慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	臨床応用を目指した表皮バリア機能の統合システム解析手法の確立
Sub Title	Integrated system analysis method of epidermal barrier function
Author	持丸, 奈央子(Mochimaru, Naoko) 天谷, 雅行(Amagai, Masayuki) 海老原, 全(Ebihara, Tamotsu) 川崎, 洋(Kawasaki, Hiroshi) 川上, 英良(Kawakami, Eiryō)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では各表皮バリアモデルマウスの多角的な表皮バリア解析から、いくつかのバリア異常状態の存在が示唆された。各表皮バリアパラメータ間のネットワーク解析、および表皮バリアパラメータ異常の推移と皮膚組織内発現分子動態を関連解析することで、表皮バリア破綻を評価するのに有用なパラメータの選定と皮膚バリア異常病態の詳細な理解につながると予想された。また表皮バリア評価パラメータの一部と皮膚表面画像の変化が関連する可能性が示唆された。私たちはヒト健常人およびアトピー性皮膚炎患者の皮膚症状と皮膚表面形状データ、画像データの連続的系統的収集を進め、本研究知見との比較相関解析を行い実臨床での応用へつなげていく。 In this study, the existence of some barrier abnormal conditions was indicated from the multiple epidermis barrier analysis of each epidermis barrier model mouse. It was anticipated that the selection of the parameter which is useful for evaluating the epidermis barrier failure and the detailed understanding of the skin barrier abnormality disease state would be connected by network analysis between each epidermis barrier parameter and related analysis of transition of the epidermis barrier parameter abnormality and expression molecular dynamics in the skin tissue. And, the possibility in which a part of the epidermal barrier evaluation parameter and change of the skin surface image were related was indicated. We will continue to systematically collect skin symptoms, skin surface shape data, and image data of healthy human subjects and patients with atopic dermatitis. We will conduct comparative correlation analysis with the findings of this study and apply it to clinical applications.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2017～2018 課題番号：17K16350 研究分野：皮膚科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16350seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１６３５０

研究課題名（和文）臨床応用を目指した表皮バリア機能の統合システム解析手法の確立

研究課題名（英文）Integrated system analysis method of epidermal barrier function

研究代表者
持丸　奈央子（Mochimaru, Naoko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：９０６２６６７３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では各表皮バリアモデルマウスの多角的な表皮バリア解析から、いくつかのバリア異常状態の存在が示唆された。各表皮バリアパラメータ間のネットワーク解析、および表皮バリアパラメータ異常の推移と皮膚組織内発現分子動態を関連解析することで、表皮バリア破綻を評価するのに有用なパラメータの選定と皮膚バリア異常病態の詳細な理解につながると予想された。また表皮バリア評価パラメータの一部と皮膚表面画像の変化が関連する可能性が示唆された。私たちはヒト健常人およびアトピー性皮膚炎患者の皮膚症状と皮膚表面形状データ、画像データの連続的系統的収集を進め、本研究知見との比較相関解析を行い実臨床での応用へつなげていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アトピー性皮膚炎治療やアレルギーマーチの発症予防戦略を考えるにあたり表皮バリア破綻の重要性が注目されて久しいが、バリア状態を簡便かつ正確に評価する技術に乏しい現状があり、日常診療への応用を阻んでいる。本研究により、複数の表皮バリアパラメータを適切に設定することにより、臨床上想定される多様なバリア異常状態を評価できる可能性が示唆された。また、現時点では皮膚表面形状画像等により、表皮バリア状態が予測評価できる可能性が見出された。これらの知見は、多様な表皮バリア状態を考慮したスキンケア用品や薬剤開発や、皮膚バリア状態を指標とした個別化スキンケア戦略の創出につながると思われ、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, the existence of some barrier abnormal conditions was indicated from the multiple epidermis barrier analysis of each epidermis barrier model mouse. It was anticipated that the selection of the parameter which is useful for evaluating the epidermis barrier failure and the detailed understanding of the skin barrier abnormality disease state would be connected by network analysis between each epidermis barrier parameter and related analysis of transition of the epidermis barrier parameter abnormality and expression molecular dynamics in the skin tissue. And, the possibility in which a part of the epidermal barrier evaluation parameter and change of the skin surface image were related was indicated. We will continue to systematically collect skin symptoms, skin surface shape data, and image data of healthy human subjects and patients with atopic dermatitis. We will conduct comparative correlation analysis with the findings of this study and apply it to clinical applications.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎　皮膚バリア　画像解析　ネットワーク

１．研究開始当初の背景

表皮最外層で角層バリアを制御しているフィラグリンの機能喪失変異とアトピー性皮膚炎の関連が指摘されて以降、表皮バリアの理解がアトピー性皮膚炎治療やアレルギーマーチ発症予防の重要要素と認識されている。しかし、表皮バリア研究の根本的課題として、日常診療の場でバリア機能を正しく評価する手法が確立されていないため、バリア異常に着目した医療応用は十分に進んでいない。現在の表皮バリア機能は、ヒト、モデル動物を問わず、TEWL (transepidermal water loss: 経費水分蒸散量)と角層内水分量を専用機器で測定することにより評価されることがほとんどだが、これらの手法は表皮バリア機能のある一面しか反映していない可能性があると同時に、計測環境の設備維持や計測時間の問題から研究レベルでの使用にとどまっている。

表皮バリアを統合的に評価することで患者個々人、あるいは各経過中のバリア状態の多様性を理解できる可能性がある。そして、簡便な手法によりバリア状態を評価するパラメータを取得することが可能となれば、表皮バリア指標を一種のバイオマーカーとして活用し、日常診療等に応用できる可能性があり、社会的意義が大きい。

２．研究の目的

本研究では、複数の表皮バリア機能評価パラメータ間の相関・ネットワークの解析をもとに、バリア機能の統合評価を試みる。そして、取得されたデータをもとに数理モデルを構築し、簡便で侵襲の少ない計測データから表皮バリア機能を予測評価する手法の考案を目指した。

３．研究の方法

(1) 表皮バリア機能異常マウスモデルを用いた表皮バリア異常の多様性の評価

野生型マウスと表皮バリア機能異常マウスモデル（$Flg^{-/-}$マウス、$Tmem79^{-/-}$マウス（Sasaki, Shiohama, et al. 未発表）、Spadeマウス）の表皮バリア機能を多角的に評価、比較をした。$Tmem79^{-/-}$マウス、Spadeマウスは表皮バリア異常出現後（7-8週齢以降）に皮膚炎を自然発症することが知られているが、本研究では皮膚炎を自然発症する前の皮膚に着目して研究を実施した。

TEWLはバポスキャン（Asahi biomed; AS-VT100RS）により、角層内水分量は角層膜厚・水分計（Asahi biomed; ASA-02）を用いて計測した。色素を用いた外から内への物質経皮透過性解析、テープストリップによる角層脆弱性評価を角層チェッカー（promotool; D-squame）を用いて評価した。また剥離された角層の形状を3D解析により検証した。皮膚の外観は、一眼レフカメラによる接写画像に加え、Primos（皮膚用非接触3D 測定システム）による3D皮膚形状を解析に使用した。

さらに、各種マウス皮膚はHE染色等を用いた皮膚組織病理画像による評価を実施した。

また、乾燥環境が表皮バリアの悪化を招き、アトピー性皮膚炎等の皮膚炎悪化につながると報告されることから、マウスを低湿度環境下で飼育し、実験的に表皮バリアを悪化させるモデルを利用し、乾燥環境が表皮バリアに与える影響やその際に動くパラメータの検証も行った。

(2) 表皮バリアパラメータ間の相関解析による、パラメータ間のネットワークの検討と計測に有用なパラメータの検証

(1)で取得されたデータは、いずれも数値パラメータに落とし込み、パラメータ間の因子解析を実施した。表皮バリア指標の一部は多パラメータを有する。これらを解析に使用する場合は有用な指標と思われるもののみを使用する場合と、非負値行列因子分解等の次元削減手法を用いて解析した場合を検討し、適当と思われる手法を使用した。

また、本研究で使用された各マウスモデルに関して既に収集されている皮膚組織トランスクリプトームデータを利用し、各表皮バリア異常パラメータの推移と皮膚組織内発現分子動態を関連解析することで、表皮バリア維持や破綻につながると予想される候補分子群を抽出した。

(3) マウスモデル知見とヒトデータの検証による、臨床応用を目指す表皮バリア評価手法の検討

TEWL, 角層内水分量, テープストリップを用いた角層脆弱性評価, 皮膚表面画像/3D 撮影画像に関しては、本研究の研究協力者により、ヒトアトピー性皮膚炎患者を対象として過去に実施計測されている。ヒトデータに関してはこれらデータを二次利用する形で、本研究から収集されたマウスモデルからのデータと比較解析を実施し、本研究知見がヒト臨床に応用可能な表皮バリア評価手法の確立につながるかどうかを検証した。

４．研究成果

(1) 表皮バリア機能異常マウスモデルを用いた表皮バリア異常の多様性の評価

Spade マウスでは皮膚炎を自然発症する前の生後 4 週齢頃より TEWL 値が野生型マウスに比べて上昇してくるのに対して、Flg$^{-/-}$マウス、Tmem79$^{-/-}$マウスはともに TEWL 値、角層内水分量の上昇を認めなかった。色素を用いた外から内への物質皮膚透過性評価に関しては、既報告の通り Flg$^{-/-}$マウスで角層内への色素透過性が亢進する所見を観察したが、観察部位ごとに色素の透過性に差が認められ、浸透性を数値パラメータにより評価することが技術的に難しかった。そのため、本解析結果は(2)のパラメータ解析には含めなかった。

テープストリップによる角層脆弱性評価に関しては、野生型マウスに比べ、各表皮バリア異常マウスの角層で剥離パターンとの相違を観察した。野生型マウスの角層は比較的均一に角層の剥離が認められるのに対して、表皮バリア異常マウスの角層は不均一に剥離が生じる傾向が強かった。さらに、複数回テープストリップを実施して角層を採取した場合、野生型マウスでは比較的後期回まで角層が剥離される像を観察するのに対して、Flg$^{-/-}$マウスを中心に表皮バリア異常マウスでは、テープストリップ後期回に比べ初期の回で角層剥離が多く観察され、これらマウスでは角層が物理的に脆弱で剥離が生じやすくなっている可能性が観察された。この剥離パターンの違いを数値パラメータに変換する手法を考察し、剥離角層の白黒画像の濃淡と面積を元に剥離された角層の量を類推したデータと、剥離パターンから散らばりの程度を評価することが野生型マウスと表皮バリア異常マウスの皮膚の違いを観察する上で有用と思われた。剥離された角層形状の 3D 解析に関しては、原子間力顕微鏡を用いた解析が表皮バリアの違いを読み解く際有用である可能性が示唆された。

皮膚表面画像・外観の評価に関しては、キメ・シワの深さの点で表皮バリア異常マウスと野生型マウス間の数値パラメータが異なることがわかった。

皮膚組織病理画像に関しては、表皮厚の計測を実施するとともに、角層の染色性の違いを数値パラメータとして変換することを検討した。表皮バリア異常マウスでは一般に表皮肥厚が観察される傾向があり、また角層が basket weave 様ではなく緊密なパターンを認める傾向が観察された。

低湿度環境飼育モデルの皮膚は角層内水分量の低下と ex-vivo で TEWL を評価する系における TEWL の上昇が観察された。また、角層が緊密なパターンに変化し表皮バリア異常マウスモデルに近い組織角層所見を認めることがわかった。

(2) 表皮バリアパラメータ間の相関解析による、パラメータ間のネットワークの検討と計測に有用なパラメータの検証

(1)で取得した各表皮バリアパラメータ間の相関解析を実施したところ、TEWL と角層内水分量データの相関を観察しなかった。臨床的に表皮バリア障害を認める皮膚では TEWL の上昇と角層内水分量の低下が生じていると考えられることが多いが、表皮バリア異常の初期においてはこれらのパラメータは独立した制御機構がはたらいている可能性が考えられた。

TEWL や色素の物質透過能などはある一定異常のバリア異常状態になって初めて、野生型皮膚との間の違いを観察したのに対し、テープストリップによる角層剥離パターンの観察や皮膚表面画像・外観の解析は、生直後の仔マウスの段階から野生型マウスと表皮バリア変異モデルマウスとの間、および各表皮バリア変異モデルマウス間でパラメータの違いを検出した。これらの違いがどのような生理学的・病態学的にどのような意義を持つのか、どういった分子により制御されているのかを皮膚組織のトランスクリプトームデータとの相関解析や時系列データ解析などを通じて、今後明らかにしていく予定である。

また、TEWL などの一部の指標が、それぞれ皮膚表面形状の変化と相関して変動する可能性が示唆された。これらを含む、現在報告されている表皮バリア評価技術の多くは、専門機器による計測を必要とし、日常生活や診療時の簡便な実施が困難である。評価に専門技術が必要な表皮バリア状態の把握を、侵襲がなく取得が簡易な皮膚画像を通じて実施できれば、スマートフォン等を中心とした画像撮影技術が発展している現状において、社会的意義が大きいと考えた。そこで私たちは今回取得した表皮バリアパラメータが反映する皮膚画像の特徴量を抽出するために、表皮画像を評価するパラメータを増数して再解析を実施した。その結果、位相的データ解析から取得される特徴量が TEWL 値と相関が高いことが示唆された。TEWL に関しては、生後早期に高値を示すとアトピー性皮膚炎やアレルギー発症リスクの上昇につながるという報告が近年なされており、今回得られた知見をヒトでの解析に応用し新規表皮バリア評価技術として確立することは、アレルギー発症を予測し予防戦略を考える上で重要になると期待される。

(3) マウスモデル知見とヒトデータの検証による、臨床応用を目指す表皮バリア評価手法の検討

ヒトデータにおいて、健常人から取得された表皮バリア評価指標が不足していたため、データの解釈に注意が必要であるものの、マウスモデル皮膚で観察された TEWL と皮膚表面画像変化との間に認めた相関の傾向は、ヒト皮膚においても観察されうることがわかった。

まとめ
　本研究における、各表皮バリアモデルマウスの多角的な表皮バリア解析から、一口に表皮バリア異常といっても解像度を上げるといくつかのバリア異常状態が存在している可能性が示唆された。各表皮バリアパラメータ間のネットワーク解析、および表皮バリアパラメータ異常の推移と皮膚組織内発現分子動態を関連解析することで、表皮バリア破綻を評価するのに有用なパラメータの選定と皮膚バリア異常病態の詳細な理解につながると予想された。
　また本研究から、表皮バリア評価パラメータの一部と皮膚表面画像の変化が関連する可能性が示唆された。とくに TEWL に関しては、皮膚画像を数値データに変換したパラメータを用いることで実際の TEWL 値を予測・評価できる可能性が示唆され、これを実現するためのアルゴリズム開発につながることが期待される。
　私たちはヒト健常人およびアトピー性皮膚炎患者の皮膚症状と皮膚表面形状データ、画像データの連続的系統的収集を進めており、ヒトデータと本研究知見との比較相関解析を行うことで、実臨床へ応用可能な技術開発につなげていく。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　0　件）

〔学会発表〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
　なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：天谷 雅行
ローマ字氏名：AMAGAI, Masayuki

研究協力者氏名：海老原 全
ローマ字氏名：EBIHARA, Tamotsu

研究協力者氏名：川崎 洋
ローマ字氏名：KAWASAKI, Hiroshi

研究協力者氏名：川上 英良
ローマ字氏名：KAWAKAMI, Eiryo

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。