

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591637

研究課題名(和文) 自然免疫機構の皮膚角層バリア機能形成における影響

研究課題名(英文) The influence of the innate immune system on the barrier function of the stratum corneum of the skin

研究代表者

菊地 克子 (KIKUCHI, KATSUKO)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50250759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：顔面は皮膚バリア機能が悪く、アクネ桿菌やマラセチアなど皮膚常在菌が発症に関わる酒さやざ瘡、脂漏性皮膚炎が好発する部位である。そこで、額、眼瞼、頬、耳、鼻、額の各部位により皮膚生理機能の違いがあるか、そして皮膚常在菌の自然免疫を介する皮膚機能への影響について調べた。酒さの病変がでにくい眼瞼や脂漏性皮膚炎がでにくい耳たぶでは、皮脂量が頬などとくらべて非常に低値で、好脂性菌であるマラセチアが増殖しにくい環境であることがわかった。顎など口周囲の皮膚は皮脂量が多くしかもバリア機能が不良であることが示され、酒さの類縁疾患の口囲皮膚炎の発症に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The barrier function of the skin on the face is deteriorated as compared to that of the skin of other part and rosacea, acne and seborrheic dermatitis are often observed on the face. The lipophilic skin flora such as p. acnes and malassezia have been implicated as causative agents of acne, rosacea and seborrheic dermatitis, respectively. In healthy control, the skin surface lipid level on the eyelid skin and earlobe skin, where rosacea and seborrheic dermatitis hardly observed, found to be significantly lower than on the cheek skin. In addition to the higher skin surface lipid level, the barrier function of the stratum corneum on the perioral skin assessed by TEWL was found to be more deteriorated than on the cheek. The impaired barrier function on the perioral skin might affect to the development of the perioral dermatitis, related disorder to rosacea.

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：皮膚バリア機能 角層 自然免疫 アトピー性皮膚炎 尋常性ざ瘡 脂漏性皮膚炎 酒さ

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体防御臓器としての皮膚

物理的透過バリアとしての角層と角層維持機構

皮膚は様々な外的因子から生体を守るバリアとして、生体最外層に位置して生体内の保護機能を担う。その機構として、a) 強固な蛋白膜である周辺体(角化外膜)を有する角層細胞とその間の細胞間脂質から構成される皮膚最表層の角層、b) 細胞間脂質による皮膚表面のpHの弱酸性化を機序とするacid mantleと呼ばれる細菌増殖抑制層の形成(*Dermatology* 1995;191(4):276-80)、c) 角層による水分保持機能による表皮pHの調整と落屑(角層の脱落)の調整(*J Invest Dermatol* 2005; 125: 183-200)などが挙げられ、これらの協調により表皮機能の恒常性を維持している。また角層は化学的バリアとしての機能も有する。d) 表皮角化細胞より分泌され角層に蓄積される抗菌ペプチドは表皮での病原性細菌増殖を抑制し(*Eur J Dermatol* 2008; 18: 11-21)、e) 角層に含有されるサイトカインや補体活性化因子などは起炎物質として炎症や免疫応答にも関わる(*J Invest Dermatol* 1989; 92(4): 596-7)。さらに、角層を通過した病原体は生きた表皮層において toll-like 受容体(TLR)に関知され、自然免疫、さらには獲得免疫機構を介した免疫反応が惹起される(*Nat Immunol* 2010; 11(5): 373-84)。これらの角層・表皮機能により、生体内の恒常性が維持されている。

免疫・炎症反応と角層バリア機能の相互関係

一方、炎症・免疫反応は表皮角化細胞の増殖と分化・角化に影響し、結果として角化細胞の最終産物である角層の機能にも影響する。私たちは、新生児の皮膚バリア機能を評価し、後にアトピー性皮膚炎(AD)を発症した児でも生直後には皮膚透過バリアの機能低下はみられず、ADの皮疹が生じた後に機能低下が起こることを確認した(*Pediatr Dermatol.* 2006)。この結果は、ケラチンの重合と角層の天然保湿因子として作用するフィラグリンの遺伝子異常が10-20%のAD患者で見出されている(*Nat Genet* 2006; 38: 441-6, *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 434-40)が、その他の患者における角層機能異常はフィラグリンの遺伝子レベルでの異常では説明されないことにも符合し、皮膚炎発症機序が皮膚バリア機能に影響することを示唆する。後に、Th2型サイトカインであるIL-4やIL-13がフィラグリン遺伝子の発現を抑制すること(*J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 150-5)や、IL-4やIL-13が角層細胞間脂質の合成の抑制を解してバリア機能低下をもたらす可能性が報告されている(*J Invest Dermatol* 2005; 124(4): 786-92)。すなわち、角層バリア異常は遺伝だけでなく炎症に伴って二次的にもたらされ、免疫学的異常と皮膚バリア機能低下がADの皮膚炎病

態の形成に関与している。

自然免疫機構が皮膚バリア機能に影響を与えうる

ADの病変部には黄色ブドウ球菌のコロニゼーションがみられ菌の産生する毒素やプロテアーゼによる角層のバリア障害を惹起することが知られている。黄色ブドウ球菌はまた、角化細胞あるいは単球などの免疫担当細胞のToll-like受容体・TLR2を介した自然免疫を誘導する。私たちは、TLR2刺激が表皮角化細胞のSCTE(kallikrein 5)の発現を誘導することを確認した(*J Invest Dermatol* 2010; in press)。セリンプロテアーゼであるSCTE(kallikrein 5)は、コルネオデスモゾームを分解し角層細胞の落屑を促すことが知られており(*J Invest Dermatol* 2004; 122(5): 1235-44)、またSCTE阻害分子であるLEKT1の遺伝子異常症であるNetherton症候群患者ではSCTE活性の異常亢進と角層バリア機能低下に伴うAD様皮膚炎が認められる(*Nat Genet* 2000; 25(2): 141-142)。これらのデータは、TLR2刺激によるSCTEの異常は角層機能異常を起こすことを示唆する。AD患者においては、TLR2刺激応答の変調がみられることが報告されており(*Exp Dermatol* 2010 19: 296-8)、前述の炎症性サイトカインによる作用と共に、自然免疫機能が皮膚疾患と皮膚機能恒常性維持に影響を与えることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、自然免疫機構が表皮角層機能に与える影響を検討することを目的とする。生体計測検査ならびに非侵襲的に採取された角層など生体標本を解析することにより、皮膚のバリア機能が、免疫・炎症反応とどのように協調し合って機能維持をしているのかを検討する。特にADにおいては黄色ブドウ球菌の、尋常性痤瘡においてはアクネ桿菌の病態形成へ関与を自然免疫と角層機能の側面から検討する。

3. 研究の方法

ヒト角層での細菌・真菌の解析ならびに抗菌ペプチドcathelicidin、落屑調整プロテアーゼなどの定量により自然免疫の病態形成への関与をアトピー性皮膚炎および尋常性痤瘡ならびに脂漏性皮膚炎を疾患モデルに検証し、自然免疫の変調が角層異常を起こす機序を解明する目的で、ヒト皮膚での細菌叢の評価と皮膚機能との関連の検討を行った。皮膚機能評価では、尋常性痤瘡の類縁疾患である酒皸ならびに口囲皮膚炎患者も対象に加えた。

(1) 健常人における顔面の皮膚機能の部位別検討

顔面皮膚では脂漏性皮膚炎が健常人においても発症する可能性があるが、脂漏性皮膚炎の発症には、マラセチアの関与が示唆されている。部位による皮膚機能ならびに皮膚細菌叢・真菌叢の変化があるかを検討した。酒皸

では眼瞼に病変が生じないことを考えて、下眼瞼の皮膚機能がその他の部位と異なるかどうかについて検討した。また、耳前庭が脂漏性皮膚炎の好発部位であるのに対して、耳前部や耳後部は耳前庭皮膚や頬(特に頬の内側)、鼻唇溝部などよりも脂漏性皮膚炎の発症頻度が低く、耳朶はさらに頻度が低いことから耳朶、耳前部、耳後部皮膚の検討を行った。

検討部位：額、頬、下眼瞼、鼻背、上口唇白唇部、顎部、耳朶(耳たぶ)、耳前部、耳後部

皮膚機能評価方法：被験者は、室温 21 ± 1 、相対湿度 $50 \pm 3\%$ の一定室内環境に保った恒温恒湿測定室に入り、15分間安静にして試験部位を露出させて馴化した後、以下の測定機器での非侵襲的測定による皮膚機能の評価を行った。

- 1.角層水分量(Skicon200EXで高周波伝導度を測定)
- 2.皮膚バリア機能(Tewameterなどで経表皮水分喪失量TEWL; transepidermal water lossを測定)
- 3.皮膚表面pH(Skin-PH-meter)
- 4.皮表脂質量(Sebumeter)

(2) ADにおける皮膚バリア機能低下と自然免疫との関連

まずAD患者の皮膚機能は以下の様に行った。

検討部位：頬、前腕屈側

皮膚機能評価方法：被験者は、室温 21 ± 1 、相対湿度 $50 \pm 3\%$ の一定室内環境に保った恒温恒湿測定室に入り、15分間安静にして試験部位を露出させて馴化した後、以下の測定機器での非侵襲的測定による皮膚機能の評価を行った。

- 1.角層水分量(Skicon200EXでの高周波伝導度測定)
- 2.皮膚バリア機能(Tewameterでの経表皮水分喪失量TEWL測定)
- 3.皮膚刺激知覚応答性(Neurometer SPT/C知覚神経自動検査装置)

(3) 痒瘡ならびに酒皰、口囲皮膚炎患者における面皰形成、皮膚バリア機能変調と自然免疫との関連

検討部位：額、頬、下眼瞼、鼻背、上口唇白唇部、顎部

皮膚機能評価方法：被験者は、室温 21 ± 1 、相対湿度 $50 \pm 3\%$ の一定室内環境に保った恒温恒湿測定室に入り、15分間安静にして試験部位を露出させて馴化した後、以下の測定機器での非侵襲的測定による皮膚機能の評価を行った。

- 1.角層水分量(Skicon200EXでの高周波伝導度測定)
- 2.皮膚バリア機能(Tewameterなどでの経表皮水分喪失量TEWL; transepidermal water loss測定)
- 3.皮膚表面pH(Skin-PH-meter)
- 4.皮表脂質量(Sebumeter)

(2)(1)において、皮膚機能測定を行った健常ならびに皮膚疾患を有する患者の皮膚表面か

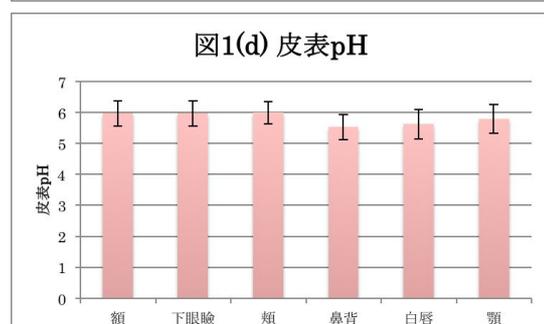
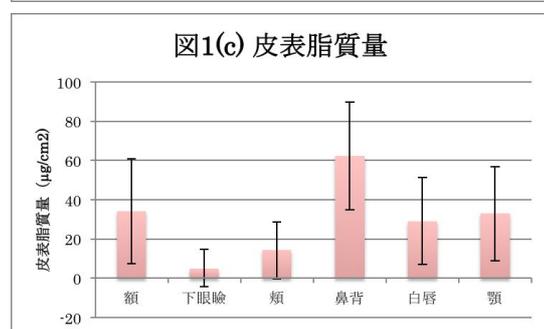
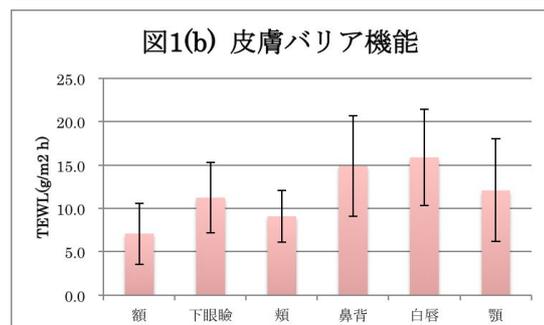
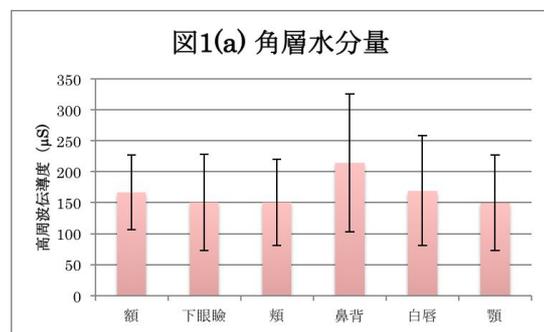
らテープストリッピングで角層を採取し、皮膚表面菌叢の解析と、TRR2, SCCE (kallikrein 7), SCTE (kallikrein 5)の発現分析を行い、自然免疫と皮膚バリア機能など皮膚生理機能との関連について検討した。

4. 研究成果

(1) 皮膚機能評価

健常人における部位別の皮膚機能の検討

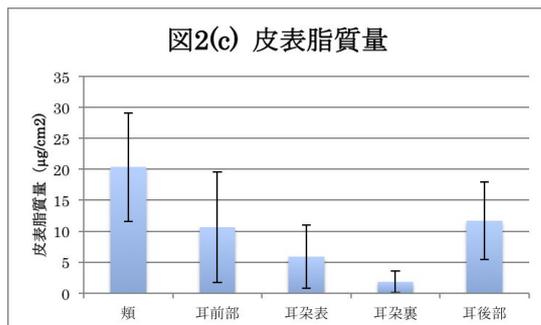
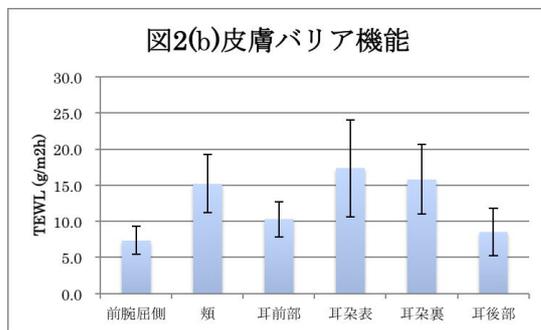
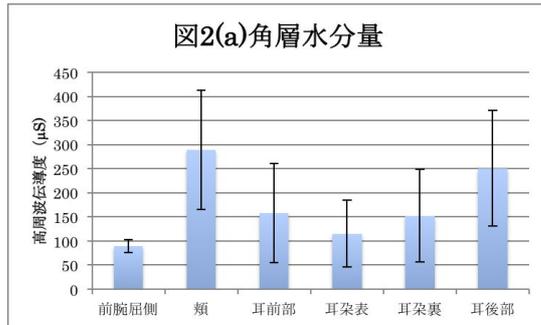
1. 額、下眼瞼、頬、鼻背、顎を中心に角層水分量、皮膚バリア機能、皮表脂質量、皮表PH値をそれぞれ図1a, b, c, dに示す。鼻背、白唇、顎、下眼瞼皮膚でTEWLが高値傾向であった。酒皰病変の発症が少ない下眼瞼部では皮表脂質量が低値であった。マラセチアやアクネ桿菌は好脂性であることから、眼瞼皮膚はこれらの菌の生息には適しないため、酒皰の病変が起こりにくい可能性が示唆された。



2. 耳朶を中心に

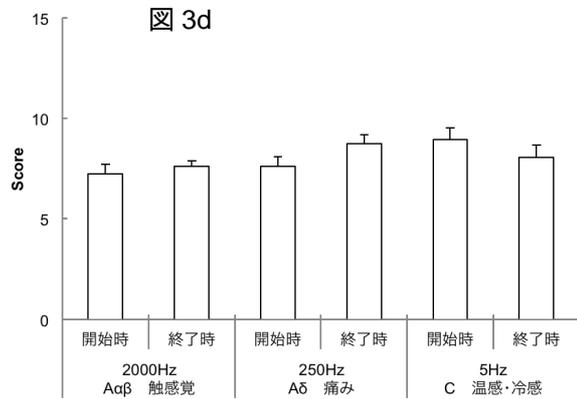
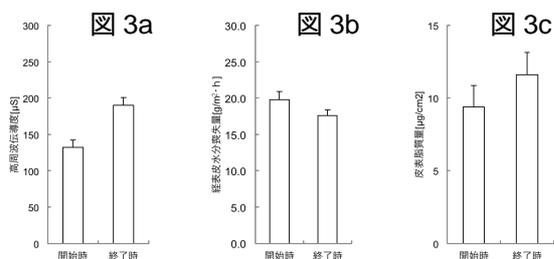
角層水分量、皮膚バリア機能、皮表脂質量、をそれぞれ図 2a, b, c に示す。

耳朶皮膚は頬部皮膚と TEWL 値がほぼ同様な値であり、バリア機能に関してはほぼ同等であると考えられた。皮表脂質量が著明に低値であることにより、好脂性のマラセチアが息しにくい環境であることが示唆された。



AD の顔面皮膚での皮膚機能の検討

アトピー性皮膚炎患者の顔面皮膚で保湿剤による適切なスキンケアの前後で角層水分量が増加して保湿機能が改善されるだけでなく、TEWL 値が低下し、皮膚バリア機能が改善することを示した。同時に測定した皮表脂質量は治療後に増加し、250Hz での電気刺激閾値が増加した。角層水分量、皮膚バリア機能、皮表脂質量、電気刺激閾値をそれぞれ、図 3a, b, c, d に示す。



③酒皰、口囲皮膚患者での皮膚機能の検討
解析に必要な症例数が不足しているためかもしれないが、治療により病変部が軽快すると、皮膚バリア機能指標の TEWL 値が低下する傾向を示した。

(2)角層剥離サンプルを用いた皮膚細菌叢の解析と TRR2, SCCE (kallikrein 7), SCTE (kallikrein 5) の発現分析
テープストリッピングならびにシアノアクリレートでの角層ならびに微少面皸剥離サンプルに関しては、現在症例数を増やして解析をすすめている。

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 32 件)

研究代表者

Watabe, A., Sugawara, T., Kikuchi, K., Yamasaki, K., Sakai, S., and Aiba, S. (2013) Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. *J Dermatol Sci* (査読有)72, 177-182.

doi:10.1016/j.jdermsci.2013.06.005.

菊地 克子、スキルアップのための Q&A
バリア機能の測り方を教えてください、皮膚アレルギーフロンティア(査読無) 11 巻 3 号 2013 年、174-174.

菊地 克子、【スキンケア-乳幼児から高齢者まで-】
皮膚バリア機能とスキンケア、*Derma.* (査読無) 210 号 2013 年、31-36.

菊地 克子、小澤 麻紀、相場 節也、森田 栄伸
適切な顔面のスキンケアがアトピー性皮膚炎患者の皮膚生理機能と QOL に及ぼす影響、*西日本皮膚科*(査読有)75 巻 1 号 2013 年、65-71.

菊地 克子、【アトピー性皮膚炎の発症とバリア機能】
バリア機能と易刺激性、アレルギーの臨床(査読無) 33 巻 2 号、2013 年、138-141.

菊地 克子、【かゆみ大全】
よくある痒みの対処法 頭皮の痒みとフケ、*JIM: Journal of Integrated Medicine*(査読無) 23 巻 2 号

2013年、126-128.

Sugawara T, Kikuchi K, Tagami H, Aiba S, Sakai S. (2012) Decreased lactate and potassium levels in natural moisturizing factor from the stratum corneum of mild atopic dermatitis patients are involved with the reduced hydration state. *J Dermatol Sci* (査読有) **66**, 54-9. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.06.005.

菊地 克子、【乾燥肌】環境とドライスキン 低湿度環境が皮膚に与える影響. *Derma.* (査読無) 196号、2012年、63-67.

菊地 克子、【乾燥肌】顔面の「乾燥肌」. *Derma.* (査読無) 196号、2012年、56-61.

菊地 克子、【脂漏性皮膚炎を極める】脂漏性皮膚炎とスキンケア. *Derma.* (査読無) 195号、2012年、55-59.

菊地 克子、【冬場の乾燥対策とスキンケア】冬場の環境が皮膚にもたらす影響とはおはよう(査読無)2123巻2号、2012年、12-15.

菊地 克子、ざ瘡と酒さの最新の知見(基礎から臨床まで) 酒さの治療の今後の展開 日本皮膚科学会雑誌(査読無)121巻13号、2011年、2855-2857.

研究分担者

山崎研志 (2013) 【Common disease 鑑別マニュアル「初診に帰って考えよう」】感染症ざ瘡「たかがニキビと思うなかれ」. *Derma.* (査読無), 41-44

Tsuchiyama, K., Wakao, S., Kuroda, Y., Ogura, F., Nojima, M., Sawaya, N., Yamasaki, K., Aiba, S., and Dezawa, M. (2013) Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* (査読有) **133**, 2425-2435. doi: 10.1038/jid.2013.172.

Takahashi, T., Kimura, Y., Niwa, K., Ohmiya, Y., Fujimura, T., Yamasaki, K., and Aiba, S. (2013) In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape-stripping. *J Invest Dermatol* (査読有) **133**, 2407-15. doi:10.1038/jid.2013.163.

Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., Koyanagi, Y., Blauvelt, A., and Shimada, S. (2013) Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells. *Cell host & microbe* (査読有) **13**, 77-86. doi: 10.1016/j.chom.2012.12.002.

Macleod, D. T., Nakatsuji, T., Yamasaki, K., Kobzik, L., and Gallo, R. L. (2013)

HSV-1 exploits the innate immune scavenger receptor MARCO to enhance epithelial adsorption and infection. *Nature communications* (査読有) **4**, 1963. doi: 10.1038/ncomms2963.

Kuo, I. H., Carpenter-Mendini, A., Yoshida, T., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Barnes, K. C., Gallo, R. L., Borkowski, A. W., Yamasaki, K., Leung, D. Y., Georas, S. N., De Benedetto, A., and Beck, L. A. (2013) Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol* (査読有) **133**, 988-998. doi: 10.1038/jid.2012.437.

Coda, A. B., Hata, T., Miller, J., Audish, D., Kotel, P., Two, A., Shafiq, F., Yamasaki, K., Harper, J. C., Del Rosso, J. Q., and Gallo, R. L. (2013) Cathelicidin, kallikrein 5, and serine protease activity is inhibited during treatment of rosacea with azelaic acid 15% gel. *J Am Acad Dermatol* (査読有) **69**, 570-577. doi: 10.1016/j.jaad.2013.05.019.

山崎研志. (2012) 【皮膚免疫学-免疫臓器としての意義と病態】皮膚疾患と自然免疫. *医学のあゆみ* (査読無) **242**, 785-790.

山崎研志. (2012) 【皮膚科最新治療のすべて】酒さ 自然免疫病態論に基づく治療. *Derma.* (査読無), 26-33.

山崎研志. (2012) 自然免疫に基づく酒さ病態論. *皮膚病診療* (査読無) **34**, 235-240.

山崎研志. (2012) 各科臨床のトピックス 酒さの病因 自然免疫機構からみた最近の進歩. *日本医師会雑誌* (査読無) **140**, 2144-2146.

Morizane, S., Yamasaki, K., Muhleisen, B., Kotel, P. F., Murakami, M., Aoyama, Y., Iwatsuki, K., Hata, T., and Gallo, R. L. (2012) Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol* (査読有) **132**, 135-143. doi: 10.1038/jid.2011.259.

Morizane, S., Yamasaki, K., Kajita, A., Ikeda, K., Zhan, M., Aoyama, Y., Gallo, R. L., and Iwatsuki, K. (2012) TH2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (査読有) **130**, 259-261 e251. doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.006.

山崎研志. (2011) ざ瘡と酒さの最新の知見(基礎から臨床まで) 酒さの発症メカニズムとその最新知見 自然免疫機構の皮膚疾患に与える影響. *日本皮膚科学会雑誌* (査読無) **121**, 2852-2854.

山崎研志. (2011) 抗菌ペプチド 免疫反応を目覚めさせる"alarmin"としての作用.

西日本皮膚科 (査読無)73, 3-7.

山崎研志. (2011)【最近のトピックス 2011 Clinical Dermatology 2011】皮膚疾患の病態 酒さをめぐる新しい病態論. *臨床皮膚科* (査読無)65, 56-59.

Yamasaki, K., Kanada, K., Macleod, D. T., Borkowski, A. W., Morizane, S., Nakatsuji, T., Cogen, A. L., and Gallo, R. L. (2011) TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes. *J Invest Dermatol* (査読有)131, 688-697. doi: 10.1038/jid.2010.351.

Yamasaki, K., and Gallo, R. L. (2011) Rosacea as a disease of cathelicidins and skin innate immunity. *J Invest Dermatol Symp Proc* (査読有)15, 12-15. doi: 10.1038/jidsymp.2011.4.

Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., and Aiba, S. (2011) An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* (査読有)124, 359-369. doi: 10.1093/toxsci/kfr237.

Muto, J., Naidu, N. N., Yamasaki, K., Pineau, N., Breton, L., and Gallo, R. L. (2011) Exogenous addition of a C-xylopyranoside derivative stimulates keratinocyte dermatan sulfate synthesis and promotes migration. *PLoS One* (査読有)6, e25480. doi: 10.1371/journal.pone.0025480.

〔学会発表〕(計 3 件)

研究代表者

菊地克子、皮膚のバリア機能障害と疾患乾燥肌とバリア機能、第 112 回日本皮膚科学会総会、2013 年 6 月 16 日、横浜市

菊地克子、皮膚生理学的検査とその読み方、第 111 回日本皮膚科学会総会、2012 年 6 月 3 日、京都市

菊地克子、酒皸治療の現状と今後の展望、第 111 回日本皮膚科学会総会、2012 年 6 月 2 日、京都市

〔図書〕(計 3 件)

研究代表者

菊地克子、シーエムシー出版、美肌科学の最前線「老化と皮膚生理指標の変化」、2014 年、54-60.

菊地克子、診断と治療社、女性の皮膚トラブル Q&A「女性の皮膚は男性とどう違う?」、2012 年、2-4.

菊地克子、診断と治療社、思春期の皮膚トラブル Q&A「思春期皮膚トラブルとスキンケアのポイントは?」、2012 年、35-38.

(1)研究代表者

菊地 克子 (KIKUCHI, KATSUKO)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号: 50250759

(2)研究分担者

山崎 研志 (YAMASAKI, KENSHI)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 40294798