

審査の結果の要旨

氏名 平尾 哲二

皮膚は生体の最外層に位置し、紫外線や異物などの外界からの種々の刺激から生体を守り、体内の水分蒸散を制御するという重要なバリア機能を演じている。これまで、急性的な紫外線照射によって生じる皮膚の炎症などについては多くの研究が進められてきたが、通常の状態の皮膚についての理解は十分ではなく、生化学的解析が求められてきた。

本論文は、皮膚の炎症・免疫応答を制御するメディエータとして interleukin-1(IL-1)とその拮抗分子(IL-1ra)、及び、バリア機能に大きな役割を演じる角層細胞 cornified envelope(CE)に焦点を当て、テープストリッピング法を用いて非侵襲的に皮膚の最外層の角層を採取し、通常の状態の皮膚、特に露光部の皮膚の生化学的解析の結果を記載したものである。

1. 露光部角層における IL-1ra の亢進

表皮ケラチノサイトは皮膚炎症のメディエータである IL-1 に加えて、その拮抗分子である IL-1ra も産生するが、それらの挙動については未解明の点が多い。そこで、角層試料中の IL-1 α および IL-1ra の高感度検出系を構築し、両者の挙動について調べた。その結果、顕著な部位差が観察され、IL-1 α は非露光部である上腕内側で多く、逆に IL-1ra は露光部である顔面で多く、活性を反映する IL-1ra/IL-1 α 比は、上腕内側角層では約 8 に過ぎないが、顔面角層では約 300 に達した。また、両者は活性本体として存在し、顔面角層では IL-1 阻害活性が優位に検出された。背部への実験的紫外線照射により、角層中 IL-1ra の著しい亢進が観察され、顔面における IL-1ra 亢進の要因として、日常的な紫外線照射の影響が強く示唆された。加齢変化について調べたところ、顔面では年齢に関わりなく IL-1ra/IL-1 α 比は高値を示したが、上腕内側では加齢とともに低下した。角層中 IL-1ra/IL-1 α 比は、乾癬やアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患や、いわゆる敏感肌においても高値を示し、表皮ターンオーバーの亢進や分化の乱れを伴う潜在的な皮膚炎症をも鋭敏に反映する指標であると位置付けられた。

2. 紫外線照射による表皮 IL-1ra 産生亢進

露光部皮膚における IL-1ra 亢進について、さらに確証を得ることを目的に、紫外線照射したマウス表皮シート培養系により検討を進めた。非照射群の培養上清には IL-1 活性が検出されたのに対して、紫外線照射群の培養上清には、IL-1ra に一致する IL-1 阻害因子が多量に含まれていた。したがって、紫外線照射された表皮からは、IL-1 のみならず IL-1ra も遊離されることが明らかとなった。

3. 角層細胞 CE 成熟度評価法の確立と顔面における未熟 CE の検出

角層は、角層細胞と細胞間脂質から構成される。角層細胞は、表皮ケラチノサイトが分化した死細胞で、内部にはケラチン線維が充満している。細胞間脂質は、セラミド、コレ

ステロール、遊離脂肪酸などから構成されるラメラ構造を組織し、角層バリア機能に重要な役割を演じている。角層細胞と細胞間脂質の界面には、角層細胞を包む CE が存在する。CE は、表皮ケラチノサイトの分化とともに involucrin や loricrin などが transglutaminase (TGase) により架橋・不溶化したもので、極めて堅牢な構造である。さらに CE の外側のタンパク質には、 ω -hydroxyceramide などの脂質がエステル結合し疎水性を獲得し、これを足場として細胞間脂質のラメラ構造が整然と配向することによって角層のアッセンブリーが形成されると考えられている。

角層バリア機能には解剖学的な部位差があり、ヒト顔面は特にバリア機能が低い部位のひとつである。その原因として、CE の状態の変調という仮説を立てた。その実証を目的として、抗 involucrin 抗体による蛍光免疫染色と Nile red 染色による非侵襲的 CE 成熟度評価法を新規に確立した。本法により CE 成熟度の部位差を調べたところ、顔面において未熟 CE が高頻度に検出されることが明らかとなった。一方、体幹や四肢など非露光部位では、角層深部では未熟 CE が検出されるが、最外層では成熟 CE が大半を占めた。これらの結果から、顔面におけるバリア機能低下の要因の一つとして、CE 成熟度の低下が強く示唆された。

4. 炎症性皮膚疾患における未熟 CE の検出と不全角化との関連

乾癬、アトピー性皮膚炎の角層試料を採取して調べたところ、皮疹部において未熟 CE の出現が判明し、炎症性皮膚疾患においてもバリア機能低下と CE 成熟度の低下との関連が強く支持された。次に、不全角化の指標として汎用される角層有核細胞(parakeratosis) と未熟 CE との差異について検討を進めた。その結果、乾癬皮疹部では、未熟 CE と有核細胞ともに検出されるものの、個々の角層細胞ごとに観察すると、両者は必ずしも一致しなかった。また、健常人の顔面角層においては核を伴わない未熟 CE が多く検出された。

5. 顔面における未熟 CE の *ex vivo* 成熟反応と TGase の関与

ヒト顔面角層における CE 成熟度低下の原因を探る目的で、未熟 CE の成熟能について検討した。採取直後の顔面角層には未熟 CE が検出されたが、37°C, 100% RH でのインキュベート後には未熟 CE は検出されず、TGase の触媒による成熟 CE への変換が観察された。この結果は、顔面の未熟 CE の潜在的成熟能力を示している。この CE 成熟反応が低湿度環境では阻害され、グリセリン塗布により回復したことから、保湿剤は単に角層水分量を高めるだけでなく、角層における酵素反応を促しバリア機能を維持向上させると考察された。

以上、本研究は、非侵襲的に得られる角層試料を用いて、IL-1ra/IL-1 α 比の測定により絶えず刺激を受ける露光部皮膚は微弱炎症状態であること、及び、CE 成熟度の評価により、CE 成熟不全がバリア機能低下の大きな要因であることを明らかにしたものである。本研究の成果は、皮膚の紫外線障害の機序解明、及び、バリア機能の解明に大きく貢献しており、今後の皮膚を標的とする医薬品、及び、化粧品の研究開発、さらには、有効な経皮吸収剤の研究開発に貢献するのみならず、生化学、医薬品化学の進展に寄与するところが大きく、博士(薬学)の学位に相応しいものと認めた。