

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「現代の数理科学と連携するモデリング手
法の構築」
研究課題「数理モデリングを基盤とした数理皮膚科
学の創設」

研究終了報告書

研究期間 2015年10月～2021年3月

研究代表者：長山雅晴
(国立大学法人北海道大学電子科学
研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

表皮構造の数理モデルを構築し、角層バリア機能を担う角層に関連する老化現象、皮膚疾患について数理モデルを応用した *in silico* 実験系を確立する。また、数理モデルで得られた知見から *in vitro* 実験のための3次元表皮培養系を確立し、臨床皮膚科学、再生医療への応用を目指す。そして学術として確立されている数学・数理科学を皮膚科学の世界に展開し、皮膚科学者、臨床皮膚科医と協働した数理モデリングによる数理皮膚科学の創設を目指す。生物学実験を基盤とした数理モデリングとその数値計算によって3次元皮膚数理モデルの構築に取り組み、皮膚疾患の病態再現を行う。また、3次元培養モデル皮膚系を使い、蛍光タンパクや免疫染色等を用いた二光子顕微鏡によるイメージング、そこから得られるデータの定量化等によって研究を進める。チーム全体で数理モデルの構築、結果の妥当性等を議論する。

皮膚疾患の病態再現に対応する皮膚数理モデルを構築した。臨床への応用として、数理モデルにおいて鶏眼の病態を再現するための仮定と臨床献体からのデータがよく一致することがわかった。また我々が構築した数理モデルは、皮膚バリア機能の恒常性も議論可能になっていることがわかった。さらに、新しい知見として、ケラチノサイトの最終分化における細胞動態、レーザー熱刺激に対する表皮細胞内 Ca^{2+} 動態、角層バリア機能の恒常性維持機構を明らかにした。数理モデルと同様に、基底部にヒト皮膚乳頭層に似た凹凸を作ることで、厚い表皮とバリア機能が高い角層を有する3次元皮膚モデルが構築できた。この3次元表皮モデルの構築方法では、再生医療など臨床医学へ応用することが困難であったため、培養器基底部にマイクロレベルの凹凸を樹脂加工で構築した系での3次元表皮モデルの構築を試みた。最初に数理グループで 10、15、20、30、60 μm の直径と、相互間隔を持つ円柱状ピラー(高さは全て 30 μm)を最密充填に配置した基底部に、ケラチノサイトを播種した際の数理モデルの構築とシミュレーションを行なった。その結果、平坦な基底部に比べて 15、20、30 μm 径のピラーがある場合、厚い表皮が構築されることが示された。この結果をベースに実験グループは、プラスチック膜の加工技術を持つ大日本印刷との共同研究を開始し、実際に使用する培養器底部に 15、20、25、30、50 μm の直径と、相互間隔を持つ円柱状ピラー(高さは全て 30 μm)を構築した系でケラチノサイトの培養を行なった。その結果、直径と相互間隔が 20 μm のピラーがある場合、有意に厚い表皮が構築されることが確認された。この3次元表皮は容易に培養器から剥がすことができるため、再生医療にも応用可能だと考えられる。また、数理科学の手法が医療生命科学にも重要な役割を果たせることが示唆された。

さらに3次元表皮モデルを、アトピー性皮膚炎など表皮の不全角化を呈する疾患の研究へ展開するため、2光子レーザー顕微鏡を用いて、培養系が角化する際のミトコンドリア、小胞体、細胞核の観察を行なった。その際、アトピー性皮膚炎の原因遺伝子の一つとされるフィラグリンの発現抑制の影響も調べた。その結果、フィラグリンの発現抑制は角化の時間を長くすることが明らかになり、フィラグリンが正常な角層形成のための細胞平坦化に寄与していることが示された。これらの知見は今後、アトピー性皮膚炎などの疾患の機序解明のための数理科学的アプローチの基盤になると期待できる。

表皮構築の数理モデルでは、表皮最表層のケラチノサイトの興奮がキーになっている。スギ花粉抗原 Cry j1 がケラチノサイトの興奮を惹き起こし、それが角層バリア機能の異常につながることを示し、その生化学的なメカニズムの解明を行なった。その結果、Cry j1 はケラチノサイトのタンパク質分解酵素受容体 PAR-1 を介してトロンビンの活性化を起こし、それが角層バリア機能の異常を惹き起こすことが分かった。さらに、その生化学的なカスケードを、トラネキサム酸、グルタチオンが抑制し、Cry j1 による角層バリア機能の異常を改善することも見出された。また、角層のバリア維持機構、ダメージを受けた後の回復過程をしらべるために、2光子レーザー顕微鏡を用いて顆粒層の脂質の相状態を観察した結果、ダメージを受けたバリア機能の回復を促進するキシリトール、フルクトースが、顆粒層の脂質の流動性を高くしていることが見いだされた。これらの成果は、アレルギーによる角層バリア異常を伴う疾患に対する、数理モデルによる対処法の探索に有効であると考えられる。

一方、皮膚感覚異常の数理科学的研究を目的として、ヒト皮膚内の末梢神経の3次元観察を行ってきたが、広島大学皮膚科学研究室からの依頼で、得られた3次元神経構造のヴァーチャルリアリティ展示を日本皮膚科学会大会(2018)で実施した。今後、さまざまな皮膚感覚異常を伴う皮膚における神経構造の研究を進めるが、その成果を効果的に示す技術の一つが見いだされた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 二光子顕微鏡を用いたケラチノサイト最終分化動態

概要: 蛍光ラベルした表皮モデルを用いて、角化時におけるオルガネラを4次元イメージングにより可視化した結果、ミトコンドリアの脱分極、細胞内小胞の停止、細胞形態の膨張、といった複数のステップを経ることが判明した。一方、アトピー性皮膚炎の関連遺伝子であるフィラグリンの発現抑制を行うと角化時間が長くなることから、フィラグリンは平坦化の促進に寄与することが示唆された。本研究成果は論文として採択された。(発行済原著論文48)

2. 基底膜変形の数理モデルと真皮乳頭層形成のメカニズム

概要: 皮膚疾患の病態を再現するために真皮変形の数理モデルを構築した。このモデルでは基底膜を弾性膜と仮定しバネ-ビーズ系の数理モデルで表現した。この数理モデルでは、分裂能の高い細胞が真皮乳頭層の凸部分に多くあることが示された。また、実験チームより真皮乳頭層の凸部分にある細胞は細胞分裂を多く起こしているという実験結果が示された。これらの結果から分裂能の高い細胞が基底膜に強く接着していることで真皮乳頭層が形成されること、その結果として、分裂能の高い細胞が真皮乳頭層の凸部分に多くあることがわかった。本研究成果は論文として採択された。(発行済原著論文34)

3. 非ヒスタミン性かゆみの持続性を示唆する数理モデリング

概要: 非ヒスタミン性のかゆみが持続する現象を理解するために、細胞を興奮性素子とし、神経電位伝播モデルで結合した数理モデルを構築した。数理モデルに対する計算機援用解析の結果、末梢神経の密度によって異なる持続的ダイナミクスが現れることを示した。我々の数理モデルは、各興奮性素子の結合強度や末梢神経の密度そのものでなく、末梢神経の枝分かれの増加が持続的ダイナミクスの要因となりうることを示唆した。(発行済原著論文25)

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 数理モデルから発見した人工皮膚構築

概要: 数理モデルによるシミュレーションによって、ケラチノサイト3次元培養に際し、その基底部に凹凸があると、表皮が厚くなり、角層が平坦になることが示唆された。この結果を検証するため、培養器の底に様々なパターンのポリエステル布を接着させた上でケラチノサイトの培養を行なった。その結果、布による凹凸が若い健常者の表皮-真皮境界にある凹凸(乳頭層)に近い場合、厚い表皮とバリア機能が高い角層を有する3次元表皮モデル系が得られた。

2. スギ花粉のバリア機能破壊のメカニズムの解明

概要: 日本産スギ花粉抗原 Cry j1 がトロンビン-PAR-1 経路を活性化することでケラチノサイトのカルシウム応答を誘発し、角層バリア機能低下を引き起こすことがわかった。また、トラネキサム酸の上記の応答を抑制する新規機能を発見した。さらなる Cry j1 による角層バリア機能低下を抑制する薬剤探索のためにトロンビン活性を評価する薬剤スクリーニング系を構築し、グルタチオンにトロンビン活性阻害効果があることを見出した。グルタチオンは Cry j1 によるケ

ラチノサイトのカルシウム応答、角層バリア機能低下も抑制することが確認できた。

3. 臨床医学への展開を目的とした培養器底部加工による人工皮膚構築

概要: 数理モデルから発見した人工皮膚を臨床医学へと展開させるため、培養器底部に直接凸加工する方法を大日本印刷との共同研究によって探索した。数理モデルによるシミュレーションを用いた結果、円柱型の凸を培養器底部に直接加工すると、その凸の幅や高さが $15\ \mu\text{m}$ ~ $30\ \mu\text{m}$ の場合に厚い表皮を形成することが予言された。その結果を基に円柱型のピラーを培養器底部に作製し3次元表皮モデルを構築すると、凸の幅や高さが $20\ \mu\text{m}$ の場合に厚い表皮を構築することが判明した。

<代表的な論文>

1. Y. Kobayashi, Y. Yasugahira, H. Kitahata, M. Watanabe, K. Natsuga and M. Nagayama, Interplay between epidermal stem cell dynamics and dermal deformation, npj Computational Materials 4(1), 45 (2018).

概要: 本論文は真皮形状の変化を伴う場合の表皮構造の数理モデルを行った。その際、真皮乳頭層が自然発生的に形成されることがわかり、その要因が分裂能の高い細胞が基底膜に強く接着していることであった。この結果は、真皮乳頭層の凸部分に分裂能の高い表皮幹細胞が多く存在していること示唆しており、この後の実験での検証により、表皮幹細胞の存在場所を明らかにできる可能性を示せた。

2. Y. Kobayashi, H. Kitahata and M. Nagayama, Sustained dynamics of a locally excitable system with nonlocal interactions, Physical Review E 96,022213 (2017).

概要: 非ヒスタミン性のかゆみが持続する現象を理解するために、数理モデリングから研究を行った。かゆみ発生機構の理解への第一歩として、神経線維と表皮細胞の結合した数理モデル(伝播距離が有限の弱い興奮系に長距離結合を導入した数理モデル)を構築した。その結果、結合の密度によって異なる持続的ダイナミクスが現れることを解析的に示した。我々の数理モデルは、末梢神経の密度そのものでなく、その枝分かれの増加が持続的ダイナミクスの要因となりうることを示唆した。

3. S. Ipponjima, Y. Umino, M. Nagayama, M. Denda, Live imaging of alterations in cellular morphology and organelles during cornification using an epidermal equivalent model, Scientific Reports 10, Article number: 5515(2020).

概要: 表皮モデルの角化時におけるオルガネラの変化を3次元観察した結果、ミトコンドリアの脱分極、細胞内小胞の停止、細胞形態の膨張を経ることが判明した。一方でフィラグリンのノックダウンから、フィラグリンの平坦化促進への寄与が示唆された。本研究は、角化のメカニズムの解明だけでなく、様々な皮膚疾患発症のメカニズムの解明にも貢献する。また、本結果の数理モデルへの反映により数理シミュレーション精度の向上が期待される。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「長山」グループ

研究代表者: 長山 雅晴(北海道大学電子科学研究所 教授)

研究項目

- ・ 皮膚数理モデルの構築
- ・ 真皮変形要因の解明
- ・ 表皮細胞・末梢神経系の相互作用モデル開発

- ・ 皮膚疾患因子特定への数理科学的アプローチ
- ・ 数理モデルの解析と可視化手法の開発

② 「傳田」グループ

主たる共同研究者:傳田 光洋((株)資生堂 嘱託社員)

研究項目

- ・ 底層形状を調整した3次元表皮モデルの構築
- ・ ボロノイ分割法の妥当性の検討
- ・ 角層バリア機能メカニズム解明、および向上方法の探索
- ・ 皮膚感覚異常因子の解明および環境因子受容システムの解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

数理モデルの進展から生命系の研究者との連携が進んでいる。理研の藤原裕展氏と毛包形成の数理モデルについて議論を行っており、京都大学理学研究科の高橋淑子グループとメラノサイトの空間分布のメカニズムについて議論を行っている。また、金沢大学医学系の佐藤純グループと九州大学医学研究科の三浦岳グループとは、脳細胞の分化モデルについて共同研究を続けている。臨床医との連携については、京都大学医学部皮膚科学教室とはKID 症候群とよばれる Gap-Junction タンパク異常によって発症する疾患について、共同研究を開始している。また、慶応義塾大学皮膚科学教室とは、タイトジャンクションバリア機能の実験と数理について共同研究をしており、孔汗角化症とよばれる疾患についても議論を開始している。3次元表皮モデルを再生医療に展開する目的で、プラスチックの微細加工技術を有する大日本印刷株式会社との共同研究を開始した。数理モデルとコンピューターシミュレーションで、ミクロン単位の径を持つ円柱状構造物が最密充填構造に分布している場合の、3次元モデルの構造を予見し、培養実験を開始した。その結果、未加工の培養器の場合に比べて、厚い表皮を得る方法を確立した。