

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659555
 研究課題名（和文） TOF-SIMS（飛行時間型質量分析）顕微鏡を用いた角質バリア機能可視化法の開発
 研究課題名（英文） Development of the visualization method of the stratum corneum barrier function by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy (TOF-SIMS)
 研究代表者
 久保 亮治（KUBO AKIHARU）
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：70335256

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎の要因として角質バリア障害が注目されている。だが、角質のバリア障害を観察評価する手段は限られており、角層内の物質分布を観察する方法も同じく限られている。本研究では、TOF-SIMS(飛行時間型二次イオン質量分析)顕微鏡を用い、角質内の物質分布の新しい可視化方法、角質バリア機能の新しい可視化方法を開発した。その結果、角質層が3つの異なる性質を持った層に分けられることを発見した。フィラグリン KO マウスでは、角質最内層のバリア機能が障害されていた。

研究成果の概要（英文）：The stratum corneum (SC), the outermost barrier of mammalian bodies, consists of layers of cornified keratinocytes with intercellular spaces sealed with lipids. The insolubility of the SC has hampered in-depth analysis, and the SC has been considered a homogeneous barrier. Here, we applied time-of-flight secondary ion mass spectrometry to demonstrate that the SC consists of three layers with distinct properties. Arginine, a major component of filaggrin-derived natural moisturizing factors, was concentrated in the middle layer, suggesting that this layer functions in skin hydration. Topical application of metal ions revealed that the outer layer allowed their passive influx and efflux, while the middle and lower layers exhibited distinct barrier properties, depending on the metal tested. Notably, filaggrin deficiency abrogated the lower layer barrier, allowing specific metal ions to permeate viable layers. These findings elucidate the multi-layered barrier function of the SC and its defects in filaggrin-deficient atopic disease patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病退学、皮膚生理・生物学、イメージング、皮膚バリア、アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

角質構成蛋白フィラグリンの変異がアトピー性皮膚炎の発症要因として注目されている。フィラグリン蛋白の減少がその分解産物である天然保湿因子の減少を通じて角質バリア障害を引き起こし、その結果として経皮的な抗原暴露が慢性的に起こり、アトピー性皮膚炎発症に至ると考えられていた。しかし、フィラグリンの減少により角質バリアがどのように変化するのは、ほとんど判っていなかった。これは角質バリア機能の評価方法がごく限られていたためであった。物質の浸透を観察するためには、その物質を可視化しなければならないが、可視化するためのプローブを付加すると浸透度が変わってしまうために、その物質の浸透度を直接評価することができない。そのため、FITC やトルイジンブルーなどの色素そのものの浸透を観察する方法や放射性物質をプローブとして用いる方法、テープストリップにより表面から順に剥いだ角質層各層のクロマトグラフィー解析といった、ごく限られた方法でしか、角質内への物質の浸透を観察することはできなかった。これは、角質バリア研究を進める上で大きな障害となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、① 飛行時間型二次イオン質量分析顕微鏡 (TOF-SIMS) を用いた皮膚切片の観察方法を開発し、② アミノ酸の角質内分布の可視化、③ 金属イオン (Ni, Cr など) の角質への浸透の可視化、④ バリア障害時の角質の構造変化、金属イオン浸透度変化の解析、を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

近年、質量分析の技術が進み、顕微鏡と質量分析の手法を組み合わせた質量分析顕微鏡が登場し、生体観察に応用されつつある。質量分析顕微鏡の強みは、プローブを用いる必要がないため、物質そのものの分布を直接観察できることと、一度の観察で様々な物質を同時に解析できることである。MALDI を用いたものは質量分解能には優れるが、解像度が 50~100 μm と粗いのに対し、TOF-SIMS (飛行時間型二次イオン質量分

析) は質量分解能には劣るが、1 μm 以下の解像度を誇る。TOF-SIMS はこれまで主に半導体など無機物質の表面分析に用いられてきた技術であり、生物試料への応用は始まったばかりである。本研究では、TOF-SIMS を角質のバリア構造・機能の可視化に応用する。無機物質の検出に優れる TOF-SIMS の特徴を生かし、重クロム酸カリウムや硫酸ニッケルといった、金属アレルギーの原因となる物質の角質への浸透を直接可視化することで、角質バリア機能を評価する全く新しい手段を開発した。

4. 研究成果

TOF-SIMS により観察するのに適した皮膚サンプルの作成方法、観察手法の最適化を行った。マウス尻尾皮膚を TOF-SIMS を用いて観察し、角質と生細胞層を分けて観察することに成功した。角質はセラミドの分解産物を多く含み、Na に富む領域として同定できた。また、フィラグリンの分解産物であるアルギニンの角質内分布を可視化することに成功した。これは、角質内における天然保湿因子の分布を可視化した、世界で初めての成果である。興味深いことに、アルギニンは角質の中層に集積しており、角質層は、K^{high}, Arginine^{low} な上層、K^{low}, Arginine^{high} な中層、K^{low}, Arginine^{low} な下層、の3つの層に分けられることが明らかとなった (図1)。

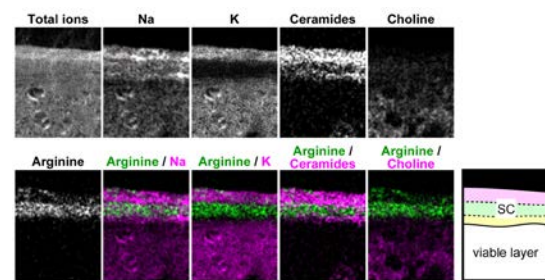


図1: マウス皮膚切片の TOF-SIMS 像。角質は、Na^{high}, Ceramide^{high} な領域として同定できた。さらに、角質は Arginine^{low} な上層 (右側の模式図にて紫色)、K^{low}, Arginine^{high} な中層 (同・緑色)、K^{low}, Arginine^{low} な下層 (同・黄色)、の3つの層に分けられた。

次に、3層の機能の違いを解析した。上層を水で洗うと、上層に含まれる Na, K は洗い流された。また六価クロムは上層には容易に

浸透するが、中層には浸透しなかった。以上より、角質上層はさまざまな低分子が容易に出入りするスポンジのような構造を取っていることが示唆された。また角質中層はバリアとして機能していた（図2）。

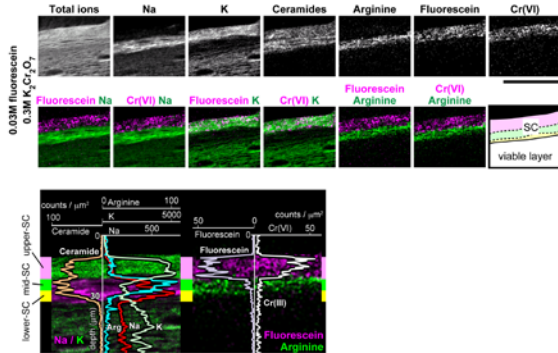


図2：マウス皮膚への Fluorescein と $K_2Cr_2O_7$ 溶液中の Cr の浸透を、皮膚切片上で可視化した。Fluorescein と Cr はいずれも角質上層には染み込んだが、角質中層には染み込まなかった。アルギニン豊富を含む角質中層がバリアとして機能していた。

さらに三価クロムの浸透性を評価したところ、三価クロムは角質中層に浸透してアルギニンを洗い流したが、角質下層には浸透しなかった。以上より、角質の中層は天然保湿因子に富み、水分保持に機能していることが示唆されるとともに、角質の中層と下層がそれぞれ異なる物理的性質を持ったバリアとして働いていることが明らかとなった。さらに、フィラグリン欠損マウス皮膚を観察したところ、角質下層のバリアが特異的に障害されていることが明らかになった。質量分析顕微鏡を用いることで、これまで知りえなかった角質層の三層構造とそれぞれの機能の違いを初めて明らかにした（図3）。

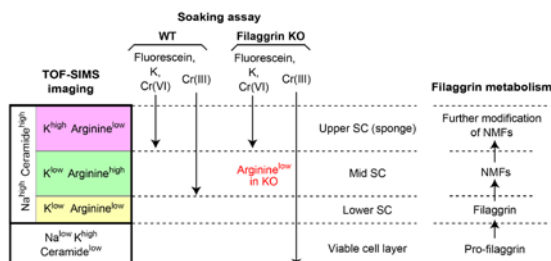


図3：角質の3層構造とそれぞれのバリア機能の模式図。フィラグリン欠損状態では、角質下層のバリア機能に異常が観察された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

1. Kubo A*, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, and Amagai M. The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties. *Sci Rep.* 3 : 1731, 2013. 査読有

〔学会発表〕（計3件）

1. Kubo A. 3D Imaging of the Mammalian Epidermis. 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Okinawa, Japan, 2012. 12. 7-8
2. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Ohashi Y, and Amagai M. The stratum corneum comprises three layers with distinct barrier properties, as revealed by TOF-SIMS imaging. 62nd Montagna Symposium on the Biology of Skin 2012, Portland, Oregon, USA, 2012. 10. 11-13
3. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Ohashi Y, and Amagai M. High-resolution TOF-SIMS Imaging reveals Multi-layered Barrier Structure of the Stratum Corneum of Skin. 19th International Mass Spectrometry Conference, Kyoto, Japan, 2012. 9. 16-17

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

[その他]

ホームページ等

皮膚バリア機構解明プロジェクト

http://www.derma.med.keio.ac.jp/derma/r_research/project7.html

皮膚“バリオロジー”:バリア機能異常から見たアレルギー疾患病態解明

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/kubo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 亮治 (AKIHARU KUBO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70335256

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし