層とは異なることが報告されていることから、疾患角層の微細構造を解析し、健常角層の微細構造へと近づけることを考えれば、あらたな治療戦略になるといえる。

2. 研究の目的

細胞間脂質のラメラ構造の変化は、直接的に皮膚のバリア機能へと影響を及ぼしている。そのため細胞間脂質の微細構造を、角層および脂質モデルにより詳細に観察した。実験には、放射光 X 線回折実験、顕微赤外分光測定、示差走査熱量測定をはじめとして、これまでに角層の観察ではほとんど用いられていないフォーカルプレーンアレイを利用した赤外分光イメージングを試みた。さらに、バリア機能向上の機能を有し炎症性皮膚疾患の治療薬となり得る、安全性に優れた製剤成分の探索を行った。

3. 研究の方法

角層細胞間脂質および脂質モデルの温度走査小角広角同時測定は、高輝度光科学研究センター (Spring-8) BL40B2、高エネルギー加速器研究機構 (PF) BL6A にて行った。また、経皮水分蒸発量 (TEWL) は、Vapometer (SWL5001JT, Delfin Technologies Ltd., Kuopio, Finland) を使用して測定した。角層細胞間脂質の充填構造分布のドメインは、Vertex70 フーリエ変換赤外分光計 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, German) を Hyperion3000 FTIR 顕微鏡と組み合わせで観察した。エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法 (ESI-MS/MS) のショットガンリピドミクスは、QExactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) に TriVersa NanoMate ion source (Advion Biosciences, Ithaca, NY, U.S.A.) を接続して測定した。

4. 研究成果

まず、細胞間脂質モデル (CER[ADS]/CHOL/PA) を用いて、ラメラ周期の異なる 2 種類のラメラ構造について実験を行ったところ、これらのラメラ構造の違いは、へアピン型と V 字型のセラミド (CER) 構造の違いによって引き起こされることが明らかになった。また、V 字型 CER によるラメラ構造は直方晶の割合が小さくなった。この結果は、V 字型 CER の比率の増加により、ラメラ構造の直方晶比率が減少し、それによって皮膚バリア機能の低下が引き起こされる可能性が示唆された。

細胞間脂質の充填構造のうち、直方晶は最も充填性が高いことから、皮膚のバリア機能への寄与が大きいと考えられている。CER と脂肪酸を除けば、細胞間脂質充填構造の直方晶を増加させることのできる薬物はほとんど知られていない。そこで、天然保湿因子成分に着目し、細胞間脂質モデルにより、アミノ酸とその誘導体について実験を行った。その結果、N-アセチル-L-ヒドロキシプロリン (AHYP) がラメラ構造の維持に貢献している可能性が示された。そこで、ヒト角層の時間分解 X 線回折測定を用いて、細胞間脂質のラメラ構造および炭化水素鎖充填構造に対する AHYP の効果を検証したところ、AHYP が静電反発を介して細胞間脂質の炭化水素鎖充填構造を維持することで皮膚のバリア機能を高めている可能性が示唆された。

皮膚のバリア機能の指標となる経皮水分蒸発量 (TEWL) は、細胞間脂質の充填構造によって異なることが知られている。細胞間脂質の充填構造は結晶 (斜方晶および六方晶) と液晶の混合物から構成されており、これらの割合がバリア機能に影響を与えていると考えられている。しかし、細胞間脂質の充填構造によって形成されるドメインの実際の分布を可視化する方法はこれまでなかった。そこで、グリッドストリッピングによって得られた角層細胞のフォーカルプレーンアレイ (FPA) を基盤とするフーリエ変換 (FT) 赤外分光イメージング分析を使用して、細胞間脂質構造の平面分布を観察した。セラミドの脂質組成は、エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法 (ESI-MS/MS) のショットガンリピドミクスを用いて調べた。充填構造によって形成されるドメインの分布とセラミドの脂質組成を、TEWL が高いまたは低い皮膚で比較した。直方晶の割合は、高 TEWL 群の方が低 TEWL 群よりも小さくなった。ESI-MS/MS ショットガンリピドミクス分析から、脂肪酸鎖長の分布に関して、低 TEWL 群と高 TEWL 群の α -ヒドロキシセラミド含有量が異なることが明らかになった。FPA の FTIR イメージングを使用した角層細胞の評価は、細胞間脂質充填構造によって形成されるドメインの分布を可視化でき

る革新的な技術であることが示された。さらに、 α -ヒドロキシ-スフィンゴシン CER や α -ヒドロキシ-フィトスフィンゴシン CER などの α -ヒドロキシ CER サブクラスの割合の増加は、直方晶充填構造ドメインの割合の減少と関連していた。

これらの結果を踏まえて、バリア機能の維持に寄与して炎症性皮膚疾患に適用できる新たな治療薬の成分のひとつとして天然保湿因子関連のアミノ酸の利用を示すことに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohnari Hiroki, Sekiya Masatoshi, Naru Eiji, Ogura Taku, Sakata Osamu, Obata Yasuko	4. 巻 69
2. 論文標題 Amino Acids and Their <i>N</i>-Acetylated Derivatives Maintain the Skin's Barrier Function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 652 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohnari Hiroki, Naru Eiji, Ogura Taku, Sakata Osamu, Obata Yasuko	4. 巻 69
2. 論文標題 Phase Separation in Lipid Lamellae Result from Ceramide Conformations and Lateral Packing Structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 72 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小幡 誉子	4. 巻 10
2. 論文標題 皮膚疾患と皮膚角層微細構造	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 100 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小幡 誉子	4. 巻 42
2. 論文標題 皮膚角層細胞間脂質の熱特性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 82 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohnari Hiroki, Naru Eiji, Sakata Osamu, Obata Yasuko	4. 巻 71
2. 論文標題 Distribution of Domains Formed by Lateral Packing of Intercellular Lipid in the Stratum Corneum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 31 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh Hiroki, Takami Ken, Ohnari Hiroki, Chiba Yoshihiko, Ikeuchi-Takahashi Yuri, Obata Yasuko	4. 巻 71
2. 論文標題 Effects and Mode of Action of Oleic Acid and Tween 80 on Skin Permeation of Disulfiram	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 289 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 荒井梨絵、安藤伸衛、松村 駿、斎藤裕紀、千葉義彦、川野久美、服部喜之、石田賢哉、小幡誉子
2. 発表標題 セラミドのキラリティーが及ぼす角層細胞間脂質微細構造への影響
3. 学会等名 第46回日本香粧品学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小幡誉子
2. 発表標題 角層微細構造の解析手法と 製剤開発への応用
3. 学会等名 第11回化粧品開発展
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuko Obata, Rie Arai, Takayuki Furuishi, Kaori Fukuzawa, Etsuo Yonemochi, Kenya Ishida
2. 発表標題 Effect of ceramide chirality on the lipid lamellar structure in stratum corneum
3. 学会等名 第46回日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒井梨絵、古石誉之、福澤 薫、米持悦生、小幡誉子、石田賢哉
2. 発表標題 角層細胞間脂質構造とセラミド光学活性の関連
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤裕紀、大淵由貴、瀬戸山陽奈、石田賢哉、小幡誉子
2. 発表標題 皮膚角層細胞間脂質微細構造から推定する脂質官能基相互作用
3. 学会等名 第45回日本化粧品学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 WU YIFAN, XU QIHUI、齋藤裕紀、大淵由貴、瀬戸山陽奈、川野久美、服部喜之、小幡誉子
2. 発表標題 皮膚角層細胞間脂質に及ぼすテルペン類の影響
3. 学会等名 第45回日本化粧品学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 XU QIHUI、WU YIFAN、齋藤裕紀、大淵由貴、瀬戸山陽奈、川野久美、服部喜之、小幡誉子
2. 発表標題 ファミチジンの皮膚透過に及ぼす経皮吸収促進剤の効果
3. 学会等名 第45回日本化粧品学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大淵由貴、瀬戸山陽奈、川野久美、服部喜之、小幡誉子
2. 発表標題 アトモキセチン/オキシブチニンの経皮吸収型製剤の開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬戸山陽奈、大淵由貴、小幡誉子
2. 発表標題 新規 イオン液体 の 皮膚透過促進効果とその 化学構造に着目した メカニズム解明
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤裕紀、大淵由貴、瀬戸山陽奈、千葉義彦、寺島裕也、小幡誉子
2. 発表標題 ジスルフィラム経皮吸収型製剤の開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒井梨絵、瀬戸山陽奈、大淵由貴、川野久美、服部喜之、石田賢哉、小幡誉子
2. 発表標題 セラミドの化学構造に着目した細胞間脂質のラメラ構造形成に関する考察
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 村松駿、大淵由貴、瀬戸山陽奈、川野久美、服部喜之、小幡誉子
2. 発表標題 アトモキセチン/オキシブチニンの同時送達を目指した経皮吸収型製剤の開発
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 荒井梨絵、安藤伸衛、村松 駿、齋藤裕紀、千葉義彦、川野久美、服部喜之、石田賢哉、小幡誉子
2. 発表標題 セラミドの光学活性が及ぼす角層細胞間脂質微細構造への影響
3. 学会等名 第46回日本香粧品学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井梨絵、古石誉之、福澤薫、米持悦生、石田賢哉、小幡誉子
2. 発表標題 角層細胞間脂質微細構造とセラミド光学活性の関連
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井梨絵、古石誉之、福澤 薫、米持悦生、小幡誉子、石田賢哉
2. 発表標題 セラミドの立体配置が角層細胞間脂質の構造変化に及ぼす影響
3. 学会等名 第66回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小幡誉子、荒井梨絵、古石誉之、米持悦生、石田賢哉
2. 発表標題 皮膚角層細胞間脂質モデルの構築と解析～光学活性ヒト型セラミドの有用性と機能性の評価～
3. 学会等名 第15回セラミド研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuko Obata, Rie Arai, Takayuki Furuishi, Etsuo Yonemochi, Kenya Ishida
2. 発表標題 Analysis of thermotropic behavior of free fatty acids in intercellular lipid model of stratum corneum focusing on ceramide chirality
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会第47回年次学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 盛井万智、池内由里、山崎紅瑠美、島名蒼衣、小幡誉子
2. 発表標題 苦味マスキングを目的としたフェキシソフェナジン微粒子の調製と評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大塚禎貴、池内由里、柴崎一輝、浴 志帆、谷口 豊、小林文香、吉村延能、小幡誉子
2. 発表標題 モリン含有エマルションの製剤特性および消化管吸収性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成瀬彩加、池内由里、相場実佑、占野二千華、高見 謙、福田哲也、山田真由美、山谷明正、小幡誉子
2. 発表標題 オランザピンゲルからの薬物皮膚透過性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴崎一輝、池内由里、大塚禎貴、浴 志帆、小幡 誉子
2. 発表標題 エマルションの製剤特性に及ぼす非イオン性界面活性剤の影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田美鈴、栗原佳子、長谷川 敦、齋藤 勲、小幡誉子、池内由里
2. 発表標題 服薬補助ゼリーの物性と医薬品の苦味マスキング効果に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------