

令和元年6月22日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09795

研究課題名(和文) ヒアルロン酸による皮膚バリア調節機構の解明とアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the physiologic role of hyaluronan breakdown in atopic dermatitis towards novel therapeutic strategy

研究代表者

武藤 潤 (Muto, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30338131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未だ解明されていないヒアルロン酸分解のアトピー性皮膚炎病態への関与に関する研究を行った。

まず、免疫組織化学的検討ではアトピー性皮膚炎の病変部においてヒアルロン酸の沈着の増強を認めた。また、低分子量のヒアルロン酸をアトピー性皮膚炎モデルマウスに塗布することで、皮膚における湿疹の炎症反応が抑制されることが観察された。さらに、アトピー性皮膚炎モデルマウスに於いてヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼ1過剰発現させたところ、皮膚炎が有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒアルロン酸およびその分解産物は自然免疫に於いて非常に重要な役割を担っていることが知られている。しかしながらサイズの小さなものと大きなものでその作用が異なり、場合によっては逆になることもあるため、ヒアルロン酸のin vivoにおける生理的作用はその分解を考慮すると非常に複雑であり未だ解明されていない。今回、ヒアルロン酸分解のアトピー性皮膚炎病態への関与に関する研究を行い、その炎症に於ける影響を検討した。医療用に使用されるヒアルロン酸は長期に使用しても副作用の少ない薬剤として知られており、慢性に症状を繰り返すアトピー性皮膚炎の治療薬として確立されればその意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We investigated the physiologic role of HA breakdown in chronic allergic dermatitis. Although HA is a natural product that lacks immunogenicity, HA fragments generated during injury is involved in the resulting inflammation. Topical application of oligo-HA significantly suppressed the increase in ear thickness after DNFB painting. Tamoxifen-dependent overexpression of HYAL1 suppressed the increase in ear thickness after DNFB application.

研究分野：皮膚自然免疫

キーワード：アトピー性皮膚炎 ヒアルロン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

日本皮膚科学会はアトピー性皮膚炎を“増悪寛解を繰り返す、そう痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ”と定義している。アトピー素因とは気管支喘息やアトピー性皮膚炎などの家族歴、既往歴またはIgEを産生しやすい素因である。アトピー性皮膚炎では皮膚バリア機能の異常が遅延型過敏反応を増悪させていると考えられている。その治療としては主にステロイドや免疫抑制剤の外用、抗ヒスタミン剤の内服、紫外線療法などがあげられるが、皮膚のバリア機能の改善策としては保湿剤の外用以外は現在のところあまり画期的な治療の選択肢は存在しないのが現状である。

従来の保湿剤以外で皮膚に作用し、そのバリア機能を改善できる因子の一つに皮膚pHがある。皮膚を酸性に保つ事でセラミド代謝やセリンプロテアーゼ等の活性をバリア機能保護的に維持できることが知られている。マウスを用いた実験でも酸性外用剤による皮膚バリア機能維持が炎症を抑制すると報告されている (Hatano Y et al. J Invest Dermatol 2009)。また、Toll-like receptor 7のリガンドであるイミキモドも皮膚バリア機能回復促進作用があるとされている (Barland CO et al. J Invest Dermatol 2004)。

ヒアルロン酸は皮膚の細胞外基質を構成する主な糖鎖である。ヒアルロン酸合成酵素により合成され、ヒアルロン酸分解酵素(ヒアルロニダーゼ)により様々なサイズに分解される。親水性が強く、水分保持や関節での衝撃吸収などの役割を主なものと考えられてきたが、近年、自然免疫における役割が注目されてきている。自然免疫においては、微生物由来の分子がToll-like receptorsを刺激し免疫を賦活化するとされるが、近年、ヒアルロン酸などの宿主由来の生体分子(Damage-associated molecular patterns, DAMPs)も同様の役割を担っていることが明らかになってきている。これまで、我々はヒアルロン酸およびその分解産物が Damage-associated molecular patterns (DAMPs)であるとの仮説のもと、研究を重ねてきた。我々はヒアルロン酸の分解産物であるオリゴ糖型低分子ヒアルロン酸が皮膚の表皮および真皮の樹状細胞を活性化し、その所属リンパ節への遊走を促進すること、その分解が接触皮膚炎反応に重大な影響を及ぼす事を明らかにした (Muto J et al. J Clin Invest 2014)。また、分解された小さいヒアルロン酸が炎症反応に関与すること (Muto J et al. Mol Immunol 2009, Kim MY et al. PLoS one 2013)、ハプテン反復塗布によるアトピー性皮膚炎病態モデルマウスにおいてカセリサイジンによるアレルギー反応抑制のターゲットがヒアルロン酸であることも報告した (Morioka et al. J Immunol 2009)。

このように、ヒアルロン酸およびその分解産物は自然免疫に於いて非常に重要な役割を担っていることが知られているが、しかしながらサイズの小さなものと大きなものでその作用が異なり、場合によっては逆になることもあるため、ヒアルロン酸の in vivo における生理的作用はその分解を考慮すると非常に複雑であり、未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

皮膚に多量に存在し、その主な細胞外マトリックスであるヒアルロン酸は皮膚の自然免疫において重要な役割を担っているが、本研究では、ヒアルロン酸の動態がアトピー性皮膚炎の病態におよぼす影響について解明し、さらにこれを新規アトピー性皮膚炎治療法として臨床応用へ展開するための研究をすることが目的である。

## 3. 研究の方法

ヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスはカリフォルニア大学サンディエゴ校皮膚科にて我々のグループが作成したマウス精子を輸送し、日本にて再度作成して繁殖した。これら及びWTマウ

スを用いてハプテン反復塗布によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの実験を施行し、ヒアルロン酸分解がアトピー性皮膚炎類似病態発症に与える影響を検討した。この系ではタモキシフェン誘導性ヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスを作成した。タモキシフェンにより遺伝子発現調節のタイミングを調節し、ハプテン反復塗布によるアトピー性皮膚炎類似病態におけるヒアルロン酸分解による炎症反応調節機構をより正確に *in vivo* で検討した。

また、アトピー性皮膚炎病変部及び健常人正常部におけるヒアルロン酸及び HAS1, HAS2, HAS3 などの合成酵素の発現につき、免疫組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

アトピー性皮膚炎病変部において、健常人非病変部皮膚と比較してヒアルロン酸の発現が亢進していた。特に病理組織学的に海綿状態を呈している部でヒアルロン酸の沈着が著明であった(図1)。また、ヒアルロン酸合成酵素については HAS3 の発現が他の合成酵素に比較して増強する傾向がみられた。以上よりアトピー性皮膚炎の病変部においてはヒアルロン酸合成が亢進し、特に病理学的に海綿状態を呈する湿疹部位でそれらが沈着していることがわかった。

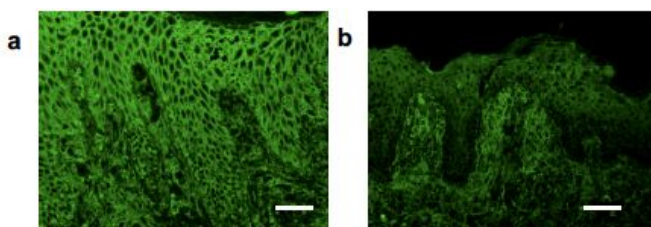


図1. アトピー性皮膚炎病変部(a)において健常人非病変部皮膚(b)と比較してヒアルロン酸の発現が増強する。

次にヒアルロン酸の分解がアトピー性皮膚炎の病態におよぼす影響について検討するため、上述のヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスを作成した。タモキシフェン投与により皮膚においてヒアルロニダーゼ1を過剰発現させたのちに 0.15 % DNFB を反復塗布した。図2のように、マウス耳介の厚みを計測したところヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスにおいて、コントロール群のマウスと比較して、有意に耳介の厚さが低下した。

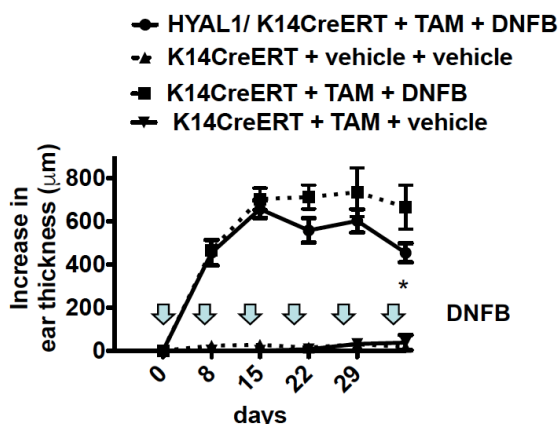


図2. ヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスに於けるアトピー性皮膚炎モデルでは耳介の厚みが有意に減少した。

ヒアルロン酸分解が新たな治療ターゲットとなるか解明するため、アトピー性皮膚炎モデルマ

ウスにおいてオリゴ糖型ヒアルロン酸含有クリーム外用による影響を検討した。0.15 % DNFB を反復塗布した後、図3のように、マウス耳介の厚みを計測したところ興味深いことに、オリゴ糖型ヒアルロン酸含有クリームを外用した群ではコントロール群のマウスと比較して耳介の厚み低下を認めた。

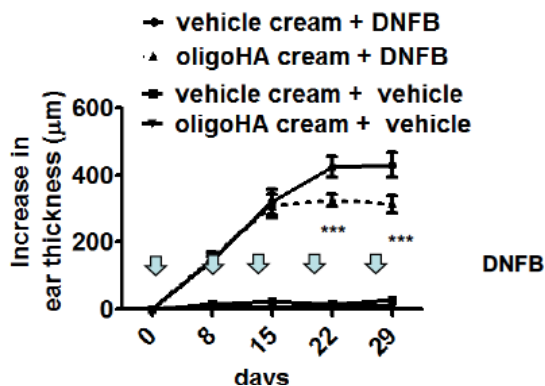


図3. オリゴ型ヒアルロン酸含有クリーム外用によりアトピー性皮膚炎モデルで耳介の厚みが有意に減少した。

マウス耳介を病理組織学的に検討したところ耳介の浮腫及び炎症性細胞浸潤が優位に低下していた(図4)。マウス耳介組織における炎症性サイトカインの発現をリアルタイムPCRで解析したところオリゴ型ヒアルロン酸クリームを外用した群において優位にこれらが低下していた。

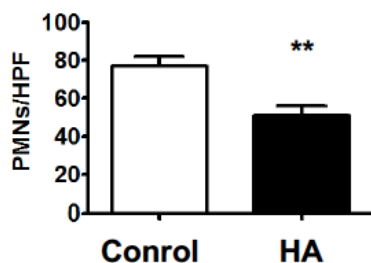


図4. オリゴ型ヒアルロン酸含有クリーム外用によりアトピー性皮膚炎モデルで耳介における炎症性細胞浸潤が優位に低下した。

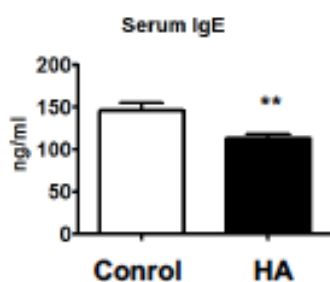


図5. オリゴ型ヒアルロン酸含有クリーム外用によりアトピー性皮膚炎モデルで血清中IgE低下を認めた。

さらに血清中のIgEも測定したところ同様に低下を認めた(図5)。

これらの結果からヒアルロン酸分解はアトピー性皮膚炎における病変部の炎症と関連があることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Muto J, Sayama K, Gallo RL, Kimata K. Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology. J Dermatol Sci. 2019. April. Doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.01.009. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

Muto J, Watanabe D, Gallo RL, Sayama K. Cutaneous degradation of hyaluronan induces suppressive effect to chronic allergic dermatitis. 24<sup>th</sup> World Congress of Dermatology. 2019. 6. 10-15, Milan, Italy

Muto J, Watanabe D, Gallo RL. Hyaluronan oligosaccharides attenuate chronic allergic dermatitis. The 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology. 2017. 12. 15-17, Kochi, Japan

Muto J, Watanabe D, Gallo RL. Hyaluronan oligosaccharides induce suppressive effect to chronic allergic dermatitis. 76<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2017. 4. 26-29, Portland, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：  
〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。