

長山 雅晴

金沢大学理工研究域・教授

## 生理学と協働した数理学による皮膚疾患機構の解明

### §1. 研究実施の概要

本研究の目標はさきがけ研究課題「自己組織化としての皮膚バリア機能の数理解析」において構成した角層再生数理モデルを拡張し、皮膚バリア機能の異常によって現れる皮膚疾患に対する発生機構やその抑制機構に対して「実験検証に耐える数理モデル」と「生理学の実験検証」から明らかにすることである。本研究を推進することによって臨床データからは読み取ることのできない疾患の機構を数理科学的手法から明らかにする。

長山グループは「実験検証に耐える皮膚運動数理モデル」の構築を目指して、今年度は、基底細胞における細胞分裂モデルを中心に「角層形成数理モデル」の再整備を行った。また、角層形成に加えて細胞間脂質形成モデルを構築した。現在は基底細胞運動モデルを構築するために培養表皮細胞に対する細胞破壊実験を行い、基底細胞運動の特徴を取り出す作業をしている。さらに、時間に対する均質化法を用いない数値計算を行い、均質化法との相違を調べている。次年度は、引き続き基底細胞運動の数理モデルの構築を行い、皮膚運動数理モデルの構成を行う。また、傳田グループから提出される実験データから数理モデルの改良を行っていく予定である。

傳田グループは、生理学の視点から、皮膚疾患機構を解明するために必要な実験系の構築を中心にしている。本年度は、表皮細胞と脊髄後根神経節由来の神経細胞との共培養系の構築を試みた。これらと平行して、培養系表皮細胞の持つ様々な機能を実験により明らかにする実験系の構築を行った。次年度から、構築した共培養系が、長山グループで構築する数理モデルのパラメータ設定のために、必要なデータを取得できるか否か検討する。さらに、今年度から継続して、細胞間脂質形成機構解明のための実験系の確立、3次元培養皮膚中でのカルシウムイオン動態観測実験系の構築を行う予定である。それぞれの実験系を構築ができた場合、長山グループの数理モデルが実際の生命現象を再現しているか否か検証するため、数理モデル評価のための生理データの取得に着手してゆく。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「長山」グループ

① 研究分担グループ長:長山 雅晴 (金沢大学理工研究域, 教授)

#### ② 研究項目

- (1) 皮膚バリア機能数理モデルの構築
- (2) 基底細胞運動の数理モデルの構築
- (3) 細胞破壊による基底細胞運動の実験
- (4) 数値計算法の数値的正当化

### (2)「傳田」グループ(研究機関別)

① 研究分担グループ長:傳田 光洋 (株式会社資生堂リサーチセンター, 主幹研究員)

#### ② 研究項目

- (1) カルシウムイオン濃度変化を指標とする表皮細胞特性抽出の実験解析
- (2) 細胞間脂質生成機構解明の実験
- (3) 3次元培養皮膚におけるカルシウム動態観察法の開発
- (4) 表皮角化細胞と神経系細胞の共培養系による表皮感覚機能の研究

### §3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### [A-1]皮膚バリア機能数理モデルの構築

今年度は、これまでに構築した角層回復モデルを基盤として、細胞内機能として細胞間脂質を生成する化学反応系モデルを取り入れた細胞間脂質形成のモデルを構築した。このモデルを角層形成モデルに組み入れることによって皮膚バリア機能の基本モデルとする。今後は細胞間脂質の表現方法について考える必要がある。この基本モデルを用いてバリア機能の早期回復機構を再現できるか確認することも課題である。

#### [A-2]基底細胞運動の数理モデル

今年度は基底細胞が受動運動すると仮定した数理モデルを構築した。この結果は、基底細胞の破壊実験において現れる細胞運動と異なる結果となった。この結果から基底細胞が能動運動すると仮定した数理モデルを構成する必要性が生じた。

#### [A-3]細胞破壊による基底細胞運動の実験

[A-2]の数値実験結果を検証するために、表皮細胞ではないが細胞運動の実験観測を行うための培養実験系を構築し、細胞破壊による細胞運動の観測を行った。その結果、細胞が掻き取られた部分に細胞が移動するときに細胞間に細胞密度の移動波のようなものが観測された。細胞はあたかもバネ振動しながら動いたように見えた。観測結果の解析は現在進行中である。また、表皮細胞の培養系、細胞極性や細胞骨格のダイナミクス、細胞増殖の分布を可視化して連続観察する実験系のセットアップを行った。

#### [A-4]数値計算法の数値的正当化

角層形成数理モデルにおいて、カルシウムイオンダイナミクスと細胞運動との間のタイムスケールの違いは時間平均による均質化法を用いて克服している。今年度は均質化法を用いない場合の数値計算を行い、均質化法を用いた結果と比較し、どの程度異なっているのか調べた。その結果から、正常な皮膚構造を保っている計算結果においては時間均質化法を用いた計算でも、十分定性的な性質を保っていることがわかった。今後は角層破壊時や表皮細胞破壊時における数値計算結果を比較していく必要がある。

#### [B-1]培養表皮細胞に対する ATP 灌流刺激によるカルシウムイオン伝播実験

細胞間カルシウムイオン伝播の数理モデルを構築するために必要な ATP に対する表皮細胞の挙動を調べた結果、ATP 灌流によって表皮細胞間をカルシウムイオンが伝播する現象が現れた。そのカルシウムイオン波の形態、速度などを数理解析することにより、ケラチノサイト間における情報伝達システムを明らかにした[2-3]。

#### [B-2]カルシウムイオン濃度変化を指標とする表皮細胞特性抽出の実験解析

培養表皮細胞が有する機能を抽出するためにカルシウムイオン濃度変化を指標とする実験系を確立することによって、ケラチノサイトが有している機能を実験から明らかにした。その一つがケラチノサイトの環境温度変化の感知性である[2-5]。培養液の温度が22℃を下回るとケラチノサイ

ト内のカルシウムイオン濃度が上昇し、17°Cを下回るとその傾向が顕著になった。また、分化したケラチノサイトより未分化ケラチノサイトの方がその応答が大きかった。末梢神経における低温受容に寄与しているのは TRPA1 であると考えられている。そこでケラチノサイトに TRPA1 の活性化を促す物質を添加すると、やはりカルシウム応答が観察された。一方、低温負荷によるカルシウム応答は TRPA1 特異的阻害剤によって阻害された。以上の結果から、ケラチノサイトにおける TRPA1 が低温受容に寄与していることを明らかにした。

次に、皮膚に存在する各種細胞、分化あるいは未分化のケラチノサイト、真皮に存在する線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ管細胞に対して水圧負荷に対する応答を調べた[2-4]。圧負荷に対し、顕著な応答を示したのは分化したケラチノサイトであった。一つの細胞のカルシウム興奮が隣接する広い領域に伝播することも、分化ケラチノサイト特有の現象であった。さらにそれらの応答が、培地からのカルシウムイオンの抜去および Transient Receptor Potential (TRP) 受容体阻害剤の添加によって消滅したことから、分化ケラチノサイトにおける特異な刺激受容には TRP 受容体が寄与していることが明らかになった。皮膚の機械刺激受容にケラチノサイトが関与していることを初めて示唆した。

以上、述べてきたように、TRP 分子は温度や機械刺激あるいは様々な化学刺激によって活性化されるイオンチャネル内蔵型受容体である。当初、末梢神経系にのみ存在すると考えられていた TRP が最近の研究でケラチノサイトにも存在することが明らかになってきた。さらに、我々の研究によって、ケラチノサイトに発現している各種 TRP 分子が感覚受容に寄与していることが明らかになった。その他にも TRP 分子はケラチノサイトの分化、増殖、あるいは炎症の惹起への寄与など、多様な役割をもっている。これらの知見を総括して示した[2-2]。

#### [B-3]3次元培養皮膚におけるカルシウムイオン動態観察法の開発

主としてヒト由来の表皮角化細胞を用いた *in vitro* 実験を行なうために、今年度は細胞を3次元構築したモデル皮膚を用い、外部からの刺激に対する応答を、細胞内カルシウムイオン指示薬、ナトリウムイオン指示薬あるいは細胞膜電位指示薬によって可視化する実験系を構築するための予備実験を行った。

#### [B-4]表皮角化細胞と神経系細胞の共培養系による表皮感覚機能の研究

表皮細胞と神経細胞(後根神経節由来)の共培養系で、実際のヒト皮膚にみられるような高次構造の構築を行った[2-1]。ヒト表皮においては上層部への無髄線維の進入、下層部での神経叢の形成が認められる。今年度は、これらの構造のモデル実験系を構築し、表皮細胞、神経細胞の培養開始タイミング、および培養液の組成の調整などを行った。その結果、神経細胞とケラチノサイトの共培養系で、細胞を培養するタイミングの違いによって、形態的に異なる末梢神経様の構造の自己組織化が観察された。特に、二種の細胞を同時に蒔き、培地のカルシウムイオン濃度が高い状態を維持すると、ケラチノサイトの集合体に神経細胞から軸策が伸展することが確認された。さらに、この系においてケラチノサイトに機械刺激を与えると、まずケラチノサイトにおいて発生したカルシウムイオン波が神経軸策にも伝播し、それがATP分解酵素でも阻害されなかったことから、未知の情報伝達経路が存在することも示唆された。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

- [1-1] T.Miura, “Mechanism of lung branching morphogenesis”, In “Biological and Physical Constraints on the Evolution of Form in Plants and Animals”, Vienna series in Theoretical biology, (in press).
- [2-1] M.Tsutsumi, M.Goto, S.Denda and M.Denda, “*Morphological and functional differences in co-culture system of keratinocytes and dorsal root ganglion-derived cells depending on time of seeding*”, Exp Dermatol 2011 (in press.)
- [2-2] M.Denda, M.Tsutsumi, “*Roles of transient receptor potential proteins (TRPs) in epidermal keratinocytes Transient Receptor Potential Channels*”, Advances in Experimental Medicine and Biology, 704 (2011) 847-860. DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3\_44

### (4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)