

氏 名 ほんま ゆうすけ
本 間 佑 介

学位の種類 博士(薬科学)

学位記番号 富医薬博乙第45号

学位授与年月日 平成25年9月18日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第4項該当

学位論文題目 **皮膚バリア破壊モデルマウスの作製と皮膚バリア修復に関する研究**

論文審査委員

(主査) 教授 倉石 泰 (紹介教員)

(副査) 教授 門脇 真

(副査) 教授 酒井 秀紀

論 文 内 容 の 要 旨

皮膚バリアは、外界からの異物侵入を防止するとともに、体内からの過剰な水分蒸散を阻止する働きがある。皮膚バリアが障害されると、細菌、ウイルス及び真菌等の感染因子、紫外線や摩擦等の物理的因子が容易に体内に侵入しやすくなり、外来異物に対する免疫応答、つまり防御機能としての炎症反応が惹起され、種々障害の原因になると考えられている。皮膚バリア障害は、それ自身は重篤な疾患ではないが、体内の水分漏出による循環器障害等により致命的な病態に陥る可能性がある。特に、高齢者の健康維持には水分補給が必須であり、その原因として加齢による皮膚バリア機能の低下があげられる。また、アトピー性皮膚炎は著しい掻痒を伴う慢性皮膚炎皮膚疾患であり、様々な環境因子に対する皮膚の過敏反応性が関与すると云われている。アトピー性皮膚炎では掻破行動による物理的刺激が繰り返されることにより、皮膚バリア破壊が起こり、更なる抗原侵入を招く結果、皮膚炎と掻痒の増大という悪循環 (itch-scratch cycle) に陥ると考えられている。従来、このような皮膚バリア障害に対しワセリン等の被覆剤で覆い、水分漏出を抑える対症療法が取られてきたが、皮膚バリア障害の治療を目指した研究はされてこなかった。また、皮膚バリア破壊の動物モデルは、有機溶媒処理による皮脂除去 (脱脂) やテープストリッピングによる角質除去等の方法が確立されているが、これらの方法では処置後の皮膚バリア修復が早く、試験薬剤の適切な評価が困難であった。

これらの背景のもと、本研究では皮膚バリア障害治療薬の創出を目的として、初めに皮膚バリア障害を定量評価できるモデルを確立し、その皮膚バリア破壊の治癒の解明に取り組んだ。

1. 実験的皮膚バリア破壊モデルマウスの作製

アトピー性皮膚炎モデルマウスの爪による搔破を、ワイヤーブラシによる機械的搔破に置き換え、機械的搔破により惹起されるマウス皮膚バリア破壊を、従来の皮膚バリア破壊モデルと比較し、その特長と評価系としての可能性を検討した。機械的搔破による皮膚バリア破壊は、搔破回数依存的に経表皮水分蒸散量（TEWL）を上昇させた。この結果は、搔破の強度に依存して皮膚バリア破壊が進展することを示すものである。皮膚バリア破壊状態を比較すると、機械的搔破による TEWL の上昇は脱脂処置によるものと比較して高く、明確なバリア破壊を設定でき、さらに皮膚バリア破壊後の修復期間においても、機械的搔破は脱脂処置より長い期間を有した。また、同程度の皮膚バリア破壊を施したテープストリッピング処置と比較しても、機械的搔破は皮膚バリア破壊後の修復に至るまで長い期間を有した。病理学的観察において、機械的搔破モデルは、表皮の損傷、剥落、細胞浸潤、痂皮の形成及び好酸性物質の付着といった組織学的変化が認められ、この炎症症状はアトピー性皮膚炎モデル動物の NC/Nga マウスの病理像と類似するものであった。皮膚バリア破壊時の基本的な治療薬である被覆剤のワセリン及び保湿剤の glycerol 水溶液を用い、モデル間での作用を比較したところ、脱脂処置モデルと比較し機械的搔破モデルはより長い時間、薬剤の効果を評価できた。従って、機械的搔破モデルは、即効性の薬剤や効力の弱い薬剤の評価も行えるモデルであると考えられた。

以上の成績より、機械的搔破は短時間で簡便に皮膚バリア破壊を作製でき、また従来の皮膚バリア破壊モデルより長期間バリア破壊状態が持続するため、皮膚バリア修復薬の評価系としてより有用なモデルであると考えられる。

2. 皮膚バリア破壊の修復に関する研究

2-1 皮膚バリア修復における prostaglandin の関与

機械的搔破皮膚バリア破壊モデルを用いて、皮膚バリア破壊とその修復における皮膚

prostaglandin (PG) の役割を検討した。皮膚への機械的搔破により、搔破回数に比例して皮膚 PG (PGD₂, PGE₂, PGI₂ 及び PGF_{2α}) 産生を誘導し、特に PGD₂ 及び PGE₂ 産生が顕著であった。この結果から、皮膚バリア破壊の程度に比例して皮膚 PG 量は誘導されることが示唆された。機械的搔破皮膚バリア破壊に対し、非ステロイド性抗炎症薬 indomethacin 塗布は、皮膚バリア修復を遅延させた。従って、皮膚バリア破壊時に産生する皮膚 PG は、皮膚バリア修復の促進に関与していることが示唆された。そこで、indomethacin 処置による皮膚バリア修復遅延に対する各 PG 塗布による作用を検討した結果、PGD₂ 及び PGE₂ が皮膚バリア修復遅延を改善したが、PGF_{2α}, PGI₂ 及び U46619 (TP 受容体作動薬) は作用を示さなかった。PGD₂ の代謝物の中で、PGJ₂ は皮膚バリア修復作用を示し、13,14-dihydro-15-keto-PGD₂ 及び 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ は効果を示さなかった。これらの効果は DP₁ 受容体への親和性に比例し、DP₂ 受容体及び PPAR γ への親和性とは関連しなかった。また、sulprostone (EP₃ 受容体作動薬) 及び ONO-4819 (EP₄ 受容体作動薬) は皮膚バリア修復作用を示し、17-phenyl-trinor-PGE₂ (EP1 受容体作動薬) 及び butaprost (EP₂ 受容体作動薬) は効果を示さなかった。以上のことから、PGD₂ は DP₁ 受容体を介し、PGE₂ は EP₃ 及び EP₄ 受容体を介して皮膚バリア修復作用を示すことが明らかとなった。

2-2 皮膚バリア修復におけるサイトカインの関与

炎症性サイトカイン IL-1 α 及び TNF α は、マウス皮膚バリア修復を促進することが報告されている。そこで、機械的搔破皮膚バリア破壊モデルにおいて、皮膚バリア破壊とその修復におけるサイトカインの役割を検討した。ステロイド系抗炎症薬 dexamethasone 塗布は、皮膚バリア修復を遅延させ、さらに dexamethasone と indomethacin の併用塗布は、皮膚バリア破壊を悪化させた。この indomethacin 及び

dexamethasone 併用処置による皮膚バリア破壊悪化に対し、PGD₂、PGE₂、IL-1 α 、IL-1 β 及び TNF α 塗布の効果は、PGD₂ 及び IL-1 β 塗布により改善し、PGE₂ 塗布は改善傾向を示したが、IL-1 α 及び TNF α 塗布は効果を示さなかった。免疫組織化学的解析において、正常皮膚の表皮では IL-1 β 及び IL-1 受容体の発現が観察されたが、indomethacin 及び dexamethasone 併用処置の皮膚では、表皮が欠落しており発現も顕著に減少していた。以上のことから、炎症性サイトカイン IL-1 β も皮膚バリア修復作用を示すことが明らかとなった。

2-3 皮膚バリア修復における COX の関与

PG は、cyclooxygenase (COX) によって産生されるが、COX は異なる遺伝子に由来する COX-1 及び COX-2 の 2 種アイソフォームが存在する。そこで、皮膚バリア修復と皮膚の内因性 PG 産生における COX-1 及び COX-2 の関与を検討した。選択的 COX-1 阻害薬 SC-560 は皮膚バリア修復を遅延させたが、選択的 COX-2 阻害薬 NS-398 では影響がなかった。SC-560 は、機械的搔破による皮膚 PG 産生を有意に抑制し、さらに PGD₂ 量については正常皮膚より低値を示したが、NS-398 では皮膚 PG 産生において殆ど変化がなかった。一方、機械的搔破により惹起される浮腫及び血漿漏出は、NS-398 により抑制されたが、SC-560 では効果を示さなかった。この炎症反応は、誘導された COX-2 により産生された PGE₂ 及び PGI₂ によるものと考えられた。以上のことから、COX-1 より産生される PGD₂ が皮膚バリア修復に関与し、COX-2 により産生される PG (PGE₂ 及び PGI₂) が皮膚炎症に関与していることが明らかとなった。

2-4 皮膚への siRNA 導入による COX-1 ノックダウン法の確立

エレクトロポレーション法を用いて、in vivo における皮膚への siRNA 導入による

COX-1 ノックダウン法の確立を行い，同モデルの特徴を薬理的に解析した。COX-1 siRNA 導入により，皮膚中 COX-1 タンパク発現は正常皮膚と比較して有意に抑制され，免疫組織化学的解析により siRNA 導入の標的部位は表皮の構成細胞であった。以上の結果から，皮膚への COX-1 siRNA 導入により表皮内の COX-1 がノックダウンされたことが示唆された。同モデルの皮膚 PG 産生量を測定した結果，皮膚 PGD₂ 量のみ有意に減少していた。この結果から，皮膚への刺激により表皮 COX-1 活性を介して産生される PG は，PGD₂ が主体であることが強く示唆され，PGD₂ は COX-1 を介して産生され，PGE₂，PGI₂ 及び PGF_{2α} は COX-1 及び COX-2 何れをも介して産生されることが明らかとなった。

3. 総括

マウス皮膚に機械的搔破することにより，皮膚バリア修復のメカニズム解明及び皮膚バリア修復薬の開発に有効なモデルマウスの作製に成功した。また，機械的搔破による皮膚バリア破壊の修復において，PGD₂，PGE₂ 及び IL-1β が皮膚バリア修復作用を示すことが明らかとし，特に表皮 COX-1 より産生される PGD₂ が DP₁ 受容体を介し皮膚バリア修復に強く関与していることを示した。正常皮膚では搔破により産生された PGD₂ は，抑制性の搔痒調節因子として皮膚の搔痒を抑え，さらに搔破により障害を受けた皮膚バリアの修復に寄与するフィードバック機構の存在を示唆した。一方，アトピー性皮膚炎皮膚では，表皮 COX-1 及び hPGDS 発現の低下により皮膚 PGD₂ 産生が誘導されないため，PGD₂ による搔痒抑制と皮膚バリア修復が作用せず，更なる搔破を引き起こす結果，皮膚炎症反応が増悪する itch-scratch cycle が発現する可能性が考えられた。従って，この PGD₂ による生体の恒常性維持機構が破綻していると考えられるアトピー性皮膚炎の治療には，PGD₂ もしくは DP₁ 受容体作動薬を外因的に補充することが最も有効な治

療法となる可能性を提示する。

学位論文審査の要旨

皮膚バリアは、体内からの過剰な水分蒸散を阻止し、外界からの異物侵入を防止する。痒みの強い慢性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎では、皮膚炎の慢性化と痒みの増大の主要な要因が搔破行動による皮膚バリアの破壊である。皮膚バリア障害を伴う皮膚疾患では、皮膚バリア障害の治療・管理が重要であるが、これまで皮膚バリア障害の治療を目指した研究はほとんど行われてこなかった。本研究は、搔破による皮膚バリア障害の修復の解析と治療法の評価に適した動物モデルを作製し、そのモデルを用いて皮膚バリア障害の修復におけるプロスタグランジン (PG) 類の役割を中心に解析し、PGD₂ と DP₁ プロスタノイド受容体が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の内容の骨子および審査結果は次のとおりである。

皮膚バリア破壊のマウスモデルの作製

マウスの皮膚にワイヤーブラシによる機械的搔破を加えると、搔破回数に依存して、経表皮水分蒸散量が増加し皮膚バリアの破壊が進行した。角質層を除去するテープストリッピング法と比較して、機械的搔破の方が破壊された皮膚バリアの修復が緩やかであった。機械的搔破の 24 時間後に表皮角質の損傷、角化亢進、剥落と痂皮、真皮および皮下組織には好中球を主体とした細胞浸潤を認めた。機械的搔破法による皮膚バリア破壊の 2 時間後に、保湿剤の glycerol 水溶液を塗布すると一過性の軽度の経表皮水分蒸散量減少を生じ、被覆剤のワセリンを塗布すると経表皮水分蒸散量減少が 8 時間持続した。以降の実験では、機械的搔破による皮膚バリア破壊のマウスモデルを用いて、皮膚バリアの破壊後の修復過程について解析した。

皮膚バリア修復への PG 類の関与

皮膚の機械的搔破により、搔破した皮膚で PGD₂、PGE₂、PGI₂ 及び PGF_{2α} の産生が増加し、特に、PGD₂ と PGE₂ の産生増加が顕著であった。非ステロイド性抗炎症薬 indomethacin 塗布が破壊された皮膚バリアの修復を遅延させ、PGD₂ と PGE₂ の塗布が修復の遅延を回復させたが、PGF_{2α}、PGI₂ と U46619 (TP 受容体作動薬) は無効であった。PGD₂ の代謝物では、PGJ₂ は (DP₁ と DP₂ 受容体作動薬) が修復遅延を回復させ、13, 14-dihydro-15-keto-PGD₂ (DP₂ 受容体作動薬) と 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (DP₂ 受容体と PPAR γ 作動薬) は無効であった。また、sulprostone (EP₃ 受容体作動薬) と ONO-4819 (EP₄ 受容体作動薬) は修復遅延を回復させ、17-phenyl-trinor-PGE₂ (EP₁ 受容体作動薬) と butaprost (EP₂ 受容体作動薬) は無効であった。以上の結果から、PGD₂ は DP₁ 受容体を介し、PGE₂ は EP₃ 及び EP₄ 受容体を介して皮膚バリア修復作用を発揮すると推論した。

皮膚バリア修復へのサイトカインの関与

ステロイド系抗炎症薬 dexamethasone の単独塗布は破壊された皮膚バリアの修復を遅延させ、dexamethasone と indomethacin の併用塗布は皮膚バリアの破壊を更に悪化させた。Dexamethasone と indomethacin の併用塗布による皮膚バリア破壊の悪化に対して、PGD₂ と IL-1 β の塗布が抑制し、PGE₂ 塗布は抑制傾向を示し、IL-1 α と TNF- α の塗布は無効であった。正常皮膚の表皮では IL-1 β と IL-1 受容体の発現が観察されたが、機械的搔破に indomethacin と dexamethasone 処置を加えた皮膚では、表皮がほぼ欠落しており IL-1 β と IL-1 受容体の発現が顕著に減少していた。炎症性サイトカイン IL-1 α と TNF- α の皮膚バリア修復促進作用が報告されているが、本条件下の皮膚では、PGD₂ に加え IL-1 β も皮膚バリア修復作用を示すことを明らかにした。

皮膚バリア修復とシクロオキシゲナーゼ

PG 類の産生に関与する cyclooxygenase (COX) には COX-1 と COX-2 の 2 つのアイソフォームが存在する。選択的 COX-1 阻害薬 SC-560 の塗布は機械的搔破により破壊された皮膚バリア修復を遅延させた。機械的搔破の 24 時間後の皮膚内 PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α} レベルが増加し, SC-560 の塗布はこれらの増加を抑制した。SC-560 の塗布は真皮内の反応である血漿血管外漏出は抑止しなかった。一方, 選択的 COX-2 阻害薬 NS-398 は, 皮膚バリア修復と皮膚内 PG レベルには影響せず, 血漿血管外漏出を抑制した。以上の結果から, COX-1 より産生される PGD₂ が皮膚バリア修復に関与し, COX-2 により産生される PG (PGE₂ 及び PGI₂) が皮膚炎症に関与すると推論した。

エレクトロポレーション法により COX-1 siRNA を *in vivo* で皮膚に導入すると, siRNA は主に表皮構成細胞に導入され, 皮膚中 COX-1 タンパク発現が有意に抑制された。また, PG 類の中で PGD₂ のみが皮膚中レベルが有意に低下した。以上の結果から, 皮膚への刺激により表皮内の COX-1 活性化を介して産生される PG は PGD₂ が主体であると推論した。

本研究は, 機械的搔破により破壊された皮膚バリアの修復に, 表皮 COX-1 より産生が増加する PGD₂ の DP₁ 受容体への作用が関与することを明らかにした。本研究の成果は皮膚バリア修復促進薬の開発に資することが期待される。

主査および副査は, 本間佑介君に面接試験を行うと共に論文内容について審査を行い, 博士 (薬学) を授けるに値すると判定した。