

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791271

研究課題名(和文)皮膚バリア機構破綻アトピー性皮膚炎モデルマウスの酸化ストレス状態と治療

研究課題名(英文)Oxidative stress in the skin of a model of atopic dermatitis caused by skin barrier disfunction

研究代表者

中井 浩三(Nakai, Kozo)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40363204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：表皮のフィラグリン発現低下による皮膚バリア機能障害はアトピー性皮膚炎の原因である。我々はフィラグリン発現が低下したアトピー性皮膚炎モデルマウスでは皮膚バリア機能に重要なEGFR、E-cadherin、Occludinの発現が低下していることを発見した。抗酸化剤であるNアセチルシステインを同マウスに投与したところ、一部改善された。さらに、Nアセチルシステインをヒトアトピー性皮膚炎患者に外用したところ皮膚バリア機能は改善した。以上のことから酸化ストレスが角化と皮膚のバリア機能を低下させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The deranged skin barrier function due to reduction of filaggrin expression in epidermis causes atopic dermatitis. We found that the expression of important skin barrier function factors is reduced in the skin of a mouse model of atopic dermatitis. N-acetylcysteine, an antioxidant, recovered the reduced expression of important skin barrier function factors. Moreover, topical application of N-acetylcysteine recovered the skin barrier function in human atopic dermatitis patients. These findings suggest that oxidative stress regulates the epidermal keratinization and skin barrier function.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 皮膚バリア機能 フィラグリン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒の強い湿疹を主病変とする難治性皮膚疾患である。近年、アトピー性皮膚炎の原因が、表皮角層の構造蛋白の一つであるフィラグリンの遺伝子異常によることが報告された。フィラグリン蛋白質の異常が存在すると、表皮のバリア機構が破綻を来し、アレルゲンなど起炎物質が、表皮内に侵入し、アトピー性皮膚炎という慢性炎症が生じると考えられている。

我々はこれまで皮膚における酸化ストレスの生理学的、病理学的役割について基礎・臨床研究を行ってきた。アトピー性皮膚炎患者の尿中活性酸素代謝物の増加や、活性酸素が表皮の角化異常をきたすことなどを報告している。これら研究から活性酸素は炎症に伴い発生するだけでなく、表皮のバリア機構などのホメオスターシスに重要であることが分かってきた。また、アトピー性皮膚炎のようにバリア機構の破綻がある葉状魚鱗癬の患者で抗酸化剤であるアセチルシステインの外用が有用であることや、ビタミンCが表皮細胞のフィラグリン発現を促進するといった報告から、アセチルシステインやビタミンCがアトピー性皮膚炎のバリア機構破綻を是正する可能性がある。しかしながら、アトピー性皮膚炎の病態解明と新たな治療開発のためにも、皮膚バリア機構と酸化ストレスとの関係についてさらに詳細な基礎研究が望まれる。

2. 研究の目的

本研究ではフィラグリン発現低下により皮膚バリア機構が破綻したフレキーテイルマウスの皮膚バリア機能と酸化ストレスの役割を明確にし、抗酸化剤投与によるこれらノックアウトマウスの皮膚バリア機能、慢性炎症、皮膚病変の変化を調べ、抗酸化剤のアトピー性皮膚炎治療への有用性を検討する。

3. 研究の方法

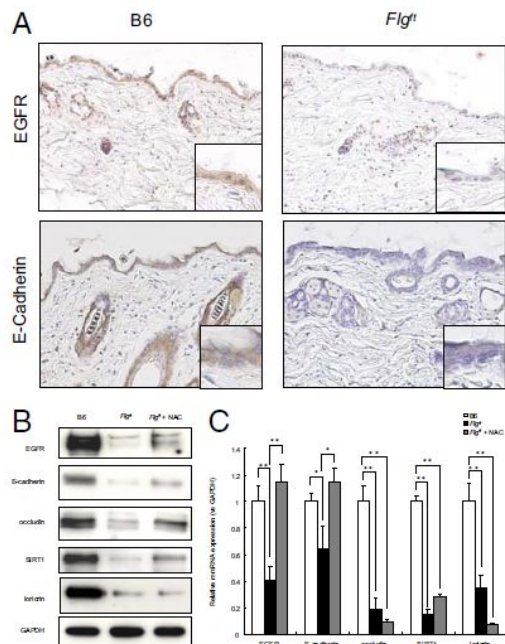
- (1) フィラグリン発現低下により皮膚バリア機構が破綻したフレキーテイルマウスの皮膚バリア機能関連因子の解析：SIRT1、EGFR、E-cadherin、Occludinの発現を real time RT-PCR、ウエスタンブロット、免疫組織染色にて調べる
- (2) 抗酸化剤投与によるフレキーテイルマウスの皮膚バリア機能関連因子の変化：SIRT1、EGFR、E-cadherin、Occludinの発現を real time RT-PCR、ウエスタンブロット、免疫組織染色にて調べる
- (3) フィラグリン発現をノックダウンしたヒト表皮角化細胞のバリア機能関連因子の解析：SIRT1、EGFR、E-cadherin、Occludinの発現を real time RT-PCR、ウエスタンブロットにて調べる
- (4) 抗酸化剤外用によるヒトアトピー性皮膚

炎患者の皮膚バリア機能の変化：経表皮水分蒸散量 (TEWL) と角層水分量の測定

- (5) 酸化ストレスが過剰な老化モデルマウス Klotho マウスの角化関連因子の解析：免疫組織染色にて調べる
- (6) Klotho 発現をノックダウンしたヒト表皮角化細胞の角化関連因子の解析：フィラグリン、ロリクリン、ケラチン1、ケラチン10、ケラチン14の発現を real time RT-PCR、ウエスタンブロット、免疫組織染色にて調べる
- (7) ヒト非黒色腫皮膚腫瘍の Klotho 発現を調べる：Klotho 発現を免疫組織染色にて調べる

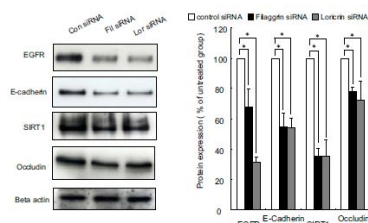
4. 研究成果

- (1) フィラグリン発現低下により皮膚バリア機構が破綻したフレキーテイルマウスの皮膚バリア機能関連因子の発現は低下していた。抗酸化剤であるアセチルシステイン投与により、一部改善がみられた。



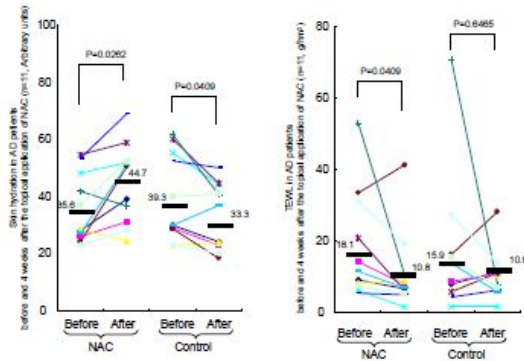
A: 免疫組織染色 B: ウエスタンブロット C: real time RT-PCR (B6:野生型対照マウス Flg<sup>fl</sup>:フレキーテイルマウス NAC:抗酸化剤アセチルシステイン)

- (2) フィラグリン発現を siRNA にてノックダウンしたヒト表皮角化細胞のバリア機能関連因子の発現は低下していた。



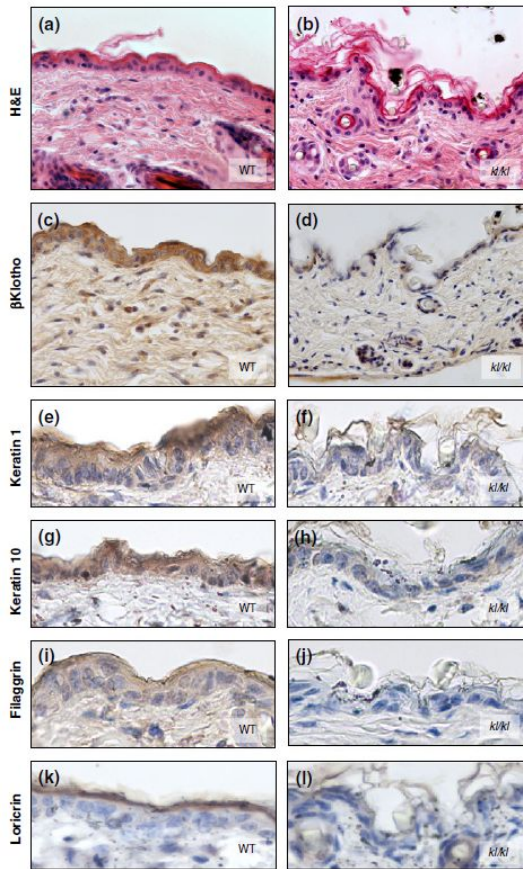
ウエスタンブロットと real time RT-PCR

- (3) 抗酸化剤アセチルシステイン外用により、ヒトアトピー性皮膚炎患者の皮膚バリア機能は改善された。



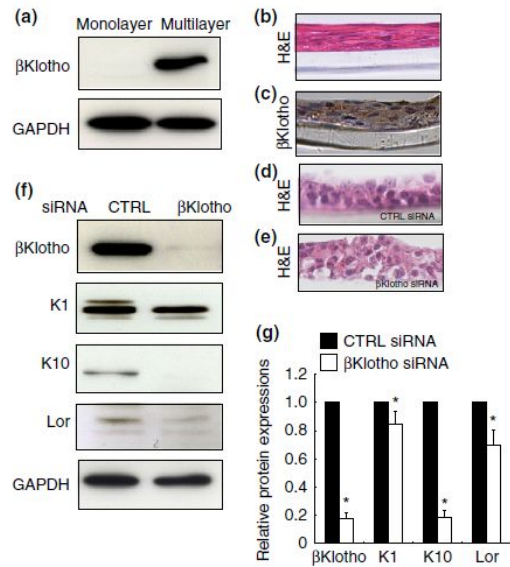
角質水分量と TEWL の変化

- (4) Klotho マウスでは角化関連因子の発現の低下がみられた。



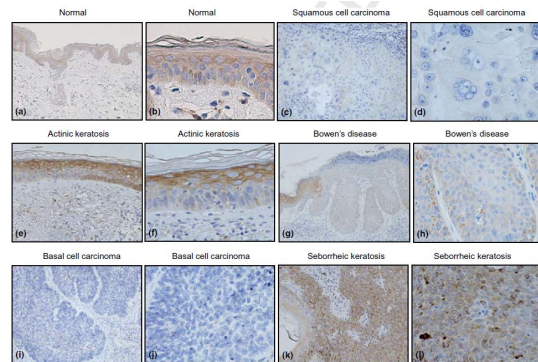
免疫組織染色

- (5) Klotho 発現を siRNA でノックダウンしたヒト表皮角化細胞ではロリクリン (Lor)、ケラチン 1 (K1)、ケラチン 10 (K10) の発現が低下していた。また、形態異常も認められた。



(a),(f), (g):ウエスタンブロットと画像解析結果 (b)-(e):免疫組織染色

- (6) ヒト非黒色腫皮膚腫瘍では Klotho 発現が低下していた。



免疫組織染色

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 6 件 )

Phosphate-buffered saline induces filaggrin expression in a human epidermal cell line (HaCaT cells) Nakai K, Yoneda K, Nakagawa T, Moriue T, Kubota Y. Dermatologica Sinica in press. www.derm-sinica.com/査読有

betaKlotho expression is reduced in human non-melanoma skin cancer. Nakai K, Yoneda K, Moriue J, Moriue T, Koura A, Yokoi I, Ishikawa E, Kubota Y, Haba R,

Kushida Y, Katsuki N, Inoue S. International Journal of Dermatology in press. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-4632](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-4632) 査読有

Effects of topical N-acetylcysteine on skin hydration/transdermal water loss in healthy volunteers and atopic dermatitis patients Kozo Nakai, Kozo Yoneda, Yumi Murakami, Ayako Koura, Reiko Maeda, Asuka Tamai, Emiko Ishikawa, Ikumi Yokoi, Junko Moriue, Tetsuya Moriue, Yasuo Kubota. Annals of Dermatology in press. <http://anndermatol.org/> 査読有

Two cases of nevus sebaceous accompanying secondary tumors with  $\beta$ Klotho expression. Nakai K, Yoneda K, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Moriue J, Moriue T, Ishikawa E, Inoue S, Kubota Y. J Dermatol. 2014 Feb;41(2):171-2. doi: 10.1111/1346-8138.12371. 査読有

Deranged epidermal differentiation in kl/kl mouse and the effects of  $\beta$ Klotho siRNA on the differentiation of HaCaT cells. Nakai K, Yoneda K, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Moriue T, Kosaka H, Kubota Y, Inoue S. Exp Dermatol. 2013 Nov;22(11):772-4. doi: 10.1111/exd.12258. 査読有

Reduced expression of epidermal growth factor receptor, E-cadherin, and occludin in the skin of flaky tail mice is due to filaggrin and loricrin deficiencies. Nakai K, Yoneda K, Hosokawa Y, Moriue T, Presland RB, Fallon PG, Kabashima K, Kosaka H, Kubota Y. Am J Pathol. 2012 Sep;181(3):969-77. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.005. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

中井浩三他、Free radical production in LPS-treated skin of atopic dermatitis mouse model 第 39 回日本研究皮膚科学会 2014 年 12 月ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)

Kozo Nakai 他、betaKlotho is required for the epidermal differentiation, and its expression is suppressed in human nonmelanoma skin cancer International Investigative Dermatology 2013 年 5 月エジンバラ (英国)

中井浩三他、betaKlotho regulates the differentiation and tumorigenesis of epidermal keratinocytes 第 37 回日本

研究皮膚科学会 2012 年 12 月ロワジュールホテル那覇 (那覇市)

中井浩三他、N-acetyl-L-cysteine restores disrupted skin barrier function in flaky tail mice 第 36 回日本研究皮膚科学会 2011 年 11 月京都国際会館 (京都市)

Kozo Nakai 他、Reduced expression of occludin, epidermal growth factor receptor, filaggrin, loricrin and SIRT1 in the skin of klotho gene deficient mice Society for Investigative Dermatology 2012 年 5 月ラーリー (米国)

〔図書〕(計 1 件)  
Filaggrin. Springer 出版 Nakai K, Yoneda K, Kubota Y. 65-74. 2014

〔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

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
中井 浩三 (NAKAI, Kozo)  
香川大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 40363204

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：