

## 表皮機能におけるカルシウムの役割

資生堂リサーチセンター 傳田光洋 (Mitsuhiro Denda)

Shiseido Research Center

皮膚は最外層の表皮、その下の真皮、皮下脂肪からなる。表皮を形成する主要な細胞はケラチノサイト (keratinocyte) と呼ばれる上皮系の細胞である。表皮の最深部でケラチノサイトは分裂し、分化しながら上層に向かい、やがて死んで角層と呼ばれる薄い層を形成する。

表皮の機能としては長らくこの角層を作る役割のみが注目されてきた。角層は死んだケラチノサイトとその間隙を埋める細胞間脂質からなる特異な構造を持ち、同じ厚さのプラスチック膜なみの水の通りにくさ、換言すればバリア機能を有する。陸棲の哺乳類にとってこの角層は体内の水分の漏出を防ぐ重要な役割を担っている。

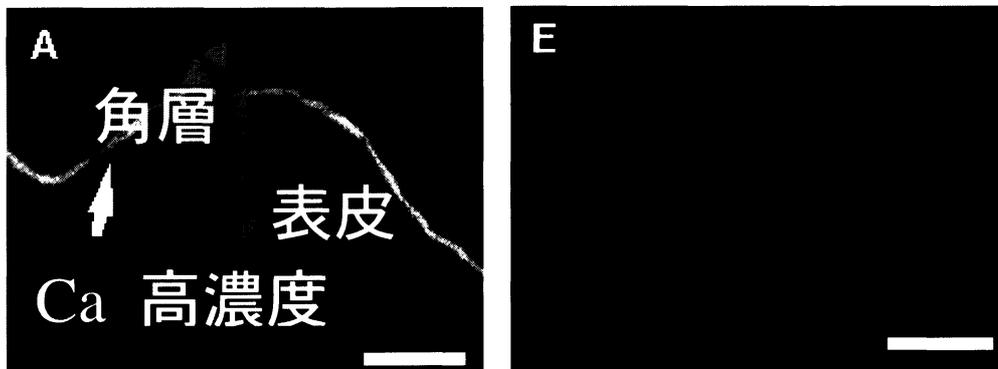
一方、最近の研究でケラチノサイトが温度、圧、可視光などを受容するタンパク質があることが知られてきた。この事実は表皮ケラチノサイトが皮膚感覚の最前線であることを示唆している。

ケラチノサイトの分化と角層バリアの形成、環境因子の受容、いずれにおいても重要な役割を果たしているのはケラチノサイトにおけるカルシウムイオンの動きである。本稿では角層バリア形成におけるカルシウムイオンの働き、そして表皮の環境因子受容におけるカルシウムの役割について述べる。

### バリア機能維持におけるカルシウムイオンの役割

健全な表皮の中では角層の直下、表皮顆粒層にカルシウムイオンの局在が観察される。このカルシウム局在は角層バリアをセラテープで剥がしたり有機溶媒で脂質を漏出させて破壊すると消滅する (Mauro 1998, Denda 2000)。

図 1 A:健全な皮膚におけるカルシウム分布 E:バリア破壊でカルシウムの局在が消える



Biochem Biophys Res Commun 272: 134-137 (2000) より許可転載

ダメージを受けても健康な表皮の場合、バリア機能は自然に回復する。バリア機能の回復と共に表皮内のカルシウム局在も元に戻る(Menon 1994)。角層バリアにダメージを与えた直後、水を通さないプラスチック膜などで皮膚表面を覆うと、バリアの回復が阻害される。この場合、表皮内のカルシウム局在も元の状態には戻らない(Menon 1994)。すなわちバリア機能と表皮内カルシウム分布はパラレルな関係にある。

カルシウムイオン環境は、まずケラチノサイトの分化に影響を与える。ケラチノサイトの単層培養系のカルシウム濃度を上げると、表皮最外層に特有なフィラグリン、インボルクリンなどのタンパク質が合成されるようになる。フィラグリンはアミノ酸にまで分解され、角層の中の水分を維持すると考えられている。インボルクリンは互いに架橋され角層の強度を高め細胞間脂質構造を支える細胞外構造を形成する(Steinert 1999)。

角層のバリア機能に寄与する細胞間脂質の合成にもカルシウム環境は大きく影響する。健康な表皮では最表層の顆粒層と呼ばれる部分で、脂質を内蔵するラメラ顆粒と呼ばれる顆粒が形成される。角化の際、ラメラ顆粒の内部の脂質が細胞外へ放出され、細胞間隙を埋めて細胞間脂質構造を形成する。この脂質の表皮における合成を誘導するのも、ケラチノサイトをとりまく環境におけるカルシウムイオンの上昇であることが知られている(REF)。

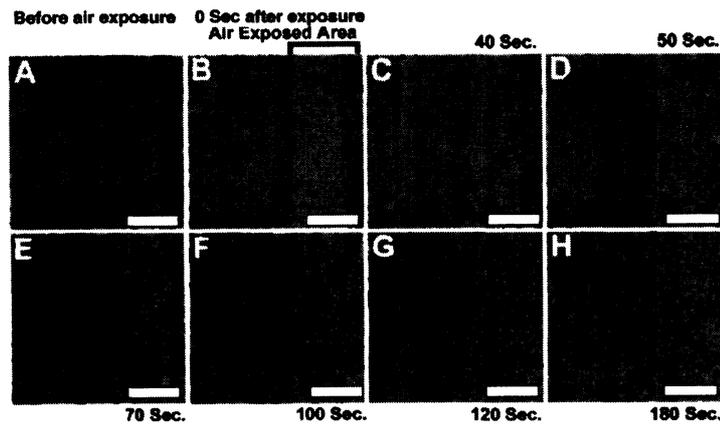
アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎の場合に表皮内のカルシウムイオン勾配が失われることが知られている(Forslind 1999)。これらの疾患ではバリア機能の低下が認められる。さらに加齢と共に表皮内カルシウムイオン勾配が失われる傾向もある(Denda 2003)。高齢者においてはバリア破壊後の回復が若年者に比べて遅いことが報告されている(Ghadially 1995)。

乾燥した環境下に1-2週間いると角層は環境に適応して厚くなる。またバリア破壊後の回復速度も通常の湿度環境下の場合より早くなる(Denda 1998)。この場合の表皮を観察してみると表皮最外層におけるインボルクリン、フィラグリンの量が増え、そして表皮内のカルシウムイオンの勾配がより顕著になっている(Elias 2002)。

陸棲哺乳類の生存に不可欠な皮膚バリア機能の維持には表皮内のカルシウムイオンの分布が極めて重要な役割を果たしている。

その一方で、健康な表皮の中でカルシウムイオンの局在が維持される機構、バリア破壊によってその局在が瞬時に失われる機構については、いまだ想像の域を得ない。カルシウムイオンの局在を皮膚表面の電位変化で観察するという実験系で、ケラチノサイトに発現しているカルシウムポンプ、あるいは電位感受性カルシウムチャネルなどが寄与しているらしいことが指摘されている(Denda 2001)。またケラチノサイトの単層培養系で、その一部を空気に暴露すると、連続的なカルシウム波、細胞内カルシウム振動が観察される(Denda 2007)。

図2 空気曝露によるカルシウム波



Skin Research and Technology 13: 195-201, 2007 より許可転載

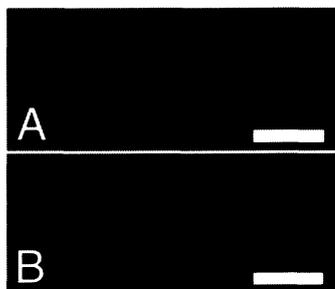
これらの減少から、表皮内のカルシウムイオンの動態は、ケラチノサイト細胞が持つイオンポンプ、イオンチャネルによる局所的变化をもたらす自己組織化現象であることが予想される。

表皮感覚の新しい考え方、そしてカルシウムイオンの役割

温度、湿度、圧力などの刺激に対する皮膚感覚は、長らく皮膚における神経末梢が担っていると考えられてきた。無髄神経線維は表皮上層にまで入り込んでいる。さらに表皮基部にはメルケル細胞、真皮にはパチニ小体など様々な神経終末が存在する。

しかし末梢神経系における温度や痛みの受容体がクローニングされてみると、それらの多くがケラチノサイトにも存在することがわかってきた。視覚、聴覚、嗅覚、味覚では、まず上皮系の細胞が光や振動や分子を受容し、それを電気的な情報に変換して神経系にもたらししていた。そして発生の段階で表皮は神経系や感覚器系と同様、外胚葉から形成される。皮膚感覚においても上皮系、すなわちケラチノサイトによって構成される表皮が、感覚の最前線である可能性がある。

きっかけになったのは二種類の痛みの受容体の発見である。全世紀末、まず43℃以上の温度、カプサイシン、酸による痛みを担う TRPV1 (VR1)、炎症時に放出される ATP による痛みを担う P2X3 である(Caterina 1997)(REF2000)。いずれも当初、神経末梢での発現が見出された。そして双方ともカルシウムイオンチャネル内蔵型受容体である。ほどなくして TRPV1、P2X3 とも表皮ケラチノサイトにも発現していることが見出された(Denda 2001)(Denda 2003)。痛みの最前線は表皮ケラチノサイトである可能性が出てきた。図3 A:表皮中 TRPV1 B:表皮中 P2X3



Exp Dermatol 16:157-161, 2007 より許可転載

温度受容体として相次いで異なる温度に対応する TRP(transient receptor potential)が発見された。その中で現時点では、体温近くの温度で活性化される TRPV3、TRPV4、および 17℃以下の低温で活性化される TRPA1 がケラチノサイトにも発現していることが確認されている(REF)(Atoyán 2009)。いずれもカルシウム透過性チャネルを内蔵する受容体である。

これらの中で TRPV4 は機械刺激と浸透圧、TRPA1 も機械刺激によって活性化されるという報告がある(Dhaka 2006)。また前述の皮膚バリア回復過程に対し、TRPV1、TRPV4、および TRPA1 が関係することも見出されている(Denda 2007)。

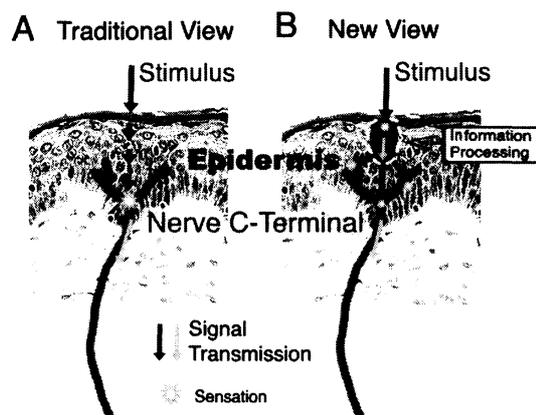
TRP の存在から予想させることであるが培養ケラチノサイトに機械刺激や温度刺激を与えると細胞内カルシウムの上昇が観察される。神経系の細胞では細胞内カチオンの上昇による細胞膜の脱分極を「興奮」と定義する。その意味においてケラチノサイトも温度や機械刺激によって興奮する。前にも述べたが、培養したケラチノサイトの一部を空気曝露した場合に観察されるカルシウム波も、ケラチノサイトの興奮が伝播していると言える。

表皮におけるケラチノサイトの興奮は、表皮に進入している神経末梢の興奮も惹起すると考えられる。ケラチノサイトと神経細胞と一緒に培養した系では、ケラチノサイトに負荷された機械刺激による興奮が、近くにある神経細胞の興奮をもたらすことが確認されている(Koizumi 2004)。

脳を含む中枢神経系でもカルシウムやナトリウムなどのイオン動態、細胞膜の電気状態が高次情報処理機構において重要な役割を果たしている。それらを担っているのは、情報伝達物質とその受容体であり、受容体の活性化は細胞内イオン濃度の変化、細胞膜電位の変化として電気的情報になる。

驚くべきことに脳において記憶や学習、あるいは情動などに寄与している受容体の多くがケラチノサイトにも発現している(Denda 2007)。またそれらの受容体を活性化する情報伝達物質の多くをケラチノサイトは合成し分泌する(Denda 2002)(Fuziwara 2003,2004)(Ikeyama 2007)。表皮の電気的狀態はバリア機能に作用するため、中枢神経系情報伝達物質の多くがバリア機能にも影響する。しかし脳において高次情報処理を担うシステムがケラチノサイトにおいて単にバリア機能の維持のみに寄与しているとは考え難く、未知の高次情報処理機構が表皮に存在する可能性がある。表皮ケラチノサイトはこれまで述べてきたように様々な環境因子を受容する感覚器としての側面がある。さらに表皮の中ではおそらくケラチノサイトと神経末梢との相互作用などで、受容された環境因子情報のプロセッシングが行われている可能性がある。換言すれば表皮は感じ考えその結果を中枢神経系や全身生理に発信しているのかもしれない。

図4 皮膚感覚の新しい考え方 Exp Dermatol 16:157-161, 2007 より許可転載



脳の機能の研究には、多様な因子の相互作用のシミュレーションが用いられる場合が多い。今後、表皮の隠された機能を解析するためにも、数学的手法の応用が必須となるであろう。

#### 参考文献

Caterina MJ., Schumacher MA., Tominaga M., Rosen TA., Levine JD., Julius D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824, 1997

Chung MK., Lee H., Mizuno A., Suzuki M., Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem* 279:21569-21575, 2004

Cockayne MJ., Hamilton SG., Zhu QM., Dunn PM., Zhong Y., Novakovic S., Malmberg AB., Cain G., Berson A., Kassotakis L., Hedley L., Lachnit WG., Burnstocks G., McMason SB., Ford APDW. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behavior in P2X3-deficient mice. *Nature* 407: 1011-1015, 2000

Denda M., Ashida Y., Inoue K., Kumazawa N. Skin surface electric potential induced by ion-flux through epidermal cell layers. *Biochem Biophys Res Commun* 284:112-117, 2001

Denda M. and Denda S. Air-exposed keratinocytes exhibited intracellular oscillation. *Skin Research and Technology* 13: 195-201, 2007

Denda M., Fuziwara S., Inoue K., Denda S., Akamatsu H., Tomitaka A., Matsunaga K. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1250-1252 (2001)

Denda M., Hosoi J., Ashida Y. Visual imaging of ion distribution in human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 272:134-137, 2000

Denda M., Inoue K., Fuziwara S., Denda S. P2X purinergic receptor antagonist accelerates skin barrier repair and prevents epidermal hyperplasia induced by skin barrier disruption. *J Invest Dermatol* 119: 1034-1040, 2002

Denda M, Sato J, Masuda Y, Tsuchiya T., Kuramoto M., Elias PM, Feingold KR. Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol* 111:858-863, 1998

Denda M., Sokabe T., Fukumi-Tominaga T., Tominaga M. Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2006 in press

Dhaka A., Viswanath V., Patapoutian A. TRP ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29:135-161, 2006

Elias PM., Ahn SK., Denda M., Brown BE., Crumrine D., Kimutai LK., Komuves L., Lee SH., Feingold KR. Modulations in epidermal calcium concentration regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol* 119:1128-1136, 2002

Forslind B., Werner-Linde Y., Lindberg M., Pallon J. Elemental analysis mirrors epidermal differentiation. *Acta. Derm. Venereol. (Stockh)* 79:12-17, 1999

Fuziwara S., Inoue K., Denda M. NMDA-type glutamate receptor is associated with cutaneous barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 120:1023-1029, 2003

Fuziwara S., Suzuki A., Inoue K., Denda M. Dopamine D2-like receptor agonists accelerate barrier repair and inhibit the epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol* 125:783-789, 2005

Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest.* 95:2281-90, 1995

Grubauer G., Elias PM., Feingold KR. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J Lipid Res* 30:323-333, 1989

Ikeyama K., Fuziwara S. and Denda M. Topical Application of Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor Accelerates Cutaneous Barrier Recovery and Prevents Epidermal Hyperplasia Induced by Barrier Disruption. *J Invest Dermatol* 127:1713-1719, 2007

Koizumi S., Fijishita K., Inoue K., Shigemoto-Mogami Y., Tsuda M., Inoue K.  $Ca^{2+}$  waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem J* 380:329-38.2004

Mauro T., Bench G., Sidderas-Haddad E., Feingold K.R., Elias P.M., Cullander C. Acute barrier perturbation abolishes the  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J. Invest. Dermatol.* 111: 1198-1201, 1998

Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br J Dermatol.* 1994 Feb;130(2):139-47.

Nemes Z, Marekov LN, Fésűs L, Steinert PM. A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8402-7.

Watanabe R., Wu K., Paul P., Marks DL., Kobayashi T., Pittelkow MR., Pagano RE. Up-regulation of glucosylceramide synthase expression and activity during human keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 273:9651-9655, 1998