

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 4 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659518

研究課題名（和文） スピンラベル法を用いた皮膚バリアー機能を簡便に測定する画期的なシステム確立

研究課題名（英文） Establishment of method using spin labeling that evaluates function and structure of lipids between corneal layers.

研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)

弘前大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：60196334

研究成果の概要（和文）：皮膚の最外層にある角質層の主な機能はバリアー機能や防御機能である。その保持に不可欠であるのが、角質細胞と細胞間脂質である。スピンラベル法は、脂質2重層のプローブの運動性を測定する、鋭敏な非破壊的な方法である。このラベルした脂質を、角層間脂質に取り込ませ、電子スピン共鳴スペクトルを検出し、角質細胞間脂質の構造を評価する方法論を確立するのが、本研究の目的である。我々は、乾癬の角質がコントロールの角質と比較して構造が不整であることを見出した。この結果は、本法以外の過去の報告と一致していた。そのため、本法は、角質の機能やその他の疾患に評価にも有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Stratum corneum is the most outer layer of the skin and has barrier and defense function. Corneocytes and lipids between keratinocytes play an important role in the function. Spin labeling method is a sensitive and nondestructive technique to measure the probe mobility in the lipid bilayers. In this study, we introduced the probe into stratum corneum and evaluate function and structure of the lipids between corneal layers. We found that the pv-SC was less ordering of the structure than that of the control SC, indicating abnormal architecture of psoriasis vulgaris stratum corneum. This result is consistent with previous observations in the different methods. Therefore, we suggest that this EPR assay is of great use for evaluating SC function and can be extended to other skin diseases with abnormal keratinization.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

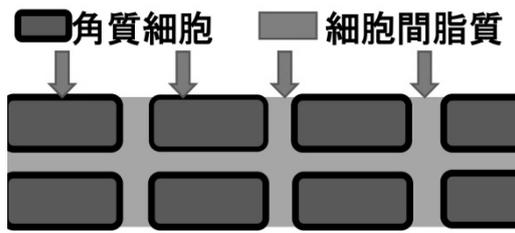
研究分野：医歯薬学

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、角化症、角質間脂質、スピンラベル、ラジカル

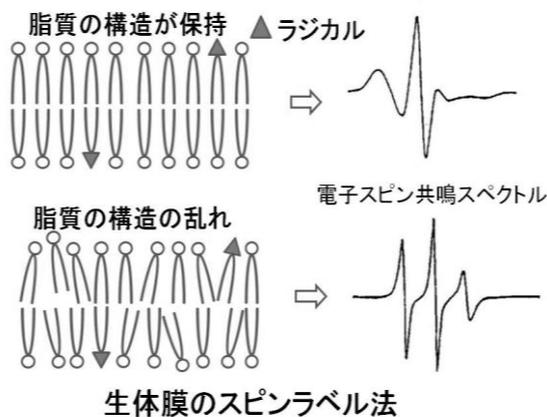
1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層にある角質層の主な機能はバリアー機能や防御機能である。その保持に不可欠であるのが、角質細胞と細胞間脂質である（下図）。



角質細胞と細胞間脂質

角層機能の評価は、組織化学・電顕などからある程度の情報が得られるが、生検が必要となり経時的な検討は難しい。そのため、臨床の場では角質水分量や経皮水分蒸発量 (TEWL) を指標とするが、もちろん角層の構造や機能を直接反映するものではない。また、爪甲異常を検出するような検査法もない。このような状況で、もし、角層の構造を簡単に測定する新しい方法論が開発できれば、画期的な萌芽システムになることは間違いない。近年、生体膜の構造状態を評価する方法としてスピララベル法が確立している。対にならない不對電子をもつのがラジカルであり、電子スピン共鳴法にて、極めて低い濃度でも、スペクトルとして検出される。このラジカルで標識した脂質を生体膜に取り込ませ、電子スピン共鳴スペクトルを解析することによって、生体膜の構造状態を決定することが可能になった。これが、生体膜のスピララベル法である (下図)。



2. 研究の目的

このラベルした脂質を、角層間脂質に取り込ませ、電子スピン共鳴スペクトルを検出し、角質細胞間脂質の構造を評価する方法論を確立するのが、本研究の目的である。そのために、アトピー性皮膚炎や魚鱗癬モデル動物を使用して、角質の水分量や TEWL、電顕・組織化学、と比較し、本法の有用性を証明する。また、アトピー性皮膚炎など、角層の機能異常がみられる疾患で、患者の角層を採取し電子スピン共鳴のスペクトルを検討する。さらに、ほとんど検査法がない爪甲疾患でも本法で早期に爪甲異常を発見できるかも試みる。本法の学術的な特色は、スピララベル法という皮膚科領域で新しい方法に着目し、角層細胞間脂質の構造を予想し、角質機能評価に発展させるという斬新な観点からの独創的な発想である。予想される結果は、新しい角質機能測定法の確立であり、角質細胞間の脂質構造を正確に把握できれば、細胞間脂質が関連するような新しい機序による皮膚疾患の発見や、脂質構造を標的とする画期的な治療法などの開発に展開される可能性もあり、その臨床的な意義は非常に大きい。

3. 研究の方法

マウスにおける角層の電子スピン共鳴の測定の確立：正常のマウスの毛を脱毛する。シアノアクリレートを滴下したスライドを直接皮膚につける。スピララベルである 5-doxyl stearic acid (5-DOSA) 溶液で角層を処理。新しく作成した電子スピン共鳴用のホルダーにその角層を取りつける。X-band 電子スピン共鳴装置 (図：中川研究室) にてスペクトルを検出する。スピララベルが伝える角層の構造情報を正しく把握するため、スペクトルのピーク距離のみならず、スペクトル全体を解析する。PC プログラムにて、シュミレーション解析を行い、脂質鎖の秩序度 (S) を

算出する。Sは、 $0 < S < 1$ の値をとり、0に近づくほど脂質は配向性が低く、構造的に乏しい状態になる。

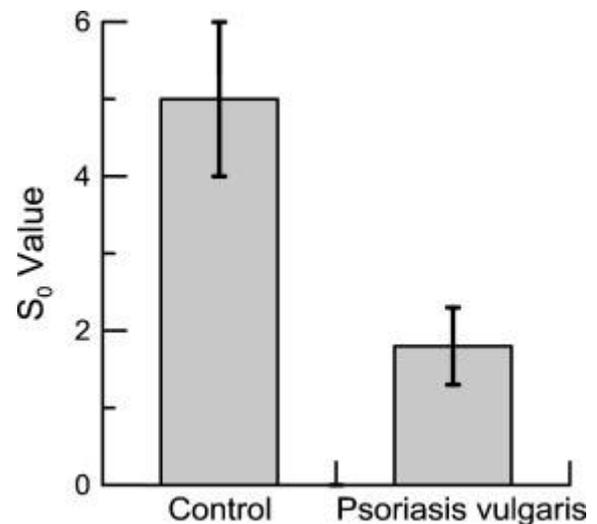
(1) 健康人での検討：いろいろな年齢の健康人ボランティアから、皮膚や爪甲の状態を観察。角質水分量や TEWL 測定、さらに皮膚や爪甲のダーモスコピー像を記録する。前腕内側部や爪甲から角層を採取し、5-DSA でラベルし、電子スピン共鳴スペクトルを取り解析する。臨床状態、ダーモスコピー所見、角質水分量・TEWL など、電子スピン共鳴の結果と比較検討する。

(2) 皮膚疾患での検討：弘前大学皮膚科外来に通院中の患者、特に、アトピー性皮膚炎、皮脂欠乏性湿疹、脂漏性湿疹、手湿疹、乾癬、爪甲異常症などについて、同意書を取る。それらの患者について、臨床状態、角質水分量・TEWL、スペクトルを比較検討する。治療前の状態、経過を観察し、治療効果との関連なども併せて検討する。

4. 研究成果

本皮膚の最外層にある角質の主たる機能はバリアー・防御機能であり、その機能のためには、角質細胞はもとより角質細胞間のスペースの構造や機能が重要である。角質細胞間には、脂質の2重層からなる生体膜によく似た脂質2重層が水層をはさみ、ミルフィューユのような連続的なラメラ（層状）構造をとっている（右図）。そのため、本法では、生体膜に類似した脂質2重層に、ラジカル標識した脂質が大量に取り込まれ、明確な電子スピン共鳴スペクトルを検出できると考えた。実際に、マウスにおける研究では、本法において角層や生体膜の機能や構造を適切に評価できることが分かった。さらに、人の健康人でもおこなったところ、外見で角質異常が観察される状態では電子共鳴スペクトラムに異常がでることが考えられた。このような

基礎的な実験を基礎に、皮膚疾患について検討した。今回は、乾癬について詳しく検討したところ、乾癬において異常があることが判明した（下図）。この結果は、英文で報告した (Nakagawa K, et al. J Dermatol Sci, 2012)



本法は、細胞間脂質を評価する新しい方法論であると同時に、爪甲の構造を評価できる初めての検査法となる。現在、臨床で角層のバリアー機能測定でよく用いられる角質水分量や経皮水分蒸発量 (TEWL) は、角層の総合的な評価法である。今回のスピンラベル法では、ラベルした脂質は細胞間の脂質2重層に取り込まれ、角質細胞の中には取り込まれない。従って、本法は細胞間脂質の構造や機能を反映するものであり、今までにはなかった画期的な新方法論と言える。また、爪甲異常を伴う多くの皮膚疾患があるが、その異常を検知する有効な方法がない。本法で爪甲の微細な異常を早期に発見できるようになれば、爪甲異常の診療に有用な革新的な検査法となりうる。そこで、乾癬における爪甲の異常についても検討した。その結果、爪の異常も本法で評価できる可能性が示唆された。この結果は英文で報告した。(Nakagawa, et al. Skin Res Technol, 2013)

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7件)

- (1) Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D: EPR spectroscopic investigation of psoriatic finger nails. 査読有. Skin Res Technol. 2013 Mar 22. doi: 10.1111/srt.12068.
- (2) Nakagawa K, Minakawa S, Sawamura D: Spectroscopic evidence of abnormal structure of psoriasis vulgaris stratum corneum. 査読有. J Dermatol Sci. 2012;65(3):222-224. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.01.002
- (3) Rokunohe D, Akasaka E, Rokunohe A, Kaneko T, Matsuzaki Y, Takiyoshi N, Aizu T, Nakano H, Sawamura D: Multiple aplasia cutis congenita lesions located along Blaschko's lines in a patient with tetralogy of Fallot-A. J Dermatol Case Rep. 査読有. 2012; 6(2):40-42. doi: 10.3315/jdcr.2012.1096.
- (4) Minakawa S, Matsuzaki Y, Nakano H, Sawamura D, Elenitsas R: Acantholysis caused repeated hemorrhagic bullae in a case of acantholytic acanthoma. 査読有. J Dermatol. 2012; 39(12): 1107-1108. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01564.x.
- (5) Korekawa A, Kaneko T, Hagiwara C, Nakajima K, Takayuki A, Nakano H, Sawamura D: Angiolymphoid hyperplasia

with eosinophilia in infancy. 査読有.

J Dermatol. 2012; 39:1052-1054. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01578.x

- (6) Asahina A, Ishiko A, Saito I, Hasegawa K, Sawamura D, Nakano H: Grover's disease following multiple bilateral blaschko lines: A Rare Clinical Presentation with Genetic and Electron Microscopic Analyses. 査読有. Dermatology. 2012; 225(2):183-187. doi: 10.1159/000343172.
- (7) Minakawa S, Matsuzaki Y, Rokunohe D, Akasaka E, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Takashima T, Sawamura D: A Case of Erythema Nodosum Associated with Subareolar Abscess. 査読有. Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, 2012; 2: 263-264. doi:10.4236/jcdsa.2012.24049

[学会発表] (計5件)

- ① 中島康爾、赤坂英二郎、六戸亜希子、六戸大樹、皆川智子、会津隆幸、中野 創、澤村大輔: 骨膜性軟骨腫との鑑別を要した爪下外骨腫の1例. 日本皮膚科学会青森地方会第359回例会, 2012.9.2. 青森市
- ② 澤村大輔: 遺伝性掌蹠角化症. 第27回角化症研究会、2012.8.4. 東京都
- ③ 澤村大輔: 表皮水疱症の医療環境について 日本: 東北地域の医療環境. 表皮水疱症友の会 DebRA Japan(NPO 法人)5周年記念 表皮水疱症アジア交流大会 in 札

幌、2012. 7. 21-22. 札幌市

④ 澤村大輔：遺伝子掌蹠角化症の病態と臨床. 愛知県皮膚科領域教育セミナー, 2012. 7. 5. 名古屋市

⑤ KANEKO T, KOREKAWA A, AKASAKA E, NAKANO H, SAWAMURA D: Amelanotic malignant melanoma with rhabdoid features, a rare variant of malignant Melanoma. 2nd Eastern Asia Dermatology Congress, 2012. 6. 13-15. Beijing (China)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授
研究者番号：60196334

(2) 研究分担者

赤坂 英二郎 (AKASAKA EIJIRO)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30436034