

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248055

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎における皮膚バリア修復不全機構の分子解析

研究課題名(英文)A molecular study on skin barrier dysfunction in atopic dermatitis

研究代表者

松田 浩珍 (Matsuda, Hiroshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80145820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 24,900,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚pHの上昇はセリンプロテアーゼKLK5の活性化を誘導し皮膚バリア破壊を起こす可能性が指摘されている。アトピー性皮膚炎患者では皮膚のpHが上昇することが知られるが、pHと皮膚炎の発症や病勢との関連には不明な点が多い。アトピー性皮膚炎モデルNC/Tndマウスを用いて、皮膚炎を発症しないSPF NC/Tndマウスの皮膚に弱アルカリ性の溶液を塗布すると、KLK5が活性化しTSLPの産生が誘導されるとともに皮膚炎が誘導された。一方、皮膚炎を発症するマウスに弱酸性の溶液を塗布すると皮膚炎が改善した。皮膚pHの変化は、KLK5/PAR2/TSLPを經由して、皮膚炎を惹起する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Raised skin pH may result in enzymatic activation of kallikrein 5 (KLK5), a serine protease thought to play a crucial role in skin barrier destruction. Although skin surface pH is increased in patients with atopic dermatitis (AD), contribution of pH to initiation of AD has been unclear. By using NC/Tnd mice, a model for human AD, skin pH and transepidermal water loss (TEWL), as well as KLK5, protease-activated receptor 2 (PAR2), and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) were measured. Acidification of the skin reduced KLK5 activity in the epidermis and ameliorated the eczema. In contrast, alkalization of the skin increased epidermal expression of KLK5 and TEWL, resulting in development of AD, even in SPF NC/Tnd mice without AD. Skin surface pH modulates KLK5 production, which might directly be responsible for barrier dysfunction, itch sensation, and allergic inflammation by activating a PAR2 and TSLP cascade in the epidermis.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ 動物 酵素 ストレス

1. 研究開始当初の背景

これまでのアレルギー研究では、宿主体内で起こる免疫学的事象の解析に重点が置かれていた。しかしながら、近年では生体防御のフロントラインでアレルギー反応の現場となる皮膚科学からの解析へと方向転換しつつある。皮膚の角質層は保湿成分や脂質、ケラチンなどに覆われ弱酸性を保っている。弱酸性の環境は、バリア機能を強固にして外部からの抗原物質の侵入や細菌の増殖に抵抗性を示す。正常な皮膚にはアルカリ中和能があり、アルカリ性物質が触れると酸性物質が放出され、30分程度で弱酸性に回復する。このことは、皮膚に pH センサー機能が備わっていることを示唆するものであり、アルカリ中和能の弱い人は感作され易いという古い研究があるがその詳細は不明である。代表者らは、世界初の自然発症アトピー性皮膚炎 (AD) モデル NC/Tnd マウスを見出し、それを用いて AD の病態解析を実施、多くの新知見を提供してきた。JAK3 シグナル系の活性化を通じた IgE の過剰産生や IFN- γ への反応性の異常 (J. Immunol. 1999, 2001) あるいは皮膚炎症状への転写因子 NF- κ B の関与 (J. Invest. Dermatol., 2007) などの免疫学的解析や、治療法の探索 (J. Invest. Dermatol., 2005, Exp. Dermatol., 2008 他多数) に関する研究を中心に、AD の病態解析を行ってきた。一方、皮膚科学的見地からは、肉眼的に臨床症状が顕著となる以前から皮膚バリア機能の低下 (経皮水分蒸発量の上昇) が認められ、このとき皮膚の角層間脂質であるセラミドの合成酵素 (酸性スフィンゴミエリナーゼ) の活性が下がり、結果としてセラミド量が減少することを明らかにしている (Br. J. Dermatol., 2001)。また、最近では、刺激を受けた表皮細胞が thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を産生し樹状細胞の活性化を誘導するが、このとき核受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ が内因性抑制因子として機能することを明らかにしている (J. Allergy Clin. Immunol., 2011)。しかしながら、皮膚の生体防御調節機構には多くの疑問が残されており、研究は始まったばかりである。AD では、皮膚角層の pH が上昇していることが知られている。酵素反応には至適 pH があるため、pH が上昇すると角層細胞間脂質膜 (皮膚バリア) の形成が阻害される可能性がある。これは前駆物質からセラミドを生成する酵素群、酸性スフィンゴミエリナーゼや β グルコセブレロシダーゼの活性が低下するためである。さらに pH が上昇すると、セリンプロテアーゼが活性化し、酸性スフィンゴミエリナーゼや β グルコセブレロシダーゼの分解促進、protease-activated receptor 2 (PAR2) の活性化、角層細胞の接着に重要なコルネオデスモソームの分解促進、活性型 IL-1 α の産生亢進、抗菌ペプチドの分解促進などが生じると考えられる。PAR2 の活性化

は、角層顆粒層境界部における層板顆粒の分泌を阻害し、角層細胞間脂質膜の形成を抑制するだけでなく、Th2 型炎症を誘導する TSLP の産生を亢進させる。また知覚神経に作用して痒みを誘導する可能性もある。pH の上昇そのものが、皮膚での黄色ブドウ球菌の増殖を促進するという説もある。皮膚バリアを構成するもうひとつの重要分子はフィラグリンである。表皮のケラトヒアリン顆粒に含まれるフィラグリンは、さまざまな酵素の作用により前駆体から単量体に分解され、最終的にはアミノ酸となって皮膚の保湿性保持成分となる。この酵素反応の過程にも弱酸性の pH が至適で、pH の上昇は正常な酵素活性を低下させるのみならず、カリクレインなどのセリンプロテアーゼを活性化して異常なフィラグリン分解を誘導する。しかしながら、AD 発症の過程で何が pH 変化の引き金を引くのかは不明なままである。このような背景から、AD の皮膚組織の pH 上昇や表皮細胞からの TSLP 産生、あるいはかゆみを誘導する機構の解明が AD の局所病態の本質とそれに対応する新規治療法の創出を導くものと推察し、本研究プロジェクトを立案した。

2. 研究の目的

表皮の角層の pH は通常酸性に保たれており、このことが透過性の皮膚バリアとしての恒常性維持、整然たる角層の凝集力、微生物に対する抵抗性、あるいは初期免疫応答などを制御している。しかしながら、皮膚の異常は角層の pH を上昇させること、アルカリ中和能の低下は感作を成立させやすいことが知られている。phospholipase A2 を介してリン脂質から合成される不飽和脂肪酸や表皮細胞のナトリウムプロトンチャンネル、フィラグリンの分解などが角層 pH の酸性化に寄与すると考えられているが、AD におけるこのような恒常性維持機構の制御と破綻については不明である。本研究では、皮膚の pH 変化が、前述の皮膚恒常性維持機構に与える影響を分子生物学的に検討し、AD の発症に繋がる皮膚バリア損傷初期〜かゆみ惹起の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

AD の発症に至る以前の、環境要因と皮膚バリア機構の異常を、pH 変化に焦点を当てて詳細に解析する。まず、皮膚の pH を変化させる環境要因を明らかにするために、さまざまな皮膚ストレスを与えて pH の変動を調べる。次に、組織培養系を用いて、皮膚の pH を人為的に変化させたときに、角層間脂質成分であるセラミドの合成や分解を制御する酵素の活性変化を解析する。また、細胞膜リン脂質から合成される不飽和脂肪酸について、pH 変化の影響を調べるとともに、その代謝産物であるプロスタノイドの生成プロファイルを分析する。さらに、皮膚バリアに

タンパク成分を供給するフィラグリンの合成あるいは分解に関与する酵素活性について、pH 変化の影響を明らかにする。最終的には、皮膚に対するストレス因子を緩和し至適 pH を保つことで、初期病変の発症や進行を抑制する新しいスキンケア法を提唱できる基礎的研究とすることを目的として以下の研究を実施した。

(1) 皮膚の pH を変動させる刺激の探索
皮膚にさまざまなストレス刺激を加え、経時的に pH の変化やアルカリ中和能を調べた。

(2) 皮膚の pH 変化と皮膚バリア構成要素の関係

皮膚の pH を変化させたときに、皮膚バリア構成要素であるフィラグリンや、表皮に局在するセリンプロテアーゼ、セラミド合成酵素（酸性スフィンゴミエリナーゼやβグルコセラブロシダーゼ）あるいは分解酵素（セラミダーゼ）の活性の変化を調べた。

(3) 皮膚の pH 変化と不飽和脂肪酸の合成
リン脂質から合成される不飽和脂肪酸が PPARγ の重要な内因性作動因子であることに着目し、AD における皮膚の不飽和脂肪酸合成の異常と PPARγ の初期炎症抑制機能が低下することの因果関係を解析した。具体的には、NC/Tnd マウスを使用して、発症前から発症初期における皮膚 pH の測定と不飽和脂肪酸の定量・定性を行うとともに、皮膚における PPARγ の発現と活性化を解析した。

(4) 皮膚の pH 変化とフィラグリン分解
皮膚組織培養により培養の温度、湿度、および pH を変化させることで、皮膚におけるフィラグリンの分解や関連する酵素の活性を調べた。

(5) 皮膚 pH の変化とかゆみの解析
かゆみを媒介する受容体の活性誘導酵素（トリプターゼなど）の作用と pH 変化の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) NC/Tnd マウスを用いた皮膚 pH 変動モデルの確立として、特定病原体フリー環境下 (SPF) で飼育し皮膚炎を発症しない NC/Tnd マウスにセロファンテープ着脱法を用いて皮膚ストレスを加え、皮膚 pH およびアルカリ中和能の変動を調べた。正常なマウスの皮膚 pH は弱酸性であるが、皮膚バリアを繰り返し損傷することで、皮膚 pH は上昇しアルカリ化した。同時に引っ掻き行動が誘発された。バリア損傷が修復すると、皮膚 pH は正常に復し、引っ掻き行動は収束した。アトピー性皮膚炎の発症に伴って、引っ掻き行動の増加と、皮膚 pH の上昇が認められた。

(2) NC/Tnd マウスを用いた皮膚 pH 変動モデルにおける皮膚酵素発現の網羅的解析

の一貫として、セリンプロテアーゼであるカリクレインファミリーに着目して検出を行った。皮膚炎の発症とともに皮膚 pH は上昇し、そのとき皮膚カリクレイン 5 の発現が亢進し、protease-activated receptor (PAR) 2 を活性化した。PAR2 の活性化により Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の発現が亢進していた。TSLP が樹状細胞の活性化を通して初期免疫応答を誘導することから、皮膚 pH の上昇は、アトピー性皮膚炎の初期病態形成に関与している可能性が示された。一方で、表皮に局在するカリクレイン 7 や 1 2 は変動が認められなかった。

(3) NC/Tnd マウスを用いて、皮膚炎発症前後の皮膚 pH の変化を解析した。正常なマウスの皮膚の pH は 5.5 前後であり、ヒトと同様に弱酸性を示している。また週齢が若いほど pH は 6 に近く、週齢が高くなるほどより弱酸性になることが明らかとなった。NC/Tnd マウスは SPF 環境で飼育するとアトピー性皮膚炎を発症しないが、このときの皮膚の pH は C57BL/6 マウスや BALB/c マウスと同様弱酸性であった。しかしながらコンベンショナル環境で飼育し皮膚炎を発症した NC/Tnd マウスでは病勢に依存して皮膚 pH が上昇した。このとき皮膚に存在するセラミド合成酵素の活性は減弱しセリンプロテアーゼの活性が上昇していた。皮膚炎を発症していない SPF NC/Tnd マウスの皮膚の弱アルカリ性の溶液を塗布して皮膚の pH を上昇させる処置をすると、皮膚バリア機能が低下し、かゆみが惹起されるとともに、Th2 型のアレルギー性炎症が惹起された。一方で、皮膚炎を発症しているコンベンショナル NC/Tnd マウスに弱酸性の溶液を塗布して上昇した皮膚の pH を下げる処置をすると、引っ掻き行動が減弱して皮膚炎が改善した。

(4) 得られた知見に関して、皮膚 pH と皮膚炎やかゆみの関係を調べるために、皮膚の組織培養法を用いて検討を行った。その結果、SPF NC/Tnd マウスから採取した皮膚組織を pH 8.3 に調整した培地で培養すると、表皮のカリクレイン 5 の活性化が上がり、TSLP の産生が誘導された。ここに PAR2 アンタゴニストを処理すると、TSLP の産生が阻害された。また、このときかゆみを誘導する IL-31 の真皮での産生が亢進していた。TSLP もかゆみを惹起するとの報告がある。これらのことから、pH の上昇は、カリクレイン 5 の活性を介して PAR2 を開裂し、TSLP の産生を誘導する結果、アレルギー性炎症やかゆみが惹起される可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(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 12 件)

(1) Amagai Y, Oida K, Matsuda A, Jung K, Kakutani S, Tanaka T, Matsuda K, Jang H, Ahn G, Xia Y, Kawashima H, Shibata H, Matsuda H, Tanaka A. Dihomo- γ -linolenic acid prevents the development of atopic dermatitis through prostaglandin D1 production in NC/Tnd mice. *J Dermatol Sci.* 2015 79:30-7. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.03.010. 査読有

(2) Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Jang H, Ahn G, Ishizaka S, Amagai Y, Oida K, Arkwright PD, Matsuda H. Ultra-pure Soft Water Ameliorates Atopic Skin Disease by Preventing Metallic Soap Deposition in NC/Tnd Mice and Reduces Skin Dryness in Humans. *Acta Derm Venereol.* 2015 doi: 10.2340/00015555-2083. 査読有

(3) Togawa Y, Kambe N, Shimojo N, Nakano T, Sato Y, Mochizuki H, Tanaka A, Matsuda H, Matsue H. Ultra-pure soft water improves skin barrier function in children with atopic dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. *J Dermatol Sci.* 2014 76:269-71. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.10.009. 査読有

(4) Higuchi H, Tanaka A, Nishikawa S, Oida K, Matsuda A, Jung K, Amagai Y, Matsuda H. Suppressive effect of mangosteen rind extract on the spontaneous development of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J Dermatol.* 2013 40:786-96. doi: 10.1111/1346-8138.12250. 査読有

(5) Kobayashi T, Hayakawa K, Tanaka A, Matsuda H. Increased expression of gelatinase and caspase activities in the skin of NC/Tnd mice: a model for atopic dermatitis. *Dermatitis.* 2013 24:254-5. doi:10.1097/DER.0b013e31829f2895. 査読有

(6) Amagai Y, Matsuda H, Tanaka A. Abnormalities in itch sensation and skin barrier function in atopic NC/Tnd mice. *Biol Pharm Bull.* 2013 36:1248-52. <http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00333> 査読有

(7) Jung K, Miyagawa M, Matsuda A, Amagai Y, Oida K, Okamoto Y, Takai M, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Ahn G, Tanaka A, Matsuda H. Antifungal effects of palmitic acid salt and ultrapure soft water on *Scedosporium apiospermum*. *J Appl Microbiol.* 2013 115:711-7. doi: 10.1111/jam.12298. 査読有

(8) Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Oida K, Nishikawa S, Jang H, Matsuda H. Heterogeneity of internal tandem duplications in the c-kit of dogs with multiple mast cell tumours. *J Small Anim Pract.* 2013 54:377-80. doi:10.1111/jsap.12069. 査読有

(9) Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Jang H, Kajiura N, Amagai Y, Oida K, Ahn G, Ohmori K, Kang KG, Matsuda H. Daily intake of Jeju groundwater improves the skin condition of the model mouse for human atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2013 40:193-200. doi:10.1111/1346-8138.12055. 査読有

(10) Ahn G, Bing SJ, Kang SM, Lee WW, Lee SH, Matsuda H, Tanaka A, Cho IH, Jeon YJ, Jee Y. The JNK/NFkappaB pathway is required to activate murine lymphocytes induced by a sulfated polysaccharide from *Ecklonia cava*. *Biochim Biophys Acta.* 2013 1830:2820-9. doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.008. 査読有

(11) Matsuda A, Tanaka A, Pan W, Okamoto N, Oida K, Kingyo N, Amagai Y, Xia Y, Jang H, Nishikawa S, Kajiura N, Ahn G, Ohmori K, Matsuda H. Supplementation of the fermented soy product ImmuBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J Dermatol Sci.* 2012 67:130-9. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.05.011 査読有

(12) Tanaka A, Amagai Y, Oida K, Matsuda H. Recent findings in mouse models for human atopic dermatitis. *Exp Anim.* 2012 61:77-84. <http://doi.org/10.1538/expanim.61.77> 査読有

[学会発表] (計16件)

(1) 松田浩珍 アトピー性皮膚炎の新しい治療戦略—高純度軟化水による皮膚バリア修復— 日本比較臨床医学会 2015年3月1日 東京農工大学(東京都・府中市)

(2) Tanaka A, Matsuda H, et al. Involvement of skin surface pH on development of atopic dermatitis 日本研究皮膚科学会 2014年12月12日 ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

(3) Tanaka A, Matsuda H, et al. Relevance between skin condition and itch during development of atopic dermatitis. 24th International Symposium of Itch 2014年10月18日 ベルサール神保町(東京都・千代田区)

(4) 松田浩珍、田中あかね、他 皮膚 pH の変化と皮膚バリア損傷との関連 日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月 11 日 北海道大学 (北海道・札幌市)

(5) Matsuda H, Tanaka A, et al. Effect of ultra-pure soft water on atopic dermatitis in children. EAACI 2014 2014 年 6 月 10 日 コペンハーゲン (デンマーク)

(6) Matsuda H, Tanaka A, et al. Involvement of skin surface pH on barrier function in development of atopic dermatitis. EAACI 2014 2014 年 6 月 10 日 コペンハーゲン (デンマーク)

(7) 松田浩珍、田中あかね、他 アトピー性皮膚炎における皮膚 pH 調節の重要性 日本獣医学会学術集会 2013 年 9 月 22 日 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

(8) 松田浩珍、田中あかね、他 カジメに含まれる dieckol のアトピー性皮膚炎に対する治療効果 2013 年 9 月 22 日 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

(9) 松田浩珍、田中あかね、他 アトピー性皮膚炎の皮膚における HIF-1 α の発現について 日本獣医学会学術集会 2013 年 9 月 20 日 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

(10) Matsuda H, Tanaka A, et al. Influence of the potential hydrogen on skin barrier function and immune responses in NC/Tnd mice, a model for human AD. EAACI 2013 2013 年 6 月 13 日 ミラノ (イタリア)

(11) Matsuda H, Tanaka A, et al. House dust mite allergens induce IgE-independent activation of canine mast cells NI-1. EAACI 2013 2013 年 6 月 13 日 ミラノ (イタリア)

(12) 松田浩珍 モーションキャプチャーによるバイオマーカーの探索 第 5 回レドックルライフイノベーションシンポジウム 2013 年 3 月 7 日 味の素株式会社川崎事業所 (東京都・川崎市) (招待講演)

(13) Matsuda H, Key factors for success in industry-university collaboration. AUTM 2013 2013 年 2 月 28 日 サンアントニオ (アメリカ)

(14) Tanaka A, Matsuda H, et al. Involvement of daily metallic soap in skin conditions of patients with atopic dermatitis. Skin Allergy Meeting 2012 2012 年 11 月 30 日 ベルリン (ドイツ)

(15) Tanaka A, Matsuda H, et al. Pain sensitivity in NC/Tnd mice with atopic dermatitis. 22nd International Symposium of Itch 2012 年 10 月 6 日 ベルサール神保町 (東京都・千代田区)

(16) 松田浩珍、田中あかね、他 アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける皮膚 pH と皮膚バリア損傷の関連性 日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 14 日 岩手大学 (岩手県・盛岡市)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

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

[その他]

ホームページ等

http://www.tuat.ac.jp/~mol_path/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 浩珍 (MATSUDA, Hiroshi)

東京農工大学大学院農学研究院・教授

研究者番号：80145820

(2) 研究分担者

田中 あかね (TANAKA, Akane)

東京農工大学大学院農学研究院・教授

研究者番号：80418673

大森 啓太郎 (OHMORI, Keitaro)

東京農工大学大学院農学研究院・講師

研究者番号：20466915

松田 彬 (MATSUDA, Akira)

東京農工大学大学院農学研究院・助教

研究者番号：90613969

(3) 連携研究者

該当なし