

ヒト角層細胞間脂質モデル膜の開発 Development of Artificial Lipid Membrane of the Human Skin Stratum Corneum

中沢 寛光, 赤下部 奈月
関西学院大学理学部 〒669-1330 兵庫県三田市学園上ヶ原 1 番

Hiromitsu NAKAZAWA*, Natsuki AKAKABE
Kwansei Gakuin University, School of Science,
1 Gakuen Uegahara, Sanda, Hyougo, 669-1330, Japan

1 はじめに

我々の人体は皮膚に覆われ、皮膚はそこで生体の恒常性の維持には必須の皮膚バリア機能を発揮する。皮膚は主に繊維状タンパク質を主成分とする真皮と、それを土台とする表皮から構成され、さらに表皮はその内部を構成する細胞の形状により、いくつかの層に分類される。この表皮の最表層には脱核し扁平になった角質細胞と、その周りを取り囲む細胞間脂質などから構成される角層が存在し、皮膚バリア機能に対してとても重要な役割を担っていることが知られている (図 1 (a))。角層の構造はよく、レンガ (角質細胞) とモルタル (細胞間脂質) の関係に例えられるが (図 1 (b))、中でもモルタルに相当する細胞間脂質の充填配列構造が、特にバリア機能にとって重要であることが近年明らかになりつつある [1-3]。

細胞間脂質の主要成分は、多種のセラミド、遊離脂肪酸、コレステロールなどであり、角層内ではこれらの分子がほぼ等モルで存在していることが知られている。角層内において細胞間脂質は結晶に近いような秩序構造を形成しており、それゆえ放射光や電子線の回折現象により、それらの存在状態を詳細に解析することができる [2-5]。近年、細胞間脂質は板状の角質細胞に対して垂直に配列し、さらにそれらが積層して細胞の面と水平なラメラ構造を形成していることが見いだされ (図 1 (c))、それらの高密度化された充填配列構造が、高いバリア性能の発揮に重要であることが徐々に明らかとなってきた [2][3]。

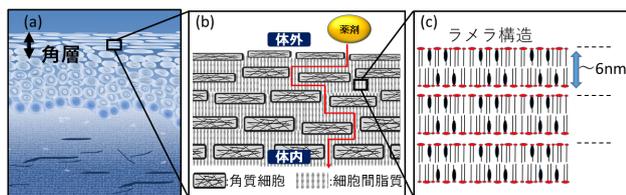


図 1 : 角層内の細胞間脂質ラメラ構造の様子

このようなバリア性能の高い細胞間脂質の充填配列構造は、正常なバリア機能の発揮には必要不可欠であるが、一方で、経皮吸収性の薬剤は主に細胞間脂質領域を経て体内へ浸透するため、それらに対しては大きな障壁となりうる。経皮吸収性の薬剤を開発する際には、製剤と角層内で連続層を形成する細胞間脂質 (図 1 (b)) との相互作用を分子レベルで解析し、明らかにすることが重要な課題となるが、正常な状態のヒト角層は、定常的な入手が容易でなく、また生体試料特有の個体差もあり、これらの相互作用を系統立てて解析することは難しい [4,5]。そこで最近、この問題を解決する手段として、ヒト角層細胞間脂質ラメラ構造を模倣した人工脂質膜 (以下、モデル膜) を作製し、それを用いてバリア機能のメカニズムや角層と薬剤との相互作用を解明しようとする試みが多くなされている [6]。我々も以前より、再現精度の高いモデル膜の作製を検討しているが、今回、作製したモデル膜にエステル油剤を作用させ、その浸透の様子、すなわち経皮吸収過程にある細胞間脂質構造の変化の様子を X 線小広角散乱法により明らかにすることを試みた。

これらの研究にモデル膜を用いる最大の利点は、ラメラ膜の作製方法や脂質成分を調製することで、様々な構造特性や物性を持つラメラ膜を作製することができる点にある。すでに、アトピー性皮膚炎などバリア機能が低下した病変皮膚や、あれ肌状態にある皮膚などでは、細胞間脂質の配列構造に乱れが生じていることが確認されており [2]、これら知見の下に荒れ肌モデルを開発し、荒れ肌の改善のための基礎解析に応用することが期待される。本研究においても、様々な構造特性を持つモデル膜を作製し、エステル油剤の浸透特性を比較、細胞間脂質の構造と物質浸透性の関係解析を実施した。それらの結果の一部について報告する。

2 実験

クロロホルム-メタノール溶液中に、ヒト角層内に含まれるセラミド、コレステロール、遊離脂肪酸などを分散し、一般的なメンブレンフィルターに適用した。試料を常温常圧で一定時間乾燥させた後、メンブレンフィルターを中央付近で2つに切断し、一方はそのままX線測定に用い、もう一方には温度処理を施して積極的に細胞間脂質を相分離させてからX線測定に用いた。実験ではこれら両試料の表面にエステル油剤を塗布し、その後の構造を、放射光X線を用いて時分割測定した。

放射光X線小広角散乱実験はKEK PF-BL6Aで実施した。ヒト角層やそのモデル膜にX線を照射すると、小角領域には細胞間脂質ラメラ構造由来の回折ピーク ($s \sim 0.16 \text{ nm}^{-1}$, $s = 2\sin\theta/\lambda$, 2θ は散乱角)が、広角領域には細胞間脂質側方配列構造(ゲル相)由来の回折ピーク ($s \sim 2.4 \text{ nm}^{-1}$)が観察されることが報告されている[3-5]。これらの散乱を同時に観測する為、X線の波長は 0.15 nm (8.27 keV)、カメラ長は小角およそ 100 cm 、広角およそ 25 cm に設定し、検出器には半導体検出器(小角: Pilatus 1M 及び広角: Pilatus100K)を用いて実験を行った。X線の露光時間を 180 秒 に設定し、エステル油剤塗布直後から1時間後まで3分おきにX線散乱像を取得し、モデル膜の構造変化の様子を解析した。

3 結果および考察

まず、試料作製後温度処理を施さなかったモデル膜にX線を照射したところ、小角には $s \sim 0.19 \text{ nm}^{-1}$ 付近に細胞間脂質ラメラ構造由来の回折ピークが(図2(a))、広角には斜方晶と直方晶由来の回折ピークが観察され、当モデル膜にはヒト角層と同様のゲル相を含むラメラ構造が形成されていることが確認された。一方で温度処理を施したモデル膜の小角散乱像には、 $s \sim 0.19 \text{ nm}^{-1}$ 付近のラメラピーク以外に $s \sim 0.23 \text{ nm}^{-1}$ 付近にシャープなピークが出現しており(図2(b))、細胞間脂質が相分離していることが確認された[7]。

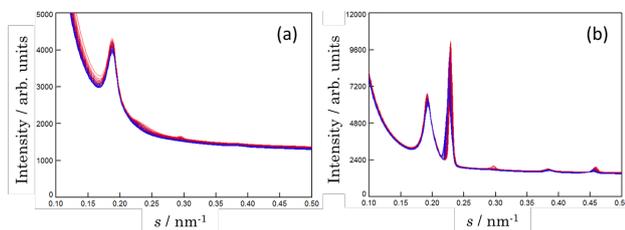


図2: モデル膜のX線小角散乱プロファイル

図2にはさらに、これらのモデル膜にエステル油剤を塗布した後のX線散乱プロファイルの時間変化の様子が、赤色から青色へのグラデーションカラーで重ね表示されている。次に、これら両試料のラメラピークにモデル関数をフィッティングし、その面

積の時間変化の様子を詳細に解析した。結果を図3に示したが、温度処理をせず細胞間脂質が相分離していない、いわゆる正常なラメラ構造を形成しているモデル膜については、1時間の測定でラメラピークの面積はほとんど変化しなかったが、相分離したモデル膜では、ラメラピークの面積が徐々に減少することが分かった。これはラメラ内部にエステル油剤が徐々に浸透し、ラメラ膜を構成する細胞間脂質分子が溶出した結果、ラメラピークの面積が小さくなったことが考えられた。ラメラ膜内において細胞間脂質が相分離し、その結果ラメラ膜内にドメイン境界が生じ、エステル油剤の透過ルートが確保され、エステル油剤がよりラメラ膜内に浸透しやすくなったと考える。

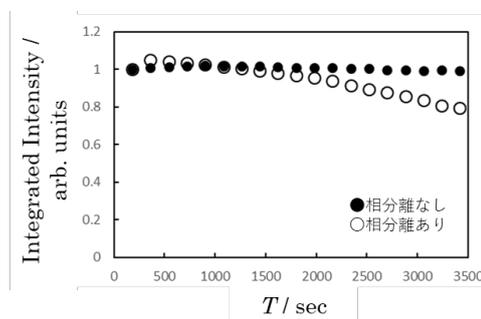


図3: ラメラピーク面積の時間変化(エステル油剤塗布後)

4 まとめ

本検討により、エステル油剤の浸透特性がモデル膜の構造によって変化することが分かり、当モデル膜を用いた物質浸透特性解析の有効性、実現性が見い出された。今回、予備的に実施したセラミドの成分を変えたモデル膜の浸透実験においては、エステル油剤の浸透速度が、ある特定の種のセラミド濃度依存的に遅くなるような傾向も確認されており、今後、当モデル膜を用いたバリア/経皮吸収メカニズムの解明研究が期待される結果となった。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 (15K05253) (19K08803) の助成を受けたものです。

参考文献

- [1] P.M. Elias, D.S. Friend, *J. Cell Biol.*, 65, 180-191 (1975).
- [2] G.S.K. Pilgram et al., *J. Invest. Dermatol.*, 117, 710-717 (2001).
- [3] H. Nakazawa et al., *Polymers* 11(5) 829 (2019).
- [4] I. Hatta et al., *Chemistry and Physics of Lipids*. 163 (4-5), 381-9 (2010).

- [5] H. Nakazawa et al., *Chemistry and Physics of Lipids*. 165 (2), 238-43 (2012).
- [6] M. W. de Jager et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1758, 636-644 (2006).
- [7] A. Schroeter et al., *Soft Matter* 13, 2107-2119 (2017).

* nakazawa@kwansei.ac.jp