

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461688

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患における新しい角層バリア機構の解明とその制御

研究課題名(英文) New barrier function of stratum corneum and its regulation in inflammatory skin diseases

研究代表者

加納 宏行 (Kano, Hiroyuki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40566494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎では皮膚角層バリア機能が低下している。その原因に角質細胞間脂質セラミドを構成する脂肪酸の長鎖/短鎖比率の低下がある。我々はこれまでにIFN- γ が超長鎖脂肪酸セラミド合成に重要な酵素ELOVLとceramide synthase (CerS)の発現を抑制することを培養表皮細胞で見いだしたが、本研究では、マウスにダニ抗原またはイミキモドを反復塗布して誘発した皮膚炎を解析し、IFN- γ の発現上昇とともに、ELOVL、CerSの発現低下、そして皮膚セラミドの長鎖脂肪酸/短鎖脂肪酸比率が低下することを示した。皮膚炎におけるTh1サイトカインによる皮膚バリア機能低下機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ceramide plays an important role in the stratum corneum barrier functions as a major component of the intercellular lipid of corneocytes. It has recently been shown that the average fatty acid (FA) chain length of ceramide correlates with the barrier function and is decreased in atopic dermatitis. We have previously shown that the expression of elongase of very long-chain fatty acid (ELOVL) and ceramide synthase (CerS), the key enzymes in the long-chain FA ceramide synthesis, is decreased by IFN- γ in cultured keratinocytes. In the present study, analysis of dermatitis caused by repeated exposure of mouse ear to mite antigen or imiquimod showed that increased expression of IFN- γ was correlated with decreased expression of ELOVL and CerS and decrease in long-chain FA ceramide. These results strongly suggest that, in dermatitis where local expression of IFN- γ is increased, IFN- γ may disrupt skin barrier function by inducing compositional change in stratum corneum ceramide.

研究分野：皮膚アレルギー

キーワード：角層バリア機構 セラミド サイトカイン インターフェロン-

1. 研究開始当初の背景

体内環境と外部環境のインターフェイスにある皮膚のバリア機構は生体の恒常性維持に必須であるが、特に角層バリア機能の低下は経皮感作やアトピー性皮膚炎(AD)の発症原因としても注目されている。角層バリア機能は角質細胞コーニファイドエンベロープ、角質細胞内天然保湿因子と角質細胞間脂質から成り立っている。セラミドは角質細胞間脂質の主要成分で、ADでは減少しているが、その化学的構造変化が角層バリア機能に影響を与えることが明らかになりつつある。つまり、セラミドはスフィンゴイド塩基と脂肪酸から構成されるが、皮膚角層セラミドは超長鎖脂肪酸の比率が高くそれが減少するとバリア機能が低下することが示されている¹⁾。そしてADではこの超長鎖脂肪酸の比率が低下していることが報告された²⁾。

我々は、超長鎖脂肪酸セラミド合成に重要な二つの酵素、elongase of very long-chain fatty acid (ELOVL)とceramide synthase (CerS)の発現がIFN- γ によって低下するが他のサイトカインでは影響されないことを培養ヒト正常表皮細胞で見いだした。さらにヒト皮膚三次元培養系においてIFN- γ は超長鎖脂肪酸セラミドを減少させることを示した³⁾。

2. 研究の目的

そこで、「皮膚炎局所で増加したIFN- γ はELOVL、CerSの発現低下を介してセラミドの脂肪酸側鎖を短鎖化して角層バリア機能を低下させる」という仮説をたてた。IFN- γ は代表的なTh1サイトカインである。一方ADはTh2疾患であるが、慢性皮膚部はTh1細胞の浸潤もある。つまりこの仮説は「慢性炎症(Th1)がバリア機能低下を引き起こす」ことを意味するが、サイトカインバランスをTh2からTh1に傾けることでADは改善することも考えられている。この仮説を検証することで、ADにおけるTh1の意義に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

上述した仮説をマウスを用いて*in vivo*で多角的に検証した。

(1) NC/Nga マウスにダニ抗原(mite fecal antigen: FAg)を反復塗布するとIFN- γ 発現増加を伴う皮膚炎を生じる⁴⁾。このマウスを用いて皮膚炎局所のIFN- γ を含むサイトカインの発現、ELOVL、CerSの発現、さらに角層セラミドの脂肪酸側鎖組成の変化を検討した。ダニ抗原はマウスの耳に週2回、計5回塗布した。サイトカイン、酵素のmRNA発現はquantitative RT-PCRで測定し、セラミドは耳の表皮を分離し脂質抽出後、UPLC-ESI-MSを用いたLC-MSにてceramide [non-hydroxyl fatty acid and sphingosine] (CER[NS])の脂肪酸鎖長の解析、定量を行った。

(2) BALB/c マウスにイミキモド(imiquimod: IMQ)を反復塗布すると乾癬様

皮膚炎が生じるが、その際IFN- γ の発現増加がないことが報告されているので⁵⁾、このマウスモデル系を用いて同様の検討を行った。イミキモドは連日で計8回塗布した。ダニ抗原塗布実験と同様、サイトカイン、酵素、セラミド[NS]分子種組成の解析を行った。

(3) 最後に、血中IFN- γ の増加がELVOL、CerS発現、セラミド脂肪酸側鎖組成に与える変化を、マウスIFN- γ 長期発現ベクターpCpG-Mu γ をマウスにhydrodynamic tail vein injection法により単回投与し、肝細胞にとりこませてIFN- γ を発現させ、血中に持続的高発現する方法⁶⁾を用いて、耳皮膚で検討した。

4. 研究成果

(1) FAg反復塗布による皮膚炎モデルでの検証

NC/Nga マウスの耳にFAgを週2回塗布すると、遅くとも4回目までに皮膚炎を生じた。5回塗布後、耳の厚さの増加、血清IgEの上昇、経表皮水分蒸散量(trans epidermal water loss: TEWL)の増加を確認した(図1)。

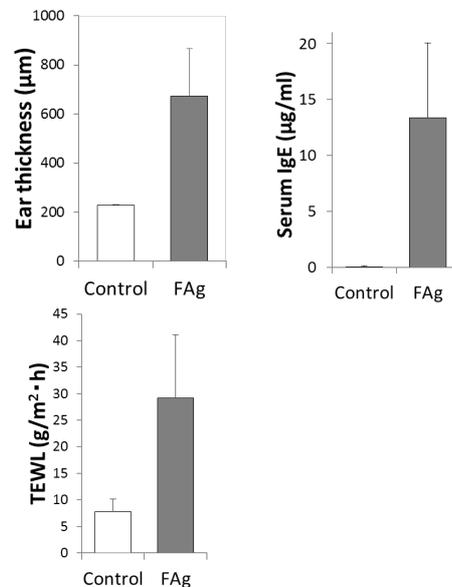


図1 FAg反復塗布による皮膚炎での耳介の厚さ、血清IgE、経表皮水分蒸散量(TEWL)

この炎症マウスの耳皮膚における各種サイトカインの発現をqRT-PCRで調べたところ、IFN- γ が163倍に増加、TNF α 、IL-17、IL-22の発現も増加したが、IL-4、IL-5の発現量は変化しなかった(図2)。

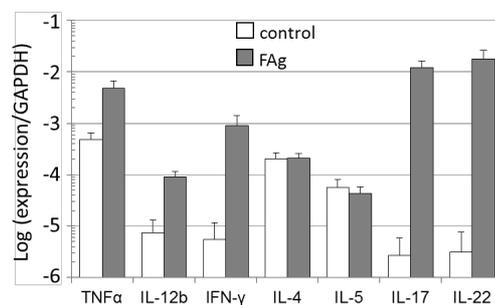


図2 FAg反復塗布による皮膚炎におけるサイトカイン発現

次に、ELOVL、CerS の発現を検討した。ELOVL は7つのアイソザイム、CerS は6つのアイソザイムが存在する。ELOVL4 は超長鎖脂肪酸セラミドの合成に必須なアイソザイムで、NC/Nga マウスでは最も多く発現していた。CerS ではCerS4 が最も多く発現していた。FAg 反復塗布で生じた皮膚炎ではELOVL4 が76.8%発現抑制され、2番目に発現の多いELOVL6 は89%の発現抑制がみられた。ELOVL3を除く他のアイソザイムも有意な発現抑制がみられた(図3)。

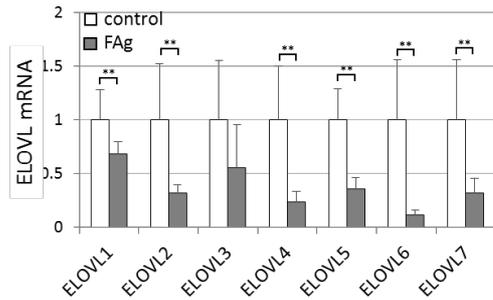


図3 FAg反復塗布による皮膚炎におけるELOVL発現

CerS においても CerS4 に加えて CerS1、CerS5 の発現が有意に減少したが、CerS2、CerS3 は軽度増加した(図4)。

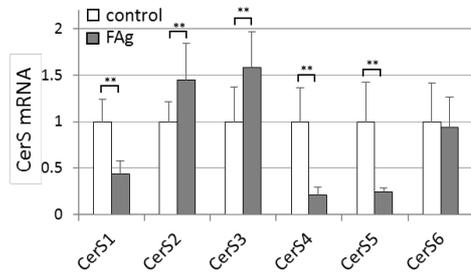


図4 FAg反復塗布による皮膚炎におけるCerS発現

次に ELOVL、CerS の発現減少によりセラミドの脂肪酸鎖長が変化するか検証した。FAg 反復塗布による皮膚炎では超長鎖脂肪酸を有する CER[NS]、つまり C24-CER と C26-CER が減少し、短鎖脂肪酸を有する CER[NS]、つまり C14、C16、C20-CER の増加が認められた(図5)。

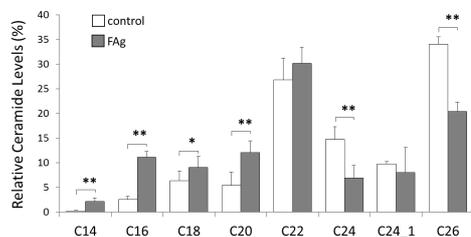


図5 FAg反復塗布による皮膚炎におけるCer[NS]の脂肪酸組成

(2) IMQ 反復塗布による乾癬様皮膚炎モデルでの検証

BALB/c マウスの耳に IMQ を連日塗布すると、5 回目には皮膚炎を生じた。8 回塗布後、耳の厚さおよび TEWL の増加を確認した。FAg 塗布と同様、各種サイトカインの発現を

qRT-PCR で調べたところ、TNF α 、IL-17、IL-22 の発現が増加したが、IFN- γ は IL-4、IL-5 とともに有意な変化は認められなかった(図6)。

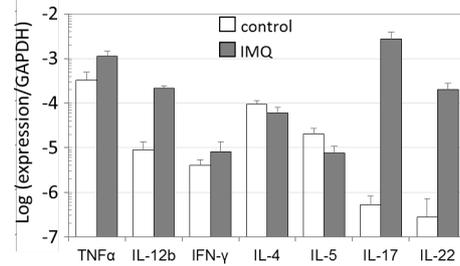


図6 IMQ反復塗布による皮膚炎におけるサイトカイン発現

次に ELOVL、CerS の発現を検討した。BALB/c マウスでも NC/Nga マウスと同様、ELOVL4 が最も多く発現し、ELOVL6 がこれに続いた。CerS も同様で、CerS4 の発現が最も多かった。IMQ 反復塗布で生じた皮膚炎では、ELOVL4 の発現に変化はなく、ELOVL6 の減少、ELOVL1 の増加以外に変化はなかった(図7)。

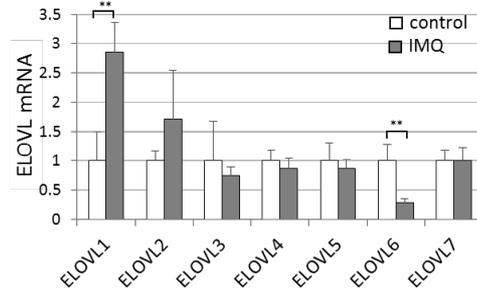


図7 IMQ反復塗布による皮膚炎におけるELOVL発現

CerS では P<0.01 での有意な減少を示すアイソザイムはなかった。一方 CerS3 の発現が顕著に増加していた(図8)。

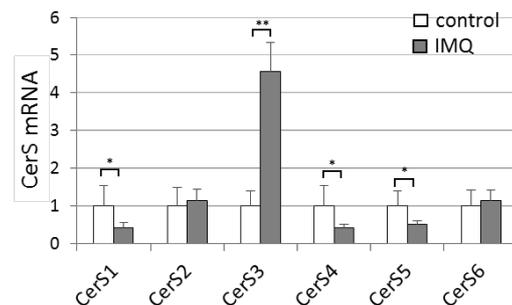


図8 IMQ反復塗布による皮膚炎におけるCerS発現

IMQ 反復塗布による皮膚炎のセラミド分析では、図9に示すように CER[NS]の脂肪酸側鎖の解析で C24 の増加はみられたが、超長鎖脂肪酸の有意な減少はみられなかった。

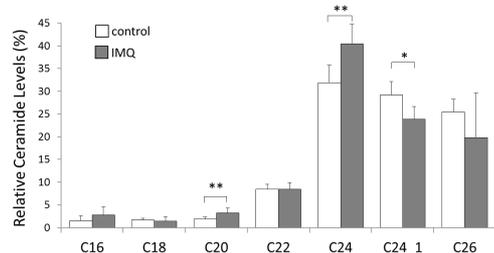


図9 IMQ反復塗布による皮膚炎におけるCer[NS]の脂肪酸組成

(3) 血中 IFN- γ 高発現マウスでの検討

マウス IFN- γ 長期発現ベクター-pCpG-Muy を hydrodynamic tail vein injection 法にて NC/Nga マウスに単回投与したところ、血清 IFN- γ は 24 時間後には最高濃度 146 ng/ml に達し、その後 2 週間は 8 ng/ml 前後の濃度を維持した (図 10)。投与後 2 週間の時点で、マウスの外観上の変化は認められなかった。

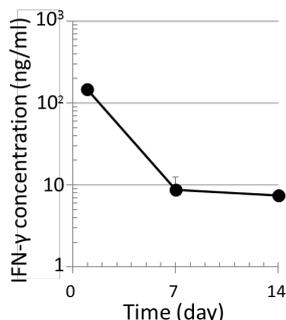


図10 マウスIFN- γ 長期発現ベクターをhydrodynamic tail vein injection法で投与したNC/Ngaマウスの血中IFN- γ 濃度

FAg、IMQ の実験と同様に投与マウスの耳における ELOVL、CerS の各アイソザイムの発現量の変化を qRT-PCR にて調べたが、いずれのアイソザイムにおいても発現量に変化はみられなかった (図 11、12)。

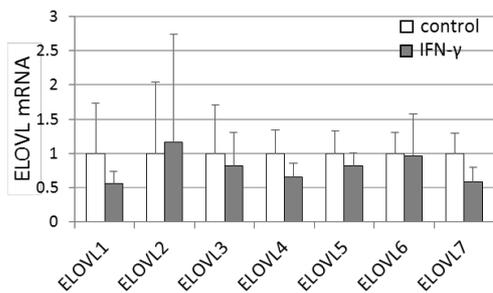


図11 マウスIFN- γ 長期発現ベクターをhydrodynamic tail vein injection法で投与したNC/Ngaマウスの耳におけるELOVL発現

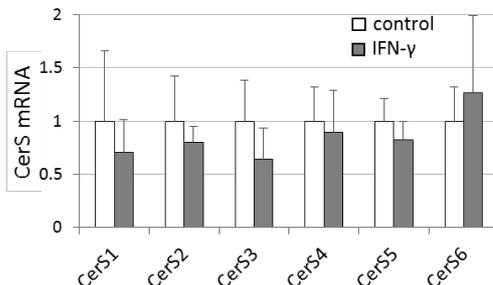


図12 マウスIFN- γ 長期発現ベクターをhydrodynamic tail vein injection法で投与したNC/Ngaマウスの耳におけるCerS発現

また、これらの結果に矛盾することなく、CER[NS]の脂肪酸組成にも変化はみられなかった (図 13)。

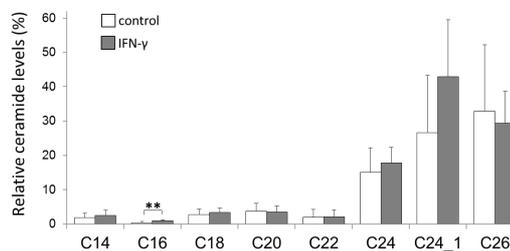


図13 マウスIFN- γ 長期発現ベクターをhydrodynamic tail vein injection法で投与したNC/Ngaマウスの耳におけるCER[NS]の脂肪酸組成

(4) 結果のまとめおよび結論

FAg 反復塗布による皮膚炎では IFN- γ の発現が増加し、長鎖脂肪酸セラミド合成に重要な ELOVL、CerS のそれぞれ 7 アイソザイム中 6 個、6 アイソザイム中 3 個のアイソザイムの発現量の顕著な低下がみられ、そして超長鎖脂肪酸セラミド (C24-と C26-CER) が減少することが観察された。一方 IMQ 反復塗布皮膚炎では、IL-17 の発現は増加したが IFN- γ の発現は増加しなかった。そして ELOVL、CerS においては発現が有意に減少するアイソザイムは認められず、セラミドの脂肪酸組成も不変であった。また、血中 IFN- γ を高濃度に維持しても、ELOVL、CerS、セラミド脂肪酸組成は不変であった。

以上の結果から、皮膚局所での IFN- γ 発現の増加する皮膚炎においては、IFN- γ は ELOVL、CerS の発現減少を介してセラミド脂肪酸組成を短鎖化し、バリア機能の低下に關与することが強く示唆された。血中 IFN- γ 濃度の上昇で変化がなかったのは、表皮顆粒層までは IFN- γ の作用が及ばなかったと考えられる。慢性期 AD では Th1 細胞の浸潤が見られる事が知られている。一般にアレルギーバランスが Th1 に傾くと AD は改善すると言われているが、本研究によって、慢性期 AD における Th1 細胞の浸潤はむしろバリア機能低下の原因のひとつとなっている可能性があることが示された。この可能性を検証するため、今後、実際の AD 患者皮膚でのサイトカイン環境を調べる方法を確立する必要があり、非侵襲的検査法の研究を開始している。

< 引用文献 >

- Joo KM, Nam GW, Park SY *et al.* (2010) Relationship between cutaneous barrier function and ceramide species in human stratum corneum. *J Dermatol Sci.* 60:47-50.
- Ishikawa J, Narita H, Kondo N *et al.* (2010) Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol.* 130:2511-4.
- Tawada C, Kanoh H, Nakamura M *et al.* (2014) Interferon- γ decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol.* 134:712-8.
- Shah MM, Miyamoto Y, Yamada Y *et al.* (2010) Orally supplemented Lactobacillus

acidophilus strain L-92 inhibits passive and active cutaneous anaphylaxis as well as 2,4-dinitrofluorobenzene and mite fecal antigen induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Microbiol Immunol* 54: 523-33

Lin YK, Yang SH, Chen CC et al. (2015) Using imiquimod-induced psoriasis-like skin as a model to measure the skin penetration of anti-psoriatic drugs. *PLoS One* 10: e0137890.

Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K et al. (2010) Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol*. 184:2729-35

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kanno Y, Shu E, Kanoh H, Seishima M.

The antifibrotic effect of α 2AP neutralization in systemic sclerosis dermal fibroblasts and mouse models of systemic sclerosis.

J Invest Dermatol. 136: 762-769, 2016 査読有 doi: 10.1016/j.jid.2015.12.028.

Kanoh H, Banno Y, Nakamura M, Seishima M.

Contact allergy to liquorice flavonoids: Analysis using liquid chromatography-mass spectrometry.

Contact Dermatitis 74: 191-192, 2016 査読有 doi: 10.1111/cod.12511.

Kanoh H, Shu E, Ichiki Y, Seishima M.

Localized scleroderma presenting as Port-wine stains: report of two cases and a literature review.

Acta Derm Venereol. 95: 1003-1004, 2015 査読有 doi: 10.2340/00015555-2100.

〔学会発表〕(計 5 件)

Kanoh H, Ishitsuka A, Nakamura M, Inagaki N, Ito H, Banno Y, Seishima M.

IFN- γ may disrupt skin barrier function through reduction of long-chain fatty acid ceramides in mite-induced dermatitis.

76th Annual meeting of the Society for Investigative Dermatology(2017年4月26-30日、Portland, Oregon, USA)

Kanoh H, Ishitsuka A, Fujine E, Matsuhaba S, Nakamura M, Inagaki N, Banno Y, Seishima M.

Reduction of long-chain fatty acid ceramide in dermatitis caused by repeated exposure to house-dust mite in NC/Nga mice

The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2016年12月9-11日、Sendai, Japan)

加藤大和、松井利巨、水谷直貴、上田夏実、笠岡沙也加、畠平春奈、元岡佑美、小泉恵

子、坂野嘉子、加納宏行、清島真理子、村手 隆、中村光浩

スフィンゴ脂質代謝物の LC-MS 測定法の検討と応用

第 42 回 BMS (Biological Mass Spectrometry) コンファレンス (2015 年 7 月 6-8 日、岐阜)

Kanoh H, Ishitsuka A, Fujine E, Matsuhaba S, Nakamura M, Inagaki N, Banno Y, Seishima M.

Decreased expression of ELOVL and ceramide synthase in dermatitis caused by repeated exposure to house-dust mite in NC/Nga mice

The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2015 年 12 月 11-13 日、Okayama, Japan)

Yasue Y, Ishitsuka A, Fujine E, Banno Y, Kanoh H, Seishima M

Effects of interferon-gamma on expression of ceramide synthases and elongase of long-chain fatty acids in cultured human keratinocytes

The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2015 年 12 月 12-14 日、Osaka, Japan)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加納 宏行 (KANOH, Hiroyuki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40566494

(2)研究分担者

清島 真理子 (SEISHIMA, Mariko)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00171314

(3)研究分担者

稲垣 直樹 (INAGAKI, Naoki)

岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：31037062

(4)研究分担者

中村 光浩 (NAKAMURA, Mitsuhiro)

岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：30433204