

# 博士論文

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

本間 佑介

# 目次

緒言	1
研究背景	2
1. 皮膚バリア機能	
1-1 表皮と角質層の構成	
1-2 表皮角化細胞接着と表皮バリア機能	
1-3 皮膚バリア破壊の実験モデル	
1-4 皮膚バリア機能に関与する因子	
2. 皮膚バリア障害を生じる疾患	
3. Prostaglandin	
<b>第 I 部 実験的皮膚バリア破壊モデルマウスの作製</b>	<b>8</b>
第 1 章 機械的搔破による皮膚バリア破壊	9
1. 実験方法	
2. 実験結果	
3. 考察	
小括	17
<b>第 II 部 皮膚バリア破壊の修復に関する研究</b>	<b>18</b>
第 1 章 皮膚バリア修復における prostglandin の関与	19
1. 実験方法	
2. 実験結果	
3. 考察	
第 2 章 皮膚バリア修復におけるサイトカインの関与	31
1. 実験方法	
2. 実験結果	
3. 考察	
第 3 章 皮膚バリア修復における COX の関与	38
1. 実験方法	
2. 実験結果	
3. 考察	

第4章 皮膚への siRNA 導入による COX-1 ノックダウン法の確立	50
1. 実験方法	
2. 実験結果	
3. 考察	
小括	58
総括	59
謝辞	64
参考文献	65
論文要旨	80
論文目録	83

## 緒言

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<sup>1)</sup>。この皮膚バリア機能の定量的指標として、皮膚表面からの水分蒸散量、即ち経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss ; TEWL) が一般的に使用されている<sup>2-4)</sup>。

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<sup>5)</sup>。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。機能面ではドライスキンにみられる TEWL の増加<sup>6,7)</sup>とそれに伴う角質水分量減少<sup>8-10)</sup>等の皮膚バリア機能の低下が認められる。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<sup>11)</sup>。従来、この様な皮膚バリア障害に対しワセリン等の保湿剤で覆い、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。

これらの背景のもと、本研究では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修復の解明を検討した。

## 研究背景

### 1. 皮膚バリア機能

#### 1-1 表皮と角質層の構成

生体の最外層に位置する表皮は、外層から角質層、顆粒層、有棘層、基底層からなる厚さ 0.1~0.2 mm の重層扁平上皮である。表皮角化細胞（ケラチノサイト）は、基底層で分裂し、上方（体外側）へ角化しながら移動し、有棘細胞、顆粒細胞と変化しながら最終的に角質細胞（角質層）へと角化する<sup>12)</sup> (Fig. 1)。角質層は、機能の低下した古い細胞は垢となり剥がれ落ちる一方、新しい角質細胞が絶えず補給されるという動的な平衡で維持している。ヒトの場合、正常で1日ほぼ1層が剥離するとすれば、その全層が剥離するのに要する時間、つまりターンオーバー時間は、四肢や躯幹など体表面の大半では約14層であり大体2週間、10層以下の顔面では1週間位である<sup>13,14)</sup>。角質層は、数層以上に堆積した角質細胞と角質細胞脂質ラメラ構造からなる。角質細胞は死細胞で核、ミトコンドリアなどオルガネラは有さず、keratin 1, keratin 10 といったケラチン繊維とそれを埋める filaggrin を主成分とするセメント物質とからなる。細胞膜に相当する部分は、電子密度の高い厚さ 15 nm の不溶性タンパク質膜（コーニファイド・セルエンベロープ）とこれに結合した脂質膜からなる<sup>15)</sup>。また、角質細胞間には脂質多層構造が詰まっている。

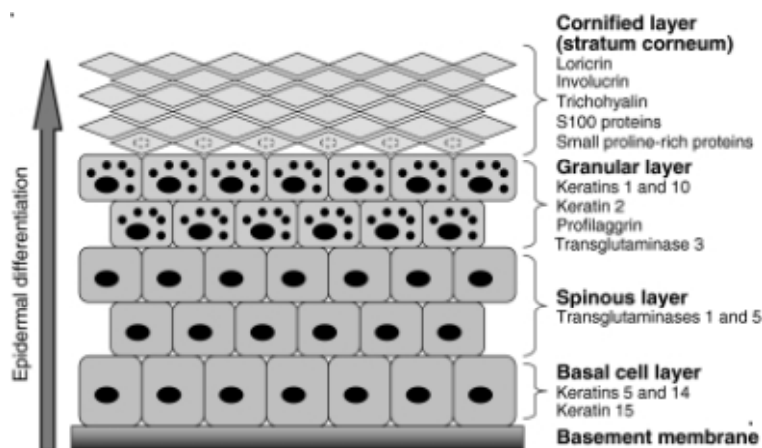


Fig. 1 Epidermal differentiation. (Ref. Sandilands et al, 2009)

#### 角質細胞

角質細胞の中には天然保湿因子と称される保水能を有する様々な水溶性低分子物質がある。天然保湿因子は、表皮顆粒層中の細胞にあるケラトヒアリン顆粒に含まれる filaggrin, profilaggrin, histidin-rich protein を主体とするタンパク質の分解産物であり<sup>16,17)</sup>、アミノ酸、ウロカイン酸、ピロリドンカルボン酸、尿素等の水溶性成分で構成され<sup>12)</sup>、これらの分子が水分を保持している。

角質細胞膜(コーニファイド・セルエンベローブ)は, transglutaminase によって involucrin, loricrin, elafin, small proline-rich proteins などが  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) lysine 結合により不溶化したタンパク質膜とそのタンパク成分に細胞外側からエステル結合した一層の ceramide とからなる<sup>15,19)</sup>。コーニファイド・セルエンベローブの外側に近いところは, 主として involucrin が占めており, これに ceramide の疎水性部分の先端 ( $\omega$ -hydro) がエステル結合している<sup>20)</sup>。Loricrin は角化過程の最終的段階で発現される分子量 26 kDa の serine, cysteine に富む不溶性タンパクで, glycine-loop という特異な分子構造を持ち, コーニファイド・セルエンベローブの主成分の一つである<sup>19)</sup>。角質細胞間の結合は corneo desmosome により, またその細胞間接着分子は desmoglein 1 と desmocoline 1 が主成分である<sup>21)</sup>。

### 角質細胞間脂質層と表皮脂質

角質層間脂質層の主成分は, オドランド小体由来の ceramide (約 46%), cholesterol (約 26%), 遊離脂肪酸 (約 13%), cholesterol sulfate (約 4%) である。これらの脂質は疎水性領域を挟んで親水性側を外側にした二重層構造を形成する。これを基本にした脂質二重層が多層に重なってラメラ構造となり, 角質細胞間を充填している<sup>22)</sup>。層構造の安定化には cholesterol sulfate が  $\text{Ca}^{2+}$  を介して細胞間脂質多重層構造の安定化に寄与している<sup>23)</sup>。

角質層の表面には皮脂腺より分泌される皮脂が覆っており, この皮脂は triglyceride (41%), diglyceride (2.2%), 遊離脂肪酸 (16.4%), wax ester (25%), squalene (12%), cholesterol ester (2.2%), cholesterol (1.4%) 等の成分によって構成されている<sup>24)</sup>。これらの成分は, 皮膚表面に疎水性の被膜を構成し<sup>25)</sup>, 過剰な水分蒸散の防止, 水溶性異物侵入に対する防御を担っている。

### 1-2 表皮角化細胞接着と表皮バリア機能

完全なバリア機能を保持するため, ケラチノサイトと角質細胞は強靱な細胞シート構造を保ち, 角質細胞層を柔軟に強く構築している。ケラチノサイトは, 細胞内にはケラチン中間径線維と desmosome, アドヘレンスジャンクション, タイトジャンクション, ギャップジャンクションなどの細胞接着構造を発達させている。Desmosome は, 細胞間で隣り合った細胞内のケラチン細胞骨格の先端を desmosome cadherin を介して細胞間で結合し, 動的で一定の厚さと強さを持つ表皮シートを形成している<sup>26)</sup>。アドヘレンスジャンクションは, 細胞間接着分子として epithelial cadherin (E-cadherin) を有し, これを介して隣り合ったアクチン線維細胞骨格が結合している。また, desmosome やタイトジャンクションの形成や接着を制御している<sup>27,28)</sup>。タイトジャンクションは, 表皮細胞間隙の液体や物質の流通を制御し, 消化液など分泌された液体が管腔内から漏れて間質に流出しないように細胞間隙間バリアを形成している。ギャップジャンクションは, 隣り合った細胞の細胞膜が接着し, その部分に多数のチャネルが凝集した斑状構造で, イオン等分子量 1 kDa までの分子を自由に通過させ直接的な細胞間情報伝達に関与している<sup>29)</sup>。

### 1-3 皮膚バリア破壊の実験モデル

皮膚バリア機能を担う因子は、皮膚表面を覆う皮脂であると解釈されており、実験的なバリア破壊は acetone 等の有機溶媒や界面活性剤による脱脂処置<sup>30, 31)</sup>や、生理的な脂質を欠乏させた必須脂肪酸欠乏食摂取動物モデル<sup>32, 33)</sup>も確立されている。また、最も簡便なバリア機能を検討するためのモデル実験系は、テープストリッピングによる角質層の物理的な剥離である<sup>34, 35)</sup>。角質細胞間脂質のラメラ構造の形態が明らかにされると<sup>36-39)</sup>、有機溶媒や界面活性剤を長時間処理し角質細胞間の脱脂を行う方法<sup>40-42)</sup>や、cholesterol 生合成を阻害する lovastatin 処理による角質中 cholesterol 欠乏モデル<sup>43)</sup>なども確立されている。これらの方法は、機能不全の状態にある角質層が残留し、鱗屑や落屑の症状を呈すことから、物理的な剥離に比べ乾皮症の病変に類似している。近年、有機溶媒による脱脂処理及び水負荷処理を繰り返すことにより、掻痒関連行動を伴う皮膚乾燥性のモデルも確立されている<sup>44)</sup>。皮膚の乾燥や肌荒れは加齢や外的環境要因も影響を与えており、この実験モデルとして 18 ヶ月齢以上のマウスを使用する方法<sup>45, 46)</sup>や、低湿度環境飼育による方法<sup>47)</sup>、拘束ストレスを与える方法<sup>48)</sup>などがある。また、NC/Nga マウスはアトピー性皮膚炎の動物モデルとしてよく知られており、皮膚炎、掻破行動、血中 IgE 濃度の上昇及び皮膚の病理組織学的形態など、多くの点でアトピー性皮膚炎患者との類似性が報告されている<sup>49)</sup>。

### 1-4 皮膚バリア機能に関与する因子

角質間脂質層の主成分である ceramide や脂質を含めた角化関連分子は、皮膚バリア機能に対し重要な役割を果たしており、古くから研究は進められてきた<sup>36, 50, 51)</sup>。皮膚バリアが障害をうけると、損傷部位には好中球、マクロファージや肥満細胞などの炎症性細胞が浸潤し、bradykinin, histamine, serotonin, cytokine, prostaglandin や leukotriene などの炎症性メディエーターが放出され、生体防御機構としての炎症反応を誘導する。テープストリッピングや有機溶媒による急性的なバリア破壊処理を施すと、ヒト表皮において TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10, IFN $\gamma$ , intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 及び transforming growth factor (TGF)- $\beta$  の mRNA 発現やケラチノサイト増殖に関与する keratin-16 の増加が報告されている<sup>52)</sup>。また、マウスケラチノサイトにおいても DNA 合成促進<sup>53, 54)</sup>、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 等の炎症性サイトカイン mRNA 発現を誘導する<sup>55-57)</sup>。TNF $\alpha$  は、p55 受容体を介し ceramide 産生量を増加させ、皮膚バリア修復に関与していることが報告されている<sup>58)</sup>。また、IL-1 $\alpha$  は、ケラチノサイトの増殖に関与する報告<sup>59)</sup>や加齢マウスを用いたテープストリッピングによる皮膚バリア破壊に対し修復促進作用を示す報告がある<sup>60)</sup>。成長因子に関して、表皮ケラチノサイトは、急性バリア破壊処理により nerve growth factor (NGF) mRNA 発現が増加<sup>61)</sup>、急性の創傷治癒過程において TGF- $\beta$  を産生<sup>62)</sup>、表皮の増殖性炎症時には platelet-derived growth factor (PDGF) を産生する<sup>63)</sup>。また、マウス急性バリア破壊の修復に対し、histamine は修復を遅延すること<sup>64)</sup>、 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) は促進すること<sup>65)</sup>、cAMP

や ATP は遅延すること<sup>66,67)</sup>など、様々な因子について報告があるが、これらの因子の皮膚バリア機能制御に関する検証は十分に得られていない。

## 2. 皮膚バリア障害を生じる疾患

### 老人性乾皮症

乾皮症 (Xerosis) は、先天性の角化異常症や炎症症状のない皮膚が乾燥によって鱗屑や亀裂を生じる。加齢に伴い皮膚バリア機能が低下し乾燥を呈するのが、老人性乾皮症である。老人性乾皮症では、皮脂腺由来の脂質 (皮脂) の減少<sup>68)</sup>、ceramide 等の角質細胞間脂質の減少<sup>45)</sup>や、ケラトヒアリン顆粒が非常に小さく<sup>69)</sup>、構成成分 filaggrin の減少に伴う天然保湿因子の減少<sup>70,71)</sup>などが報告されており、角質層の水分保持能の低下や皮膚バリア機能に対する修復能の低下により皮膚の乾燥が起こるとされている。高齢者の皮膚は、若年者の皮膚に比べ角質層の肥厚、表皮の萎縮や顆粒層の消失が見られる。TEWL は若年者に比べて同等もしくは減少している<sup>45,72)</sup>。従って、表皮に亀裂が生じない限りバリア機能は保持されるが、角質層は乾燥しているため乾燥環境や物理的刺激により亀裂を生じ、バリア機能を損ないやすい。また、老人性乾皮症の半数の人が痒みを訴えており、皮膚の搔破により亀裂部位を中心として、皮膚炎を生じてくる。

### 季節性乾皮症 (冬季乾皮症)

季節性乾皮症は、冬季の乾燥環境を原因とする健常人にも認められる症状である。また、この季節的変動は老人性乾皮症やアトピー性皮膚炎などの病勢を悪化させる。冬季乾皮症の皮膚では ceramide 等の角質細胞間脂質の含有量に変動は認めないが、皮脂成分である triglyceride や cholesterol ester は減少するなどの組成の変化が報告されている<sup>73)</sup>。角質層ではケラチノサイトの細胞間接着因子 corneo desmosome が増加しており<sup>74)</sup>、正常な角質の自然剥離を妨げている。

### 乾癬

乾癬は、表皮の異常な増殖及び角化を主徴とする原因不明の炎症性皮膚疾患である。病変部皮膚は、赤い発疹と白色の鱗屑を伴う発疹が出現し、周りの皮膚より少し盛り上がった状態となり乾燥傾向にあり<sup>75,76)</sup>、時には痒みも伴う<sup>77)</sup>。表皮ケラチノサイトにおいて IL-1 産生減少<sup>78)</sup>、IL-6 産生増加<sup>79)</sup>、NGF 産生亢進<sup>80)</sup>などが報告されている。

### アトピー性皮膚炎

アトピー性皮膚炎は、著しい搔痒を伴い慢性的に増悪と寛解を繰り返す皮膚の炎症であり、皮膚バリア障害と免疫反応が関与する疾患である。搔痒が搔破行動をもたらして皮膚を損傷することにより、さらに搔痒が増加し強い搔破が発現する結果、炎症反応が増悪す



る itch-scratch cycle と呼ばれる現象が存在し、疾患の難治化を進行させる<sup>11)</sup>。アトピー性皮膚炎の病変部での TEWL の上昇は勿論であるが、非病変部の皮膚においても角質水分量の低下<sup>9, 10)</sup>、TEWL の上昇<sup>6, 7)</sup>が認められ、アトピー性乾皮症と云われる乾燥状態にあり、肉眼的には認め得ない軽い炎症の持続もある<sup>23)</sup>。表皮の増殖と分化の過程に軽度の亢進が認められ、機能的に不完全な厚い角質層の構築と、ターンオーバー時間の短縮が起こっている<sup>6, 82)</sup>。また、アトピー性皮膚炎では角質細胞間脂質の ceramide 含有量の低下が認められる<sup>8, 83)</sup>。その原因としては、sphingomyelin を ceramide 以外に代謝する sphingomyelin acylase あるいは sphingomyelin deacylase の異常発現<sup>84, 85)</sup>、glucosylceramide から ceramide 以外に代謝する glucosylceramide sphingomyelin deacylase の誘導<sup>86)</sup>、皮膚の微生物による ceramide の分解亢進<sup>87)</sup>などが挙げられている。また、アトピー性皮膚炎では filaggrin の低下や変異が認められており<sup>88, 89)</sup>、角質細胞間脂質ラメラ構造の障害が考えられている。

### 3. Prostaglandin

Prostaglandin (PG) は、phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) によって膜リン脂質より遊離されたアラキドン酸を基質として、cyclooxygenase (COX) と各PG合成酵素の代謝を受けて産生された生理活性脂質である。PGは、基本構造の違いからPGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>及びPGF<sub>2α</sub>の4種類に分類され(4種のPGとthromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) を総称してprostanoidと呼ぶ)、生体内で広範な作用を示すことが報告されている<sup>90-93)</sup>。これら脂質メディエーターが他の細胞間メディエーターと異なるのは、産生されると蓄積されずに速やかに細胞外に放出され、その近傍の細胞にのみ作用して生理活性を発揮することである。PGの多彩な生理作用は、細胞膜状の特異的受容体により介在され、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>及びTXA<sub>2</sub>は、それぞれDP、EP、IP、FP及びTP受容体を介し作用を発揮する<sup>94, 95)</sup> (Fig. 2)。DP受容体には、DP<sub>1</sub>及びDP<sub>2</sub> (別名CRTH2と称される<sup>96)</sup>) 受容体、EP受容体には、EP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>の受容体サブタイプが存在する<sup>97-99)</sup>。これらは全て7回膜貫通型Gタンパク結合型受容体であり、DP<sub>2</sub> (CRTH2) を除く8種類の受容体は、1次構造上のホモロジーが高く共通の遺伝子から進化してきたと考えられる。一方、DP<sub>2</sub> (CRTH2) は、むしろケモカイン受容体に近く、元々は全く異なる物質をリガンドとしていた受容体が進化の過程でPGD<sub>2</sub>をリガンドとするようになったと考えられる<sup>95)</sup>。DP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>4</sub>及びIPはGsと共役しadenylate cyclaseの活性化を、FP及びTPはGqに共役しCa<sup>2+</sup>動員系を、EP<sub>1</sub>も同様に、種類は不明であるがGタンパク質と共役しCa<sup>2+</sup>動員系を、EP<sub>3</sub>及びDP<sub>2</sub>はGiに共役しadenylate cyclaseの抑制及びCa<sup>2+</sup>動員系を主に伝達する。

一般的に、炎症反応ではCOX-2によって産生されたPGが炎症増悪に関与すると考えられている。特にPGE<sub>2</sub>及びPGI<sub>2</sub>は、炎症組織及び浸出液中に多量に存在し、*in vivo*で炎症反応亢進作用を示す<sup>100-104)</sup>。また、PGE<sub>2</sub>及びPGF<sub>2α</sub>は、ケラチノサイト分化や毛周期に関与する<sup>105-107)</sup>。PGD<sub>2</sub>は、血管拡張、血小板凝集抑制<sup>108)</sup>、気管支平滑筋収縮<sup>109)</sup>、睡眠誘発<sup>110)</sup>等の生理活性を

示す。皮膚においては、DP<sub>1</sub>を介し真皮の樹状細胞の遊走を抑制する<sup>111)</sup>が、一方で、DP<sub>2</sub> (CRTH2)を介し血管透過性の亢進及び好中球の浸潤が誘導される<sup>112)</sup>。また、新井らは、PGD<sub>2</sub>がアトピー性皮膚炎の動物モデルNC/Ngaマウスの搔破行動を強力に抑制することを報告している<sup>113)</sup>。しかしながら、PGが皮膚で産生される意義は十分には解明されていない。また、アトピー性皮膚炎や皮膚バリア機能に対する皮膚PGの研究は殆どなされておらず、その関連性については不明な点が多い。

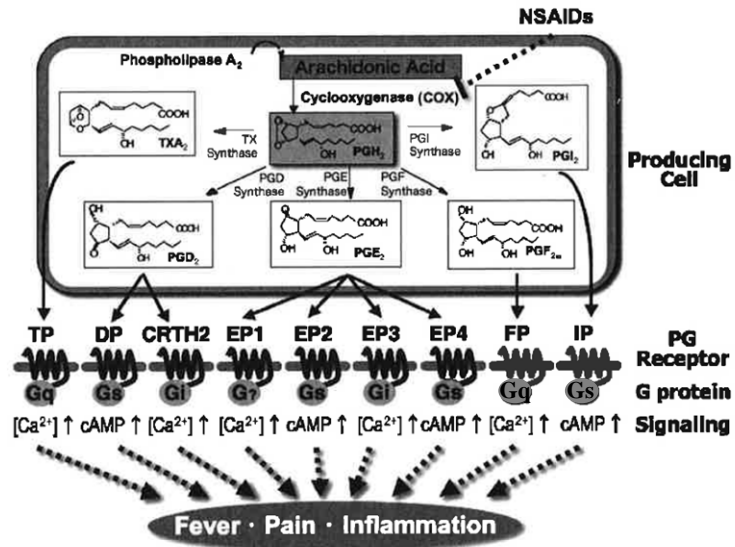


Fig. 2 PG synthesis and cognate receptor signaling. (Ref. Morimoto et al, 2012)

## 第 I 部

### 実験的皮膚バリア破壊モデルマウスの作製

## 第1章 機械的搔破による皮膚バリア破壊

皮膚、特に表皮は、体内の生命環境（即ち水環境）と体外の非生命環境（即ち空気環境）との間の境界バリア構造である。バリア機能に関して最も重要な役割を果たしているのが表皮の最外層に位置する角質層であり、表皮ケラチノサイトの最終分化細胞である角質細胞は、強靱な脂質多重層構造を構築する。皮膚バリアが障害されると、細菌、真菌及びウイルス等の感染因子、紫外線及び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<sup>1)</sup>。この皮膚バリア機能の定量的指標として、皮膚表面からの水分蒸散量、即ち経表皮水分蒸散量（TEWL）が一般的に使用されている<sup>2-4)</sup>。アトピー性皮膚炎は、著しい搔痒を伴い慢性的に増悪と寛解を繰り返す皮膚の炎症であり、皮膚バリア障害と免疫反応が関与する疾患である。機能面ではドライスキンにみられる表皮角質からの水分蒸散の増加（TEWLの増加）<sup>6, 7)</sup>とそれに伴う角質水分量減少<sup>8-10)</sup>等の皮膚バリア機能の低下が認められる。搔痒が搔破行動をもたらして皮膚を損傷することにより、さらに搔痒が増加し強い搔破が発現する結果、炎症反応が増悪する **itch-scratch cycle** と呼ばれる現象が存在し、疾患の難治化を進行させる<sup>11)</sup>。

皮膚バリア機能を担う因子は、皮膚表面を覆う皮脂であると解釈されており、実験的なバリア破壊は、**acetone**等の有機溶媒や界面活性剤による脱脂処置<sup>30, 31)</sup>や必須脂肪酸欠乏食摂取動物モデル<sup>32, 33)</sup>も確立されている。また、もっとも簡便なバリア機能を検討するためのモデル実験系は、テープストリッピングによる角質層の物理的な剥離である<sup>34, 35)</sup>。しかしながら、これらの方法では処置後の皮膚バリア修復が早いため、試験薬剤の皮膚バリア修復に対する適切な評価を行うことが困難であった。また、**NC/Nga**マウスはアトピー性皮膚炎の臨床症状をよく反映した動物モデルであるが<sup>49)</sup>、自発的搔破行動及び皮膚炎発症に個体差があること、モデル作製に長期間必要であることなどの問題点がある。

本章では、アトピー性皮膚炎患者における搔破行動による皮膚バリア破壊を、ワイヤーブラシによる機械的搔破に置き換えマウスの皮膚バリア破壊モデルを作製し、皮膚バリア修復薬評価系としての可能性を、従来の皮膚バリア破壊モデルと比較検討した。

### 1. 実験方法

#### 1-1 実験動物

実験には、日本エスエルシー株式会社より購入した8週齢の雄性 **BALB/c** 系マウスを使用した。飼育環境条件として室温：23 ± 3°C、湿度：50 ± 20%、照明時間：約12時間、換

気回数：10 回以上/時間に設定した飼育室内で飼育した。飼料（MF：オリエンタル酵母工業）及び飲料水（殺菌水）は自由に与えた。なお、本実験は大正製薬株式会社 医薬研究所の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

#### 1-2 皮膚バリア破壊処置

皮膚バリア破壊処置前日に、diethylether 麻酔下でマウス吻側背部皮膚（約 2 cm × 2 cm）を電気バリカンで除毛した。皮膚バリア破壊処置として、除毛部位皮膚に対し以下の処置を diethylether 麻酔下にて実施した。処置 1：ワイヤーブラシ（SCWS-005P, ワイヤー径； $\Phi$  0.175 mm, 長さ；15 mm, パオックコーポレーション）により皮膚を 40~50 回搔破し（強さ； $60 \pm 10$  g/cm<sup>2</sup>), TEWL を約 20 g/m<sup>2</sup>/h まで上昇させた（機械的搔破処置）。処置 2：Acetone と diethylether (1:1) の混液を浸した脱脂綿（約 1 cm × 1 cm）で 15 秒間被覆を 1 日 2 回（9:00 及び 17:00）3 日間及び 4 日目に 1 回（9:00），計 7 回実施した（脱脂処置）。処置 3：粘着テープ（ニチバン）により角質層を 6~8 回剥離するテープストリッピングを行い，TEWL を約 20 g/m<sup>2</sup>/h まで上昇させた（テープストリッピング処置）。

#### 1-3 経表皮水分蒸散量（TEWL）の測定

TEWL 測定装置（Tewameter TM210, Courage & Khazaka, Germany）を用いてマウス背部の TEWL を測定した。TEWL 測定装置のプローブを測定部位の皮膚上に垂直になるように約 30 秒間静置させ，数値が安定した後，測定値を記録した。

#### 1-4 薬物

Glycerol（和光純薬工業株式会社）は 10% 水溶液に調製した。10% glycerol 水溶液あるいは白色ワセリン（CROLATUM, クロードジャパン株式会社）は，皮膚バリア破壊処置後に 0.1 mL 塗布した。TEWL は塗布 1, 2, 4, 8, 12 及び 24 時間後に測定した。

#### 1-5 病理組織学的観察

各皮膚バリア破壊処置を行った 24 時間後の背部皮膚を剥離し，10% 中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業株式会社）にて固定後，パラフィンブロックを経て hematoxylin-eosin (HE) 染色後に光学顕微鏡を用いて観察した。

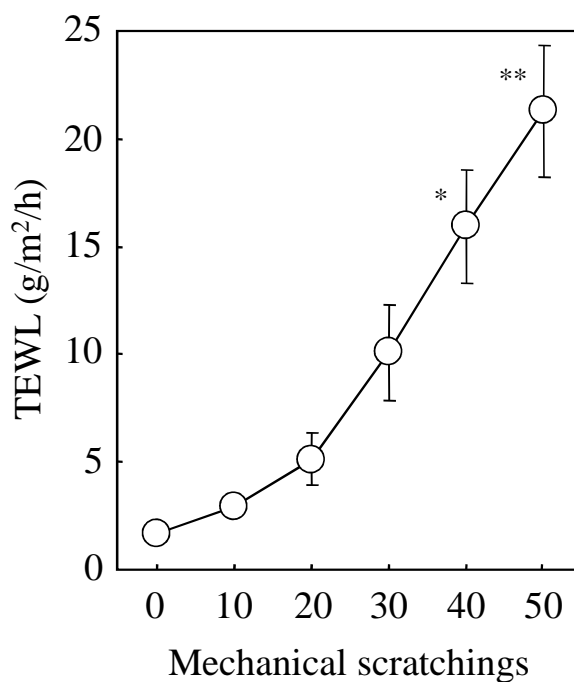
#### 1-6 統計処理

データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。有意差の検定は，多重比較は Bartlett 検定による等分散性の確認後，等分散の場合は Dunnett 検定を，不等分散の場合はさらに F 検定により 2 群間の等分散性を確認し，等分散の場合は Student の t 検定を，不等分散の場合は Welch の t 検定を行い，Bonferroni 法により多重性の調整を行った。2 群間比較は，同様に F 検定後，Student の t 検定または Welch の t 検定を行った。有意水準は 5% とした。

## 2. 実験結果

### 2-1 機械的搔破回数と TEWL 値の変化

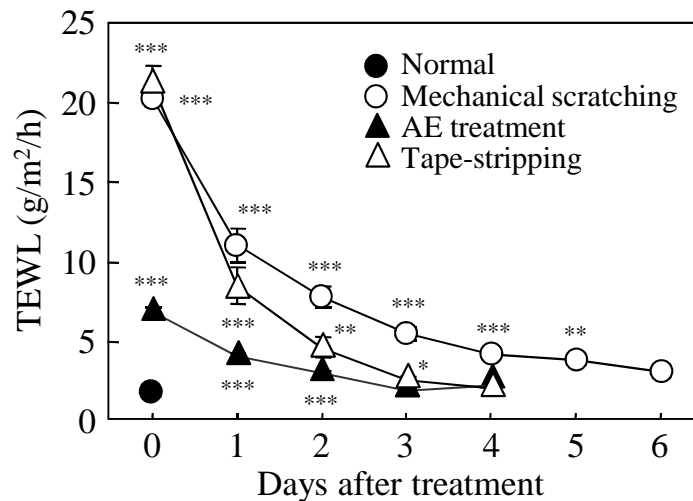
正常皮膚の TEWL 値は  $1.70 \pm 0.14 \text{ g/m}^2/\text{h}$  であった。背部皮膚へのワイヤーブラシによる 10, 20, 30, 40 及び 50 回搔破により, TEWL 値はそれぞれ  $2.97 \pm 0.37$ ,  $5.12 \pm 1.21$ ,  $10.08 \pm 2.19$ ,  $15.93 \pm 2.63$  及び  $21.28 \pm 3.04 \text{ g/m}^2/\text{h}$  へと搔破回数依存的に増加し, 搔破 40 回以上で正常皮膚値と比較し有意差が認められた (Fig. 3)。



**Fig. 3 Change in transepidermal water loss (TEWL) by mechanical scratching.** The skin of the rostral part of the mouse back was mechanically scratched 10, 20, 30, 40 and 50 times. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  when compared with mechanical scratchings 0 (Welch's t-test).

## 2-2 皮膚バリア破壊後の修復期間比較

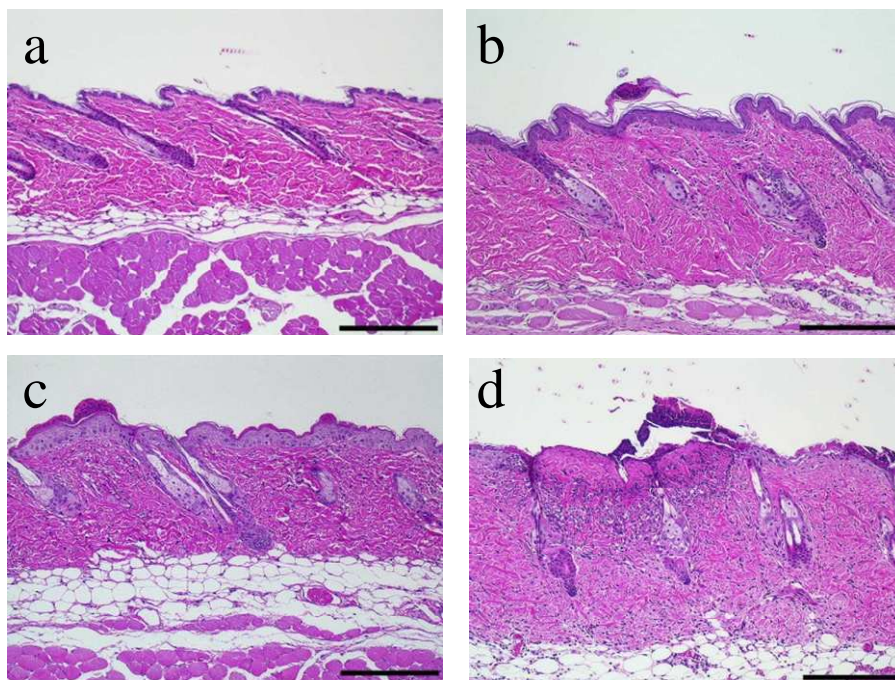
正常皮膚の TEWL 値は  $1.57 \pm 0.13 \text{ g/m}^2/\text{h}$  であった。機械的搔破では、背部皮膚へのワイヤーブラシ約 50 回搔破による皮膚バリア破壊処置により、TEWL は  $20.29 \pm 0.49 \text{ g/m}^2/\text{h}$  に上昇した。その後、TEWL は処置後 1 日目で急激に減少するが、2 日目以降は徐々に低下し、6 日目で正常皮膚との間に有意差が認められなくなった。脱脂処置では、処置後の TEWL 値は  $6.74 \pm 0.28 \text{ g/m}^2/\text{h}$  となり、正常皮膚と比較し有意に上昇した。しかし、TEWL 値の上昇は機械的搔破処置と比較し低値であり、処置後 3 日目では正常皮膚との間に有意差が認められなくなった。テープストリッピング処置では、6~8 回の角質除去により、TEWL は  $21.19 \pm 1.06 \text{ g/m}^2/\text{h}$  に上昇した。しかし、機械的搔破処置と比較し皮膚バリアの修復が早く、処置後 4 日目で正常皮膚との間に有意差が認められなくなった (Fig. 4)。



**Fig. 4 Time course change on TEWL in mechanical scratching, acetone-ether (AE) treatment and tape-stripping.** Mechanical scratching (○) was performed until TEWL reached approximately  $20 \text{ g/m}^2/\text{h}$ . AE treatment (▲) was performed twice daily (9:00 and 17:00) for 3 days and once the fourth morning, for a total of 7 times. Tape-stripping (△) was performed until TEWL reached approximately  $20 \text{ g/m}^2/\text{h}$ . Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 8 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when compared with normal group (●) (Student's t-test or Welch's t-test).

### 2-3 病理組織学的観察

各皮膚バリア破壊処置 24 時間後の病理組織学的観察を行った。機械的搔破では、表皮損傷、剥落、真皮及び皮下組織に好中球を主体とした細胞浸潤及び表皮角化層における好酸性物質の付着（もしくは角化亢進）、痂皮及び表皮肥厚が認められた（Fig. 5a）。脱脂処置（Fig. 5b）及びテープストリッピング処置（Fig. 5c）においても、細胞浸潤、痂皮及び表皮肥厚が観察されたが、機械的搔破と比較し軽度であった。



**Fig. 5 Hematoxylin and eosin (HE) staining of the skin treated for barrier disruption.** The pictures represent the HE-stained sections from the skin 24 h after AE treatment (b) or tape-stripping (c) or mechanical scratching (d), or non-treatment (a). Scale bar = 100  $\mu$ m.

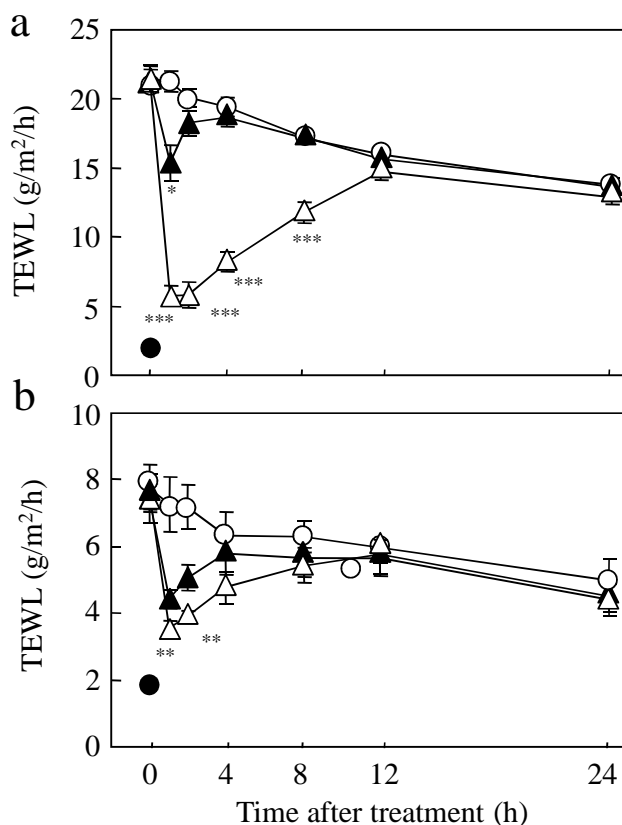
### 2-4 皮膚バリア破壊に対する被覆剤及び保湿剤の作用

機械的搔破及び脱脂処置による皮膚バリア破壊に対する被覆剤及び保湿剤の作用を比較検討した。被覆剤は油脂性軟膏基剤の白色ワセリンを、保湿剤は親水性保湿剤である 10% glycerol 水溶液を用いた。機械的搔破による皮膚バリア破壊後 (TEWL:  $21.52 \pm 0.82$  g/m<sup>2</sup>/h), 自然修復により TEWL は経時的に減少し, 12 時間後では  $15.62 \pm 0.57$  g/m<sup>2</sup>/h, 24 時間後では  $13.78 \pm 0.50$  g/m<sup>2</sup>/h であった (無処置群)。白色ワセリン塗布群は, 塗布 1 時間後において  $5.75 \pm 0.71$  g/m<sup>2</sup>/h と最も低値を示し, 無処置群 ( $21.30 \pm 0.74$  g/m<sup>2</sup>/h) と比較し有意差を認めた。その後, TEWL は徐々に上昇していくが, 塗布 8 時間後 ( $11.78 \pm 0.77$  g/m<sup>2</sup>/h) まで無処置群 ( $17.22 \pm 0.37$  g/m<sup>2</sup>/h) と比較し有意差が認められた。10% glycerol 塗布群は, 塗布 1 時間後 ( $15.37 \pm 1.32$  g/m<sup>2</sup>/h) において, 無処置群と比較し有意に低値を示したが, 塗布 2 時間後 ( $18.25 \pm 0.91$  g/m<sup>2</sup>/h) では無処置群 ( $20.08 \pm 0.61$  g/m<sup>2</sup>/h) と比較し有意差は



認められなかった (Fig. 6a)。

一方、脱脂処置による皮膚バリア破壊後 (TEWL :  $7.58 \pm 0.64 \text{ g/m}^2/\text{h}$ )、自然修復により TEWL は経時的に減少し、12 時間後では  $5.95 \pm 0.46 \text{ g/m}^2/\text{h}$ 、24 時間後では  $5.00 \pm 0.61 \text{ g/m}^2/\text{h}$  であった (無処置群)。白色ワセリン塗布群は、塗布 1 時間後において  $3.57 \pm 0.20 \text{ g/m}^2/\text{h}$  と最も低値を示し、無処置群 ( $7.27 \pm 0.83 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ) と比較し有意差を認めた。その後、TEWL は徐々に上昇していき、塗布 2 時間後 ( $3.90 \pm 0.19 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ) では無処置群 ( $7.18 \pm 0.65 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ) と比較し有意差が認められたが、塗布 4 時間後 ( $4.77 \pm 0.49 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ) では無処置群 ( $6.33 \pm 0.71 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ) と比較し有意差は認められなかった。10% glycerol 塗布群は、塗布 1 時間後において  $4.43 \pm 0.28 \text{ g/m}^2/\text{h}$  と低値を示したが、無処置群と比較し有意差は認められなかった (Fig. 6b)。



**Fig. 6 Effect of moisturizers on recovery of cutaneous barrier disruption.** The murine skin was treated by mechanical scratching (a) and AE treatment (b) as mentioned in Fig. 4. and 0.1 mL of vaseline ( $\triangle$ ) or glycerol ( $\blacktriangle$ ), respectively, was topically applied after each cutaneous barrier disruption. TEWL was measured at 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after topical applications.  $\bullet$ ; Normal skin group. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M from 8 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when compared with non-application ( $\circ$ ) (Student's t-test or Welch's t-test).

### 3. 考察

ワイヤーブラシを用いた機械的搔破により惹起されるマウス皮膚バリア破壊を、修復に至るまでの期間、皮膚病態、被覆剤及び保湿剤の作用について、脱脂処置及びテープストリッピング処置モデルと比較し、その特長と評価系としての可能性を検討した。

機械的搔破は、搔破回数依存的に 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。アトピー性皮膚炎患者は、著しい掻痒による搔破行動が物理的刺激となり皮膚バリア破壊を引き起こすと考えられている。実際、アトピー性皮膚炎患者では健常人と比較し、TEWL が上昇していることも報告されている<sup>6, 7)</sup>。Conventional (通常飼育) 環境下で皮膚炎を自然発症する NC/Nga マウスは、アトピー性皮膚炎自然発症モデルとして広く用いられているが<sup>49)</sup>、自発性搔破行動により皮膚バリア破壊を起こし TEWL が上昇する<sup>114)</sup>。しかし、後肢爪を切除し搔破による物理的刺激を抑えると、皮膚バリア破壊及び皮膚炎を発症しない<sup>114)</sup>。従って、ワイヤーブラシによる機械的搔破は、アトピー性皮膚炎患者の指爪による搔破行動に代わり、アトピー性皮膚炎類似の皮膚バリア破壊を惹起させるものと考えられた。

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 (TEWL : 20 g/m<sup>2</sup>/h) 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期間が長かった。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た。この組織変化は好中球を主体とし、処置 24 時間後に生じていることから急性炎症を示唆するものであり、機械的搔破により皮膚バリア破壊及び皮膚炎の誘発が確認された。また、この病理学的炎症症状は、皮膚炎を発症した NC/Nga マウスの病理像と類似するものであった<sup>114)</sup>。一方、脱脂処置及びテープストリッピング処置においても細胞浸潤や痂皮形成、表皮肥厚が観察されたが、機械的搔破と比較し軽度であった。機械的搔破がテープストリッピング処置より皮膚バリア破壊後の修復期間が長かったのは、テープストリッピング処置が角質バリアの除去のみであるのに対し、機械的搔破は角質バリアの損傷以外に、角質層より下層のバリア機能も障害したためと考えられる。以上のことから、従来の皮膚バリア破壊モデルである脱脂処置及びテープストリッピング処置モデルは、皮膚バリア修復が早いため、試験薬剤の皮膚バリア修復促進に対する適切な評価を行うことが困難であったが、機械的搔破モデルは明確な TEWL の上昇、つまり明確な皮膚バリア破壊及び長期間皮膚バリア破壊状態が持続するため、薬剤の適切な評価が出来るものと考えられた。NC/Nga マウスはアトピー性皮膚炎の臨床症状をよく反映した動物モデルの一つであるが、自発的搔破行動及び皮膚炎発症に個体差があること、モデルの作製に長期間必要であることなどの問題点もある。脱脂処置モデルも同様に、TEWL の上昇に個体差を生じ

ることがあり、またモデル作製に数日間必要とすることの問題点がある。しかしながら機械的搔破は、搔破回数により TEWL を設定出来ること、短時間でモデルを作製出来ること、皮膚バリア修復に至る期間が長い利点があることから、機械的搔破による皮膚バリア破壊は皮膚バリア修復作用の評価系として有用と考えられた。

皮膚バリア破壊に対する最も基本的な治療法は、バリアを補う被覆剤あるいは保湿剤による保湿療法である。そこで、代表的な被覆剤である油脂性軟膏基剤の白色ワセリン及び親水性保湿剤である glycerol の影響を検討した。白色ワセリン塗布は、機械的搔破モデルにおいて 8 時間まで、脱脂処置モデルにおいて 2 時間まで無処置群と比較し有意な TEWL の減少作用を示した。しかしながら、両モデルにおいて 12 時間後には無処置群と同等まで TEWL は上昇し、1 日 1 回の白色ワセリン塗布は経日的な TEWL に変化を与えなかった (data not shown)。Glycerol 塗布は、脱脂処置モデルでは無処置群と比較し有意差は認められなかったが、機械的搔破モデルでは 1 時間後のみにおいて無処置群と比較し有意な TEWL の減少を示し、その効果は白色ワセリンと比較して弱いものであった。機械的搔破モデルは高い TEWL 上昇を示すため、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。

以上の結果より、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た。

## 小括

皮膚バリア破壊のモデルマウス作出を目的として、ワイヤーブラシを用いて機械的搔破したマウスの皮膚バリア機能及び皮膚病変の特性を検討した結果、以下の成績を得た。

1. 機械的搔破は搔破回数依存的に TEWL を上昇させた。一定量のバリア破壊負荷が可能であり、搔破回数により容易に皮膚バリア破壊を設定できた。
2. 皮膚バリア破壊処置として、脱脂処置、テープストリッピング及び機械的搔破を比較検討した結果、機械的搔破は短時間で明確な TEWL の上昇、つまり皮膚バリア破壊を設定でき、また治癒に至るまでの期間が長く、長期間バリア破壊状態を保つことができた。
3. 機械的搔破の皮膚病変は、表皮の損傷、剥落、痂皮形成及び炎症性細胞の浸潤などの炎症症状がテープストリッピングや脱脂処置と比較し重篤であった。また、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。
4. 被覆剤のワセリン及び保湿剤の glycerol 水溶液の作用を比較検討した結果、機械的搔破はより長い時間、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。

機械的搔破は、短時間で簡便にバリア破壊モデルを作製でき、また従来 of 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。

## 第Ⅱ部

皮膚バリア破壊の修復に関する研究

## 第1章 皮膚バリア修復における prostaglandin の関与

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。角質間脂質層構造の主成分である、ceramide, cholesterol, 遊離脂肪酸や脂質を含めた角化関連分子は、皮膚バリア機能を制御する標的として研究が進められてきた<sup>36, 50, 51)</sup>。皮膚バリアが障害されると、損傷した組織に炎症性細胞が集積し、この炎症性細胞からは様々な炎症性メディエーター (bradykinin, histamine, serotonin, cytokine, prostanoid 等) が放出され、生体防御機構としての炎症反応が起こる。炎症性メディエーターの中で、histamine<sup>64)</sup>, IL-1 $\alpha$ <sup>60)</sup>及び TNF $\alpha$ <sup>58)</sup>等は皮膚バリア修復に関与することが報告されている。

掻破は、表皮を削り取り、皮膚の表面に付着または内部に進入した異物を排除する生理反応と考えられている。しかし、掻破は皮膚を障害する行為でもあるため、そこには過度の掻破による皮膚障害を抑え、皮膚の恒常性を維持するための厳密な調節機構が存在すると考えられる。健常な皮膚では、掻痒によって誘導された掻破により掻痒感が消失するため、過剰な掻破による皮膚障害を発現することはないが、アトピー性皮膚炎患者においては、掻破によりさらに掻痒が増加し、過剰な掻破行為によりさらに皮膚炎が悪化するという itch-scratch-cycle と呼ばれる悪循環が存在する<sup>11)</sup>。新井らは、アトピー性皮膚炎の動物モデル NC/Nga マウスの掻破行動を指標として種々薬物を評価した結果、prostaglandin (PG) 産生抑制作用を持つ indomethacin の投与により NC/Nga マウスの掻破行動が増加し、PG の前駆体であるアラキドン酸の塗布により掻破行動が抑制されることを見出した<sup>113)</sup>。これらの結果は、内因性 PG が掻痒に対し生理的調節物質として機能する可能性を示唆するものであった。さらに、他の PG に比べ、PGD<sub>2</sub> が強力な掻痒抑制作用を有することを見出している<sup>113)</sup>。PG は、基本構造の違いから PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  の 4 種類に分類され、生体内で広範な作用を示す生理活性物質<sup>90-93)</sup>であり、皮膚においても上記 4 種の PG が産生される<sup>113)</sup>。特に PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> は、炎症反応 (発熱、疼痛及び浮腫) との関係が良く知られており<sup>100-104)</sup>、これらの PG は皮膚炎の進展に関与すると考えられている。しかしながら、PG が皮膚で産生される意義は十分には解明されていない。また、アトピー性皮膚炎や皮膚バリア機能における皮膚 PG の研究は殆どなされておらず、その関連性については不明な点が多い。

本章では、機械的掻破皮膚バリア破壊モデルを用い、皮膚バリア破壊とその修復における皮膚 PG の役割を検討した。

## 1. 実験方法

### 1-1 実験動物

実験には、日本エスエルシー株式会社より購入した 8 週齢の雄性 BALB/c 系マウスを使用した。飼育方法は、第 I 部、第 1 章に従って行った。

### 1-2 機械的搔破による皮膚バリア破壊処置

第 I 部、第 1 章の方法に従って、ワイヤーブラシを用いてマウス背部皮膚を搔破した。皮膚バリア修復に対する薬効試験では、TEWL が  $20 \text{ g/m}^2/\text{h}$  になるよう搔破した。

### 1-3 TEWL の測定

第 I 部、第 1 章の方法に従って、TEWL 測定装置 (Tewameter TM210, Courage & Khazaka, Germany) を用いてマウス背部の TEWL を測定した。

### 1-4 皮膚 PG 量の測定

新たな内因性の PG 産生を抑制するため、indomethacin (10 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を静脈内投与し、5 分後に頸椎脱臼により屠殺してから鋏を用いて背部皮膚を採取した。氷上にて皮膚片 (約 100 mg) をチューブに移し、PBS (100  $\mu\text{M}$  indomethacin を含む) 1 mL を添加した後、ポリトロンホモジェナイザーを用いて組織を破碎した。Acetone (国産化学株式会社) 4 mL を添加して攪拌し、5 分間静置した後、遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 10 分) した。上清を回収し、氷上にて窒素を吹き付けて溶媒を蒸発させた後、ELISA buffer に再溶解して ELISA kit にて各 PG 量 (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  及び 6keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> ) を測定した。データは pg/mg (皮膚組織湿重量) で示した。ELISA 測定には、PGD<sub>2</sub> EIA kit, PGE<sub>2</sub> EIA kit 及び 6keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  EIA kit (以上, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) 及び PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  EIA kit (R&D System Inc., Minneapolis, MN) を用いた。なお、6keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  は PGI<sub>2</sub> の安定代謝物であるため、6keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  量を PGI<sub>2</sub> 量とした。

### 1-5 薬物

Indomethacin は Sigma-Aldrich より、PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub>, PGJ<sub>2</sub> (DP<sub>1</sub>/DP<sub>2</sub> 受容体作動薬), 13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub> (DP<sub>2</sub> 受容体作動薬), 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (DP<sub>2</sub>/PPAR $\gamma$  受容体作動薬), 17-phenyl-trinor-PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub> 受容体作動薬), sulprostone (EP<sub>3</sub> 受容体作動薬) 及び U46619 (TP 受容体作動薬) は Cayman Chemical より購入した。Butaprost (EP<sub>2</sub> 受容体作動薬) 及び ONO-4819 (EP<sub>4</sub> 受容体作動薬) は大正製薬にて合成した。以上の薬物は ethanol (国産化学株式会社) に溶解して濃度を調整し、マウス背部皮膚に塗布した。

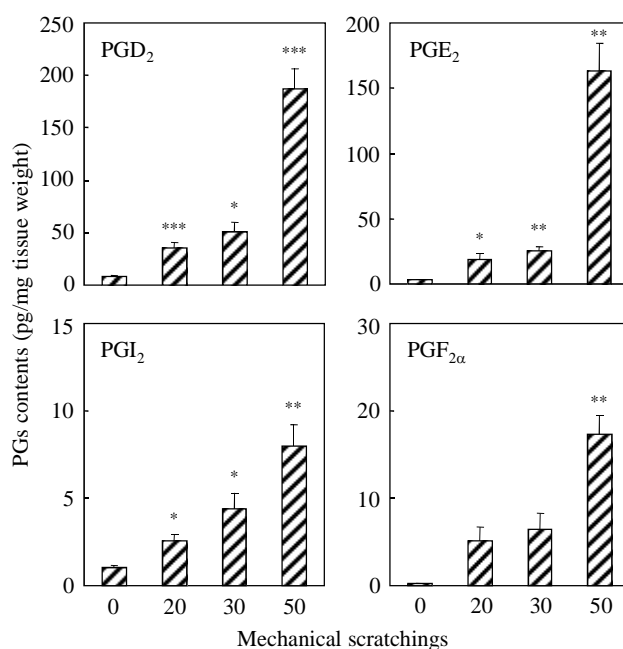
## 1-6 統計処理

データは平均値 ± 標準誤差で示した。有意差の検定は、多重比較は Bartlett 検定による等分散性の確認後、等分散の場合は Dunnett 検定を、不等分散の場合はさらに F 検定により 2 群間の等分散性を確認し、等分散の場合は Student の t 検定を、不等分散の場合は Welch の t 検定を行い、Bonferroni 法により多重性の調整を行った。2 群間比較は、同様に F 検定後、Student の t 検定または Welch の t 検定を行った。有意水準は 5% とした。

## 2. 実験結果

### 2-1 機械的搔破回数と皮膚 PG 量の変化

マウス背部皮膚に機械的搔破を 0, 20, 30 及び 50 回負荷し、10 分後の皮膚 PG 量を測定した。搔破 0 回の PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 量は、それぞれ 8.09 ± 1.33, 2.96 ± 0.71, 1.02 ± 0.12 及び 0.18 ± 0.08 pg/mg tissue であった。機械的搔破後の皮膚 PG 量は、搔破回数に依存して増加した。50 回搔破後の PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 量は、それぞれ 186.94 ± 18.90, 163.11 ± 21.40, 7.97 ± 1.22 及び 17.33 ± 2.20 pg/mg tissue であった。皮膚 PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 量は、PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 量より顕著に多かった (Fig. 7)。

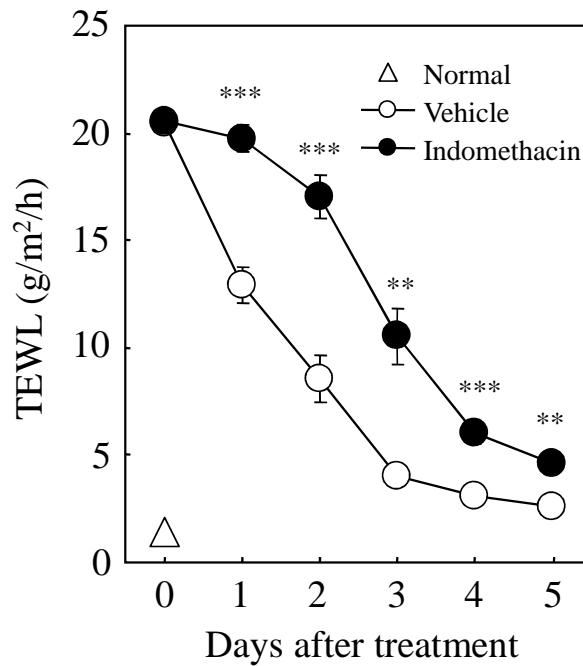


**Fig. 7 Changes in skin PGs contents by mechanical scratching.** The amounts of PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (6-keto-PGF<sub>1α</sub>) and PGF<sub>2α</sub> were measured 10 min after the treatment of cutaneous barrier disruption by mechanical scratching for 20, 30 and 50 times. Values represent the mean ± S.E.M. from 6 mice. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared with mechanical scratchings 0 (Student's t-test or Welch's t-test).



## 2-2 皮膚バリア修復に対する indomethacin の作用

機械的搔破による皮膚バリア破壊 (TEWL 約 20 g/m<sup>2</sup>/h) 直後から 0.1% indomethacin を 1 日 1 回 0.1 mL 塗布し、翌日からの TEWL の経日変化を測定し、皮膚バリア修復への影響を検討した。Indomethacin 塗布群は、溶媒塗布群と比較し全ての測定日において有意に TEWL 値が高く、皮膚バリア修復の遅延が観察された (Fig. 8)。また、機械的搔破による皮膚 PG 産生に対し、0.1% indomethacin 塗布は完全に PG 産生を阻害していた (Table 1)。



**Fig. 8 Effect of indomethacin on recovery of the cutaneous barrier.** Mice were subjected to cutaneous barrier disruption by mechanical scratching about 50 times and 0.1 mL of 0.1% indomethacin (●) was then topically applied once a day for 5 days. TEWL was measured at 24 h after topically application of indomethacin. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 8 mice. Normal represents the value of mice given no treatment (△). \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared with vehicle (○) (Student's t-test).

**Table 1 Effect of indomethacin on the mechanically induced barrier disruption of the skin on PGs contents.**

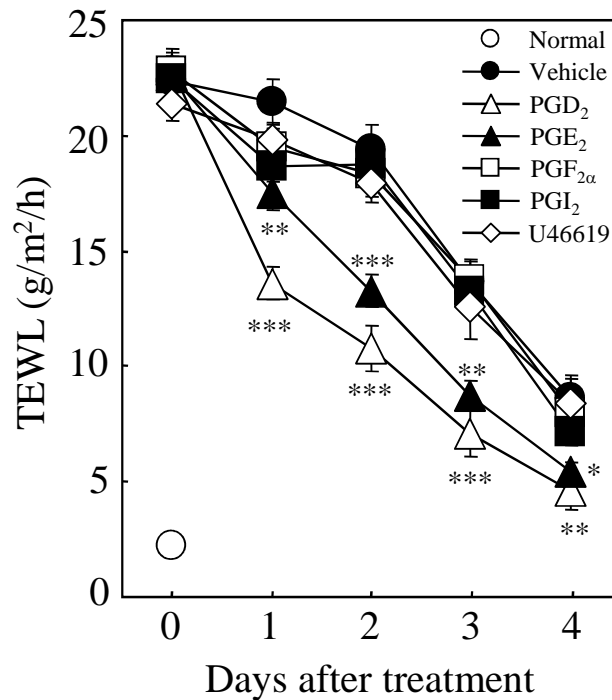
	<b>PGD<sub>2</sub></b>	<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>PGI<sub>2</sub></b>	<b>PGF<sub>2α</sub></b>
<b>Non-treatment</b>	5.35 ± 0.36	5.88 ± 0.92	1.11 ± 0.10	0.80 ± 0.23
<b>VH + MS</b>	238.42 ± 31.20 <sup>a</sup>	285.60 ± 36.69 <sup>a</sup>	16.79 ± 1.98 <sup>a</sup>	39.16 ± 4.26 <sup>a</sup>
<b>IM + MS</b>	3.10 ± 0.56 <sup>b</sup>	3.30 ± 0.92 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.05 <sup>b</sup>

Values represent the mean ± S.E.M. pg/mg tissue weight from 6 mice. MS; Mice were subjected to cutaneous barrier disruption by mechanical scratching (MS) about 50 times using a wire-brush, 10 min before the measurement of the skin PGs (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub>) counts. IM; 0.1 mL of 0.1% indomethacin (IM) was topically applied to the mouse skin of the back, 10 min before MS.

<sup>a</sup>P<0.001 compared with non-treatment of each PG content. <sup>b</sup>P<0.001 compared with vehicle (VH) of each PG content (Welch's t-test).

### 2-3 皮膚バリア修復に対する PG の作用

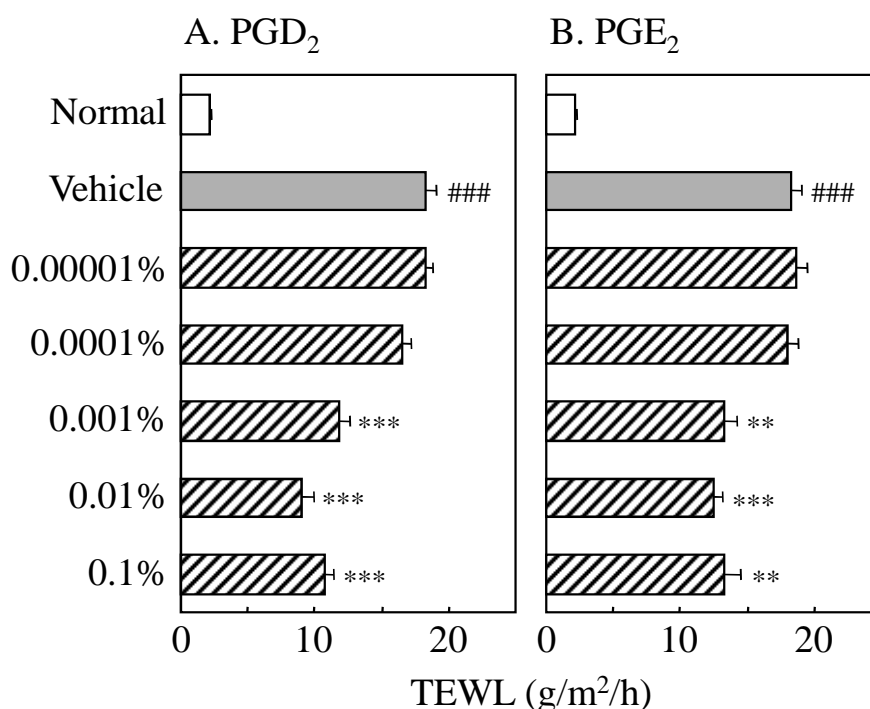
機械的搔破による皮膚バリア破壊 (TEWL 約 20 g/m<sup>2</sup>/h) 及び 0.1% indomethacin 塗布による内因性 PG 産生阻害処置後, 5 種の PG (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び U46619 (TP 受容体作動薬)) を 1 日 1 回塗布し, 翌日からの TEWL の経日変化を測定し, 皮膚バリア修復への影響を検討した。処置後 1 日目において, 溶媒塗布群の TEWL は 21.49 ± 0.68 g/m<sup>2</sup>/h であるのに対し, 0.1% PGD<sub>2</sub> 塗布群は 13.60 ± 0.73 g/m<sup>2</sup>/h, 0.1% PGE<sub>2</sub> 塗布群は 17.51 ± 0.84 g/m<sup>2</sup>/h であり, 共に有意に低値を示した。処置後 2 日目以降も, 両群は溶媒塗布群と比較し有意差を認めしたが, PGD<sub>2</sub> 塗布群は PGE<sub>2</sub> 塗布群より全ての測定日において低値を示した。一方, 0.1% PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び U46619 塗布群は, 溶媒塗布群と比較し有意差は認められなかった (Fig. 9)。



**Fig. 9 Effect of several prostanoids on recovery of the cutaneous barrier.** Mice were subjected to cutaneous barrier disruption by mechanical scratching about 50 times and then inhibition of production of endogenous PGs by topical application of indomethacin. A 0.1 mL of 0.1% several prostanoids (PGD<sub>2</sub>; △, PGE<sub>2</sub>; ▲, PGF<sub>2α</sub>; □, PGI<sub>2</sub>; ■, U46619; ◇) were topically applied once a day for 4 days 10 min after topical application of indomethacin. TEWL was measured at 24 h after topically application of each prostanoid. Values represent the mean ± S.E.M. from 8 mice. Normal represents the value of mice given no treatment (○). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared with vehicle (●) (Dunnett's test).

#### 2-4 皮膚バリア修復に対する PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> の作用

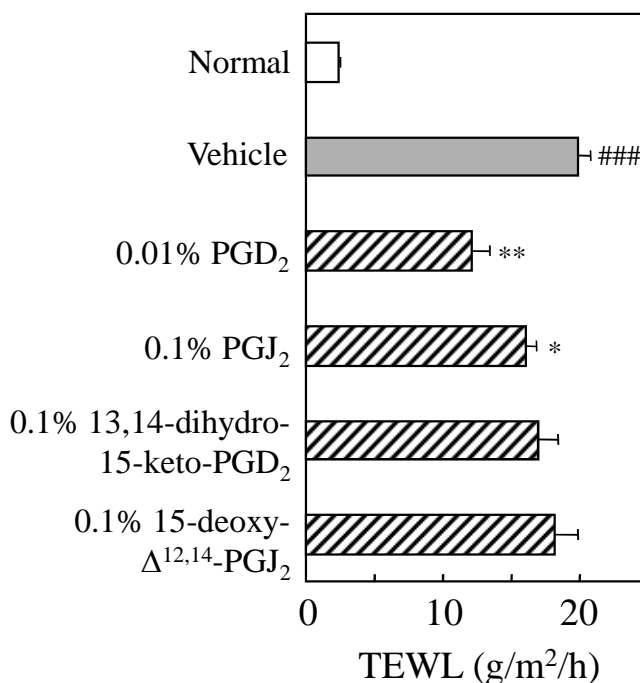
機械的搔破による皮膚バリア破壊 (TEWL 約 20 g/m<sup>2</sup>/h) 及び 0.1% indomethacin 塗布による内因性 PGs 産生阻害処置後, 0.00001~0.1% PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> を 1 日 1 回塗布し, 皮膚バリア修復への影響を検討した。評価は溶媒塗布群との差が最も明確な処置後 2 日目における TEWL を測定した。PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 塗布は, 用量依存的に indomethacin による皮膚バリア修復遅延を改善した。PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 塗布共に, 0.001~0.1% の濃度において溶媒塗布群と比較し有意差を認めたが, 0.0001 及び 0.00001% の濃度では有意差を認めなかった。また, PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> の抑制作用は 0.01% の濃度でプラトーに達していた (Fig. 10)。



**Fig. 10 Effect of a low concentration of PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> on recovery of the cutaneous barrier.** Mice were subjected to cutaneous barrier disruption by mechanical scratching about 50 times and then inhibition of production of endogenous PGs by topical application of indomethacin. A 0.1 mL of 0.00001%, 0.0001%, 0.001, 0.01% and 0.1% PGD<sub>2</sub> (A) and PGE<sub>2</sub> (B) were topically applied once a day for 2 days 10 min after topical application of indomethacin (hatched columns). TEWL was measured at 24 h after the second topically application of each PG. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 8 mice. Normal represents the value of mice given no treatment (open column). ###P<0.001 when compared with normal (Student's t-test). \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared with vehicle (shadowed column) (Dunnett's test).

## 2-5 皮膚バリア修復に対する PGD<sub>2</sub> 代謝物の作用

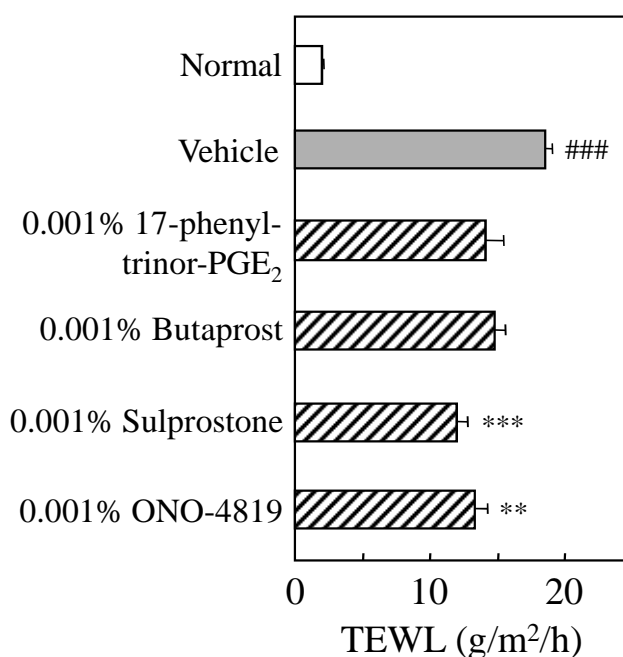
PGD<sub>2</sub> の皮膚バリア修復作用において、PGD<sub>2</sub> 受容体である DP<sub>1</sub> 及び DP<sub>2</sub> 受容体または PGD<sub>2</sub> が親和性を有する PPAR $\gamma$  の関与を検討するため、DP<sub>1</sub>、DP<sub>2</sub> 及び PPAR $\gamma$  各々に結合特性を有する PGD<sub>2</sub> 各代謝物の皮膚バリア修復に対する効果を検討した。評価は溶媒塗布群との差が最も明確な処置後 2 日目における TEWL を測定した。DP<sub>1</sub> 及び DP<sub>2</sub> の作動活性を持つ PGJ<sub>2</sub> は 0.1% で有意な皮膚バリア修復作用を示した。しかしながら、0.01% PGD<sub>2</sub> の TEWL と比較すると高値を示した。一方、DP<sub>2</sub> 作動活性を持つ 13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub> は 0.1% で有意な皮膚バリア修復作用を示さず、DP<sub>2</sub> 及び PPAR $\gamma$  作動活性を持つ 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> も 0.1% で有意な作用を示さなかった。DP<sub>1</sub> 作動活性を持つ PGD<sub>2</sub> 及び PGJ<sub>2</sub> が、皮膚バリア修復作用を示すことが明らかとなった (Fig. 11)。



**Fig. 11 Effect of PGD<sub>2</sub> metabolites on recovery of the cutaneous barrier.** Mice were subjected to cutaneous barrier disruption by mechanical scratching about 50 times and then inhibition of production of endogenous PGs by topical application of indomethacin. A 0.1 mL of 0.01% PGD<sub>2</sub>, 0.1% PGJ<sub>2</sub>, 0.1% 13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub> and 0.1% 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> were topically applied once a day for 2 days 10 min after topical application of indomethacin (hatched columns). TEWL was measured at 24 h after the second topical application of each PGD<sub>2</sub> metabolite. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 8 mice. Normal represents the value of mice given no treatment (open column). ###P<0.001 when compared with normal (Student's t-test). \*P<0.05, \*\*P<0.01 when compared with vehicle (shadowed column) (Dunnnett's test).

## 2-6 皮膚バリア修復に対する EP 受容体作動薬の作用

PGE<sub>2</sub> の皮膚バリア修復作用において、PGE<sub>2</sub> 受容体である EP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub> 及び EP<sub>4</sub> 受容体の関与を検討するため、それぞれの受容体作動薬の皮膚バリア修復に対する効果を検討した。評価は溶媒塗布群との差が最も明確な処置後 2 日目における TEWL を測定した。0.001% sulprostone (EP<sub>3</sub> 受容体作動薬) 及び ONO-4819 (EP<sub>4</sub> 受容体作動薬) は有意な皮膚バリア修復作用を示したが、0.001% 17-phenyl-trinor-PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub> 受容体作動薬) 及び butaprost (EP<sub>2</sub> 受容体作動薬) は有意な作用を示さなかった (Fig. 12)。0.0001% の濃度においては、ONO-4819 (EP<sub>4</sub> 受容体作動薬) のみで有意な皮膚バリア修復作用を示した (data not shown)。PGE<sub>2</sub> の皮膚バリア修復作用は、EP<sub>3</sub> 及び EP<sub>4</sub> 受容体を介することが明らかとなった。



**Fig. 12 Effect of EP receptor agonists on recovery of the cutaneous barrier.** Mice were subjected to cutaneous barrier disruption by mechanical scratching about 50 times and then inhibition of production of endogenous PGs by topical application of indomethacin. A 0.1 mL of 0.01% 17-phenyl-trinor-PGE<sub>2</sub>, butaprost, sulprostone and ONO-4819 were topically applied once a day for 2 days 10 min after topical application of indomethacin (hatched columns). TEWL was measured at 24 h after the second topical application of each EP agonist. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 mice. Normal represents the value of mice given no treatment (open column). ###P<0.001 when compared with normal (Welsh's t-test). \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared with vehicle (shadowed column) (Dunnett's test).

### 3. 考察

本章では、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皮膚 PG の役割を検討した。

皮膚への機械的搔破は、搔破回数に比例して皮膚 PG (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub>) 産生を誘導し、特に PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 産生が顕著であった。一方、皮膚 TXA<sub>2</sub> 産生については明確な変化は認められなかった。第 I 部において、機械的搔破は搔破回数依存的に TEWL を上昇することを示した。従って、皮膚 PG 量は皮膚バリア破壊の程度に比例して誘導されることが示唆された。ハプテン誘発皮膚炎モデルにおいても、同様に皮膚 PG 産生増加が認められる<sup>116)</sup>。一方、PG 前駆体であるアラキドン酸は、皮膚への塗布により皮膚 PG 産生を誘導するが機械的搔破と異なり TEWL 値の上昇は見られず、病理学的にも炎症像は認められない<sup>117)</sup>。つまり、アラキドン酸塗布による PG 産生では、皮膚バリア破壊及び炎症を惹起しない。一般的に、炎症反応では cyclooxygenase (COX) -2 によって産生される大量の PG (主に PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub>) が炎症の modulator として反応を増悪させることから<sup>100-104)</sup>、PG により炎症反応が惹起され増悪すると考えられているが、アラキドン酸塗布による PG 増加のように皮膚バリア破壊を伴わない PG 量の増加は皮膚炎を惹起しない。従って、機械的搔破による皮膚バリア破壊は、単なる皮膚 PG 量の増加によって惹起されたものではないことが示唆された。搔破行動は、皮膚に侵入した異物を排除するため生理反応と考えられる。しかし、搔破は皮膚を障害する行為でもあるため、そこには過度の搔破による皮膚障害を抑え、皮膚の恒常性を維持するための厳密な調節機構が存在すると考えられる。新井らが報告した PG (特に PGD<sub>2</sub>) の搔破行動抑制作用<sup>113)</sup>を考え併せると、搔痒感を消失させるために搔破行動によって皮膚に物理刺激を与え、結果皮膚バリア破壊が生じるが、産生された PGD<sub>2</sub> が搔痒抑制により過度の搔破行動を抑え、皮膚損傷を防ぐフィードバック機構が存在する可能性が考えられた。

次に、皮膚バリア破壊時に産生される PG の皮膚バリア修復への役割を検討した。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) である indomethacin 塗布により内因性 PG 産生を阻害させ皮膚バリア修復作用を検討した結果、皮膚バリア修復の遅延が観察された。同様に、他の NSAIDs 塗布においても皮膚バリア修復の遅延が観察される<sup>117)</sup>。これらの結果は、皮膚バリア破壊時に産生させる皮膚 PG は皮膚バリア修復促進に関与していることを示唆した。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、PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> が皮膚バリア修復遅延を改善したが、PGF<sub>2α</sub>、PGI<sub>2</sub> 及び U46619 (TP 受容体作動薬) は有意な作用を示さなかった。また、PGD<sub>2</sub> は皮膚バリア修復過程の早期に作用を示す傾向が見られ、さらに PGE<sub>2</sub> より強力な作用であった。

PGD<sub>2</sub> の生体内での代謝は大きく 3 通りに分かれる。15-hydroxy-PG-dehydrogenase 及び 15-keto-PG-13-reductase により 13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub> に代謝される経路、PGF synthase により 11-β-PGF<sub>2α</sub> に代謝される経路及び非酵素的に PGI<sub>2</sub> に代謝される経路である<sup>118)</sup>。こ

のうち、11- $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> は生理活性が弱い、13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub>はDP<sub>2</sub>受容体に対して親和性を示すことが知られる<sup>119)</sup>。PGJ<sub>2</sub>は、DP<sub>1</sub>及びDP<sub>2</sub>受容体に親和性を示す<sup>119, 121)</sup>。さらに、PGJ<sub>2</sub>からの代謝物である15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>はDP<sub>2</sub>に加えて核内受容体であるPPAR $\gamma$ にも親和性を有する<sup>120)</sup>。DP<sub>1</sub>受容体はGsと共役しadenylate cyclaseの活性化する。DP<sub>2</sub>受容体は7回膜貫通型のGタンパク結合型受容体で、Th2細胞、好酸球及び好塩基球などに発現し、アレルギー症状の増悪に関与することが報告されており<sup>96, 121)</sup>、CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expression on Th2 cells) 受容体とも称される。一方、PPAR $\gamma$ は核内レセプターの種類として作用し、抗炎症作用を示すことが報告されている。PGD<sub>2</sub>の皮膚バリア修復作用におけるDP<sub>1</sub>、DP<sub>2</sub>及びPPAR $\gamma$ の関与を検討したところ、0.1% PGJ<sub>2</sub>は有意な皮膚バリア修復作用を示した。一方、0.1% 13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub>及び15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>は有意な効果を示さなかった。これらの効果はDP<sub>1</sub>受容体への親和性に比例し、DP<sub>2</sub>受容体及びPPAR $\gamma$ への親和性とは関連しなかった。以上の結果から、PGD<sub>2</sub>はDP<sub>1</sub>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。

一方、EP受容体には、EP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>の受容体サブタイプが存在する<sup>97-99)</sup>。EP<sub>1</sub>受容体はGタンパク質と共役するがその種類は不明である。Ca<sup>2+</sup>透過性チャネルを活性化し、細胞外からCa<sup>2+</sup>流入を引き起こす。EP<sub>2</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体はGsと共役し、adenylate cyclaseを活性化し、cAMPを上昇させる。一方、EP<sub>3</sub>受容体はGiに共役し、adenylate cyclaseを抑制する。しかし、マウスEP<sub>3</sub>受容体には3種類のisoform (EP<sub>3 $\alpha$</sub> 、EP<sub>3 $\beta$</sub> 及びEP<sub>3 $\gamma$</sub> )が存在し、これらは各種PGに対する結合特異性や結合親和性は同じであるが、共役するGタンパク質やその活性化効率は異なると報告されている<sup>122-124)</sup>。EP<sub>3 $\alpha$</sub> 及びEP<sub>3 $\beta$</sub> はGiとのみ共役しadenylate cyclaseを抑制するが、EP<sub>3 $\gamma$</sub> は低濃度のPGE<sub>2</sub>でGi、高濃度ではGsとも共役しadenylate cyclaseを活性化する。PGE<sub>2</sub>の皮膚バリア修復作用におけるEP受容体の関与を検討したところ、0.001% sulprostone (EP<sub>3</sub>受容体作動薬) 及びONO-4819 (EP<sub>4</sub>受容体作動薬) は有意な皮膚バリア修復作用を示した。一方、0.001% 17-phenyl-trinor-PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>受容体作動薬) 及びbutaprost (EP<sub>2</sub>受容体作動薬) は有意な効果を示さなかった。0.0001%の濃度においては、ONO-4819のみで有意な皮膚バリア修復作用を示した。以上の結果から、PGE<sub>2</sub>はEP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体 (特にEP<sub>4</sub>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。

皮膚バリア修復に関与したDP<sub>1</sub>、EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体に共通する細胞内シグナルとして、Gsと共役しadenylate cyclase活性化によるcAMPの上昇が考えられる。しかし傳田らは、テープストリッピングモデルにおいて、cAMPは皮膚バリア修復をむしろ遅延させると報告し、cAMPは表皮において電位依存性Caチャネルに作用し細胞内にCa<sup>2+</sup>を流入させることにより、皮膚の恒常性に関与することを示唆している<sup>66)</sup>。また、尋常性乾癬、慢性湿疹、アトピー性皮膚炎などの皮膚炎を伴う患者においてcAMP上昇が認められるが、これは炎症に伴うPGE<sub>2</sub>産生によるものと考えられている。従って、DP<sub>1</sub>、EP<sub>3</sub>及びEP<sub>4</sub>受容体を介した皮膚バリア修復作用は、cAMP-Ca<sup>2+</sup>流入以外の要因が考えられるが、その要因は



不明である。今後、ceramide や脂質を含めた角化関連分子への影響など、更なる検討が必要とされる。

以上の結果より、機械的搔破による皮膚バリア破壊の修復において、搔破により誘導された  $\text{PGD}_2$  及び  $\text{PGE}_2$  は皮膚バリア修復を促進する生理的役割を持つことを明らかにした。特に、最も強く誘導される  $\text{PGD}_2$  は搔痒抑制効果によって過度の搔破行動を抑え、さらに搔破によって障害を受けた皮膚バリアの修復に寄与することを明らかにした。

## 第2章 皮膚バリア修復におけるサイトカインの関与

サイトカインは、細胞が産生する生物学的活性を持つ可溶性因子であり、細胞性免疫の発現や調節、癌細胞やウイルスの増殖の抑制あるいは炎症やアレルギー反応など多面的に関与する。特に、活性化マクロファージや活性化血管内皮細胞から産生される IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 等は炎症性サイトカインと呼ばれ、生体内における様々な炎症症状を引き起こす原因因子として関与する。皮膚バリアとサイトカインの関与においては、テープストリッピングや有機溶媒による急性的なバリア破壊処理により、マウスケラチノサイトにおける IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 等の炎症性サイトカイン mRNA 発現を誘導することが明らかとなっている<sup>55-57)</sup>。また、IL-1 $\alpha$ <sup>60)</sup>及び TNF $\alpha$ <sup>58)</sup>は、マウス皮膚バリア修復促進に関与することが報告されている。従って、炎症性サイトカインは PG 同様に皮膚損傷を防ぐフィードバック機構が存在する可能性が考えられる。

本章では、機械的搔破皮膚バリア破壊モデルにおいて、サイトカイン産生抑制作用を持つステロイド系抗炎症薬 dexamethasone を用い、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。

### 1. 実験方法

#### 1-1 実験動物

実験には、日本エスエルシー株式会社より購入した 8 週齢の雄性 BALB/c 系マウスを使用した。飼育方法は、第 I 部、第 1 章に従って行った。

#### 1-2 機械的搔破による皮膚バリア破壊処置

第 I 部、第 1 章の方法に従って、ワイヤーブラシを用いてマウス背部皮膚を搔破した。皮膚バリア修復に対する薬効試験では、TEWL が 20 g/m<sup>2</sup>/h になるよう搔破した。

#### 1-3 TEWL の測定

第 I 部、第 1 章の方法に従って、TEWL 測定装置 (Tewameter TM210, Courage & Khazaka, Germany) を用いてマウス背部の TEWL を測定した。

#### 1-4 薬物

Indomethacin は Sigma-Aldrich より、dexamethasone は和光純薬工業株式会社より購入した。機械的搔破の 3 時間前に ethanol に溶解した 0.1% indomethacin, 0.1% dexamethasone または 0.1% indomethacin/dexamethasone をマウス背部皮膚に 0.2 mL 塗布し、その後 1 日 1 回

4日間塗布した。PGD<sub>2</sub>及びPGE<sub>2</sub>はCayman Chemicalより、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及びTNF $\alpha$ はフナコシ株式会社より購入した。PGD<sub>2</sub>及びPGE<sub>2</sub>はethanolにて0.01%の濃度に、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及びTNF $\alpha$ は0.001%の濃度に調整し、機械的搔破の翌日から1日1回3日間マウス背部皮膚に0.1 mL塗布した。

#### 1-5 病理組織学的観察及び免疫組織化学的解析

Indomethacin 及び dexamethasone 塗布4日後の背部皮膚を剥離し、第I部、第1章の方法に従ってHE染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。免疫組織化学的手法は、切片をgoat anti-mouse IL-1 $\beta$  antibody (2  $\mu$ g/mL ; AF-201-NA ; R&D Systems, Minneapolis, MN) または goat anti-IL-1RI antibody (1  $\mu$ g/mL ; BAF771 ; R&D Systems) で反応させた後、avidin-biotin peroxidase complex 法により染色標本を作製し、光学顕微鏡を用いて観察した。

#### 1-6 統計処理

データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。有意差の検定は、多重比較はBartlett検定による等分散性の確認後、等分散の場合はDunnnett検定を、不等分散の場合はさらにF検定により2群間の等分散性を確認し、等分散の場合はStudentのt検定を、不等分散の場合はWelchのt検定を行い、Bonferroni法により多重性の調整を行った。2群間比較は、同様にF検定後、Studentのt検定またはWelchのt検定を行った。有意水準は5%とした。

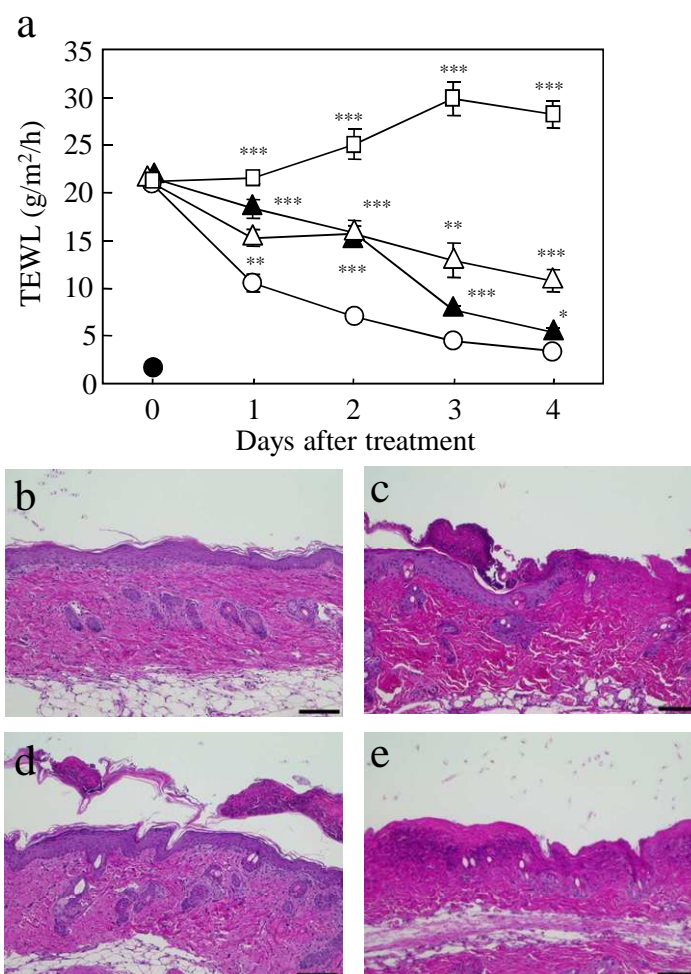
## 2. 実験結果

### 2-1 皮膚バリア修復に対する indomethacin 及び dexamethasone 単独または併用効果

機械的搔破による皮膚バリア破壊 (TEWL 約 20 g/m<sup>2</sup>/h) の3時間前及びその後1日1回4日間、0.1% indomethacin または 0.1% dexamethasone, あるいは 0.1% indomethacin/dexamethasone を0.2 mL塗布し、TEWLの経日変化を測定し皮膚バリア修復への影響を検討した。Indomethacin 単独塗布は、溶媒塗布群と比較し全ての測定日において有意にTEWL値が高く、皮膚バリア修復の遅延が観察された。その変化は、処置後2日目まではTEWLの減少が緩やかで、3日目に急激に減少した。Dexamethasone 単独塗布も、溶媒塗布群と比較し全ての測定日において有意にTEWL値が高く、皮膚バリア修復の遅延が観察された。その変化は、処置後1日目においてはindomethacin 単独塗布のTEWLより減少したが、2日目以降はTEWLの減少が緩やかで、indomethacin 単独塗布よりTEWLは高値を示した。一方、indomethacin 及び dexamethasone 併用塗布は、処置後1日目よりTEWLは上昇し、3日目においてTEWLの上昇はプラトーに達した。併用塗布では、皮膚バリア機能の悪化が観察された (Fig. 13a)。

次に、処置後4日目の皮膚を、HE染色により病理組織学的に検討した。Indomethacin 塗

布 (Fig. 13d) は, 溶媒塗布 (Fig. 13b) と比較し痂皮形成, 軽度のびらん及び炎症性細胞浸潤が観察された。Dexamethasone 塗布 (Fig. 13c) は, 溶媒塗布と比較し痂皮, びらん及び潰瘍, 炎症性細胞浸潤などが観察され, 皮膚炎症状を悪化させた。一方, indomethacin 及び dexamethasone 併用塗布は, 潰瘍, 炎症性細胞浸潤などの皮膚炎症状の悪化が顕著であり, 特に表皮は完全に剥離していた (Fig. 13e)。

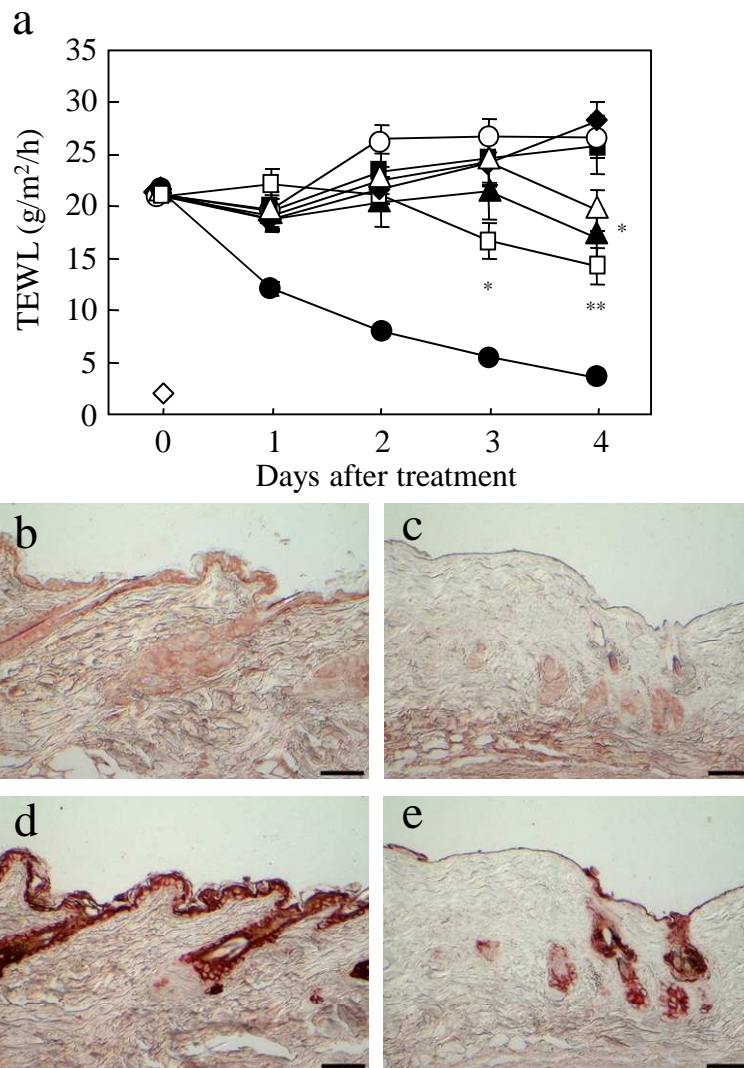


**Fig. 13 Effect of indomethacin or/and dexamethasone on mechanical scratching-induced cutaneous barrier disruption.** (a) Recovery of cutaneous barrier disruption. 0.1% indomethacin (▲), dexamethasone (△), or indomethacin/dexamethasone (□) in a volume of 0.2 mL were topically applied 3 h before mechanical scratching once daily for 4 days. TEWL was measured 24 h after each topical application. ●: Normal skin group. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 8 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when compared with vehicle (○) (Student's t-test or Welch's t-test). (b-e) Hematoxylin and eosin (HE) staining of the skin on mechanical scratching-induced cutaneous barrier disruption treated with indomethacin and dexamethasone. The pictures represent the HE-stained sections from the skin 4 days after vehicle (b) or dexamethasone (c) or indomethacin (d), or indomethacin/dexamethasone treatment (e). Scale bar = 100  $\mu$ m.

## 2-2 皮膚バリア修復に対する PG 及びサイトカインの作用

Indomethacin 及び dexamethasone 併用処置による皮膚バリア破壊悪化に対する PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及び TNF $\alpha$  の皮膚バリア修復作用を検討した。PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> は 0.01% の濃度で, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及び TNF $\alpha$  は 0.001% の濃度で, 機械的搔破の翌日から 1 日 1 回 3 日間マウス背部皮膚に 0.1 mL 塗布した。PGD<sub>2</sub> 及び IL-1 $\beta$  塗布は, それぞれ処置後 4 日目及び 3 日目より溶媒塗布と比較し TEWL を有意に減少させた。PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$  及び TNF $\alpha$  塗布は, 溶媒塗布と比較し有意差は認められなかったが, PGE<sub>2</sub> 塗布では処置後 4 日目において TEWL 減少の傾向が見られた (Fig. 14a)。

次に, 免疫組織化学的手法により皮膚における IL-1 $\beta$  及び IL-1 受容体タイプ I (IL-1RI) の発現を検討した。正常皮膚の表皮において, IL-1 $\beta$  (Fig. 14b) 及び IL-1RI (Fig. 14d) の発現が観察されたが, indomethacin 及び dexamethasone 併用処置の皮膚では, 表皮が殆ど欠落しており, IL-1 $\beta$  (Fig. 14c) 及び IL-1RI (Fig. 14e) の発現は顕著に減少していた。



**Fig. 14** Effect of several PGs and cytokines on mechanical scratching-induced cutaneous barrier disruption treated with indomethacin and dexamethasone. (a) Recovery of cutaneous barrier disruption. 0.01% PGD<sub>2</sub> (▲), PGE<sub>2</sub> (△), 0.001% IL-1α (■), IL-1β (□) and TNFα (◆) dissolved in ethanol in a volume of 0.1 mL were topically applied 1 day after mechanical scratching treated with 0.1% indomethacin/dexamethasone. Several drugs were then topically applied once daily for 3 days. ●: Mechanical scratching with nonapplication of indomethacin/ dexamethasone group. ◇: Normal skin group. TEWL was measured 24 h after each topical application. Values represent the mean ± S.E.M. from 8 mice. \*P<0.05, \*\*P<0.01 when compared with vehicle (○) (Welch's t-test). (b-e) Localization of IL-1β and IL-1RI at mice skin. IL-1β immunohistochemistry of normal (b) and topical application of indomethacin/dexamethasone (c). IL-1RI immunohistochemistry of normal (d) and topical application of indomethacin/ dexamethasone (e). Scale bar = 50 μm.

### 3. 考察

本章では、機械的搔破皮膚バリア破壊モデルにおいて、サイトカイン産生抑制作用を持つステロイド系抗炎症薬 dexamethasone を用い、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。

ステロイドは、細胞質に存在するグルココルチコイド受容体 (GR) と結合して核内に移動し、遺伝子の転写増強あるいは抑制作用を示す。GR は多くの細胞に存在するため、ステロイドは内皮細胞や繊維芽細胞を含め、皮膚を構成する様々な細胞に多様な作用を及ぼす。作用発現には、GR-ステロイド複合体が染色体上の特異的配列に結合して転写調節を示す (DNA 結合依存的) 機構と、直接 DNA には結合せず近傍の転写因子との相互作用により作用する (DNA 結合非依存的) 機構が存在することが明らかになっている。抗炎症作用の発現は、DNA 結合非依存的に AP-1 (Activator protein 1) や NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) などの転写因子による遺伝子発現を抑制することで、細胞接着分子、サイトカイン及びケモカインなどの産生を抑制するためと考えられている<sup>125-129)</sup>。また、ステロイドは COX-2 遺伝子発現の抑制により PG 産生を抑制し抗炎症作用を示す<sup>130, 131)</sup>。しかし、その広範な薬理作用と GR の発現の普遍性から感染症、皮膚萎縮や毛細血管拡張などの副作用発現が問題となっている<sup>132, 133)</sup>。ステロイド系抗炎症薬 dexamethasone の皮膚バリア修復への影響を検討した結果、dexamethasone 塗布により皮膚バリア修復は遅延し、また indomethacin と dexamethasone の併用塗布では皮膚バリア破壊が悪化した。Dexamethasone 単独塗布は、処置後 1 日目においては indomethacin 単独塗布の TEWL より減少したが、ステロイドは COX-2 遺伝子発現を抑制するが、COX-1 遺伝子には影響を与えないため<sup>130, 131)</sup>、COX-1 より産生された PG (PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub>) が皮膚バリア修復に寄与したのかもしれない。一方、2 日目以降は TEWL の減少が緩やかで indomethacin 単独塗布より TEWL は高値を示した。つまり、皮膚バリア修復過程の初期には PG が主に寄与するが、修復後期には dexamethasone により阻害を受けた PG 以外の因子が関与している可能性を示唆した。Indomethacin により PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> の皮膚バリア修復を阻害した上で、dexamethasone を併用すると皮膚バリア機能は悪化し、病理組織学的観察では潰瘍、炎症性細胞浸潤などの皮膚炎症状の悪化が顕著であり、特に表皮は完全に剥離していた。ステロイド外用剤は、アトピー性皮膚炎を初めとする皮膚炎症に対し有効性が確認されているが、一方でステロイド投与により創傷治癒障害が起きることが報告されている<sup>134)</sup>。本試験では、機械的搔破モデルにおいてステロイド塗布は、皮膚バリア修復を遅延もしくは悪化させることが明らかとなった。

この indomethacin 及び dexamethasone 併用処置による皮膚バリア破壊悪化に対する PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及び TNF $\alpha$  の皮膚バリア修復作用を検討した。PGD<sub>2</sub> 塗布は、処置後 4 日目で溶媒塗布と比較し TEWL を有意に減少させ、PGE<sub>2</sub> 塗布は処置後 4 日目において有意差は認めないが TEWL 減少の傾向が見られた。第 II 部、第 1 章で PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> の皮

皮膚バリア修復促進作用を示したが、indomethacin 及び dexamethasone 併用処置による皮膚バリア破壊悪化に対しても修復作用を示した。本試験では薬物塗布は処置後 1 日目より開始したが、PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> の皮膚バリア修復作用が弱かったのは、塗布開始のタイミングによるものかもしれない。炎症性サイトカインと皮膚バリアの関与については、テープストリッピングや有機溶媒による急性的なバリア破壊処理により、マウスケラチノサイトにおける IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6 等の炎症性サイトカイン mRNA 発現を誘導することが報告されている<sup>55-57</sup>。10%以下の超低湿度環境下において有機溶媒処理を 4 日間連続して実施した場合も、ケラチノサイトの IL-1 $\alpha$  産生増加が起こる<sup>59</sup>。また、IL-1 $\alpha$ <sup>60</sup> 及び TNF $\alpha$ <sup>58</sup> は、ヘアレスマウスを用いたテープストリッピングモデルにおいて、皮膚バリア修復を促進することが報告されている。しかし、本試験では IL-1 $\beta$  塗布は、処置後 3 日目より溶媒塗布と比較し TEWL を有意に減少させたが、IL-1 $\alpha$  及び TNF $\alpha$  塗布は影響を与えなかった。IL-1 $\alpha$  はケラチノサイトの脂質合成を促進する報告<sup>60</sup>があるのに対し、脂質合成は促進せずに角化亢進を惹起し、また keratin 10 及び involucrin 発現を抑制する報告<sup>135</sup>もある。TNF $\alpha$  に関しても、filaggrin 及び loricrin mRNA 発現を抑制する報告がある<sup>136</sup>。IL-1 $\alpha$  及び TNF $\alpha$  の皮膚バリア機能制御に関しては報告の相違もあり、検証は十分に得られていない。

免疫組織化学的手法により、皮膚における IL-1 $\beta$  及び IL-1 受容体タイプ I (IL-1RI) の発現を検討した結果、正常皮膚の表皮において IL-1 $\beta$  及び IL-1RI の発現が観察されたが、indomethacin 及び dexamethasone 併用処置の皮膚では、表皮が殆ど欠落しており、IL-1 $\beta$  及び IL-1RI の発現は顕著に減少していた。Indomethacin 及び dexamethasone 併用処置による皮膚バリア破壊悪化は、表皮において IL-1 $\beta$  及び IL-1RI が減少していたためと考えられた。正常皮膚表皮において IL-1 $\beta$  及び IL-1RI が観察された結果は、マウス皮膚において IL-1 $\beta$  タンパクが構成的に発現していること<sup>137</sup>、IL-1RI がマウスケラチノサイトにおいて発現している<sup>138</sup>との報告と一致していた。IL-1 受容体には、タイプ I (IL-1RI) 及びタイプ II (IL-1RII) の 2 つのサブタイプが存在するが、IL-1RII は細胞内ドメインをほぼ欠損しているためシグナル伝達には関与しない。IL-1 $\beta$  の細胞内シグナル伝達経路は、Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) と同様であり、ミエロイド系分化因子 88 (Myeloid differentiation protein-88 : MyD88) を介してセリン/スレオニンキナーゼである IL-1 受容体関連キナーゼ (IL-1 Receptor associating kinase : IRAK) を活性化し、さらに TRAF-6 (TNF receptor-associated factor-6) を介して炎症反応に関与する NF- $\kappa$ B や MAP キナーゼ等の活性化を引き起こし、転写活性を示す<sup>139</sup>。IL-1 $\beta$  はタイトジャンクションの主要タンパク質である occludin 及び claudin-1 の発現を増加させる報告がある<sup>140</sup>。また、IL-1 $\beta$  は表皮角化細胞において、成長因子 TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) の VII 型コラーゲン遺伝子 (COL7A1) 発現促進作用を増強し、皮膚の構築に寄与するとの報告がある<sup>141</sup>。今後、COL7A1 を含む細胞間脂質代謝や角化細胞接着への影響など、更なる検討が必要とされる。

以上の結果より、機械的搔破による皮膚バリア破壊の修復において、PGD<sub>2</sub> に加え炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  も皮膚バリア修復を促進する生理的役割を持つことを明らかにした。



## 第3章 皮膚バリア修復における COX の関与

PGs (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub>) は, PLA<sub>2</sub> によって膜リン脂質より遊離されたアラキドン酸から COX によって産生される PGH<sub>2</sub> を中間体として, 各 PG の合成酵素により合成される。COX には同様の酵素活性を持ち, 異なる遺伝子に由来する COX-1 及び COX-2 の 2 種 isoform が存在する。COX-1 は殆どの組織で恒常的に発現し, 多くの基本的な生理機能の維持に関わっていると考えられている<sup>142)</sup>。一方, COX-2 はサイトカインや刺激物質に反応して発現が誘導され, 炎症反応などにおいて重要な役割を果たすと考えられている<sup>143)</sup>。COX-1 は構成型, COX-2 は誘導型酵素として生体内 PG 産生に関与し, その PG 産生活性は前者では主に基質であるアラキドン酸量に, 後者は主に酵素遺伝子の発現誘導により調節されると考えられている。構造的には, COX-1 及び COX-2 のアミノ酸配列, 立体構造ともに類似しており, アミノ酸配列での相同性は約 60% である<sup>144, 145)</sup>。

一般的に非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) は, COX-1 及び COX-2 の阻害により PG 産生を抑制することで抗炎症, 鎮痛及び解熱作用を発揮する。これまでに, 多くの COX-1 及び COX-2 阻害剤が開発され, 各々の選択的阻害剤を用いた解析によって COX-1 及び COX-2 の生体内における機能が明らかにされてきた。特に COX-1 選択的阻害剤 SC-560<sup>146)</sup> 及び COX-2 選択的阻害剤 NS-398<sup>147)</sup> は, *in vitro* 及び *in vivo* で明確な COX 選択阻害作用を示すことから, COX 関連の研究に繁用されている。第 II 部, 第 2 章において, NSAIDs が皮膚バリア修復を遅延させ, PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> が皮膚バリア修復に関与することを示したが, これまでに皮膚バリアに関連した皮膚 PG 産生における COX-1 及び COX-2 の関与については殆ど報告されていない。本章では, 機械的搔破モデルの皮膚バリア修復に対する SC-560 及び NS-398 の効果を検討することにより, 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 の関与の解明を目指した。

### 1. 実験方法

#### 1-1 実験動物

実験には, 日本エスエルシー株式会社より購入した 8 週齢の雄性 BALB/c 系マウスを使用した。飼育方法は, 第 I 部, 第 1 章に従って行った。

#### 1-2 機械的搔破による皮膚バリア破壊処置

第 I 部, 第 1 章の方法に従って, ワイヤブラシを用いてマウス背部皮膚を 40~50 回搔破し, TEWL を約 20 g/m<sup>2</sup>/h まで上昇させた。

### 1-3 TEWL の測定

第 I 部, 第 1 章の方法に従って, TEWL 測定装置 (Tewameter TM210, Courage & Khazaka, Germany) を用いてマウス背部の TEWL を測定した。

### 1-4 皮膚 PG 量の測定

皮膚の PG 量は, 第 I 部, 第 1 章の方法に従って, 各 PG に特異的な ELISA kit を用いて測定した。

### 1-5 皮膚重量及び血漿漏出量の測定

機械的搔破 22 時間後に 0.5% Evans blue を静脈内投与し, その 2 時間後に頸椎脱臼にて屠殺したマウス背部皮膚の搔破部位を採取した。採取した皮膚をさらに直径 1 cm に切り抜き皮膚重量を測定し, 血漿漏出量の測定用サンプルとした。皮膚中 Evans blue 量は, 片山らの方法に従って測定した<sup>148)</sup>。つまり, 皮膚サンプルに 1 M KOH を 0.2 mL 添加し, 37°C にて一晩反応させた。その後, 0.2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/acetone (5:13) を 1.8 mL 添加し, 遠心分離 (3,000 rpm, 4°C, 15 分) した。上清を回収し, 波長 620 nm にて Evans blue 濃度を測定した。

### 1-6 皮膚組織における COX-1 及び COX-2 の発現 (Western blotting)

マウス背部皮膚を機械的搔破後, 頸椎脱臼にて屠殺したマウスの背部皮膚を採取し, 以下の方法に従ってタンパク質を抽出し, Western blotting を実施した。

#### (a) 抽出と免疫沈降

採取した皮膚を鋏で切り刻んだ後, ホモジェナイズバッファー [150 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µL Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)] を添加し, polytron tissue homogenizer にて組織を破碎した。組織破碎液を 10,000 rpm, 15 分, 4°C にて遠心分離し, 上清 (総タンパク量: 100 µg) を各々の COX 特異的な抗体と 4°C にて 2 時間反応させた (COX-1 ; Cayman Chemical, COX-2 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。さらに 20 µL Protein G Agarose beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加して 4°C にて一晩反応させた。その後 1,500 rpm, 2 分間遠心分離した。

#### (b) SDS-PAGE と Western blotting

上記沈殿を蒸留水で洗い, Laemmli sample buffer (Bio-Rad Japan) で再懸濁してから 96°C で 5 分間熱処理したものをサンプルとした。SDS-7.5w/v% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い, 泳動終了後, ゲル内のタンパク質を PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA) に転写した。転写後の膜をブロッキング溶液 (0.3% nonfat dried milk/PBST buffer (0.1% Tween-20/PBS)) に浸し, 60 分間室温で振とうした。その後, 一次抗体処置として, ブロッキング溶液で 200 倍に希釈した rabbit anti-rat COX-2 polyclonal antibody (Cayman Chemical) 及び goat anti-human COX-1 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) 溶液中で室温にて 90 分間振とうした。PBST 溶液で膜を 3 回洗浄後, 二次抗体処置として, ブ

ロッキング溶液で 10,000 倍に希釈した horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-(rabbit IgG) (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), または 25,000 倍に希釈した horseradish peroxidase-conjugated swine anti-(goat IgG) (BIOSOURCE, Camarillo, CA) 溶液中で室温にて 60 分間振とうした。その後, PBS 溶液で 3 回洗浄し, Enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) を添加して化学発光した COX-1 及び 2 のバンド画像をスキャナーで取り込み, バンド濃度を定量化した。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH の発現も Western blotting にて確認し, データは GAPDH 発現量に対する比で示した。

#### 1-7 皮膚組織における COX-1 及び COX-2 の発現 (免疫組織化学的解析)

機械的搔破 24 時間後のマウス背部皮膚を採取し, 10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) にて固定後, パラフィンブロック及び切片を作製した。切片を rabbit anti-COX-1 polyclonal antibody (2.5 µg/mL ; 160109 ; Cayman chemical) または goat anti-COX-2 polyclonal antibody (2.5 µg/mL ; sc-1745 ; Santa Cruz Biotechnology) で反応させた後, avidin-biotin peroxidase complex 法により染色標本を作製し, 光学顕微鏡を用いて観察した。二重染色は, 切片を goat anti-COX-1 antibody (5 µg/mL ; sc-1754 ; Santa Cruz Biotechnology) 及び rat anti-F4/80 monoclonal antibody (20 µg/mL ; MCAP497 ; Serotec, Oxford, U.K.) または goat anti-COX-2 polyclonal antibody (1 µg/mL ; sc-1745 ; Santa Cruz Biotechnology) 及び rat anti-Gr-1 monoclonal antibody (10 µg/mL ; 553122 ; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) で反応させた後, Alexa 568 標識または Alexa 488 標識二次抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR) で二重染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### 1-8 薬物

SC-560 は Cayman Chemical より購入し, NS-398 は大正製薬にて合成した。薬物は ethanol に溶解して 0.1% の濃度に調整し, 機械的搔破 10 分前にマウス背部皮膚に 0.2 mL 塗布した。皮膚バリア修復に対する作用では, その後 1 日 1 回 4 日間塗布した。

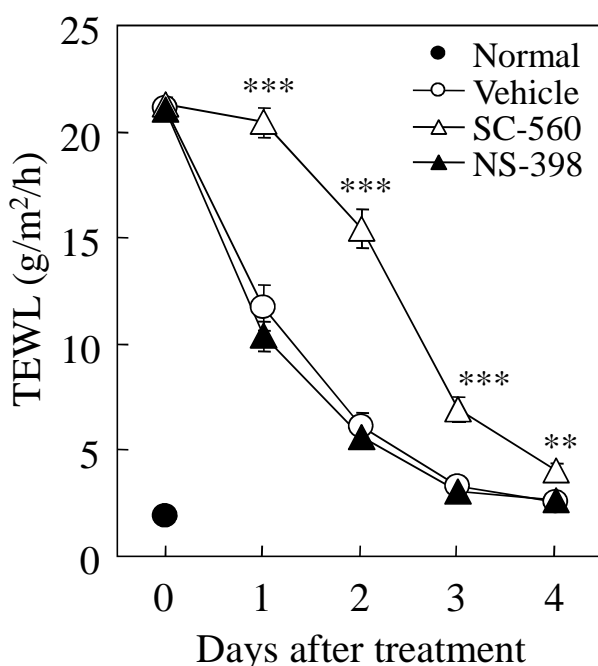
#### 1-9 データ解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。有意差の検定は, 多重比較は Bartlett 検定による等分散性の確認後, 等分散の場合は Dunnett 検定を, 不等分散の場合はさらに F 検定により 2 群間の等分散性を確認し, 等分散の場合は Student の t 検定を, 不等分散の場合は Welch の t 検定を行い, Bonferroni 法により多重性の調整を行った。2 群間比較は, 同様に F 検定後, Student の t 検定または Welch の t 検定を行った。有意水準は 5% とした。

## 2. 実験結果

### 2-1 皮膚バリア修復に対する COX 阻害剤の作用

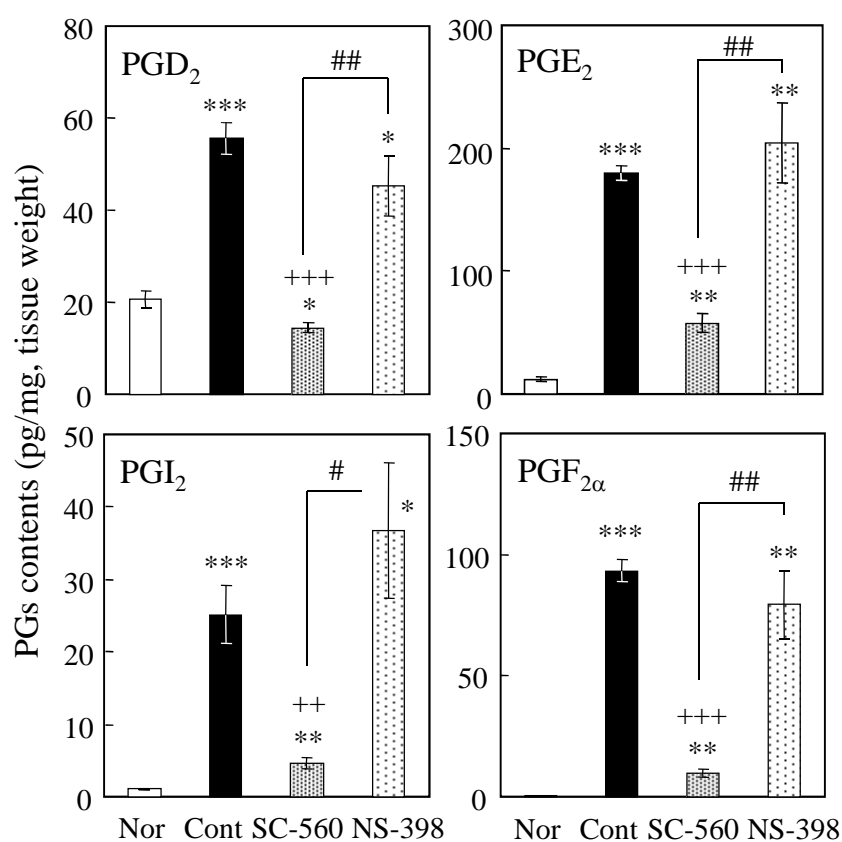
機械的搔破モデルでの皮膚バリア修復における COX-1 及び COX-2 の関与を調べるために、COX-1 選択的阻害剤である SC-560 (0.1%) 及び COX-2 選択的阻害剤である NS-398 (0.1%) を 1 日 1 回 0.2 mL 塗布し、翌日からの TEWL の経日変化を測定した。SC-560 塗布群は、溶媒塗布群と比較し全ての測定日において有意に TEWL 値が高く、皮膚バリア修復の遅延が観察された。一方、NS-398 塗布群は、溶媒塗布群と比較し有意な差は観察されなかった (Fig. 15)。



**Fig. 15 Effect of SC-560 (COX-1-selective inhibitor) and NS-398 (COX-2-selective inhibitor) on recovery of the cutaneous barrier.** Mice were subjected to cutaneous barrier disruption by mechanical scratching about 50 times. A 0.2 mL of SC-560 0.1% (△) or NS-398 0.1% (▲) was then topically applied 10 min prior to the mechanical scratching and once a day for 4 days. TEWL was measured at 24 h after each topical application. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 8 mice. Normal represents the value of mice given no treatment (●). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when compared with vehicle (○) (Student's t-test).

## 2-2 皮膚バリア破壊時の皮膚 PG 量に対する COX 阻害剤の作用

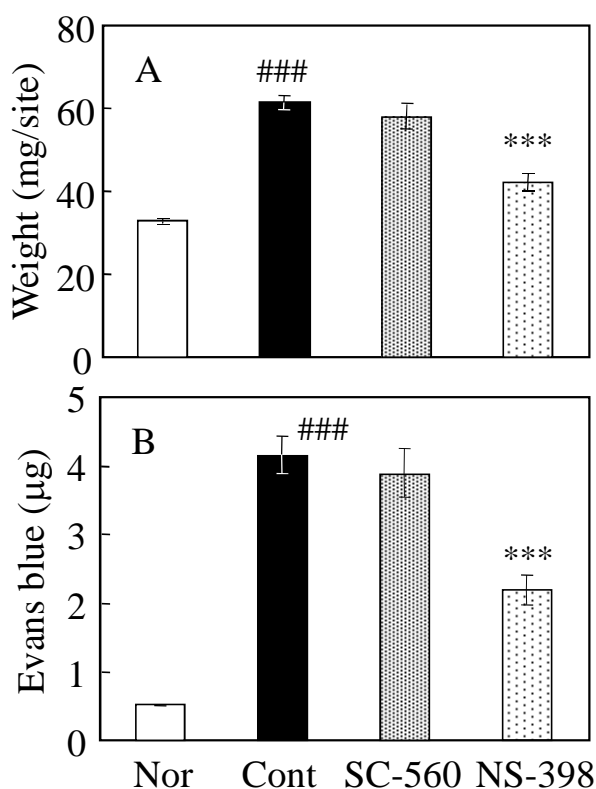
SC-560 及び NS-398 の皮膚 PG 量への作用を検討するため、マウスの背部に 0.1% SC-560 及び 0.1% NS-398 を 0.2 mL 塗布し、機械的搔破処置 24 時間後の皮膚 PG 量を測定した。機械的搔破 (Cont) 群は、正常 (Nor) 群と比較し全ての皮膚 PG において有意に増加した。また、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 量の増加率は PGD<sub>2</sub> 量と比較して顕著であった。SC-560 塗布は、Cont 群と比較し全ての皮膚 PG 量を有意に減少させ、さらに Nor 群との比較においては、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 量は有意に高値を示したが、PGD<sub>2</sub> 量のみにおいて有意に減少していた。一方 NS-398 塗布は、Cont 群と比較し全ての PG で有意差は認めず、SC-560 との比較においては全ての PG において有意に高値を示した (Fig. 16)。



**Fig. 16 Effects of topical application of SC-560 and NS-398 on the PGs contents in the mouse skin at 24 h after mechanical scratching.** A 0.2 mL of SC-560 0.1% or NS-398 0.1% was topically applied 10 min prior to the mechanical scratching. Twenty-four hours later, skin specimens were taken and the PGs (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub>) contents were measured using an enzyme immunoassay kit as described in Materials and Methods. Values represent the mean ± S.E.M. from 6 mice. Nor and Cont represent the values of mice given no treatment and vehicle treatment, respectively. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared with Nor mice. ++P<0.01, +++P<0.001 when compared with Cont mice (Student's t-test or Welch's t-test). #P<0.05, ##P<0.01, SC-560 vs. NS-398 (Welch's t-test).

### 2-3 皮膚バリア破壊時の皮膚炎症に対する COX 阻害剤の作用

SC-560 及び NS-398 の皮膚炎症への作用を検討するため、マウスの背部に 0.1% SC-560 及び 0.1% NS-398 を 0.2 mL 塗布し、機械的搔破処置 24 時間後の浮腫及び血漿漏出量を測定した。浮腫や血漿漏出などの炎症反応は、COX-2 活性により惹起させると報告させている<sup>149, 150</sup>。機械的搔破処置 (Cont) 群は有意に皮膚重量及び血漿漏出量を増加させた。NS-398 塗布は、Cont 群と比較して皮膚重量及び血漿漏出量を有意に減少させたが、SC-560 塗布では有意差は認められなかった (Fig. 17)。これらの結果から、NS-398 塗布は機械的搔破 24 時間後の皮膚において COX-2 由来の炎症反応を抑制したことが明らかとなった。

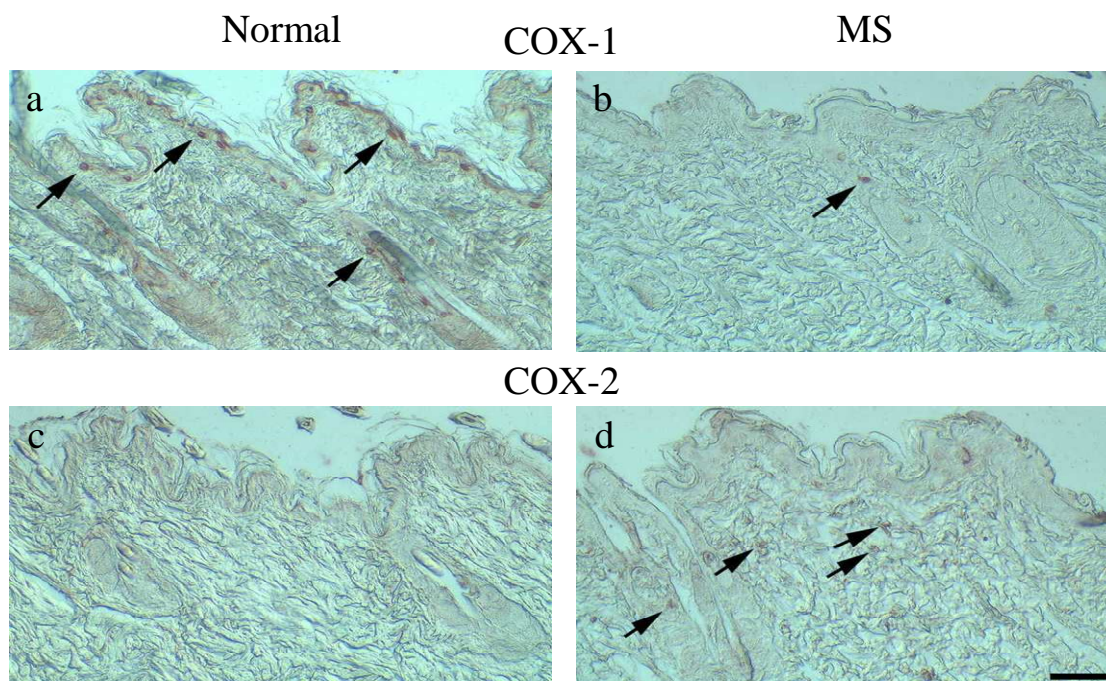


**Fig. 17 Effects of topical application of SC-560 and NS-398 on mechanical scratching-induced oedema and plasma extravasation.** A 0.2 mL of SC-560 0.1% or NS-398 0.1% was topically applied 10 min prior to the mechanical scratching. Tissue weight (A) and plasma extravasation (B) were measured at 24 h after the mechanical scratching as described in Materials and Methods. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 mice. Nor and Cont represent the values of mice given no treatment and vehicle treatment, respectively. ###P<0.001, Nor vs. Cont. \*\*\*P<0.001 when compared with Cont (Student's t-test).

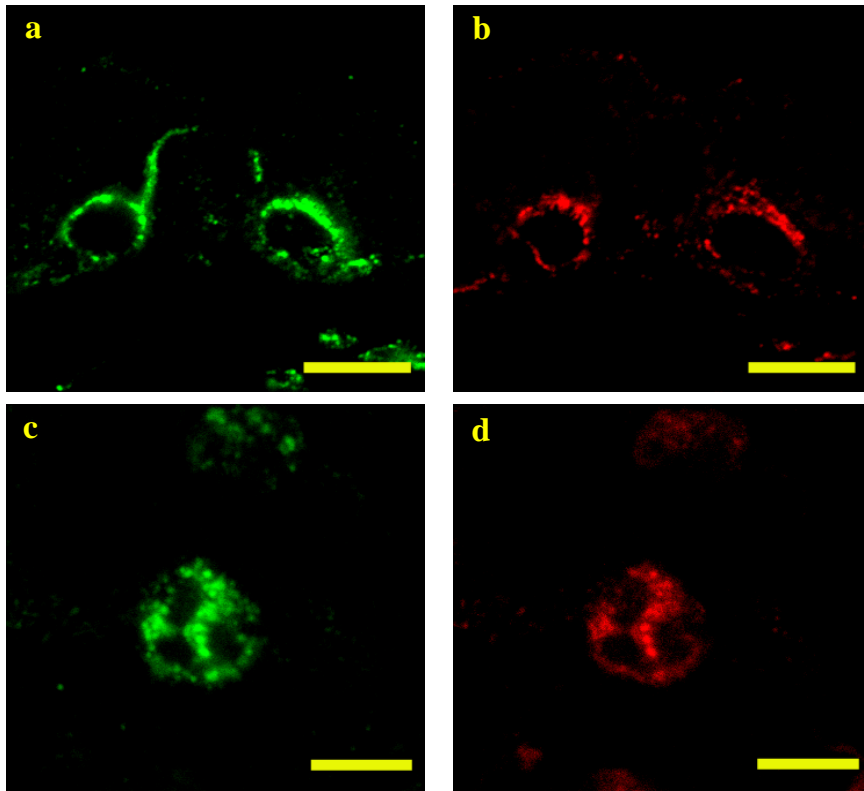
#### 2-4 機械的搔破モデルにおける COX-1 及び COX-2 発現 (免疫組織学的解析)

機械的搔破 24 時間後の皮膚 COX-1 及び COX-2 発現を免疫組織学的に検討した。正常皮膚において、COX-1 陽性細胞は表皮基底層に発現していた (Fig. 18a)。機械的搔破モデル皮膚において、COX-1 陽性細胞は減少していた (Fig. 18b)。一方、COX-2 陽性細胞は正常皮膚 (Fig. 18d) では発現していなかったが (Fig. 18c)、機械的搔破モデル皮膚では真皮において発現が増加していた (Fig. 18d)。

これらの COX 陽性細胞がどの細胞に発現しているか明らかとするため、各 COX 抗体と特異的細胞マーカーとの二重染色を行った。正常皮膚において、COX-1 陽性細胞 (Fig. 19b) と F4/80 抗原 (Fig. 19a) は同じ表皮中の細胞上に発現が認められ、細胞の形状よりランゲルハンス細胞であった。一方、機械的搔破モデル皮膚において、COX-2 陽性細胞 (Fig. 19d) と Gr-1 抗原 (Fig. 19c) は同じ真皮中の細胞上に発現が認められ、細胞の形状より好中球であった。



**Fig. 18 Immunohistochemical localization of COX-1 and COX-2 in mouse skin.** Twenty-four hours after mechanical scratching (MS), the COX-1 expression in the epidermis and basal layer of the follicle (b, arrow) was assessed in comparison with that in normal skin (a, arrows). COX-2 expression in the dermis in mechanically scratched skin (d, arrows) in comparison with that in normal skin (c). Scale bar = 100  $\mu$ m.

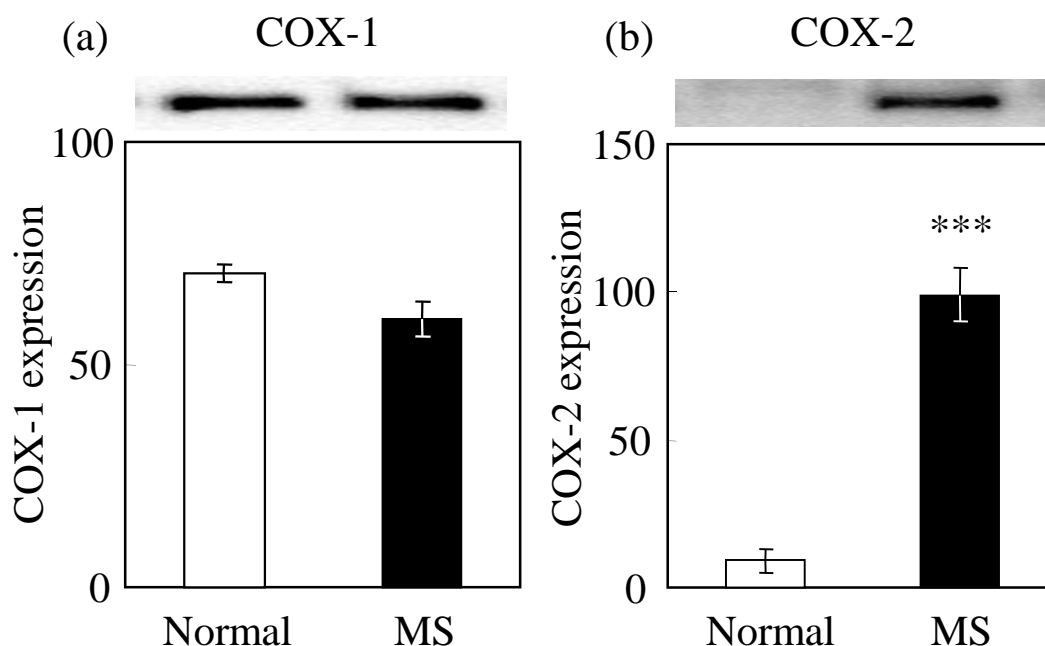


**Fig. 19** Double immunostaining for COXs and specific cell marker antigens. COX-1 (b, red) and F4/80 antigen (a, green) were positively stained in the same cells in the epidermis of normal skin, and COX-2 (d, red) and Gr-1 antigen (c, green) were positively stained in the same cells in the dermis of mechanically scratched skin, respectively. Scale bar = 7.5  $\mu\text{m}$  (a, b) and 5  $\mu\text{m}$  (c, d).



## 2-5 機械的搔破モデルにおける COX-1 及び COX-2 タンパク発現 (Western blotting 解析)

機械的搔破 24 時間後の皮膚 COX-1 及び COX-2 タンパク発現を Western blotting にて検討した。COX-1 は正常皮膚において構成的に発現しており、その発現は機械的搔破後において殆ど変動しなかった。一方、COX-2 は正常皮膚において殆ど発現せず、機械的搔破後において有意に増加した (Fig. 20)。



**Fig. 20** Western blotting analysis of COX protein expression in the skin at 24 h after mechanical scratching. Protein lysate from the skin tissue of mechanically scratched mice (MS) was prepared, and Western blotting was performed as described in Materials and methods. Visualized COX-1 (a) and COX-2 (b) bands were scanned and quantified. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of the results from 3 mice. \*\*\* $P < 0.001$  Normal vs. MS (Student's t-test).

## 3. 考察

本章では、機械的搔破モデルの皮膚バリア修復に対する COX-1 選択的阻害剤 SC-560 及び COX-2 選択的阻害剤 NS-398 の効果を検討することにより、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。機械的搔破モデルに対し、SC-560 塗布は皮膚バリア修復を遅延させたが、NS-398 は影響を与えなかった。従って、第 II 部、第 1 章で観察された indomethacin 処置による皮膚バリア修復遅延は、COX-1 阻害作用によることが示唆された。

機械的搔破後の皮膚 COX-1 及び COX-2 発現は、COX-1 が機械的搔破に拘わらず恒常的

な発現を示し、COX-2 が搔破 1 時間後より mRNA 発現を、3 時間後からタンパク発現を示し、24 時間後に最も強く発現する<sup>151)</sup>。皮膚バリア破壊 24 時間後の皮膚 PG 量に対する COX 阻害剤の作用検討において、SC-560 塗布は全ての PG 量を有意に抑制し、さらに PGD<sub>2</sub> 量については正常皮膚より低値を示した。一方、NS-398 塗布は皮膚 PG 量に殆ど影響を与えなかった。これまでに、aspirin を前処置し機械的搔破後の皮膚 PG 産生能を検討した結果、PGD<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 産生能は機械的搔破 6 時間後で増加しないが、PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> 産生能は 6 時間後で有意な増加を示すことを明らかにしている<sup>151)</sup>。Aspirin は代表的な NSAIDs の一つで、COX の活性部位である 530 番目のセリンをアセチル化することで非可逆的な阻害作用を示す<sup>152-154)</sup>。また、aspirin の血中半減期は 15 分であり、血中の aspirin は速やかに PG 産生阻害作用のないサリチル酸に代謝される<sup>155, 156)</sup>。このことから、aspirin は投与時に存在する COX を不活性化するが、その後新たに合成される COX の活性は阻害しないと想定される<sup>157)</sup>。正常皮膚では COX-1 のみ発現すること、aspirin による COX-1 不活性化は 6 時間まで持続すること<sup>151)</sup>から、機械的搔破 6 時間後では、COX-1 に加えて搔破前には発現していなかった COX-2 が発現しており、PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> 産生能の増加は aspirin 投与後に発現した COX-2 に起因した現象と考えられる。一方、機械的搔破モデルにおいて、PGD<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> は COX-1 を介して産生されることを示唆している。これらの結果と、第 II 編、第 1 章において、PGD<sub>2</sub> が皮膚バリア修復作用を示すことを併せると、SC-560 の皮膚バリア修復遅延作用は、COX-1 阻害による PGD<sub>2</sub> 産生抑制が原因であることが明らかとなった。つまり、COX-1 より産生される PGD<sub>2</sub> は皮膚バリアを修復する生理的役割を持つことが示唆された。

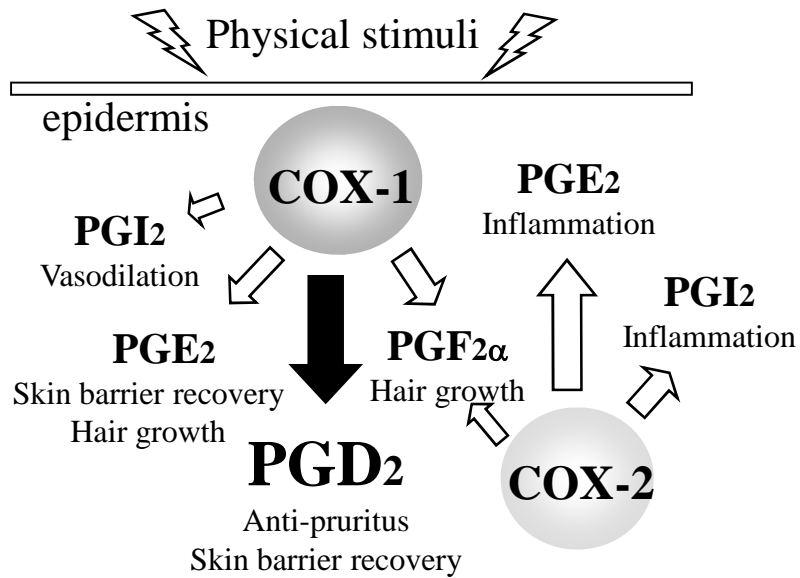
一方で、機械的搔破 24 時間後における皮膚 PG 量に対し、NS-398 塗布の効果は弱かった。免疫組織化学的解析及び Western blotting 解析において、機械的搔破 24 時間後の皮膚では COX-2 の発現を観察している。皮膚 PG 量への NS-398 塗布による効果の報告は殆ど無いため、COX-2 由来の炎症に対する NS-398 塗布の抑制効果を検証するため、機械的搔破により惹起される浮腫及び血漿漏出への NS-398 塗布の効果を検討した。浮腫や血漿漏出などの炎症反応は COX-2 により惹起され<sup>149, 150)</sup>、NS-398 の抗炎症作用については、carrageenin 誘発炎症モデルに対する作用<sup>147)</sup>等いくつか報告されている。本試験において、NS-398 塗布は機械的搔破誘発の炎症反応を抑制したが、SC-560 塗布は作用を認めなかった。これらを併せて考えると、NS-398 塗布は機械的搔破 24 時間後の皮膚 PG 産生を抑制することにより、COX-2 由来の炎症反応を抑制することを示唆している。今回、NS-398 は皮膚 PG 産生量に殆ど影響を与えなかったが、機械的搔破モデルにおいて COX-2 活性により産生させる皮膚 PG 量は極めて少ないが、十分な炎症反応を惹起させたのかもしれない。以上の結果より、皮膚バリア修復に関与する COX と機械的搔破誘発の炎症反応に関与する COX は異なることが明らかになった。

次に、機械的搔破モデルでの COX-1 及び COX-2 発現場所について免疫組織学的解析を行った。COX-1 陽性細胞は正常皮膚の表皮基底層に主に発現しており、これらの細胞はラ

ンゲルハンス細胞と同定され、これまでの報告と一致していた<sup>158)</sup>。機械的搔破モデルの皮膚において COX-1 陽性細胞は減少していたが、Western blotting 解析において 24 時間後の COX-1 タンパク発現量は殆ど変化がなかった。表皮基底層の COX-1 発現量は減少していたが、表皮及び真皮全体の発現量では殆ど変化がなかったのかもしれない。COX-2 陽性細胞は正常皮膚では殆ど発現しておらず、機械的搔破モデルの真皮中の好中球浸潤細胞に発現していた。マウス正常皮膚では COX-2 mRNA 及びタンパクは殆ど発現しておらず<sup>159, 160)</sup>、皮膚障害の 5 時間後に真皮中の好中球浸潤細胞に発現が認められる報告があり<sup>161)</sup>、今回の結果と一致していた。Western blotting 解析による COX 発現では、COX-1 は機械的搔破に関わらず定常的に発現しており、COX-2 は正常皮膚では発現していないが、機械的搔破により誘導された。これらの結果より、機械的搔破直後の皮膚 PG 産生には、COX-1 が主に関与し、その後の産生増加には COX-1 及び COX-2 の両酵素が関与すると考えられた。また、皮膚バリア修復及び炎症に関与する COX のタイプの違いは、COX の発現場所と関係があるのかもしれない。つまり、表皮中に発現する COX-1 は皮膚バリア修復に関与し、真皮中に発現する COX-2 は炎症に関与する。

以上のことより推察される、皮膚における PG 産生と COX の関与について Fig. 21 に示した。正常皮膚では、COX-1 により産生される PG が、血管拡張<sup>108, 162)</sup>、毛周期<sup>106, 107)</sup>、ケラチノサイトの分化<sup>105)</sup>などの皮膚恒常性の維持に関与している。アトピー性皮膚炎患者の搔破行動のような皮膚障害を引き起こす物理刺激は、PLA<sub>2</sub> の活性化、膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を介し、COX-1 により多量の PG (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub>) を産生する。これらの PG の中でも、特に PGD<sub>2</sub> は搔痒抑制及び皮膚バリア修復作用を持ち、過度の物理刺激から皮膚を守るため、また皮膚修復を促進するためのフィードバック調節において重要な役割を担っているのかもしれない。物理刺激により真皮中に誘導された COX-2 からは、炎症反応<sup>100-104)</sup>に関与する PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> が産生される。炎症反応は生体防御機構として惹起されることから、PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> もまた過度の物理刺激から皮膚を守るフィードバック調節機構として働いているのかもしれない。

以上、本章での検討より、COX-1 より産生される PGD<sub>2</sub> が皮膚バリア修復に関与し、COX-2 により産生される PG (PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub>) が皮膚炎症に関与していることが示唆された。



**Fig. 21 Putative role of COX-1 and COX-2 on physical stimuli-induced cutaneous PGs production in mice.** COX-1 is constitutively expressed and generally plays a housekeeping role to maintain the homeostasis such as vasodilation and hair growth. COX-1 activated by physical damage produces PGs, having effects of antipruritus and skin barrier recovery. A few hours later, physical damage induces expression of COX-2 in the dermis, producing PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub>, which mediate inflammatory reactions.

## 第4章 皮膚への siRNA 導入による COX-1 ノックダウン法の確立

siRNA (small interfering RNA) は 21-23 塩基対から成る低分子二本鎖 RNA であり, siRNA を用いた RNA interference (RNAi) は配列特異的に遺伝子発現を抑制する方法として利用されている<sup>163,164</sup>。siRNA は RNA-inducing silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体により細胞質に取り込まれ, 標的の mRNA に結合しタンパク質の翻訳を抑制する。現在, siRNA を用いた RNAi は *in vitro* 試験ではすでに標準化された方法であり, 今後は臨床への応用も期待されている。エレクトロポレーションは電気パルスをかけることで細胞膜に微小な穴を開け, DNA を細胞内部へ送り込み, 形質転換することができる方法である。皮膚は容易に接触できるため, 遺伝子導入を行うのに魅力的な部位であり, そのため *in vivo* においてエレクトロポレーションによる皮膚を標的とした遺伝子導入法は普及してきている<sup>165</sup>。皮膚へのエレクトロポレーションは条件によって皮膚障害を引き起こすが, 近年, 新種の電極を用いて繰り返し電気パルスをかける手法は, 皮膚障害を軽度抑え皮膚へ遺伝子を導入できることが報告されている<sup>166</sup>。

本章では, 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った。さらに, このモデルを用い皮膚 COX-1 ノックダウンによる皮膚 PG への影響を検討することにより, 前章に続き皮膚 PG 産生における COX の関与の解明を目指した。

### 1. 実験方法

#### 1-1 実験動物

実験には, 日本エスエルシー株式会社より購入した 7 週齢の雄性 SPF NC/Nga マウスを使用した。飼育方法は, 第 I 部, 第 1 章に従って行った。

#### 1-2 プラスミドレポーター遺伝子及び siRNA の導入

Diethylether 麻酔下で, 除毛したマウス吻側背部皮膚にケラチンクリーム (フクダ電子) を塗布し, 同部位に電極 (直径 1 cm, NepaGene) を設置した。次に, TE buffer 50  $\mu$ L に溶解させた CMV- $\beta$ -gal plasmid (50  $\mu$ g, Invitrogen, Carlsbad, CA) または SV40-Luc2 plasmid (50  $\mu$ g, pGL4.13, Promega, Madison, WI) をマウスに皮内投与し, 電子パルス発生器 (CUY21, NepaGene) を用いて, パルス長 100 ms, 67~200 V/cm, 4 矩形波パルスの条件でエレクトロポレーションを行った。24 時間後, 全皮膚中の  $\beta$ -gal 活性を chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (Stratagene, Santa Clara, CA) を用い波長 590 nm で測定し, 値は  $\beta$ -gal 活性/皮膚重量 40 mg に補正した。また, 組織学的  $\beta$ -gal 発現は皮膚切片を作製後, X-gal

(Stratagene) と一晩反応させ電子顕微鏡下で観察した。脳, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 骨格筋, 導入部位 (吻側背部) の皮膚及び非導入部位 (尾側背部) の皮膚中 luciferase 活性は, luciferase assay kit (Promega) と Wallac 1420 Multilabel counter (PerkinElmer, Waltham, MA) を用い測定した。siRNA 導入は, siRNA (12.5  $\mu\text{g}$  = 1.0 nmol, siGENOME SMARTpool ant ON-TARGETplus, Dharmacon, Chicago, IL) を含む 50  $\mu\text{L}$  siPORT Amine (Ambion, Austin, TX) を皮膚に注入し, 最適な条件でエレクトロポレーションを行った。陰性対照として, non-silence scrambled-control RNA (Dharmacon) を使用した。

### 1-3 皮膚における COX-1 の発現 (Western blotting)

Western-blot 解析は, 第 II 部, 第 3 章の方法に従って行った。

### 1-4 皮膚における COX-1 の発現 (免疫組織化学的解析)

免疫組織化学的解析は, 第 II 部, 第 3 章の方法に従って行った。COX-1 強度の測定は, 倍率 200 倍にて表皮の 5 箇所/マウス ( $n = 4$ ) をランダムに選び, IPLab Spectrum (Scanalytics, Fairfax, VA, USA) を用いて表皮中の COX-1 免疫活性面積として算出した。

### 1-5 皮膚 PG 量の測定

皮膚 PG 量は, 第 II 部, 第 1 章の方法に従って, 各 PG に特異的な ELISA kit を用いて測定した。

### 1-6 データ解析

データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。有意差の検定には, F 検定により 2 群間の等分散性を確認し, 等分散の場合は Student の t 検定を, 不等分散の場合は Welch の t 検定を行った。有意水準は 5% とした。

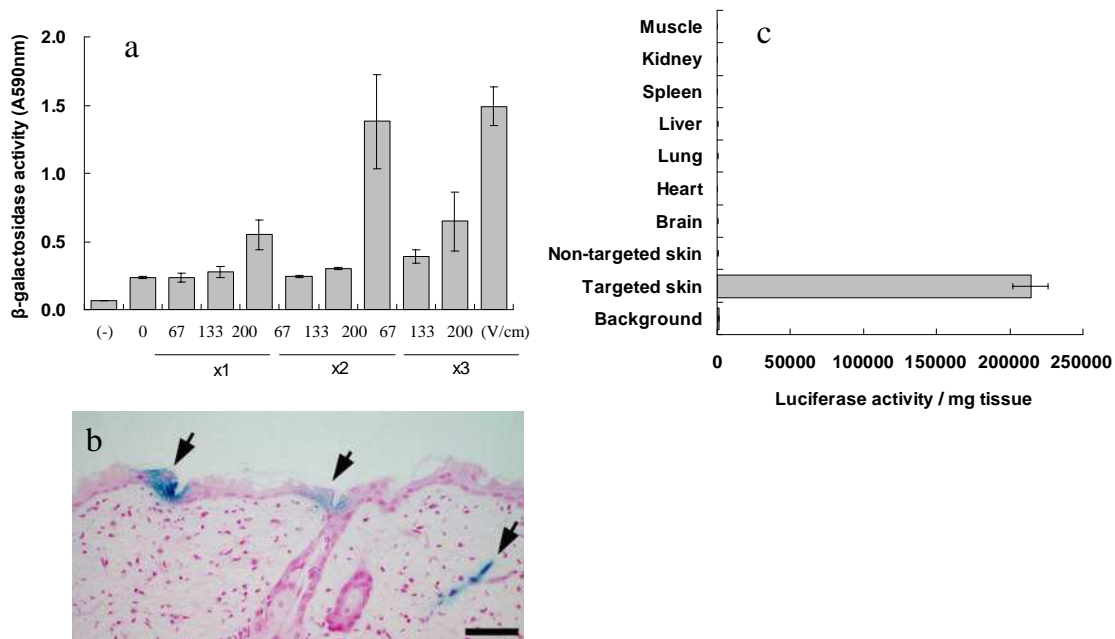
## 2. 実験結果

### 2-1 皮膚へのプラスミド DNA 導入の条件検討

初めに、皮膚組織へプラスミド DNA (pDNA) を導入する条件を検討した。β-gal 遺伝子を含むプラスミドベクターを注入後、数種の回数と電圧でエレクトロポレーションを行った。Fig. 22a では導入 24 時間後の皮膚中 β-gal 活性を示した。回数、電圧依存的に β-gal 活性は増加し、電圧 200 V/cm の 2 回または 3 回の電気刺激の条件において、皮膚障害が軽度で β-gal 活性が最も発現していた。しかし、naked-DNA (0 V) のみの注入では β-gal 活性の増加は認められなかった。200 V/cm, 0.10~0.15 A の電流値 (200 V/cm, 2 回の条件で、非電気刺激と比較し 7.6 倍遺伝子発現が増加する電流値) を得るためには、ケラチンクリームの適度な量と抵抗値を 0.7~0.8 Ω に合わせる必要があった。また、200 V/cm 以上の電圧または 0.20 A 以上の電流では、明らかな皮膚障害を起こした。

次に、皮膚における β-gal 発現を X-gal 染色により組織学的に解析した。正常表皮及びプラスミド注入のみの表皮では β-gal 発現は認められず、最適条件下 (200 V/cm, 0.10~0.15 A, 2 回) でエレクトロポレーションした表皮において β-gal 発現が認められた (Fig. 22b)。また、真皮において β-gal 発現は認められなかったが、毛包の一部 (Fig. 22b) 及び皮下筋層の一部 (data not shown) で発現が認められた。ケラチノサイトやランゲルハンス細胞等の表皮の構成細胞は遺伝子導入の最良な標的になると考えられた。

次に、プラスミドの皮内投与での発現部位が標的部位に限局するのか全身性に発現するか確認するため、luciferase 活性を指標に検討した。一部の臓器では β-gal のバックグラウンド活性が高いため、luciferase 活性は β-gal 活性の代わりに利用される。Luciferase レポーター遺伝子発現は注入部位皮膚に限局して発現し、非注入部位皮膚を含む他の臓器では発現は認められなかった (Fig. 22c)。

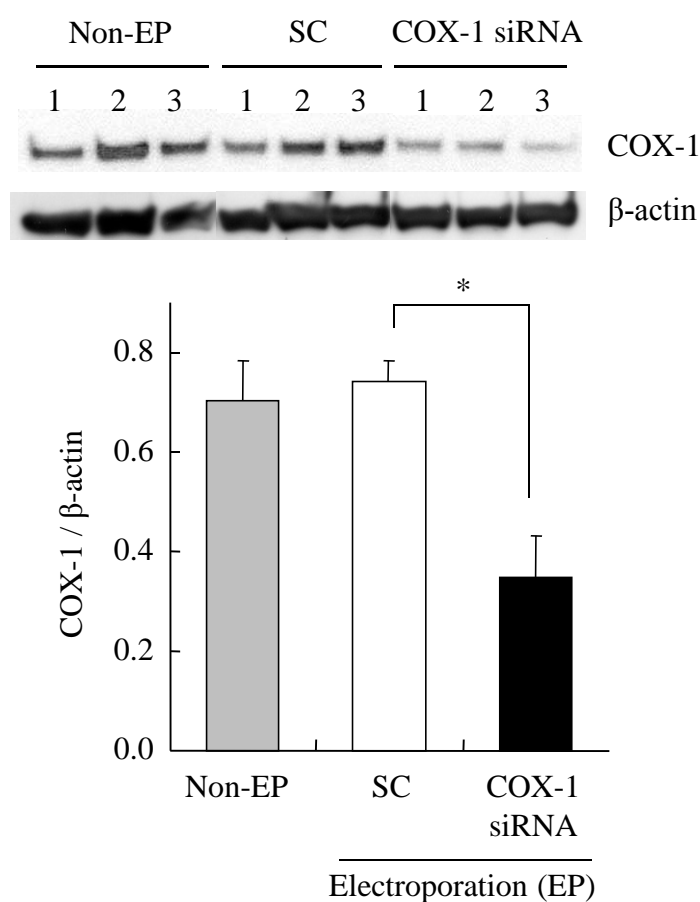


**Fig. 22 Electroporation-assisted transfection of an exogenous gene into the normal skin.** (a) Pulse- number- and voltage-dependent expression of  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) gene in the skin after intradermal injection of a plasmid coding for  $\beta$ -gal. Whole upper back skin tissues at the injected site were collected 24 h after the *in vivo* plasmid electro-transfection and assayed  $\beta$ -gal activity using chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) as the substrate. Optimum activity was obtained with double set pulses at 200 V/cm. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 3 mice. (b) Localization of  $\beta$ -gal expression in the skin tissue after injection of the CMV- $\beta$ -gal pDNA. Skin tissues at the injected site were collected 24 h after electroporation, and X-gal staining followed by histological analysis were performed. When the optimized pulse conditions (double set pulses at 200 V/cm and 0.10-0.15 A) were applied, dotted  $\beta$ -gal expression became evident in the epidermis and some parts of the hair follicles (arrows). Scale bar = 50  $\mu$ m. (c) Luciferase expression in major organs after the intradermal injection of pDNA via electroporation. For the luciferase enzyme assay, brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, the muscle under the injected site, the upper back skin of the injected site, and the lower back skin of the non-injected site were harvested 24 h after injection from mice treated SV40-Luc2. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from 3 mice.



## 2-2 皮膚への COX-1 siRNA 導入によるノックダウン (Western blotting 解析)

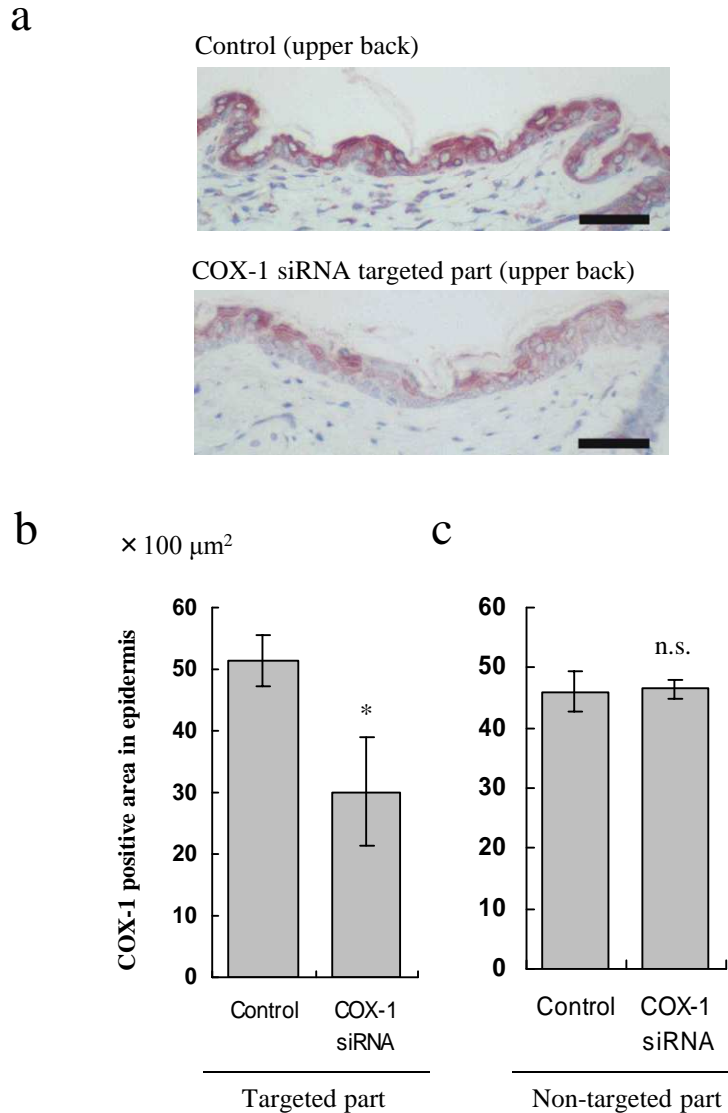
siRNA は pDNA よりサイズが小さく、また核内に導入する必要のあるプラスミド DNA と比較し局在する場所は細胞質であるため、siRNA の導入は pDNA の導入より理論的に容易と考えられる。そこで、前述のエレクトロポレーション手法を用い皮膚への siRNA 導入による COX-1 ノックダウンを試みた。COX-1 siRNA 導入後 4 日目において、皮膚中 COX-1 タンパク発現は正常皮膚と比較して有意に抑制された (Fig. 23)。陰性対照である non-silence scrambled-control RNA の導入では影響が見られなかった。なお、COX-2 は正常皮膚及び siRNA 導入皮膚において、共に僅かながら発現していた (data not shown)。



**Fig. 23 siRNA-mediated silencing of COX-1 expression in the skin.** COX-1 expression was suppressed in the skin NC/Nga mice. COX-1-specific siRNA was transfected under optimized conditions of electroporation. Total homogenates were extracted from the skin tissue on day 4 after the electroporation and subjected to Western blotting. The COX-1/ $\beta$ -actin density ratio was quantitatively evaluated and represented as the mean  $\pm$  S.E.M. from 3 mice. \* $P < 0.05$  when compared with non-silencing scrambled-control (SC) RNA-transfected skin (Student's t-test).

### 2-3 皮膚への COX-1 siRNA 導入によるノックダウン (免疫組織化学的解析)

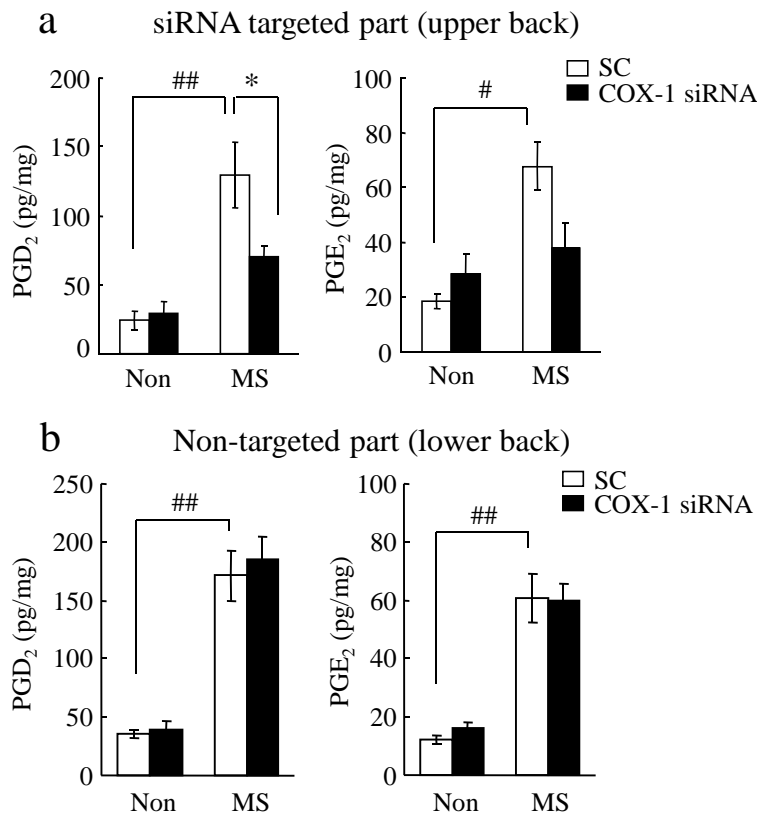
皮膚への COX-1 siRNA 導入による COX-1 ノックダウンについて免疫組織化学的に解析した (Fig. 24a)。COX-1 siRNA 導入後 4 日目において, 導入部位表皮での COX-1 発現は正常皮膚と比較して有意に抑制された (Fig. 24b)。COX-1 siRNA 非導入部位表皮では正常皮膚と比較して, COX-1 発現に変化は見られなかった (Fig. 24c)。



**Fig. 24 siRNA-mediated silencing of COX-1 expression in the skin tissue.** The localization of COX-1 expression was immunohistochemically analyzed. (a) Endogenous COX-1 expression in the epidermal area was obviously silenced in the COX-1 siRNA-targeted part of skin after 4 days of electroporation. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (b, c) COX-1 positive area in the epidermis were quantitatively evaluated and represented as the mean  $\pm$  S.E.M. from 4 mice. \* $P < 0.05$  when compared with scrambled-control RNA-transfected skin (Student's t-test).

## 2-4 皮膚 COX-1 ノックダウンによる皮膚 PG 産生への影響

COX-1 siRNA 導入による皮膚 PG 産生能への影響について検討した。皮膚 PG 産生能は、siRNA 導入部位への機械的搔破 10 回刺激で評価を行った。機械的搔破は皮膚 PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 量を有意に増加させた (Fig. 25a)。一方、皮膚 PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 量では高値を示したが有意差は認められず、産生量は 10 pg/mL 以下であった (data not shown)。Non-silence scrambled-control RNA (SC) 群の PGD<sub>2</sub> は、非搔破群において 24.2 ± 6.6 pg/mL であり、機械的搔破により 129.5 ± 23.7 pg/mL と有意な増加を認めたが、COX-1 siRNA 群の機械的搔破では 70.4 ± 7.8 pg/mL であり、有意な減少が認められた。一方、PGE<sub>2</sub> は PGD<sub>2</sub> と同様な傾向を示したが、SC 群と COX-1 siRNA 群での機械的搔破による産生量の比較において有意差は認められなかった。また、COX-1 siRNA 非導入部皮膚において同様に皮膚 PG 産生能を比較したが、SC 群と COX-1 siRNA 群で影響は見られなかった (Fig. 25b)。



**Fig. 25 siRNA-mediated silencing of PG production in the skin.** PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> contents in the skin tissue homogenate were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (a) The PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> contents were elevated after mechanical scratching (MS), and the enhanced PG contents were reduced by COX-1 siRNA transfection at the targeted part of electroporation. (b) No reductions were detected in non-targeted skin. Values represent the mean ± S.E.M. from 6 mice. #P<0.05, ##P<0.01 when compared with the non-MS control (Non). \*P<0.05 when compared with non-silencing scrambled-control RNA transfected (SC) (Student's t-test).

### 3. 考察

本章では、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、さらに同モデルを用いて皮膚 COX-1 ノックダウンによる皮膚 PG への影響を検討し、皮膚 PG 産生における COX の関与を検討した。

初めに、皮膚障害が軽度で  $\beta$ -gal 活性が最も発現する pDNA を導入するエレクトロポレーション条件を検討し、その最適条件下のエレクトロポレーションで COX-1 siRNA 導入を行った。皮膚への COX-1 siRNA 導入を行った結果、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ることが明らかになった。これらの結果は、皮膚への COX-1 siRNA 導入により表皮内の COX-1 をノックダウンしたことを示唆する。RNAi は、配列特異的に遺伝子発現を抑制する方法であり、様々な遺伝的疾患の治療戦略として期待されている<sup>163, 164</sup>。近年、*in vivo*での siRNA の標的化遺伝子導入法が多数報告されており、その手段としてリポソーム製剤 (stable nucleic acid lipid particles ; SNALP)<sup>167</sup>、ナノ粒子<sup>168</sup>、カチオン性ペプチド<sup>169</sup>、コレステロール<sup>170</sup>、プロタミン抗体融合タンパク質<sup>171</sup>、アテロコラーゲン<sup>172</sup>、アプタマー-siRNA キメラ<sup>173</sup>等がある。一方、エレクトロポレーションも組織内に siRNA を導入するのに適した手法である<sup>174</sup>。近年、*in vivo*エレクトロポレーション法を用い、未修飾 siRNA をマウス関節腔<sup>175</sup>や脳<sup>176</sup>に導入した例が報告されている。しかし、体部皮膚への siRNA 導入によるノックダウンについては報告がない。今回、エレクトロポレーションを用いた皮膚への siRNA 導入によるノックダウンは初めての成功例となった。

この COX-1 ノックダウンモデルを用い、皮膚 COX-1 ノックダウンによる皮膚 PG への影響を検討し、皮膚 PG 産生における COX の関与を検討した。機械的搔破 10 回刺激による皮膚 PG 産生量を測定した結果、COX-1 ノックダウン群の PGD<sub>2</sub> 量は対照群と比較し有意に減少していた。PGE<sub>2</sub> 量は対照群より低値を示したが、有意差は認められなかった。一方、PGL<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  量では機械的搔破による有意な産生増加は認められなかった。NC/Nga マウス皮膚は、BALB/c マウスより少ない機械的搔破回数で TEWL 値が上昇する (data not shown)。また、エレクトロポレーションにより僅かではあるが皮膚バリアは障害を受けているため機械的搔破 10 回刺激を選択したが、弱い刺激のため元々内因性産生量が少ない PGL<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  は有意な増加認められなかったと考える。以上の結果から、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、PGD<sub>2</sub> が主体であることが示唆された。また、COX-1 ノックアウトマウスを用いた皮膚 PG 産生の検討において、PGD<sub>2</sub> 産生のみが野生型マウスより有意に低下することを確認している<sup>151</sup>。第 II 部、第 3 章の結果と併せて考えると、搔破刺激時の皮膚では、PGD<sub>2</sub> は COX-1 を介して産生され、PGE<sub>2</sub>、PGL<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  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。今回新たに確立した皮膚への siRNA 導入による COX-1 ノックダウン法は、皮膚 PG と COX の関与を解明するための手法として、今後活用されることを期待したい。

## 小括

機械的搔破モデルを用い、皮膚バリア修復における薬理学的特性を検討した結果、以下の成績を得た。

1. 皮膚への機械的搔破は、搔破回数に比例し皮膚 PG 産生を誘導し、特に PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 産生が顕著であった。
2. 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) 塗布は、皮膚バリア修復を遅延させた。この皮膚バリア修復遅延は PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 塗布により改善した。また、PGD<sub>2</sub> は DP<sub>1</sub> 受容体を介し、PGE<sub>2</sub> は EP<sub>3</sub> 及び EP<sub>4</sub> 受容体を介し皮膚バリア修復作用を示した。
3. ステロイド系抗炎症薬塗布は皮膚バリア修復を遅延させ、NSAID とステロイドの併用塗布では皮膚バリア破壊を悪化させた。この皮膚バリア破壊悪化は PGD<sub>2</sub> 及び IL-1β 塗布により改善した。
4. 選択的 COX-1 阻害薬は皮膚バリア修復を遅延させたが、選択的 COX-2 阻害薬では影響がなかった。また、COX-1 より産生される PGD<sub>2</sub> が皮膚バリア修復に関与し、COX-2 により産生される PG (PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub>) が皮膚炎症に関与していた。
5. エレクトロポレーションを用いた皮膚への siRNA 導入による COX-1 ノックダウンマウスの作製に初めて成功した。このマウスを用い検討した結果、皮膚 PGD<sub>2</sub> 産生は COX-1 ノックダウンにより抑制された。

以上のことより、機械的搔破による皮膚バリア破壊の修復において、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 及び IL-1β が皮膚バリア修復作用を示すことが明らかとなった。特に、表皮 COX-1 より産生される PGD<sub>2</sub> が DP<sub>1</sub> 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。

## 総括

皮膚、特に表皮は体内の生命環境（即ち水環境）と体外の非生命環境（即ち空気環境）との間の境界バリア構造である。バリア機能に関して最も重要な役割を果たしているのが表皮の最外層に位置する角質層であり、表皮ケラチノサイトの最終分化細胞である角質細胞は強靱な脂質多重層構造を構築する。皮膚バリアが障害されると、微生物等の感染因子や物理的因子が容易に体内に侵入しやすくなり<sup>1)</sup>、外来異物に対する免疫応答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。また、角質層の水分保持機能の低下により皮膚が乾燥し、細かいひび割れから更なる外来異物の侵入を引き起こす。加齢による皮膚バリア機能低下が原因で生じる老人性乾皮症や、冬季の空気の乾燥により生じる季節性乾皮症の皮膚では、知覚神経の痒覚閾値が低下し、痒みを感じやすくなり、掻破行動により皮膚炎も起こりやすくなる<sup>17)</sup>。アトピー性皮膚炎は、掻痒を伴い慢性的に増悪と寛解を繰り返す皮膚の炎症であり、皮膚バリア障害と免疫反応が関与する疾患である。掻痒が掻破行動をもたらして皮膚を損傷することにより、さらに掻痒が増加し強い掻破が発現する結果、炎症反応が増悪する *itch-scratch cycle* と呼ばれる現象が存在し、疾患の難治化を進行させる<sup>11)</sup>。これら疾患に対し、炎症を抑制するための免疫抑制剤やステロイド外用剤の塗布を基本とした治療が行われているが、皮膚バリア障害に対しては保湿剤などのスキンケアが基本的な治療であり、有効性の高い治療薬は現在までほとんどない。本研究は、皮膚バリア障害の治療薬創出を目的として、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修復の解明に取り組んだ。

### <第 I 部> 実験的皮膚バリア破壊モデルマウスの作製

アトピー性皮膚炎の掻破行動による皮膚バリア破壊を、ワイヤーブラシによる機械的掻破に置き換え、マウスの皮膚バリア破壊モデルを作製し、皮膚バリア修復薬評価系としての可能性を、従来の皮膚バリア破壊モデルと比較検討した。アトピー性皮膚炎患者は著しい掻痒による掻破行動が物理的刺激となり皮膚バリア破壊を引き起こすが、NC/Nga マウスの後肢爪を切除し掻破による物理的刺激を抑えると、皮膚バリア破壊は抑制される<sup>114)</sup>。機械的掻破は、掻破回数依存的に TEWL を上昇させ、つまり皮膚バリア破壊を進展した。また、病理学的観察において機械的掻破モデルは、表皮の損傷、剥落、痂皮形成及び炎症性細胞浸潤といった組織学的変化が認められ、この病理学的炎症症状は、NC/Nga マウスの病理像と類似するものであった。従って、機械的掻破はアトピー性皮膚炎患者の指爪による掻破行動に代わり、アトピー性皮膚炎類似の皮膚バリア破壊を惹起させるものと考えられた。皮膚バリア破壊状態をモデル間で比較すると、機械的掻破による TEWL の上昇は脱脂処置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長い期間を有した。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期間が長かった。従来の皮膚バリア破壊モデルは皮膚バリア修復が早いため、試験薬剤の皮膚バリア修復に対する適切な評価を行うことが困難であったが、機械的搔破モデルは明確な皮膚バリア破壊及び長期間皮膚バリア破壊状態が持続するため、薬剤の適切な評価が出来るものと考えられた。そこで被覆剤のワセリン及び保湿剤の glycerol の作用を脱脂処置と比較検討した結果、機械的搔破はより長い時間、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。以上の結果より、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た。

## <第Ⅱ部> 皮膚バリア破壊の修復に関する研究

第1章では、機械的搔破モデルを用い皮膚バリア破壊とその修復における PG の役割を検討した。皮膚への機械的搔破は、搔破回数に比例して皮膚 PG 産生を誘導し、特に PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 産生が顕著であった。非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) 塗布による内因性 PG 産生阻害を行い、皮膚バリア修復作用を検討した結果、皮膚バリア修復の遅延が観察された。つまり、皮膚バリア破壊時に産生させる皮膚 PG は皮膚バリア修復促進に関与していることが示唆された。この内因性 PG 産生阻害による皮膚バリア修復遅延は PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 塗布により改善し、さらに PGD<sub>2</sub> は DP<sub>1</sub> 受容体を介し、PGE<sub>2</sub> は EP<sub>3</sub> 及び EP<sub>4</sub> 受容体を介し皮膚バリア修復作用を示すことが明らかとなった。以上の結果より、機械的搔破による皮膚バリア破壊の修復において、搔破により誘導された PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> は皮膚バリア修復を促進する生理的役割を持つことを明らかにした。特に、最も強く誘導される PGD<sub>2</sub> は搔痒抑制効果によって過度の搔破行動を抑え、さらに搔破によって障害を受けた皮膚バリアの修復に寄与することを明らかにした。

第2章では、サイトカイン産生抑制作用を持つステロイド系抗炎症薬を用い、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。機械的搔破による皮膚バリア破壊に対し、ステロイドの塗布は皮膚バリア修復を遅延させ、さらに NSAID とステロイドの併用塗布では皮膚バリア破壊を悪化させた。病理組織学的観察において NSAID とステロイドの併用塗布では、潰瘍、炎症性細胞浸潤などの皮膚炎症の悪化が顕著であり、特に表皮は完全に剥離していた。この NSAID とステロイドの併用塗布による皮膚バリア破壊悪化は PGD<sub>2</sub> 及び IL-1β 塗布により改善した。免疫組織化学的手法において、NSAID とステロイドの併用塗布では、表皮 IL-1β 及び IL-1RI の発現は顕著に減少していた。皮膚バリア破壊悪化は、表皮において IL-1β 及び IL-1RI が減少していたためと考えられた。以上の結果より、機械的搔破による皮膚バリア破壊の修復において、PGD<sub>2</sub> に加え炎症性サイトカイン IL-1β も皮膚バリア修復を促進する生理的役割を持つことを明らかにした。

第3章では、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 阻害薬は機械的搔破による皮膚バリア修復を遅延させたが、選択的 COX-2 阻害薬では影響がなかった。一方、浮腫や血漿漏出などの皮膚炎症反応に対し、COX-2 阻害薬は抑制作用を示したが、COX-1 阻害薬では影響がなかった。機械的搔破 24 時間後の皮膚 PG 産生に対し、COX-1 阻害薬は全ての PG 産生を抑制し、さらに PGD<sub>2</sub> 量については正常皮膚より低値を示した。つまり COX-1 阻害薬の皮膚バリア修復遅延作用は、COX-1 阻害による PGD<sub>2</sub> 産生抑制が原因であることが強く示唆された。一方、COX-2 阻害薬は PG 産生に対する影響が少なかった。機械的搔破モデルにおいて、COX-2 活性により産生させる皮膚 PG 量は極めて少ないが、十分な炎症反応を惹起させたのかもしれない。また、免疫組織化学染色により、COX-1 は表皮ランゲルハンス細胞に発現し、機械的搔破により誘導される COX-2 は真皮好中球に発現していた。以上の結果より、機械的搔破による皮膚バリア破壊において、表皮 COX-1 より産生される PGD<sub>2</sub> が皮膚バリア修復に関与し、真皮中に誘導した COX-2 より産生される PG (PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub>) は炎症に関与していることが明らかとなった。

第4章では、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、さらにこのモデルを用い皮膚 COX-1 ノックダウンによる皮膚 PG への影響を検討することにより、第3章に続き皮膚 PG 産生における COX の関与の解明を目指した。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、エレクトロポレーションを用いた皮膚への siRNA 導入による COX-1 ノックダウンマウスの作製に初めて成功した。同モデルの皮膚 PG 産生量を測定した結果、皮膚 PGD<sub>2</sub> 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、PGD<sub>2</sub> が主体であることが強く示唆され、PGD<sub>2</sub> は COX-1 を介して産生され、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 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。

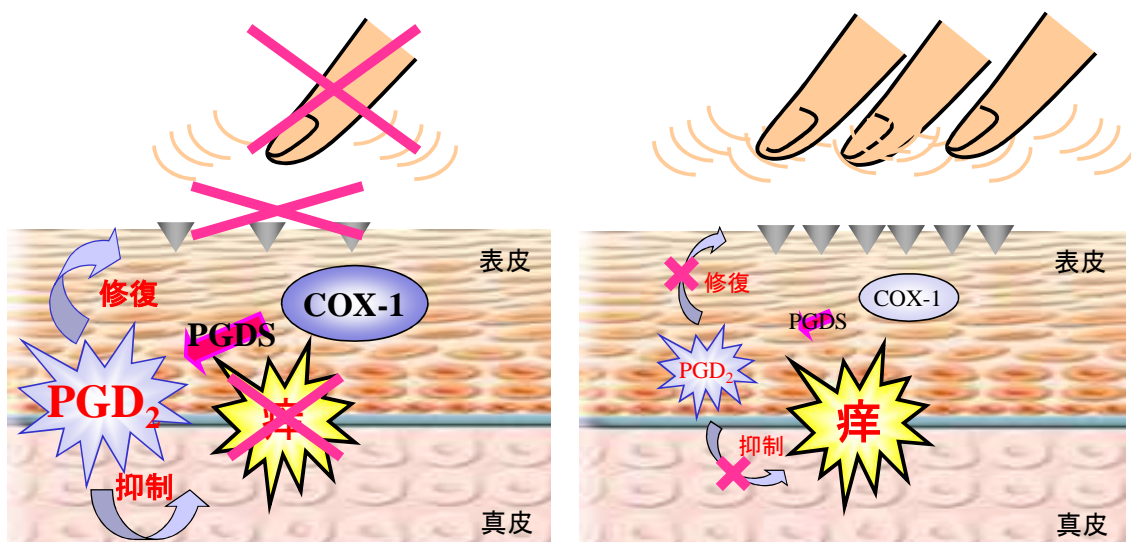
以上、本研究において、皮膚バリア修復のメカニズム解明及び皮膚バリア修復薬の開発に有効なモデルマウスの作製に成功した。また、機械的搔破による皮膚バリア破壊の修復において、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 及び IL-1β が皮膚バリア修復作用を示すことを明らかとし、特に表皮 COX-1 より産生される PGD<sub>2</sub> が DP<sub>1</sub> 受容体を介し皮膚バリア修復に強く関与していることを示した。PGD<sub>2</sub> の搔痒抑制作用<sup>113)</sup>と併せて考えると、正常皮膚では搔破により産生された PGD<sub>2</sub> 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が示唆された (Fig. 26a)。しかしながら、アトピー性皮膚炎患者ではこの PGD<sub>2</sub> によるフィードバック機構が破綻している可能性が考えられた。第II部、第1章で示したように、正常のマウスでは搔破により皮膚 PG 産生が誘導されるが、皮膚炎を発症した NC/Nga マウスでは4種 PG の中で PGD<sub>2</sub>



産生能のみが低下している<sup>178, 179)</sup>。さらにこの皮膚 PGD<sub>2</sub> 産生能低下は、表皮 COX-1 及び PGD<sub>2</sub> 合成酵素である hPGDS (造血器型 PGD 合成酵素) 発現の低下に起因した現象であることが明らかとなっている<sup>178, 180)</sup>。また、アトピー性皮膚炎患者皮膚では、PGE<sub>2</sub> が健常人の皮膚よりも多い<sup>181)</sup>が、PGD<sub>2</sub> は検出限界以下であることが報告されている<sup>182)</sup>ため、同様の発症機序が関与する可能性が考えられた。即ち、アトピー性皮膚炎患者皮膚では、痒みを感じ搔破をするが、表皮 COX-1 及び hPGDS 発現の低下が原因で皮膚 PGD<sub>2</sub> 産生が誘導されない。従って、PGD<sub>2</sub> 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 (Fig. 26b)。老人性乾皮症や乾癬などの慢性的な搔痒を伴う皮膚バリア障害においても、アトピー性皮膚炎同様の PGD<sub>2</sub> によるフィードバック機構の破綻が起きている可能性が考えられるため、今後の検討によるメカニズム解明に期待したい。

### a. 正常皮膚

### b. アトピー性皮膚炎皮膚



**Fig. 26** 正常皮膚及びアトピー性皮膚炎皮膚における PGD<sub>2</sub> の生理作用の仮説

(a) 正常皮膚では、搔破行動によって表皮 COX-1 及び hPGDS を介して産生された PGD<sub>2</sub> が、搔痒抑制による過度の搔破行動を抑え、障害を受けた皮膚バリアを修復するフィードバック機構として作用する。(b) アトピー性皮膚炎皮膚では、表皮 COX-1 及び hPGDS 低下に起因する PGD<sub>2</sub> 産生系の異常により、皮膚 PGD<sub>2</sub> 量及び産生能が低下する。その結果、過度の搔破行動が惹起され皮膚炎発症及び慢性化に至る。

アトピー性皮膚炎の治療には、保湿剤によるスキンケアや、皮膚炎症の沈静化を目的としたステロイド外用剤や免疫抑制剤に分類されるプロトピック (FK-506) 軟膏が用いられる。ステロイド外用剤やプロトピック軟膏は、皮膚の炎症を速やかに抑え、二次的に搔破

行動に対しても効果を示すことが報告されているが、ステロイド外用剤には皮膚の萎縮、紅潮、毛細血管拡張及び多毛などの局所的副作用があり<sup>183)</sup>、プロトピック軟膏は特有の刺激感、皮膚癌発症のリスク増加や感染症などの副作用が懸念される<sup>184)</sup>。また、皮膚バリア修復に対しては、ステロイド外用剤は第Ⅱ部、第2章で示したように皮膚バリア修復を遅延または悪化させ、プロトピック軟膏は作用を示さない<sup>185)</sup>。一方、掻痒に対する治療は抗 histamine 剤（抗アレルギー剤）が処方されているが、実際にはその効果は弱く<sup>186-188)</sup>、患者の Quality of Life の向上に結びつく証拠が得られていない。これまでアトピー性皮膚炎患者では血中 IgE 量の上昇<sup>189)</sup>や Th2 細胞が多く存在する<sup>190)</sup>ことから、皮膚炎の発症は Th2 免疫に強く寄偏したアレルギー反応が原因と考えられてきた。しかし、近年では“掻痒”の疾患とする考え方が浸透しつつあり<sup>191)</sup>、アトピー性皮膚炎でのアレルギー反応は、掻破行動による皮膚バリア障害を引き起こした結果、皮膚炎やアレルギー反応を惹起すると考えられる。実際、NC/Nga マウスの皮膚炎発症は、掻破行動に追従し皮膚バリア破壊が生じ、さらに皮膚バリア破壊に追従し皮膚炎発症及び Th2 反応（血中 IgE 及び IgG<sub>1</sub> 上昇）が生じることを示している<sup>192)</sup>。従って、掻痒抑制と皮膚バリア修復作用を持ち合わせる PGD<sub>2</sub> は、アトピー性皮膚炎発症を防ぐ生体の恒常性調節物質であり、この PGD<sub>2</sub> 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皮膚炎増悪及び慢性化（itch-scratch cycle）の治療には、PGD<sub>2</sub> もしくは DP<sub>1</sub> 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。

## 謝辞

本論文を纏めるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 応用薬理学研究室 倉石 泰 教授に謹んで深厚なる感謝の意を表します。また、本論文の御高閲と適切な御教示を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 酒井秀紀 教授、同 門脇 真 教授に深く御礼申し上げます。

本研究の機会及び本論文発表の許可を与えて戴きました大正製薬株式会社 上原 茂 社長、藤田 憲一 常務取締役、奥山 茂 医薬研究本部長、高橋 健三 医薬研究副本部長に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、終始丁寧な御指導を戴きました同社 元開発薬理研究室 GM 新井 巖 博士に心より感謝致します。また、数多くの貴重なる御助言並びに御協力を賜りました同 QA 推進室長 中池 司郎 博士、同医薬安全管理部 田中 誠 博士、同創薬薬理第3研究室長 加來 伸介 博士、同創薬薬理第3研究室 GM 杉山 寛行 氏、同創薬薬理第3研究室 GM 鈴木 啓子 氏に深く感謝致します。

本研究は、大正富山医薬品株式会社 二木 伸子 博士、同創薬薬理第3研究室 杉本 昌謙 博士、同開発推進部 井上 知之 博士、同 SM 薬理研究室 橋本 由紀 博士、高岡 彰子 博士、同安全性研究室 櫻井 孝信 博士、中西 豊 氏の御協力なくしては成し得なかったものであり、深く感謝致します。

これまでの研究活動において、多くの先輩、同僚の皆様には、様々な御協力と御支援を戴きました。お世話になりながらもここに御名前を言上することが出来なかった多くの方々に、心から厚くお礼申し上げます。

最後に、全面的に支えとなってくれました家族に心より感謝致します。

## 参考文献

1. Rycroft RJ. Low humidity and microtrauma. *Am J Ind Med.* **8**: 371-3, 1985.
2. Baker H, Kligman AM. Measurement of transepidermal water loss by electrical hygrometry. Instrumentation and responses to physical and chemical insults. *Arch Dermatol.* **96**: 441-52, 1967.
3. Grubauer G, Elias PM, Feingold KR. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J Lipid Res.* **30**: 323-33, 1989.
4. Ozawa T, Takahashi M. Skin hydration: recent advances. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* **185**: 26-8, 1994.
5. Dalziel KL. Aspects of cutaneous ageing. *Clin Exp Dermatol.* **16**: 315-23, 1991.
6. Watanabe M, Tagami H, Horii I, Takahashi M, Kligman AM. Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis. *Arch Dermatol.* **127**: 1689-92, 1991.
7. Werner Y, Lindberg M. Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin inpatients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* **65**: 102-5, 1985.
8. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol.* **96**: 523-6, 1991.
9. Werner Y. The water content of the stratum corneum in patients with atopic dermatitis. Measurement with the corneometer CM 420. *Acta Derm Venereol.* **66**: 281-4, 1986.
10. Berardesca E, Fideli D, Borroni G, Maibach H. In vivo hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients. *Acta Derm Venereol.* **70**: 400-4, 1990.
11. Wahlgren CF. Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol.* **26**: 770-9, 1999.
12. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.* **122**: 1285-94, 2009.
13. Baker H, Kligman AM. Technique for estimating turnover time of human stratum corneum. *Arch Dermatol.* **95**: 408-11, 1967.
14. Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin-relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res.* **291**: 555-9, 1999.
15. Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small prolinerich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.* **270**: 17702-11, 1995.
16. Scott IR, Harding CR, Barrett JG. Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source

- of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta*. **719**: 110-7, 1982.
17. Scott IR, Harding CR. Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev Biol*. **115**: 84-92, 1986.
  18. Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther*. **17**: 43-8, 2004.
  19. Jarnik M, Simon MN, Steven AC. Cornified cell envelope assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *J Cell Sci*. **111**: 1051-60, 1998.
  20. Stewart ME, Downing DT. The omega-hydroxyceramides of pig epidermis are attached to corneocytes solely through omega-hydroxyl groups. *J Lipid Res*. **42**: 1105-10, 2001.
  21. Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol*. **122**: 1235-44, 2004.
  22. Swartzendruber DC, Wertz PW, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol*. **92**: 251-7, 1989.
  23. Hernandez-Martin A, Gonzalez-Sarmiento R, De Unamuno P. X-linked ichthyosis: an update. *Br J Dermatol*. **141**: 617-27, 1999.
  24. Downing DT, Strauss JS, Pochi PE. Variability in the chemical composition of human skin surface lipids. *J Invest Dermatol*. **53**: 322-7, 1969.
  25. Ziboh VA, Chapkin RS. Metabolism and function of skin lipids. *Prog Lipid Res*. **27**: 81-105, 1988.
  26. Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Dermatol*. **27**: 684-90, 2002.
  27. Lewis JE, Wahl JK 3<sup>rd</sup>, Sass KM, Jensen PJ, Johnson KR, Wheelock MJ. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol*. **136**: 919-34, 1997.
  28. Capaldo CT, Macara IG. Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*. **18**: 189-200, 2007.
  29. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*. **383**: 725-37, 2002.
  30. Matoltsy AG, Downes AM, Sweeney TM. Studies of the epidermal water barrier. II. Investigation of the chemical nature of the water barrier. *J Invest Dermatol*. **50**: 19-26, 1968.

31. Fredriksson T. Influence of solvents and surface active agents on the barrier function of the skin towards Sarin. II. Increase in rate of absorption. *Acta Derm Venereol.* **49**: 55-8, 1969.
32. Prottey C, Hartop PJ, Black JG, McCormack JI. The repair of impaired epidermal barrier function in rats by the cutaneous application of linoleic acid. *Br J Dermatol.* **94**: 13-21, 1976.
33. Elias PM, Brown BE, Ziboh VA. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *J Invest Dermatol.* **74**: 230-3, 1980.
34. Elias PM, Fritsch PO, Lampe M, Williams ML, Brown BE, Nemanic M, Grayson S. Retinoid effects on epidermal structure, differentiation, and permeability. *Lab Invest.* **44**: 531-40, 1981.
35. Frodin T, Skogh M. Measurement of transepidermal water loss using an evaporimeter to follow the restitution of barrier layer of human epidermis after stripping the stratum corneum. *Acta Derm Venereol.* **64**: 537-40, 1984.
36. Elias PM, Friend DS. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol.* **65**: 180-91, 1975.
37. Elias PM, McNutt NS, Friend DS. Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: a freeze-fracture, tracer, and thin-section study. *Anat Rec.* **189**: 577-94, 1977.
38. Wertz PW, Downing DT. Glycolipids in mammalian epidermis: structure and function in the water barrier. *Science.* **217**: 1261-2, 1982.
39. Menon GK, Grayson S, Elias PM. Cytochemical and biochemical localization of lipase and sphingomyelinase activity in mammalian epidermis. *J Invest Dermatol.* **86**: 591-7, 1986.
40. Imokawa G, Hattori M. A possible function and recovery study of structural lipids in the water-holding properties of the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* **84**: 282-4, 1985.
41. Imokawa G, Akasaki S, Hattori M, Yoshizuka N. Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol.* **87**: 758-61, 1986.
42. Imokawa G, Akasaki S, Minematsu Y, Kawai M. Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch Dermatol Res.* **281**: 45-51, 1989.
43. Feingold KR, Man MQ, Proksch E, Menon GK, Brown BE, Elias PM. The lovastatin-treated rodent: a new model of barrier disruption and epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol.* **96**: 201-9, 1991.
44. Miyamoto T, Nojima H, Shinkado T, Nakahashi T, Kuraishi Y. Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice. *Jpn J Pharmacol.* **88**: 285-92, 2002.
45. Ghadially R, Brown BE, Sequerira-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.
46. Ghadially R, Brown BE, Hanley K, Reed JT, Feingold KR, Elias PM. Decreased epidermal lipid synthesis accounts for altered barrier function in aged mice. *J Invest Dermatol.* **106**: 1064-9, 1996.
  47. Denda M, Sato J, Tsuchiya T, Elias PM, Feingold KR. Low humidity stimulates epidermal DNA synthesis and amplifies the hyperproliferative response to barrier disruption: implication for seasonal exacerbations of inflammatory dermatoses. *J Invest Dermatol.* **111**: 873-8, 1998.
  48. Denda M, Tsuchiya T, Hosoi J, Koyama J. Immobilization-induced and crowded environment- induced stress delay barrier recovery in murine skin. *Br J Dermatol.* **138**: 780-5, 1998.
  49. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio J, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* **9**: 461-6, 1997.
  50. Wilkinson DI. Variability in composition of surface lipids. The problem of the epidermal contribution. *J Invest Dermatol.* **52**: 339-43, 1969.
  51. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol.* **80** Suppl: 44s-49s, 1983.
  52. Nickoloff BJ, Naidu Y. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol.* **30**: 535-46, 1994.
  53. Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest.* **87**: 1668-73, 1991.
  54. Denda M, Wood LC, Emami S, Calhoun C, Brown BE, Elias PM, Feingold KR. The epidermal hyperplasia associated with repeated barrier disruption by acetone treatment or tape stripping cannot be attributed to increased water loss. *Arch Dermatol Res.* **288**: 230-238, 1996.
  55. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest.* **90**: 482-7, 1992.
  56. Wood LC, Feingold KR, Sequeira-Matin SM, Elias PM, Grunfeld C. Barrier function coordinately regulates epidermal IL-1 and IL-1 receptor antagonist mRNA levels. *Exp Dermatol.* **3**: 56-60, 1994.
  57. Tsai JC, Feingold KR, Crumrine D, Wood LC, Grunfeld C, Elias PM. Permeability barrier disruption alters the localization and expression of TNF alpha/protein in the epidermis. *Arch Dermatol Res.* **286**: 242-8, 1994.
  58. Jansen JM, Schutze S, Forl M, Kronke M, Proksh E. Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest.* **104**:

1761-70, 1999.

59. Groves RW, Rauschmayr T, Nakamura K, Sarkar S, Williams IR, Kupper TS. Inflammatory and hyperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the IL-1 receptor (type I) on epidermal keratinocytes. Evidence that IL-1-inducible secondary cytokines produced by keratinocytes in vivo can cause skin disease. *J Clin Invest.* **98**: 336-44, 1996.
60. Barland CO, Zettersten E, Brown BS, Ye J, Elias PM, Ghadially R. Imiquimod-induced interleukin-1 $\alpha$  stimulation improves barrier homeostasis in aged murine epidermis. *J Invest Dermatol.* **122**: 330-6, 2004.
61. Liou A, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR, Wood LC. Amphiregulin and nerve growth factor expression are regulated by barrier status in murine epidermis. *J Invest Dermatol.* **108**: 73-7, 1997.
62. Schmid P, Cox D, Bilbe G, McMaster C, Stahelin H, Luscher N, Seiler W. TGF- $\beta$ s and TGF- $\beta$  type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *J Pathol.* **171**: 191-7, 1993.
63. Niessen FB, Andriessen MP, Schalkwijk J, Visser L, Timens W. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J Pathol.* **194**: 207-16, 2001.
64. Ahida Y, Denda M, Hirao T. Histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptor antagonists accelerate skin barrier repair and prevent epidermal hyperplasia induced by barrier disruption in dry environment. *J Invest Dermatol.* **116**: 261-5, 2001.
65. Denda M, Inoue K, Inomata S, Denda S.  $\gamma$ -aminobutyric acid (A) receptor agonist accelerate cutaneous barrier recovery and prevent epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol.* **119**: 1041-7, 2002.
66. Denda M, Fuziwara S, Inoue K. Association of cyclic adenosine monophosphate with permeability barrier homeostasis of murine skin. *J Invest Dermatol.* **122**: 140-6, 2004.
67. 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**: 1034-40, 2002.
68. Akimoto K, Yoshikawa N, Higaki Y, Kawashima M, Imokawa G. Quantitative analysis of stratum corneum lipids in xerosis and asteatotic eczema. *J Dermatol.* **20**: 1-6, 1993.
69. Tezuka T. Electron-microscopic changes in xerosis senilis epidermis. Its abnormal membrane-coating granule formation. *Dermatologica.* **166**: 57- 61, 1983.
70. Horii I, Nakayama Y, Obata M, Tagami H. Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin. *Br J Dermatol.* **121**: 587-592, 1989.
71. Jacobson TM, Yuksel KU, Geesin JC, Gordon JS, Lane AT, Gracy RW. Effects of aging and xerosis on the amino acid composition of human skin. *J Invest Dermatol.* **95**: 296-300, 1990.
72. Engelke M, Jensen JM, Ekanayake-Mudiyanselage S, Proksch E. Effects of xerosis and



- aging on epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol.* **137**: 219-25, 1997.
73. Saint-Leger D, Francois AM, Leveque JL, Stoudemayer TJ, Kligman AM, Grove G. Stratum corneum lipids in skin xerosis. *Dermatologica.* **178**: 151- 5, 1989.
  74. Simon M, Bernard D, Minondo AM, Camus C, Fiat F, Schmidt R, Serre G. Persistence of both peripheral and non-peripheral corneodesmosomes in the upper stratum corneum of winter xerosis skin versus only peripheral in normal skin. *J Invest Dermatol.* **116**: 23-30, 2001.
  75. Takenouchi M, Suzuki H, Tagami H. Hydration characteristics of pathologic stratum corneum --evaluation of bound water. *J Invest Dermatol.* **87**: 574-6, 1986.
  76. Hashimoto-Kumasaka K, Takahashi K, Tagami H. Electrical measurement of the water content of the stratum corneum in vivo and in vitro under various conditions: comparison between skin surface hygrometer and corneometer in evaluation of the skin surface hydration state. *Acta Derm Venereol.* **73**: 335-9, 1993.
  77. Gupta MA, Gupta AK, Kirkby S, Weiner HK, Mace TM, Schork NJ, Johnson EH, Ellis CN, Voorhees JJ. Pruritus in psoriasis. A prospective study of some psychiatric and dermatologic correlates. *Arch Dermatol.* **124**: 1052-7, 1988.
  78. Cooper KD, Hammerberg C, Baadsgaard O, Elder JT, Chan LS, Sauder DN, Voorhees JJ, Fisher G. IL-1 activity is reduced in psoriatic skin. Decreased IL-1 alpha and increased nonfunctional IL-1 beta. *J Immunol.* **144**: 4593-603, 1990.
  79. Ohta Y, Katayama I, Funato T, Yokozeki H, Nishiyama S, Hirano T, Kishimoto T, Nishioka K. In situ expression of messenger RNA of interleukin-1 and interleukin-6 in psoriasis: interleukin-6 involved in formation of psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res.* **283**: 351-6, 1991.
  80. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Psoriatic keratinocytes express high levels of nerve growth factor. *Acta Derm Venereol.* **78**: 84-6, 1998.
  81. Finlay AY, Nicholls S, King CS, Marks R. The 'dry' non-eczematous skin associated with atopic eczema. *Br J Dermatol.* **103**: 249-56, 1980.
  82. Aoyama H, Tanaka M, Hara M, Tabata N, Tagami H. Nummular eczema: An addition of senile xerosis and unique cutaneous reactivities to environmental aeroallergens. *Dermatology.* **199**: 135-9, 1999.
  83. Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y. Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* **283**: 219-23, 1991.
  84. Murata Y, Ogata J, Higaki Y, Kawashima M, Yada Y, Higuchi K, Tsuchiya T, Kawainami S, Imokawa G. Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *J Invest Dermatol.* **106**: 1242-9, 1996.
  85. Hara J, Higuchi K, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G. High-expression of

- sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* **115**: 406-13, 2000.
86. Higuchi K, Hara J, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G. The skin of atopic dermatitis patients contains a novel enzyme, glucosylceramide sphingomyelin deacylase, which cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *Biochem J.* **350**: 747-56, 2000.
  87. Ohnishi Y, Okino N, Ito M, Imayama S. Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* **6**: 101-4, 1999.
  88. Sandilands A, O'Regan GM, Liao H, Zhao Y, Terron-Kwiatkowski A, Watson RM, Cassidy AJ, Goudie DR, Smith FJ, McLean WH, Irvine AD. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* **126**: 1770-5, 2006.
  89. Hudson TJ. Skin barrier function and allergic risk. *Nature Genetics.* **38**: 399-400, 2006.
  90. Larsen GL, Henson PM. Mediators inflammation. *Annu Rev Immunol.* **1**: 335-59, 1983.
  91. Goodwin JS. Immunomodulation by eicosanoids and anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Immunol.* **2**: 264-8, 1989.
  92. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem.* **274**: 22903-6, 1999.
  93. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem.* **55**: 69-102, 1986.
  94. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International union of pharmacology classification of prostaglandin receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* **46**: 205-29, 1994.
  95. Morimoto K, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Functions of prostaglandin receptor in contact dermatitis and application to drug discovery. *Yakugaku Zasshi.* **132**: 1217-23, 2012.
  96. Nagata K, Hirai H, Tanaka K, Ogawa K, Aso T, Suganuma K, Nakamura M, Takano S. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). *FEBS Lett.* **459**: 195-9, 1999.
  97. Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RL. A novel inhibitory prostanoids receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins.* **47**: 151-68, 1994.
  98. Ushikubi F, Hirata M, Narumiya S. Molecular biology of prostanoids receptors; an overview. *J Lipid Mediators Cell Signal.* **12**: 343-59, 1995.
  99. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **79**: 1193-226, 1999.
  100. Williams TJ. Prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub> and the vascular changes of inflammation. *Br*

- J Pharmacol.* **65**: 517–24, 1979.
101. Kiyomiya K, Oh-ishi S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF<sub>1</sub>, thromboxane B<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub> in rat pleurisy induced by phorbol myristate acetate. *Jpn J Pharmacol.* **39**: 201–6, 1985.
  102. Neisius U, Olsson R, Rukwied R, Lischezki G, Schmelz M. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces vasodilation and pruritus, but no protein extravasation in atopic dermatitis and controls. *J Am Acad Dermatol.* **47**: 28-32, 2002.
  103. Higgs GA, Moncada S, Vane JR. Eicosanoids in inflammation. *Ann Clin Res.* **16**: 287–299, 1984.
  104. Vane JR, Botting RM. The mode of action of anti-inflammatory drugs. *Prostagland Med J.* **66** (Suppl. 4): S2-S17, 1990.
  105. Evans CB, Pillai S, Goldyne ME. Endogenous prostaglandin E<sub>2</sub> modulates calcium induced differentiation in human skin keratinocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **49**: 777–81, 1993.
  106. Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, Marks F, Muller-Decker K. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 7629-34, 2001.
  107. Uno H, Zimbric ML, Albert DM, Stjernschantz J. Effect of latanoprost on hair growth in the bald scalp of the stump-tailed macaque: a pilot study. *Acta Derm Venereol.* **82**: 7-12, 2002.
  108. Whittle BJR, Moncada S, Vane JR. Comparison of the effects of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), prostaglandin E<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins.* **16**: 373-88, 1978.
  109. Patterson R, Harris KE, Greenberger PA. Effect of prostaglandin D<sub>2</sub> and I<sub>2</sub> on the airways of rhesus monkeys. *J Allergy Clin Immunol.* **65**: 269-73, 1980.
  110. Ueno R, Honda K, Inoue S, Hayaishi O. Prostaglandin D<sub>2</sub>, a cerebral sleep-inducing substance in rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* **80**: 1735-7, 1983.
  111. Angeli V, Faveeuw C, Roye O, Fontaine J, Teissier E, Capron A, Wolowczuk I, Capron M, Trottein F. Role of the parasite-derived prostaglandin D<sub>2</sub> in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *J Exp Med.* **193**: 1135-47, 2001.
  112. Takeshita K, Yamasaki T, Nagao K, Sugimoto H, Shichijo M, Gantner F, Bacon KB. CRTH2 is a prominent in contact hypersensitivity-induced neutrophil inflammation. *Int Immunol.* **16**: 947-59, 2004.
  113. Arai I, Takano N, Hashimoto Y, Futaki N, Sugimoto M, Takahashi N, Inoue T, Nakaike S. Prostanoid DP<sub>1</sub> receptor agonist inhibits the pruritic activity in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol.* **505**: 229-35, 2004.
  114. Hashimoto Y, Arai I, Nakanishi Y, Sakurai T, Nakamura A, Nakaike S. Scratching of their

- skin by NC/Nga mice leads to development of dermatitis. *Life Sci.* **76**: 783–794, 2004.
115. Ruzicka T, Walter JF, Printz MP. Changes in arachidonic acid metabolism in UV-irradiated hairless mouse skin. *J Invest Dermatol.* **81**: 300-3, 1983.
  116. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S. Increased scratching counts depend on a decrease in ability of cutaneous prostaglandin D<sub>2</sub> biosynthesis in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* **14**: 898-905, 2005.
  117. Futaki N, Arai I, Sugimoto M, Honma Y, Hashimoto Y, Sakurai T, Nakanishi Y, Tanaka M, Nakaike S. Role of prostaglandins on mechanical scratching-induced cutaneous barrier disruption in mice. *Exp Dermatol.* **16**: 507-12, 2007.
  118. Ito S, Narumiya S, Hayashi O. Prostaglandin D<sub>2</sub>: a biological perspective. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **37**: 219-34, 1989.
  119. Nagata K, Hirai H. The second PGD<sub>2</sub> receptor CRTH2: structure, properties, and functions in leukocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **69**: 169-77, 2003.
  120. Barry MF, Peter T, Jasmine C, Regina PB, Bruce MS, Ronald ME. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell.* **83**: 803-12, 1995.
  121. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D<sub>2</sub> selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med.* **193**: 255-61, 2001.
  122. Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, Narumiya S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> determines G-protein specificity. *Nature.* **365**: 166-70, 1993.
  123. Sugimoto Y, Negishi M, Hayashi Y, Namba T, Honda A, Watabe A, Hirata M, Narumiya S, Ichikawa A. Two isoforms of EP<sub>3</sub> receptor with different carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem.* **268**: 2712-8, 1993.
  124. Hasegawa H, Negishi M, Ichikawa A. Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype different in agonist-independent constitutive activity. *J Biol Chem.* **271**: 1857-60, 1996.
  125. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev.* **24**: 488-522, 2003.
  126. Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**: S1-53, 1998.
  127. Cronsteine BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F. A mechanism for the anti-inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and

- intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. **89**: 9991-5, 1992.
128. Watanabe M, Yagi M, Omata M, Hirasawa N, Mue S, Tsurufuji S, Ohuchi K. Stimulation of neutrophil adherence to vascular endothelial cells by histamine and thrombin and its inhibition by PAF antagonists and dexamethasone. *Br J Pharmacol*. **102**: 239-45, 1991.
  129. Hirasawa N, Watanabe M, Mue S, Watanabe K, Tsurufuji S, Ohuchi K. Induction of neutrophil infiltration by rat chemotactic cytokine (CINC) and its inhibition by dexamethasone in rats. *Inflammation*. **16**: 187-96, 1992.
  130. Newton R, Kuitert LM, Slater DM, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine induction of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. *Life Sci*. **60**: 67-78, 1997.
  131. Filaretova L, Tanaka A, Miyazawa T, Kato S, Takeuchi K. Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *Am J Physiol*. **283**: G1082-9, 2002.
  132. Oikarinen A, Autio P. New aspects of the mechanism of corticosteroid-induced dermal atrophy. *Clin Exp Dermatol*. **16**: 416-9, 1991.
  133. Takeda K, Arase S, Takahashi S. Side effects of topical corticosteroids and their prevention. *Drugs*. **36** Suppl 5: 15-23, 1988.
  134. 高野邦夫ら 長期ステロイド投与による創傷治癒障害：サイトカインの変化と成長ホルモンの効果. *外科と代謝・栄養*. **35**: 345-51, 2001.
  135. O'Shaughnessy RFL, Choudhary I, Harper JI. Interleukin-1 alpha blockade prevents hyperkeratosis in an *in vitro* model of lamellar ichthyosis. *Hum Mol Genet*. **169**: 231-7, 2000.
  136. Kim BE, Howell MD, Guttman-Yassky E, Guttman E, Gilleaudeau PM, Cardinale IR, Boguniewicz M, Krueger JG, Leung DYM. TNF- $\alpha$  downregulates filaggrin and loricrin through c-Jun N-terminal kinase: Role for TNF- $\alpha$  antagonists to improve skin barrier. *J Invest Dermatol*. **131**: 1272-9, 2011.
  137. Kermani F, Flint MS, Hotchkiss SAM. Induction and localization of cutaneous interleukin-1 $\beta$  mRNA during contact sensitization. *Toxicol Appl Pharmacol*. **19**: 2594-605, 2010.
  138. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Characteristics and regulation of the expression on interleukin 1 receptors by murine langerhans cells and keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. **290**: 688-95, 1998.
  139. Li X, Qin J. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med*. **83**: 258-66, 2005.
  140. Kirschner N, Poetzl C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, Brandner JM. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: Putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol*. **175**: 1095-106, 2009.

141. Takeda H, Kon A, Ito N, Sawamura D, Takagaki K, Hashimoto I, Hanada K. Keratinocyte-specific modulation of type VII collagen gene expression by pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ ). *Exp Dermatol*. **14**: 289-94, 2005.
142. Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem*. **263**: 3550-3, 1988.
143. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*. **268**: 9049-54, 1993.
144. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*. **56**: 387-437, 2004.
145. Lee JL, Mukhtar H, Bickers DR, Kopelovich L, Athar M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol*. **192**: 294-306, 2003.
146. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 13313-8, 1998.
147. Futaki N, Yoshikawa K, Hamasaka Y, Arai I, Higuchi S, Iizuka H, Otomo S. NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. *Gen Pharmacol*. **24**: 105-10, 1993.
148. Katayama S, Shionoya H, Ohtake S. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol Immunol*. **22**: 89-101, 1978.
149. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 12013-7, 1994.
150. Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest*. 1996 **97**: 2672-9, 1996.
151. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S. Role of COX-1 and COX-2 on skin PGs biosynthesis by mechanical scratching in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **75**: 1-8, 2006.
152. Humes JL, Winter CA, Sadowski SJ, Kuehl FA Jr. Multiple sites on prostaglandin cyclooxygenase are determinants in the action of nonsteroidal antiinflammatory agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. **78**: 2053-6, 1981.
153. Rome LH, Lands WE. Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin

- biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. **72**: 4863-5, 1975.
154. Roth GJ, Machuga ET, Ozols J. Isolation and covalent structure of the aspirin-modified, active-site region of prostaglandin synthetase. *Biochemistry*. **22**: 4672-5, 1983.
  155. Verbeeck RK, Blackburn JL, Loewen GR. Clinical pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Pharmacokinet*. **8**: 297-331, 1983.
  156. Thiessen JJ. Aspirin: plasma concentration and effects. *Thromb Res*. **4**: 105-111, 1983.
  157. Patrignani P, Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, Cipollone F, Ganci A, Créminon C, Maclouf J, Patrono C. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther*. **271**: 1705-12, 1994.
  158. Müller-Decker K, Hirschner W, Marks F, Fürstenberger G. The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. *J Invest Dermatol*. **119**: 1189-95, 2002.
  159. Müller-Decker K, Scholz K, Neufang F, Marks F, Fürstenberger G. Localization of prostaglandin-H synthase-1 and -2 in mouse skin: implications for cutaneous function. *Exp Cell Res*. **242**: 84-91, 1998.
  160. Athar M, An KP, Morel KD, Kim AL, Aszterbaum M, Longley J, Epstein EH Jr, Bickers DR. Ultraviolet B (UVB)-induced COX-2 expression in murine skin: an immunohistochemical study. *Biochem Biophys Res Commun*. **280**: 1042-7, 2001.
  161. Kämpfer H, Bräutigam L, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank S. Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. *J Invest Dermatol*. **120**: 880-90, 2003.
  162. Smith WL, De Witt DL, Allen ML. Biochemical distribution of PGI<sub>2</sub> synthase antigen in smooth muscle cells. *J Biol Chem*. **258**:4922-6, 1983.
  163. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**: 806-11, 1998.
  164. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. **411**: 494-8, 2001.
  165. Maruyama H, Ataka K, Higuchi N, Sakamoto F, Gejyo F, Miyazaki J. Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Gene Ther* 2001. **8**: 1808-12, 2001.
  166. Heller LC, Jaroszeski MJ, Coppola D, McCray AN, Hickey J, Heller R. Optimization of cutaneous electrically mediated plasmid DNA delivery using novel electrode. *Gene Ther*. **14**: 275-80, 2007.
  167. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J,

- Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Röhl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. **441**: 111-4, 2006.
168. Kim B, Tang Q, Biswas PS, Xu J, Schiffelers RM, Xie FY, Ansari AM, Scaria PV, Woodle MC, Lu P, Rouse BT. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol*. **165**: 2177-85, 2004.
169. Simeoni F, Morris MC, Heitz F, Divita G. Peptide-based strategy for siRNA delivery into mammalian cells. *Methods Mol Biol*. **309**: 251-60, 2005.
170. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. **432**: 173-8, 2004.
171. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*. **23**: 709-17, 2005.
172. Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**: 12177-82, 2005.
173. McNamara JO II, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*. **24**: 1005-15, 2006.
174. Gilmore IR, Fox SP, Hollins AJ, Akhtar S. Delivery strategies for siRNA-mediated gene silencing. *Curr Drug Deliv*. **3**: 147-55, 2006.
175. Schiffelers RM, Xu J, Storm G, Woodle MC, Scaria PV. Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. **52**: 1314-8, 2005.
176. Akaneya Y, Jiang B, Tsumoto T. RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. *J Neurophysiol*. **93**: 594-602, 2005.
177. Kobayashi H, Kikuchi K, Tsubono Y, Tagami H. Measurement of electrical current perception threshold of sensory nerves for pruritus in atopic dermatitis patients and normal individuals with various degrees of mild damage to the stratum corneum. *Dermatology*. **206**: 204-11, 2003.



178. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Sakurai T, Honma Y, Nakaike S. Time course changes of scratching counts, dermatitis symptoms, and levels of cutaneous prostaglandins in NC/Nga mice. *Exp Dermatol*. **15**: 875-82, 2006.
179. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Sakurai T, Honma Y, Nakaike S. The anti-pruritic efficacy of TS-022, a prostanoid DP<sub>1</sub> receptor agonist, is dependent on the endogenous prostaglandin D<sub>2</sub> level in the skin of NC/Nga mice. *Eur J Pharmacol*. **546**: 196-203, 2007.
180. Takaoka A, Arai I, Sugimoto M, Futaki N, Sakurai T, Honma Y, Nakaike S. Role of scratch-induced cutaneous prostaglandin D<sub>2</sub> production on atopic-like scratching behavior in mice. *Exp Dermatol*. **16**: 331-9, 2007.
181. Fogh K, Herlin T, Kragballe K. Eicosanoids in skin of patients with atopic dermatitis: prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> are present in biologically active concentration. *J Allergy Clin Immunol*. **83**: 450-5, 1989.
182. Ruzicka T, Simmet T, Peskar BA, Ring J. Skin levels of arachidonic acid-derived inflammatory mediators and histamine in atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol*. **86**: 105-8, 1986.
183. 古江増隆. 外用療法 1) ステロイド外用薬の使用法. *治療学*. **39**: 43-6, 2005.
184. Niwa Y, Terashima T, Sumi H. Topical application of the immunosuppressant tacrolimus accelerates carcinogenesis in mouse skin. *Br J Dermatol*. **149**: 960-7, 2003.
185. Arai I, Takaoka A, Hashimoto Y, Honma Y, Koizumi C, Futaki N, Sugimoto M, Takahashi N, Inoue T, Nakanishi Y, Sakurai T, Tanami T, Yagi M, Ono N, Nakaike S. Effects of TS-022, a newly developed prostanoid DP<sub>1</sub> receptor agonist, on experimental pruritis, cutaneous barrier disruptions and atopic dermatitis in mice. *Eur J Pharmacol*. **556**: 207-14, 2007.
186. Munday J, Bloomfield R, Goldman M, Robey H, Kitowska GJ, Gwiedzinski Z, Wankiewicz A, Marks R, Protas-Drozd F, Mikaszewska M. Chlorpheniramine is no more effective than placebo in relieving the symptoms of childhood atopic dermatitis with a nocturnal itching and scratching component. *Dermatology*. **205**: 40-5, 2002.
187. Klein PA, Clark RA. An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch Dermatol*. **135**: 1522-5, 1999.
188. Berth-Jones J, Graham-Brown RA. Failure of terfenadine in relieving the pruritus of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. **121**: 635-7, 1989.
189. Wittig HJ, Belloit J, De Fillippi I, Royal G. Age-related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. **66**: 305-13, 1980.
190. Mihm MC Jr, Soter NA, Dvorak HF, Austen KF. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol*. **67**: 305-12, 1976.

191. Koblenzer CS. Itching and the atopic skin. *J Allergy Clin Immunol.* **104**: S109-13, 1999.
192. Hashimoto Y, Takaoka A, Sugimoto M, Honma Y, Sakurai T, Futaki N, Arai I. Itch-associated scratching contributes to the development of dermatitis and hyperimmunoglobulinaemia E in NC/Nga mice. *Exp Dermatol.* **20**: 820-5, 2011.

## 論文要旨

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掻破をワイヤーブラシによる機械的掻破に置き換え、機械的掻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。機械的掻破による皮膚バリア破壊は、掻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、掻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、機械的掻破による TEWL の上昇は脱脂処置と比較して高く、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掻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、機械的掻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、機械的掻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 (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub>) 産生を誘導し、特に PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> 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、PGD<sub>2</sub> 及び PGE<sub>2</sub> が皮膚バリア修復遅延を改善したが、PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> 及び U46619 (TP 受容体作動薬) は作用を示さなかった。PGD<sub>2</sub> の代謝物の中で、PGJ<sub>2</sub> は皮膚バリア修復作用を示し、13,14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub> 及び 15-deoxy-Δ<sup>12,14</sup>-PGJ<sub>2</sub> は効果を示さなかった。これらの効果は DP<sub>1</sub> 受容体への親和性に比例し、DP<sub>2</sub> 受容体及び PPAR $\gamma$  への親和性とは関連しなかった。また、sulprostone (EP<sub>3</sub> 受容体作動薬) 及び ONO-4819 (EP<sub>4</sub> 受容体作動薬) は皮膚バリア修復作用を示し、17-phenyl-trinor-PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub> 受容体作動薬) 及び butaprost (EP<sub>2</sub> 受容体作動薬) は効果を示さなかった。以上のことから、PGD<sub>2</sub> は DP<sub>1</sub> 受容体を介し、PGE<sub>2</sub> は EP<sub>3</sub> 及び EP<sub>4</sub> 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 $\alpha$  及び TNF $\alpha$  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、PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及び TNF $\alpha$  塗布の効果は、PGD<sub>2</sub> 及び IL-1 $\beta$  塗布により改善し、PGE<sub>2</sub> 塗布は改善傾向を示したが、IL-1 $\alpha$  及び TNF $\alpha$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 isoform 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 PGD<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> 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 PGD<sub>2</sub> が皮膚バリア修復に関与し、COX-2 により産生される PG (PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub>) 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 PGD<sub>2</sub> 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、PGD<sub>2</sub> が主体であることが強く示唆され、PGD<sub>2</sub> は COX-1 を介して産生され、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 及び PGF<sub>2α</sub> 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、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 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 PGD<sub>2</sub> が DP<sub>1</sub> 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 PGD<sub>2</sub> 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 PGD<sub>2</sub> 産生が誘導されないため、PGD<sub>2</sub> 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 PGD<sub>2</sub> 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、PGD<sub>2</sub> もしくは DP<sub>1</sub> 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。

## 論文目録

本論文に記載した内容は、以下の論文として公表した。

1. Honma Y, Arai I, Hashimoto Y, Futaki N, Sugimoto M, Tanaka M, Nakaike S. Prostaglandin D<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> accelerate the recovery of cutaneous barrier disruption induced by mechanical scratching in mice. *Eur J Pharmacol.* **518**: 56-62, 2005.
2. Honma Y, Arai I, Sakurai T, Futaki N, Hashimoto Y, Sugimoto M, Nakanishi Y, Nakaike S. Effects of indomethacin and dexamethasone on mechanical scratching-induced cutaneous barrier disruption in mice. *Exp Dermatol.* **15**: 501-8, 2006.
3. Honma Y, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Sugimoto M, Sakurai T, Nakaike S. Cyclooxygenase-1 inhibition delays recovery of the cutaneous barrier disruption caused by mechanical scratching in mice. *Br J Dermatol.* **156**: 1178-87, 2007.
4. Inoue T, Sugimoto M, Sakurai T, Saito R, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Arai I, Nakaike S. Modulation of scratching behavior by silencing an endogenous cyclooxygenase-1 gene in the skin through the administration of siRNA. *J Gene Med.* **9**: 994-1001, 2007.
5. Hashimoto Y, Takaoka A, Sugimoto M, Honma Y, Sakurai T, Futaki N, Arai I. Itch-associated scratching contributes to the development of dermatitis and hyperimmunoglobulinaemia E in NC/Nga mice. *Exp Dermatol.* **20**: 820-5, 2011.

## 参考論文

1. Takahashi N, Arai I, Honma Y, Hashimoto Y, Harada M, Futaki N, Sugimoto M, Nakaike S. Scratching behavior in spontaneous- or allergic contact-induced dermatitis in NC/Nga mice. *Exp Dermatol*. **14**: 830-7, 2005.
2. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S. Increased scratching counts depend on a decrease in ability of cutaneous prostaglandin D<sub>2</sub> biosynthesis in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. **14**: 898-905, 2005.
3. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S. Role of COX-1 and COX-2 on skin PGs biosynthesis by mechanical scratching in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **75**: 1-8, 2006.
4. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S. COX-1 inhibition enhances scratching behavior in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. **15**: 582-8, 2006.
5. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Sakurai T, Honma Y, Nakaike S. Time course changes of scratching counts, dermatitis symptoms, and levels of cutaneous prostaglandins in NC/Nga mice. *Exp Dermatol*. **15**: 875-82, 2006.
6. Takaoka A, Arai I, Sugimoto M, Honma Y, Futaki N, Sakurai T, Nakaike S. Role of scratch-induced cutaneous prostaglandin D<sub>2</sub> production on atopic-like scratching behavior in mice. *Exp Dermatol*. **16**: 331-9, 2007.
7. Futaki N, Arai I, Sugimoto M, Honma Y, Hashimoto Y, Sakurai T, Nakanishi Y, Tanaka M, Nakaike S. Role of prostaglandins on mechanical scratching-induced cutaneous barrier disruption in mice. *Exp Dermatol*. **16**: 507-12, 2007.
8. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Honma Y, Sakurai T, Hashimoto Y, Nakaike S. Putative mechanism of the itch-scratch circle: Repeated scratching decreases the cutaneous level of prostaglandin D<sub>2</sub>, a mediator that inhibits itching. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **76**: 93-101, 2007.
9. Arai I, Takaoka A, Hashimoto Y, Honma Y, Koizumi C, Futaki N, Sugimoto M, Takahashi N, Inoue T, Nakanishi Y, Sakurai T, Tanami T, Yagi M, Ono N, Nakaike S. Effects of TS-022, a newly developed prostanoid DP<sub>1</sub> receptor agonist, on experimental pruritis, cutaneous barrier disruptions and atopic dermatitis in mice. *Eur J Pharmacol*. **556**: 207-14, 2007.
10. Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Sakurai T, Honma Y, Nakaike S. The anti-pruritic efficacy of TS-022, a prostanoid DP<sub>1</sub> receptor agonist, is dependent on the endogenous prostaglandin D<sub>2</sub> level in the skin of NC/Nga mice. *Eur J Pharmacol*. **564**: 196-203, 2007.