

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591315
 研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎における、神経ペプチドの in vivo における関与の検討
 研究課題名（英文） Role of neuropeptide stress in atopic dermatitis.

研究代表者

Bae Sangjae (BAE SANGJAE)
 長崎大学・医学部・歯学部附属病院・医員
 研究者番号 90325647

研究成果の概要：

1年目にはアトピー性皮膚炎病変部皮膚でのストレス誘発性神経伝達物質であるサブスタンスPと発現の解析とアトピー性皮膚炎由来末梢血単核球におけるNEPの発現の検討を行った。結果、サブスタンスPはアトピー性皮膚炎の皮疹部と末梢血単核球に多く存在し、アトピー性皮膚炎を増悪する因子であることを確認した。2年目は、サブスタンスP誘導性皮膚炎症のin vivoにおける解析を行った。接触皮膚炎マウスにストレス(振動と低周波)を9日間加えて検討した結果、ストレスを加えたマウスにはサブスタンスP、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4などを介して接触皮膚炎を増強した。さらに、このストレスは接着分子の中でL-selectinを介して皮膚炎症を増強することも確認できた。以上よりアトピー性皮膚炎の増悪因子であるストレス、サブスタンスP、接着分子のL-selectinなどが治療のターゲットとして考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、慢性再発性の湿疹性病変の炎症性疾患であり、QOLを著しく障害するため、早急な病因・病態の解明と、それに基づいた新しい治療法の開発が求められている。その病因まだ不明であるが、Th2型のヘルパーT細胞の関与を示唆する説、これとは逆にTh1の関与が慢性化に重要とする説、

免疫異常ではなく皮膚バリア機能の異常が一義的な原因とする説など様々な仮説が提唱されている。近年、アトピー性皮膚炎の増悪因子として心理的要因の関与が注目を集めている。事実、研究代表者らの研究グループが、1995年から行っている長崎大学新生におけるアトピー性皮膚炎の実態調査でも、ストレスを増悪因子にあげる学生が増え、

発汗、乾燥、ダニやハウスダストについて4番目となっている。さらにストレスを増悪因子にあげる割合は、調査開始時期に比べ年々上昇している。またState-Trait Anxiety Inventory (STAI : 状態・特性不安検査)を用いた心理テストでも、治療に伴い状態不安が軽減されていくことを研究代表者らの研究グループは明らかにしている。また、これら精神的ストレスはアトピー性皮膚炎に伴う免疫異常を増強しうる可能性が示されつつある。つまり、人前で仕事に関する4分間のスピーチと、4分間の引き算の繰り返しによる暗算を行うと、1分後には血液中の好酸球数が増加し、さらに1日後には血清中総IgE値が上昇することが報告されている。このように精神的ストレスはアトピー性皮膚炎で従来観察されていた器質的な異常を増強することによって、その病態に密接に関与していることが示唆されている。また過労などの肉体的なストレスが皮膚炎を増加させることもよく知られている。しかしながら、なぜ肉体的、精神的なストレスが、このようにアトピー性皮膚炎の免疫異常を増悪するのかという分子機序は不明であり、ストレスによる増悪を抑制しうる治療の分子ターゲットも未だに明らかにされていない。

神経系と免疫系には、双方向性の相互作用を有するシステムが存在することが近年注目を集めている。つまり、免疫反応は神経の機能を変化させ、逆に神経活動は免疫機能を変調させることが明らかにされつつある。この免疫系と神経系のクロス・トークは、共通の生化学的言語、特に神経ペプチドによって担われている。サブスタンスP (SP)は、脊髄後根神経節で合成され、末梢神経および中枢神経両方で神経伝達分子として働く神経ペプチドである。サブスタンスPは、皮膚の感覚神経より放出され、その結果皮膚局所の神経原性の炎症を惹起することが知られている。さらに重要なことは、精神的ストレスが加わると神経末端よりSPが放出されることが示されている。加えて、サブスタンスPは肥満細胞からのヒスタミンの遊離、ケラチノサイトやT細胞の細胞接着分子の増強、IL-1などの炎症性サイトカイン産生誘導、B細胞からの抗体産生増強などの免疫を制御する機能を有することも明らかにされている。これらの作用より、サブスタンスPは精神的ストレスと、アトピー性皮膚炎に伴う皮膚の炎症反応を結びつける分子となる可能性が推定される。

研究代表者は、初めてサブスタンスPが神経細胞のみならず非神経細胞である皮膚角

化細胞より産生されることを報告している¹⁾。また培養真皮線維芽細胞をサブスタンスPで刺激すると、好酸球浸潤を誘導するケモカインであるエオタキシンの産生増強がみられること²⁾や、サブスタンスPを始めとする神経伝達分子の分解酵素であるneutral endopeptidase (NEP)の発現増強を見いだしている³⁾。さらに、アトピー性皮膚炎患者において、治療前後で血漿中のサブスタンスPやNEPについて検討したところ、治療前に比べ治療後に、症状の軽快に伴い、血漿サブスタンスPの減少や末梢血単核球でのNEP mRNAの発現増強を見いだしている。これらの結果は、サブスタンスPはアトピー性皮膚炎に伴う皮膚アレルギー反応に深く関与している可能性を示している。

2. 研究の目的

ヒトなど有酸素呼吸を行う生物は、酸素の還元反応に伴って生じる活性酸素に常に暴露されており、その活性酸素はアミノ酸の酸化、脂質の過酸化、DNAの酸化修飾、アポトーシスなどを引き起こし、生体に組織障害をもたらす重要な因子として注目を集めている。この活性酸素がもたらす組織障害は酸化ストレスと総称され、正常の有酸素呼吸時以外にも、炎症、細菌感染症、紫外線照射などによって過剰に発生し、組織障害を直接惹起していることが明らかにされている。研究代表者はアレルギー性皮膚炎において、サブスタンスPの前駆体とiNOSの発現増強を報告している⁴⁾。この結果はアレルギー性皮膚疾患において、NOとサブスタンスPの相互作用が重要な役割を担っている可能性を示しており、サブスタンスPによる神経原性の皮膚炎症を考える上で、NOに代表される酸化ストレスの関与を検討することは重要となる。今回、ストレスが生体にどのような機序で皮膚炎症に関与しているのかをサブスタンスPをはじめ様々な炎症性メディエーターと細胞接着分子を用いて検討した。

3. 研究の方法

今回、われわれは、オキサゾロン接触皮膚炎マウス(感作は背中、惹起は耳)を用いて、ストレスマウスモデルを作成した。前述の如く、サブスタンスP、酸化ストレスはアトピー性皮膚炎において、肉体的、心理的ストレスによる神経原性の皮膚炎症を惹起する候補分子である。本研究では、肉体的なストレス(短時間50mlチューブにマウスを拘束)1日間と、精神的なストレス(400Hz音波と振動)を2日間と9日間与えたストレス触皮膚

炎のマウスモデルを作成し、ストレスにおける皮膚炎の増幅有無をサブスタンスP、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4を用いて解析した。さらに皮膚炎症に深く関与している細胞接着因子（L-selectin、E-selectin、P-selectin）の欠損マウスを用いて、同様にストレスマウスを作成し、ストレスと接着分子との関連を検討した。

4. 研究成果

図1は、各マウスの耳を生検して、HE、toluidine、dylon染色を行った結果である。非ストレスマウスに比し、ストレスを与えたマウスの皮膚浮腫と炎症は著明に増幅した。またストレスを与えた日数と皮膚炎症は比例する傾向であった。さらに皮膚炎症は、耳の浮腫のみならず浸潤細胞（肥満細胞と好酸球）とも相関関係が認められた（図は表示されない）。このことより、接触皮膚炎マウスにおいて、ストレスは皮膚炎症を増幅したことが明らかになった。

次に、どのような因子がストレスに誘導され、皮膚炎症を増幅したのかを9日間ストレスを負荷したマウスの耳と非ストレスのマウスの耳を用いて、サブスタンスP、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4 mRNAの発現をReal time PCRにて比較検討した（図2）。結果は、ストレスマウスの耳において、上記の全てのメディエーターの発現が増強した。今までの結果より、ストレスは少なくともサブスタンスP、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4を介して肥満細胞と好酸球の浸潤を誘導し、局所皮膚炎症に深く関与していることが示唆された。

図3は、ストレスが皮膚炎症に深く関与している細胞接着分子とどのような関連性を有するかをL-selectin、E-selectin、P-selectinの欠損マウスを用いて検討した結果である。コントロールマウスの耳に比べて、ストレス負荷後のE-selectin、P-selectin欠損マウスの耳は有意な炎症の差は認めなかったが、L-selectin欠損マウスの耳は、明らかに耳の炎症は減弱した。このことより、ストレスは接着分子の中で主にL-selectinを介して細胞の遊走や炎症に関与する可能性があるのではないかと考えた。さらにL-selectinのストレスへの関与を検討するためにL-selectinの抗体をマウスに注射してストレスを負荷したところ、L-selectin欠損マウスのように明らかに耳の炎症が減弱した（図は示さない）。

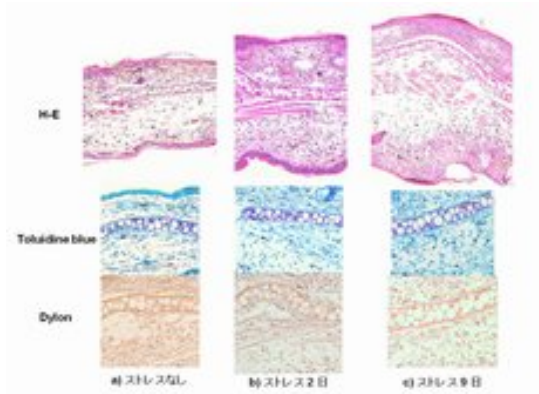


図1. 接触皮膚炎マウスにおけるストレスを負荷(2日と9日)後の皮膚炎症の増幅（耳におけるHE、toluidine、dylon染色）

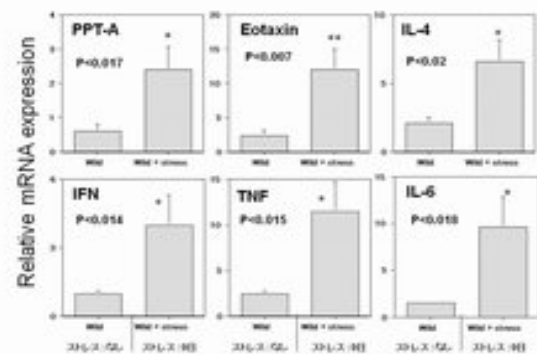


図2. ストレス負荷(9日間)後の耳におけるサブスタンスP、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4 mRNAの発現(Real time PCR)の比較検討

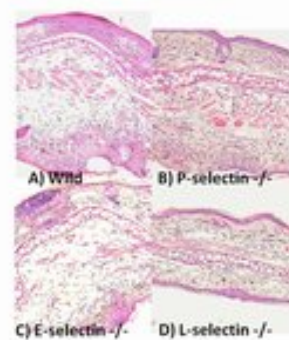


図3. L-selectin、E-selectin、P-selectinの欠損マウスにおけるストレス負荷(9日間)後の皮膚炎症(耳)

ストレスにて遊離されると知られているサブスタンスPを精神的ストレスとアトピー性皮膚炎における皮膚炎症とを結びつける分子として考え、今回、われわれは接触皮膚炎マウスモデルを用いて、ストレスマウスを作成し、in vivoでストレスがどのような機序で皮膚炎症に関与しているかを解析した。

図1は、ストレスにて明らかに局所の炎症が増幅され、また同じストレスでもストレスを

与えた期間にて皮膚炎症が増幅されることを示唆している。ストレス増幅性炎症には、肥満細胞と好酸球も重要な役割を担っていることも明らかになった。さらに図2の結果よりストレスにて増幅した皮膚炎症には、サブスタンスP、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4の発現が増強しており、少なくともストレス誘導性皮膚炎症にはこれらの因子が深く関与していることは確認できた。局所の皮膚炎症には、必ず細胞接着分子が関与していることはよく知られている。近年の報告にてストレスは樹状細胞を成熟、活性化し、ICAM-1などの細胞接着分子の発現にも深く関与していることが明らかになっている⁵⁾。今回ストレスにて増幅される皮膚炎症に、どのような細胞接着分子が関与しているのかをL-selectin、E-selectin、P-selectinの欠損マウスを用いて検討した結果、図3は上記の細胞接着の中で、L-selectinのみがストレスと深く関与していることを示している。以上の結果より、ストレスはマウス接触皮膚炎モデルにおいて、皮膚局所にサブスタンスPをはじめ、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4などの炎症メディエーターと共に細胞接着分子であるL-selectinを介して皮膚炎症を増幅する可能性があると考えられた。このことより、ストレスにて増悪するアトピー性皮膚炎において、サブスタンスP、エオタキシン、IFN、TNF、IL-6、IL-4などの炎症メディエーターとL-selectinは新しい治療の目標となると考えている。

文献

- 1) Bae SJ et al: Autocrine induction of substance P mRNA and peptide in cultured normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 263(2): 327-33, 1999
- 2) Bae SJ et al: Inhibitory effect of cetirizine on histamine-induced eotaxin production in normal human fibroblast. *Curr Ther Res Clin E* 63: 128, 2002
- 3) Bae SJ et al.: Substance P induce Preprotachykinin-A mRNA, Neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Allergy Immunol* 127:316,2002
- 4) Bae SJ et al.: Topical glucocorticoid augments scratching behavior in dinitrofluorobenzene-sensitized mice by induction of substance P. *Exp Dermatol* 13: 780, 2004
- (5) Joachim RA et al: Stress-induced neurogenic inflammation in murine skin skews dendritic

cells towards maturation and migration: key role of intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function-associated antigen interactions. *Am J Pathol* 173(5): 1379-88, 2008.

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 0件)

現在 American Journal of Pathology に投稿中である。

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Bae Sangjae (BAE SANGJAE)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号 90325647

(2) 研究分担者

竹中 基 (BAE SANGJAE)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号 30281207

清水 和宏 (SHIMIZU KAZUHIRO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 80170968

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 20215792