

「数学と諸分野の協働によるブレークスルーの探索」
平成22年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

長山 雅晴

北海道大学電子科学研究所・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. 研究実施体制

(1)「長山」グループ

① 研究代表者:長山 雅晴 (北海道大学電子科学研究所, 教授)

② 研究項目

- ・ 皮膚バリア機能数理モデルの構築
- ・ 基底細胞運動の数理モデルの構築
- ・ 細胞破壊による基底細胞運動の実験
- ・ 皮膚感覚機構の基礎モデル構築
- ・ 数値計算法の数値的正当化
- ・ 数値計算結果の可視化

(2)「傳田」グループ

① 主たる共同研究者:傳田光洋 (株式会社資生堂, 主幹研究員)

② 研究項目

- ・ ケラチノサイト・神経細胞共培養系による皮膚感覚異常機構解明
- ・ 表皮病理が情動に作用する因子の探索
- ・ 細胞内Caを指標としたケラチノサイト刺激感受性の評価
- ・ 細胞内Caを指標とした表皮ダメージ修復機構の解明
- ・ 二光子レーザー顕微鏡による皮膚内末梢神経 3次元構造観察法確立

§ 2. 研究実施内容

① 皮膚バリア機能数理モデルの構築と数値計算法の数値的正当化

皮膚バリア機能の恒常性を評価するための準備として、表皮構造の恒常性維持を評価するための指標を導入した。この評価は、角層直下でのカルシウムイオン興奮表皮細胞の均一性を指標として行った。この指標を用いることで、表皮構造の恒常性維持を評価することが可能となった。また、この指標を用いることで、数値計算を高速に行うための「時間平均化法」の有効性を確認した。この結果から、細胞運動の時間スケールでの数値計算の中にカルシウムダイナミクスの時間スケールでの計算結果の平均値を用いる場合の限界が明らかになった(数値計算法の数値的正当化)。さらに、皮膚バリア機能を持つ数理モデルを構築するために、細胞間脂質形成の数理モデルを構築した。今後は細胞間脂質の恒常性評価と角層の恒常性維持評価を用いたバリア機能の恒常性評価を行っていく。これらの研究と平行して、人工細胞膜ダイナミクスの研究を行った。この研究では単糖の種類によって皮膚バリア機能の回復機能が異なる要因を明らかにするため、リン脂質人工膜に対する単糖の作用を膜圧測定と分光測定から調べた。その結果、回復機能が有効であったフルクトース等は人工膜に対して特異的に作用することがわかった[1]。

② 細胞破壊による基底細胞運動の実験と基底細胞運動の数理モデルの構築

基底細胞運動の数理モデルを構築するためにMDCK細胞を用いた創傷治癒実験を行い、そこで発見した細胞集団の振動現象を再現するための数理モデルを構築した。振動現象が起こる要因として、細胞運動は細胞極性から生まれること、細胞極性は細胞間に働く力によって生じること、そして細胞の隣接関係は細胞が運動しても維持されること、が重要であることを明らかにした。さらに、ヒト表皮角化細胞を用いて集団運動解析を行った。方向性を持った集団運動を生み出すための細胞間接着の重要性を実験検証し、構築した数理モデルによって細胞個々の移動能を考慮する必要性を示した。多細胞動態を表現するセルラーポッツモデルの枠組みを用いて、細胞集団運動を記述する数理モデルを構築した([2])。今後は、これらの数理モデルを基盤として、創傷治癒時に起こる基底細胞運動の数理モデルの構築を行う(基底細胞運動の数理モデルの構築、細胞破壊による基底細胞運動の実験)。

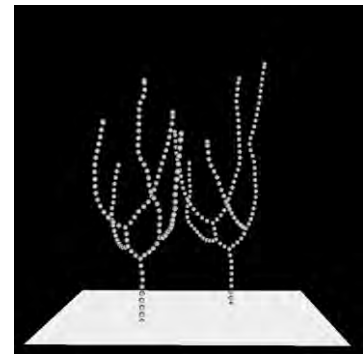


図1：3次元末梢神経伸張モデルの計算結果。

③ 皮膚感覚機構の基礎モデル構築

皮膚感覚機構の数理モデルを構築するために、表皮に伸張する末梢神経の数理モデルを構築した(図1)。この数理モデルを用いて、実験で見られるような表皮細胞への伸張現象を再現した。数理モデルでは末梢神経を誘導する物質が必要であるが、実験では末梢神経の誘導因子が未発見である。そこで、数理モデルから表皮細胞から放出されていると思われる誘導物質の存

在を示唆する実験系の構築した。今後は、数理モデルの結果と実験系の結果を合わせることで誘導物質の存在を明らかにする。

④ 数値計算結果の可視化

数値計算結果の可視化については、離散細胞運動モデルの結果に対して、細胞の体積をパラメータにしたフェーズフィールド法を用いて表皮細胞の可視化を行った。細胞数だけ変数が必要な方法であり、かつ3次元計算を行う必要があるため並列化による高速計算を行った。図2は3次元表皮構造モデルの計算結果を本研究でおこなった計算方法で可視化した結果である。

⑤ ケラチノサイト・神経細胞共培養系による皮膚感覚異常機構解明

アトピー性皮膚炎の患者の皮膚では、神経線維の密度が高くなっているという報告がある。またアトピー性皮膚炎モデル動物系では、この神経線維伸展を抑制すると、搔爬行動が抑制されたという報告がある。ケラチノサイトと神経細胞との共培養系で神経線維の伸展を定量する系があれば、痒み抑制薬剤のスクリーニングに役立つ可能性がある。そのため、あらかじめケラチノサイトと神経細胞を分離して培養し、その後、障壁を除去する実験を行なった。その結果、皮膚上層で認められる神経線維構造の自己組織化が見出され、その伸展の程度を数値化する方法も確立できた ([3])。

⑥ 表皮病理が情動に作用する因子の探索

従来、大脳で合成、放出されるペプチドホルモン、オキシトシンは人間の信頼や社会性、学習などに関与していることが知られている。私たちはこのオキシトシンが表皮ケラチノサイトでも合成され、ケラチノサイトへの刺激によって放出されることを明らかにした ([4])。さらに近年、コルチゾールもケラチノサイトで合成されること、アトピー性皮膚炎患者の表皮ではサイトカインが合成されること、アトピー性皮膚炎患者はうつを併発するケースが多いことから、表皮の病理状態が情動にも作用することを示唆する仮説を提唱した([5])。

⑦ 細胞内Caを指標としたケラチノサイト刺激感受性の評価

ケラチノサイトが機械刺激に応答する閾値を調べる目的で、密閉プラスチックに培養したケラチノサイトに、徐々に気圧を負荷する、高気圧を維持する、気圧を低下させるなどの措置を施し、細胞内カルシウムイオン濃度変化を観察した。その結果、気圧が大気圧から5hPa上昇すると細胞内カルシ

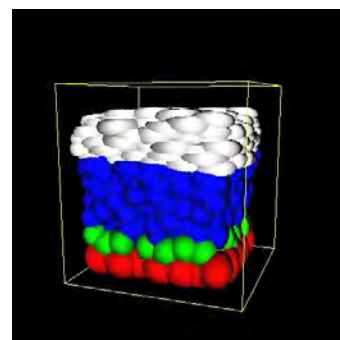
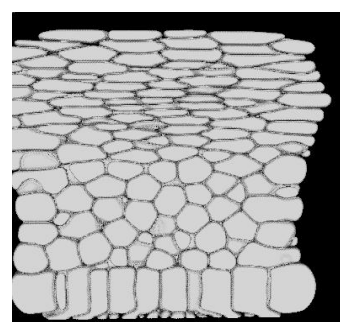


図2:3 次元表皮構造モデルの数値計算結果に対してフェーズフィールド法を用いて可視化した結果。上部は表皮の断面図、下部は表皮の全体図

ウム濃度の応答が現われること、一定の加圧、あるいは減圧でもカルシウム応答が観察されることから、ケラチノサイトが大気圧程度の圧変化(加圧, 減圧を問わない)にも応答し、わずかな外部機械刺激、大気圧変化のセンサーになりうるということが明らかになった([6]).

⑧ 細胞内Caを指標とした表皮ダメージ修復機構の解明

表皮が傷ついた後の修復過程、とりわけダメージを受けた部位の時空間的情報をいかにして表皮が獲得しているかを考察する目的で、単層培養したケラチノサイトを一つ、あるいは複数、破壊して、その後の細胞内カルシウムイオン変化を観察した。その結果、ダメージを受けた細胞の周囲に限定した細胞内カルシウムイオンの上昇の継続が観察された。この花弁状のパターンは培地からカルシウムを抜去すると現われず、また細胞にダメージを与えた直後から 30 分間のみ培地からカルシウムを抜去すると、ダメージを受けた場所における回復が有意に遅れた。これらの結果から、表皮がダメージを受けた後の修復過程における時空間情報は細胞内カルシウム濃度変化のパターンによって担われている可能性が示唆される([8]).

⑨ 二光子レーザー顕微鏡による皮膚内末梢神経 3次元構造観察法確立

アトピー性皮膚炎などの痒みの原因を解明する目的で、ヒト皮膚内部の神経線維の3次元立体構造を二光子レーザー顕微鏡で観察する手法の確立を目指した。その結果、免疫組織化学的手法により、健常者の皮膚内神経線維の3次元構造の可視化に成功した。今後、アトピー性皮膚炎患者の皮膚内神経線維の3次元構造の観察を進め、その痒みの原因を明らかにし、痒みを抑制する根本的対策の提案を目指す。

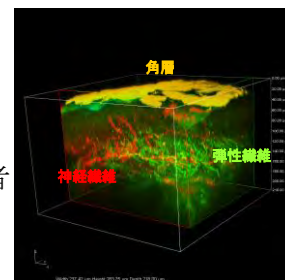


図3:ヒト皮膚内神経構

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表(公開)

●論文詳細情報

- [1] Satoshi Nakata, Takaya Shiota, Noriyuki Kumazawa, Mitsuhiro Denda, "Interaction between a monosaccharide and a phospholipid molecular layer", Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 405 (2012) 14– 18.
- [2] Tsuyoshi Hirashima, Yoichiroh Hosokawa, Takanori Iino, Masaharu Nagayama, "On Fundamental Cellular Processes for Emergence of Collective Epithelial Movement", Biology Open, 2013 (in press).
- [3] Sumiko Denda, Kentaro Takei, Junichi Kumamoto, Makiko Goto, Moe Tsutsumi, Mitsuhiro Denda, "Oxytocin is expressed in epidermal keratinocytes and released upon stimulation with adenosine 5'-[gamma-thio]triphosphate in vitro", Exp.

Dermatol 21:535-537, 2012 doi: 10.1111.

- [4] Moe Tsutsumi, Masashi Nakatani, Junichi Kumamoto, Sumiko Denda and Mitsuhiro Denda, “In vitro formation of organized structure between keratinocytes and dorsal-root-ganglion cells”, *Exp. Dermatol* 21:886-888, 2012, doi: 10.1111.
- [5] Mitsuhiro Denda, Kentaro Takei, Sumiko Denda, “How does epidermal pathology interact with mental state?”, *Medical Hypothesis*. 80:194-196, 2013, doi: 10.1016.
- [6] Kazuyuki Ikeyama, Masashi Nakatani, Junichi Kumamoto, Mitsuhiro Denda”, *Distinct intracellular calcium responses of individual cultured human keratinocytes to air pressure changes*”, *Skin Res Tech* 2013 in press.
- [7] Mitsuhiro Denda, Moe Tsutsumi, ”Possible role of epidermal keratinocytes in the construction of acupuncture meridians”, *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 2013 in press.
- [8] Moe Tsutsumi, Makiko Goto, Mitsuhiro Denda, “Dynamics of intracellular calcium in cultured human keratinocytes after localized cell damage”, *Exp. Dermatol* 2013 in press.

(3-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)