

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06802

研究課題名(和文) 関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚発現メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Study on the mechanism of dry skin induction in arthritis model mice

研究代表者

大井 一弥 (Ooi, Kazuya)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：40406369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節炎マウスにおいてマスト細胞の増殖がc-kit抗体により阻害され、乾燥皮膚への影響が確認できた。また、皮膚中のコラーゲンの減少、マスト細胞数の増加が抑制された。さらにTSLPや好中球、活性酸素などの因子が関わっていた。次いで樹状細胞の刺激により分化するTh2細胞およびTh17細胞で検討した。Th2阻害薬およびTh17阻害薬投与後、乾燥皮膚が改善された。Th2阻害薬を投与した関節炎マウスでは、非投与関節炎マウスよりIL-6、TNF- $\alpha$ が低下し、Th17阻害薬投与では皮膚中マスト細胞数が減少した。Th2細胞およびTh17細胞では、異なる機構で乾燥皮膚発現が誘導されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ患者において症例報告が散見される乾燥皮膚に着目した。関節炎においてマスト細胞が乾燥皮膚の誘導に関わる点については、すでに報告した消化器疾患モデルマウスでの現象と類似するが、TSLPやグルココルチコイド、樹状細胞などが関わる点については、関節炎特有の乾燥皮膚の誘導メカニズムであると考えられた。次に非ステロイド性抗炎症薬を関節炎マウスに投与することで、関節炎から誘導される乾燥皮膚が抑制されるかについて検討している。これらの知見も踏まえて、疾患によって乾燥皮膚の誘導メカニズムが異なる可能性が提示され、疾患ごとに適正な乾燥皮膚対策を講じることが可能な科学的根拠となるものと確信している。

研究成果の概要(英文)：In arthritic mice, mast cell proliferation was inhibited by the c-kit antibody, and the effect on dry skin was confirmed. In addition, the decrease in collagen in the skin and the increase in the number of mast cells were suppressed. Furthermore, factors such as TSLP, neutrophils, and active oxygen were involved. Next, we examined Th2 cells and Th17 cells that differentiated by stimulation of dendritic cells. Dry skin improved after Th2 and Th17 inhibitors. Arthritis mice treated with Th2 inhibitors had lower IL-6 and TNF- $\alpha$  than non-treated arthritic mice, and Th17 inhibitor administration reduced the number of mast cells in the skin. It was suggested that Th2 cells and Th17 cells induce dry skin expression by different mechanisms.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾燥皮膚 皮膚バリア機能 マスト細胞 コラーゲン TSLP

## 1. 研究開始当初の背景

本邦は、高齢化により炎症性疾患が増加しており、関節炎患者の急増も例外ではない。関節炎患者は、QOL 低下をもたらす症状の一つとして乾燥皮膚が知られている。

関節炎の皮膚病変は、病態に基づく血管炎の皮膚症状や循環障害性の皮膚症状が多く、自己免疫疾患との合併で発症する皮膚症状も特徴的である。しかし、これまでは関節炎患者が全身性の乾燥皮膚を訴えても、関節および皮膚領域における従来の各々の治療が行なわれることが一般的であり、関節炎と乾燥皮膚との関連性について言及されてこなかった。

本研究は、関節部位で誘発される因子が皮膚構造を乱す機構を解明し、乾燥皮膚の発現メカニズムを探索する。

皮膚は、体内と外界を隔て、生体内の水分を保持する働きや外部刺激から諸器官を守るバリアとしての働きがある。皮膚バリア機能が低下した状態である乾燥皮膚は、経表皮水分喪失量 (Transepidermal water loss: TEWL) の上昇や角層水分量の低下がみられることが知られており、痒みを生じるきっかけとなる。これまでに我々は、小腸炎や大腸炎などの消化器疾患モデルマウスにおいて、乾燥皮膚を引き起こすという報告を行ってきた。

我々は、次いで消化器以外関節炎に着目し、乾燥皮膚の誘導にどのようなメカニズムが関わるかについては明らかではない。関節炎患者における皮膚には、皮膚潰瘍をはじめとして結節や乾皮症など様々である。そのうち、乾燥皮膚が見られることは、臨床において症例報告が散見される程度でメカニズムは明らかではない。

## 2. 研究の目的

関節リウマチモデルであるコラーゲン誘発関節炎モデルマウスにおいて、乾燥皮膚発現の再現性について確認し、関節炎における乾燥皮膚発現へのマスト細胞の影響を明らかにする。次いで関節炎の乾燥皮膚におけるマスト細胞活性化に、TSLP、好中球、ROS が関与している可能性について検証する。それには、TSLP 抗体抗好中球抗体活性酸素を除去する N-acetyl cysteine (NAC) をそれぞれ投与し、マスト細胞活性化への影響を確認する。グルココルチコイド受容体遮断薬 (RU486: mifepristone) を投与し、ストレスホルモンであるグルココルチコイドの関節炎における乾燥皮膚の発現の関与についても検討を行なう。最後にマスト細胞を中心とした検討からマスト細胞以外の免疫担当細胞が関節炎における乾燥皮膚誘導に関わるかについて検討を行なう。また、樹状細胞は Th1 細胞や Th2 細胞に加えて IL-17、IL-21 や IL-22 産生細胞として新たに発見された Th17 細胞を活性化する。Th17 細胞から放出される IL-17 は、アレルギー性皮膚炎に影響を及ぼすことが知られており、樹状細胞によって Th0 細胞から分化される Th2 細胞および Th17 細胞は、関節炎により誘導される乾燥皮膚発現について検討を行なう。

## 3. 研究の方法

### 1. 実験動物

関節リウマチの病態を模倣したモデルマウスとして、DBA/1J コラーゲン誘導関節炎マウスを使用した。

### 2. マウス皮膚の TEWL の測定

Tewameter®TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) を用いて、TEWL を測定した。

### 3. マウスの血液および皮膚組織の採取

麻酔後、心臓から約 1 mL の血液を採取した。次いで背部皮膚組織を採取し、-80 °C で凍結保存した。

### 4. 組織染色

採取した皮膚組織の一部は免疫組織の評価用として、パラホルムアルデヒド溶液にて固定した。固定した皮膚組織は Tissue-Tek O.C.T. Compound を用いて凍結包埋し、5 μm の厚さでミクロトームにて薄切を行った。薄切した切片は HE 染色後、光学顕微鏡にて組織学的評価を行った。

### 5. ウエスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析

採取した背部の皮膚組織 100 mg を細かく刻んだ後、組織用懸濁試薬に浸漬し、氷上にてハンドミキサーを用いて、ホモジナイズ (20,000 rpm, 60 秒) した。懸濁液を遠心分離後、解析まで -80 °C で保存した。上清サンプルを溶解後、電気泳動を行った。電気泳動されたタンパク質は iBlot 2 Dry blotting system を用いて、25V の定電圧を 6 分間かけてニトロセルロース膜に転写し、4 °C で一晩、5% スキムミルクにてブロッキングを行った。ブロッキング後、25 °C で 1 時

間、1次抗体としてウサギ抗 I 型コラーゲン抗体、ウサギ抗 IV 型コラーゲン抗体、ウサギ抗 MMP-1 抗体、ウサギ抗 MMP-9 抗体、マウス抗  $\alpha$ -アクチン抗体でそれぞれ反応させたのち、2次抗体で処理を行った。免疫複合体は化学発光試薬であるイムノスターゼータで処理したのちに、lumino-image analyzer を用いて検出した。

#### 6. 血中ヒスタミン濃度の測定

心臓から採取した血液サンプルを遠心分離後、血漿を採取した。血中のヒスタミン濃度は、ELISA kit を用いて測定した。ヒスタミンにトレースしたアセチルコリンエステラーゼをマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

#### 7. 血中分子マーカーの濃度測定

心臓から採取した血液サンプルを遠心分離後、血漿を測定に用いた。血漿中の TSLP、IL-6、ヒスタミン、コルチコステロン濃度は、それぞれの ELISA kit を用い、ROS は Oxyselct™ in vitro ROS/RNS 測定キットをマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

## 4. 研究成果

まず我々は、関節炎モデルマウスの乾燥皮膚発現の再現性について確認し、関節炎における乾燥皮膚発現へのマスト細胞の影響を明らかにした。

コントロールマウスと比較して関節炎マウスでは TEWL が上昇し、乾燥皮膚が生じた。また、関節炎マウスにおける皮膚中の I 型および IV 型コラーゲンは低値であり、それらの分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP)-1 および MMP-9 は高値であった。さらに、関節炎マウスの皮膚におけるマスト細胞数および血漿中におけるヒスタミン量は増加した。これらのことから、関節炎マウスにおける乾燥皮膚発現にマスト細胞の関与が考えられたため、マスト細胞の増殖に関わる c-kit の抗体を関節炎マウスに投与することで、マスト細胞の増殖を阻害し、乾燥皮膚への影響を確認した。その結果、上昇していた TEWL を低下させ、関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善した。

マスト細胞を活性化する因子には Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、その上流にある Reactive oxygen species (ROS) と考えられ、TSLP はストレスホルモンであるグルココルチコイドからの影響も受ける。それら因子の影響を確認するために、抗 TSLP 抗体、抗好中球抗体、活性酸素を除去する N-acetyl cysteine (NAC)、グルココルチコイド受容体遮断薬 (RU486: mifepristone) をそれぞれモデルマウスに投与した。それらの投与により、関節炎マウスにおける皮膚中マスト細胞数は減少し、乾燥皮膚は改善した。さらに、NAC の投与に加えて RU486 を併用した場合は、より一層の乾燥皮膚の改善と皮膚中マスト細胞数および血漿ヒスタミン濃度の減少効果が得られた。

我々は、TSLP から刺激を受けるマスト細胞以外の免疫担当細胞として樹状細胞に着目し、樹状細胞の刺激により分化する Th2 細胞および Th17 細胞が関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に与える影響を検討した。Th2 阻害薬および Th17 阻害薬を投与した際、関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善された。Th2 阻害薬を投与した関節炎マウスでは無投与の関節炎マウスと比較して IL-6 および TNF- $\alpha$  が低下した。また、Th17 阻害薬を投与した関節炎マウスでは、TEWL が低下しており、血中 IL-17 や皮膚中マスト細胞数が減少した。以上のことから、樹状細胞により分化が促進されるヘルパー T 細胞といえども、Th2 細胞および Th17 細胞それぞれに異なるメカニズムで乾燥皮膚の発現を誘導することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 1.Masataka Deguchi , Hidehiko Jose , Keigo Nishida , Kazuya Ooi	4. 巻 140
2. 論文標題 Transepidermal Water Loss (TEWL)-decreasing Effect by Administration of Zinc in the Elderly People	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 313-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuya Ooi	4. 巻 139
2. 論文標題 Protection of the Skin Barrier Function in Inflammatory Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 1553-1556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00181-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Goto, Keiichi Hiramoto, Kazuya Ooi	4. 巻 42
2. 論文標題 Th2 and Th17 Induce Dry Skin in a Mouse Model of Arthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 468-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto K, Hiramoto K, Ooi K	4. 巻 42
2. 論文標題 Th2 and Th17 Induce Dry Skin in a Mouse Model of Arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 468-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00803.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekijima H, Goto K, Hiramoto K, Komori R, Ooi K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Characterization of dry skin associating with type 2 diabetes mellitus using a KK-Ay/TaJcl mouse model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cutan Ocul Toxicol.	6. 最初と最後の頁 391-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15569527.2018.1490746. Epub 2018 Jul 31.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto K, Hiramoto K, Kawakita M, Yamaoka M, Ooi K.	4. 巻 31
2. 論文標題 The influence of reactive oxygen species and glucocorticoids on dry skin in a mouse model of Arthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Skin Pharmacol Physiol.	6. 最初と最後の頁 188-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000488250. Epub 2018 Apr 26.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto K, Hiramoto K, Kita H, Ooi K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Role of mast cells in the induction of dry skin in a mouse model of rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cutan Ocul Toxicol.	6. 最初と最後の頁 61-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15569527.2017.1337784. Epub 2017 Jun 21.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 五藤健児, 平本恵一, 大井一弥
2. 発表標題 デキストラン硫酸ナトリウム誘導性潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する高用量ビタミンC投与による改善効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出口昌孝, 平岡純, 西田圭吾, 安井裕之, 町田博文, 大井一弥
2. 発表標題 血液透析患者の掻痒と血中微量元素の関連
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五藤健児, 平本恵一, 高田偉隠, 大井一弥
2. 発表標題 関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚発現に対するグルココルチコイドの影響
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五藤健児, 平本恵一, 大井一弥
2. 発表標題 好中球が関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五藤健児, 平本恵一, 大井一弥
2. 発表標題 関節炎における乾燥皮膚には樹状細胞が関与する
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五藤健児、平本恵一、山岡実由、大井一弥
2. 発表標題 関節炎モデルマウスの乾燥皮膚誘導における活性酸素の役割
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------