

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

角層バリア機能の微細構造解析によるアトピー性皮膚炎発症機序の解明

研究分担者 松井 毅 (独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター
皮膚恒常性研究チーム 上級研究員

研究要旨

アトピー性皮膚炎をはじめとするアトピー性疾患において、皮膚バリア機能障害による経皮的抗原曝露の亢進が、疾患の発症・増悪をさせていることが明らかになりつつある。皮膚バリアの3大要素として、角質層バリア、顆粒層のタイトジャンクション、ランゲルハンス細胞が存在する。しかし、表皮の顆粒層・角質層において、どのような微細構造レベルでの細胞生物学的現象が、皮膚バリア機能障害初期の兆候として認められるのかは不明な点が多い。本研究では、皮膚バリア機能障害モデルマウスの顆粒層・角質層における電子顕微鏡法による微細構造解析系の構築を行う。本年度は、マウス表皮上層(顆粒層～角質層)のサンプルを用いた加圧凍結・凍結置換法による新しい顆粒層・角質層の電子顕微鏡観察系の構築を行った。

研究協力者

平林 愛 (公財)難病医学研究財団
リサーチレジデント

(Leica)にて加圧凍結し、凍結置換装置 AFS(Leica)にて、-90 から 0 まで徐々に温度を上昇させることで凍結置換溶液(2% オスミウム/アセトン溶液)への置換を行った。置換終了後、化学固定した試料と同様に樹脂包埋し、超薄切片の作製を行い、電子顕微鏡観察を行った。

A . 研究目的

皮膚の顆粒層・角質層において、どのような微細構造レベルでの細胞生物学的現象が皮膚バリア機能障害初期の兆候として認められるのかを、電子顕微鏡を用いてマウスモデルから明らかにする。本年度は、マウス表皮上層シートを用いた顆粒層・角質層の微細構造観察に特化した電子顕微鏡観察系を構築することを目標とした。

B . 研究方法

マウス表皮上層シートを用いて化学固定法と加圧凍結・凍結置換法により電子顕微鏡用試料作製を行った。化学固定は、Half Kalnovsky 固定液にて固定した後に、オスミウム酸固定液を用いて「後固定」を行った。エタノールでの脱水後、エポキシ系樹脂に包埋し、超薄切片(80nm)を作製した。加圧凍結・凍結置換は、EMPACT

C . 研究結果

低倍率で表皮上層シートの全体像を比較すると、化学固定では細胞膜の湾曲が多く認められた。また、各角層間が大きく開き一方で、顆粒層同士は密着して細胞間隙が狭くなっていた。次に特徴的な領域を高倍率で観察した。核については、加圧凍結・凍結置換の方が核内の電子密度が高く、ヘテロクロマチン領域が明瞭に観察されたことから、生体分子の流出が少ないと考えられた。顆粒層のケラトヒアリン顆粒は、化学固定では高電子密度の塊として観察されたが、加圧凍結・凍結置換では繊維状のアモルファス構造として認められた。また、ケラチンは化学固定では凝集していた

が、加圧凍結・凍結置換では繊維状であった。デスモソームについては、化学固定では顆粒層間の細胞間隙が狭いため観察された数が少なく、明瞭な構造が認められなかったが、加圧凍結・凍結置換では分子構造が明瞭であり、接着分子が重なり電子密度が高い領域も観察された。角質層については、化学固定では角層間の開きが大きいためコルネオデスモソームの数が少なく、輪郭がぼやけていたが、加圧凍結・凍結置換では明瞭なコルネオデスモソームが観察された。また、加圧凍結・凍結置換では角質層内のケラチン繊維も明瞭に観察された。以上の観察結果から、加圧凍結・凍結置換法は、マウス表皮上層シートの顆粒層・角質層における微細構造の保持に適していることが明らかになった。

D . 考察

加圧凍結・凍結置換法は、化学固定法で用いられるアルデヒド固定によるアーティファクトを受ける可能性がなく、生細胞に近い状態で細胞内構造を観察できる手法として注目されてきた。アトピー性皮膚炎発症機序の解明には角層から顆粒層の細胞構造学的現象を微細構造レベルで観察することが重要である。今回用いた表皮上層シートは、角層から顆粒層のみのシートであるが、厚みが約 20 μm であるため、加圧凍結により非晶質凍結することが可能である。実際に、化学固定よりも顆粒層内の核やケラチン、接着構造、角層間のケラチンや接着構造等、微細構造の保持がよいことが明らかになった。

E . 結論

今回の観察より、表皮上層シートを用いた加圧凍結・凍結置換法は、ケラトヒアリン顆粒や接着構造、脂質二重膜、角層内のケラチンなど顆粒層・角質層における微細構造の保持がよく、アトピー性皮膚炎発症機序を解明するためのマウス表皮上層の微細構造観察に適した方法であることが明らかになった。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表（平成 26 年度）

< 論文発表 >

Matsui T, Amagai M: Dissecting the formation, structure, and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* (epub, doi: 10.1093/intimm/dxv013), 2015.

< 学会発表 >

松井毅: 哺乳類皮膚表皮角質層の機能的進化. **第14回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム**, 東京, 2014. 12. 20.

H . 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし