

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)	氏名	熊本 淳一
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
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手法確立)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	中田 聡	
審査委員	教 授	泉 俊輔	
審査委員	教 授	楯 真一 (学術・社会連携室)	
審査委員	教 授	小林 亮	
審査委員	教 授	秀 道広 (医系科学研究科)	
〔論文審査の要旨〕			
<p>皮膚の重要な機能としてバリア機能が挙げられる。角層のバリア機能を明らかにするために多くの生化学的研究がなされてきたが、バリア機能を担っている表皮のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 勾配の維持やその Ca^{2+} 勾配による角層細胞間脂質の恒常的供給など、生物物理学的な現象のメカニズムは不明なままである。また、アトピー性皮膚炎や乾癬などの難治性皮膚疾患では、「Ca^{2+}局在の消失」と「バリア機能の低下」が認められており、Ca^{2+}の局在とバリア機能には密接な関係があると考えられてきた。しかしながら、未だ根本的な解明には至らず、保湿剤やステロイド剤による炎症を抑える対処療法しかないのが現状である。そこで申請者は、新規な 3 次元培養系を用いた生理学的実験と数理モデルによる検証の組み合わせにより、これらの未解決問題の解明を目的として研究を行った。</p> <p>まず申請者は Ca^{2+} 勾配とバリア機能との関係について焦点を当てた。表皮角層直下ではラメラ顆粒と呼ばれる細胞間脂質を含む顆粒が形成され、角化の際、ラメラ顆粒内部の脂質が細胞間隙に放出される。この過程は表皮バリア恒常性維持に重要なプロセスであり、これまでの研究では皮膚表面の電位が関与していると考えられている。そこで、申請者は Ca^{2+} を表層に局在化するために負の電位を印加し、最上層の超微細構造を透過型電子顕微鏡、および二光子顕微鏡で観察した。その結果、電位を印加しない皮膚と比べて、負電位を印加した皮膚ではラメラ顆粒の分泌が加速される結果が観察された。また、Ca^{2+} 分布を二光子顕微鏡で観察した結果、皮膚表面に負電位を印加した場合、表皮最表層での Ca^{2+} 濃度が電位を印加しない皮膚に比べて高くなった。本研究によってヒト皮膚組織における、ラメラ顆粒の分泌と電位の関係を明らかにすると共に、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た。</p> <p>次に申請者は、日本産スギ花粉アレルギー物質である Cry j1 がケラチノサイトの表皮内カルシウム動態及びヒト皮膚組織のバリア機能に与える影響について研究した。日本人の 1/4 が発症しているスギ花粉症が免疫反応系ではなく、表皮のバリア機能に直接影響をもたらすのではないかと考え、申請者は Cry j1 をケラチノサイトに添加した際の細胞内 Ca^{2+} 動</p>			

態観察とヒト皮膚組織を用いたバリア機能評価法の確立を行った。その結果、ケラチノサイトに Cry j1 を添加すると細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことを見出した。また Cry j1 を塗布したヒト皮膚組織ではラメラ顆粒の分泌が抑制され、経表皮水分蒸散量が上昇した。すなわち、バリア機能の低下を引き起こすことが示唆された。本研究により、ケラチノサイトの Ca^{2+} 動態に影響する様々な外部因子が、バリア機能に異常をもたらすことを示唆し、今後バリア機能に影響を与える因子探索研究の発展に大きく寄与すると考えられる。

次に申請者は表皮内 Ca^{2+} 動態に焦点を当てた。 Ca^{2+} 動態のこれまでの研究では、刺激情報と細胞の様子との3次元同時観測法が確立されていなかった。そこでヒト皮膚組織と二光子顕微鏡を用いたリアルタイム測定法の確立を目的とした。具体的には、熱刺激として二光子顕微鏡に搭載されているレーザーを用い、刺激と Ca^{2+} の同時測定を二光子顕微鏡により可能にした。結果として、表皮最上層に刺激を与えると基底層まで瞬時に Ca^{2+} が伝播し、その後、隣接する基底細胞に伝播する様子をリアルタイムで観察することに成功した。本研究は、ヒト皮膚組織を用いた Ca^{2+} 動態のリアルタイム観察法を確立し、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。また、他刺激によるヒト皮膚組織 Ca^{2+} 動態観察に関する研究の発展に大きく寄与すると考えられる。

最後に、申請者は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について、数学者との共同研究を行なった。申請者はまず共同研究者と共に、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。ここでの数理モデルは、「 Ca^{2+} 動態を記述した数理モデル」、「細胞分裂や細胞周期等、細胞ダイナミクスを考慮した数理モデル」、「角層バリア機能を表現する細胞間脂質形成を考慮した数理モデル」等、いくつもの数理モデルから構成される。その結果、表皮の構造や厚さは、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、表皮直下真皮最上部に位置する乳頭層の波状パターンが重要であることが示唆された。次に、表皮モデルを培養するための培養器の底部に数値計算の波の波長や振幅のスケール比が類似した、ポリエステルメッシュを密着させて表皮モデルを構築し表皮の厚さやバリア機能を評価した。その結果、無処理の表皮モデルと比較して、処理した表皮モデルの表皮は厚く、ラメラ顆粒の分泌が増し、経表皮水分蒸散量も低下した。つまり、数理モデルと類似した高バリア機能を有する厚い表皮モデルが形成されることが判明した。これらの結果から、本研究では表皮恒常性を表した数理モデルの妥当性が確認されると共に、この数理モデルがバリア機能の恒常性維持の生物学的プロセスの解明に有効な方法になることが示唆された。

以上、本研究では 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、Cry j1 がケラチノサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こし、バリア機能を低下させることを見出した。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、数理モデルの妥当性を確認すると共に、バリア機能の恒常性維持に関する生物学的プロセスの解明に数理モデルが有効になることを示唆した。これらの研究は皮膚科学分野だけでなく異分野融合研究として高く評価できる。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

1. Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen induces elevation of intracellular calcium in human keratinocytes and impairs epidermal barrier function of human skin ex vivo. Kumamoto J., Tsutsumi M., Goto M., Nagayama M., Denda M. Archives of Dermatological Research, 308, 2016, 49-54.
2. Real-time imaging of human epidermal calcium dynamics in response to point laser stimulation. Kumamoto J., Goto M., Nagayama M., Denda M. Journal of Dermatological Science, 86, 2017, 13-20.
3. Mathematical-model-guided development of full-thickness epidermal equivalent. Kumamoto J., Nakanishi S., Makita M., Uesaka M., Yasugahira Y., Kobayashi Y., Nagayama M., Denda S., Denda M. Scientific Reports, 17999, 2018, 8.
4. Frontiers in epidermal barrier homeostasis--an approach to mathematical modelling of epidermal calcium dynamics. Denda M, Denda S, Tsutsumi M, Goto M, Kumamoto J, Nakatani M., Takei K., Kitahata H., Nakata S., Sawabu Y., Kobayashi Y., Nagayama M. Experimental Dermatology, 23, 2014, 79-82.

参考論文

1. External negative electric potential accelerates exocytosis of lamellar bodies in human skin ex vivo. Kumamoto J., Goto M., Denda S., Nakatani M., Takasugi Y., Tsuchiya K., Shimizu Y., Takatsuru Y., Denda M. Experimental Dermatology, 22, 2013, 1-3.