

非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）による
皮膚生理機能への影響に関する研究

2023 年

丸山 清子

Research on the effects of NSAIDs administration
on skin physiological functions in mice

2023

Kiyoko Maruyama

目次

緒論	1
第1章 非ステロイド性抗炎症薬インドメタシン投与による PPAR γ を介して 誘発される乾燥皮膚発現メカニズムの解明	
第1節 緒言	4
第2節 実験方法	6
第3節 結果	12
第4節 考察	14
第5節 小括-1	39
第2章 加齢マウスにおけるインドメタシン投与によるジアミンオキシダーゼ (DAO)と皮膚生理機能低下の発現メカニズムの解明	
第1節 緒言	40
第2節 実験方法	41
第3節 結果	43
第4節 考察	44
第5節 小括-2	52
第3章 加齢マウスにおけるセレコキシブ投与による乾燥皮膚発現メカニズム の解明	
第1節 緒言	53
第2節 実験方法	54
第3節 結果	55
第4節 考察	56
第5節 小括-3	68
結論	69
引用文献	73
謝辞	79
英文要旨	80

略語一覽

a.u.: arbitrary unit

CD: Cluster of Differentiation or Cluster Designation

COX: cyclooxygenase

DAO: diamine oxidase

EB virus: Epstein-Barr virus

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

HE: hematoxylin and eosin

NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs

IgA: immunoglobulin A

IgE: immunoglobulin E

IgG: immunoglobulin G

IL-6: interleukin 6

IL-10: interleukin 10

MMPs: matrix metalloproteinases

PGs: prostaglandins

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

TB: toluidine blue

TEWL: trans epidermal water loss

TNF- α : tumor necrosis factor- α

ZO-1: zonula occludens-1

緒論

日本は 1970 年に 65 歳以上の人口が 7%を超える高齢化社会に突入し、その後も高齢化率は伸び、1995 年には 14%を超える高齢社会、2010 年には 21%を超える超高齢社会を迎えた。2023 年 4 月に、高齢化率は 29.1%となり、日本ではこの先も高齢化が進むと予測されている。高齢化が進むに伴い、サルコペニアを発現する高齢者が増加し、関節痛や圧迫骨折も増加傾向を示すようになった。さらに、2020 年 12 月に始まった新型コロナウイルス感染症拡大により、サルコペニアは急速に進み¹⁾、痛みを訴える人は多くなり、治療薬である非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs) の使用量は増加の一途を示している。NSAIDs の使用量は、世界的にも増加しており²⁾、2022 年には世界市場規模が 386 億米ドルに到達し、2030 年にはさらに増え 613.9 億米ドルになると推測されている (Fig-1)。

NSAIDs の作用機序は、プロスタグランジン (Prostaglandins: PGs) 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase: COX) を阻害し、PG 産生を抑制することで、消炎鎮痛作用を発揮する³⁾。COX にはアイソフォームが 2 つありそれぞれ COX-1、COX-2 という⁴⁾。COX-1 は全身に存在するが、COX-2 は炎症部位に誘引発現する。PG は、様々な生理活性を有しており、生体の維持に関与している。COX-1 選択性 NSAIDs は、主に COX-1 を阻害するため、胃・十二指腸潰瘍、腎機能低下のリスクが上昇することが知られている⁵⁾。しかし、COX-2 選択性 NSAIDs の場合は、COX-1 選択性 NSAIDs に比べて胃・十二指腸潰瘍の発現リスクが少ないことが特徴である。

2014 年、当該研究室では、NSAIDs 投与後に散見される乾燥皮膚の発現に着目し、8 週齢マウスに、インドメタシン、ロキソプロフェンナトリウム(以下ロキソプロフェンとする)およびセレコキシブを投与し、薬剤性小腸炎症を惹起させて乾燥皮膚発現メカニズムについて報告した⁶⁾。この報告により、NSAIDs 投与により、小腸において急性炎症が発

現し、そこから放出される炎症性サイトカインなどが循環血流に乗り、乾燥皮膚発現に至ることが明らかになった。また、小腸炎症により生じた炎症性サイトカインやヒスタミンが皮膚バリア機能に影響することが報告された⁷⁾。

小腸は免疫システムにおいて重要な組織であり、身体の恒常性（ホメオスタシス）を担う器官である⁸⁾。また皮膚も、生体内外との境界を担う重要な器官で、小腸同様免疫システムが発達していることから、小腸と皮膚の免疫系に何らかの関係が存在すると考えられるが、現段階では、メカニズムは明確にされていない。そこで、我々は、NSAIDsによる小腸炎症および乾燥皮膚発現のメカニズムの解明を行うことで、小腸と皮膚の関係性を明らかにすることを目的とした。また、その際、NSAIDsを投与した高齢者の副作用が散見されているにも関わらず、NSAIDsの投与と加齢による身体生理機能の変化についても不明な部分が多いため、加齢によって変動する因子との関連を皮膚の生理機能への影響について着目し、解析した。

第1章では、NSAIDsがペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（Peroxisome Proliferator-Activated Receptor: PPAR） γ のリガンドとして働くことが知られており、中でもインドメタシンがリガンドの働きが強いとの報告があることから⁹⁾、インドメタシン投与による小腸炎症発現から乾燥皮膚発現に至るメカニズムでのPPAR γ の寄与を検討した。

第2章では、インドメタシン投与による加齢マウスのジアミンオキシダーゼ（Diamine Oxidase : DAO）活性と皮膚生理機能の変化について検討した。ホメオスタシスの一端を担っているDAOは¹⁰⁾、小腸絨毛細胞で生成され循環血流へと放出される酵素で、ヒスタミンのコントローラーとして働くことが知られている¹¹⁾。そのためこの酵素は、1980年代後半からアトピー性皮膚炎や炎症性腸疾患との関係について研究が行われ、DAOの欠乏によりヒスタミン不耐症を発症することが報告されている¹²⁾。しかしながら、NSAIDs投与時の小腸炎症においてDAO活性の変化や加齢との関係についての報告がほとんどな

い。このことから、インドメタシンを加齢（40週齢）マウスに投与し、DAO 活性や小腸および皮膚の変化を観察した。

第3章では、胃・十二指腸潰瘍の発現リスクが少なく、COX-1 選択性 NSAIDs よりも安全性が高い薬剤であると認識されているセレコキシブの副作用発現について、加齢と皮膚生理機能の変化という観点から検討した論文は少ないことから、加齢マウスを用いて、セレコキシブ投与による乾燥皮膚発現について検討した。

第 1 章

非ステロイド性抗炎症薬インドメタシン投与による PPAR γ を介して誘発される乾燥皮膚発現メカニズムの解明

第 1 節 緒言

当該研究室において、小腸炎症により、炎症性サイトカインの分泌促進、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinases: MMPs) の発現から、I 型コラーゲンの減少、経表皮水分喪失量 (Trans Epidermal Water Loss : TEWL) の上昇、角層水分量の減少が生じ、乾燥皮膚に至るという報告を行った¹³⁾¹⁴⁾。また、重要なポイントはマスト細胞の増加およびその脱顆粒の発現とみられているが、アレルゲンが存在しない状態において、マスト細胞の脱顆粒が発現したメカニズムについては未解明のままであった。

今回、そのメカニズムを解明することを研究目的とした。

生体では、アラキドン酸から PGH₂ を合成し、さらに種々の PG を合成している。合成された PG により働きが異なり、感染などにより炎症が生じた際の炎症・発熱・疼痛の発現は PGE₂ の働きによるものである (Fig-2)。

NSAIDs は PG 合成の律速酵素である COX を阻害することで PG の合成を阻害し、炎症・発熱・疼痛を抑制し、薬効を発現する。

しかし、一方で、PG の胃粘膜保護作用や、血流促進作用を阻害することで、胃・十二指腸潰瘍の発現するリスクが上昇する¹⁵⁾¹⁶⁾。COX-1 は様々な組織において恒常的に発現しているが、COX-2 は炎症に誘引発現され、脳や腎臓では恒常的に発現し、PG の合成阻害をしても胃・十二指腸潰瘍の発現リスクは高くない。

今回の研究では、COX-1 選択性 NSAIDs としてインドメタシン、COX 非選択性

NSAIDs としてロキソプロフェン、COX-2 選択的 NSAIDs としてセレコキシブを採択した。NSAIDs は、PG の合成阻害により薬効発現するだけでなく、PPAR γ のリガンドとして働くことが知られており、NSAIDs の中でもインドメタシンは、リガンドの働きが強いとの報告がある。PPAR γ はリガンド依存性があり、核内受容型転写因子で糖や脂質の代謝に関連しているだけでなく、単球 / マクロファージに発現し、サイトカイン産生を調節することで抗炎症作用、免疫のコントロール作用を有している¹⁷⁾¹⁸⁾。

本研究では、NSAIDs と PPAR γ の関係性に着目し、NSAIDs 投与、小腸炎症発現、そして乾燥皮膚発現に至るメカニズムについて検討・解明することとした。

第2節 実験方法

1. 実験動物

8週齢、雄性ヘアレスマウス（HOS:HR-1 SLC: Hamamatsu, Shizuoka, Japan）を温度 23 ± 2 °C、湿度 $55\pm 10\%$ 、明暗サイクル 12 時間（8:00~20:00 Light）の環境下において、水分・餌は自動給餌（CE-2; Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan）とする。1 週間馴化後、実験（A）では、インドメタシン群、ロキソプロフェン群、セレコキシブ群およびコントロール群に各群 5 匹振り分け、実験（B）では、GW9662 単独群、インドメタシン+GW9662 群（以下併用群とする）に各群 5 匹振り分けた。

2. 使用薬剤

各薬剤投与群およびコントロール群に投与した薬剤は下記の通りである。

・実験（A）

1. インドメタシン（Sigma-Aldrich : St. Louis, MO, U.S.A.）
2. ロキソプロフェン（Wako Pure Chemical Industries, Ltd. : Osaka, Japan）
3. セレコキシブ（TOCRIS Bioscience : Avonmouth, Bristol, U.K.）
4. 0.25%DMSO; DMSO: Dimethyl sulfoxide : コントロール群（A）

・実験（B）

1. インドメタシン（Sigma-Aldrich : St. Louis, MO, U.S.A.）
2. GW9662: PPAR γ アンタゴニスト（1 mg / mL; Wako Pure Chemical Corporation）
3. 併用群: インドメタシン（Sigma-Aldrich : St. Louis, MO, U.S.A.）+
GW9662（1 mg / mL; Wako Pure Chemical Corporation）
4. 生理食塩水 : コントロール群（B）

3. 各薬剤投与量および溶媒

・実験(A) COX1 選択性 NSAIDs であるインドメタシン、COX 非選択性ロキソプロフェンおよび COX-2 選択性 NSAIDs であるセレコキシブの投与量は下記の通りである。

1. インドメタシン 40 mg/kg 生理食塩水
2. ロキソプロフェン 30 mg/kg 蒸留水
3. セレコキシブ 10 mg/kg 0.25%DMSO

(Kuzumoto et al.¹⁹⁾, Shimada et al.²⁰⁾, Liang et al.²¹⁾ の方法に準じて実施)

・実験(B) インドメタシンおよび GW9662 の投与量は下記の通りである

1. インドメタシン 40 mg/kg 生理食塩水
2. GW9662 (: 1 mg / mL; Wako Pure Chemical Corporation) 0.1mL / 生理食塩水
3. 併用群: インドメタシン (40 mg / kg) + GW9662 (1 mg / mL を 0.1 mL):
4. 生理食塩水: コントロール

4. 実験手順

実験(A)ならびに(B)において、1週間馴化後、各薬剤を4日間経口投与し、その24時間後に背部皮膚のTEWLの測定(Tewameter TM300)²²⁾、角層水分量(Corneometer CM825)²³⁾の測定を行った後、ペントバルビタール麻酔下において解剖し、皮膚、小腸のサンプルおよび血液サンプルを採取した。

すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験指針(承認番号: 第34号)に従って実施した。

5. 背部皮膚の TEWL および角層水分量の測定方法

TEWL、角層水分量は、共に皮膚バリア機能を反映する皮膚透過性のマーカーとして使用され、TEWL の上昇、角層水分量の減少は乾燥皮膚の発現を示す。

TEWL は、Tewameter TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne Germany) を使用し、背部皮膚に測定部分を 10 秒間押し当てて、数字を読みとる。

ランダムに 3 点選択し、測定結果の平均値を算出する。

角層水分量の測定も、TEWL に準じて、ランダムに 3 点選択し、Corneometer CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH) を使用し、平均値を算出した。

6. マウスの小腸および皮膚の組織ならびに血液サンプルの採取および保存方法

TEWL と角層水分量を測定後、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与してマウスに麻酔し、心臓穿刺により 1 mL の循環血を採取したのちに、小腸および皮膚の組織を採取し、凍結保存した。

採取した皮膚と小腸サンプルは 2 グループに分け、組織保存用は -80 °C で保存し、切片用はパラホルムアルデヒド溶液 (4%, WAKO) で固定し、凍結した Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋し、-4 °C で保存した。

パラフィン包埋した組織は 5 μm の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin: HE) 染色で皮膚および小腸の細胞の形状を光学顕微鏡で確認した。

採取した血液は、-30°C で保存した。

7. 免疫組織化学染色と評価方法

免疫組織化学染色で、MMP-1、マスト細胞、CCR7、CD163、CD23、CD21、PPAR γ を測定した。

マスト細胞やトリプターゼ、MMP-1の計測にはImage JソフトウェアRを用いた。

さらに、PPAR γ の関与を確認するために、PPAR γ アンタゴニストであるGW9662を投与し、同様に乾燥皮膚発現を比較検討した。

CCR7; CCL19やCCL21のGタンパク共役型受容体であり、免疫細胞や線維芽細胞などの間質細胞から分泌される。これは、M1マクロファージでの発現が多く、今回の研究においても、M1マクロファージのマーカーとして使用した。

CD163; スカベンジャー受容体システインリッチ (scavenger receptor cysteine-rich: SRCR) スーパーファミリーに属する膜貫通タンパク質であり、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のスカベンジャー受容体であり、今回の研究では、M2マクロファージのマーカーとして使用した。

CD23²⁴; 分子量 45,000 の糖タンパクで、A型とB型が存在する。遺伝子は染色体19q13.3に存在し、遅延型アレルギー反応に関与している。CD23はB細胞、好酸球、単球 / マクロファージ、血小板などのマーカーである。その主たる機能は免疫グロブリン (Immunoglobulin: Ig) E の Fc 部に対する低親和性 IgE レセプター (Fc ϵ RII) であり、IgE 産生の制御に関与する膜抗原である。CD23は細胞質内のN末端の違いによりA型とB型に区分される。今回の研究では、B細胞のマーカーとして使用した。

CD21²⁵; 分子量 145,000 の糖タンパクで、遺伝子は染色体 19q13.1 に存在する。

CD21は、成熟B細胞、EBV形質転換リンパ芽球などのマーカーで、末梢血中では成熟循環B細胞に検出され、T細胞、NK細胞や顆粒球には検出されない。CD21抗原は

Epstein-Barr (EB)ウイルスの表面レセプターである。

CD; (Cluster of Differentiation あるいは Cluster Designation) とは、同一の細胞集団または同一の細胞膜抗原や抗原エピトープを認識するモノクローナル抗体を、1つのカテゴリーにまとめたものである。

8. ヒスタミン、インターロイキン (Interleukin: IL)-10、免疫グロブリン (immunoglobulin: Ig) E の測定

小腸と皮膚組織のヒスタミン測定のため、小腸と皮膚は、100 mg の組織片をそれぞれ準備し、そこにリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline: PBS) 1 mL を注入し、氷上でホモジナイズを行った。終了後、1500 ×g で 15 分間遠心分離し、上清を、分析用に採取した。

小腸、皮膚の上清液中のヒスタミン、血漿中の IL-10、IgE 抗体の測定には下記の ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) キットを使用した。光学密度測定機器: マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) で測定した。

ヒスタミン測定: Bertin Pharmacol, Montigny-le-Bretonnux, France

IL-10: Proteintech, Rosemont, IL, U.S.A.

IgE: Yamasa Shoyu Co., Ltd., Chiba, Japan

9. 組織染色

パラフィン包埋した組織片から 5 μm に切片を切り出し、その薄片をスライドガラスに載せ、十分に乾燥したのち、脱パラフィン処理を行って、HE 染色、トルイジンブルー

(Toluidine Blue: TB) 染色をおこなった²⁶⁾。

HE 染色を用いた組織染色では、組織の形状を確認した。TB 染色した組織は、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) を使用して、蛍光顕微鏡によりマスト細胞数を評価した。

10. ウェスタンブロット解析

背部皮膚サンプルを溶解緩衝液 (Kurabo, Osaka, Japan) 中でホモジナイズし、上清を採取するため、 $8000 \times g$ で 10 分間遠心分離した。採取した上清は分析まで -80°C で保管した。

解凍後、 $5\mu\text{g}$ / レーンのタンパク質を、4%~12% BIS-TRIS Bolt ゲル (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) に流し、200V で 30 分間電気泳動した。

メンブレインは 5%、 4°C で一晩、スキムミルクでブロッキングしたのち、 25°C で一次抗体と反応させた。

一次抗体は下記の通りである。

I 型コラーゲン : 1: 1,000; EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, U.S.A.

MMP-1: 1: 1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.

ケモカインレセプター7 : M1 macrophage marker, 1: 1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.

CD163; M2 macrophage marker, 1: 1000; Abcam

PPAR γ 1; 1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.

P-PPAR γ ; P-PPAR γ (1: 1,000; Bioss Inc, Woburn, MA, U.S.A., CD23; 1: 1000; Proteintech)

β - actin; 1: 5,000; Sigma-Aldrich

二次抗体で処理後、ImmunoStar Zeta (Wako Pure Chemical Industries)、画像分析器 (LAS-4000; Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

11. 統計分析

すべてのデータは平均値 \pm 標準偏差 (standard deviation: SD) 値で示した。結果は Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp.) を使用し分析した。各群間の統計的有意性は、Tukey's post-hoc test により評価した。危険率が、5% 未満の場合を統計学的に有意として判断した。統計解析は、SPSS software version 20 (IBM, Armonk, NY, U.S.A.) にて実施した。

第 3 節 結果

実験 (A)

TEWL は、インドメタシン群において、有意に上昇した (Fig-3a)。

角層水分量はインドメタシン群において、有意に減少した (Fig-3b)。

HE 染色した皮膚組織の比較では、インドメタシン群では肥厚がみられたが、ロキソプロフェン群、セレコキシブ群およびコントロール群の間に、大きな差は認められなかった。小腸は、大きな差は認められなかった (Fig-4)。

I 型コラーゲンの測定では、インドメタシン群において有意に減少した。これは、I 型コラーゲン分解酵素である MMP-1 が増加したためである。この結果は、ウェスタンブロット法による I 型コラーゲンの発現解析結果と相違はなかった (Fig-5)。

血漿中と皮膚のヒスタミンを確認したところ、双方においてインドメタシン群において有意に増加していた。特に皮膚においては、コントロール群の約 4 倍であった (Fig-

6a,6b)。

小腸と皮膚のマスト細胞数は TB 染色で比較したところ、インドメタシン群は、双方においてコントロール群に比べて増加傾向が顕著であり、それに続いてロキソプロフェン群、セレコキシブ群の順であった (Fig-7a,7b)。マスト細胞は、発現数に差はあるが、NSAIDs の投与により、増加することが明らかになった。

実験 (B)

PPAR γ の発現を免疫組織化学染色法で確認したところ、マスト細胞、PPAR γ の発現が、インドメタシン群で増加が認められた (Fig-8)。インドメタシン群、セレコキシブ群 において、P-PPAR γ 、PPAR γ を比較したところ、インドメタシン群は小腸において、P-PPAR γ が有意に増加し、PPAR γ の減少に有意差は認められなかった。(Fig-9a~9c)。また、皮膚においては、インドメタシン群 P-PPAR γ が有意に増加し、PPAR γ は他の群と比較して有意に減少した (Fig-9d~9f)。以上のことから、実験 (B) は、インドメタシンを対象として実験を行うこととした。

小腸のマクロファージを比較したところ、インドメタシン群の M2 マクロファージは、他の群と比較して、約 2 倍に増加したが、M1 マクロファージに有意差は認められなかった (Fig-10)。

皮膚のマクロファージを比較したところ、インドメタシン群の M2 マクロファージは、他の群と比較して、約 6 倍に増加したが、M1 マクロファージに有意差は認められなかった (Fig-11)。

B 細胞は、インドメタシン群が、コントロール群および他の NSAIDs 投与群と比較して、約 3 倍増加した (Fig-12)。

IL-10 は、インドメタシン群が、コントロール群の約 5 倍増加した (Fig-13)。

IgE 抗体は、インドメタシン群において、コントロール群の約 5 倍増加した (Fig-14)。

PPAR γ アンタゴニストである GW9662 単独群の TEWL は、コントロール群よりも若干低下した。インドメタシン単独群と併用群の TEWL はコントロール群よりも上昇したが、インドメタシン単独群に比べて併用群の TEWL は、低かった (Fig-15)。

角層水分量においては有意差は認められなかった (data not shown)。

小腸と皮膚のトリプターゼは、PPAR γ アンタゴニストである GW9662 を併用すると、インドメタシン単独群より減少した (Fig-16a~16d)。

第 4 節 考察

今回の研究では、NSAIDs 投与における皮膚の生理機能の変化について検討した。

皮膚は、我々の身体全体を覆い、生体の状態維持のためにバリア機能、体温調節機能などをもつ組織である²⁷⁾。

皮膚の概略図 (Fig-17) において、一番外側が角質層で、内に向かって顆粒層、有棘層、基底層があり、基底膜を境にして表皮を構成している。基底膜より内側に、結合組織で、コラーゲンやヒアルロン酸が存在する真皮がある。表皮の厚さは約 0.2mm でその 95% は角化細胞である。角質層は、10 層以上からなり、その下の顆粒層は 2~5 層である。有棘層は 5 層、そして表皮の一番内側にある基底層は 1 層である。顆粒層にはタイトジャンクション (Tight Junction: TJ) があり、細胞の隙間を埋めて内外の行き来を防いでいる。体外との境目にある角質層と、顆粒層にある TJ が、皮膚バリア機能において重要な役割を担っている。

乾燥皮膚の評価は、経表皮水分喪失量 (Trans Epidermal Water Loss: TEWL) TEWL と角層水分量で行う。TEWL は、角質層を通じて、喪失する水分量を表しており、健康な皮膚で 0.3 から 0.5 mg / cm² / 時間で、数値は大きくなると皮膚バリア機能の低下傾向を示す。また、角層水分量は、角質層に含まれる水分量のこと、健康な皮膚で約 20 から

30% であり、この数値は小さくなると皮膚バリア機能の低下傾向を示す。

乾燥皮膚は、TEWL が上昇し、角層水分量が低下しているときに生じる。コラーゲンは、天然保湿タンパク質であり、皮膚を潤す効果があるが、増加したマスト細胞からヒスタミンの分泌が増加することで、その保湿効果を低下させている²⁸⁾。

ヒスタミンはアレルギーを引き起こすケミカルメディエーターとしてよく知られている。IgE 抗体がマスト細胞上の FcεRI レセプターと結合し、その IgE 抗体と抗原が結合したときに、マスト細胞の脱顆粒により放出され、アレルギー症状を呈する。また、IgE 抗体が著しく増加した時にもマスト細胞は脱顆粒を発現する。さらに、マスト細胞がトリプターゼを活性化すると種々の MMPs が放出され、MMP-1 は I 型コラーゲンを、MMP-9 は IV 型コラーゲンを減少させる²⁹⁾。その結果、皮膚生理機能の破綻が生じる。

今回使用した薬剤の特徴は次の通りである。インドメタシンは、COX-1 選択性が強く、また、薬効が現れるのが早く、鎮痛効果も強力であることから、発売当時には自己免疫性疾患である関節リウマチ治療に投与されていた薬剤である。ロキソプロフェンは、COX 非選択性 NSAIDs で、現在でも幅広く使用され、スイッチ OTC によりドラッグストアでも購入できる薬剤である。セレコキシブは、COX-2 選択性 NSAIDs のカテゴリーで認められている薬剤で、胃・十二指腸潰瘍の発現が少なく高齢者に、広く使用されている薬剤である。

NSAIDs を投与したマウスの小腸炎症によるマスト細胞数の変化を確認したところ、インドメタシン群でマスト細胞数の著しい増加がみられた。

当該研究室では、NSAIDs 投与による小腸炎症と皮膚生理機能の変化との関連の研究において、COX-1 選択性の強いインドメタシン投与により発現した小腸炎症でマスト細胞数が増加し、過剰分泌された腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF)-α や IL-6 などの炎症性サイトカインやヒスタミンなどが MMPs を活性化することによりコラーゲンが減少し、その結果、乾燥皮膚を誘導したと報告している³⁰⁾。

PPAR γ は、リガンド依存性で、脂肪の蓄積や糖代謝に関わるタンパク質であり、マクロファージ上にも発現し、炎症を抑制する働きがある。PGD $_2$ から合成される PGJ $_2$ の代謝産物である Δ 12-PGJ $_2$ 、15d-PGD $_2$ が内因性リガンドとして PPAR γ を活性化している³¹⁾³²⁾³³⁾。NSAIDs は、生体内で COX を阻害して薬効を発現するだけでなく、PPAR γ の外因性リガンドとして働くことが知られている。NSAIDs の中でもインドメタシンはリガンドとしての働きが強いことが知られている。インドメタシンを経口投与した結果、小腸炎症が惹起され、炎症部位から炎症性サイトカインやヒスタミンが過剰に分泌され、循環血流に放出される。インドメタシンは PPAR γ を活性化した結果、抗炎症作用のある M2 マクロファージを増加させる。M2 マクロファージの増加に伴い、抗炎症作用をもつ IL-10、IgE 抗体の分泌も増加した。その結果、B 細胞の増加、IL-10 による B 細胞の成熟化、IgE 抗体の増加が誘発され、マスト細胞の脱顆粒を促したと考えられる。小腸炎症に伴い、マスト細胞は増加していたため、脱顆粒で放出されたケミカルメディエーターも増加したと考えられる。

インドメタシン投与による PPAR γ の活性化、B 細胞の増加および成熟化および IgE 抗体の増加のメカニズムと、小腸炎症によるマスト細胞の増加により、マスト細胞の脱顆粒が促され、その結果、乾燥皮膚発現に至ったと考えられた。

実験 B において、PPAR γ の関与を検証するため、PPAR γ のアンタゴニストである GW9962 をインドメタシンと同時に投与したところ、TEWL は低下傾向を示した。MMP-1 は、トリプターゼにより活性化されるが、実験 B で、小腸および皮膚のトリプターゼが減少したことより、MMP-1 が減少傾向を示し、I 型コラーゲンの分解が抑制されたと考えられた。以上のことにより PPAR γ はインドメタシン投与により、皮膚バリア機能の低下を誘導すると考えられる。

インドメタシン投与において、小腸炎症発現、炎症性サイトカイン分泌増加による乾燥皮膚発現のメカニズムとして、PPAR γ の関与するメカニズムが考えられた。

インドメタシン投与の小腸炎症は、数時間後に発現し始め 24 時間後には組織の充血や出血がみられることがあり、この症状は胃・十二指腸潰瘍発現量より低用量で発現するという報告があり、自覚症状が少なくても、インドメタシン投与による小腸炎症は無視できないといえる³⁴⁾³⁵⁾。

今回の研究で、インドメタシン群において乾燥皮膚が発現するメカニズムに、免疫システムも関わっており、これは小腸、皮膚双方の免疫システムに影響を与えるという可能性も含まれていると考えられる。

第 1 章の結果は Fig-18 にまとめた。

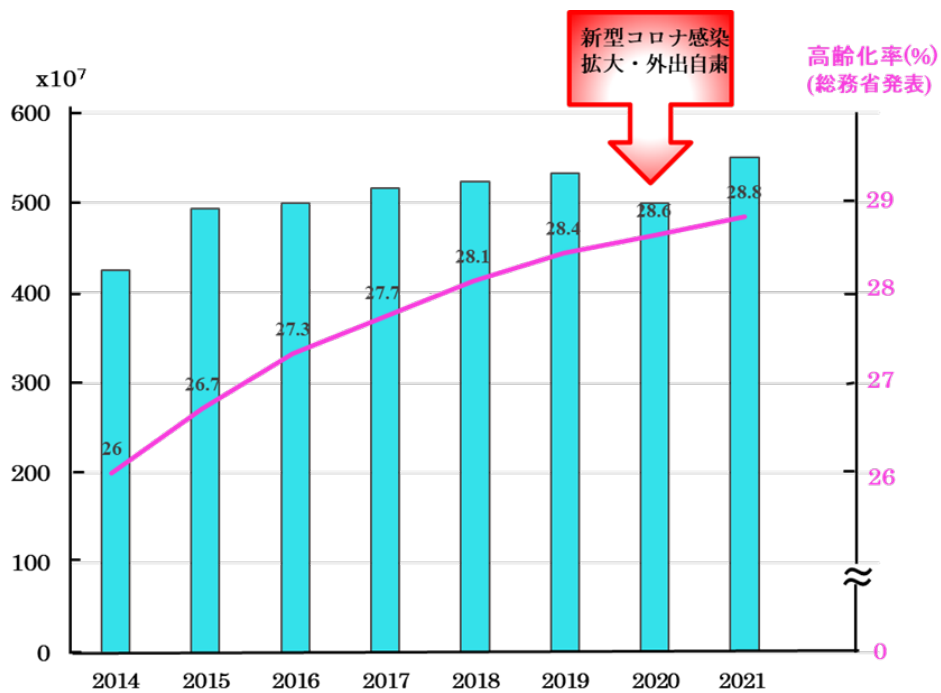


Fig-1 2014年～2021年 年度別解熱鎮痛消炎剤の使用量と高齢化率

(厚生労働省 NDB オープンデータ 薬効分類 114 のデータおよび総務省発表の高齢化率をもとに作成)

厚生労働省の NDB データでは、解熱鎮痛消炎剤の使用量が年々増加傾向を示している。また、総務省の発表している高齢化率を合わせると、相関がみられる。ただし、2020年は新型コロナウイルス感染拡大予防対策により、薬剤の使用量は一時的に減少したが、2021年は、再び上昇傾向を示した。

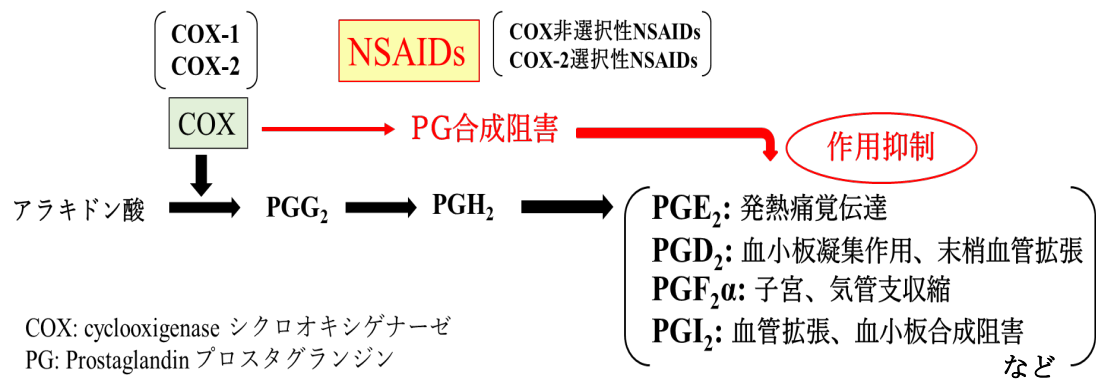


Fig-2 アラキドン酸カスケードおよび NSAIDs の作用機序

生体内では、アラキドン酸から PG を合成している。その律速酵素が COX-1、COX-2 である。合成された PG は種々の働きを担い、生体のホメオスタシスに関与している。

その 1 つが PGE₂ であり、発熱痛覚伝達作用を有し、炎症の発現時に効果を発揮する。

NSAIDs の作用機序は、アラキドン酸から PG 合成の律速酵素である、COX を阻害し、その結果、PG 合成が阻害され、薬効発現に至る。

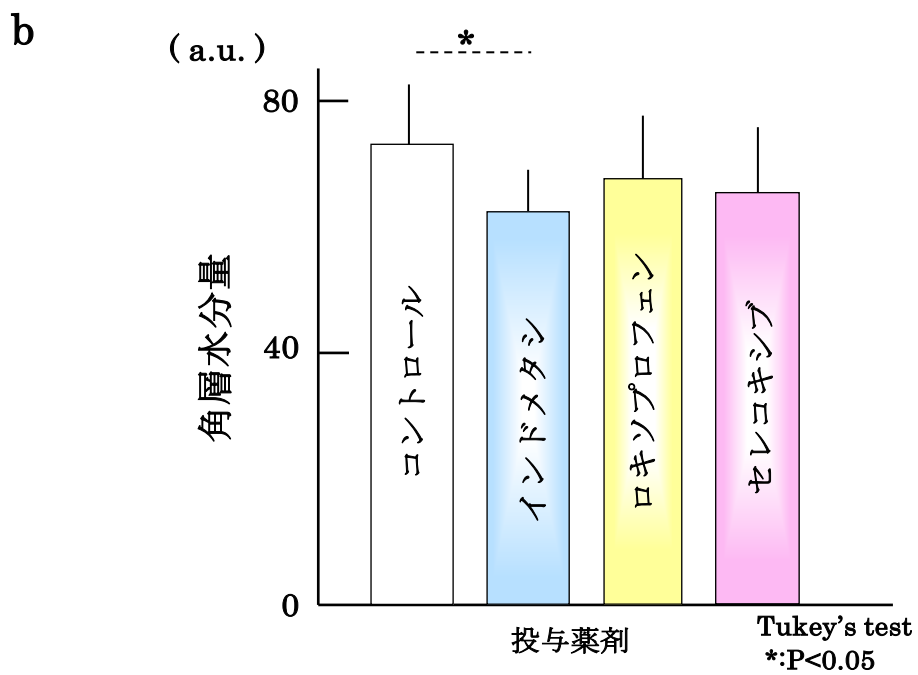
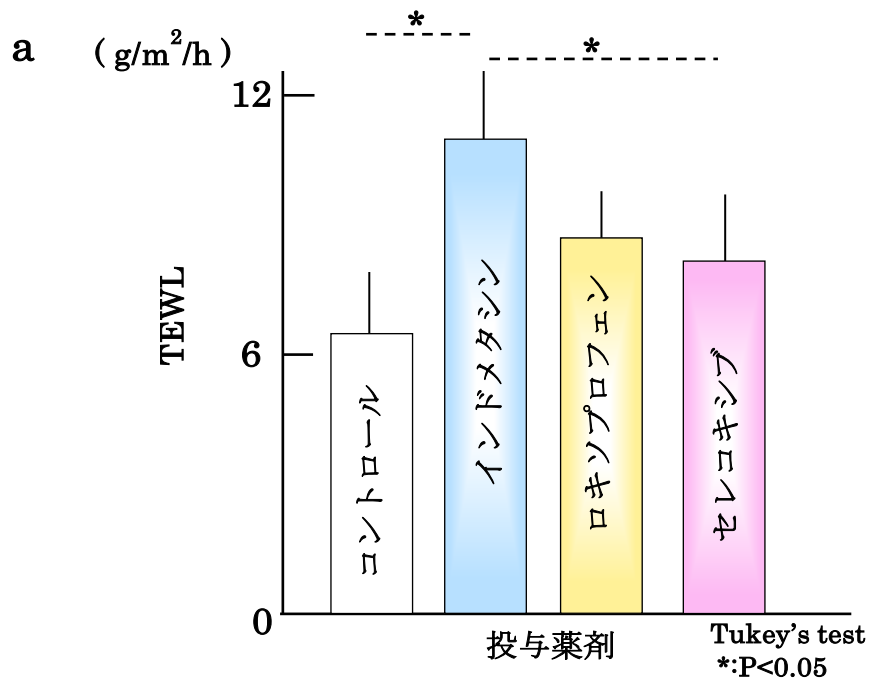


Fig-3 NSAIDs 投与時の TEWL と角層水分量の比較

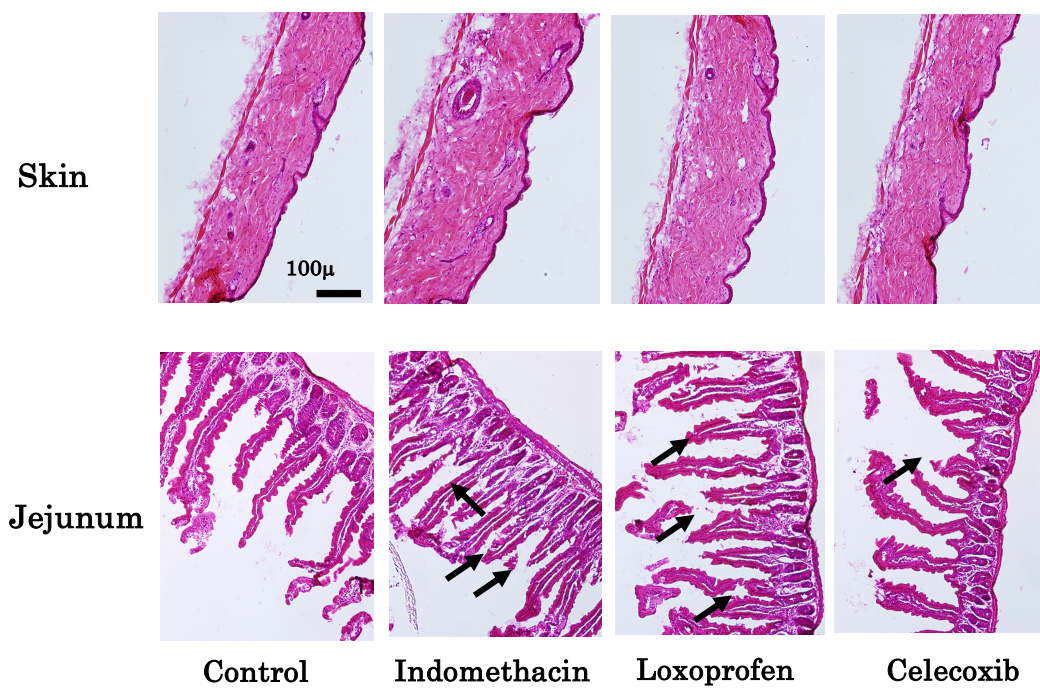


Fig-4 HE 染色した皮膚および小腸組織の比較

黒矢印は小腸絨毛組織の切断されたところを示している。

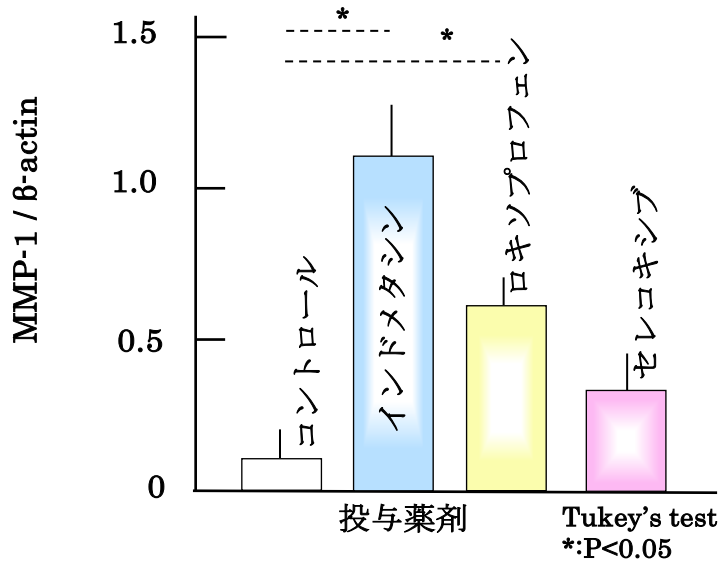
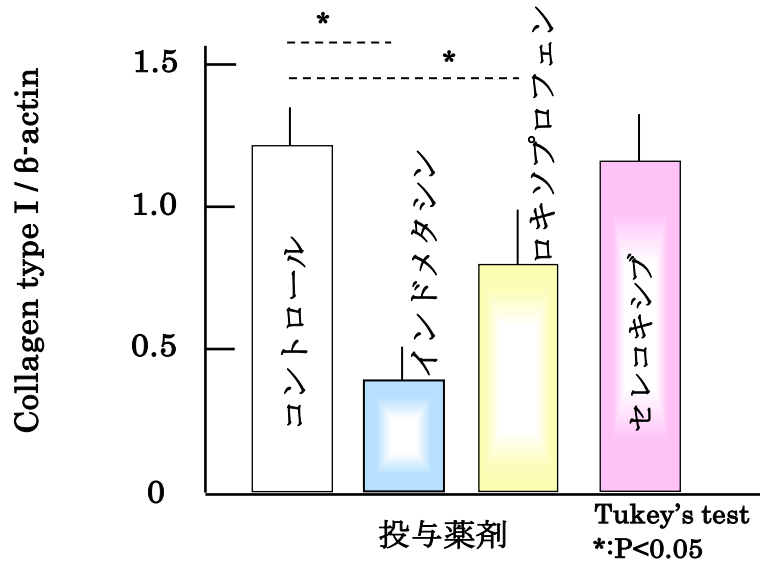
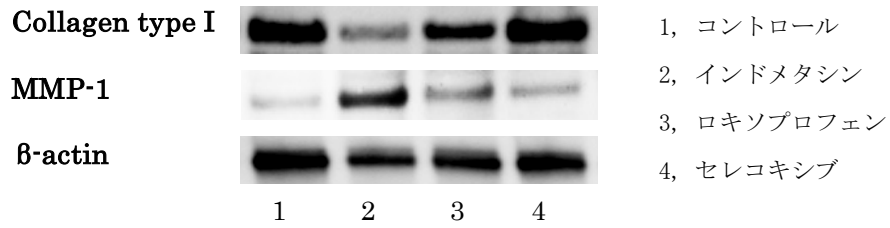


Fig-5 I 型コラーゲン、MMP-1 の比較

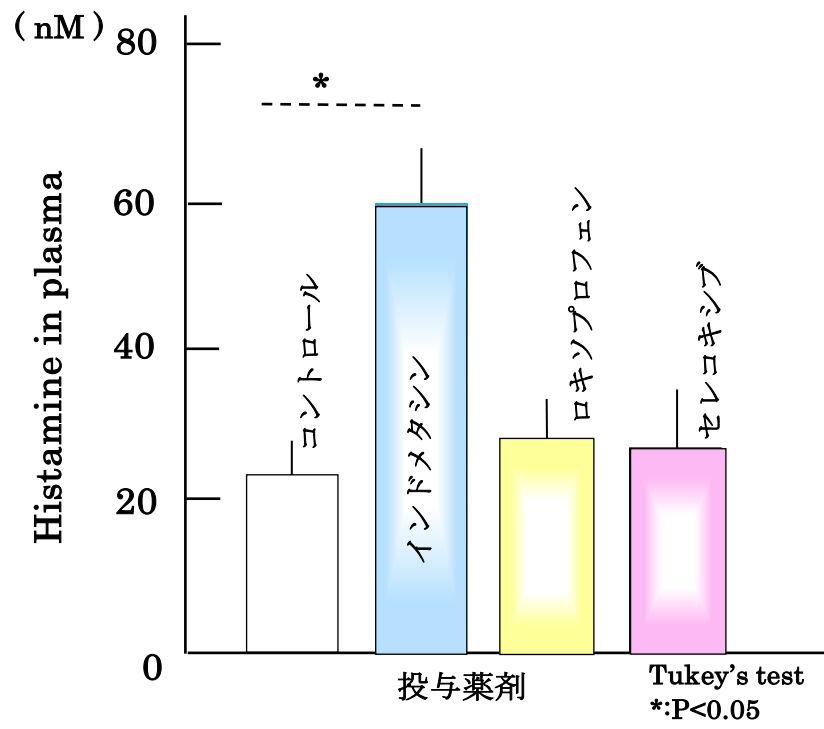


Fig-6a NSAIDs 投与による血漿ヒスタミン量の比較

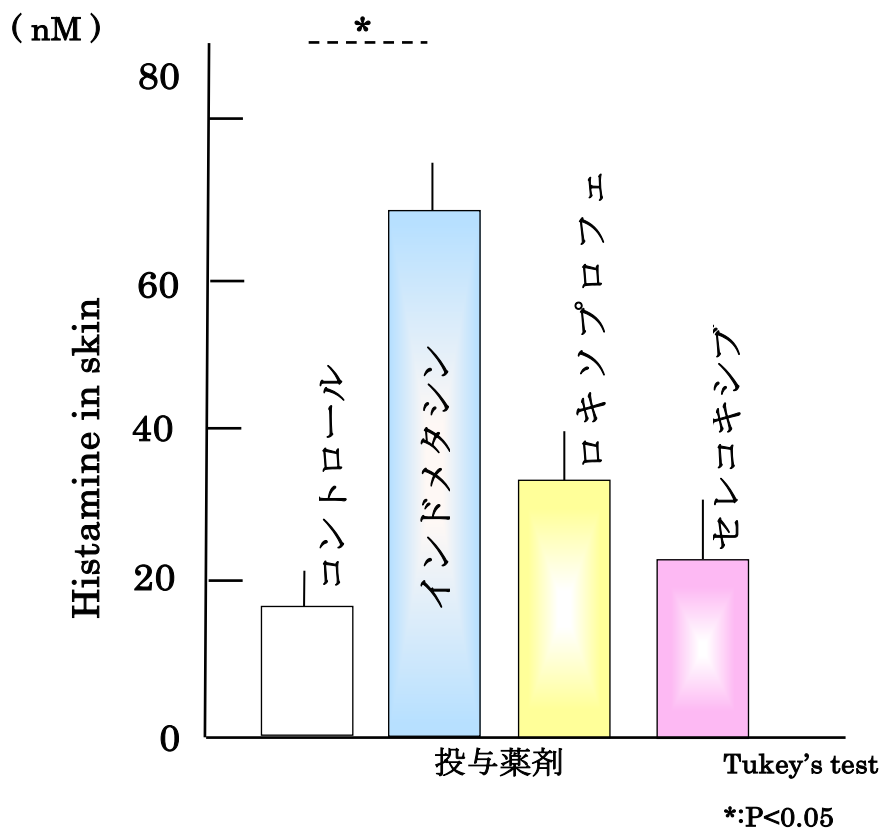


Fig-6b NSAIDs 投与による皮膚ヒスタミン量の比較

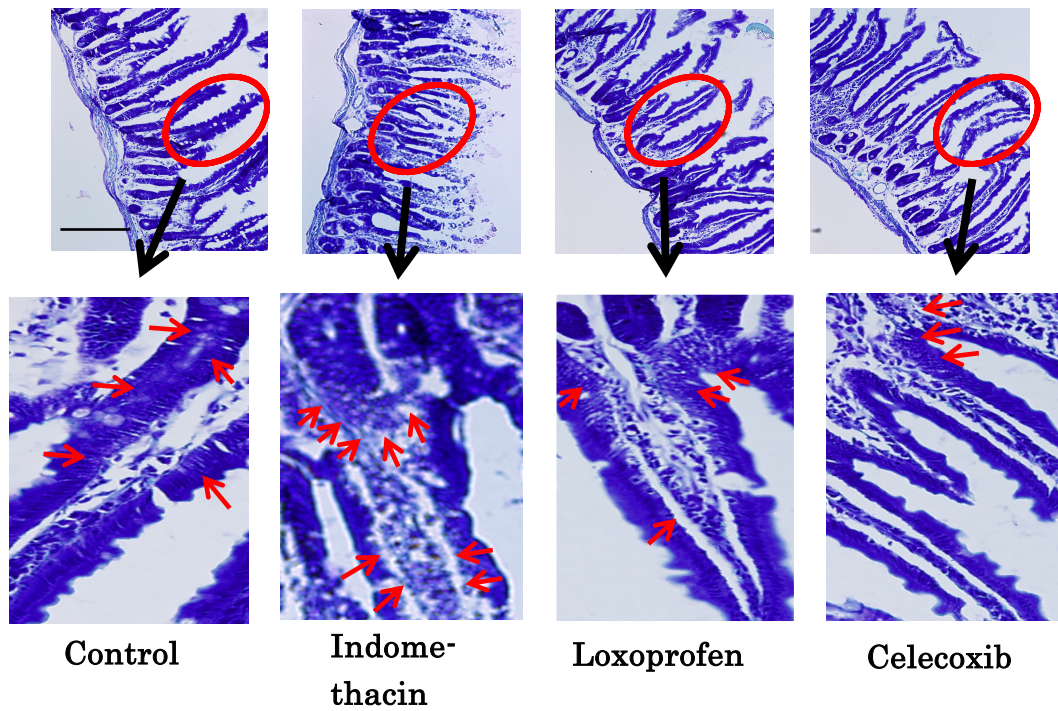
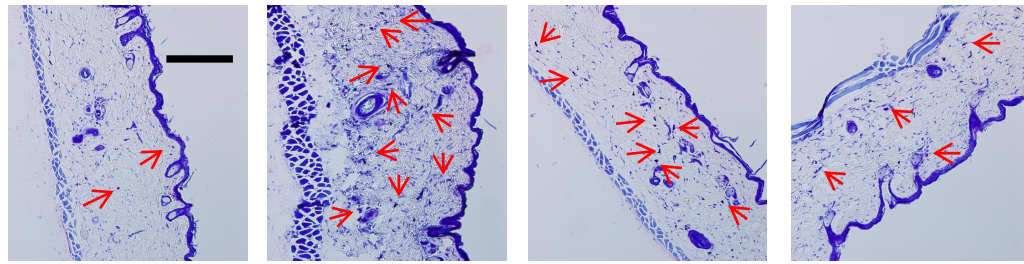


Fig-7a 小腸でのマスト細胞の発現の比較 (TB 染色)

赤矢印はマスト細胞を示す。

スケールバーは 100 μ m を示す。



Control

Indome-
thacin

Loxoprofen

Celecoxib

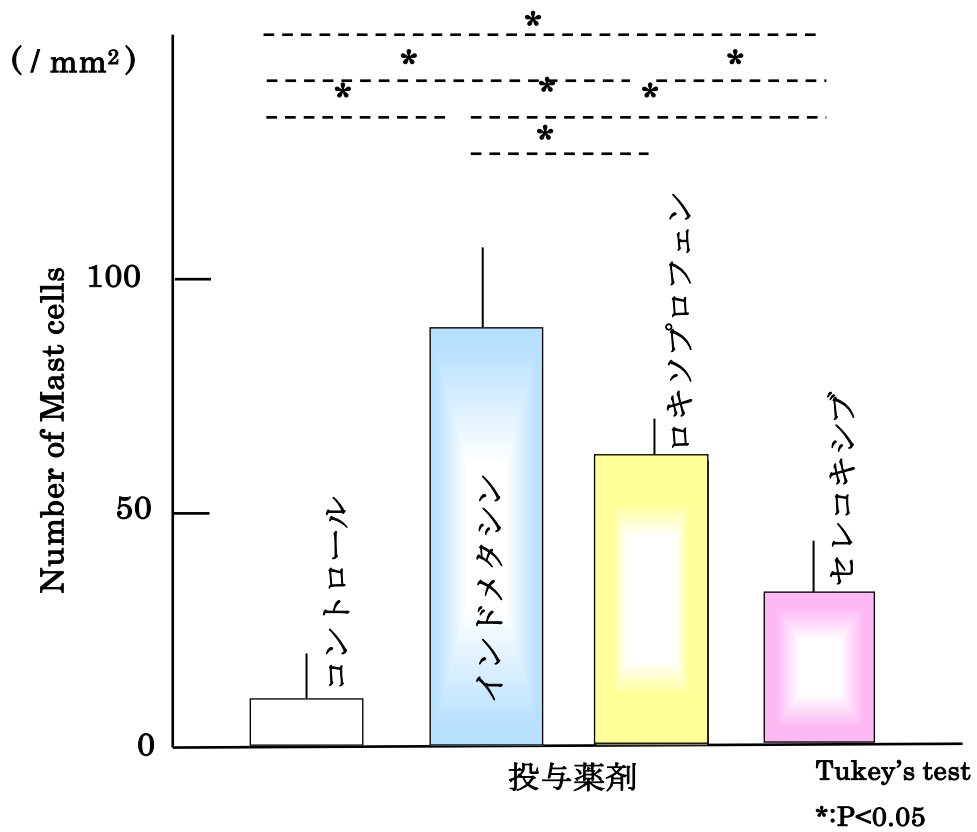


Fig-7b 皮膚におけるマスト細胞数の比較 (TB 染色)

赤矢印はマスト細胞を示す。

スケールバーは 100 μ m を示す。

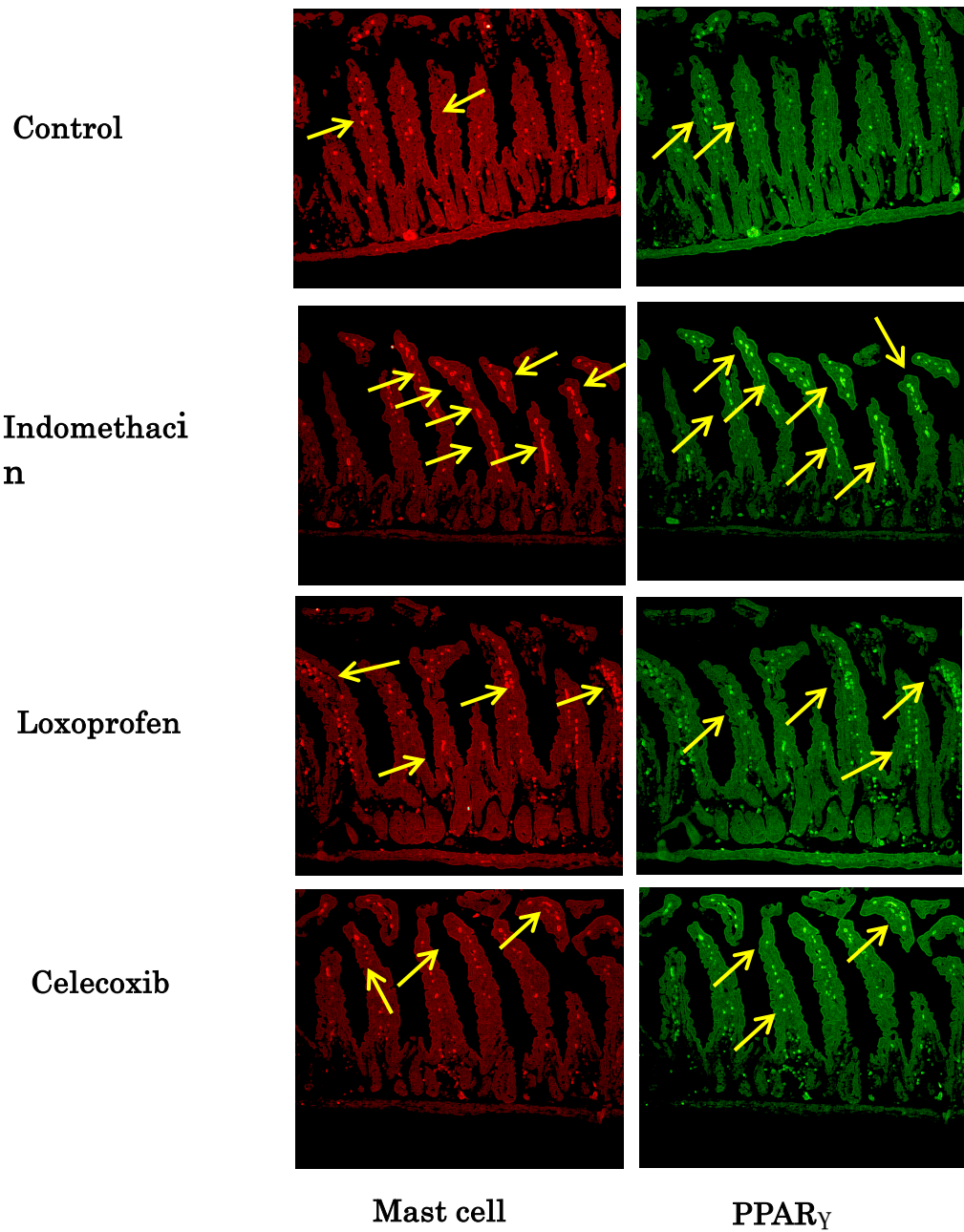
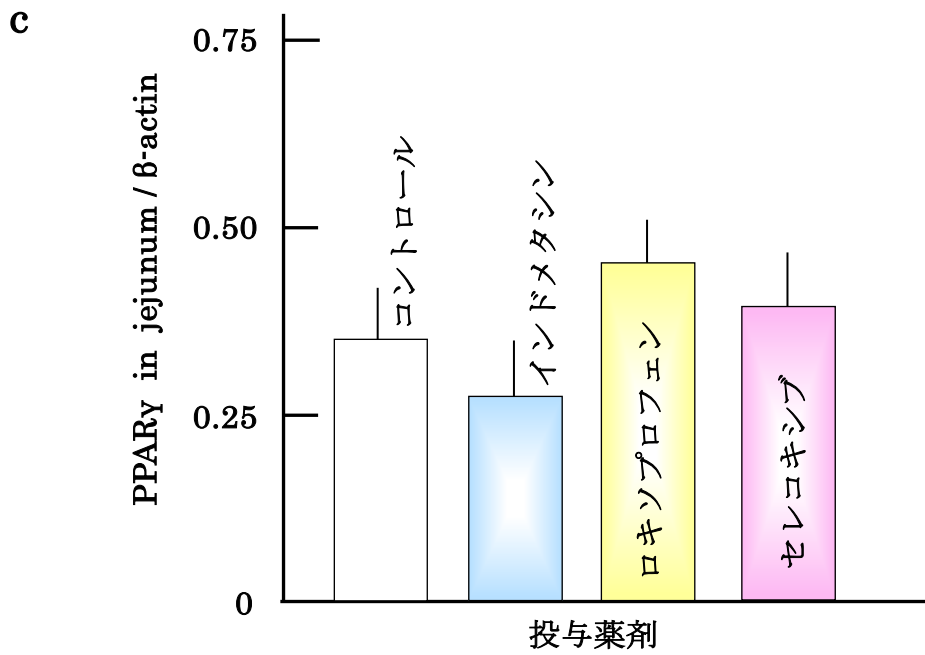
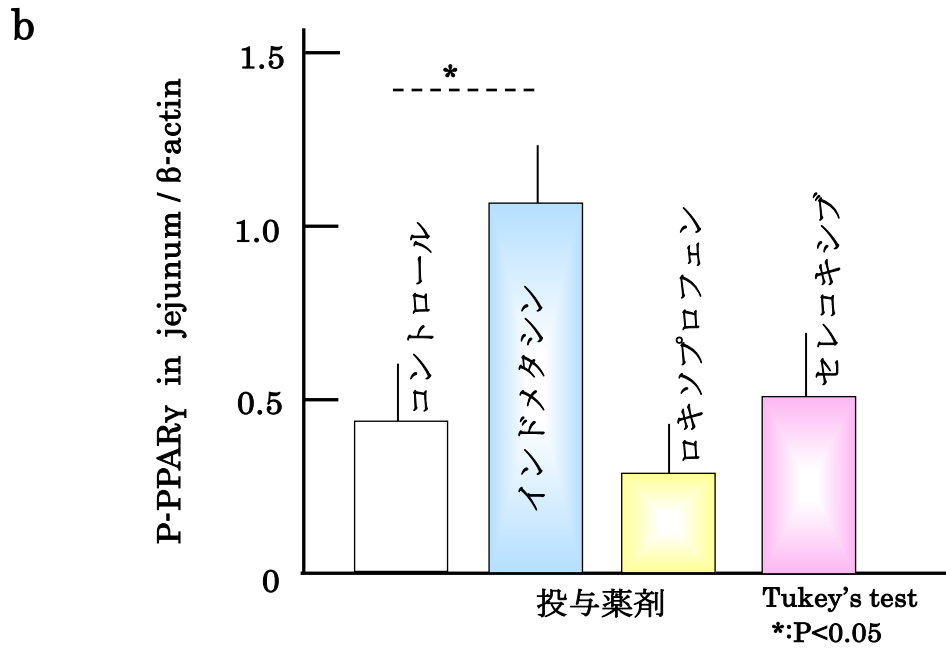
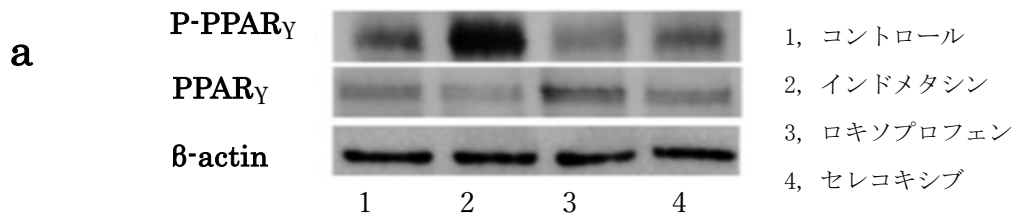


Fig-8 マスト細胞および PPAR_γ の発現の比較 (免疫組織化学染色)

黄色の矢印は発現したマスト細胞および PPAR_γ を示す。



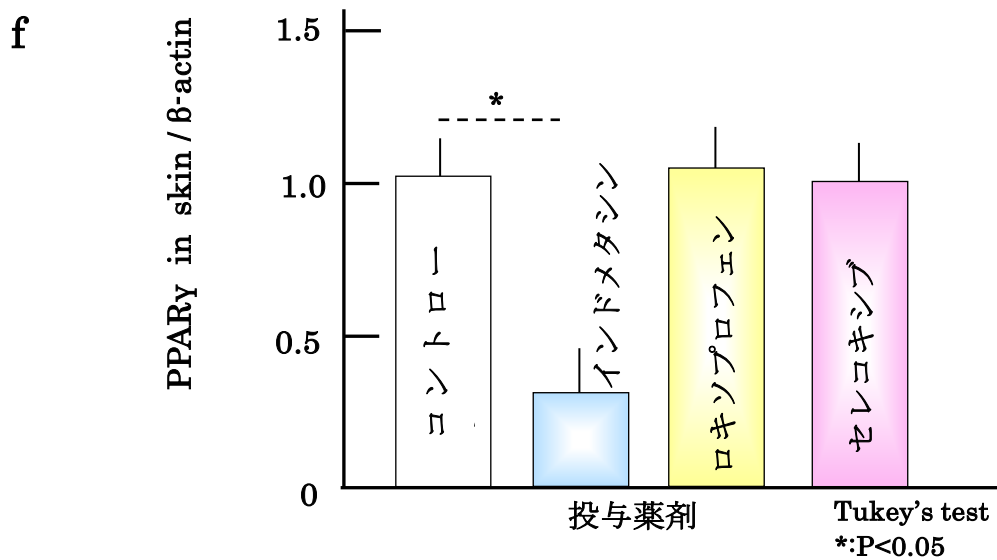
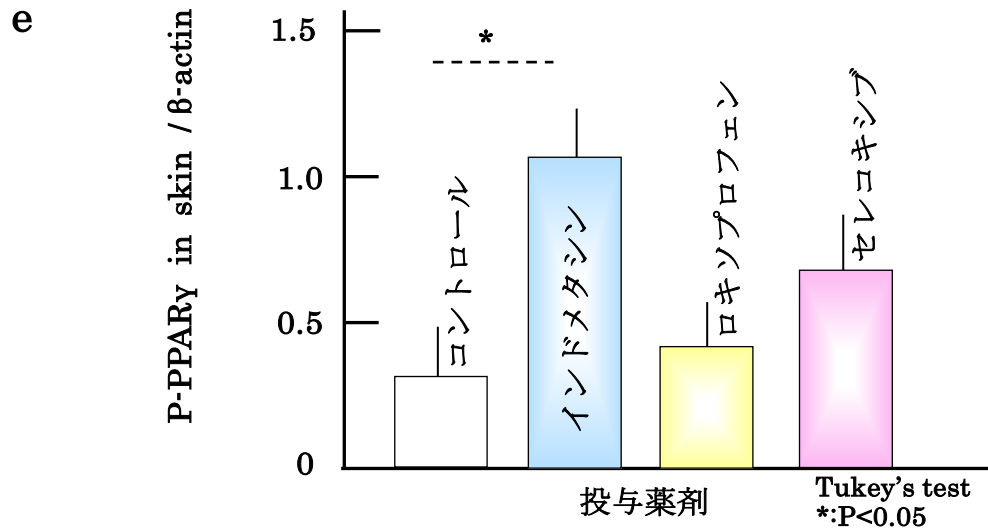
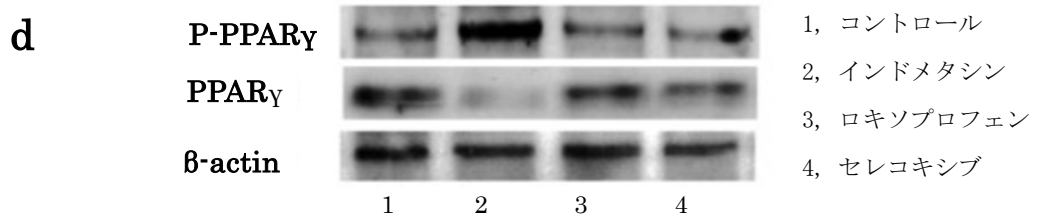


Fig-9 小腸 (a,b,c) と皮膚 (d,e,f) における P-PPAR γ 、PPAR γ の発現量の比較

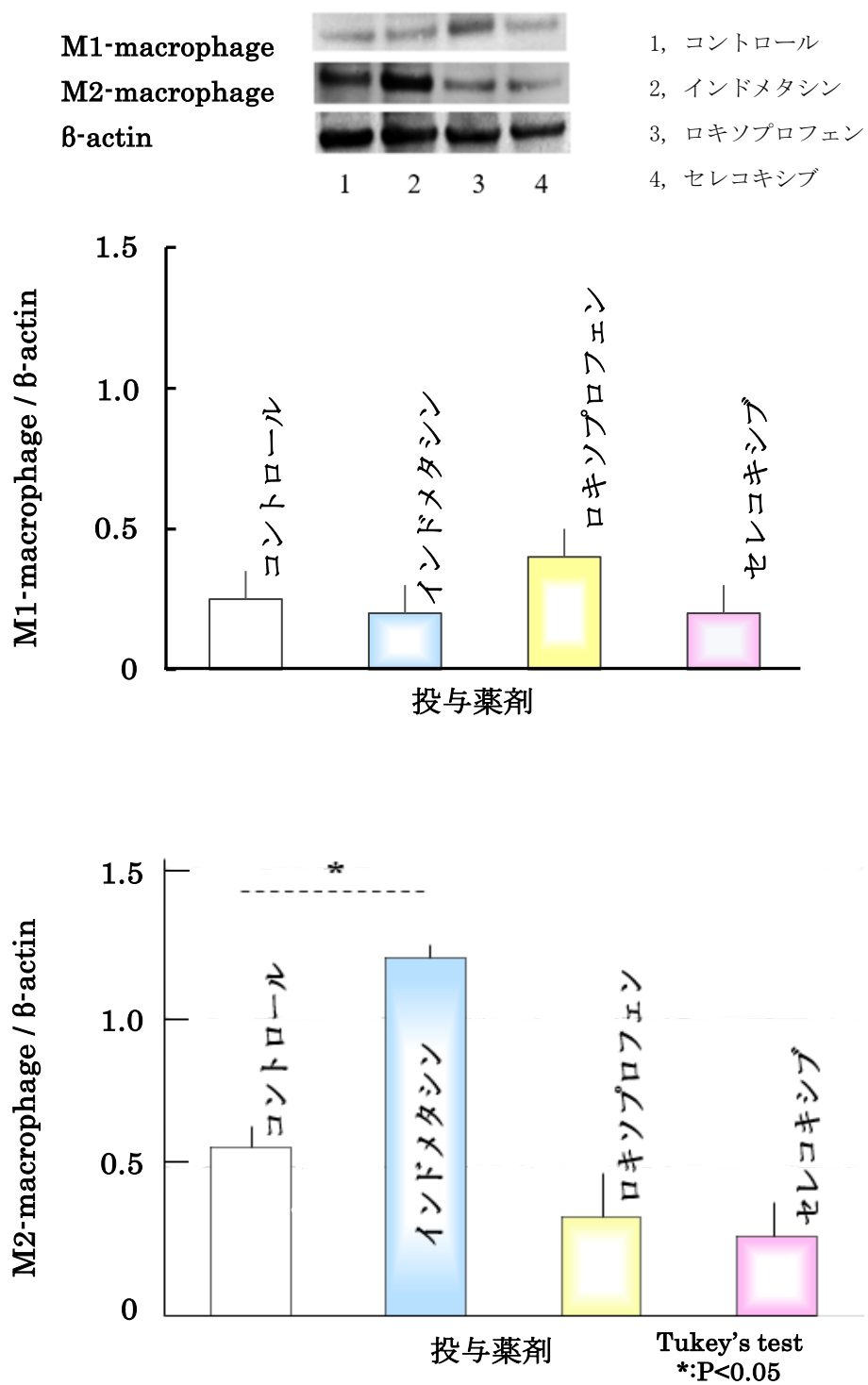


Fig-10 小腸における M1 および M2 マクロファージの比較

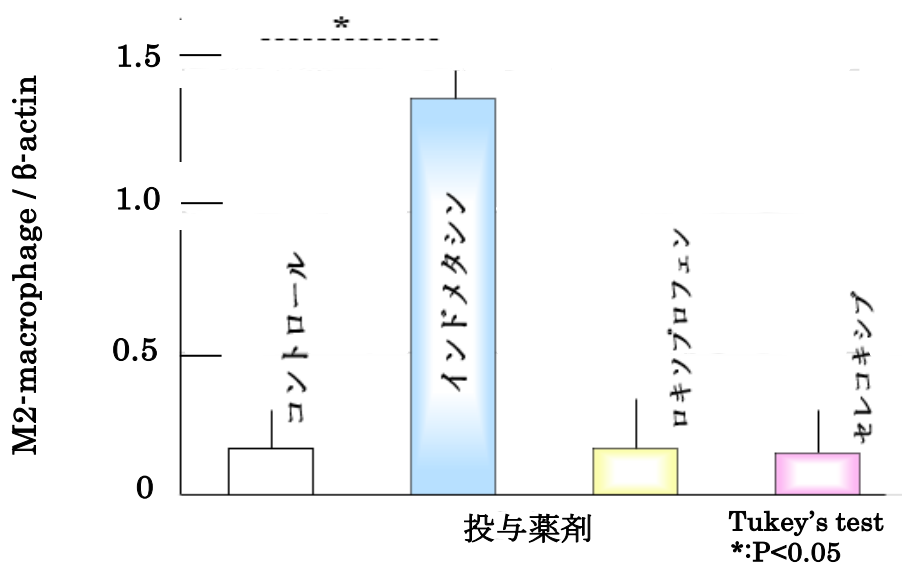
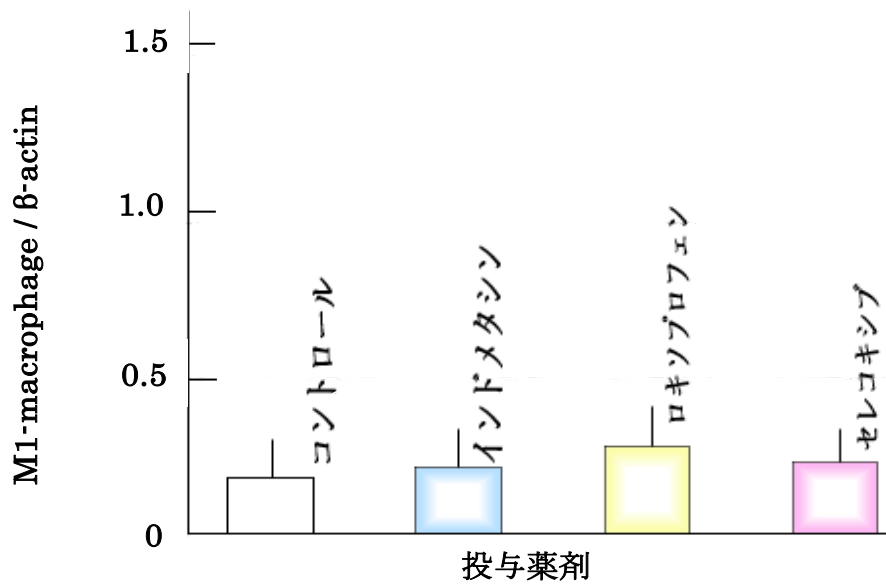
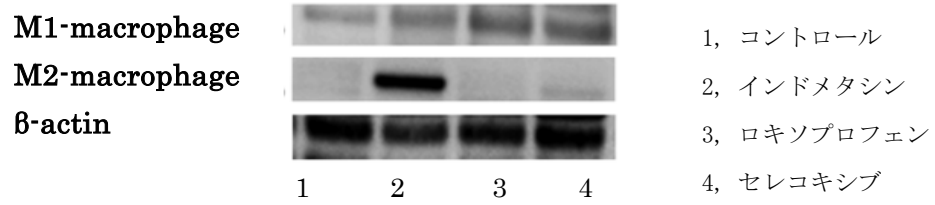


Fig-11 皮膚における M1 および M2 マクロファージの比較

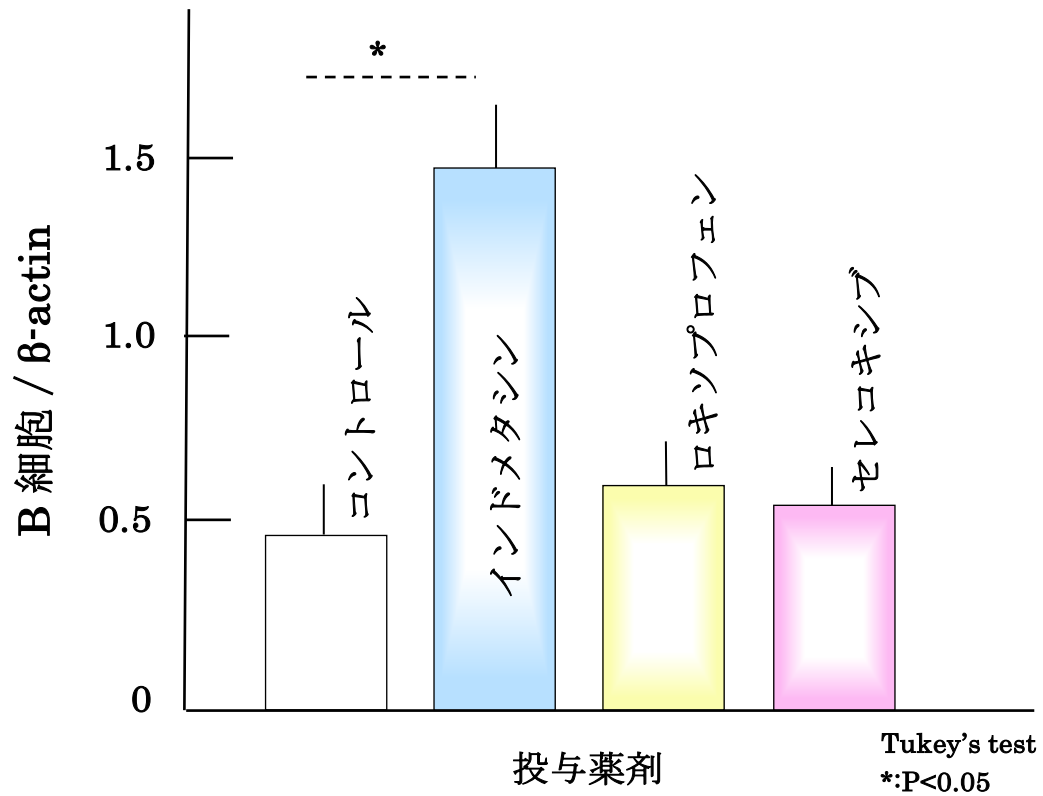
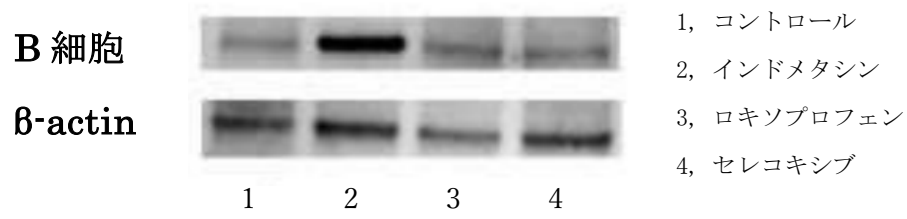


Fig-12 皮膚の B 細胞の発現数の比較

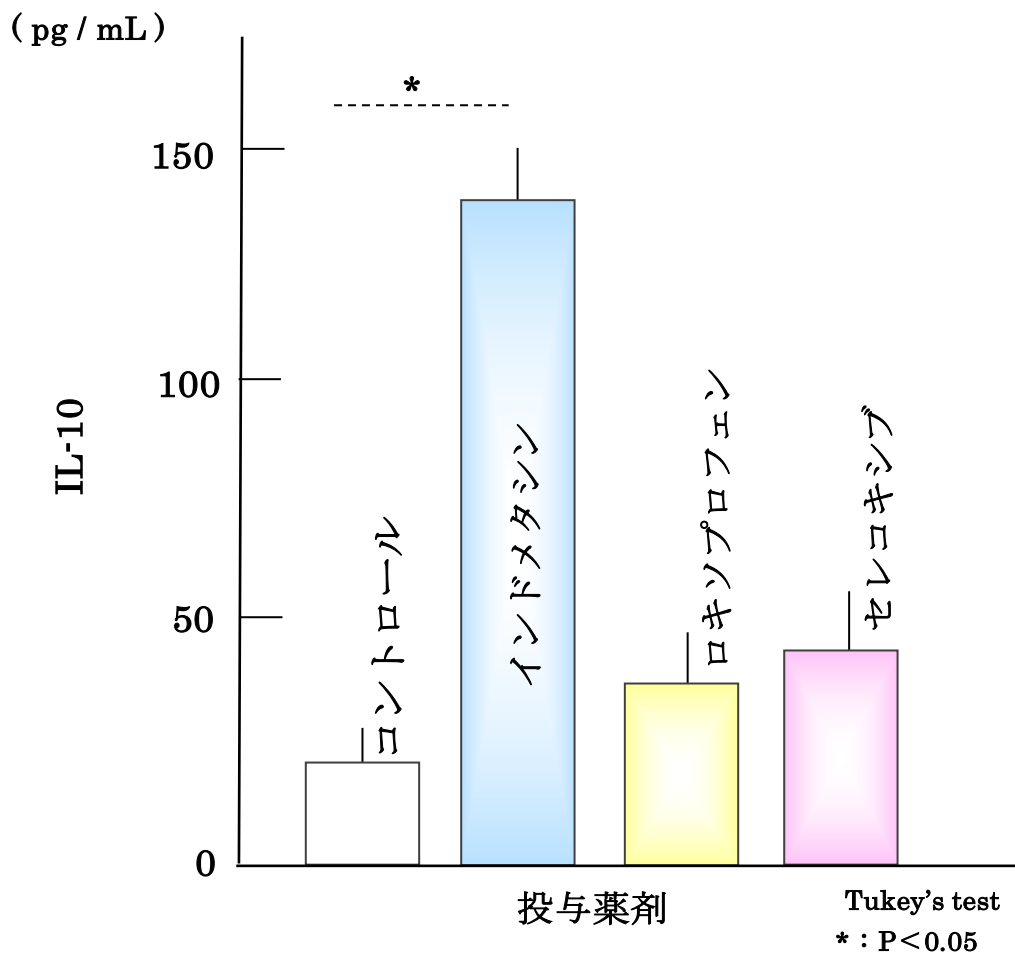


Fig-13 IL-10 の発現量比較

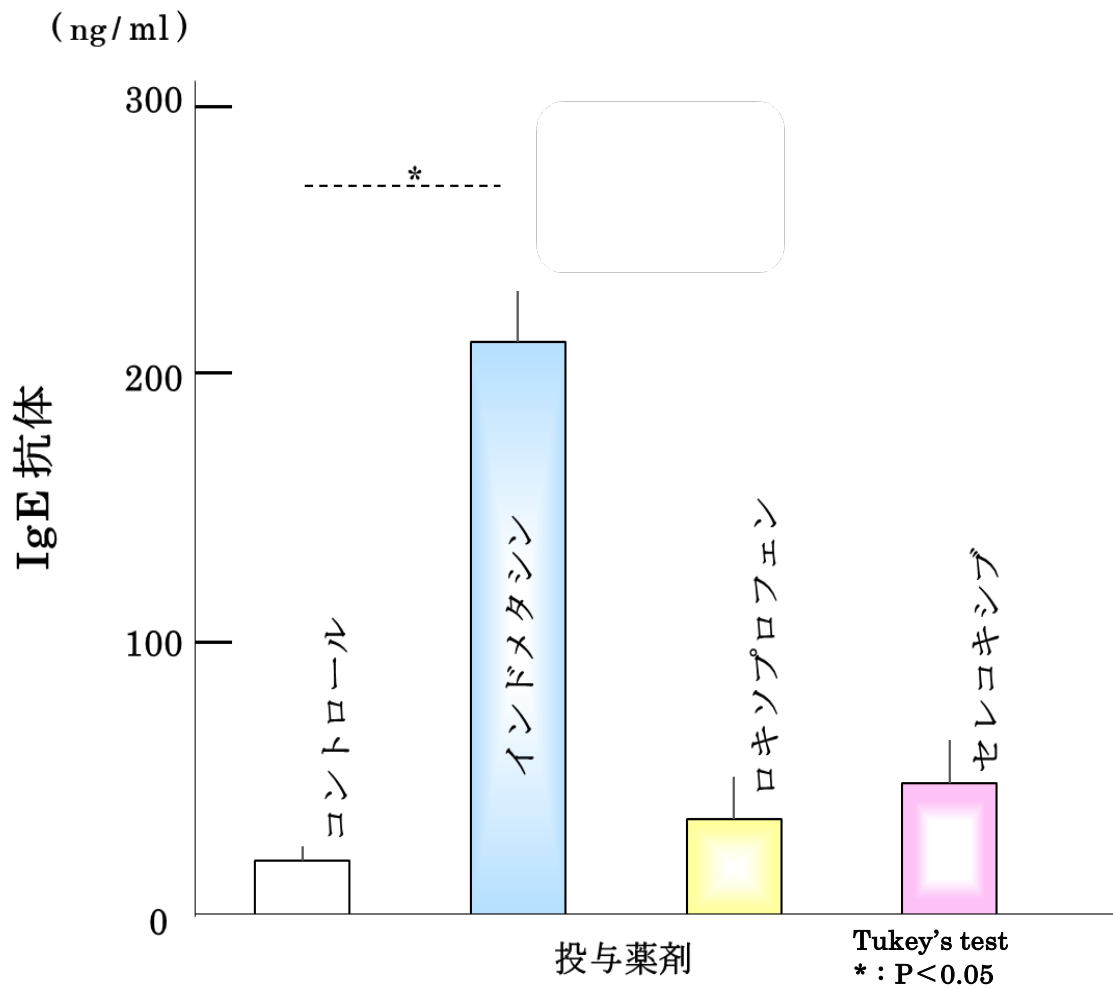


Fig-14 IgE 抗体発現量の比較

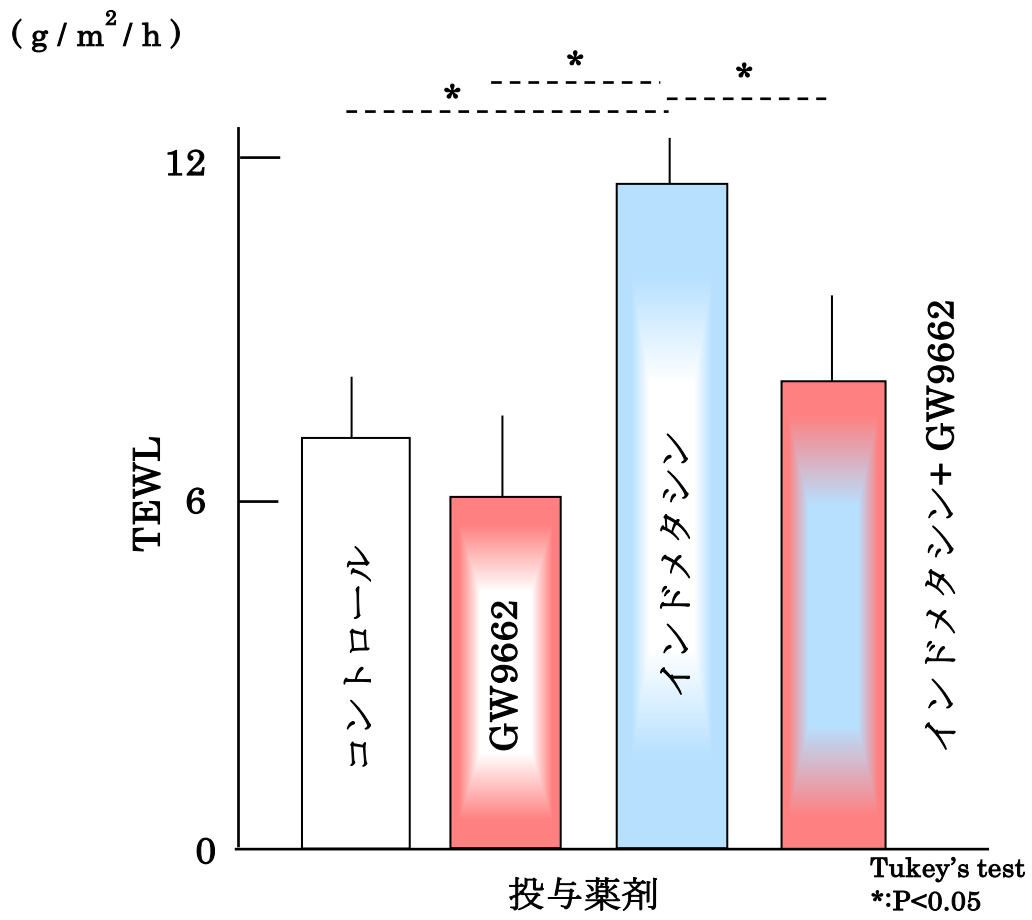
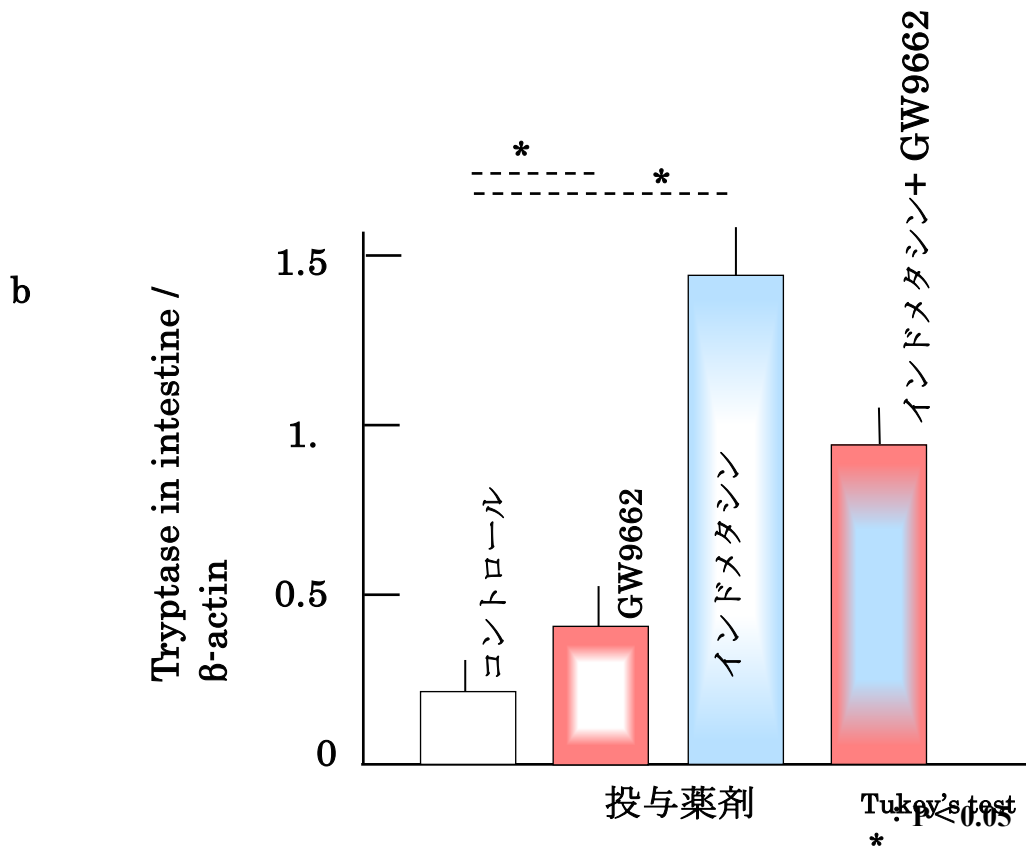
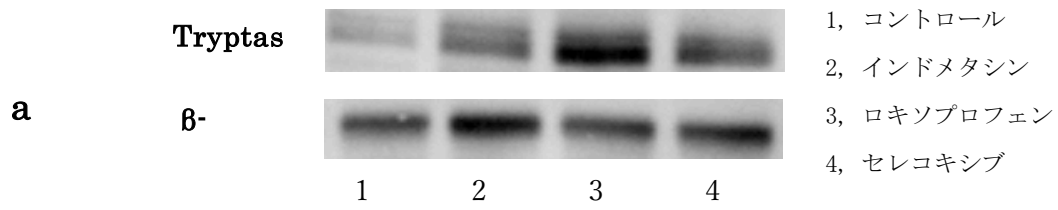


Fig-15 PPAR_γ アンタゴニスト GW9662 を投与した時の TEWL の比較



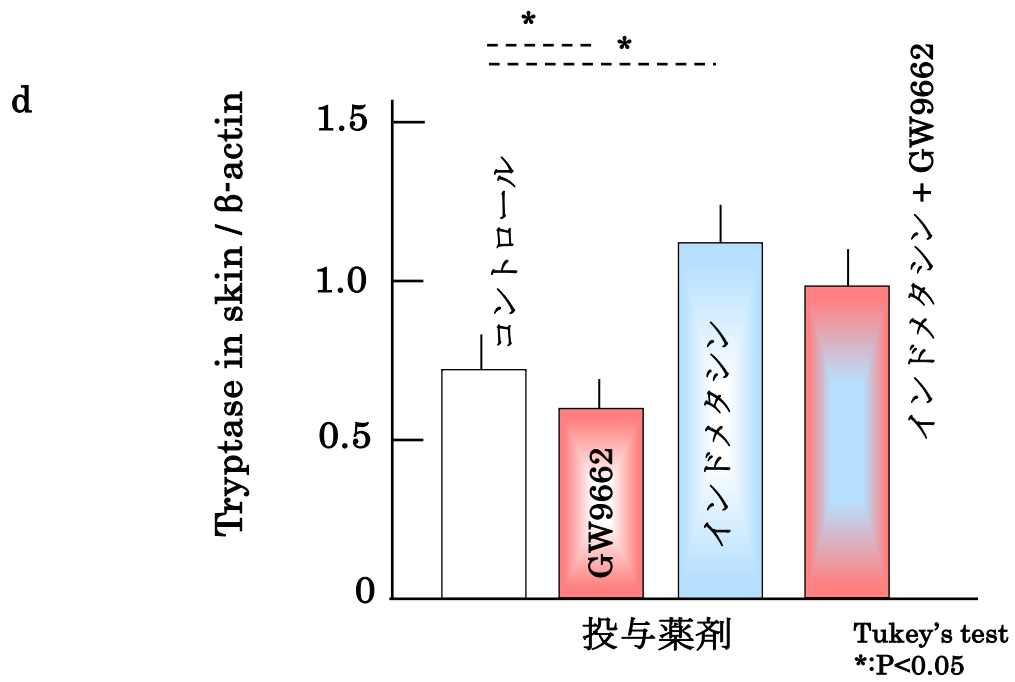
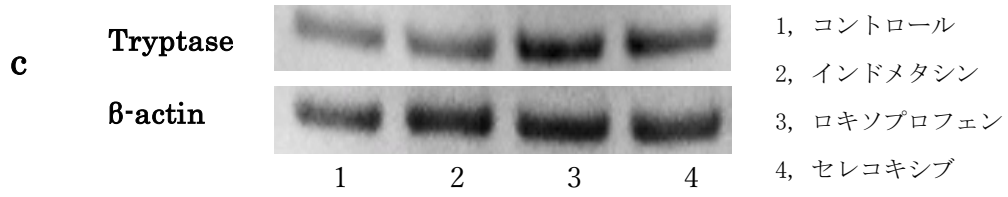


Fig-16 PPAR γ アンタゴニスト GW9662 を投与時の小腸および皮膚におけるトリプターゼの比較

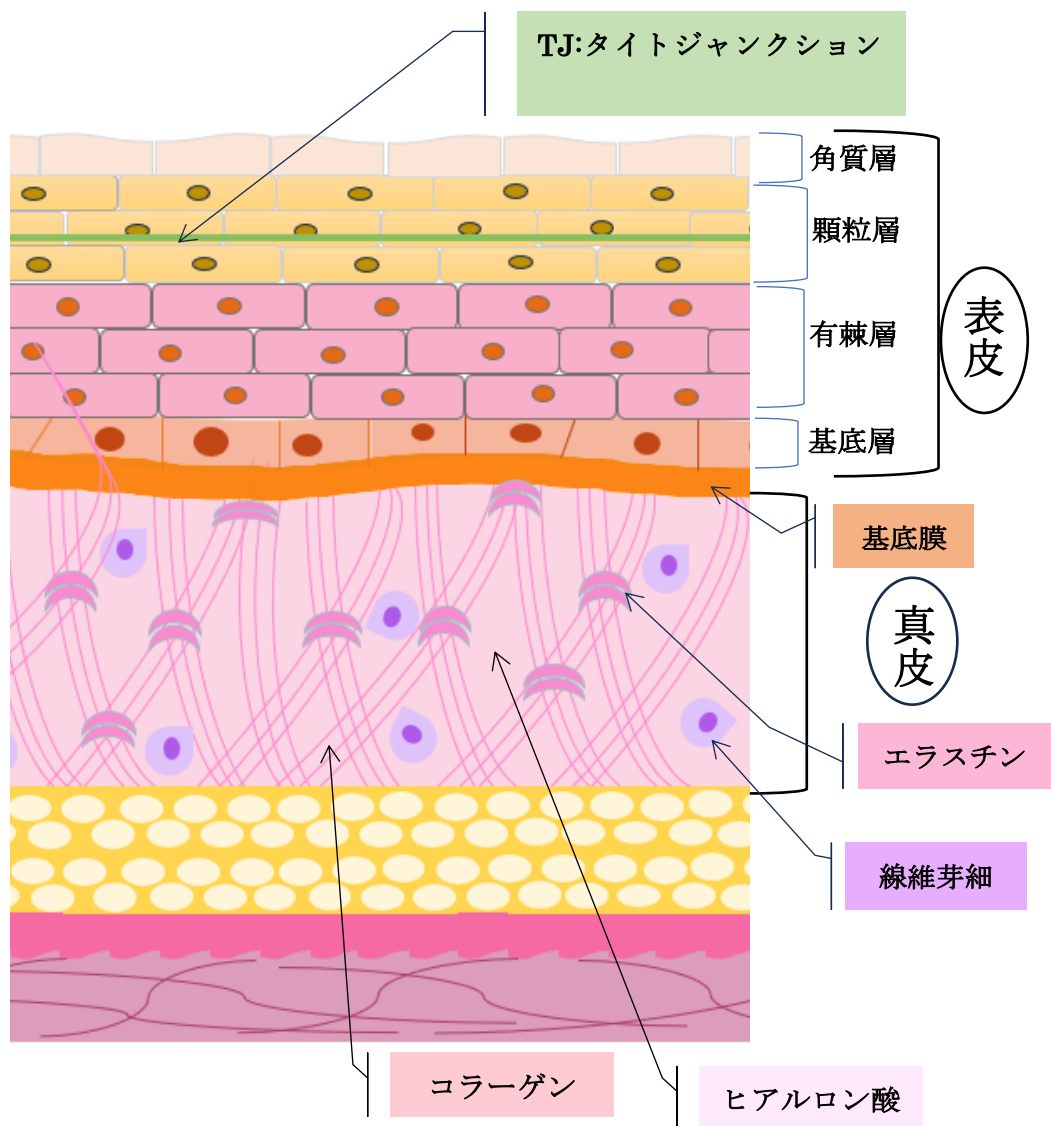


Fig-17 皮膚組織の概略図

皮膚は生体の内外との境界を形成する組織であり、生体を覆っている。皮膚のバリア機能により対外からのアレルゲンや細菌などの侵入、体内からの水分喪失を防いでいる。表皮の顆粒層は2～5層で形成されており、第2層に TJ が、細胞間の隙間を埋めている。

第5節 小括-1

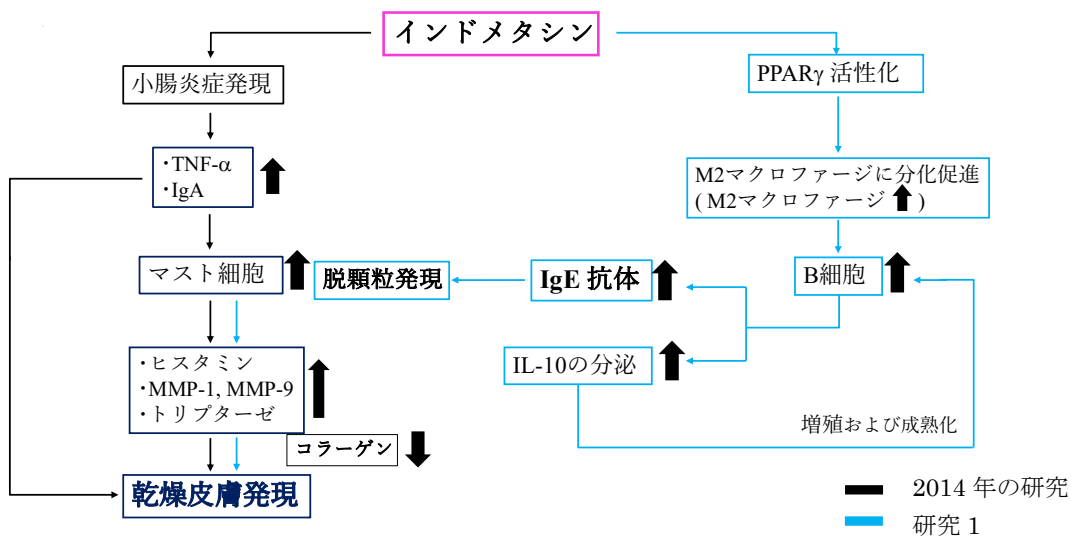


Fig-18 インドメタシンの投与による PPAR γ を介して誘発される乾燥皮膚発現メカニズム
 今回の研究の結果は、青矢印で示した。インドメタシンが PPAR γ のリガンドとなり、M2 マクロファージの増加および B 細胞の増加により、IgE 抗体が増加したことで、マスト細胞の脱顆粒が促された。マスト細胞の脱顆粒により、放出されたケミカルメディエーターは、循環血流に乗り、全身を巡り、皮膚ではコラーゲンが減少し、乾燥皮膚発現に至ったものと考えられる。

第2章

加齢マウスにおけるインドメタシン投与によるジアミンオキシダーゼ (DAO) と皮膚生理機能低下の発現メカニズムの解明

第1節 緒言

インドメタシン投与により、胃・十二指腸潰瘍のリスクがあることは周知されている。また、当該研究室の研究においてインドメタシン投与により小腸に薬剤性急性炎症を惹起させ、その結果、乾燥皮膚発現に至ることも報告された。急性小腸炎症により発現した炎症性サイトカインやヒスタミンが循環血流に乗り全身に影響を及ぼす可能性がある。しかし、生体にはホメオスタシスがあり、炎症があればそれに対抗するシステムが存在する。

その1つがDAOである³⁶⁾。DAOは、1930年BestとMcHenryらにより初めて報告され、アルギニン、プロリン、ヒスチジン、トリプトファンの代謝酵素に属し、ヒスタミンの分解に関与する酵素である。DAOの低下は、腸管の機能障害やアレルギー性疾患の誘発の報告があり³⁷⁾、これらの疾患がDAO投与によって改善するなどケミカルメディエーターとしてヒスタミンが関与する疾患において治療薬として考えられた。DAOは、小腸絨毛細胞で生成され、全身に存在するが、一番活性の高い組織が小腸であり、小腸機能のマーカーとして使用される³⁸⁾。

インドメタシンの投与による小腸炎症および乾燥皮膚発現と加齢による影響やDAOの変化を確認した研究は少ない。そこで、今回の研究ではインドメタシン投与時の加齢による身体生理機能の変化とヒスタミン分解酵素の1つであるDAOの変化に着目した。

今回は加齢マウスを使用するため、インドメタシン投与量をあらかじめ予備実験において確認し、第1章よりも低用量³⁹⁾で実験を行うこととした。

第 2 節 実験方法

1. 実験動物

ヘアレスマウス (HOS:HR-1 SLC: Hamamatsu, Shizuoka, Japan)

9 週齢、40 週齢 雄性 各群 4 匹を第 1 章に準じて 1 週間馴化飼育した。

体重や健康状態を確認しインドメタシン群およびコントロール群に各群 4 匹ランダムに分配した。

1. インドメタシン群

2. コントロール群

2. 使用薬剤

1. インドメタシン (Sigma-Aldrich : St. Louis, MO, U.S.A.)

2. 生理食塩水：コントロール群

3. 各薬剤投与量および溶媒

1. インドメタシン: 20 mg / kg 生理食塩水

2. 生理食塩水 (コントロール群)

第 1 章の用量で体調不良を生じたため、予備試験を行い、上記の投与量を選択した

4. 背部皮膚、小腸および血液サンプルの採取方法および保存方法

サンプル採取方法は第 1 章のサンプル採取方法に準ずる

背部皮膚の TEWL、角層水分量測定後に、採取した背部、小腸組織、血液サンプルについては、第 1 章に準じて保存した

飼育環境、薬剤投与方法、実験方法、サンプル採取方法、染色方法については、第 1 章の実験方法に準じる。今回パラフィン包埋から、厚さ 6 μm の切片を作成した。

5. 免疫組織化学染色と評価方法

免疫組織化学染色方法

DAO, MUC2, ZO-1 の検体を、脱パラフィンし、下記の一次抗体とインキュベートした。次に、二次抗体とインキュベートした。

一次抗体

DAO; rabbit polyclonal anti-DAO (1 :100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA U.S.A.)

MUC2; rabbit polyclonal anti-mucin-2 (MUC2)(1 : 100; Bioss, Woburn, MA, U.S.A.)

ZO-1; rabbit polyclonal anti-zonula occludens-1 (ZO-1) (1 : 100; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, U.S.A.)

二次抗体

Alexa Fluor™ goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.)

評価方法

DAO 活性は共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) を使用して評価した。

DAO 活性は、image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) を使用し、ランダムに DAO 活性発現箇所を 5 点選択し、測定した。

MUC2, ZO-1 は、蛍光顕微鏡 (BZ-X800, Keyence, Tokyo, Japan) を使用して評価した。

6. 統計分析

すべてのデータは平均値 \pm SD 値で示した。結果は、Microsoft Excel 365 (Microsoft Corp.) を使用し分析した。各群間の統計的有意性は、一元配置分散分析を使用し、3 つ以上のグループを Tukey's post-hoc test により評価した。危険率が、5% 未満を統計学的に

有意として判断した。

第3節 結果

解剖時のマウスの小腸の状態は、40週齢インドメタシン群のみ肉眼で確認できるほど水を纏い全体的に浮腫があるように見え、他のマウス群と大きく異なっていた。(Fig-19)。さらに、HE染色した小腸組織を比較すると、40週齢インドメタシン群において小腸絨毛組織が破綻しており、小腸機能の低下が示唆された。

また、DAO活性は、加齢により低下し、インドメタシン投与の影響を受けて、さらに低下することが明らかになった (Fig-20,21)。

小腸および皮膚のマスト細胞は、加齢およびインドメタシン投与の両方の影響を受けて、増加していた (Fig-22,23)。

小腸において、小腸バリアを担う、TJの構成タンパクであるタイトジャンクションタンパク質 (zonula occludens: ZO)-1 と上皮細胞の保護を担うムチン (mucin: MUC) 2 が、40週齢インドメタシン群において減少していることが明らかになった (Fig-24)。

第4節 考察

DAO は、ヒスタミン分解に関わる酵素であり、ヒスタミンのコントローラーとしての役割を担っており、小腸絨毛細胞で生産され、その活性は、全身に及ぶが、一番高いのは小腸である。そのため、小腸機能のマーカーとして使用され、ヒスタミンが起因する疾患の治療などに検討されている。

1980年代、ヒスタミン関連疾患である、アトピー性皮膚炎や過敏性腸症候群に対して DAO の投与が、どれだけの効果をもたらすかという研究が盛んに行われ、臨床現場では治療に際し、DAO の測定を行い、評価し、治療効果向上につなげた経緯がある⁴⁰⁾。

今回の実験において、40週齢インドメタシン群の小腸は、9週齢インドメタシン群と比較して、肉眼でも確認できるほど大きな変化が認められた。この違いは、加齢による身体生理機能の低下が関与していることが、うかがわれた。また、小腸組織をHE染色、TB染色、そのほか免疫組織化学染色で確認したところ、加齢、インドメタシン投与の有無により、差が生じていたため、小腸の状態がDAO活性に大きく影響することが示唆された。

小腸において、小腸絨毛細胞の破綻だけでなく、40週齢インドメタシン群で、ZO-1およびMUC2が低下していることが明らかになった。ZO-1は、小腸TJの構成要素であるクローディン(Claudin: CLDN)-4を構成しており⁴¹⁾、CLDN-4は分子量23kDaの膜4回貫通タンパク質である。腸管においてCLDN-4は小腸バリア強化作用があるが、TNF- α で減少する。また、TNF- α が、CLDN-2の発現を誘導することでバリアを減弱化することがわかっている⁴²⁾。ZO-1の減少により、CLDN-4が減少することにより、腸管のバリア機能の減弱が生じたと考えられるMUC2は胚細胞から産生される小腸ゲル層の主要成分であり、消化管内の微生物や宿主自身の分解酵素から上皮細胞を保護している。ZO-1およびMUC2の発現の低下は、共に腸管バリア機能の低下を誘引する可能性を示唆する。

以上の結果から、小腸において、炎症性サイトカインの分泌、マスト細胞の増加が生じ、

小腸バリア機能が低下していることが考えられる。また、DAOの減少からヒスタミンの発現は、増加傾向であると考えられる。ヒスタミンは循環血流にのり全身をめぐり、マスト細胞の脱顆粒により MMPs の分泌を促し、コラーゲン減少により皮膚バリア機能に影響を及ぼしていると考えられ、特に 40 週齢マウスにおいて顕著であることが明らかになった。インドメタシンの投与は、小腸バリア機能および皮膚バリア機能に影響を及ぼし、ともにその機能を低下させていると考えられる。さらに、加齢という要素が加わることで、バリア機能の低下は加速すると考えられる。

第 2 章の結果は Fig-25 にまとめた。

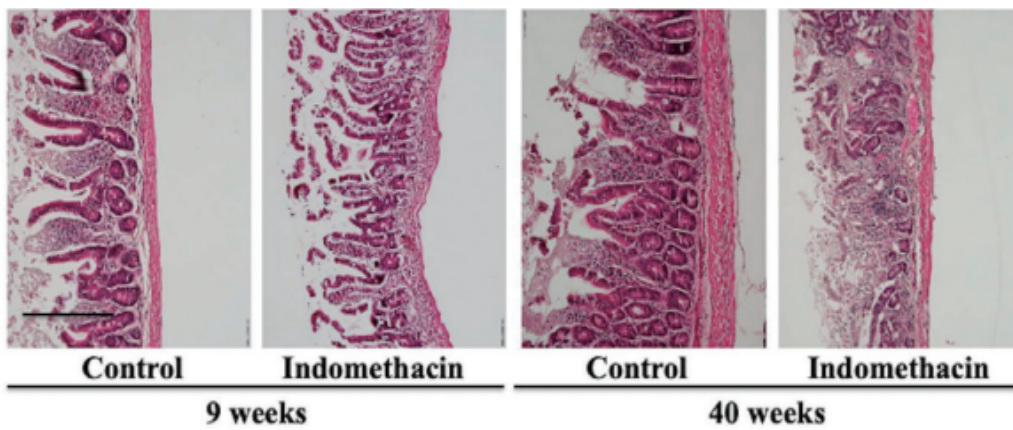
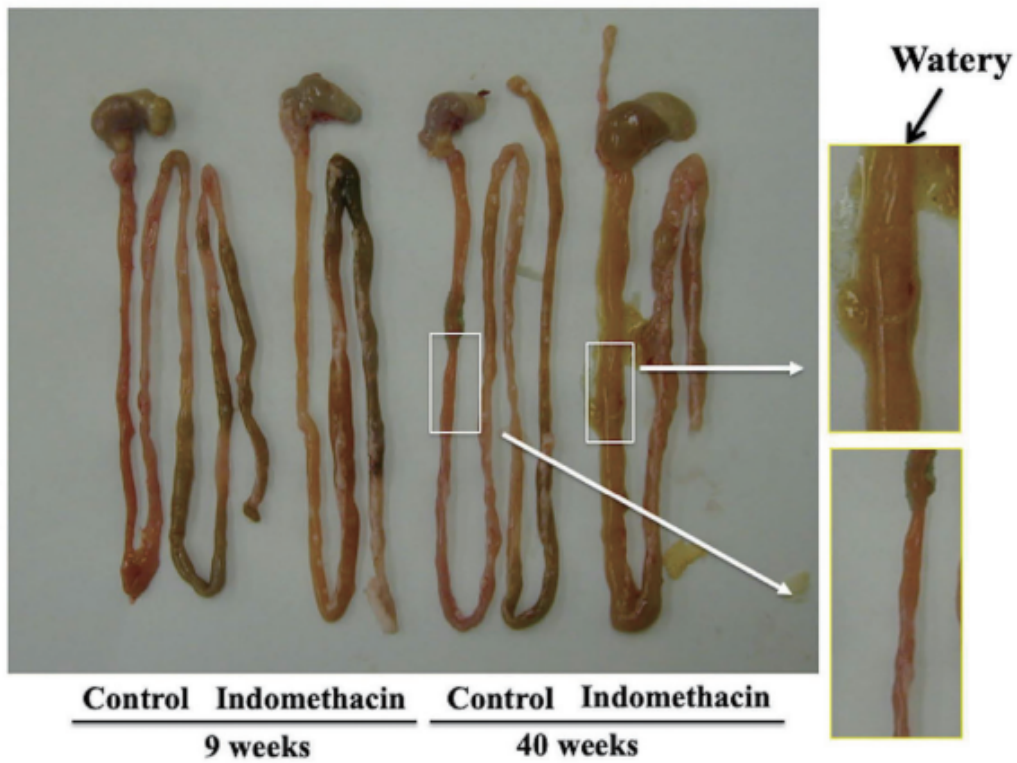
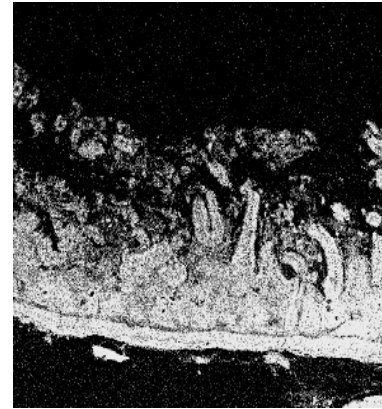
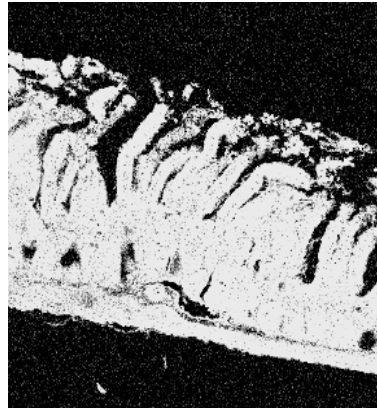


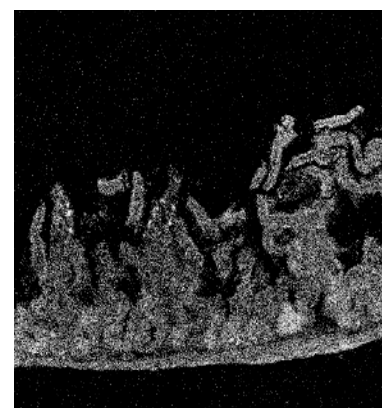
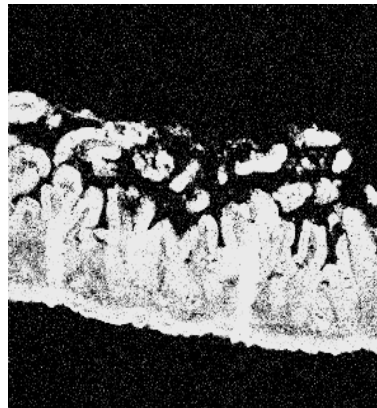
Fig-19 解剖時の小腸の状態と HE 染色した小腸組織

スケールバーは 100 μ m を示す。

Control



Indomethacin



9 weeks

40 weeks

Fig-20 9週齢および40週齢マウスにインドメタシン投与によるDAO活性の変化
(免疫組織化学染色)

インドメタシン投与によりDAOの変化を週齢で比較した。

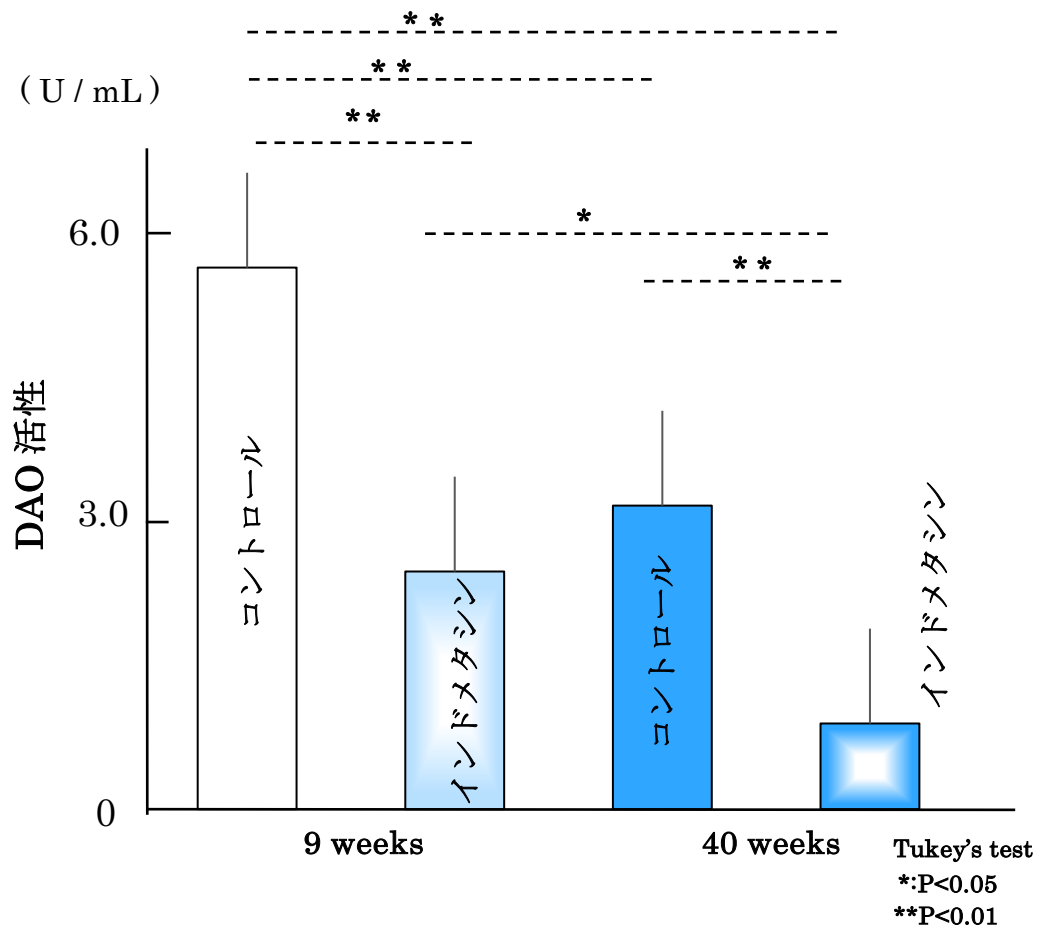


Fig-21 インドメタシン投与時の DAO 活性の比較

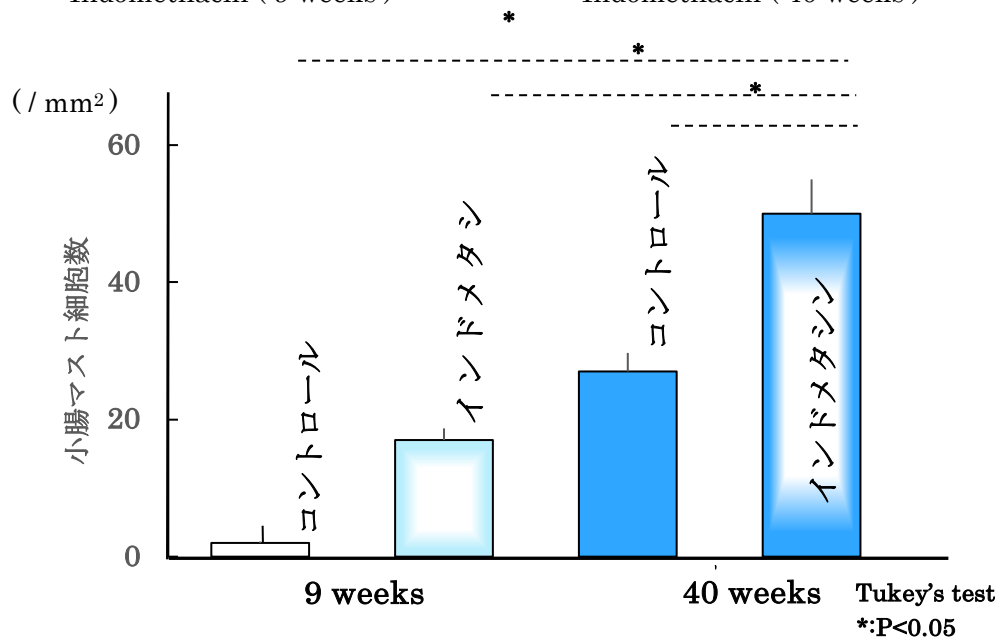
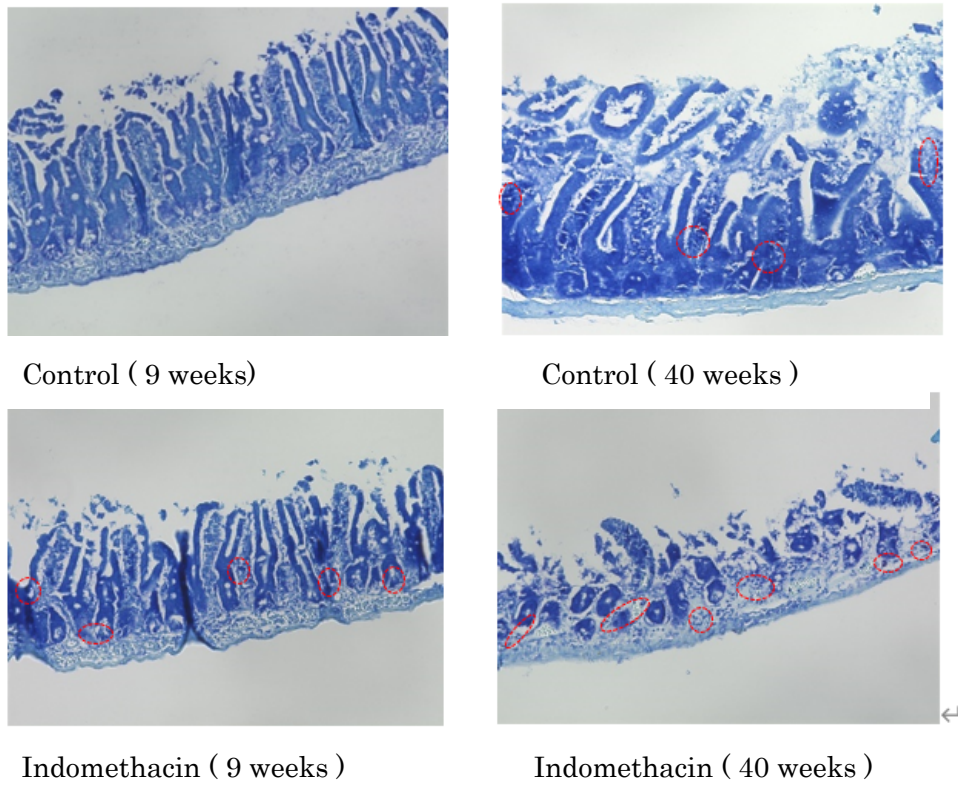
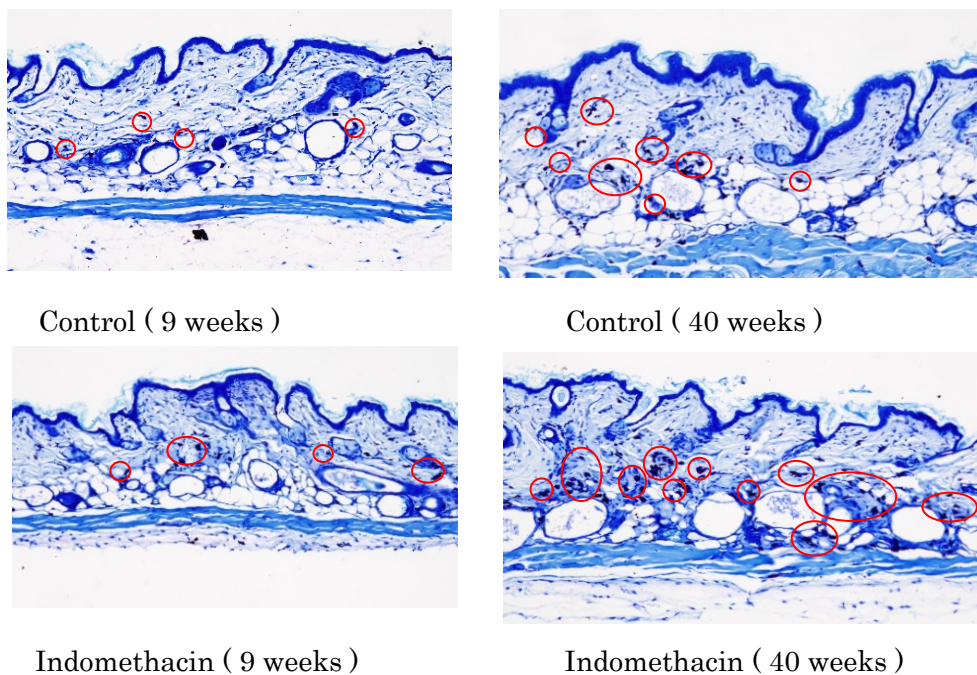


Fig-22 小腸マスト細胞数の比較 (TB 染色)

小腸組織図において、赤丸はマスト細胞を示す。



Control (9 weeks)

Control (40 weeks)

Indomethacin (9 weeks)

Indomethacin (40 weeks)

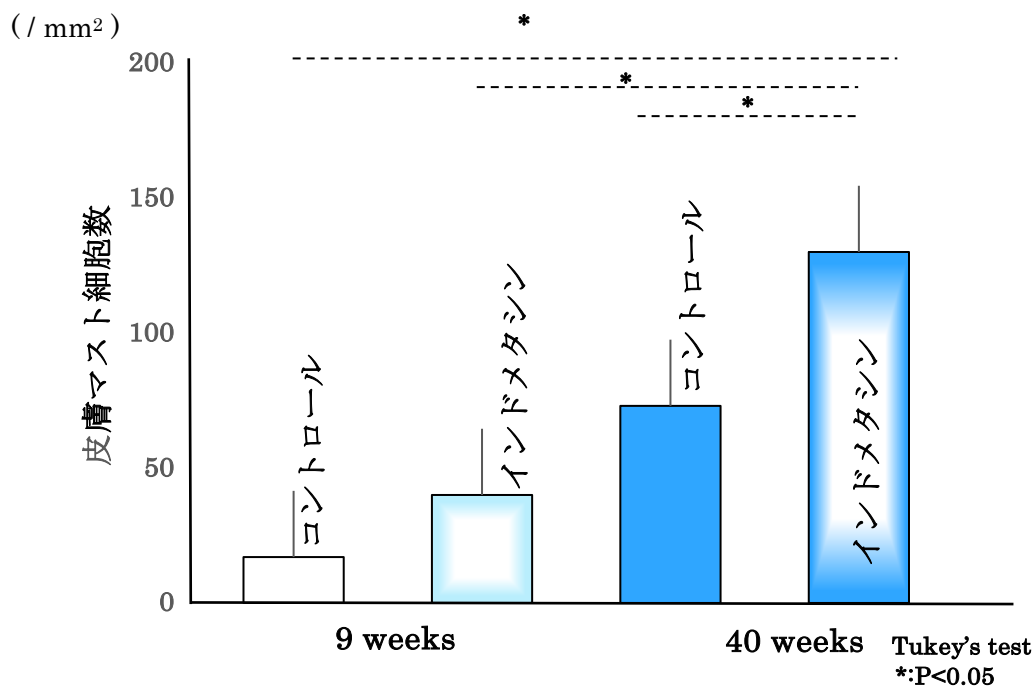


Fig-23 皮膚マスト細胞数の比較 (TB 染色)

皮膚組織図において、赤丸はマスト細胞を示す。

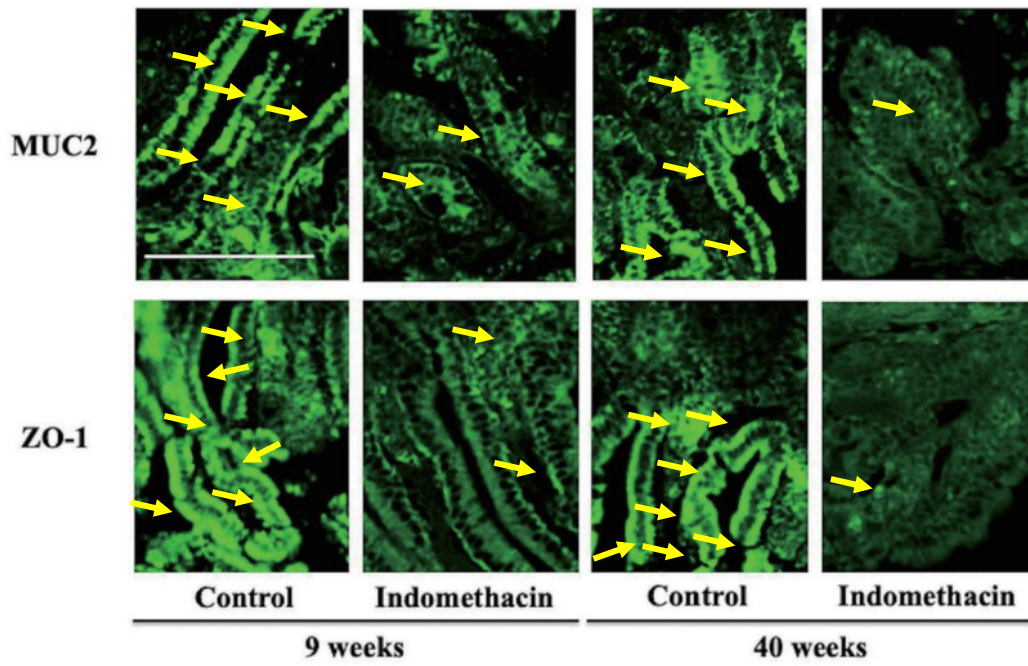


Fig-24 インドメタシン投与時の MUC2、ZO-1 の発現の比較（免疫組織化学染色）

黄色の矢印は MUC2、ZO-1 を示す。

スケールバーは 100 μ m を示す。

第5節 小括-2

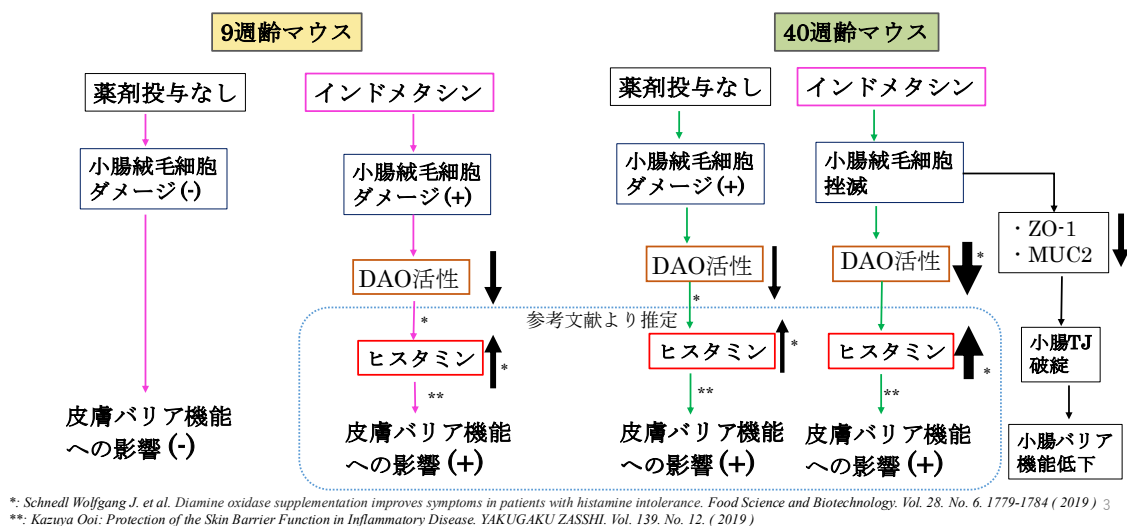


Fig-25 インドメタシンの投与による DAO 活性低下および皮膚バリア機能への影響を発現するメカニズム

9 週齢と 40 週齢のマウスにインドメタシンを投与すると、小腸絨毛細胞がダメージを受け、DAO 活性は減少する。特に、40 週齢では小腸絨毛細胞が控減していることにより、DAO 活性は、有意に減少し、ヒスタミンコントロールは不良となる。その結果、ヒスタミンは、40 週齢インドメタシン群において著しく増加し、皮膚バリア機能への影響も大きいと推定できる。また、小腸バリアを担う小腸 TJ の構成タンパク質である ZO-1 も、腸管の粘液バリアの構成タンパク質である MUC2 もら、40 週齢インドメタシン群において減少しているため、小腸バリア機能が低下していると考えられる。

第3章

加齢マウスにおけるセレコキシブ投与による乾燥皮膚発現

メカニズムの解明

第1節 緒言

セレコキシブは、2007年に日本で最初に承認された COX-2 選択的 NSAIDs であり、胃・十二指腸潰瘍の発現リスクが低く、日本では、高齢者に使用されるケースが多い。

また、心血管系への影響が、報告されている COX-2 選択性 NSAIDs も海外では存在するが、メタ解析において、セレコキシブは1日 400mg か、もしくはそれ以上の投与に限り報告があり⁴³⁾、腎機能への影響も、添付文書に記載されている量の2倍以上服用しても問題なかったという報告から⁴⁴⁾、安全性が高いと評価されている。

高齢者は、一般的に身体生理機能が低下しており、さらに、原疾患の有無など個人差も大きいいため、NSAIDs の選択も COX-2 選択性 NSAIDs が主になっていると考えられる。胃・十二指腸潰瘍の発現リスクが少ないセレコキシブは、COX-1 選択性 NSAIDs よりも安全性が高い薬剤であると認識されているが、セレコキシブ、加齢、皮膚生理機能の変化、という点に着目し、検討した論文は少ない。

今回、我々は10週齢および40週齢マウスを用いて、セレコキシブ投与による乾燥皮膚発現のメカニズムについて検討した。

第2節 実験方法

1. 実験動物

10 週齢および 40 週齢雄性ヘアレスマウス (HOS:HR-1, from SLC; Hamamatsu, Shizuoka, Japan) を 1 週間馴化飼育し、40 週齢マウス、10 週齢マウスをセレコキシブ群、コントロール群に振り分けた。1 群 4 匹 (n=4) とした。

飼育方法については第 1 章に準ずる

2. 使用薬、薬剤投与量および溶媒

セレコキシブ (10mg /kg) を 0.25% DMSO (TOCRIS Bioscience, Avonmouth, Bristol, U.K.) に溶解し、セレコキシブ群に投与し、コントロール群には 0.25% DMSO を投与した。実験方法、飼育環境については第 1 章に準ずる

3. 実験手順、背部皮膚の TEWL および角層水分量の測定方法

手順、使用機器については第 1 章に準ずる。

4. 背部皮膚、小腸および血液サンプルの採取方法および保存方法

サンプル採取方法については第 1 章に準ずる。

背部皮膚の TEWL、角層水分量測定後に、採取した背部、小腸組織、血液サンプルは、第 1 章に準じて保存した。

5. 血漿ヒアルロン酸、TNF- α 、クレアチニンの測定

血漿ヒアルロン酸および TNF- α は下記の ELISA キットを使用し、下記の通り測定した。

ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.)、光学密度測定機器：マイク

ロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) を使用し、その濃度を評価した。

血漿クレアチニン濃度

クレアチニン測定キット (Cayman, Ann Arbor, MI, U.S.A.) を使用して測定した。

6. 統計分析

すべてのデータは平均値 \pm SD 値で示した。結果は、Tukey's post-hoc test により評価した。危険率が、5% 未満および 1% 未満の場合を統計学的に有意として判断した。

第3節 結果

10 週齢と 40 週齢マウスの体重は、週数による増加はあるが、薬剤投与による大きな変化は認められなかった (Fig-26)。

背部皮膚の TEWL に有意差は認められなかったが、角層水分量が 40 週齢インドメタシン投与群で有意に減少していることから、乾燥皮膚の発現が確認できた (Fig-27,28)。

HE 染色した小腸組織は、大きな差は認められなかった (Fig-29)。しかし、HE 染色した皮膚組織では、40 週齢セレコキシブ群は、40 週齢コントロール群と比較して、浮腫を含み肥厚していることが確認できた (Fig-30)。皮膚の厚さを確認したところ、40 週齢セレコキシブ群では、10 週齢マウス群、40 週齢コントロールマウス群と比較して有意に肥厚した。10 週齢マウス群は、セレコキシブの投与に関係なく、有意差は認められなかった (Fig-31)。インドメタシン投与時にみられたような、小腸組織に変化はなく薬剤性急性小腸炎症は確認できなかった。血液サンプルを用いて、ヒアルロン酸量、TNF- α 、クレアチニンを調べた結果、40 週齢セレコキシブ群において、増加していることが確認された (Fig-32-34)。

第4節 考察

セレコキシブは、その構造に COX-1 と異なりカルボキシル基は無く、スルホンアミド基が、COX-2 の内部と結合することにより、薬効を発現する (Fig-35)。COX-2 は、COX-1 と違い炎症部位に発現することが一般的ではあるが、腎臓と脳では COX-1 同様常時存在することが報告されている⁴⁵⁾。腎臓には、COX-1、COX-2 が常時存在することから、COX 選択性に関係なく NSAIDs 投与により腎臓の COX が阻害され、PG 合成も阻害されたと考えられる。これにより、PGI₂ などによる腎臓の輸入細動脈血管拡張作用が低下し、糸球体での濾過量が低下すると考えられる。また、レニン-アンジオテンシン系の活性が低下することにより、高 K 血症や浮腫が生じたことで、急性薬剤性腎障害が発現したものと考えられる⁴⁶⁾。一般的に NSAIDs 投与による急性腎不全は、腎前性急性腎不全である⁴⁷⁾。

炎症により誘発される COX-2 を、セレコキシブは選択的に阻害するが、腎臓には常時存在するため、腎臓への影響は COX-1 選択的 NSAIDs と変わらないと考えられる。しかし、セレコックス® のインタビューフォームでは、少ないといわれる胃・十二指腸潰瘍の発現率よりも、腎障害発現率は低いため、腎臓への影響が大きいとは感じられない (Fig-36)。また、セレコキシブに関しては、同じ COX-2 選択的阻害薬である rofecoxib と比較して腎機能悪化リスク、腎不全移行リスクは有意に低いという報告⁴⁸⁾ やセレコキシブを 1 日 800mg 投与しても、eGFR に変化がなかったという報告⁴⁹⁾ もある。それらにより、非選択的 NSAIDs と比較して腎障害が少なく、高齢者への投与に関して安全性が高いと判断し、幅広く使用されていると考えられる。

今回の研究結果において、薬剤投与の影響受けることなく、マウスは成長し、健康状態に問題はないようにみられたが、セレコキシブ群 40 週齢マウスでは乾燥皮膚が発現し、血漿中のヒアルロン酸量の増加もみられた。小腸の急性炎症も慢性肝疾患も確認できなかったが (data not shown)、クレアチニンの上昇から、薬剤性急性腎障害の発現により、炎

症性サイトカインの分泌過剰により皮膚バリア機能への影響が見られ、乾燥皮膚発現に至ったと考えられた。

加齢マウスにセレコキシブを投与することで、腎臓への影響が認められたことから、セレコキシブの投与は、COX-1 選択性 NSAIDs 同様、腎機能に影響を及ぼしている可能性があり、加齢というファクターが加わると、影響は増大すると考えられる。

皮膚において、ヒアルロン酸は保湿を担う重要な成分であるが、炎症などで皮膚から流出する。セレコキシブ投与 40 週齢マウスで、血漿ヒアルロン酸量が増加した原因として 2 つ考えられる。一方は、皮膚から、もう一方は、腎臓からである。

ヒアルロン酸は、皮膚真皮を構成する要素であり、ムコ多糖の一種であり、線維芽細胞で合成され、肝臓で分解される物質である。皮膚だけでなく、生体の細胞間の潤滑油的な働きがあり、関節液や眼球硝子体に多く含まれている物質である。また、腎髄質間質中のヒアルロン酸は大きなドメインを形成し、ドメイン内に大量の水を保持できることから、腎臓の水処理能力においてヒアルロン酸は重要な役割を果たしていると言われている。腎髄質間質のヒアルロン酸濃度は水利尿で高く抗利尿では低い。この事実はヒアルロン酸濃度が高いことにより腎臓での水の再吸収がさまたげられることを示している。水の再吸収に伴い間質のヒアルロニダーゼ活性が上昇し、ヒアルロン酸の低分子化が起きる。腎臓でも代謝されるため、腎不全でもヒアルロン酸量が増加することが知られている⁵⁰⁾。

第 3 章の結果は Fig-37 にまとめた。

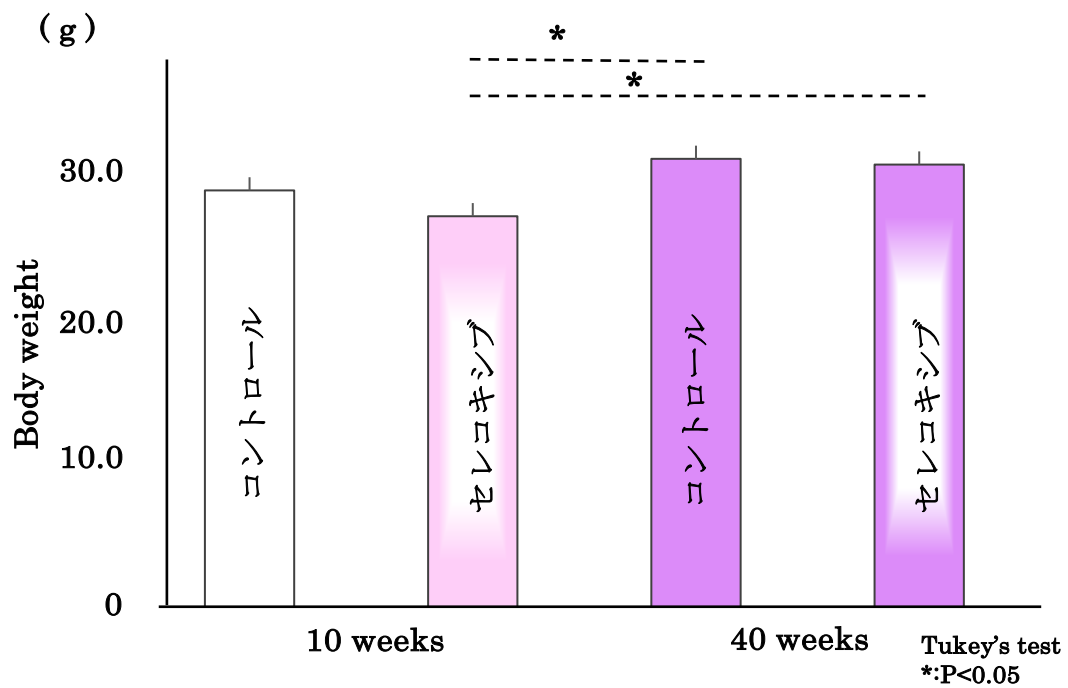


Fig-26 10週齢および40週齢マウスの薬剤投与による体重変化の確認

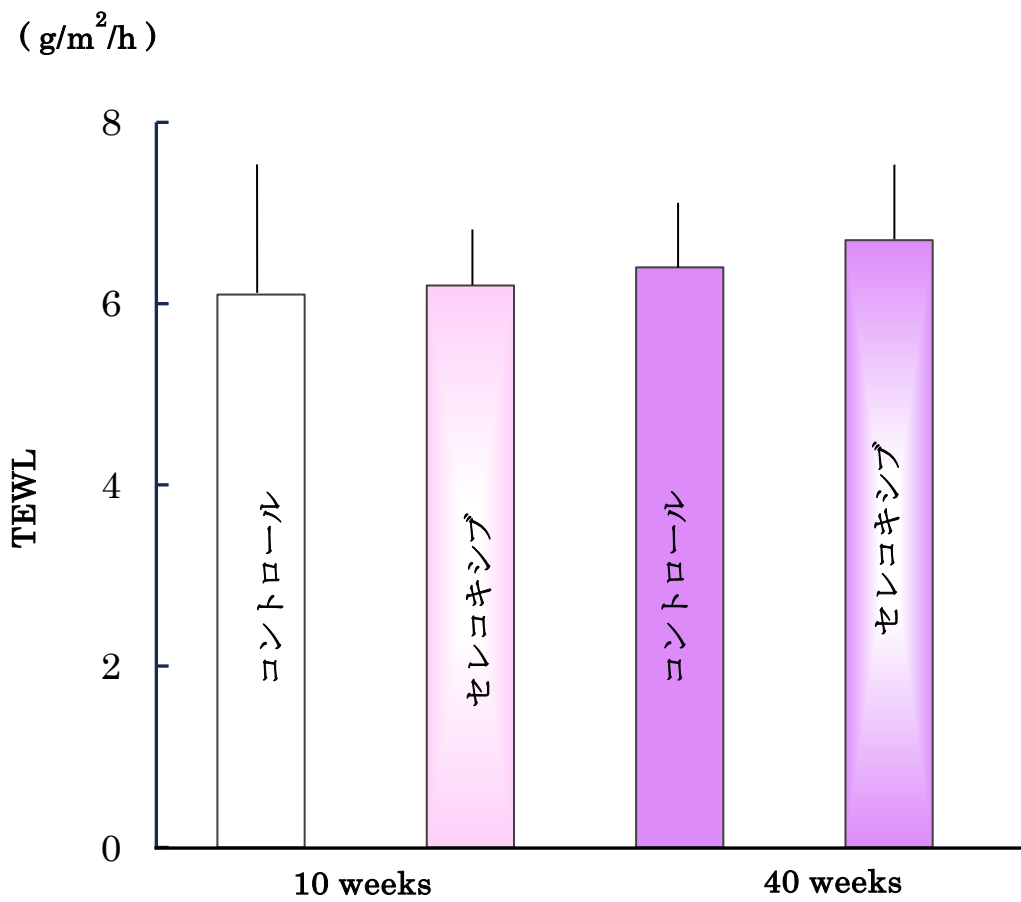


Fig-27 10週齢および40週齢マウスにセレコキシブ投与時のTEWLの比較

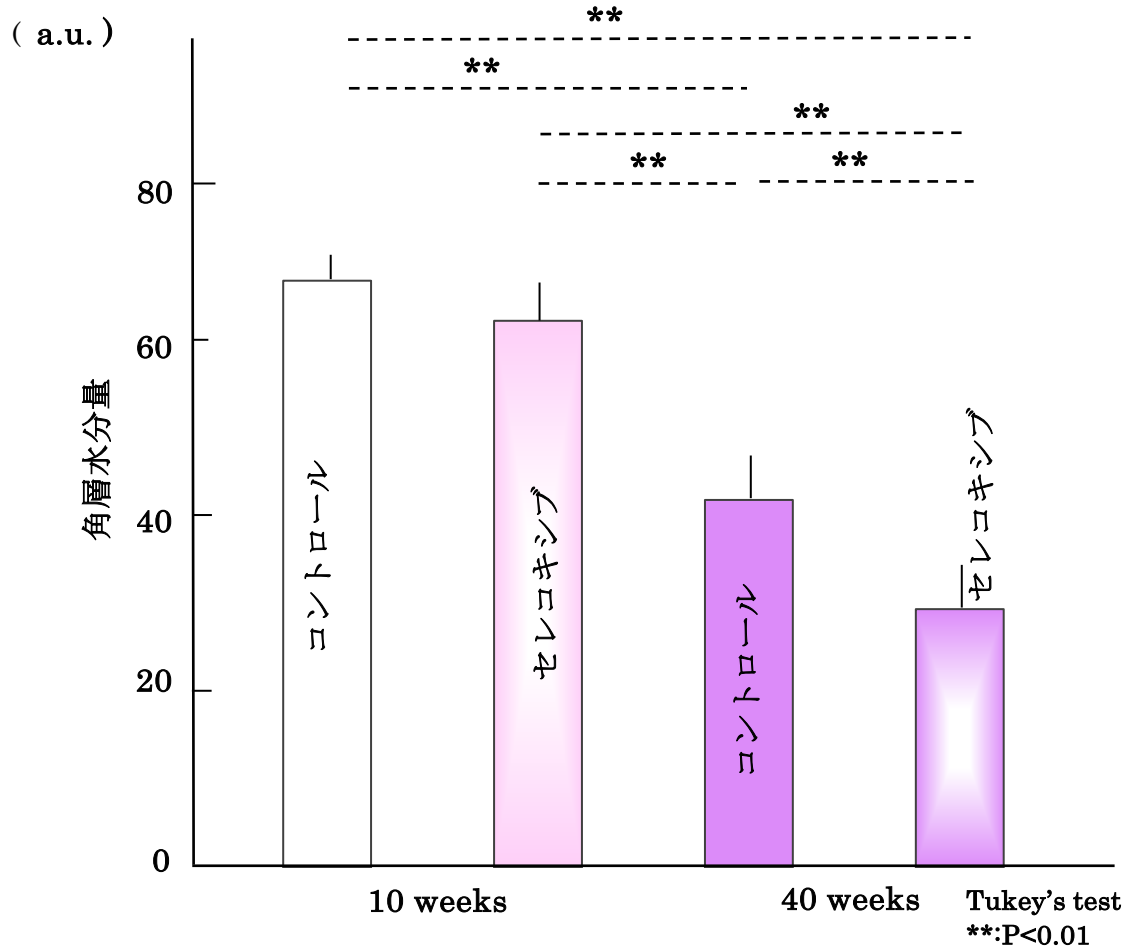
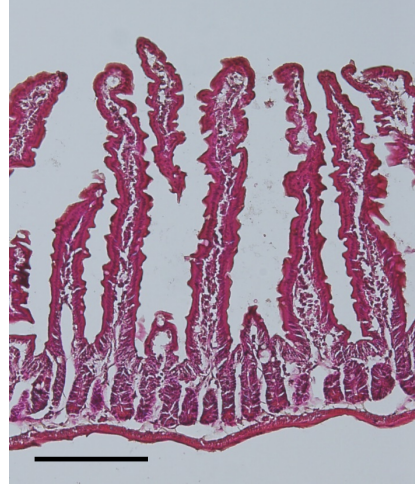
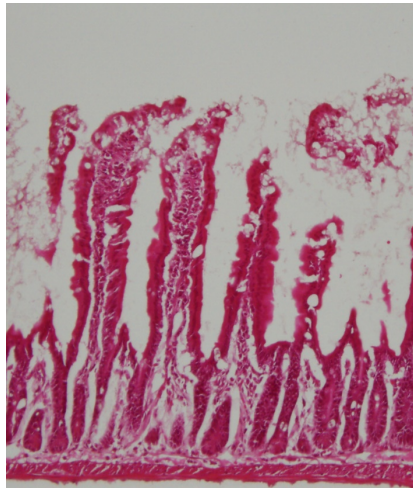
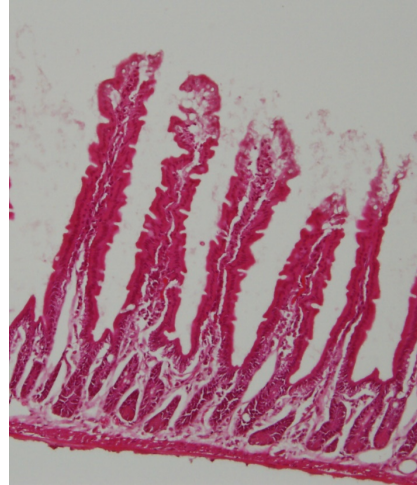
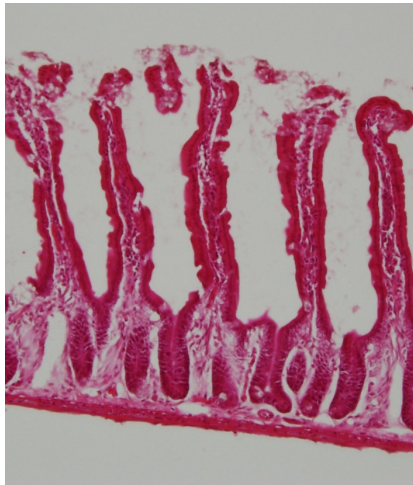


Fig-28 10 週齢および 40 週齢マウスにセレコキシブ投与時の角層水分量の比較

Control



Celecoxib



10 weeks

40 weeks

Fig-29 10 週齢および 40 週齢マウスにセレコキシブ投与時の小腸組織の比較
スケールバーは 100 μ m を示す。

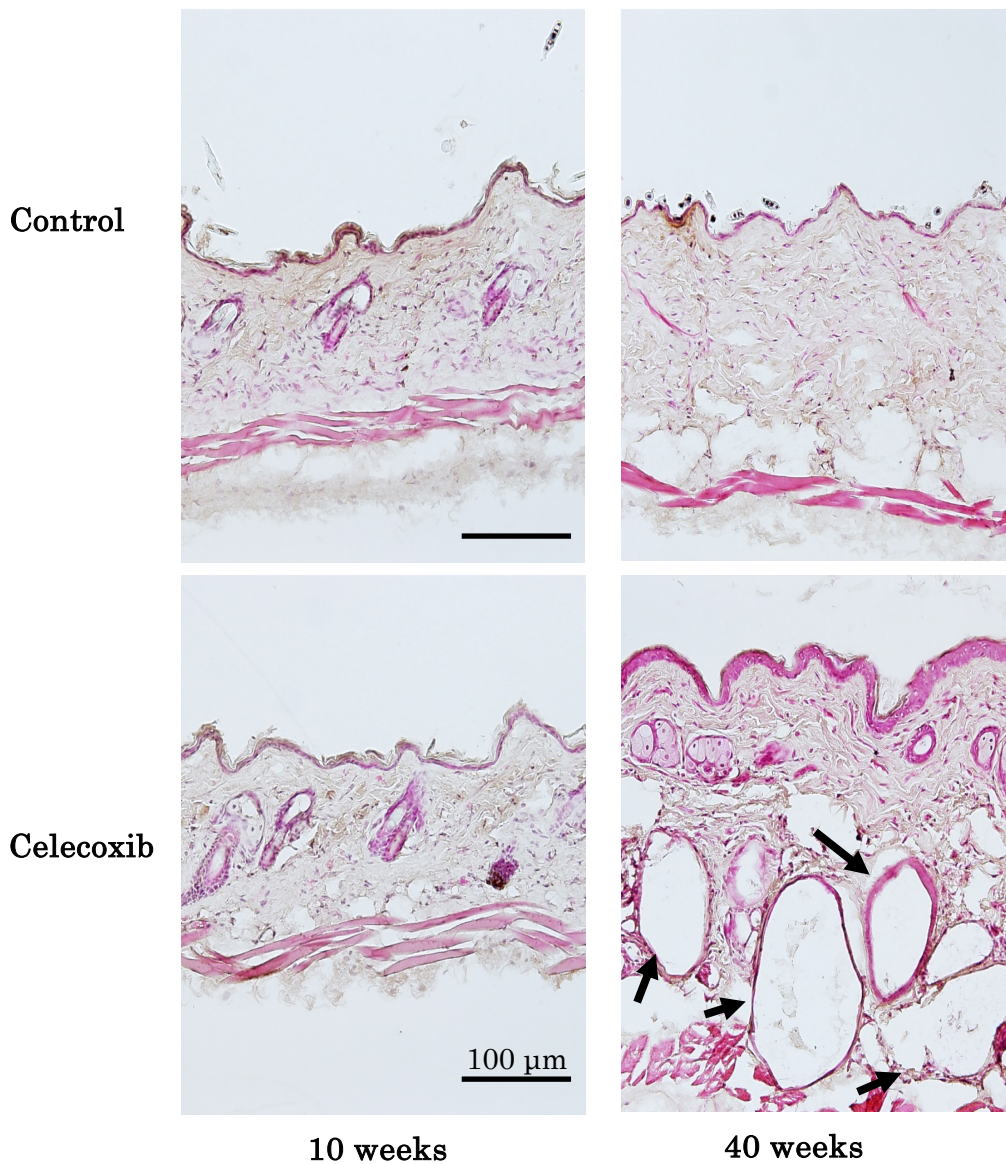


Fig-30 10 週齢および 40 週齢マウスにセレコキシブ投与時の皮膚組織の比較 (HE 染色)

セレコキシブ投与 40 週齢マウスにおいて黒矢印は浮腫のようなものを示す。

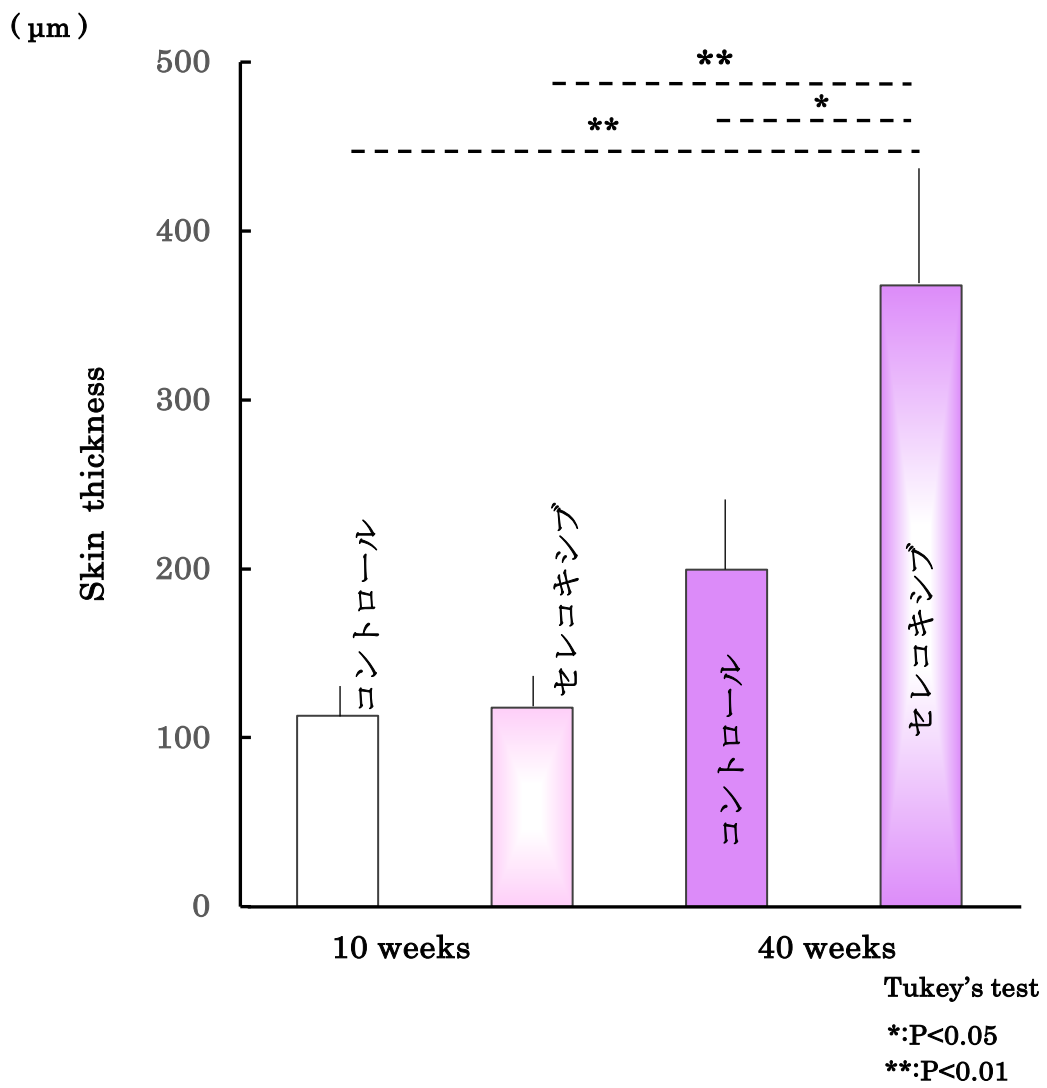
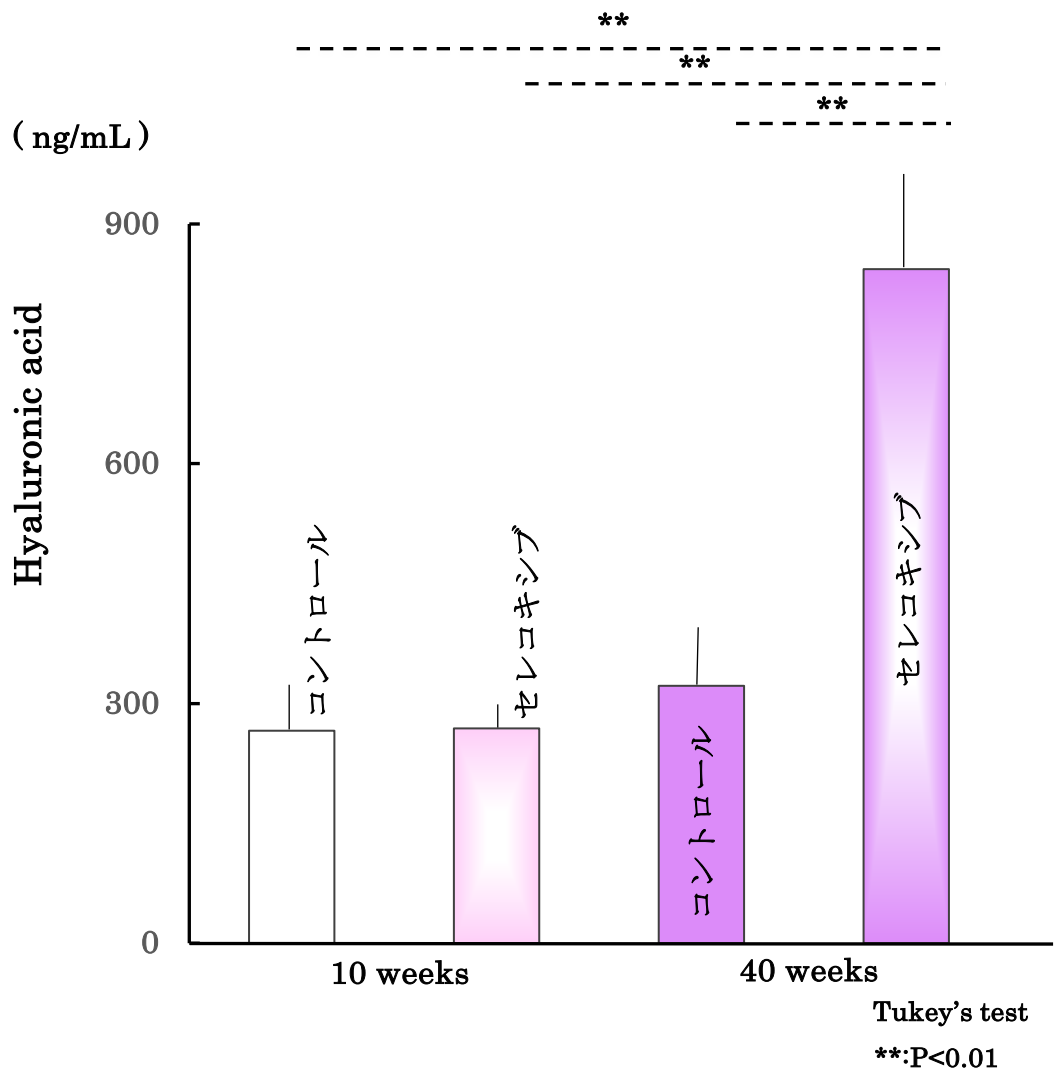


Fig-31 10 週齢および 40 週齢にセレコキシブ投与時の皮膚組織の厚さ



ラテックス凝集免疫比濁法による比較

Fig-32 10週齢および40週齢マウスにセレコキシブ投与時のヒアルロン酸発現量の比較

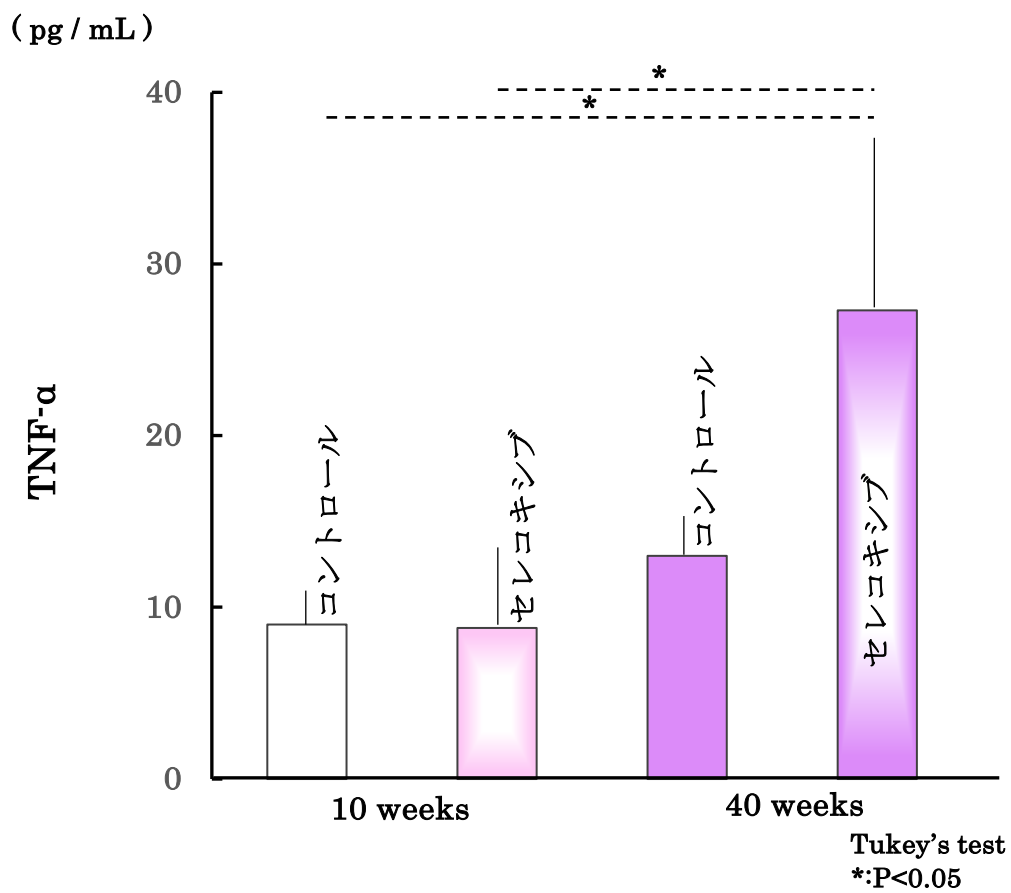


Fig-33 10 週齢および 40 週齢マウスにセレコキシブ投与による TNF- α 発現量の比較

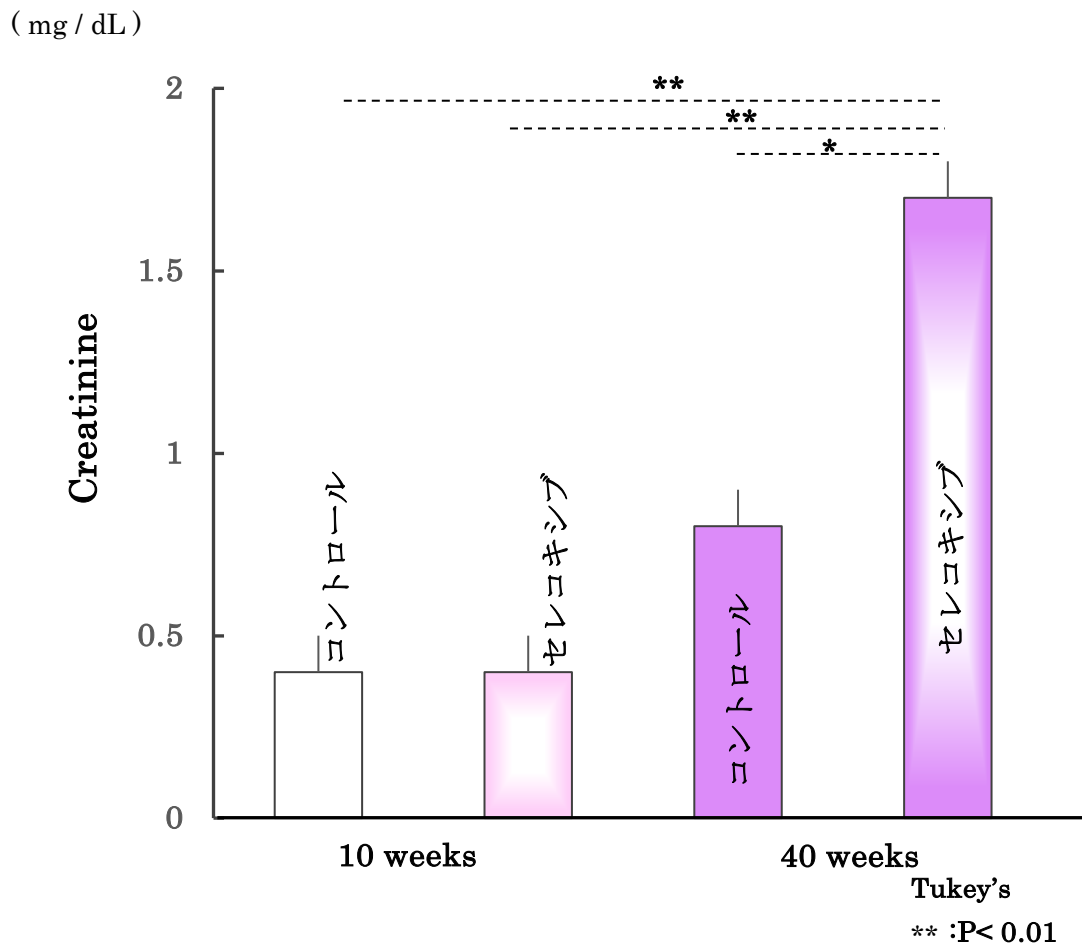


Fig-34 10 週齢および 40 週齢セレコキシブ投与時のクレアチニン発現量の比較

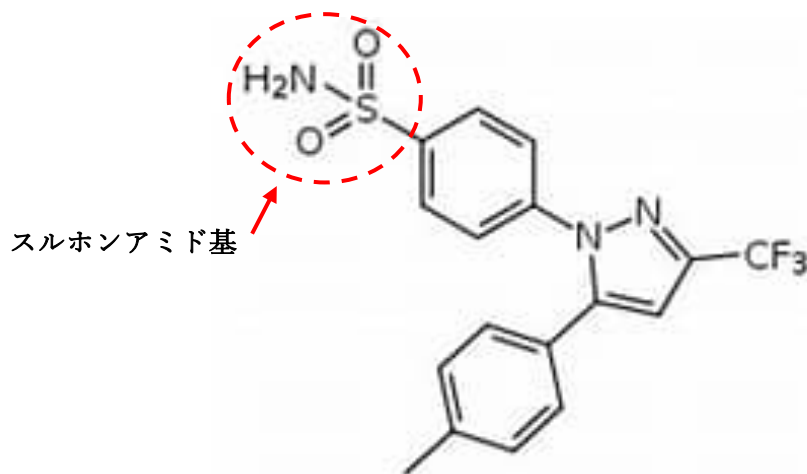


Fig-35 セレコキシブ構造式

セレコキシブのスルホンアミド基で COX-2 と結合し、薬効を発現する。

セレコックス® インタビューフォームに記載された腎障害の発現リスク

(8) 高齢者

9.8 高齢者

患者の状態を観察しながら、慎重に投与すること。一般に生理機能が低下している。

(解説)

一般に高齢者では肝機能、腎機能等の生理機能が低下していることから設定した。

副作用等の種類 ^{a)}	副作用等の種類別発現症例(件数)率(%)			
	承認時までの集計	使用成績調査1	使用成績調査2	特定使用成績調査1(長期使用)
腎および尿路障害	7(0.2)	4(0.1)	1(0.1)	1(0.1)
*尿管結石	-	1(0.0)	-	-
頻尿	2(0.1)	-	-	-
多尿	1(0.0)	-	-	-
胃腸障害	362(9.3)	89(2.7)	7(1.0)	24(1.8)
腹部不快感	82(2.1)	24(0.7)	2(0.3)	2(0.1)
*腹部不快感	-	1(0.0)	-	-

(セレコックス® のインタビューフォームより抜粋)

Fig-36 セレコキシブの腎機能への影響

胃・十二指腸潰瘍の発現リスクが低いセレコキシブであるが、腎障害の発現リスクはさらに低いため、腎機能への影響は少ないと考えられる。

第5節 小括-3

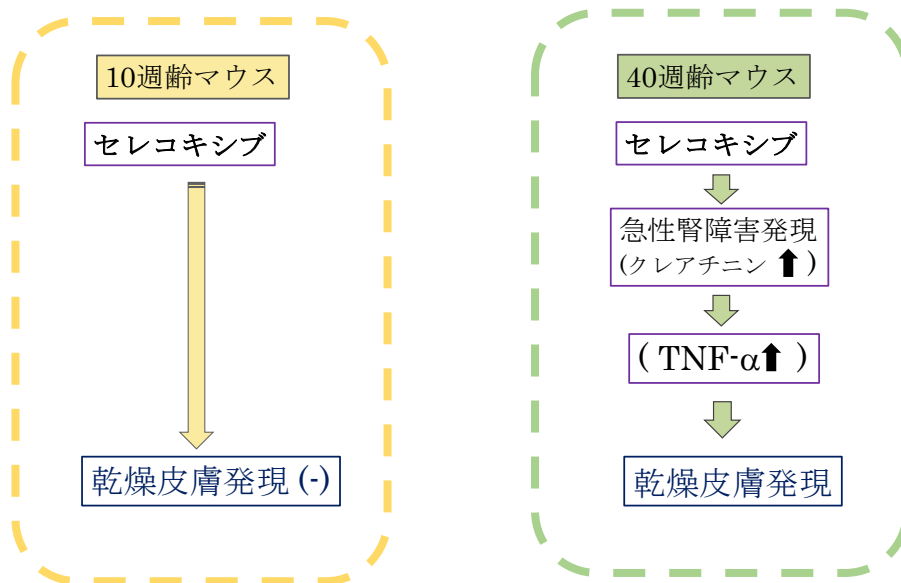


Fig-37 加齢マウスにおけるセレコキシブ投与による乾燥皮膚発現のメカニズム

40 週齢マウスのセレコキシブ投与により、クレアチニン上昇が生じた。このことから、急性腎障害が発現したものと考えられる。炎症性サイトカインの 1 つである TNF- α の分泌が増加し、循環血流に放出された結果、乾燥皮膚発現に繋がったと考えられる。

10 週齢マウスでは、コントロール群と比較して、セレコキシブ投与による有意差は認められなかった。

結論

内閣府より、日本の高齢化率は、2065年まで増加傾向が続くと発表された⁵¹⁾。様々な痛みへの訴えは世代に関係なく増加傾向を示しており（厚生労働省 NDB オープンデータ）、老若男女問わず私たちの生活に NSAIDs は必要不可欠な薬剤として存在している。NSAIDs による急性小腸炎症は、服用後数時間で始まり、急性増悪すると 24 時間後には小腸粘膜の充血や出血につながるという報告がある。

第 1 章では、NSAIDs 投与による小腸炎症および皮膚生理機能への影響に焦点を当てて、乾燥皮膚の発現に関するシグナルやメカニズムの解明を行った。NSAIDs は、PPAR γ のリガンドとなり PPAR γ を活性化させることが知られている。特にインドメタシンでリガンドとしての作用は高く、活性化された PPAR γ は、M2 マクロファージを増加させ、その結果 B 細胞が増加し、IgE 抗体の産生が著しく増加する。マスト細胞は、細胞表面に、IgE 抗体高親和性の Fc ϵ RI 受容体を発現し、IgE 抗体と結合した状態で抗原を待っている。抗原と IgE 抗体が結合すると、マスト細胞は、脱顆粒し、アレルギー反応を生じる。また、脱顆粒は、急激に増加した IgE 抗体自身がトリガーとなることも明らかになっている。今回の研究では、インドメタシン投与により、マスト細胞数の増加を示すメカニズムと、PPAR γ の活性化を介し IgE 抗体の増加のメカニズムの両方のメカニズムにより、マスト細胞の脱顆粒が発現し、ケミカルメディエーターが循環血流に放出されたと考えられる。これらが循環血流に乗って、全身に運ばれ、皮膚の皮下組織から真皮層のコラーゲンが減少し、TEWL の上昇と共に、乾燥皮膚が発現し、皮膚バリア機能の低下が引き起こされるに至ったと考えられる。

第 2 章では、インドメタシンの投与により生じる皮膚の生理機能の変化が加齢と関連しているのかを調べた。一般的に、生体の生理機能は加齢により低下傾向を示すとされている。そのため、インドメタシンの投与により、小腸絨毛細胞の破綻に伴い小腸の表面積が

減少するなどにより相対的に、DAO 活性が減少し、ヒスタミンの増加などが、加齢マウスでは顕著であり、皮膚バリア機能の低下をもたらしていることが明らかとなった。

第 3 章では、高齢者に対して使用頻度が高いセレコキシブ投与による乾燥皮膚発現メカニズムについて調べた。COX-2 選択性 NSAIDs であるセレコキシブは、過剰に服用しても推定糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate: eGFR) に変化をもたらさず、腎機能への影響が少なく、安全性が高いという報告があり、高齢者にも選択しやすい薬剤であるとされている。しかし、炎症時に誘引発現される COX-2 は、腎臓と脳では COX-1 同様常時存在する酵素である。そこで、今回の研究では、セレコキシブによる腎機能障害に着目して、乾燥皮膚発現メカニズムについて解析した。10 週齢 (若齢) と 40 週齢 (加齢) のマウスで比べた結果、セレコキシブ投与した加齢マウスのみ、ヒアルロン酸の増加と炎症性サイトカインの発現およびクレアチニンの上昇が確認され、腎障害により乾燥皮膚が発現することが示唆された。

1985 年、イブプロフェンのスイッチ OTC 化が実施され、現在、ドラッグストアでも購入できる NSAIDs の種類が増え、手軽に入手できるようになった。NSAIDs の使用は、長期投与の処方が多く見られ、また、容易に入手できることから、オーバードーズ⁵³⁾ が社会的にも問題となっている。副作用としてよく知られている胃・十二指腸潰瘍はもちろんのこと、それ以外の副作用にも注意を向ける必要がある。2023 年、ポートランド (アメリカ合衆国、オレゴン州) で開催された第 14 回国際ヒアルロン酸学会 (International Society for Hyaluronan Science: ISHAS 14th international conference) において、花王株式会社が、健康な皮膚の表皮は加齢に伴い薄くなること、表皮のヒアルロン酸量と乾燥皮膚発現との関連について発表した。加齢に伴い表皮が薄くなると、乾燥皮膚発現のリスクが高くなると予想される。NSAIDs だけではなく、炎症を発現する様々な薬剤により、皮膚バリア機能の低下が生じると考えられるため、皮膚の変化は、薬剤を使用する治療において重要な確認項目になると思われる。

第 1 章から第 3 章までの研究成果は Fig-38 にまとめた。

今回の研究から、PPAR γ のリガンドとして働く NSAIDs 以外の薬剤の投与においても、リガンドとなる薬剤、生体内の炎症⁵⁴⁾、加齢という要素により、乾燥皮膚発現のリスクが高まることが示唆される。また、小腸と同様に、皮膚組織においても、TJ が顆粒層の角質層側から第 2 層に存在し、皮膚バリアを強固なものにしている (Fig-17)。皮膚の TJ では、CLDN-1 が主構成要素であることから、今後の研究では、DAO、小腸および腎臓の炎症による皮膚 TJ への影響を明らかにする必要があると考える。

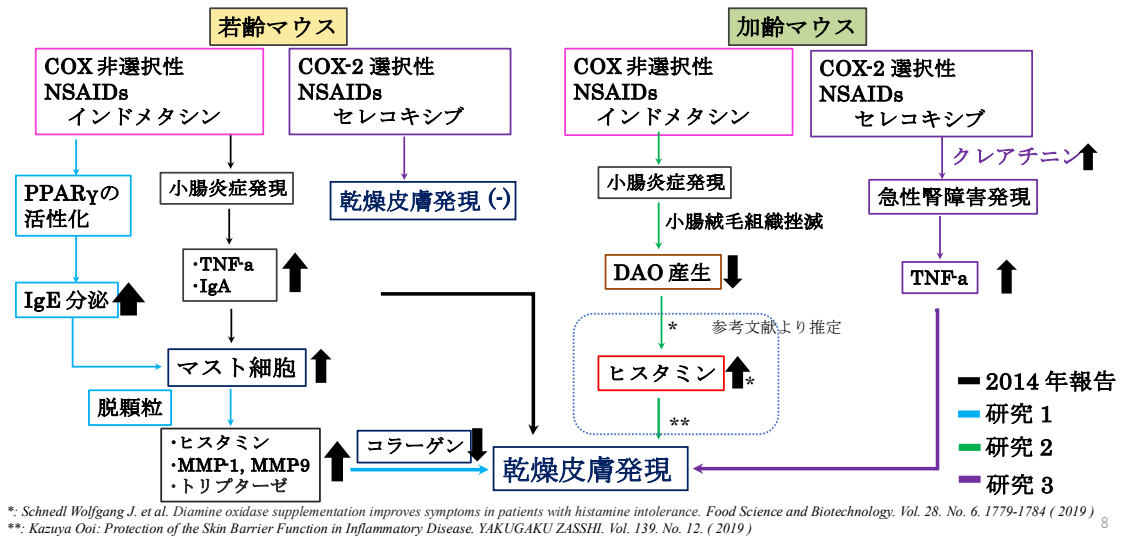


Fig-38 NSAIDs 投与による乾燥皮膚発現のメカニズムと加齢との関係

今回の研究において、インドメタシンの投与により、若齢マウスで乾燥皮膚が発現した。安全性が高いとされるセレコキシブの投与により、若齢マウスではみられなかったが、加齢マウスにおいて乾燥皮膚が発現した。また、その発現メカニズムも明らかになった。加齢は、副作用発現の重要なファクターであると考えられる。

引用文献

- 1) John EM, Kamyar KZ, Stefan DA. COVID-19: a major cause of cachexia and sarcopenia? : *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.*, 2020; 11: 863–865.
- 2) Grand View Research, Research Reports in Pharmacertical Analgesics Market: Glpbal Industry Trends, Share, Size, Glowth, Opportunity, and Forecast 2023-2028.
- 3) Sekiguchi H, Inoue G, Nakazawa T, Imura T, et al., Loxoprofen sodium and celecoxib for postoperative pain in patients after spinal surgery: a randomized comparative study. *J Orthop. Sci.*, 2015; 20: 617-623.
- 4) Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998; 38: 97-120.
- 5) Vane J. Towards a better aspirin. *Nature*, 1994; 367: 215-216.
- 6) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Exp. Dermatol.*, 2014; 23: 659–663.
- 7) Nishikawa K, Sugiyama T, Kato M, Ishizuka J, et al: Non-Helicobacter pylori and non-NSAID peptic ulcer disease in the Japanese population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* , 2000; 12: 635-640.
- 8) Menon V, Uddin LQ. Saliency, switching, attention and control; a network model of insula function. *Brain Struct Funct*, 2010; 214: 665-667.
- 9) Mruyama K, Goto K, Hiramoto K, Tanaka S, Ooi K. Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, induces skin dryness via PPAR γ in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2022; 45: 77-85.
- 10) Bounous G, Echave V, Vobecky SJ, Navert H, et al. necrosis of the intestinal

- mucosa with high serum levels diamine oxidase. *Dig. Dis. Sci.*, 1984; 29: 872-874.
- 11) Liang S, Shi L-Y, Duan J-Y, Liu H-H, et al. Celecoxib reduces inflammation and angiogenesis in mice with adenomayosis. *Am. J. Transl. Res.*, 2021; 13: 2858-2866.
 - 12) Schnedl WJ, Enko D. Histamine intolerance originates in the gut. *Nutrients*, 2021; 13: 1262.
 - 13) Washizaki K, Kanto H, Yoshida K, Chung L, et al. The objective technique for evaluating of dry skin symptom in the skin disease. *Toho Igakkai zassi (Journal of the Medical Society of Toho University)*, 2016; 63: 39-42
 - 14) Ohno H. Effects of ionized water nanodroplets (mist) released from an air-conditioner on the biophysical and biomechanical propertyes of skin in low humidity rooms. *Jpn. J. Biometeor*, 2016; 5: 113-121.
 - 15) Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol.Rev.*, 2008; 88: 1547-1565.
 - 16) Beppu K, Osada T, Shibuya T, Watanabe S. Pathogenic mechanism of NSAIDs-induced mucosal injury in lower gastrointestinal tract. *Jpn. J. Clin. Med.*,2011; 69: 1083-1108.
 - 17) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, et al. The Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 1998; 391: 79-82.
 - 18) Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 1998; 391: 79-82.
 - 19) Kuzumoto T, Tanigawa T, Higashimori A, Kitamura H, et al. Protective role of resolving DI, a pro-resolving lipid mediator in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage. *PLOS ONE*, 2021; 16: e0250862.

- 20) Shimada N, Sakata A, Igarashi T, Takeuchi M, et al. M1macrophage infiltration ezacerbate muscle/bone atrophy after peripheral nerve injury. *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2020; 21: 44.
- 21) Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 1998; 391: 79-82.
- 22) Barel AO, Clarys P. Study of the stratum Corneum barrier function by transepidermal water loss measurements: comparison between two commercial instruments: Evaporimeter and Tewameter. *Skin Pharmacol.*, 1995; 8: 186-195 .
- 23) Berardesca E. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Res. Technol.*, 1997; 3: 126-132.
- 24) Engeroff P, Fellmann M Yerly D, Bachmann MF, Vogel M. A novel recycling mechanism of native IgE-antigen complexes in human B Cells facilitates transfer of antigen to dendritic cells for antigen presentation. *J. Allergy Immunol.*, 2018; 142: 557-568. e6.
- 25) Bonnfoy JY, Gauchat JF, Life P, Graber P, Aubry JP, Lecoanet-Henchoz S. Regulation of IgE synthesis by CD23/CD21 interaction. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1995; 107: 40-42.
- 26) Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.*, 2011; 19: 229-234.
- 27) Kimura S, Tsuchiya A, Ogawa M, Ono, et al. "Tissue-scale tensional homeostasis in skin regulates structure and physiological function", *Communications Biology*, 2020; 3(1): 637.
- 28) Gschwandtner M, Mildner M, Mlitz V, Gruber F, et al. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a

- human skin model. *Allergy*. 2013; 68(1): 37-47.
- 29) Hasegawa M. *Bcell. Jpn. J. Clin. Immunol.*, 2005; 28(5): 300-308.
- 30) Demerjian M, Man M-Q, Choi E-H, Brown BE, et al. Topical treatment with thiazolidinediones, activators of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, normalizes epidermal homeostasis in a murine hyperproliferative disease model. *Exp. Dermatol.*, 2006; 15:154-160
- 31) Santiago Garcia-Vallvé, Laura Guasch, Sarah Tomas-Hernández, Josep Maria del Bas, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ) and Lipid Choreography: Newcomers Take the Stage. *J. Med. Chem.* 2015; 23(58) 14: 5381-94.
- 32) Chen J, Yang H, Sheng Z. Ellagic acid activated PPAR signaling pathway to protect ileums against castor oil-induced diarrhea in mice: application of transcriptome analysis in drug screening. *Front. Pharmacol.*, 2020; 10: 1681.
- 33) Eisai クリニシアン, 2007; 54, 564.
- 34) 国立長寿医療センター 病院レター, 2012, 37: 1-4.
- 35) Watanabe T, Tanigawa T, Shiba M, et al. Anti-tumour necrosis factor agents reduce non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small bowel injury in rheumatoid arthritis patients. *Gut*, 2014; 63: 409-414.
- 36) Schnedl Wolfgang J, Schenk Michael, Lackner Sonja, Enko Dietmar, Mangge Harald, Forster Florian. Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine intolerance. *J-GLOBAL*. 2019; 28: 1779-1784.
- 37) 佐藤千秋, 千葉正博, 十良澤勝雄, 屋代 薫, et al. 血中 DAO 活性. *日本静脈経腸栄養学会雑誌*, 2016; 31(5), 1099-1104.
- 38) Maruyama K, Hiramoto K, Tanaka S, Ooi K. Effects of Indomethacin

- Administration on the Small Intestines of 40-Week-Old Mice. *BPB Reports*. 2023; 6: 136-140.
- 39) Raithel M, Ulrich P, Keymling J et al. Analysis and topographical distribution of gut diamine oxidase activity in patients with food allergy. *Ann NY Acad. Sci.* 1998; 17: 258-261
- 40) Morita K, Tsukita S, Miyachi Y. Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *British Journal of Dermatology*, 2004; 151: 2.
- 41) Amoozadeh Y, Dan Q, Xiao J, Waheed F, et al. Tumor necrosis factor- induces a biphasic change in claudin-2 expression intubular epithelial cells, role in barrier functions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015; 309: C38–C50.
- 42) Kuo HW, Tsai SS, Tiao MM, Lui YC, et al. Analgesic use and the risk for progression of chronic kidney disease. *Pharmacoepidermiol Drug Saf* 2010; 19: 745-751.
- 43) Karin D, Charlotte H, Jörg P, Hannsjörg W S, et al. Effects of celecoxib and diclofenac on blood pressure, renal function, and vasoactive prostanoids in young and elderly subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 2002; 42(9): 985-994.
- 44) Nadine Ansorge, Christian Dannecker, Udo Jeschke, Elisa Schmoeckel, et al. Regulatory T Cells with Additional COX-2 Expression Are Independent Negative Prognosticators for Vulvar Cancer patients. *international Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(9): 4662.
- 45) 平田純生, 門脇大介, 成田勇樹. NSAIDsによる腎障害-COX-2阻害薬およびアセトアミノフェンは腎障害を起こすか。 *日腎会誌*; 2016; 58(7): 1059-1063
- 46) 中山謙二 非ステロイド性消炎鎮痛剤 (NSAIDs) と薬剤性腎障害。 *仙台医療セン*

ター医学雑誌. 2019; 9.

- 47) Benson P, Yudd M, Sims D, Chang V, et al. Renal effects of high-dose celecoxib in elderly men with stage D2 prostate carcinoma. *Clin Nephrol*, 2012; 78: 376-381.
- 48) Kuo HW, Tsai SS, Tiao MM, Lui YC, et al. Analgesic use and the risk for progression of chronic kidney disease. *Pharmacopidermiol Drug Saf* 2010; 19: 745-751.
- 49) Steven EN, Neville DY, Daniel HS, Thomas FL, et al. PRECISION Trial Investigators. Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *N Engl J Med*. 2016; 375(26): 2519-2529.
- 50) Wells A, Larraon E, Hanas E, Laurent T, et al. Increased hyaluronan in acutely rejecting human kidney grafts transplantation, 1993; 55(6): 1346-1348.
- 51) 内閣府ホームページ、令和 4 年版高齢社会白書(全体版)、1 高齢化の現状と将来像
- 52) Goldstein JL, Eisen GM, Lewis B, et al. Small bowel mucosal injury is reduced in healthy subjects treated with celecoxib compared with ibuprofen plus omeprazole, as assessed by video capsule endoscopy. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007; 25: 1211-1222.
- 53) 厚生労働省、令和 5 年 3 月 8 日 第 2 回 医薬品の販売制度に関する検討会、わが国における市販薬乱用に実態と課題
- 54) Parvaneh Seiri, Abbas Abi, Mohammad Soukhtanloo. PPAR- α : Its ligand and its regulation by microRNAs. *J Cell Biochem*. 2019; 120 (7): 10893-10908.

謝辞

本研究に際して、ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科 大井一弥教授に深甚なる謝意を表します。

本研究をまとめるにあたり、貴重なご指導、ご助言を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 平本恵一准教授 田中章太助手ならびに鈴鹿医療科学大学東洋医学研究所 所長有馬寧教授に深謝の意を表します。

本学位論文の審査にあたり、種々のご助言、ご指導を賜りました鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科 定金豊教授 中山浩伸教授 榎屋友幸准教授に深謝の意を表します。

研究生活において様々のご助言をいただき、お世話になりました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科の先生方および事務面でサポートいただきました白子教務課課長 水井智子氏をはじめ鈴鹿医療科学大学の職員の方々、ならびに病態・治療学分野臨床薬理学研究室の皆様感謝いたします。

大学院生活において励ましや多くのアドバイスをくださった鈴鹿医療科学大学大学院を卒業された諸先輩方に感謝の意を表します。

Abstract

Research on the effects of NSAIDs administration on skin physiological functions in mice

In Japan's super-aged society, the incidence of bone fractures and joint pain is rapidly increasing, and the demand for NSAIDs is rising.

NSAIDs exert anti-inflammatory and pain-relieving effects by inhibiting cyclooxygenase (COX) and prostaglandin (PG) synthesis¹⁾. COX has two isoforms, COX-1 and COX-2.²⁾ COX-1 is constitutively expressed in the body, but COX-2 is induced by inflammation. NSAIDs with high COX-1 selectivity increase the risk of developing gastric and duodenal ulcers owing to the inhibition of PG synthesis, however, COX-2 has a lower risk³⁾, making it safe for older adults. Nonetheless, questions remain regarding the occurrence of dry skin, which is often observed after the administration of NSAIDs.

In this study, we investigated the changes in skin physiology that occur after NSAID administration.

Chapter 1

The mechanism of PPAR γ induced dry skin expression *via* PPAR γ induced by the administration of indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug.

In 2014, our laboratory reported on the development of dry skin associated with the onset of enteritis due to NSAIDs administration⁴⁾. In that report, the administration of indomethacin, which is highly COX-1 selective, resulted in the development of enteritis and elevated levels of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase (MMP)-1, resulting in a decrease in type I collagen and an increase in mast cells. This result suggested that mast cell degranulation had occurred, but it was unclear which signal had caused degranulation.

This study aimed to clarify the mechanism of mast cell degranulation expression. Indomethacin is known to act as a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ⁵⁾. PPAR γ is a protein that is highly expressed in adipose tissue and macrophages. Although it is mainly involved in glucose metabolism and fat accumulation by binding to ligands^{6),7)}, it can inhibit inflammation⁸⁾. Indomethacin is also known to activate PPAR γ , increase interleukin (IL)-10 expression, and promote an increase in immunoglobulin (Ig) E antibodies. Mast cells wait for IgE antibodies to bind to Fc ϵ

receptors expressed on the cell surface⁹⁾ Allergic reactions are triggered by the binding of antigens to IgE antibodies, which initiates degranulation and triggers the release of chemical mediators. A rapid increase in IgE levels has been reported to trigger IgE degranulation.

The approximately 10-fold increase in IgE antibodies in the indomethacin-treated group compared to that in the loxoprofen sodium and celecoxib groups may have triggered degranulation. As indomethacin induces the expression of IgE antibodies, it was thought that mast cells in the circulating bloodstream targeted the skin and induced dry skin expression.

Chapter 2

Changes in diamine oxidase (DAO) barrier function following indomethacin administration in aging mice.

NSAIDs are used when homeostasis is inadequate for recovery from inflammation and pain. Certain reports have focused on the relationship between impaired homeostatic function and age-related adverse effects of NSAIDs due to age.

However, only a few studies have examined how the homeostasis changes as the body ages.

This study investigated the relationship between DAO¹⁰⁾, which is thought to be one of the defense mechanisms that operates in the event of drug-induced inflammation, and aging. DAO is synthesized in the apical portion of the small intestinal villous tissue and serves as a histamine controller to reduce the effects of excessive histamine discharged by inflammation¹¹⁾. Serum DAO activity, which is also used to evaluate the physiological function¹²⁾, is reportedly decreased by small intestinal mucosal injury¹³⁾. A comparison of the changes in skin physiology and homeostasis of DAO induced by the administration of NSAIDs in aged and young mice revealed that indomethacin-induced contraction of the small intestinal villi tissue and a marked decrease in DAO activity were observed in aged mice only.

These results suggest that age-related homeostasis may exacerbate indomethacin-induced small intestinal inflammation. Chapter 2 revealed the involvement of histamine in the development of dry skin induced by indomethacin administration, and that the age-related decrease in DAO activity may be one of the causes of the exacerbation of dry skin development.

Chapter 3

The development of dry skin in aging mice administered celecoxib.

Celecoxib, a COX-2 selectivity NSAIDs, is considered safe for older adults. However,

adverse reactions to NSAIDs should be noted not only for gastric and duodenal ulcers but also for impaired renal function.

In the present, aged-celecoxib-treated mice exhibited thickened skin and elevated creatinine levels. This suggests that celecoxib administration may have caused acute drug-induced kidney injury, and that the expression of tumor necrosis factor (TNF)- α , due to renal disorder may have caused the development of dry skin. The development of dry skin due to drug-induced kidney injury and age-related factors should be considered in addition to celecoxib administration.

Conclusion

These studies have revealed the involvement of PPAR γ , which has an inhibitory effect on inflammation, in the development of dry skin induced by the administration of NSAIDs. Therefore, it was thought that a drug that would be a ligand for PPAR γ could cause similar adverse reactions. Furthermore, even with celecoxib administration, which is considered safe for older individuals, age-related renal disorder and associated dry skin have been observed. Awareness of the occurrence of adverse reactions other than gastrointestinal symptoms, including COX-2 selective NSAIDs, has been suggested.

References

- 1) Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 1971; 231: 232-235.
- 2) Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, et al., TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase cyclooxygenase homologue. *Journal of Biological Chemistry*, 1991; 266: 12866-12872.
- 3) Graham DY, Opekun AR, Willingham FF, Qureshi WA. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005; 3: 55-59.
- 4) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impaired skin barrier function in mice with colon carcinoma induced by azoxym ethane and dextran sodium sulfate. *Biol. Pharm. Bull.*, 2015; 38: 947-950.
- 5) Ana C Puhl, Flora A Milton, Aleksandra Cvorovic, Paul Webb et al. Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor γ regulation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nucl Recept Signal.* 2015; 13: e004
- 6) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999; 4: Issue 4. 595-607.
- 7) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, et al., *J. Clin. Invest.*, 1998; 101.

- 8) Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome-activated receptor- α activation in modulates cellular redox status, repress nuclear factor- κ B signaling and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 32833-32841.
- 9) P. Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 1999; 17: 931.
- 10) Wolvekamp MC, de Bruin RW. Diamine oxidase an overview of historical, biochemical and functional aspects. *Dig Dis*, 1994; 12: 2-14.
- 11) Sanjay Ponkshe. What to Know About Diamine Oxidase (DAO) for Histamine Intolerance. WebMD Editorial Contributors, 2023; Allergies Guide.
- 12) Cai C, Chen J, et al. Diamine oxidase as a marker for diagnosis of superior mesenteric arterial occlusion. *Hepatogastroenterology* , 2012; 59: 155-158.
- 13) Forget P, Saye Z, Van Cutsem, JL, et al: Serum diamine oxidase activity in acute gastroenteritis in children. *Pediatr Res*, 1985; 19: 26-28.