

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870955

研究課題名(和文)皮膚角層のバリア機能発現機序の解明に関する研究

研究課題名(英文)Breakthrough for unresolved structural problems in skin barrier function

研究代表者

中沢 寛光 (NAKAZAWA, Hiromitsu)

関西学院大学・理工学部・教育技術主事

研究者番号：70411775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚の最外層で高秩序化構造を形成する角層は、皮膚バリア機能に対して重要な役割を發揮する。この角層の高秩序化構造は、経皮吸収性の薬剤に対しても大きな障壁となるため、よってより吸収性に優れた経皮吸収薬を開発するためには、角層と薬剤の相互作用を分子レベルで明らかにすることが重要となる。本研究課題では独自に開発した角層の構造と角層間を透過する物質を同時に計測することができる試料セルを使用し、それをを用いて角層内を透過する水の透過特性を明らかにした。今後は、さらに薬剤の構成成分と角層との相互作用を詳細に解析し、経皮吸収メカニズムの解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：Stratum corneum (SC) is mainly composed of flattened corneocytes and highly ordered intercellular lipid lamellar region in the outermost layer of the human skin. The SC serves as a physicochemical barrier to percutaneous absorption of not only harmful agents but also drugs (for example, ointment for skin). In order to develop drugs with more effective absorption properties, it is important to clarify the interaction between the SC and drugs at the molecular level. In this study, we developed a sample cell designed for the simultaneous analysis of the SC structure and skin permeation, and made clear the behavior of water in SC. By conducting a detailed analysis of the interaction between the SC and the drugs, this study aims to elucidate the percutaneous absorption mechanism of drugs.

研究分野：生物物理学

キーワード：皮膚角層バリア機能 細胞間脂質 放射光X線回折 経皮吸収

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚の最も重要な役割は、外界からの異物の侵入を防ぐバリア機能を発揮することであり、それには皮膚の最外層に位置する“角層”が重要な役割を担う。角層は主にケラチンを主成分とする“角質細胞”と、その周りを取り囲む“細胞間脂質”で構成され、それらが高秩序化されることで、高いバリア性能が発揮される。

生体の恒常性の維持には必須の皮膚バリア機能であるが、一方でこの高秩序化構造は、経皮吸収性の薬剤の体内への吸収に対しては逆に大きな障壁となりうる。よって、より吸収性に優れた製剤の開発には、製剤と角層の相互作用を分子レベルで明らかにすることが重要な課題となるが、角層のどの構造体が、どのような物質の吸収に対して、どのように影響するかについては、まだよく分かっていない。

物質の経皮吸収挙動を明らかにし、経皮吸収型製剤の開発に転用可能な情報を取得するためには、両者の関係性を詳細に解析することが求められるが、角層は生体試料であるので、角層の個体差の問題は避けて通れない。そこで、我々はこれらの問題を解決するために、角層の構造と角層内を透過する物質の透過挙動の同時解析を提案する。特殊な試料セルを開発し、高輝度放射光を利用することで、これらの同時解析が可能となる。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、溶液浸透過程にある角層に X 線を照射し、その際に生じる角層の構造変化を観察することで、角層内を透過する物質の透過挙動が見積もられることを示してきた[1]。この手法は個体差がある試料に対しても有効であり、経皮吸収研究に対して多くの新しい情報を提供してきたが、角層の構造に変化が生じないような物質の透過挙動は解析することができなかった。最近、大型放射光施設 SPring-8 に高強度なビームライン (BL03XU) が新設され、シート状の角層 1 枚での構造解析が可能となり、これにより角層間を透過する物質そのものの透過挙動と角層の構造の同時解析が可能となった[2]。

そこで、シート状の試料の構造と物質透過性を同時に計測することができる“外部環境 2 分セル” (特願: 2012-071442) を開発し、角層内を透過する物質の移動特性と構造との関係性、特に温度変化特性を詳細に解析することで、角層の構造と機能 (バリア/吸収特性) の関係性を明らかにすることを目指した。本研究では、生体の基本物質である“水”に着目し、水の移動特性に対する角層構造の寄与の程度を詳細に解析した。

### 3. 研究の方法

(1) 試料のヒト角層は、美容外科手術により不要となった皮膚より分離抽出したものをを用いた (Biopredic 社、フランス)。手術に

よる皮膚の摘出後、同社において直ちに表皮層のみが剥離され、トリプシンなどの酵素処理で角層直下の細胞等を分解した後、水洗して角層を調製している[3]。採取された皮膚を実験に用いることについて、被験者よりインフォームドコンセントが得られており、法令に基づいて皮膚が採取されていることなどが、Biopredic 社において確認されている。さらに、関西学院大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究安全倫理審査委員会においても、当角層試料の実験使用が、問題ないことが承認されている。

(2) 開発した外部環境 2 分セルの概略図を図 1 に示した。角層のようなシート状の試料を入射 X 線に対して 45° 程度傾けて設置することで、試料の表裏の環境を自在に制御しつつ、同時に X 線回折等による構造解析が実施可能となった。また試料の支持台にペルチエ素子を連結することで、試料の温度変化解析にも対応させた。

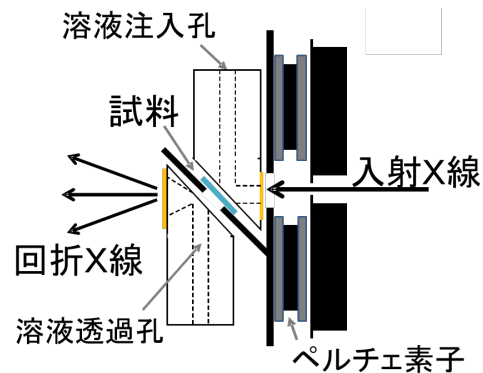


図 1. 外部環境 2 分セルの概略図

(3) 当試料セルの中央に、自重量に対して 25% になるように水和した角層試料を設置し、試料セルの下部を水で満たして (体の内部環境を想定)、また上部に経皮水分蒸散量 (TEWL) 測定装置を連結し、TEWL と角層構造の同時温度変化解析を実施した。

(4) X 線回折実験は SPring-8 の BL03XU (第 2 ハッチ) で実施した。X 線のエネルギーを 14 keV、カメラ長を 50 cm 程度に設定し、小広角同時 X 線散乱実験を実施した。

### 4. 研究成果

外部環境 2 分セルの中央にシート状の角層を設置し、そこに X 線を連続的に照射して回折像を取得しつつ、同時に TEWL を測定し、両者の温度依存性を解析する実験を実施した。この実験では、元来の角層の外表面側が上面 (TEWL 測定側) に、体内側が下面 (水槽側) になるように、外部環境 2 分セル内に角層試料を設置した。系の温度を 20 から 70 まで上昇させて連続的に TEWL 値と X 線散乱像を取得したところ、角層構造由来の反射と TEWL 値の両方が非連続的に変化することがわかった。

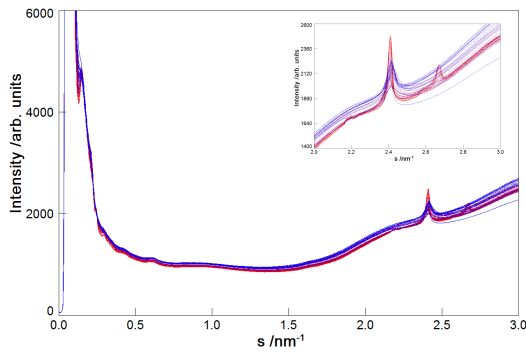


図2. ヒト角層のX線散乱プロファイル (温度変化)

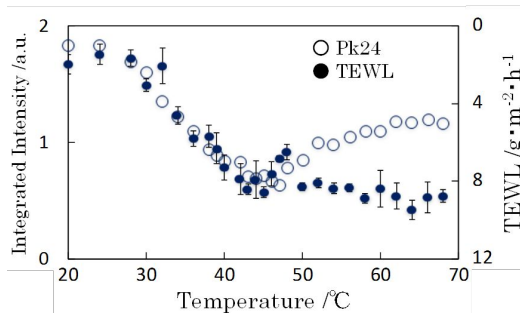


図3. TEWLとPk24の同時温度変化解析

ヒト角層の温度変化X線散乱プロファイルを図2に示した。図2では、20 から70 の昇温過程における小広角散乱プロファイルと広角散乱プロファイル(右上挿入)が、グラデーションカラー(赤 青)で表示されている。このX線散乱プロファイルにおいて、温度相転移に伴う細胞間脂質の側方配列構造である Orthorhombic (Ort) 構造の消失や Hexagonal (Hex) 構造由来ピークのシフトなどの変化が観察された(図2)。これらの相転移温度やその挙動は、これまでに角層試料で観察されている結果とおおよそ一致していた[4]。ここで Hex および Ort 構造由来の  $s=2.4 \text{ nm}^{-1}$  付近のピークを Pk24 とする。Pk24 及び TEWL 値の温度依存性の解析結果を図3で示したが、20 から温度が上昇するにつれて、Pk24 のピーク強度が徐々に低下していき(図3中で  $\circ$  で表示)、おおよそ42 でその変化は一旦収まり、さらに温度を上昇させると、今度は逆にピーク強度が増大していくことがわかった。また、同時に Pk24 のピーク位置を解析したところ、20 ~35 では徐々にピーク位置を小角側(格子間隔が膨らむ方向)にシフトさせるが、35 付近でその変化は収まり、一旦広角側(格子間隔が縮む方向)にシフトして、48 付近で再び小角側へのシフトに転ずることがわかった。通常、温度上昇の過程で単一の相にある分子の格子間隔が、小さくなる方向に構造変化することは考えにくく、この変化には複数の相が混在していることが示唆された。

また同時に測定した TEWL 値の温度変化曲

線は、Ort 構造の消失及び Pk24 の強度低下が生じる 35 付近で上昇し始め、Pk24 の強度が上昇し始める 42 付近に変曲点を持ち、それ以上温度では再び緩やかに上昇することがわかった。これらの温度変化挙動は試料によっても若干異なるが、おおよそ Ort 構造が消失すると TEWL 値は急激に上昇し始め、その変化は Pk24 の強度が増加する温度付近で停止することがわかった。

以上の結果より、角層間の水の移動は、角層内に存在する細胞間脂質の相状態に依存する可能性が示唆された。

<引用文献>

[1] Hatta I., Nakazawa H. et al. (2010) Chem Phys Lipids 163 (4-5) 381-389.

[2] H. Masunaga, et al. (2011) Multipurpose soft-material SAXS /WAXS /GISAXS beamline at SPring-8, Polymer journal 43, 471-477.

[3] H. Nakazawa, et al. (2012) A possible regulation mechanism of water content in human stratum corneum via intercellular lipid matrix, Chem Phys Lipids. 165, 238-243.

[4] J.A. Bouwstra, et al. (1991) Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. J. Invest. Dermatol. 97, 1005-1012.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

加藤 知、中沢 寛光、ヒト皮膚角層の構造と物質透過性、オレオサイエンス、査読なし、15 (11)、2015、5-12

中沢 寛光、極低照射量電子回折法および放射光X線回折法によるヒト皮膚角層微細構造と水分透過性の関係解析、関西学院大学理工学研究科博士学位論文、査読有、2015

H. Nakazawa, T. Imai, I. Hatta, S. Sakai, S. Inoue, S. Kato, Low-flux electron diffraction study for the intercellular lipid organization on a human corneocyte., Biochim. Biophys. Acta, 査読有、1828 (6)、2013、1424-1431

〔学会発表〕(計 6 件)

中沢 寛光 (2015) 電子線回折法及びX線回折法を用いた皮膚角層の構造解析、第4回関西ものづくり技術シーズ発表会(2015年10月1日) 追手門大学(大阪府・大阪市)

S. Yonenaga, H. Nakazawa, T. Uchida,

S. Kato (2015) Development of model lipid membranes to elucidate the role of stratum corneum intercellular lipid lamellar structures in the skin barrier function. The 27th Conference of the European Colloid and Interface Society (2015年9月6日) ボルドー(フランス)

S. Maeda, K. Nakamura, H. Nakazawa, S. Kato (2015) Study on human corneocyte morphology by newly developed non-invasive cryosection electron microscopy. The 27th Conference of the European Colloid and Interface Society (2015年9月7日) ボルドー(フランス)

K. Nakamura, H. Nakazawa, S. Kato (2013) Electron microscopic observation of cryo-ultrathin section of human stratum corneum sandwiched between adhesive tapes. 54th International Conference on the Bioscience of Lipids (2013年9月18日) バリ(イタリア)

H. Nakazawa, T. Imai, I. Hatta, S. kato (2013) Electron and X-ray Diffraction Study on the Intercellular Lipid Organization in Human Skin Stratum Corneum. The 27th Conference of the European Colloid and Interface Society (2013年9月2日) ソフィア(ブルガリア)

I. Hatta, H. Nakazawa, N. Ohta (2013) Disruption and reconstitution of stratum corneum structure by treating with ethanol and acetone - Role of domain with disordered intercellular lipid arrangement (or disorder phase) - Gordon Research Conference Barrier Function of Mammalian Skin (2013年8月19日) ウォーターバレー(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称：敏感肌の評価方法  
発明者：内田 崇志、加藤 知、中沢 寛光  
権利者：花王株式会社  
種類：特許  
番号：2016 - 045327  
出願年月日：2016年3月9日  
国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：試料保持装置および試料分析法  
発明者：中沢 寛光、加藤 知  
権利者：学校法人関西学院

種類：特許  
番号：2013 - 205077  
取得年月日：2013年10月7日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
中沢 寛光 (NAKAZAWA, Hiromitsu)  
関西学院大学・理工学部・教育技術主事  
研究者番号：70411775