

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08742

研究課題名(和文)炎症後色素沈着の病態解明と新規治療法の開発：モデルマウスを使用した解析

研究課題名(英文) A mouse model for postinflammatory hyperpigmentation: an analysis of molecular, and histological traits, and an establishment of effective treatment.

研究代表者

鈴木 民夫 (Suzuki, Tamio)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30206502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：露出部の炎症後色素沈着(PIH)は、患者のQOLを著しく低下させるにもかかわらず、その病態が解析されておらず、有効な治療法も確立されていない。そこで、我々はヒト型皮膚を持つ遺伝子改変マウス(hk14SCF Tg-HRMマウス)を使用して、PIHモデルマウスを確立した。そして、PIHの病態を化学的、免疫組織学的、電子顕微鏡的に解析したところ、主原因は真皮に滴落したメラニンの代謝速度が遅い事、その代謝の中心的な役割を担っているのが一部のマクロファージであることを明らかにした。我々のPIHモデルマウスの確立が今後PIH研究の飛躍的発展のきっかけになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎などの各種皮膚炎症性疾患において、まずはその炎症をコントロールすることが重要であるが、病勢が治まったのちに残る炎症後の色素沈着(PIH)については、有効な治療法もない。顔面や頸部、手背等の露出部位に見られるPIHは、患者のQOLを著しく低下させ、時には社会活動も大きく障害する。特に若年者においては、健全な精神的発育を阻害することすらありうる。本研究の大きな成果であるPIHモデル動物の確立は、PIHの病態解明を飛躍的に躍進させ、今後の新規治療法の確立の大きな原動力になりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：Although post-inflammatory hyperpigmentation (PIH) in exposed areas significantly reduces the patient's quality of life, its pathology has not been analyzed and no effective treatment has been established. Therefore, we established a PIH model mouse using a transgenic mouse (hk14SCF Tg-HRM mouse) with human-like skin, and analyzed the pathophysiology of PIH with chemical, immunohistological, and electron microscopic methods. The results showed that the main cause of PIH was the slow metabolism of melanin dropped on the dermis, in which a subpopulation of macrophages would play a central role in its metabolism. It is expected that the establishment of our PIH model mouse will trigger the dramatic development of PIH research in the future.

研究分野：皮膚科学、色素異常症

キーワード：モデルマウス アトピー性皮膚炎 メラニン代謝 マクロファージ メラニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎などの各種皮膚炎症性疾患や尋常性ざ瘡等においては、病勢が強い時にはまずはその炎症をコントロールすることは非常に重要であり、そのための多くの研究がなされてきた。しかし、病勢が治まったのちに残る**炎症後の色素沈着 (Post-Inflammatory Hyperpigmentation : PIH)**については、病態に関してほとんど明らかにされておらず、病態論に基づいた有効な治療法もない。過去の論文では、PIHの患者からの生検標本を使用した観察で表皮のメラニン合成が亢進していること、真皮上層へのメラニンの滴落がありそれをマクロファージが取り込んでいることなどが報告されている程度であり、そこに介在している分子についてはごく一部が26年前に報告されたのみである。顔面や頸部、手背等の露出部位に見られるPIHは、患者のQOLを著しく低下させ、時には社会活動も大きく障害する。特に若年者においては、場合によっては健全な精神的発育を阻害することすらありうる。

これまで十分な病態解明が行われてこなかった理由の1つとして、PIH研究に適切なモデル動物が確立されていないことがあげられる。野生型マウスでは、ヒトの皮膚と異なり表皮にメラノサイトが存在せず、表皮ケラチノサイトにメラニンは沈着していない。そのためマウスの皮膚に炎症を惹起することはできても、PIHを発症させることはできない。これまでに実験系としては、ヒト皮膚を用いた *in vitro* モデルの報告が散見されるのみである。モデル動物の確立は、PIHの病態解明を飛躍的に躍進させ、新規治療法の確立の大きな原動力になりうると思われる。

## 2. 研究の目的

PIHモデルマウスを確立して病態解明を行い、病態に基づいた治療法を確立することである。

- (1) 本研究の最大の特徴はPIHのモデルマウスを作成し、研究に用いることである。色素異常症の研究は、ヒトとマウスの皮膚の違いにより、モデル動物として野生型マウスを用いることができず、その方法論において制限が多かった。その様な状況において、本研究におけるhk14SCF Tg-HRMマウスを使用したPIHモデルマウスの作成・使用はその制限を打ち破るものである。hk14SCF Tg-HRMマウスは、ヒトの皮膚と同様の頻度で表皮にメラノサイトを保持し、表皮ケラチノサイトにメラニン沈着を認める。そして、さらにヘアレス化したマウスであり、マウスの体幹の皮膚はヒトの顔面の皮膚によく似た構造をしている。このhk14SCF Tg-HRMマウスの体幹にPIHを安定的に発症するPIHマウスを作成する条件を確立する。
- (2) PIHモデルマウスを用いてPIHの病態解明を行う。
- (3) PIHモデルマウスを用いて、科学的エビデンスを伴ったPIHに対する有効な新規治療法を確立するとともに既存の治療法の有効性を検証する。

## 3. 研究の方法

炎症後色素沈着マウスを使用して、3年間にその病態解明と新しい治療法の開発と既存の治療法の有効性を検証する。例えば、重症のアトピー性皮膚炎の患者では、皮膚炎のコントロールが良好になってもなお数年間は患部にPIHが残存している。なぜこのように皮膚におけるメラニン色素の消褪に長時間がかかるのか？言い換えれば、皮膚におけるメラニン代謝機構を明らかにする。

- (1) 急性炎症後と慢性炎症後のモデルマウスにそれぞれ発症したPIHについて、免疫組織学的解析、分子生物学的解析によりサイトカイン環境に違いがあるかどうかを解析する。ま

た、免疫組織学的解析や電子顕微鏡的観察により、サイトカイン環境の違いによる表皮におけるメラニン合成促進や真皮へのメラニン滴落の程度、さらに炎症細胞の出現パターンの違いを明らかにする。

- (2) PIH 病変から採取した皮膚を表皮と真皮に分離して、それぞれのメラニン量を化学的、および画像解析に定量する。そして、それらの結果を比較検討する。つまり、定量法を確立する。
- (3) モデルマウスにおける PIH の時間的変化を観察する。組織学的に表皮、真皮それぞれのメラニン量を定量し、その推移を明らかにする。また、real-time RT-PCR でサイトカインやメラニン合成に影響を与える各種シグナル分子を経時的に定量し、メラニン分解を亢進させるキーとなるシグナルを分子生物学的に明らかにする。
- (4) PIH の真皮に現れるメラニン含有細胞の性状、特徴を明らかにする。マクロファージが主役を担うと言われているが、最近の研究ではマクロファージには組織固定型と遊走型を含む複数のサブタイプがあり、どちらのタイプが関与しているのか？さらに、マクロファージ内のメラニンおよびメラノソーム代謝について観察する。また、真皮線維芽細胞もメラニン代謝に関連していると思われるが、線維芽細胞には少なくとも5種類のサブタイプが存在すると報告されている。メラニンを含んだ線維芽細胞の特徴を電子顕微鏡による観察、および各種マーカーに対する抗体を用いた免疫組織学的検討により明らかにする。
- (5) PIH の悪化因子に紫外線曝露があると言われているが、その影響を実証する。慢性炎症による PIH モデルマウスに紫外線曝露を炎症直後としばらく後に行った群を作成し、紫外線曝露の影響をメラニン量測定とともに組織学的に検討する。
- (6) 研究経過中、上記3で、キーとなるシグナル、分子、細胞が明らかになった場合、それを標的とした治療法の開発を目指す。一方、それまでは、まずは VitC などの既存の治療法、及び、色素沈着消退促進作用があると報告されている薬剤について、PIH モデルマウスを用いてその効果を検証する。

#### 4 . 研究成果

##### (1) PIH モデルマウス確立について

ハプテンとして 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を用いて、マウスの腹部に 100  $\mu$ l of 0.5% DNFB in acetone/olive oil (4:1) を連日 2 回塗布して感作 (day 0, 1) し、感作 1 週間後から週 2 回、合計 9 回マウスの背部に 100  $\mu$ l of 0.15% DNFB を反復塗布した。day 35 を 0 とし、1 週間毎 16 weeks まで色素沈着の経過を観察した。

その結果、DNFB9 回塗布終了後にはマウスの背部に色素沈着が認められた。塗布中止の 1 週間後にはその色素沈着はさらに増強し、メラニンインデックスはピーク値を示した。そして、その後 8 週間後にかけて明らかな色素沈着が薄くなった。処置前のマウスに比べ 8 週目までは有意な色素増強が認められた。

これらの色素増強のみられたマウスの背部より皮膚生検を施行し、病理組織学的観察を行った。その結果、ヘマトキシリンエオジン染色では、0 週の皮膚標本では、著明な表皮肥厚、明らかな基底層の障害がみられ、真皮には多くの炎症細胞浸潤、ならびにメラニン含有細胞を認め、炎症期のアトピー性皮膚炎や接触皮膚炎の組織像と同様な湿疹の所見が得られた。2 週後の組織像では、0 週でみられた表皮変化はみられなくなり、基底層の障害も明らかではなかった。一方、真皮にはメラニン含有細胞を多数認めた。フォンタナマッソン染色では、0 週で表皮基底層、および表皮全層にわたってメラニンの増生を認め、真皮においてもメラニン含有細

胞の増加を認めた。これらの変化は、2週間後には減少していたが、表皮内のメラニン量の減少に比べ、真皮のメラニンは多く残存していた。一般に、病理組織学的に PIH は基底細胞の空胞化を伴わない表皮メラニンの増加と真皮メラノファージの増加と定義されるため、ハプテン の最終塗布から2週間以降の変化は炎症後色素沈着組織所見と一致しており、本マウスは PIH モデルマウスをあることが示された。

## (2) PIH モデルマウスの解析について

まず、分子生物学的解析によりサイトカイン環境を解析した。DNFB9 回塗布終了 24 時間後の interferon (IFN)- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-13 の発現の増減を RT-PCR で調べた。その結果、いずれも発現増加がみられ、Th1 と Th2 サイトカインの両方の発現が増えていることが確認された。これは、これまでの報告と一致するものであり、この状態が慢性湿疹、つまりアトピー性皮膚炎のモデルであることを示している。

次に、マウスの PIH 病変部位から採取した皮膚を表皮と真皮に分離して、それぞれ、メラニン量を化学的に定量した。その結果、真皮のメラニン量 / 表皮のメラニン量はコントロールに比べ 4 週間目までは有意に高く、8 週間で元に戻った。また、画像解析による定量では、表皮は一過性にメラニン量は増えるものの、2 週間目には有意差は既になくなっていった。一方、真皮の方は 4 週間目までは有意にメラニン量が増えており、12 週間目ようやく有意差がなくなった。これらの結果より、PIH に寄与しているのは真皮に存在するメラニンであり、表皮に比べて真皮メラニンの消退、あるいは分解速度が遅くなっていることが原因であることが確認された。つまり、PIH は本質的には真皮におけるユーメラニンの増加であることが確認できた。

PIH において真皮に現れるメラニン含有細胞を電子顕微鏡による観察により解析した。その結果、メラニンを含んでいるのはマクロファージと線維芽細胞であることが明らかとなった。そして、含有されているメラニンは、クロファージに含まれているメラニンの方が 10 倍以上多かった。

PIH マウスモデルの真皮マクロファージを免疫組織化学的に解析した。まずは予備実験において、マクロファージに対する抗体を 8 種類試みたが、2 種類だけに染色性が確認されたため、その後の本解析に使用した。真皮を対物レンズ 20 倍で観察し、1 標本あたりランダムに 3 視野撮影し、陽性細胞数を数えた。その結果、メラニン含有細胞のうち、F4/80 陽性となる細胞は 17 ~ 45% であり、また、解析を行った全てのポイントでその比率は半分以下であった。この結果は、PIH において主な役割を果たしているマクロファージは、CD68<sup>+</sup>,F4/80-細胞であることが示すものである。

PIH の悪化因子に紫外線曝露があると言われているが、その明らかな科学的報告はない。そこで、その影響を検証した。PIH モデルマウスに紫外線照射を PIH 発症直後と 1 週間後に行った群を作成し、メラニンインデックスを測定した。その結果、我々のマウスモデルを使用した実験系では紫外線曝露の影響は、紫外線曝露の時期に関わらず認められず、有意な差が認められなかった。つまり、今回の研究では、紫外線曝露と PIH の因果関係は明らかにならなかった。

## (3) PIH に対する有効な新規治療法確立について

これまでの臨床経験から、PIH に対して有効性があると推測している 4 種類の外用剤 (A,B,C,D) の効果について PIH マウスモデルを使用して検証した。モデルマウスの背中左側半分に試験薬剤を外用し、右半側にコントロールとしてワセリンを外用して、色素沈着消失

の速さを比較した。その結果、再現性のある有意な結果を得ることができなかった。マウスによる個体差が大きく、今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Shoko, Abe Yuko, Nakajima Kimiko, Sano Shigetoshi, Yamamoto Osamu, Wakamatsu Kazumasa, Ito Shosuke, Hayashi Masahiro, Suzuki Tamio	4. 巻 34
2. 論文標題 Establishment of a mouse model for post inflammatory hyperpigmentation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pigment Cell & Melanoma Research	6. 最初と最後の頁 101 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pcmr.12911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野祥子、阿部優子、中島喜美子、佐野栄紀、山元修、若松一雅、伊藤祥輔、林昌浩、鈴木民夫
2. 発表標題 炎症後色素沈着症のモデル動物の確立
3. 学会等名 第50回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shoko Nakano, Yuko Abe, Yutaka Hozumi, Tamio Suzuki, Kimiko Nakajima, Shigetoshi Sano, Osamu Yamamoto
2. 発表標題 Establishment of a mouse model for post-inflammatory pigmentation (PIH)
3. 学会等名 The 44th annual meeting of the Japanese Society for investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamio Suzuki
2. 発表標題 48. Analysis of post-inflammatory hyperpigmentation (PIH) using a new model mouse.
3. 学会等名 20th Hamchun Dermatology Symposium, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	穂積 豊 (Hozumi Yutaka)		
研究協力者	斉藤 委美 (Saito Imi)		

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
---------	---------