

細胞間脂質に着目した皮膚疾患モデルの構造解析と治療薬開発への応用 Structural Analysis of Intercellular Lipid Model of Skin Disease and Development of Treatment Formulation

小幡 誉子^a, 佐野 啓^a, 吉田 真也^a, 太田 昇^b, 八木 直人^b, 高山 幸三^a
Yasuko Obata^a, Hiromu Sano^a, Shinya Yoshida^a, Noboru Ohta^b, Naoto Yagi^b, Koza Takayama^a

^a星薬科大学, ^b(公財)高輝度光科学研究センター
^aHoshi University, ^bSPRING-8/JASRI

皮膚角層中の細胞間脂質はラメラ構造を形成し、生体の脱水や異物侵入を防ぐバリアとして機能している。近年、アトピー性皮膚炎では細胞間脂質中の微量成分の比率に違いがあることが報告されたことから、これらの脂質組成にもとづいて微量脂質を配合した脂質モデルを調製した。その結果、形成されるラメラ構造が正常皮膚のモデルと異なることが示された。これらの微細構造より、アトピー性皮膚炎角層では物質透過が亢進している可能性が示唆された。

キーワード： 皮膚角層、アトピー性皮膚炎、細胞間脂質、ラメラ構造

背景と研究目的：

現在罹患率の高い皮膚疾患の1つであるアトピー性皮膚炎は、改善治療薬がないことから、対症療法として進行の抑制や生活環境の改善が行われている。アトピー性皮膚炎では、外因性物質の侵入に対するバリア機能が低下しており、皮膚からの水分蒸散量の増大も報告されている。このようは背景のなかで、近年、バリア機能の本質である角層細胞間脂質の変化が主たる原因として見直されている。ヒトの角層細胞間脂質では、約6 nm および13 nm の周期性を持ったラメラ、さらに一定の格子面間隔を有する充填構造が形成されている。これまでの報告では、13 nm の周期を持つ長周期ラメラがバリア機能に非常に重要であり、アトピー性皮膚炎ではこのラメラ周期が、本来の13 nm よりも短くなっているとの報告もある。また、細胞間脂質構成成分の変化に関しては、セラミド量の減少が報告されてきたが、現在同定されているヒト角層細胞間脂質の12種のセラミドのうち、その減少は特定のセラミドに限られている。このように、アトピー性皮膚角層におけるバリア機能の低下は、細胞間脂質のもつ微細構造の変化と関連している可能性が考えられるが、その点に焦点を絞った研究は行われていない。

最近、アトピー性皮膚炎を発症させたモデル動物角層の定量的解析から、細胞間脂質に微量に含まれるスフィンゴシンおよびスフィンガニンの比率が正常皮膚とは異なっていることが報告された。スフィンゴシンおよびスフィンガニンは、それぞれ、セラミドの骨格となる前駆体、およびセラミドの代謝産物である。これまでの検討から、細胞間脂質の脂質構成比の違いは、相転移温度や形成する微細構造を左右する大きな要因であることがわかっている。したがって、これらの微量成分がバリア機能の本質である微細構造を支配する可能性も予想できる。

そこで、本研究では、まず角層細胞間脂質の主要成分と微量脂質の比率をもとに、アトピー性皮膚炎角層モデル(ASM)を調製し、正常皮膚角層モデル(NSM)とのバリア機能に寄与する微細構造の違いを知ることを目的とした。さらに、これまで報告例のない、スフィンゴシンおよびスフィンガニンの微細構造への影響を明らかにすることで、アトピー性皮膚炎角層モデルの構築と治療薬開発への応用を試みた。

実験：

脂質モデルの調製：クロロホルム：メタノール混合溶液(=2:1)にセラミド2、コレステロール、パルミチン酸、スフィンガニン、およびスフィンゴシンを溶解し、最終濃度を10 mMとした。脂質組成はTable 1に示した。

放射光 X 線回折測定：調製した脂質モデルをガラスキャピラリー(内径1 mm)に充填し、SPRING-8(BL40B2)において、エネルギー15 keV、カメラ長約50 cm(ベヘン酸銀により校正)、検

出器にはイメージングプレートを用い、露光時間は30秒として、小角・広角同時測定を行った。

結果および考察：

まず、示差走査熱量測定により、NSMおよびASMの熱特性を調べた。得られた吸熱曲線をFig. 1に示した。両者とも50°C付近を相転移温度とする吸熱ピークが認められた。ヒト角層では47°C付近に六方晶の融解による相転移が認められることから、50°C付近(49.8°C)を相転移温度とする吸熱ピークは六方晶の融解によるものと考えられる[1]。一方、NSMでは38°C付近(38.5°C)に肩のような小さな吸熱ピークが検出されたのに対し、ASMではそのピークが非常に小さかった。マウスやヒト角層における斜方晶の融解は30°C付近から始まり39°C付近まで続くことがX線回折測定やFTIR測定からわかっている[2]。同様の試料を用いてX線回折実験を行って、得られた回折プロファイルを図2に示した。 $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークと $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークの積分強度の比を $R_{2.4/2.7}$ と定義すると[3]、Fig. 2(b)に示すように、ASMではNSMと比較してこの値が有意に大きくなった。これは、 $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$ のみにピークを示す六方晶が、 $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ および $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$ の二カ所にピークを示す斜方晶よりも多く存在する可能性を示唆するものと考えられる。これは、Fig. 1で得られた結果と一致する。

以上より、斜方晶がバリア機能に関与していることを示す報告もあることから、アトピー性皮膚炎の角層におけるバリア機能低下が、斜方晶の減少によるものではないかと推察した。

今後の課題：

今回実験に使用したスフィンゴシンおよびスフィンガニンの配合比を大幅に変化させて、いずれの脂質が充填構造に対する影響が大きいかについて検討を行いたい。さらに、細胞間脂質の成分のうち、充填構造への寄与が大きいと考えられるセラミドに着目して、セラミドの混合比を増大させた場合について実験を行い、アトピー性皮膚炎の治療法のひとつであるセラミド補充法の有効性について調べてみたい。

参考文献：

[1] I. Hatta, et al., *Biochim.Biophys.Acta*, **1758**, 1830-1836 (2006).
 [2] Y. Obata, et al., *Int.J.Pharm.*, **398**, 18-23 (2010).
 [3] Y. Obata, et al., *J.Contr.Rel.*, **115**, 275-279 (2006).

Table1. 脂質モデルの処方

mol (%)	NSM	ASM
Ceramide 2	11.9	11.7
Cholesterol	33.0	32.4
Palmitic acid	50.6	49.8
Sphingosine	3.8	5.7
Sphinganine	0.7	0.4

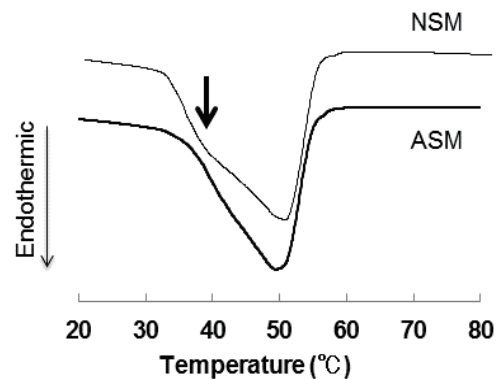


Fig. 1. 脂質モデルの吸熱曲線

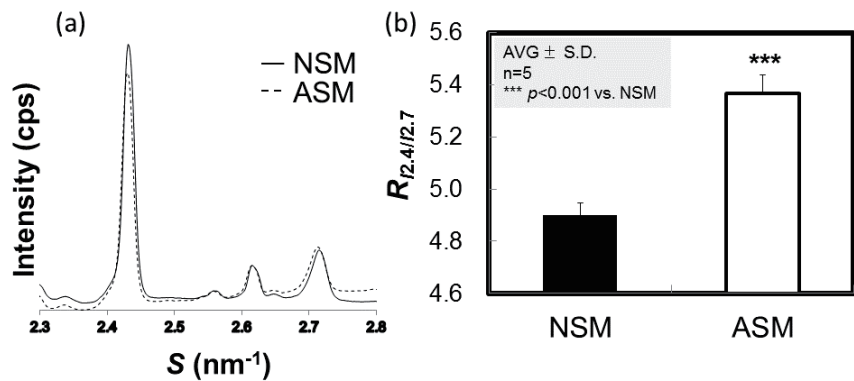


Fig. 2. 脂質モデルの充填構造