

博士論文の内容の要旨

氏名	中西忍
学位名	博士（工学）
学位授与年月日	2021年 9月 30日
論文題目	皮膚表皮の花粉防御機構の解明と新皮膚表皮応答評価系の構築

(博士論文の内容の要旨)

皮膚は身体の全表面を覆い、内部の諸器官を外部からの刺激・衝撃から保護するとともに、独自の生理機能を持って外界と接している。身体全体の調和に関係している人体最大の臓器であり、もっとも活発に再生できる組織の1つでもある。皮膚は大きく表皮・真皮・皮下組織に分類され、その3層の中で表皮は最も薄い層だが、外界からのバリア機能において最も重要な働きを担っている。表皮はケラチノサイトと呼ばれる細胞が基底層から増殖し、上層に向かうにつれて分化し、有棘層、顆粒層、角層と呼ばれる層を形成することで成り立っている。表皮内ではカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度が厳密に調整されており、通常は有棘層と基底層では低く、顆粒層で高くなって角層で再び減少する、という濃度勾配が保たれている。表皮のバリア機能において特に重要なのは体内の水分を外界へ逃がさないようにすることで、外界からの刺激により顆粒層細胞内の Ca^{2+} 濃度が低下すると顆粒細胞からラメラ顆粒が分泌され、表皮バリアの修復が行われる。一方、外界からの刺激による表皮バリア破壊は角層内 pH を上昇させ、セリンプロテアーゼを活性化する。活性化したセリンプロテアーゼは G タンパク質共役受容体の Protease activated receptor-2 (PAR-2) を活性化し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす。これはラメラ顆粒の分泌を抑制するので、表皮バリア機能制御には細胞内 Ca^{2+} 濃度の調整が重要となる。我々は以前の研究で日本産スギ (*Cryptomeria japonica*) 花粉の主要アレルゲンである Cry j1 が表皮内セリンプロテアーゼを活性化し、表皮バリア機能を低下させることを見出している (第1章 序論)。

本研究では表皮バリア機能調節機構の解明と制御を目的とせず、日本産スギ花粉のアレルゲン Cry j1 の表皮への作用機序の解明に取り組んだ。その結果、Cry j1 はセリンプロテアーゼの1種であるトロンピンを活性化し、活性化されたトロンピンが PAR-2 ではなく PAR-1 を活性化することで細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を誘発し、表皮バリア機能低下を引き起こすことがわかった。また、セリンプロテアーゼ阻害剤である SBTI やトロンピン阻害剤であるビバルリジンは Cry j1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制し、表皮バリア機能低下を抑制できることもわかった。プラスミノゲン阻害剤として知られる表皮バリア回復促進剤、トラネキサム酸にも同様の効果が観察され、トラネキサム酸の新たな機能の発見にも繋がった (第2章)。さらに Cry j1 による表皮バリア機能低下に対する新たな薬剤を見つけることを目的として、トロンピン活性阻害剤のスクリーニングを行った。その結果、還元型グルタチオンにトロンピン活性阻害効果、および Cry j1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇・表皮バリア機能低下の抑制効果を見出した。これはトロンピン/PAR-1 経路をターゲットとした表皮バリア機能改善剤の開発が有効であることを示しており、今後新たな臨床研究への利用が期待される成果である (第3章)。次に、表皮バリア機能研究の発展を支える礎となる技術の開発を試みた。(1) 皮膚内 (部位別) における各種元素の分布パターン網羅的解析: 表皮内のカルシウム以外の元素にも皮膚恒常性維持に関わるものが知られているが、それらの元素の詳細については有効な蛍光試薬が少ないことに加え、分析に複雑なサンプル調整を要するためにあまり調べられていない。そこで、レーザーアブレーション ICP 質量分析を用いることで、特別な前処理を施すことなく皮膚凍結切片から網羅的に元素情報を取得する方法を確立した。皮膚内の部位別分布パターンを13種類の元素について明らかにし、うち4種類の元素 (Sr, Mo, I, Ba) については世界で初めて皮膚内定量に成功した。(2) 機械的刺激に対する表皮応答評価モデルの構築: 外界からの刺激にはラメラ顆粒分泌では防ぎきれないもの、例えば棘などの物理的・機械的な刺激物も存在する。こうした異物は仮にそれが細胞毒性を示さなかったとしてもいずれ表皮から体外へと排出され、この異物排除も表皮バリア機能の一つである。しかし機構解析に利用できる評価系がほとんどないため、ハンギング・インサート上で12日間ケラチノサイトを培養して「3D 表皮モデル」を構築することにより、プラスチックビーズや PET メッシュのよう

な異物を皮膚に埋め込んだときのケラチノサイトの応答を観察できる評価系を構築した（第4章）。

このように、スギ花粉症による肌荒れとその発現ならびに修復に関する機構の詳細を明らかにし、トロンビン活性阻害剤のスクリーニングを通して還元型グルタチオンが表皮バリア機能低下の抑制効果を持つことを見出した。さらに元素解析と異物応答に関する新しい皮膚表皮応答評価系も提案でき、これらの技術が基礎から臨床までのあらゆる皮膚科学研究の発展に寄与することを期待したい（第5章 総括）。