

## 学位論文要旨

### Establishment of a novel method for visualization of calcium dynamics and evaluation of epidermal barrier function using human skin tissue (ヒト皮膚組織を用いた表皮カルシウム動態の可視化とバリア機能評価の新技术確立)

氏名 熊本 淳一

ヒトの皮膚は、外部病原体を防ぎ、体内からの水分蒸散を防ぐバリア機能を持つ。このバリア機能は皮膚最外層である角層が担っている。表皮の最下層である基底層で分裂した表皮角化細胞（ケラチノサイト：KC）が、分化しながら皮膚表面に移動する。最上層の顆粒層でラメラ顆粒と言われる脂質を含む顆粒が現れ、その脂質は分化の最終段階でKCが死んで角化する際、角化細胞間隙へと分泌される。分泌された脂質は細胞間脂質となり、バリア機能を持つ角層が構築される(図1)。

このバリア機能の恒常的維持には角層直下のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の局在が重要であることが指摘されていた。正常な表皮では角層直下に  $\text{Ca}^{2+}$  の局在が見られるが、バリアを破壊するとこの局在は消失する。そして、バリア機能の回復と共に  $\text{Ca}^{2+}$  の局在も戻る(図2)。アトピー性皮膚炎や乾癬などの難治性

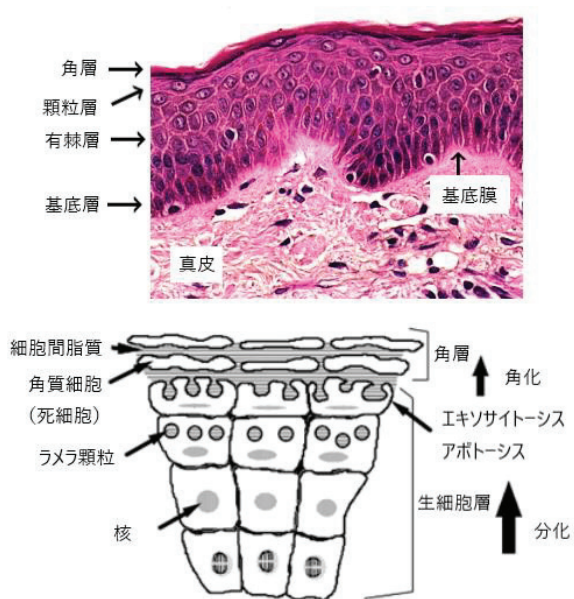


図1. 実際の表皮(上)とその模式図(下)

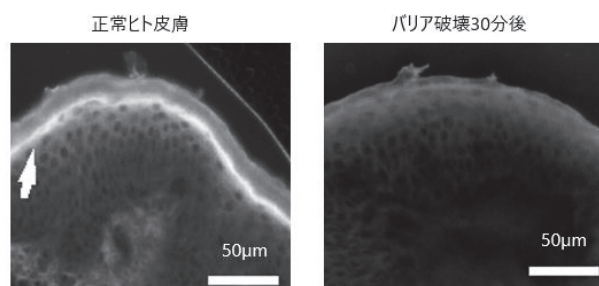


図2. 角層直下のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の局在 (白矢印)

皮膚疾患では、この  $\text{Ca}^{2+}$  局在の消失とバリア機能の低下が認められる。そのためバリア機能と  $\text{Ca}^{2+}$  の局在には密接な関係があると考えられてきた。しかし、これまで3次元培養系を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  動態とバリア機能との関連を解明しようとする試みは無かった。そこで、本研究ではヒト皮膚組織培養系を用いた生理学的実験法を確立すると共に、数理学による表皮生理機構の解明のため、数学者との融合研究を行った。

まず、2光子顕微鏡によって表皮内の  $\text{Ca}^{2+}$  3次元分布を観察する方法を確立した。さらにヒト皮膚組織培養系の皮膚表面への負電位印加により表皮最表層の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の局在化が促進され、同時にバリア機能の恒常性維持に重要なラメラ顆粒の細胞間への分泌が促進されることが判明した。これらの結果は  $\text{Ca}^{2+}$  の局在化がバリア機能の恒常的維持に重要であ

ることを示唆している。

また日本産スギ花粉のアレルギー物質 (Cry j1) が KC の  $Ca^{2+}$  動態に異常をもたらすことを見出し、さらに Cry j1 がヒト皮膚組織培養系のバリア機能の低下をもたらすことを見出した。この結果は KC の  $Ca^{2+}$  動態に影響する様々な外部因子が、バリア機能の異常をもたらすことを示唆している。

次に表皮最表層がレーザーによる熱刺激を受けた直後、表皮内でどのような  $Ca^{2+}$  動態を起こすのか二光子顕微鏡を用いて検証した。その結果、刺激を与えると瞬時に基底層で  $Ca^{2+}$  が上昇し、その後、 $Ca^{2+}$  が隣接する KC へと伝播していく時間変化が観察できた。これにより、熱刺激による表皮内の時空間的な情報伝達機構が解明される可能性を示唆した。

これらの研究結果を基に、バリア恒常性維持機能のメカニズムを明らかにする目的で、その現象を表現する数理モデルの構築とその解析を、数学者と共同しながら行なった。まず、表皮細胞間の  $Ca^{2+}$  動態を基盤とし、表皮恒常性を維持した数理モデルを用いて数値シミュレーションを行った。その結果、生理学的な厚さを有する表皮モデルを構築するためには、表皮基底部に特定の高さの間隔がある波状パターンが重要であることが示唆された。

皮膚科学の基礎研究では、KC を用いた 3 次元表皮培養系が、様々な皮膚疾患のメカニズム解明や、薬剤の効果、皮膚への透過性の検証に用いられる。数値シミュレーション結果を検証するため、この培養系の底部に、数理モデルが予言したパターンと同等の高さ、間隔を持つポリエステルメッシュを密着させて 3 次元表皮培養系を構築し表皮の厚さやバリア機能を評価した。その結果、ポリエステルメッシュを密着させていない培養系と比べ、表皮は厚く、ラメラ顆粒の分泌が増え、高いバリア機能をもつ 3 次元表皮培養系が構築された (図 3)。この方法では細胞分裂を繰り返した KC でもヒト皮膚の表皮と同じ厚さの 3 次元表皮培養系が得られ、臨床研究への応用も期待できる。

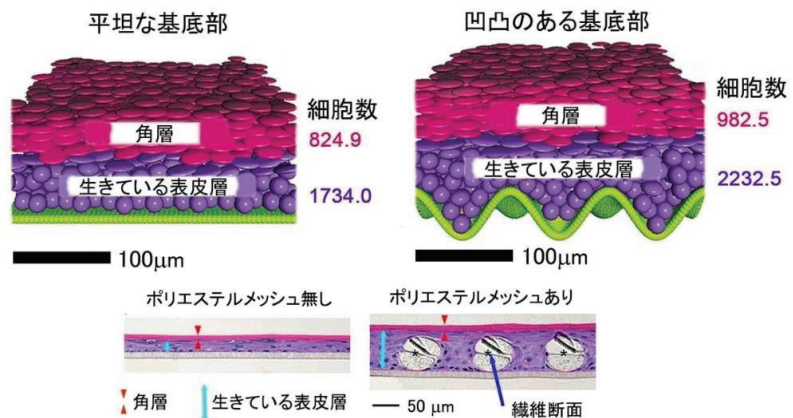


図3. 表皮恒常性を維持した数理モデルの数値シミュレーション結果画像(上)と3次元表皮培養系の断面図(下)

以上、本研究では表皮内  $Ca^{2+}$  動態が角層バリア恒常性維持の要因であることを明らかにした。そして、ヒト皮膚組織を用いた新たなバリア機能評価方法を確立し、 $Ca^{2+}$  動態に異常を起こす Cry j1 がバリア機能の低下を引き起こすことを発見した。また、刺激を受けた際の表皮内  $Ca^{2+}$  動態のリアルタイム可視化法を確立した。最後に、数理モデルを用いた高バリア機能を持つ表皮モデルの構築から、バリア機能の恒常性維持のような複雑な生物学的プロセスの解明に対する数学的モデリングの有効性を示すことができた。これらの成果は、今後、難治性皮膚疾患の機序解明に寄与しうるものと考えられる。