

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19696

研究課題名(和文)角層pH上昇は、表皮内神経伸長反応を促進する

研究課題名(英文)Elevation of SC pH accelerate epidermal innervation

研究代表者

伊藤 亜希子(Akiko, Ito)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70457620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：角層pH上昇刺激は、神経伸長因子や反撥因子の発現に影響を与え、表皮内神経伸長反応を亢進させた。更に、角層pH上昇刺激が、フィラグリン遺伝子変異を伴い自然発症型のADモデルとして知られるflaky tailマウスの痒み行動を、表皮内神経伸長反応亢進を伴って誘発したことは、角層pH上昇刺激のADにおけるかゆみへの関与を示唆する。

STAT6欠損マウスでは、弱酸性維持に関するフィラグリンの発現低下と真皮の肥満細胞数の減少を伴って、角層pHが低下していた。これらの結果は、角層pH、Th2型の免疫応答、肥満細胞、及び表皮細胞が互いに関係し合いながら神経伸長反応を制御していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Elevation of stratum corneum (SC) pH influenced the expressions of nerve growth factor and semaphorin 3 in epidermis and augmented the epidermal innervation. In addition, elevation of SC pH induced scratching of flaky tail mice having filaggrin mutation with augmentation of epidermal innervation. These results suggest that elevation of SC pH is involved not only in induction of itching but also in the collaboration of environmental factors and genetic ones in the pathogenesis of atopic dermatitis.

In signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) mice, SC pH was downregulated with elevation of filaggrin expressions in epidermis and decrease in number of mast cells in dermis. These results suggest that epidermal innervation might be regulated by collaboration of SC pH, Th2 cytokines, mast cells, and epidermal keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：角層pH 表皮内神経伸長 アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

**(1) 表皮内神経伸長は、アトピー性皮膚炎病変部で認められる。**

アトピー性皮膚炎 (以下、AD) の病態の特徴のひとつは、掻痒が生じ易いことである。その原因のひとつとして、表皮内への神経伸長が観察されている。

**(2) 表皮内神経伸長は、神経伸長因子と反発因子のバランスによって制御されている。**

表皮内神経伸長は、神経伸長因子と反発因子とのバランスによって制御されている。AD病変部の表皮では、神経伸長因子である、nerve growth factor (NGF)の発現亢進と反発因子である semaphorin 3A(Sema3A)の発現低下が観察されている。

**(3) 神経伸長因子と反発因子のバランスを制御する因子は不明である。**

申請者の所属する教室では、AD病変部に存在する Th2 サイトカインが神経伸長を促進する因子であるという仮説を立て研究を行った。マウスに TNF $\alpha$  又は IL-4 を皮内投与すると、TNF $\alpha$  と IL-4 を同時に投与した場合に Sema3A の発現低下と表皮内神経伸長の亢進が観察された。この現象は、IL-4 受容体の情報伝達因子である signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6)欠損マウスでは認めなかった (Sakai et al. J Dermatol Sci 投稿中)。更に、表皮角化細胞の 3 次元培養系においても TNF $\alpha$  と IL-4 の共刺激によって Sema3A の発現低下を認めた (未発表データ)。従って、Th2 サイトカインが AD における表皮内神経伸長促進因子のひとつと考えられた。しかし、AD 病変部で観察される NGF の発現亢進は検出できなかった。即ち、Th2 サイトカインのみでは AD 病変部における表皮内神経伸長亢進制御の全てを説明出来ない。角層バリア破壊刺激によって、NGF 発現亢進と Sema3A 発現低下を伴う表皮内神経伸長が観察されることから、角層バリア破壊刺激によって産生分泌される TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインが NGF の発現を亢進すると予想した。実際、他のグループの角化細胞単層培養系での実験では、TNF $\alpha$  による NGF 発現亢進が観察された。しかし、その亢進作用は、血清を加えるなどの特殊な条件下でのみ観察されたと報告されている。更に、本教室のマウスを用いた研究では、TNF $\alpha$  皮内投与による発現亢進は検出できなかった。

**(4) 角層 pH の上昇は、アトピー性皮膚炎の様々な病態に関与している可能性がある。**

AD 病変部では角層 pH が上昇しているが、角層 pH の上昇は、serine protease-activated receptor-2(PAR2)依存性及び非依存性に AD の病態に関与し得る。実際、ハプテン反復塗布誘導性 AD 様皮膚炎マウスモデルを用いた我々の教室などの研究で、lactobionic acid(LBA)を用いた角層 pH の弱酸性維持による AD 様皮膚炎の予防効果 (Hatano et al. J Invest Dermatol2009) や、LBA と PAR2 アンタゴニストによる治療効果が見出された (Sakai et al 投稿中)。更に、申請者の所属する教室は、様々な角層 pH 上昇刺激 (搔破、石鹸の使用、炎症など) 後の角層 pH 回復能の低下が AD 発症・増悪に関与している可能性を、皮膚バリア機能に関与するフィラグリンと Tmem79/Matt の変異を有する AD モデルマウスである flaky tail マウスを用いた研究で明らかにした (Sakai et al. J Dermatol Sci 2014)。

**(5) 角層 pH の上昇は、神経伸長因子と反発因子のバランスを制御する因子かもしれない。**

AD 病変部で観察される NGF 発現上昇と Sema3A 発現低下を伴う表皮内神経伸長が再現される角層バリア破壊刺激も角層 pH を即座に上昇させる。そこで、角層 pH 上昇は、NGF 発現上昇と Sema3A 発現低下を伴う表皮内神経伸長を促進する因子との仮説を立てた。実際、我々の予備的実験で、角層バリアを障害することなく即座に pH を上昇させることが可能な 1,1,3,3-tetramethylguanidine (TMG)塗布後 2 時間後のマウス表皮における NGF の発現上昇が、免疫組織学的に観察された。

2. 研究の目的

(1) 角層 pH の上昇が、表皮内神経伸張に関与するか否かを確認する。

(2) 角層 pH の上昇により、表皮内神経伸張を亢進した場合、その機序を知る。

(3) 角層 pH 上昇による表皮内神経伸張亢進作用が、AD の病態においてどのように関与するかを知る。

3. 研究の方法

(1) TMG 塗布後の皮膚を採取し、免疫染色にて表皮内神経伸張 (抗 PGP9.5 抗体)、神経伸張因子の発現 (抗 NGF 抗体)、神経伸張反発因子の発現 (抗 Semaphorin 3 抗体) を検討した。

(2) AD の病態との関連性を検討する目的で、フィラグリンの欠損したマウス (flaky tail マウス) や STAT6 欠損マウスを用いた。

(3) かゆみ行動は、動画を撮影して観察した。

(4) 表皮におけるフィラグリンの発現は、リアルタイム PCR による定量的 PCR 法で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 角層 pH 上昇刺激は、表皮内神経伸張を促進する。

角層 pH を上昇させる TMG を、マウスに 2 日間、1 日 2 回塗布する間に、経時的に角層 pH を測定したところ、この塗布条件下で角層 pH の弱酸性状態が傷害されることを確認した。

次いで、TMG による角層 pH 上昇刺激後に皮膚を採取し、抗 PGP9.5 抗体を用いて免疫組織染色にて解析したところ、明確な炎症反応の惹起が観察されない一方、神経線維の表皮内伸長反応が亢進していた (図 1)。免疫染色の結果を半定量的に解析したところ、TMG による角層 pH 上昇刺激後の表皮内への神経伸張反応の亢進が確認された (図 2)。

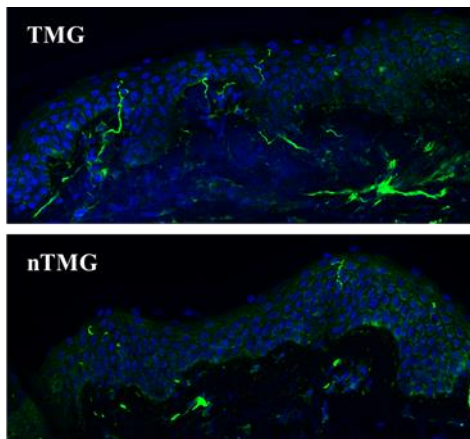


図1: 角層pH上昇刺激は表皮内神経伸張を促進 (抗PGP9.5抗体による免疫染色)

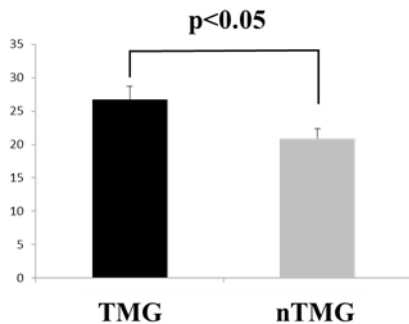


図2: 角層pH上昇刺激は表皮内神経伸張を促進(半定量的解析)

##### (2) 角層 pH 上昇刺激は、表皮における神経伸張因子 (NGF) の発現を、統計学的有意差を伴って上昇させた。

神経伸張因子 (NGF) と神経反撥因子 (semaphorin 3A) の表皮における発現をリアルタイム PCR 法で解析したところ、角層 pH 上昇反応後に、NGF の発現は、統計学的有意差を伴って上昇した (図 3)。Semaphorin 3A の発現も上昇傾向を示したが、統計学的有意差は得られなかった (図 4)。

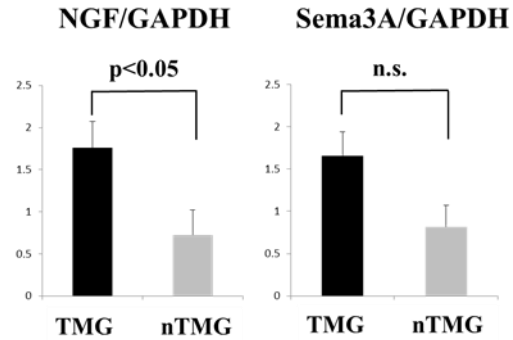


図3: 角層pH上昇刺激は表皮におけるNGFの発現を亢進 (リアルタイムPCR)

図4: 角層pH上昇刺激は表皮におけるSema3aの発現を亢進させる傾向があるも、統計学的有意差無し (リアルタイムPCR)

##### (3) フィラグリン遺伝子の変異を有するマウスにおいて、角層 pH 上昇刺激は、表皮内神経伸張反応を伴うかゆみ行動を誘発した。

皮膚バリア機能構築に重要なフィラグリン欠損マウスと野生型マウスを用いて検討を行った。角層 pH 上昇刺激である TMG 塗布を行ったところ、フィラグリン欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、搔爬行動の有意な増加を認めた (図 5)。

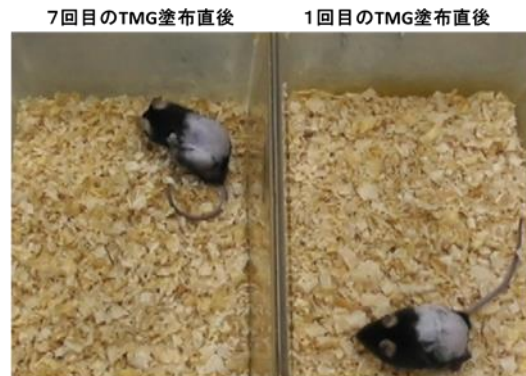
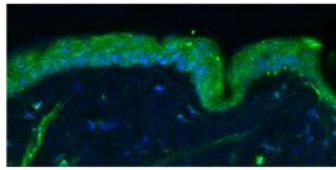


図5 1回目のTMG塗布直後では認められなかった搔爬行動が、7回目の塗布直後に著明に認められた。

抗 PGP9.5 抗体を用いた免疫化学染色を施行したところ、搔爬行動の認められたフィラグリン欠損マウスにおいて、神経の表皮内伸長を認めた (図 6)。

7回目の  
TMG  
塗布後



1回目の  
TMG  
塗布前

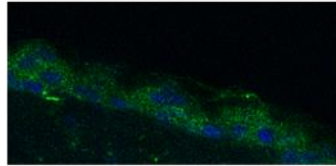


図6 7回目の塗布後の皮膚では、神経の表皮内浸潤亢進を認めた。

#### (4) STAT6欠損マウスの角層 pH は、フィラグリンの低下や肥満細胞の減少を伴って、低下していた。

Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)における角層 pH を測定したところ、定常状態であっても、野生型マウスと比較し低下していた (図7)。更に、この STAT6 欠損マウスでは、弱酸性維持に関与するフィラグリンの発現低下 (図8) と、神経伸張因子 (NGF) の産生細胞である真皮内の肥満細胞の減少 (図9) を伴っていた。

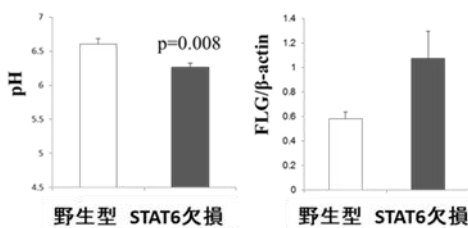


図7 STAT6欠損マウスでは角層pHが低下 図8 STAT6欠損マウスではフィラグリンが上昇

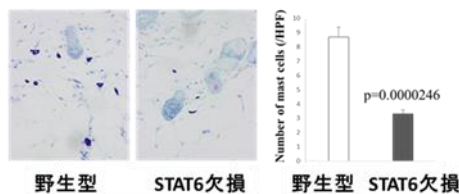


図9 STAT6欠損マウスでは、真皮内の肥満細胞数が減少

(成果のまとめ)

角層 pH 上昇刺激は、神経伸張因子や反撥因子の発現に影響を与え、表皮内神経伸張反応を亢進させることが見出された。更に、角層 pH 上昇刺激が、フィラグリン遺伝子変異を伴い自然発症型の AD モデルとして知られ

る flaky tail マウスの痒み行動を、表皮内神経伸張反応亢進を伴って誘発したことは、角層 pH 上昇刺激が AD におけるかゆみに深く関与している可能性を示唆する。角層 pH の上昇は、角層バリアを傷害する様々な環境刺激によって上昇することを考慮すれば、この結果は、角層 pH 上昇が、AD の病態における環境因子と遺伝的因子 (フィラグリン遺伝子変異) とのコラボレーションを形成する重要な因子である可能性を示唆する。

表皮のフィラグリンの分解産物である天然保湿因子は、弱酸性維持に関与する因子のひとつと考えられている。更に、肥満細胞が、神経伸張因子 (NGF) である nerve growth factor の重要な産生細胞で有るだけで無く、角層 pH 上昇時に表皮から産生・分泌されるプロテアーゼにより PAR2 を介して活性化され脱顆粒すること、角層 pH 上昇は、表皮における PAR2 活性化を介して Th2 型の免疫反応を誘導する、などの知見を考慮すると、今回、STAT6 欠損マウスを用いた研究から得られた結果は、定常状態、炎症や角層バリア破壊時などの非定常状態の両者において、角層 pH、Th2 型の免疫応答、肥満細胞、及び表皮細胞が互いに関係し合いながら神経伸張反応を制御していることを示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

無し

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

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

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 亜希子 (ITO Akiko)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70457620

### (2) 研究分担者 無し

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者 無し

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者 無し

( )