

博士論文(2020年3月)内容の要旨および審査結果の要旨

鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科

氏名 ごとう けんじ 五藤 健児

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博(薬)甲第6号

学位授与の日付 令和2年3月13日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目「関節炎により誘導される乾燥皮膚発現のメカニズム解析」

論文審査委員(主査)教授 中山 浩伸 博士(薬学)

(副査)教授 川西 正祐 薬学博士

教授 飯田 靖彦 博士(薬学)

教授 佐藤 英介 医学博士

教授 田口 博明 博士(薬学)

# 論文要旨

氏名	五藤 健児
----	-------

## 論文の題名

関節炎により誘導される乾燥皮膚発現のメカニズム解析

## 論文の要旨

### 緒論

皮膚は、主に表皮・真皮・皮下組織から成る人体最大の臓器である。表皮や真皮における天然保湿因子のヒアルロン酸やコラーゲンなどは皮膚構造の保持に重要な役割を担っており、外界との間でバリアを形成することで水分喪失を防ぎ、生体を維持している。皮膚バリア機能低下がもたらす乾燥皮膚は、掻痒を引き起こすきっかけとなり、重篤な場合には皮膚感染症を引き起こすなど二次的な疾病に繋がる。これまでに、小腸炎や大腸炎などの消化器疾患モデル動物において、炎症を起こした部位とは異なる臓器である皮膚に影響が及び、乾燥皮膚を発現することが確認されている[1, 2]。本研究では、消化器官以外の炎症性疾患である関節リウマチに着目した。関節リウマチは、関節炎や進行性関節破壊などの関節における症状を主とするだけでなく、血管や皮下組織などにおける関節外症状も生じる炎症性疾患である。臨床において関節リウマチ患者が乾燥皮膚を呈することは既知の事実として報告されているが[3, 4]、分子レベルの誘導メカニズムの詳細は明らかではない。本研究では、関節リウマチを模倣した関節炎モデルマウスを用いて乾燥皮膚を発現させ、その発現のメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

### 第1章：関節炎モデルマウスにおけるマスト細胞がもたらす乾燥皮膚への影響

10週齢雄性のDBA/1Jマウス（コントロールマウス）およびDBA/1Jコラーゲン関節炎誘発モデルマウス（関節炎マウス）を使用した（各  $n = 5$ ）。乾燥皮膚の程度を評価するために経表皮水分喪失量（Transepidermal water loss: TEWL）を測定し、皮膚組織の染色を行った。さらに、皮膚バリア機能に関与するヒスタミンやコラーゲンの発現を測定した。その結果、コントロールマウスと比較して関節炎マウスでは、TEWLが上昇し、乾燥皮膚が生じた。また、関節炎マウスにおける皮膚中のI型およびIV型コラーゲンは低値であり、それらの分解酵素であるMatrix metalloproteinase (MMP)-1およびMMP-9は高値であった。さらに、関節炎マウスの皮膚におけるマスト細胞数および血漿中におけるヒスタミン量は増加していた。これらのことから、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現には、マスト細胞が関与している可能性が考えられた。次に、マスト細胞の増殖に関わるc-kitの抗体を関節炎マウスに投与することで、マスト細胞の増殖を阻害し、乾燥皮膚への影響を確認した。その結果、上昇していたTEWLを低下させ、関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善した。また、皮膚中のI型コラーゲンの減少、マスト細胞数およびヒスタミン量の増加が抑制された。したがって、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現にマスト細胞の関与が明らかとなった。

## 第2章：関節炎モデルマウスにおけるマスト細胞を介した Reactive Oxygen Species およびストレスホルモンの乾燥皮膚への影響

第1章と同様の関節炎マウスを用い、マスト細胞を活性化する因子による乾燥皮膚への影響を確認した。マスト細胞を活性化する因子としては Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、その上流にある好中球や Reactive oxygen species (ROS) が予測される [5]。また、TSLP はストレスホルモンであるグルココルチコイドからの影響も受ける [6]。本章では、抗 TSLP 抗体、抗好中球抗体、ROS 消去剤である N-アセチルシステイン (NAC) それぞれの投与を試みた。それらの投与により、関節炎マウスにおける乾燥皮膚は改善し、皮膚中マスト細胞数が減少した。さらに、NAC の投与に加えてグルココルチコイドの受容体遮断薬を併用した場合には、より一層の乾燥皮膚の改善と皮膚中マスト細胞数の減少効果が得られた。したがって、TSLP、好中球、ROS およびグルココルチコイドはマスト細胞を介して、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現を誘導していることが明らかとなった。

## 第3章：関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚発現に Th2 細胞および Th17 細胞が及ぼす影響

第2章では、マスト細胞をはじめ、様々な免疫担当細胞を刺激する TSLP が関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に関わることを明らかにした。本章では、TSLP から刺激を受けるマスト細胞以外の免疫担当細胞として樹状細胞に着目し、樹状細胞の刺激により分化する Th2 細胞および Th17 細胞が関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に与える影響を検討した。Th2 および Th17 阻害剤を投与した際、関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善された。Th2 細胞によって引き起こされる乾燥皮膚は、IL-6 および TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの増加により起こるのに対して、Th17 細胞は、IL-17 の分泌増加およびマスト細胞の活性化を介して起こすことが考えられた。このことから、樹状細胞により分化が促進されるヘルパーT細胞といえども、Th2 細胞および Th17 細胞それぞれに異なるメカニズムで乾燥皮膚の発現を誘導することが明らかとなった。

以上の結果より、関節炎マウスにおいて乾燥皮膚の発現が誘導されることが明らかとなった。その誘導のメカニズムとしては、活性酸素やストレスホルモンによって活性化される TSLP を介したマスト細胞および樹状細胞の関連が考えられた。これらの因子を抑えることは、関節リウマチ患者における乾燥皮膚症状を緩和することに繋がる可能性が示唆された。

### 引用文献

- [1] Yokoyama S. et al. *Exp Dermatol.* 2014;23:659-663.
- [2] Yokoyama S. et al. *Exp Dermatol.* 2015;24:779-784.
- [3] Lora V. et al *G Ital Dermatol Venereol.* 2018;153:243-255.
- [4] Ghosh SK. et al. *Indian J Dermatol* 2017;62:411-417.
- [5] Shen S. et al. *Food Chem Toxicol.* 2017;99:60-69.
- [6] Mizuno K. et al. *J Dermatol Sci.* 2015; 80:45-53.

※和文で作成すること。用紙サイズ A4、2500 字以内 (MS 明朝 10.5 ポイント)。

# 論文審査結果の要旨

## 【判定結果】

当委員会は、五藤 健児 氏による学位申請論文の審査および口述による諮問を行った結果、博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判断した。

## 【判定理由】

申請された論文は、超高齢社会に突入した現在において増加している関節リウマチ患者で、しばしば起こる乾燥皮膚に着目し、その疾患の発現メカニズムの解明を動物モデルを用いて試みた成果報告である。

第1章では、慢性関節リウマチの動物モデルとして、薬理試験などで使用実績が多いコラーゲン誘導関節炎マウス（関節炎マウス）を用い、その病態を観察した。その結果、経表皮水分喪失量の増加などから乾燥皮膚を発現していることを確認し、本研究に用いる動物モデルとしての妥当性を示した。そして、そのマウスの皮膚や血液を用いた生化学的および組織化学的解析から、関節炎マウスの皮膚では、マスト細胞数の増加で、マトリックスメタロプロテアーゼやヒスタミンの増加が起こり、その結果、コラーゲンが減少することから乾燥皮膚を発現することを明らかにした。

第2章では、マスト細胞の数を増加させる因子として、サイトカイン Thymic stromal lymphopoietin（TSLP）、その産生に関わる好中球や活性酸素種、ストレスホルモンであるグルココルチコイドを候補として考え、それらの抗体や阻害薬をマウスに投与して、生化学的および組織化学的解析を行った。その結果、これら因子が、マスト細胞の数を増加させて関節炎マウスでの乾燥皮膚の発現を誘導していることを示した。

第3章では、マスト細胞以外で、乾燥皮膚の発現を誘発する免疫担当細胞についての検討を下記のように行った。候補として、Th0細胞からTh2細胞やTh17細胞への分化を誘導する樹状細胞に着目し、Th2細胞およびTh17細胞の機能阻害薬をマウスに投与し、生化学的および組織化学的解析を行うことで、それらの細胞が乾燥皮膚の発現に与える影響を検討した。その結果、Th2細胞は、IL-6およびTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを増加させることで、また、Th17細胞は、炎症と自己免疫を促進するサイトカインとして知られるIL-17の分泌を増加させることで、乾燥皮膚を発現させることを示した。これらのことから、関節炎での乾燥皮膚の発現に樹状細胞やその下流のTh2細胞およびTh17細胞が関与していること、また、Th2細胞とTh17細胞は、異なるメカニズムによって乾燥皮膚を誘導することを明らかにした。

最後にこれら結果を総括し、マスト細胞が乾燥皮膚の誘導に関わる点においては、消器疾患での乾燥皮膚発現と共通すること、また、TSLPやグルココルチコイドからのシグナルやマスト細胞以外に樹状細胞が関わる点が、特有の誘導メカニズムであることと結論し、疾患ごとでの適正な乾燥皮膚対策が必要であることを示唆した。

以上のような申請者の研究について審査委員会は慎重に審議し、下記の結論を得た。申請者は薬学研究科において、分子病態学に関して十分な知識と実験技術を身につけ、そして、鋭い観察力や分析力、展開力を持って研究を遂行した。また申請者の研究より得られた知見は、関節リウマチでの皮膚疾患での分子病態の理解を前進させた。さらには、様々な炎症系疾病で発現することが報告されている乾燥皮膚の阻止は、乾燥皮膚が一因となる掻痒や皮膚感染症の阻止に繋がるため、それら患者の QOL の向上に寄与することが期待できるものとする。従って、審査委員会は、申請者を博士（薬学）の適格者と認める。