

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

2020

五藤 健児

Mechanistic analysis of dry skin induced by arthritis

2020

Kenji Goto

目次

緒論	1
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	
第 1 節 緒言	4
第 2 節 実験方法	5
第 3 節 結果	8
第 4 節 考察	15
第 5 節 小括	16
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 節 緒言	17
第 2 節 実験方法	18
第 3 節 結果	21
第 4 節 考察	27
第 5 節 小括	29
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 1 節 緒言	30
第 2 節 実験方法	31
第 3 節 結果	34
第 4 節 考察	40
第 5 節 小括	42
結論	43
引用文献	45
謝辞	48
Abstract	49

略号一覧

ACTH: adrenocorticotropic hormone
CCL17: chemokine (C-C motif) ligand 17
DMSO: dimethyl sulfoxide
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
HE: hematoxylin and eosin
IL: interleukin
JAK: janus kinase
JNK: c-jun N-terminal kinase
LDS: lithium dodecyl sulfate
MMP: matrix metalloproteinase
NAC: *N*-acetyl cysteine
PBS: phosphate buffered salts
QOL: quality of life
ROR γ t: retinoid-related orphan receptor gamma t
ROS: reactive oxygen species
STAT: signal transducers and activator of transcription
TEWL: transepidermal water loss
Th: T helper
TNF- α : tumor necrosis factor- α
TSLP: thymic stromal lymphopoietin
TARC: thymus and activation regulated chemokine

緒論

皮膚は、最外層にて上皮組織を形成する表皮、その下層において結合組織からなる真皮、さらに深部に存在する皮下組織から主に形成される人体最大の臓器である。皮膚の機能として、体内と外界を隔て、生体内の水分保持や外部刺激から諸器官を守る働き、侵入した異物や細菌などを排除することで体を守る働きがある。表皮の最内層である基底層で産生されたケラチノサイト（角化細胞）は、角化と呼ばれる細胞分裂を繰り返しながら外層へ移動し、最終的には外界に触れる最外層である角層を形成し、身体をくまなく覆っている。角層では、ケラチノサイトがレンガ様の構造をとり、ケラチノサイトの間隙（細胞間質）に存在する細胞間脂質であるセラミドや天然保湿因子であるヒアルロン酸などが角層の水分量を保ち、表皮からの水分の喪失を防いでいる。また、真皮においてはコラーゲンを中心とする結合組織が豊富に存在し、エラスチンと共に皮膚の弾性を保っている。これらの結合組織の間隙にはヒアルロン酸も蓄えられ、水分が一定量保持されている(Fig. 1)。

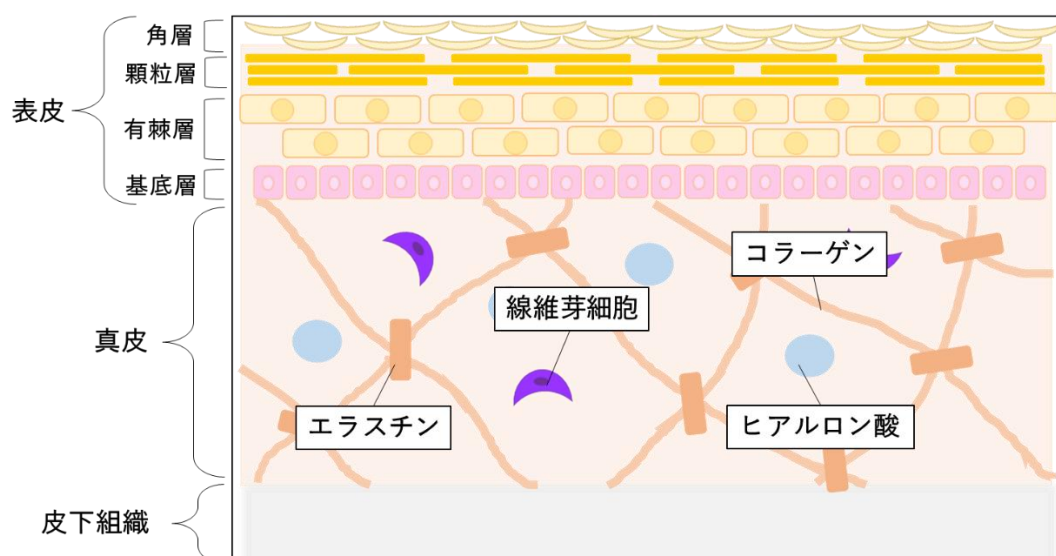


Fig. 1 皮膚構造の模式図

皮膚は、外部環境の変化や生体内の異常が起こると、バリア機能が低下する。その結果、皮膚中の水分が保持できず、喪失することで乾燥皮膚が引き起こされる。乾燥皮膚を生じる要因としては、炎症によってコラーゲンを生成する線維芽細胞が障害を受けることや、マスト細胞に存在するトリプターゼによってコラーゲン分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP)が活性化されることが挙

げられる [Ref. 1, 2]。乾燥皮膚の所見としては、経表皮水分喪失量 (Transepidermal water loss: TEWL) の上昇や角層水分量の低下がみられることが知られている [Ref. 3]。そのような状態に陥れば、掻痒を生じるきっかけとなりうる。掻痒により皮膚が障害を受けると、表皮細胞から interleukin (IL)-1 や tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカインが放出され、それらが原因となり再び痒みを生じることとなる。結果として、皮膚症状を悪化させる itch scratch cycle のような慢性化を引き起こすこともある [Ref. 4]。痒みが酷くなれば傷を生じ、皮膚感染症の発症や、睡眠障害の誘発など精神的に与える影響も大きい [Ref. 5]。これらは患者の Quality of life (QOL) を著しく低下させる要因となりうるため、掻痒の原因となる乾燥皮膚を防ぐことは大変重要である。

これまでに小腸炎や大腸炎、肝炎などの消化器疾患モデルマウスでは、乾燥皮膚を引き起こすという報告がなされている [Ref. 6-8]。その際には、皮膚におけるアセチルコリンなどの神経系シグナルやマスト細胞などの免疫担当細胞の関与が認められており、内臓器官の障害は遠隔臓器である皮膚の状態に影響を及ぼすことを示している。本論文では、消化器以外に炎症性疾患においてもどのような因子が乾燥皮膚に影響を及ぼすのかについて検討することとし、炎症性自己免疫疾患である関節リウマチに着目した。

関節リウマチは遺伝的な要因や微生物感染、ストレス、ホルモンバランスの異常などの様々な因子が原因となって発症する自己免疫疾患である [Ref. 9]。関節の炎症と進行性関節破壊を主症状とし、血管、肺、腎臓、皮下組織などの関節外にも病巣が広がる。世界人口の約 1% が罹患し、本邦においては現在およそ 80 万人の罹患者がいるとされており、さらに高齢化の影響も相まってその数は年々増加の傾向にある。関節リウマチ患者が掻痒を呈することや乾燥皮膚を発現することは、臨床では既知の事実として症例報告されているが、その誘導に関するメカニズムは明らかにされていない [Ref. 10, 11]。

関節リウマチの病態を網羅したモデル動物は存在しないが、主徴である関節炎を模倣したモデル動物は多数存在する。基礎研究にて用いられる代表的なモデルとしては、アジュバント惹起ラット、II 型コラーゲン誘導関節炎マウスなどが挙げられる [Ref. 12]。なかでも、コラーゲン誘導関節炎モデルは 1977 年に Trentham らが発表し、現在では関節リウマチの動物モデルとして薬理試験などに頻用されているモデルである [Ref. 13]。接種する動物とは異なる種の II 型コラーゲンを注射することで、動物体内で抗原抗体反応が起こり、抗原に対する抗体が大量に産生される。産生された抗体は異種 II 型コラーゲンを抗原として認識・排除する一方で、自身の II 型コラーゲンも抗原として認識し、主に II 型コラーゲンを構成成分とする関節軟骨が破壊される。コラーゲン誘導関節炎モデルはメトトレキサートをはじめとしたリウマチ治療薬の承認時における薬理試験の

際に用いられ、関節炎の改善および治療効果を得るなど実績豊富である [Ref. 14]。本論文では、ヒト慢性関節リウマチに酷似し、使用実績も多いコラーゲン誘導関節炎マウスを用い、乾燥皮膚発現のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

第 1 章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、乾燥皮膚の再現性とマスト細胞の乾燥皮膚への影響を検討した。第 2 章では、同マウスを用いてマスト細胞の活性化因子について検討を行った。第 3 章では、マスト細胞以外の免疫担当細胞が乾燥皮膚へ及ぼす影響について検討し、関節リウマチにおいて乾燥皮膚の発現が誘導される模式図を作成した。

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

第 1 節 緒言

乾燥皮膚は、経表皮水分喪失量 (Transepidermal water loss: TEWL) の上昇が所見として現れ、表皮における皮脂の欠乏や真皮に存在する天然保湿因子であるヒアルロン酸および細胞外マトリックスであるコラーゲンの減少により引き起こされる [Ref. 6]。皮膚におけるコラーゲンは主に I 型および IV 型が存在し、I 型コラーゲンは細胞外マトリックスを構成する主要な成分として、皮膚に弾力性を持たせたり、水分を保持したりする働きがある。IV 型コラーゲンは基底膜を構成する成分であり、特に表皮と真皮の結合に役立つ。これらのコラーゲンは、皮膚や関節の組織修復に必須な酵素である Matrix metalloproteinase (MMPs) によって分解されており、I 型コラーゲンは主として MMP-1 に、IV 型コラーゲンは MMP-9 によって分解される。皮膚炎症の惹起により、これら MMPs が過剰に発現し、コラーゲンの低下を招いてしまうため、皮膚水分量を低下させることが報告されている [Ref. 15]。

関節リウマチにおける皮膚症状は、全身性の強皮症やリウマチ結節、皮膚潰瘍など様々であり、乾燥皮膚発現も症例報告がなされている [Ref. 9, 10]。乾燥皮膚発現のメカニズムを解明する基礎的研究は不十分であるが、関節リウマチ患者における滑膜組織ではマスト細胞が増加し、滑液中のトリプターゼおよびヒスタミン濃度が増加したとの報告があることから [Ref. 16]、関節リウマチの病態にはマスト細胞が関与していることが示唆されている。マスト細胞は炎症やアレルギー反応などの生体防御に重要な役割を持つ免疫担当細胞であり、トリプターゼや炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-6、特異顆粒であるヒスタミンなどを放出する [Ref. 17]。このうち、トリプターゼや TNF- α は MMPs を活性化することが報告されている [Ref. 18]。マスト細胞をノックアウトさせることで小腸炎モデルマウスにおける乾燥皮膚が改善したことや [Ref. 6]、蕁麻疹治療にマスト細胞を標的とした治療法が期待されていることなどから [Ref. 19]、マスト細胞の皮膚疾患への関与が示唆でき、関節リウマチにお

ける乾燥皮膚発現にも関係する可能性がある。

コラーゲン誘発関節炎モデルマウスは抗リウマチ薬の薬理試験の際に用いられるモデル動物であるが、乾燥皮膚の評価に適したモデルであるかについては定かではない。

したがって本章では、関節リウマチモデルであるコラーゲン誘発関節炎モデルマウスの乾燥皮膚発現の再現性について確認し、関節炎における乾燥皮膚発現へのマスト細胞の影響を明らかにすることを目的とした。

第2節 実験方法

1. 実験動物とその飼育および処置

関節リウマチの病態を模倣したモデルマウスとして、DBA/1Jコラーゲン誘導関節炎マウス(関節炎マウス)を使用した。このマウスは、日本エスエルシー株式会社にて関節炎処置を施された10週齢のマウスである。コラーゲン誘導関節炎処置として、DBA/1JマウスにII型コラーゲン抗体を1回目は耳介基部、21日後の2回目は尾根部に皮内投与することで作製された。本モデルは、リウマチ治療薬の承認時における薬理試験の際に用いられ、関節炎の改善および治療効果を得るなど使用頻度・実績共に豊富である。性周期を有する雌性マウスの使用は、性ホルモンの影響を考慮する必要があるため、関節炎の発症に性ホルモンが関与するとの報告があるため[Ref. 20]、本研究を行う上で正確な結果を得られない可能性がある。したがって、本研究では雄性マウスを用いた。コラーゲン誘導処置を行わないDBA/1Jマウスをコントロールマウス($n = 5$)とした。購入したマウスは温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル12時間(light: 8:00-20:00)の環境下、固形飼料および水を自由に摂取させ、いずれも1週間の馴化飼育を実施した。馴化後、1日1回4日間連続にて $21 \mu\text{g}/\text{kg}$ の抗c-kit抗体(マスト細胞の増殖抑制)(Lifespan Biosciences Inc., Seattle, WA)を関節炎マウスの腹腔内に投与した[Ref. 21]。抗c-kit抗体投与最終日に、ペントバルビタールナトリウム($5 \text{ mg}/\text{mL}$)(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を $50 \text{ mg}/\text{kg}$ となるように腹腔内投与してマウスに麻酔したのち、背部の刈毛を行い、さらに除毛クリーム(Veet Hair Removal Cream Fit Sensitive; Reckitt Benckiser, Slough, UK)を用いて、背部を除毛し、皮膚を露出させた。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験委員会による研究計画書の承認を得た後に、総理府の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、ならびに「鈴鹿医療科学大学動物実験指針(承認番号:第66号)」に従って実施した。

2. マウス後肢容積の測定

除毛処置の24時間後、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与にてマウスを麻酔し、Cosgroveらの方法に則り、水を満たしたビーカーを電子天秤に載せ、マウス後肢の指先から脛骨までを浸すことで、後肢容積を測定した[Ref. 22]。

3. マウス背部皮膚のTEWLの測定

手順2終了後、麻酔下におけるマウス背部皮膚のTEWLの測定を行った。TEWLは皮膚から時間あたりに体外喪失する水分量の測定値であり、皮膚のバリア機能を反映している。Barelらの方法に基づいて、Tewameter®TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)を用いて、TEWLを測定した[Ref. 23]。測定値は測定開始後およそ10秒が経過し、数値が安定した状態で読み取り、3回測定した値の平均値を算出した。

4. マウスの血液および皮膚組織の採取

手順2および3終了後、心臓から約1 mLの血液を採取した。また、縦1.5 cm×横0.8 cm四方の背部皮膚組織を採取し、 -80°C で凍結保存した。

5. 皮膚組織の染色

採取した皮膚組織の一部は免疫組織学的評価に用いるため、パラホルムアルデヒド溶液(4%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)にて固定した。固定した皮膚組織はTissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)を用いて凍結包埋し、5 μm の厚さでマイクローム (Leica Biosystems, Nussloch, Germany)にて薄切を行った。薄切した切片はhematoxylin and eosin (HE)によって染色した後、光学顕微鏡にて組織学的評価を行い、無作為に抽出した10枚の画像における表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。また、トルイジンブルー染色を行い、マスト細胞数をImage Jソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて計測した。無作為に3か所のエリアを抽出し、単位面積(mm^2)あたりのマスト細胞数の平均値を算出した。

6. ウエスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析

採取した背部の皮膚組織100 mgを剪刀で細かく刻んだ後、組織用懸濁試薬(KURABO, Osaka, Japan)に浸漬し、氷上にてハンドミキサー(POLYTRON PT 1200 CL; Kinematica AG, Littau, Switzerland)を用いて、ホモジナイズ(20,000 rpm, 60秒)した。懸濁液を $8,000 \times g$ で10分間遠心分離したのち、上清を抽出し、

解析に用いるまで -80°C で保存した。上清サンプルを溶解後、Lowry法により総タンパク質量 $7.85\ \mu\text{g}$ となるようlithium dodecyl sulfate (LDS) sample buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)およびsample reducing agent (Thermo Fisher Scientific)に懸濁させて調整し、煮沸後、4-12% BIS-TRIS Bolt gel (Thermo Fisher Scientific)を用いて200Vの定電圧で18分間電気泳動を行った。電気泳動されたタンパク質はiBlot 2 Dry blotting system (Thermo Fisher Scientific)を用いて、25Vの定電圧を6分間かけてニトロセルロース膜(Thermo Fisher Scientific)に転写し、 4°C で一晩、5%スキムミルク(Megmilk Snow Brand Company, Tokyo, Japan)にてブロッキングを行った。ブロッキング後、 25°C で1時間、1次抗体として抗I型コラーゲン抗体(1:1,000, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA)、抗IV型コラーゲン抗体(1:1,000, Abcam, Cambridge, MA, USA)、抗MMP-1抗体(1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)、抗MMP-9抗体(1:1000, Abnova, Taipei, Taiwan)、抗 β -アクチン抗体(1:5,000, Sigma, St. Louis, MO, USA)でそれぞれ反応させたのち、horseradish peroxidaseで標識された2次抗体(Thermo Fisher Scientific)で処理を行った。免疫複合体は化学発光試薬であるイムノスターゼータ(Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)で処理したのちに、lumino-image analyzer (LAS-4000, FUJIFILM, Greenwood, SC, USA)を用いて検出した。

7. 血中ヒスタミン濃度の測定

心臓から採取した血液サンプルを 4°C 、 $3,000 \times g$ で10分間遠心分離し、上清部分(血漿)を採取した。血漿中のヒスタミン濃度はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Histamine: Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France)のプロトコルに従い、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)を用いて、405 nmの波長にて測定した。

8. 統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準偏差(SD)値で示した。2群間の比較にはStudent's *t*-test、3群間の比較にはTukey's testを用いた。危険率が5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。統計解析はIBM SPSS Statistics24にて実施した。

第3節 結果

1. マウスの後肢容積

関節の腫れは関節の炎症状態を評価する指標の1つである。マウスの後肢容積を測定したところ[Ref. 22]、関節炎マウスではコントロールマウスに比べて約3倍増加しており、本研究に使用するマウスが関節炎を発症していることが確認できた(Fig. 2)。

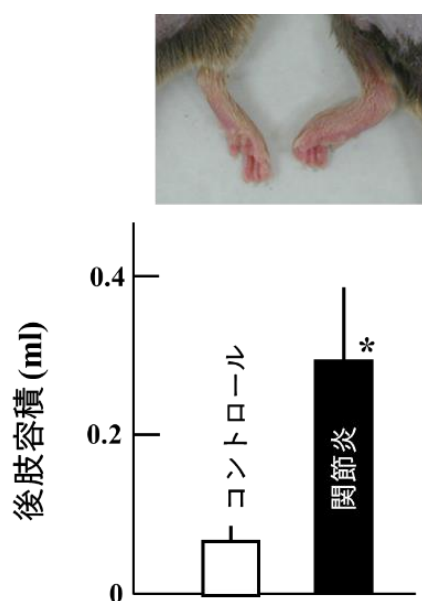


Fig. 2 コントロールマウスと関節炎マウスとの後肢容積の比較

コントロールマウスと関節炎マウスとの後肢の比較写真。後肢を蒸留水にて満たしたビーカーに浸けることで容積を測定した。測定値は平均値±標準偏差(SD)値として示した。

Student's *t*-test ($n = 5$). * $p < 0.05$ 。

2. マウス背部皮膚のTEWLおよび組織学的検討

関節炎マウスの乾燥皮膚の状態を確認するため、TEWLの測定および皮膚の組織学的な検討を行った。除毛処置の翌日、各マウスのTEWLの測定を実施した。関節炎マウスのTEWLはコントロールマウスに比して、約2倍上昇していた(Fig. 3A)。また、皮膚の切片をHE染色により評価した。表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定したところ、関節炎マウスではコントロールと比較して、約1.5倍厚くなっていた(Fig. 3B)。

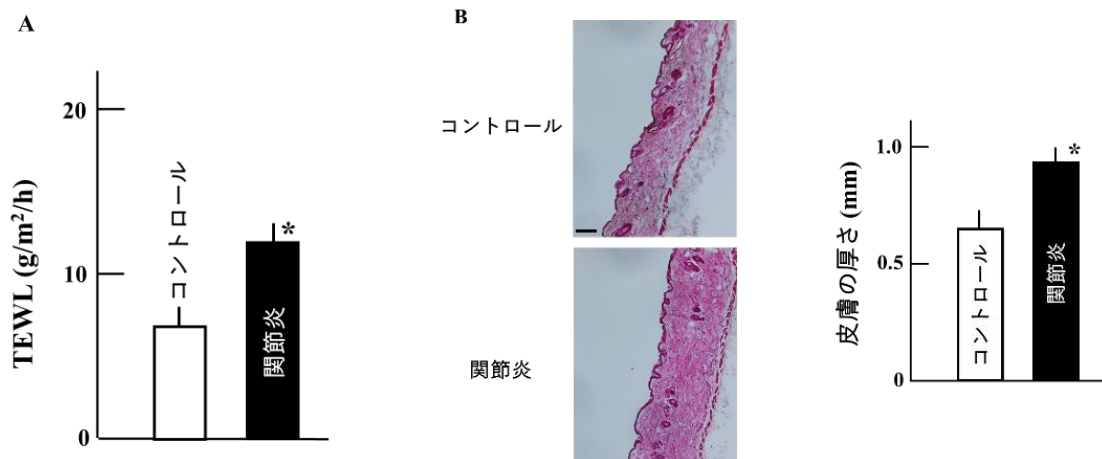


Fig. 3 関節炎マウスにおける皮膚状態の変化

A) 除毛処置をした翌日に背部皮膚におけるTransepidermal water loss (TEWL)を測定した。測定値は平均値±SD値として示した。B) Hematoxylin and eosin (HE)染色を実施した皮膚切片を顕微鏡にて観察し、無作為に抽出した10枚の画像における表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。Scale bar = 200 μ m。Student's *t*-test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

3. 皮膚中のI型コラーゲン、IV型コラーゲン、MMP-1およびMMP-9の変化

他の疾患により生じた乾燥皮膚では、MMPによるコラーゲンの分解が増加していたため[Ref. 6]、本研究においてもウエスタンブロッティングにより、MMPやコラーゲンの発現を解析した。関節炎マウスにおける皮膚中のI型コラーゲンおよびIV型コラーゲンの発現量は、コントロールマウスに比して約0.5倍減少した。また、I型コラーゲンを分解する酵素であるMMP-1、およびIV型コラーゲンを分解する酵素であるMMP-9の発現量は関節炎マウスではコントロールマウスに比して約4倍から5倍増加した(Fig. 4)。

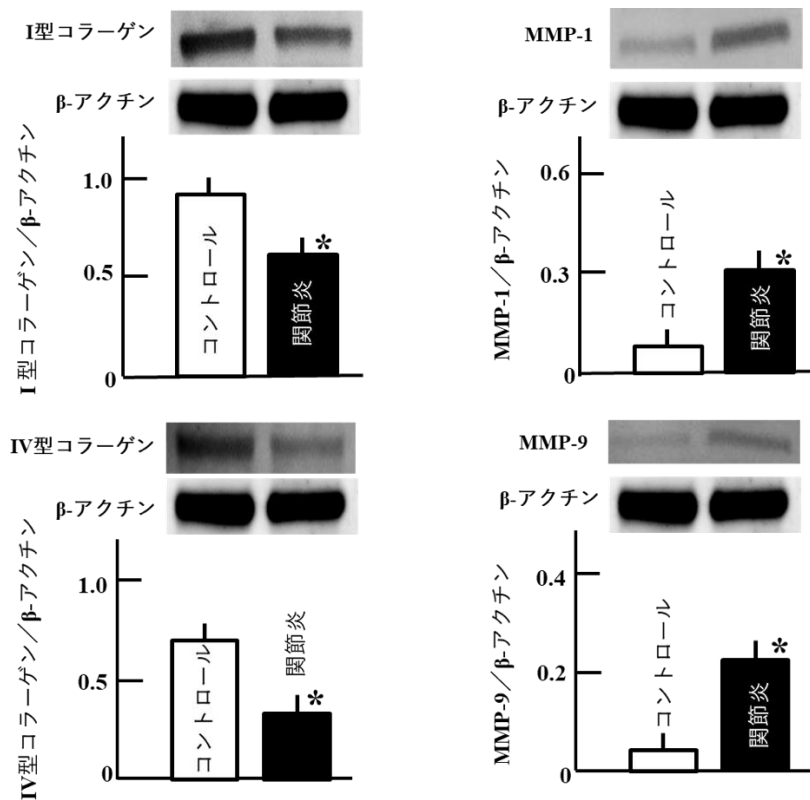


Fig. 4 皮膚におけるI型コラーゲン、IV型コラーゲン、MMP-1およびMMP-9の発現量

ウエスタンブロッティングにより皮膚中のI型コラーゲン、IV型コラーゲン、MMP-1およびMMP-9の発現をlumino-image analyzerを用いて検出し、数値化した。値はβ-actinにより標準化し、平均値±SD値で示した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

4. 皮膚中マスト細胞の発現数

マスト細胞が関節リウマチの病態や他の疾患により生じる乾燥皮膚に関わっていると報告されていることから [Ref. 6, 16]、本研究では皮膚中のマスト細胞の発現数を計測した。トルイジンブルー染色の結果、コントロールマウスの皮膚中に比べて、関節炎マウスの皮膚中ではマスト細胞の発現数が約4倍増加していた (Fig. 5)。

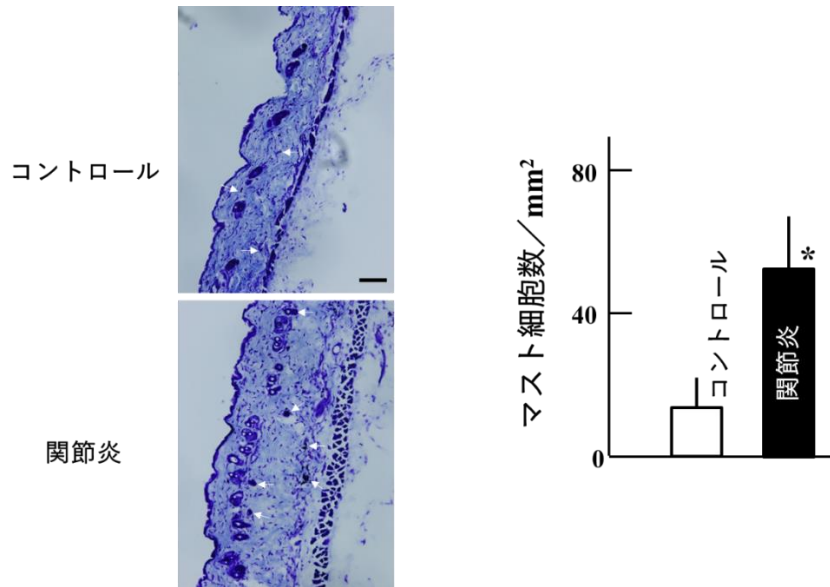


Fig. 5 関節炎マウスの皮膚におけるマスト細胞の発現数

皮膚切片におけるマスト細胞をトルイジンブルー染色により検出した後、発現数を計測した。Scale bar = 200 μ m。Student's *t*-test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

5. 血漿中のヒスタミン濃度

ヒスタミンはマスト細胞から特異的に脱顆粒される因子であり、関節リウマチ患者の滑膜にて増加していると報告されている [Ref. 16]。したがって、乾燥皮膚の発現に関わっている可能性があり、本研究においては血漿中のヒスタミン濃度をELISAにより、測定した。ヒスタミンはコントロールマウスと比べて、関節炎マウスでは約2倍増加した (Fig. 6)。

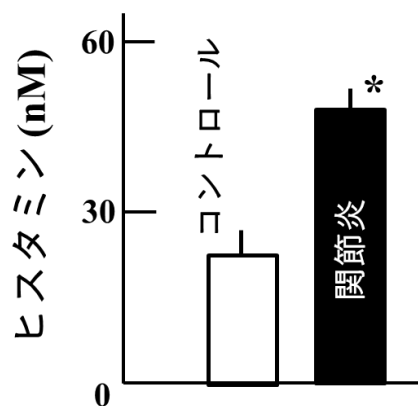


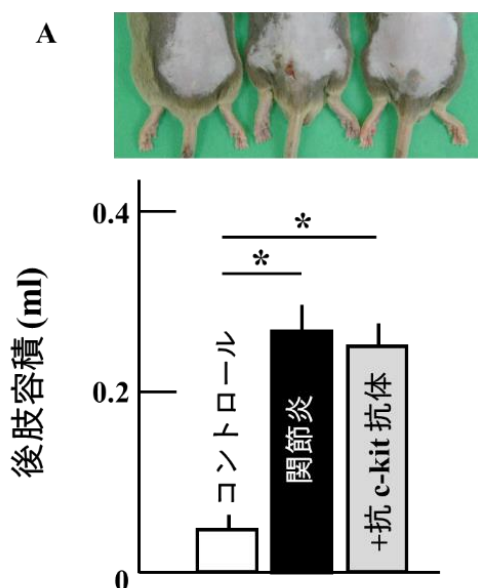
Fig. 6 血漿中のヒスタミン濃度

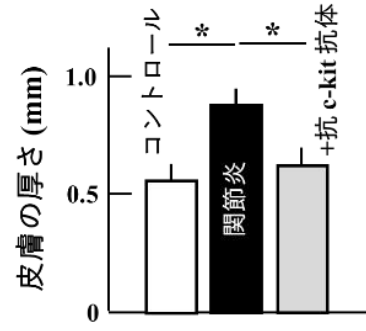
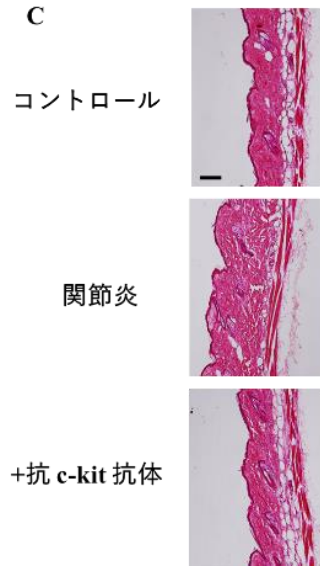
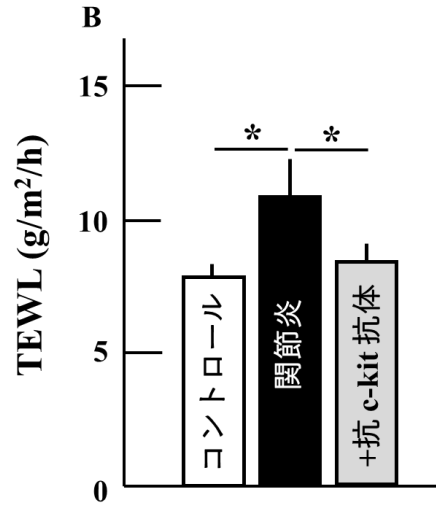
血漿中のヒスタミンをELISAにより測定した。Student's *t*-test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

6. 抗c-kit抗体投与による影響

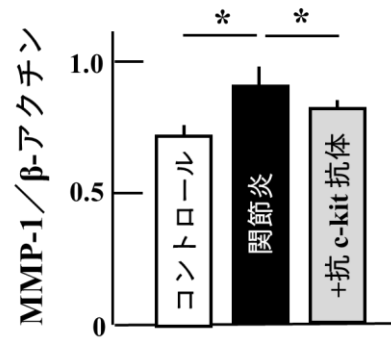
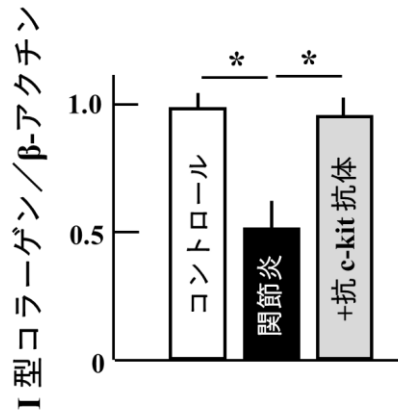
上記のように関節炎により発現した乾燥皮膚においてもマスト細胞数の増加が観察できた。しかしながら、マスト細胞数の増加が関節炎における乾燥皮膚発現の要因かは明らかではないため、マスト細胞の増殖に関わる因子であるc-kitの抗体を投与した[Ref. 21]。抗c-kit抗体を投与した関節炎マウスでは、後肢容積に変化は無かったが(Fig. 7A)、無投与の関節炎マウスで上昇したTEWLをコントロールマウスと同程度に低下させ、また、皮膚の厚さもコントロールマウスと同程度であった(Fig. 7B, 7C)。

本モデルマウスにおいても乾燥皮膚発現にはMMPによるコラーゲンの分解やヒスタミンの増加が見られたため、これらがマスト細胞の増加によって起こることを確認するために、それらの増減を抗c-kit抗体を投与した関節炎マウス、無投与の関節炎マウス、コントロールマウスで比較した。抗c-kit抗体の投与により、皮膚中のI型コラーゲン発現の減少は無投与の関節炎マウスより抑えられ、コントロールマウスと同程度であったほか、MMP-1発現の増加も抑制され、コントロールの値まで近づけられた(Fig. 7D)。皮膚中のマスト細胞数および血中ヒスタミンは減少しており、マスト細胞数に関してはコントロールマウスと同程度であったが、ヒスタミンはコントロールマウスの値までは抑えられていなかった(Fig. 7E, 7F)。





D



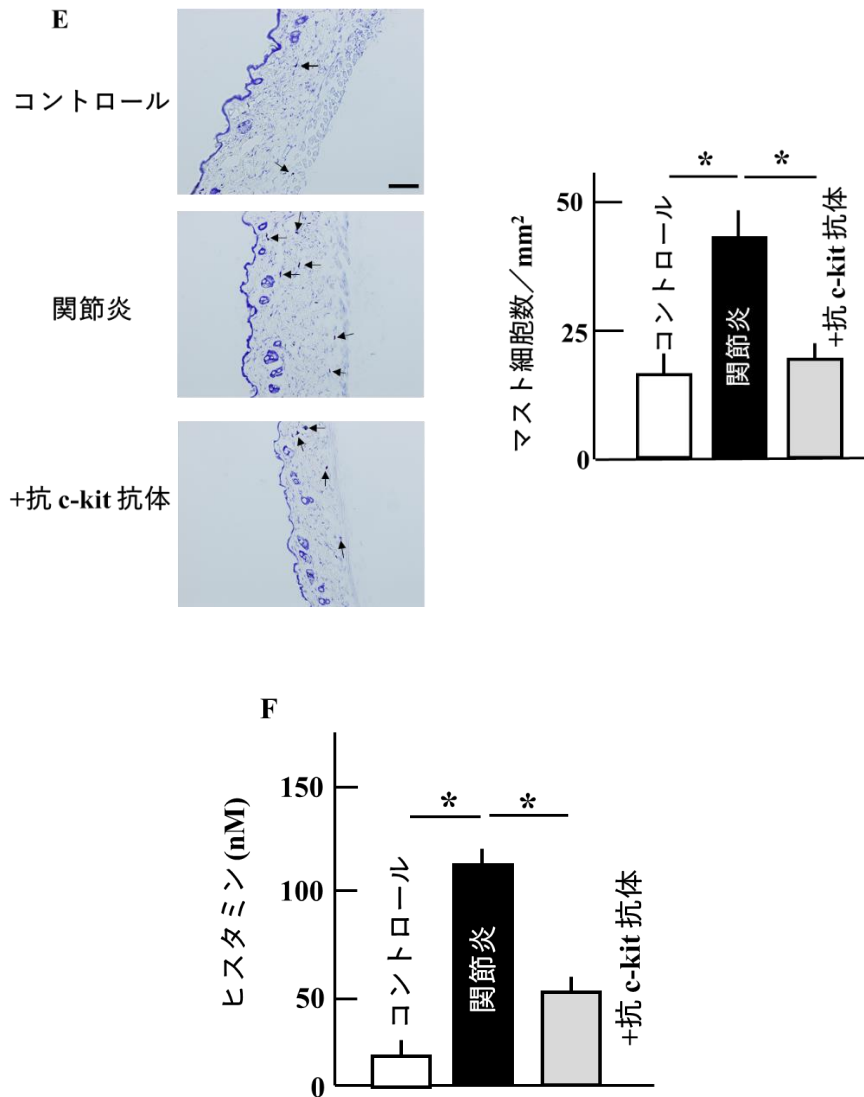


Fig. 7 関節炎マウスにおける乾燥皮膚における抗c-kit抗体投与による効果

A) 抗c-kit抗体投与による後肢容積を比較した。B) 背部皮膚におけるTEWLを測定した。C) HE染色を実施した皮膚切片を顕微鏡にて観察し、無作為に抽出した10枚の画像における表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。Scale bar = 200 μ m。D) 皮膚におけるI型コラーゲンおよびMMP-1の発現を検出し、数値化した。値は β -actinによって標準化し、平均値 \pm SD値で示した。E) 皮膚切片におけるマスト細胞をトルイジンブルー染色により検出した後、発現数を計測した。Scale bar = 200 μ m。F) 血漿中のヒスタミンをELISAにより測定した。測定値は平均値 \pm SD値として示した。Tukey's test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

第 4 節 考察

コントロールマウスに比べて後肢容積が増加した関節炎マウスでは、TEWLおよび皮膚中MMPs発現が上昇し、I型およびIV型コラーゲンは減少した(Fig. 3A, 4)。これらのことから、コラーゲン誘発関節炎モデルマウスは臨床報告に合致する乾燥皮膚の発現を認めたので、関節リウマチにおける乾燥皮膚の評価に適したモデルであると考えられた。

コラーゲンの分解にはマスト細胞より放出されるトリプターゼやTNF- α によって活性化されたMMPsによる分解、Reactive oxygen species (ROS)による直接的な分解や線維芽細胞の変性によるコラーゲン新生の阻害などがある[Ref. 24]。乾燥皮膚および関節炎の各々の発症にマスト細胞の関わりが報告されている[Ref. 6, 16]。本研究においても関節炎マウスの皮膚でのマスト細胞数、MMP-1およびMMP-9の発現が増加していたほか(Fig. 4, 5)、血液中のヒスタミンについても関節炎マウスで増加していた(Fig. 6)。マスト細胞の増殖を抑制する抗c-kit抗体を関節炎マウス投与することで、関節炎による後肢容積は増加したままであったが、TEWLの上昇が抑制された。また、抗c-kit抗体投与を投与した関節炎マウスでは、皮膚中のマスト細胞数の増加やMMP-1の増加が抑制され、皮膚中のI型コラーゲンの減少も抑制されたほか、血中の血中ヒスタミン量の減少が確認できた(Fig. 7)。これらの報告と本研究の結果から、マスト細胞によって活性化されたMMPsがコラーゲン分解を導き、関節炎による乾燥皮膚を招く可能性が考えられた。また、ヒスタミンは皮膚に炎症を起こすことや、マスト細胞から脱顆粒されたヒスタミンがマスト細胞をさらに活性化させ、マスト細胞中の顆粒の成熟を促進させること、抗ヒスタミン薬の投与により、TEWLの上昇が抑えられたとの報告があることから[Ref. 25, 26]、本章における関節炎モデルの乾燥皮膚発現にヒスタミンの増加も関わることを示唆できた。

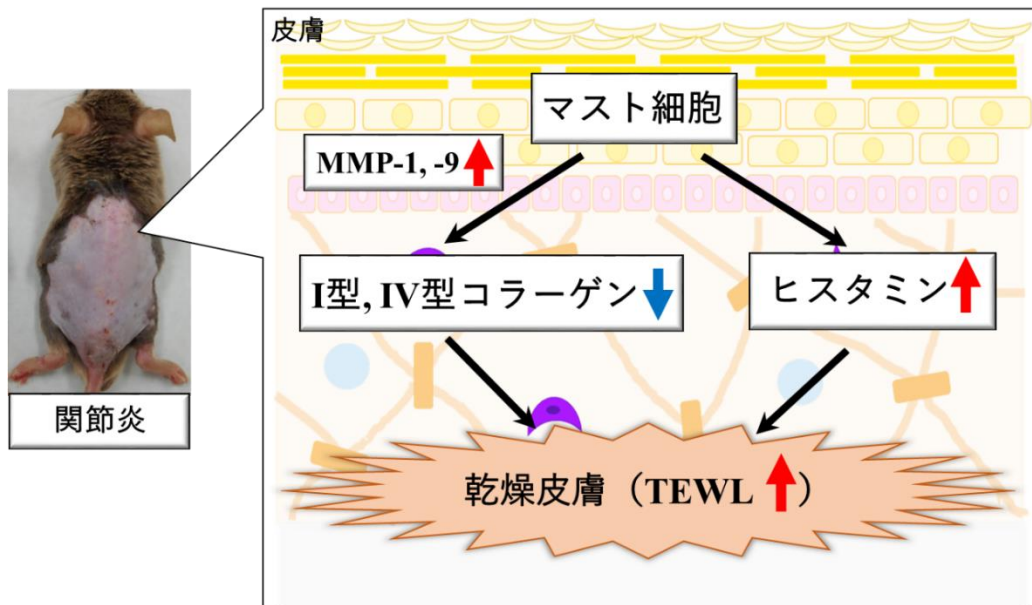


Fig. 8 関節炎により誘導される乾燥皮膚発現におけるマスト細胞の役割

第 5 節 小括

本章の結果は、コラーゲン誘導関節炎マウスにおける乾燥皮膚発現の再現性を確認し、その発現のメカニズムにはマスト細胞が関与していることを示した(Fig. 8)。マスト細胞の増殖に関わる *c-kit* の抗体を投与することで、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の症状が改善されたことは、この結果を支持している。したがって、マスト細胞の増加を防ぐことが関節炎による乾燥皮膚の発現を軽減する 1 つの手段になることを示している。

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 節 緒言

第 1 章では、関節炎モデルマウスで乾燥皮膚を確認し、その発症にマスト細胞の活性化が関わっていることを明らかにした。しかしながら、乾燥皮膚においてマスト細胞を活性化し、増加させる因子については明らかとなっていない。したがって本章では、マスト細胞の活性化に関わる因子の候補を選出し、それらの影響について検討した。

最近の研究において、皮膚バリア機能低下を引き起こすアトピー性皮膚炎では、**thymic stromal lymphopoietin (TSLP)**が関わっているとの報告がある [Ref. 27]。TSLP は上皮細胞より放出され、マスト細胞や樹状細胞などの免疫担当細胞を活性化するので、免疫反応に重要な役割を担っている [Ref. 28]。このような報告から、関節炎における乾燥皮膚のマスト細胞の活性化に関わっている可能性が示唆された。

関節リウマチでは好中球やマクロファージが関節の滑膜に集積し、貪食作用により関節破壊をもたらす [Ref. 29]。特に好中球は関節リウマチ患者の滑膜液における細胞の約 90%を占める [Ref. 30]。また、好中球は関節症状のみならず、急性熱性好中球性皮膚症のように皮膚症状に関連する疾患も存在する [Ref. 31]。好中球は **Reactive oxygen species (ROS)**を産生しており、関節リウマチ患者における関節の炎症部位においては、**ROS**が増加している [Ref. 32]。**ROS**は外来異物の除去や細胞内シグナルの応答に必要な物質であるが、過剰に生成した **ROS**は、癌や動脈硬化、糖尿病、胃潰瘍、大腸炎、皮膚疾患など多くの疾患の発症に関わる [Ref. 33]。**ROS**が線維芽細胞の変性を起こし、コラーゲンの生成を阻害することで皮膚炎を起こすことや [Ref. 24]、**ROS**を低減することで皮膚におけるコラーゲンの減少を抑制し、乾燥皮膚を抑制した報告がある [Ref. 7]。また、**ROS**はマスト細胞からヒスタミンが脱顆粒する際に作用することや [Ref. 34]、**TSLP**のシグナルを調節しているとの報告がある [Ref. 35]。これらのことから、好中球や好中球から産生される **ROS**が **TSLP**に影響を及ぼし、マスト細胞を介

して関節炎における乾燥皮膚を誘導している可能性が考えられるが、このことを解析した報告はなされていない。

関節リウマチでは、関節の激しい痛みを伴うため、罹患者には身体的にも精神的にもストレスが生じている。それらストレスが、グルココルチコイドの増加をもたらす[Ref. 36]。ストレスにより、視床下部-下垂体-副腎系が活性化され、下垂体を刺激し、**adrenocorticotropic hormone (ACTH)**を分泌する。その後、**ACTH**は副腎皮質からのグルココルチコイドの分泌を促進する。グルココルチコイド類似の合成ステロイド(デキサメタゾン)により**TSLP**の発現が低下した報告のように[Ref. 37]、グルココルチコイドは免疫反応を抑える作用を有する一方で、**Toll like receptor 2** 遺伝子の発現を上昇させることで皮膚の機能異常を引き起こすことが報告されている[Ref. 38]。グルココルチコイドが関節炎における乾燥皮膚の発現に関わっている可能性が考えられるが、その詳細は明らかとなっていない。

上述のように、関節炎の乾燥皮膚におけるマスト細胞活性化に、**TSLP**、好中球、**ROS**が関与している可能性があるが詳細は不明である。したがって、本章では抗**TSLP**抗体[Ref. 39]、抗好中球抗体[Ref. 40]、抗酸化物質のグルタチオン前駆体として活性酸素を除去する *N-acetyl cysteine (NAC)* [Ref. 41]をそれぞれ投与することでマスト細胞活性化への影響を確認した。また、グルココルチコイド受容体遮断薬(**RU486: mifepristone**) [Ref. 42]を投与することで、ストレスホルモンであるグルココルチコイドの関節炎における乾燥皮膚の発現への関与についても検討した。

第 2 節 実験方法

1. 実験動物とその飼育および処置

第 1 章同様に、10 週齢の雄性 **DBA/1J** コラーゲン誘導関節炎マウス(関節炎マウス)を用いた。本章においても、日本エスエルシー株式会社がコラーゲン誘導関節炎処置を実施したものを購入した。関節炎処置を行わない **DBA/1J** マウスをコントロールマウス(**n = 5**)とした。購入したマウスは第 1 章と同条件で馴化飼育し、馴化飼育後、各試薬を関節炎マウスに投与した。各試薬の投与終了日に、第 1 章同様に背部の除毛により、皮膚を露出させた。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験委員会による研究計画書の承認を得た後に、総理府の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、ならびに「鈴鹿医療科学大学動物実験指針(承認番号:第 66 号)」に従って実施した。

2. 各試薬の投与

馴化飼育後、各中和抗体や阻害剤を関節炎マウスに投与した(Fig. 9)。1日1回4日間連続にて0.08 µg/0.2 mL/mouseの抗TSLP中和抗体(R&D System Inc., Minneapolis, USA)をPhosphate buffered salts (PBS)に溶解させ、腹腔内投与した。試験2日目に、250 µg/0.2 mL/mouseの抗好中球モノクローナル中和抗体(AdipoGen Life Sciences, Inc., San Diego, CA, USA)をPBSに溶解させ、腹腔内に単回投与した。1日1回4日間連続にて200 mg/kgのNAC(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を0.1%のDimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解させ、腹腔内投与した。1日1回4日間連続にて30 mg/kgのRU486(Roussel-Uclaf, Paris, France)をコーン油に溶解させ、腹腔内投与した。

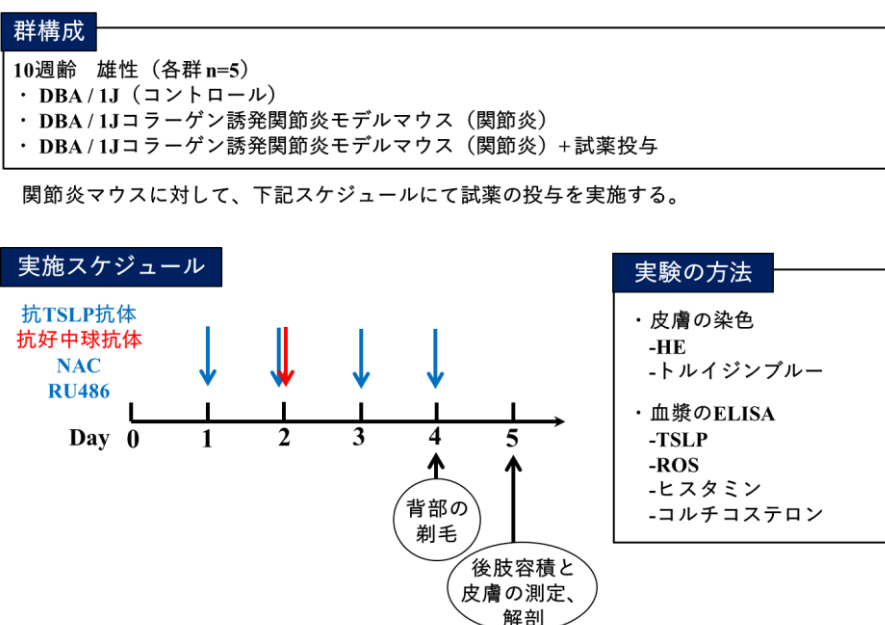


Fig. 9 実験方法

3. マウス後肢容積の測定

除毛処置の24時間後、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与にてマウスを麻酔し、第1章同様にCosgroveらの方法に則り、後肢容積を測定した[Ref. 22]。

4. マウス背部皮膚のTEWLの測定

手順3終了後、マウスの背部皮膚のTEWLをTewameter®TM300(Courage + Khazaka Electronic)を用いて測定した[Ref. 23]。測定値は第1章と同法により算出した。

5. マウスの血液および皮膚組織の採取

手順 3 および 4 終了後、マウスの心臓から約 1 mL の血液を採取した。また、縦 1.5 cm×横 0.8 cm 四方の背部皮膚組織を採取し、 -80°C で凍結保存した。

6. 皮膚組織の染色

採取した皮膚組織の一部は免疫組織学的評価に用いるため、パラホルムアルデヒド溶液(4%, Wako)で固定した。固定された皮膚組織は Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek)を用いて凍結包埋し、 $5\ \mu\text{m}$ の厚さでマイクロトームにて薄切を行った。薄切した切片は HE によって染色した後、光学顕微鏡にて組織学的評価を行い、無作為に抽出した 10 枚の画像における表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。また、皮膚中のマスト細胞はトルイジンブルー染色し、細胞数を Image J ソフトウェアを用いて計測した。無作為に 3 か所のエリアを抽出し、単位面積(mm^2)あたりのマスト細胞数の平均値を算出した。

7. 血中分子マーカーの濃度測定

心臓から採取した血液サンプルを 4°C 、 $3,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清部分(血漿)を測定に用いた。血漿中の TSLP、IL-6、ヒスタミン、コルチコステロン濃度は、それぞれの ELISA kit (TSLP, R&D Systems; IL-6, BioLegend, San Diego, CA, USA; Histamine, Bertin Pharma; Corticosterone, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA)のプロトコルに従い、マイクロプレートリーダーにて $450\ \text{nm}$ の波長で測定した。ROS は OxyselctTM in vitro ROS/RNS 測定キット(Cell biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)を使用し、マイクロプレートリーダーにて励起 $480\ \text{nm}$ /蛍光 $530\ \text{nm}$ の波長で測定した。

8. 統計解析

全てのデータはコントロールに対する比率とし、平均値 \pm SD 値で示した。関節炎マウスに対する各群の比較には Student's *t*-test を用いた。危険率が 5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。統計解析は IBM SPSS Statistics24 にて実施した。

第 3 節 結果

1. 各試薬投与による後肢容積の比較

抗 TSLP 抗体、抗好中球抗体、NAC、NAC+RU486 投与による関節の炎症状態を比較するために、マウスの後肢容積を測定した。関節炎マウスの後肢容積はコントロールマウスよりも約 2 倍増加した。しかし、後肢容積は各試薬を投与した関節炎マウスと無投与の関節炎マウスとの間で差異はなかった (Fig. 10)。

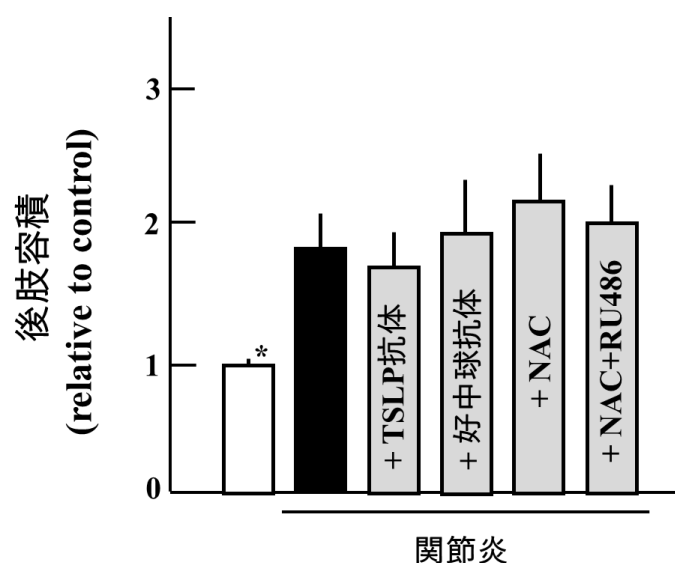
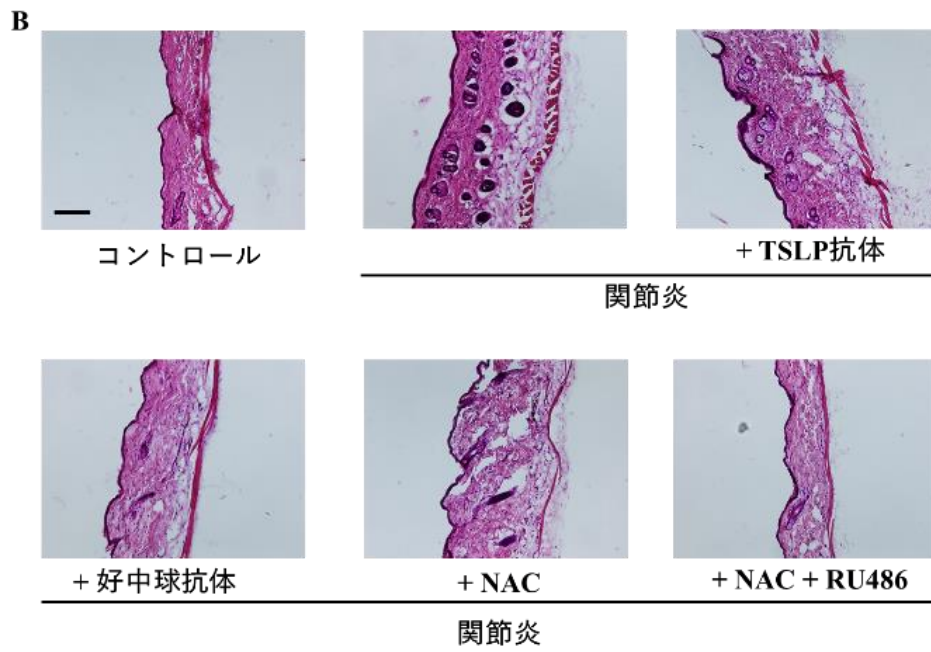
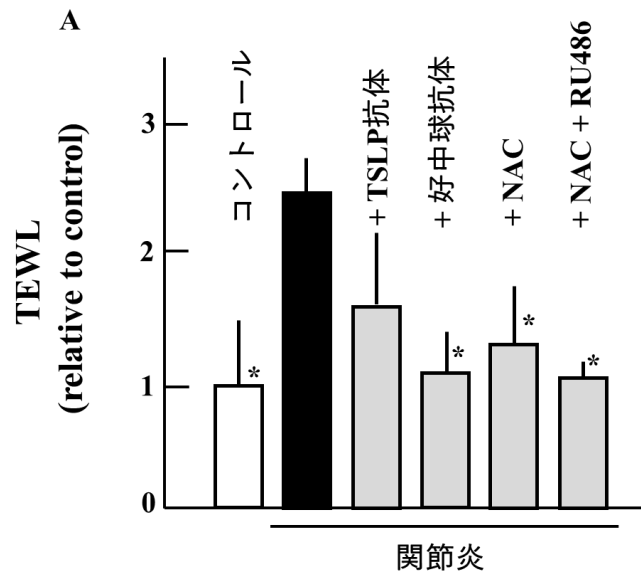


Fig. 10 各試薬投与による後肢容積の比較

後肢を蒸留水にて満たしたビーカーに浸けることで容積を測定した。値はコントロールに対する比率とし、平均値±SD 値で示した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

2. 各試薬投与マウスと関節炎マウスとの皮膚の比較

各試薬の投与による乾燥皮膚の状態を確認するために、マウス背部皮膚の TEWL の測定および HE 染色による組織学的な検討を行った。関節炎マウスではコントロールマウスと比較して、TEWL が約 2.5 倍上昇したが、各試薬を投与した関節炎マウスの TEWL は抗 TSLP 抗体を投与したマウスを除いて、コントロールマウスと同程度まで低下した (Fig. 11A)。コントロールマウスの皮膚と比較した場合、関節炎マウスの皮膚は約 2 倍厚かったが、各試薬を投与した関節炎マウスの皮膚の厚さは抗 TSLP 抗体と NAC を投与したマウスを除いて、コントロールマウスと同程度まで減少した (Fig. 11B)。



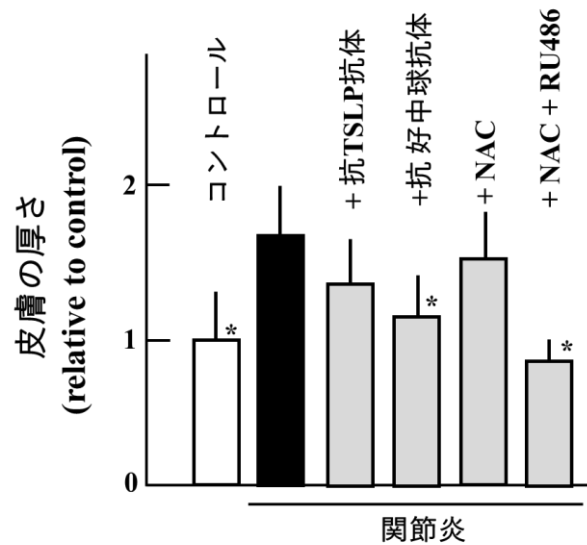


Fig. 11 各試薬投与による皮膚状態の変化

A) 除毛処置した翌日の TEWL 測定値を示した。B) 皮膚切片を HE 染色した後、光学顕微鏡で観察した。観察により得られた皮膚切片の画像を無作為に抽出し、表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。Scale bar = 200 μ m。値はコントロールに対する比率とし、平均値 \pm SD 値で示した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

3. 血漿中の TSLP、ROS、および IL-6 濃度の解析

抗 TSLP 抗体や NAC の投与により、乾燥皮膚が改善したことから、TSLP や ROS の値が変動している可能性が考えられたため、それらの血中濃度を測定した。関節炎マウスにおける TSLP および ROS 濃度はコントロールと比較して、それぞれ約 15 倍、1.5 倍高かった。一方、無投与の関節炎マウスより各試薬を投与した関節炎マウスではいずれの因子も低下していた(Fig. 12)。抗 TSLP 抗体を投与することで TSLP はコントロールマウスと同程度まで抑えられていたが、NAC のみではコントロールと同程度まで抑えることはできなかった。したがって、NAC 以外の因子が TSLP を活性化している可能性があり、既報にて TSLP を活性化することが報告されているグルココルチコイドに着目し、グルココルチコイド受容体遮断薬である RU486 を併用させた。NAC+RU486 を投与した関節炎マウスではコントロールマウスと同程度まで減少した(Fig. 12A)。ROS は抗 TSLP 抗体および NAC を投与した関節炎マウスではコントロールマウスと同程度まで減少し、抗好中球抗体および NAC+RU486 を投与した関節炎マウスではさらに減少していた(Fig. 12B)。また、第 1 章ではマスト細胞から脱顆粒するヒスタミンの増加が関節炎における乾燥皮膚の発現に関わることを明らかにしたが、マスト細胞からは TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが放出されることが報告されている [Ref. 43]。ヒスタミンはケラチノサイトの IL-6 供給を増加

させる働きあり [Ref. 44]、IL-6 は、核内転写因子である **signal transducers and activator of transcription (STAT) 3** を活性化させることで Th17 の分化を促し [Ref. 45, 46]、アトピー性皮膚炎のような乾燥皮膚を伴う皮膚疾患に関わる IL-17 を放出する働きがある [Ref. 47]。これらが乾燥皮膚に関わる可能性も考えられる。したがって本研究では ELISA により、血漿中の IL-6 濃度を測定した。関節炎マウスにおける IL-6 濃度はコントロールと比較して、約 20 倍高かった。IL-6 は、抗 TSLP 抗体、NAC、NAC+RU486 を投与した関節炎マウスではコントロールマウスと同程度まで減少した (Fig. 12C)。

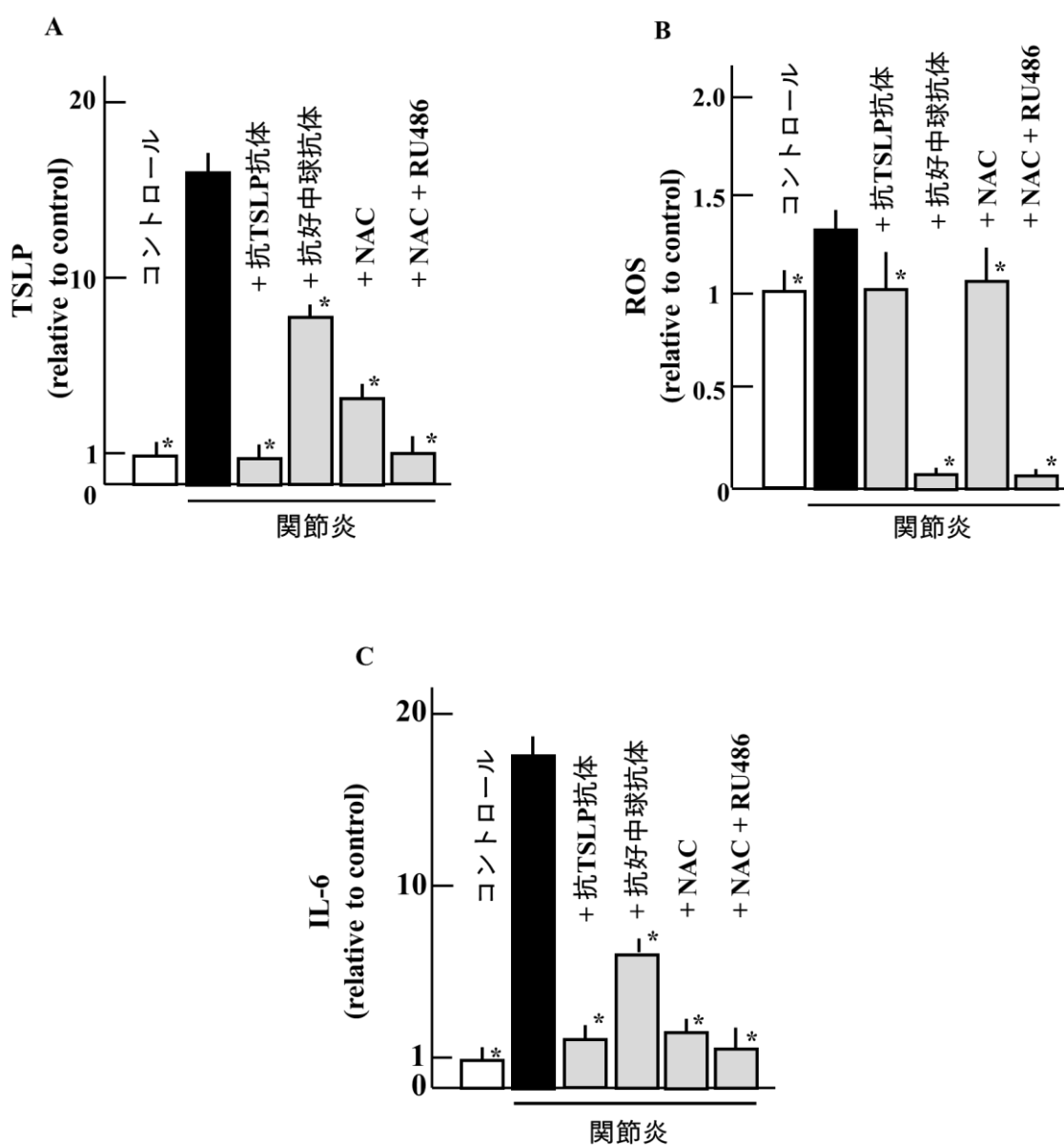


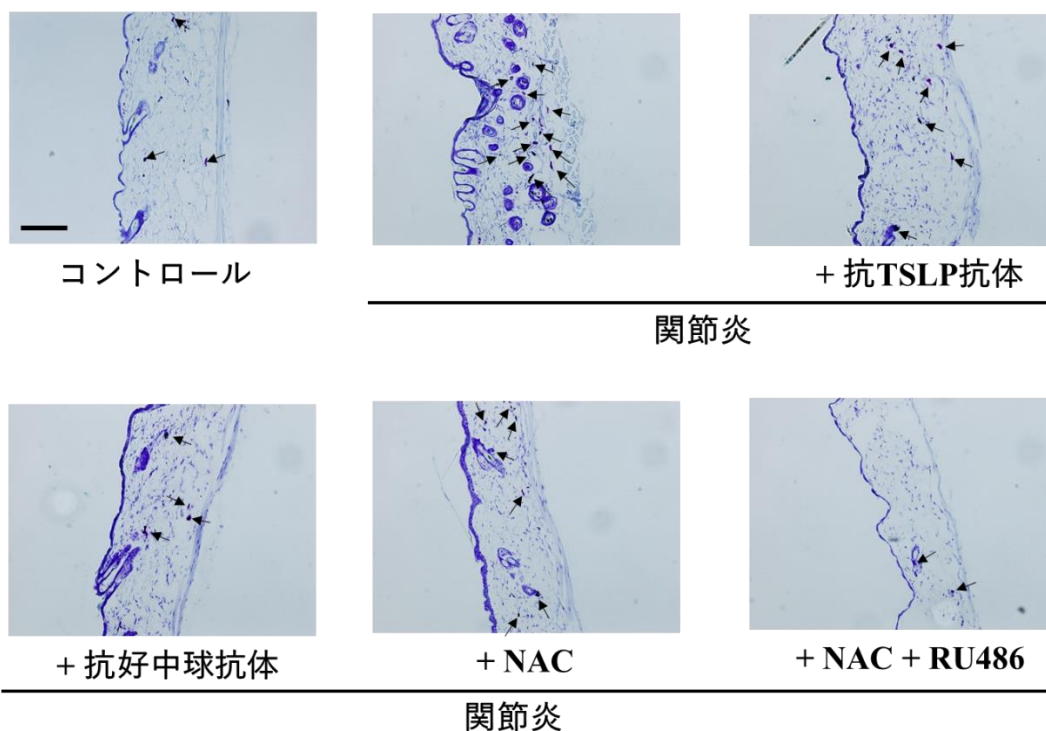
Fig. 12 各試薬投与による TSLP、ROS および IL-6 への影響

A) ELISA により、血漿の TSLP を測定した。B) ELISA により、血漿の ROS を測定した。C) ELISA により、血漿の IL-6 を測定した。値はコントロールに対する比率とし、平均値±SD 値で示した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

4. 皮膚中のマスト細胞数および血漿中ヒスタミン濃度の解析

マスト細胞を活性化する因子の阻害剤や中和抗体を投与した際の皮膚中のマスト細胞数の変化について、トルイジンブルー染色を用いて組織学的に評価した。マスト細胞はコントロールマウスと比較して関節炎マウスにおいて約 2.5 倍増加した (Fig. 13A)。しかしながら、関節炎マウスに比べ、各試薬を投与した関節炎マウスでは皮膚のマスト細胞数が減少した。さらに、各試薬投与におけるマウスのヒスタミン濃度を ELISA により測定した。ヒスタミンは、コントロールマウスよりも関節炎マウスにおいて約 10 倍増加したが、各試薬を投与したマウスでは減少していた (Fig. 13B)。抗 TSLP 抗体、NAC+RU486 を投与した関節炎マウスでは、コントロールマウスと同程度まで減少した。

A



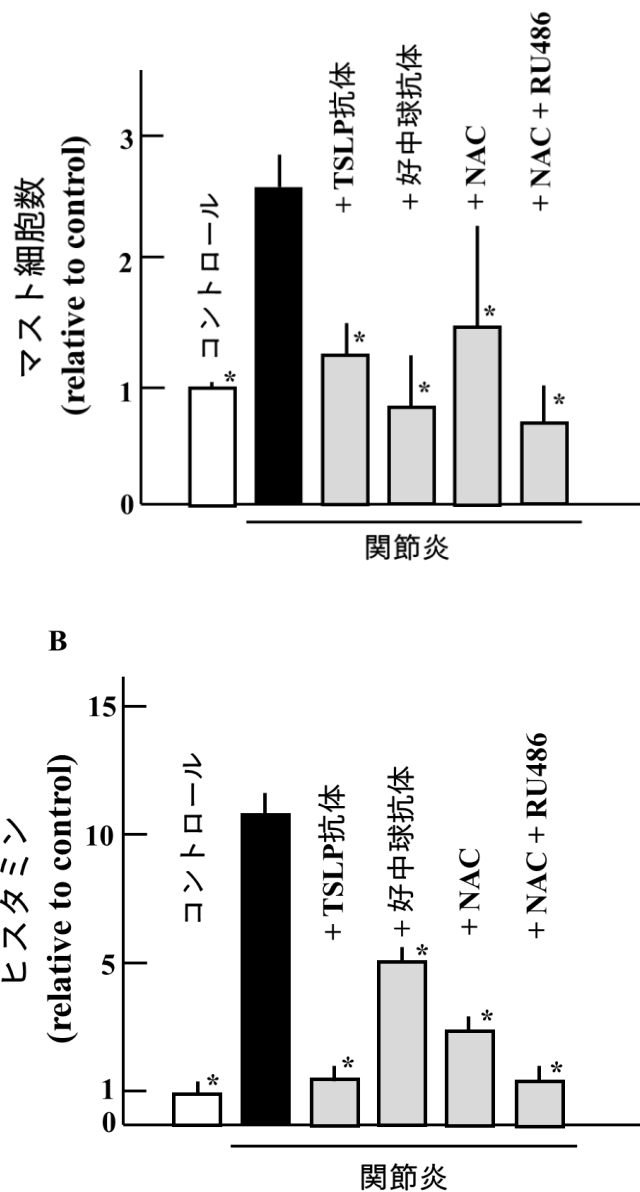


Fig. 13 各試薬投与による皮膚中マスト細胞数および血漿中ヒスタミンへの影響

A) 皮膚切片におけるマスト細胞をトルイジンブルー染色により検出し、計測した。B) 血漿中のヒスタミン濃度を ELISA により測定した。値はコントロールに対する比率とし、平均値±SD 値で示した。Student's *t*-test (n = 5)。* *p* < 0.05。

5. 血漿中のコルチコステロン濃度の解析

血漿中のグルココルチコイド(コルチコステロン)を ELISA により測定した。関節炎マウスにおけるコルチコステロンは、コントロールマウスより約 10 倍高かった。関節炎マウスと各試薬を投与した関節炎マウス間での差異はなかった (Fig. 14)。

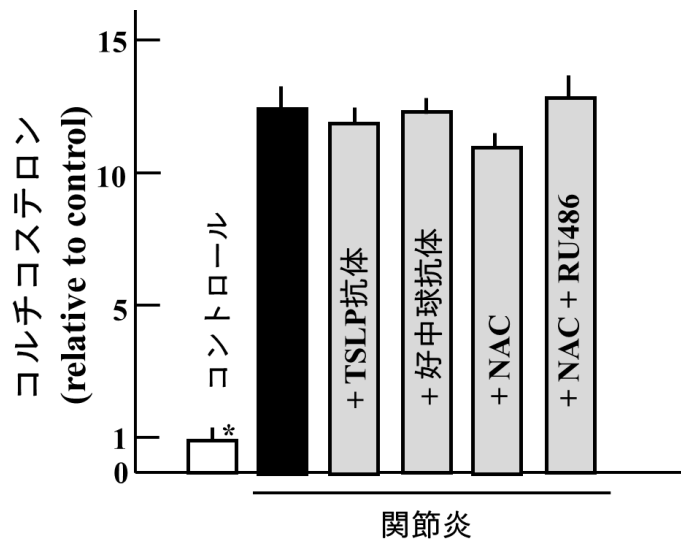


Fig. 14 各試薬投与による血漿中コルチコステロンへの影響

血漿中コルチコステロン濃度は ELISA により測定した。値はコントロールに対する比率とし、平均値±SD 値で示した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

第 4 節 考察

本章では、関節炎における乾燥皮膚症状において TSLP、好中球、ROS ならびにストレスホルモンの一種であるグルココルチコイドなど、それぞれの中和抗体や阻害剤の投与を行い、それらが、マスト細胞を刺激し乾燥皮膚を発現するかどうかを検討した。関節炎マウスでは、前章にて論述したマスト細胞やヒスタミンの増加に加え、TSLP、ROS、IL-6 およびコルチコステロン濃度が増加したため (Fig. 12-14)、これらの因子が乾燥皮膚を引き起こしていることが考えられた。

抗 TSLP 抗体の投与を行った結果、TEWL および皮膚の厚さは統計的有意差がなかったものの非投与の関節炎マウスに比べると減少していた (Fig. 11)。また、TSLP やマスト細胞数を減少させ、ヒスタミンも減少した (Fig. 13)。しかしながら、TEWL や皮膚の厚さはコントロールマウスまで戻らなかった。したがって、TSLP の他にもマスト細胞/ヒスタミン系に関わる因子があり、乾燥皮膚を引き起こしている可能性が考えられた。

抗好中球抗体を投与した関節炎マウスでは、TEWL が低下し、皮膚の厚さが減少していた (Fig. 11)。また、皮膚中マスト細胞、血中 TSLP、IL-6、ROS ならびにヒスタミンの増加が抑制されていた (Fig. 12, 13)。なかでも ROS に関しては、コントロールマウスより低い値となっていた。しかしながら、抗好中球抗体

の投与によって TSLP、IL-6 およびヒスタミンの値はコントロールマウスまでは抑えられなかった(Fig. 12, 13)。これらの結果から、好中球は ROS 産生によるマスト細胞数の増加により、関節炎における乾燥皮膚を発現させることが考えられた。

NAC を投与した関節炎マウスでは無投与の関節炎マウスと比較して、TEWL が低下し、皮膚の厚さが減少傾向であった(Fig. 11)。また皮膚中マスト細胞数や血中 TSLP、IL-6、ROS およびヒスタミンを減少させた(Fig. 12, 13)。これらの結果から、本章で用いたキットにて測定可能な ROS(H₂O₂、一酸化窒素、ペルオキシラジカル、ペルオキシ亜硝酸)は関節炎マウスにおける乾燥皮膚の誘導に関与していることが示された(Fig. 12C)。また、NAC を投与した関節炎マウスにおいても抗好中球抗体を投与した関節炎マウスと同様、IL-6、TSLP、マスト細胞およびヒスタミンはコントロールマウスの値まで抑えられなかった。したがって、ROS 以外の因子が TSLP およびマスト細胞に影響を及ぼしている可能性が考えられたため、既報にて TSLP を活性化することが報告されているグルココルチコイドに着目した。

NAC+RU486 を併用した関節炎マウスでは、TEWL および皮膚の厚さのいずれもコントロールマウスと同程度まで抑えられており、乾燥皮膚が抑えられていることが明らかとなった(Fig. 11)。また、皮膚中マスト細胞数や血中 TSLP、IL-6、ROS およびヒスタミンの値をコントロールマウスにコントロールマウスのレベルにまで抑えられた(Fig. 12, 13)。RU486 による相乗的な効果は、NAC 単独投与以上の ROS や TSLP の減少をもたらし、マスト細胞数を減少させることで、乾燥皮膚を改善したと考えられた。以上より、好中球や ROS に加えて、ACTH/glucocorticoid 系による TSLP を介したマスト細胞への影響が関節炎における乾燥皮膚の発現に関与することが示された。

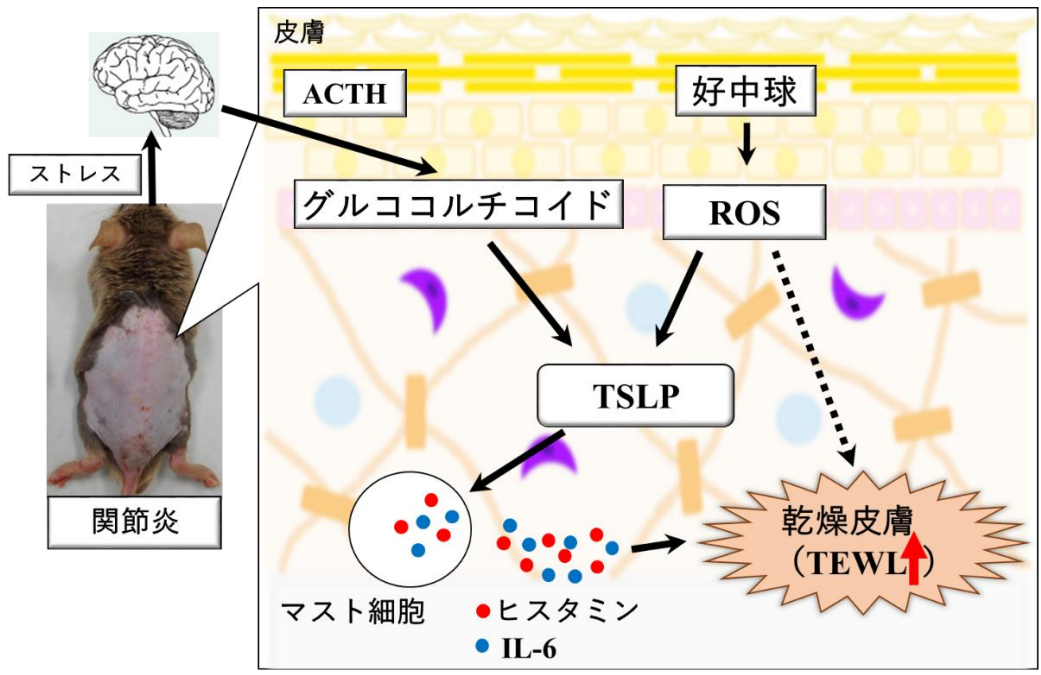


Fig. 15 マスト細胞を活性化する因子が関節炎における乾燥皮膚を誘導する反応

第 5 節 小括

本章では、関節炎マウスの乾燥皮膚発現におけるマスト細胞を活性化する因子として、TSLP や好中球、ROS、グルココルチコイドが関与することを明らかにした(Fig.15)。なかでも ROS およびグルココルチコイドの連関が TSLP を介してマスト細胞を活性化し、関節炎における乾燥皮膚の発現に関与することが示された。

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 1 節 緒言

第 2 章では、ROS やグルココルチコイドなどが TSLP を介し、マスト細胞活性化することで、関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚の発現に関与していることを見出した。前章まではマスト細胞を中心に検討を行ってきたが、TSLP から刺激を受ける免疫担当細胞は様々であり、マスト細胞以外の免疫担当細胞が関節炎における乾燥皮膚誘導に関わるかについては明らかではない。

樹状細胞は、ナイーブ T(Th0)細胞を T helper (Th) 2 細胞や Th17 細胞に分化させる免疫担当細胞の一種として、生体内に取り込まれた抗原の提示を行う他、T 細胞や B 細胞を分化させることで生体防御を担っている。TSLP がミエロイド樹状細胞を活性化し、OX40 ligand のような TNF スーパーファミリーや Chemokine (C-C motif) ligand 17 (CCL17) (TARC: Thymus and activation regulated chemokine)の発現を誘導することで、Th0 細胞を Th2 細胞に分化させることが報告されている [Ref. 48]。その際には Th2 細胞の特異的な転写因子である GATA3 が発現し、Th0 細胞からの Th2 細胞の分化を促進し、IL-4、IL-6 や TNF- α などのサイトカインの放出を誘導する [Ref. 49, 50]。炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- α は関節リウマチにおける関節の炎症に関わるだけでなく [Ref. 51]、アルコール性肝炎では乾燥皮膚を生じさせることや、掻痒感をもたらすなど皮膚への悪影響が報告されている [Ref. 4, 8]。

また、樹状細胞は Th1 細胞や Th2 細胞に加えて IL-17、IL-21 や IL-22 産生細胞として新たに発見された Th17 細胞を活性化する [Ref. 52, 53]。Orphan Nuclear Receptor ROR γ t (retinoid-related orphan receptor gamma t) は Th17 の特異的な転写因子として同定され、STAT3 と協調的な働きを行い、IL-23 受容体を誘導する。IL-23 受容体は ROR γ t の発現増加を介して、Th0 細胞の Th17 細胞への分化を促進する [Ref. 54]。IL-6 もまた、Janus kinase (JAK) 1 を介して STAT3 を刺激し、樹状細胞の Th0 細胞から Th17 細胞への分化作用を促進する [Ref. 55, 56]。Th17 細胞から放出される IL-17 は、アレルギー性皮膚炎や乾

癬に影響を及ぼすと報告されている [Ref. 47](Fig. 16)。

これらのことから、樹状細胞によって Th0 細胞から分化される Th2 細胞および Th17 細胞は関節炎により誘導される乾燥皮膚の発現に関与している可能性が考えられた。本章では、Th2 および Th17 のそれぞれの阻害剤を投与することで、それらが関節炎における乾燥皮膚に与える影響を検討した。

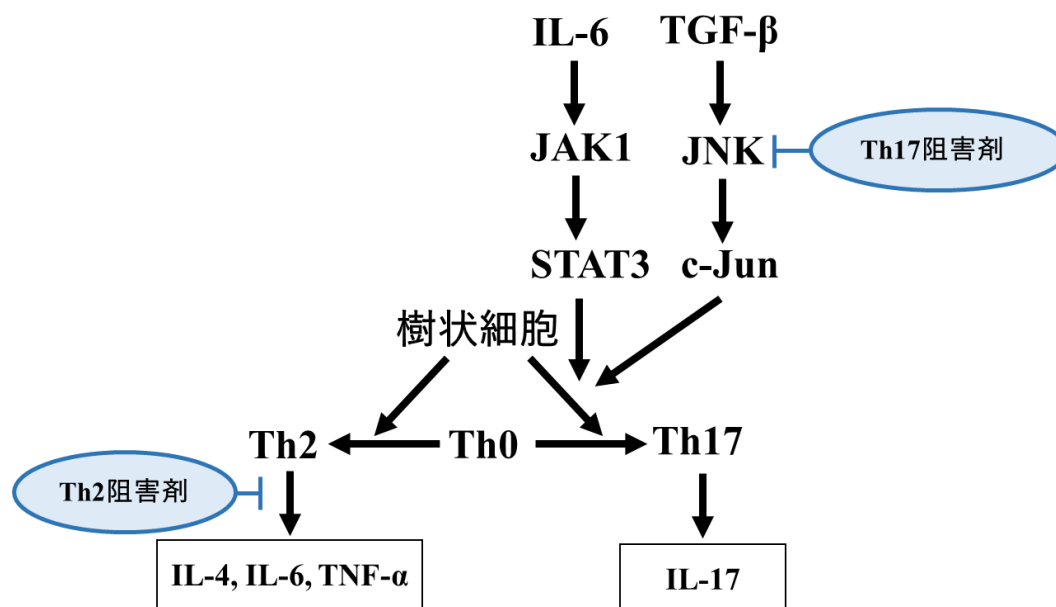


Fig. 16 樹状細胞から活性化される Th2 細胞および Th17 細胞のパスウェイおよび阻害剤の作用

Th2 阻害剤*: Th2 細胞からのサイトカイン放出抑制

Th17 阻害剤**: c-Jun N-terminal kinase (JNK)を阻害(Th0 細胞から Th17 細胞への分化阻害)

第 2 節 実験方法

1. 実験動物

前章までと同様、日本エスエルシー株式会社がコラーゲン誘導関節炎処置を実施した 10 週齢の DBA/1 J 雄性の関節炎マウスを購入した。関節炎処置を行わない DBA/1J マウスをコントロールマウス(n = 5)とした。購入したマウスはこれまでと同条件の飼育とし、いずれも 1 週間、馴化飼育した後、Th2 サイトカイン放出抑制剤(Th2 阻害剤) (IPD-1151T; TAIHO Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)

および Th17 細胞分化阻害剤(Th17 阻害剤) (SP600125; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)の投与を開始した[Ref. 57, 58]。各阻害剤の投与終了日に、前章と同様に背部の除毛により、皮膚を露出させた。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験委員会による研究計画書の承認を得た後に、総理府の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、ならびに「鈴鹿医療科学大学動物実験指針(承認番号:第 66 号)」に従って実施した。

2. Th2 阻害剤および Th17 阻害剤の投与

1 日 1 回 4 日間連続で、30 mg/kg の Th2 阻害剤を蒸留水に溶解させ、経口投与した。1 日 1 回 4 日間連続で、20 mg/kg の Th17 阻害剤を 0.1% の DMSO に溶解させ腹腔内投与した。

3. マウス後肢容積の測定

除毛処置の 24 時間後、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与にてマウスを麻酔し、Cosgrove らの方法に則り、前章と同様に後肢容積を測定した[Ref. 22]。

4. マウス背部皮膚の TEWL の測定

手順 3 終了後、マウスの TEWL の測定を行った。Tewameter®TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)を用いて、TEWL を測定した[Ref. 23]。測定値はこれまでと同法にて、算出した。

5. マウスの血液および皮膚組織の採取

手順 3 および 4 終了後、マウスの心臓から約 1 mL の血液を採取した。また、縦 1.5 cm×横 0.8 cm 四方の背部皮膚組織を採取し、 -80°C で凍結保存した。

6. 組織染色

採取した皮膚の組織の一部は免疫組織学的評価に用いるため、パラホルムアルデヒド溶液(4%, Wako)にて固定した。固定された皮膚組織を Tissue-Tek O.C.T. Compound を用いて凍結包埋し、5 μm の厚さでマイクロトームにて薄切を行った。薄切した切片は HE によって染色した後、光学顕微鏡にて組織学的評価を行い、無作為に抽出した 10 枚の画像における表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。また、皮膚中のマスト細胞はトルイジンブルー染色し、細胞数を Image J ソフトウェアを用いて計測した。無作為に 3 か所のエリアを抽出し、単位面積(mm^2)あたりのマスト細胞数の平均値を算出した。さらに、免疫染色により、皮膚切片の樹状細胞数を評価した。皮膚切片は樹状細胞の 1 次抗体として抗

CD11c 抗体(1:50, Becton Dickinson and Company, NJ, USA)を 4°C にて一晩反応させたのち、2 次抗体として fluorescein isothiocyanate-conjugated (1:30, Dako Cytomation, Glostrup Denmark)を室温にて 2 時間反応させた。免疫染色を実施した皮膚切片は蛍光顕微鏡にて観察し、Image J ソフトウェアを用い、無作為に 3 か所のエリアを抽出して陽性細胞数を計測し、平均値を算出した。

7. ウエスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析

採取した背部の皮膚組織 100 mg を剪刀で細かく刻んだのち、組織用懸濁試薬 (KURABO, Osaka, Japan)に浸漬し、氷上でハンドミキサー (POLYTRON PT 1200 CL; Kinematica AG, Littau, Switzerland)を用いて、ホモジナイズ(20,000 rpm, 60 秒)した。懸濁液を 8,000 ×g で 10 分間遠心分離したのち、上清を取り出し、解析に用いるまで -80°C で保存した。上清サンプルを溶解後、Lowry 法により総タンパク質量 5 µg となるようとなるよう lithium dodecyl sulfate (LDS) sample buffer および sample reducing agent に懸濁させて調整し、煮沸後、4-12% BIS-TRIS Bolt gel を用いて 200V の定電圧で 18 分間電気泳動を行った。電気泳動されたタンパク質は iBlot 2 Dry blotting system を用いて、25V の定電圧を 6 分間かけてニトロセルロース膜に転写し、4°C で一晩、5%スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後、25°C で 1 時間、1 次抗体として抗 CD11c 抗体(1:1000, Becton Dickinson)、抗 RORγt 抗体(1:1000, Bioryt, Cambridgeshire, UK)、抗 GATA3 抗体(1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、β-アクチン(1:5,000, Sigma-Aldrich)で反応させたのち、horseradish peroxidase で標識された 2 次抗体で処理を行った。免疫複合体は化学発光試薬イムノスターゼータ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 処理したのちに、lumino-image analyzer (LAS-4000, FUJIFILM)を用いて検出した。

8. 血中分子マーカーの濃度測定

心臓から採取した血液サンプルを 4°C、3,000 ×g で 10 分間遠心分離し、上清部分(血漿)を測定に用いた。血中の TSLP、IL-6、TNF-α および IL-17 はそれぞれ ELISA kit (IL-6, Biolegend; TSLP, TNF-α, and IL-17, R&D Systems)のプロトコルに従い、マイクロプレートリーダーを用い、405 nm の波長で検出した。

9. 統計解析

全てのデータは平均値±SD 値で示した。2 群間の比較には Student's *t*-test、多群間の比較には Tukey's test を用いた。危険率が 5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。統計解析は IBM SPSS Statistics24 にて実施した。

第 3 節 結果

1. 皮膚中の樹状細胞数

樹状細胞が関節炎における乾燥皮膚発現への関与を検証するため、樹状細胞に発現する特異的な分子である CD11c を指標として、免疫染色法により皮膚中の樹状細胞の発現を確認した。コントロールマウスと比較して、関節炎マウスにおける樹状細胞数の増加が確認された(Fig. 17A)。さらに、ウエスタンブロッティングによる樹状細胞数の定量化を行った結果、皮膚中の CD11c 分子の発現はコントロールマウスと比較して関節炎マウスにおいて約 2 倍増加しており、関節炎マウスの皮膚における樹状細胞数の増加が裏付けられた(Fig. 17B)。

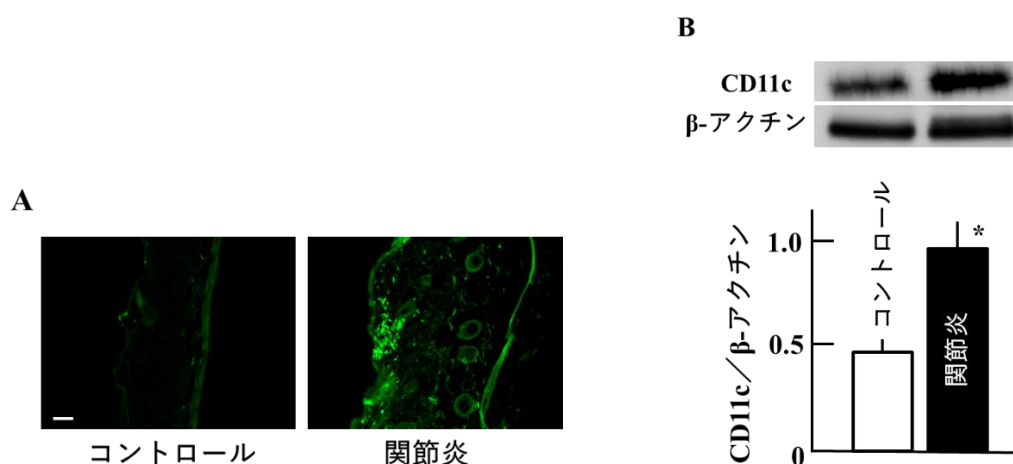


Fig. 17 皮膚における樹状細胞の発現

A) 免疫染色法により、CD11c に基づいた樹状細胞の発現を確認した。Scale bar = 100 μm 。B) ウエスタンブロッティングにて、CD11c の発現を定量化した。値は β -actin によって標準化し、平均値 \pm SD 値で示した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

2. GATA3 および ROR γ t 転写因子の発現

Th0 細胞から Th2 細胞への分化に関わる転写因子 GATA3 や Th17 細胞への分化に関わる転写因子 ROR γ t の発現をウエスタンブロッティングにより定量化した。関節炎マウスではコントロールマウスと比較して、GATA3 および ROR γ t の発現量は約 2 倍から 3 倍増加した(Fig. 18)。

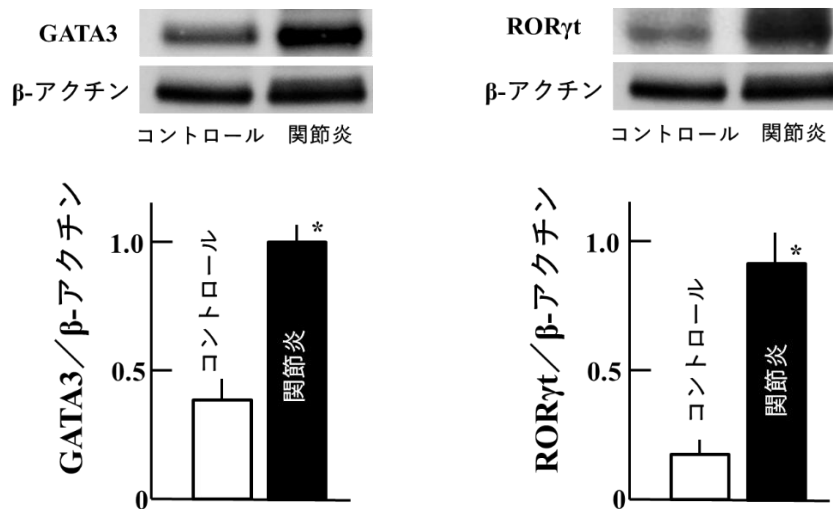


Fig. 18 皮膚中の GATA3 (Th2 marker) および RORγt (Th17 marker) の発現量

ウエスタンブロッティングにて、皮膚における GATA3 および RORγt の発現を検出し、数値化した。値は β-actin によって標準化し、平均値±SD 値で示した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

3. 阻害剤投与による後肢容積の比較

前章までと同様に、関節の炎症状態の指標として、マウスの後肢容積を測定した。関節炎マウスではコントロールマウスと比較して、後肢容積は約 2 倍増加した。Th2 阻害剤を投与した関節炎マウスの後肢容積はいずれの群とも統計的有意差が無かった。また、Th17 阻害剤を投与した関節炎マウスの後肢容積は、無投与の関節炎マウスとの差異はなかった (Fig. 19)。

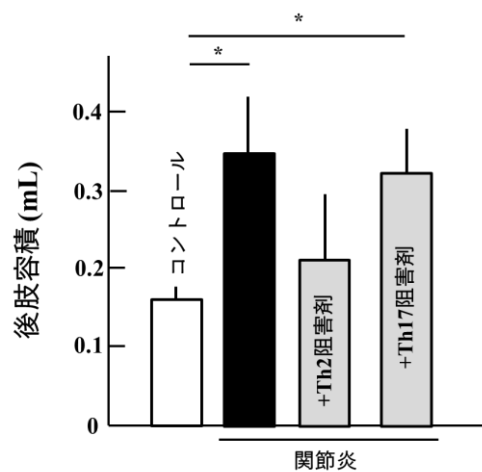
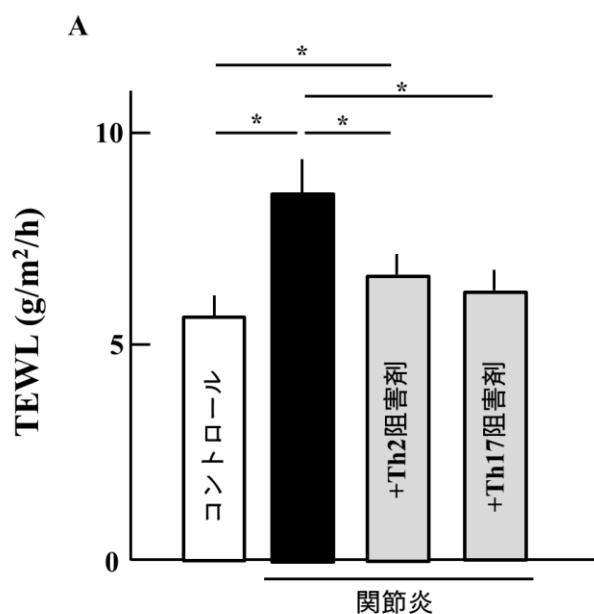


Fig. 19 Th2 阻害剤および Th17 阻害剤の投与による後肢容積への影響

後肢を蒸留水にて満たしたビーカーに浸けることで容積を測定した。数値は平均値±SD 値で示した。Tukey's test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

4. 皮膚状態の変化

乾燥皮膚を評価するために背部皮膚における TEWL の測定および HE 染色した皮膚の厚さの計測を実施した。関節炎マウスではコントロールに比べて TEWL が約 1.5 倍上昇していたが、Th2 阻害剤および Th17 阻害剤によって、コントロールマウスと同程度まで抑えられた(Fig. 20A)。関節炎マウスではコントロールマウスに比べて皮膚が約 1.5 倍厚くなっており、Th17 阻害剤によって、その厚さはコントロールマウスと同程度まで抑えられていた。一方で、Th2 阻害剤の投与では、皮膚がさらに厚くなっていた(Fig. 20B)。



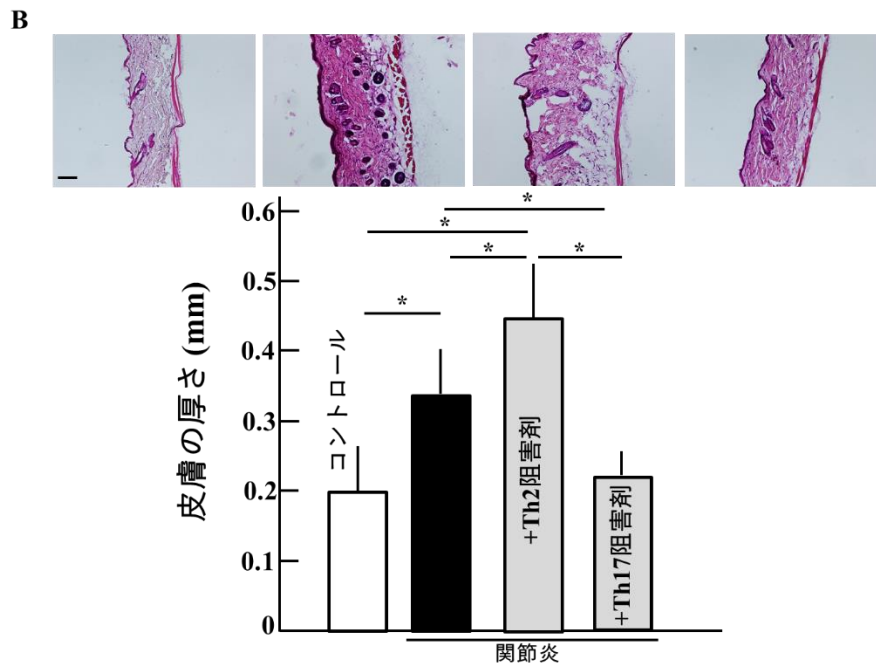


Fig. 20 Th2 阻害剤および Th17 阻害剤の投与による皮膚への影響

A) 除毛処置翌日の背部皮膚における TEWL を測定した。B) 皮膚切片を HE 染色した後、顕微鏡にて観察した。無作為に抽出した画像における表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。Scale bar = 100 μm 。測定値は平均値 \pm SD 値として示した。Tukey's test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。

5. 血中の TSLP の濃度

TSLP はマスト細胞や樹状細胞の活性化に関わる因子であり、第 2 章では関節炎マウスの乾燥皮膚発現におけるマスト細胞を刺激する因子として同定した。本章では、Th2 および Th17 阻害剤投与が TSLP に与える影響を確認する目的で、血中の TSLP を測定した。コントロールマウスと比較して、関節炎マウスにおける TSLP は約 10 倍増加していたが、Th2 阻害剤および Th17 阻害剤を投与しても、無投与の関節炎マウスとの差異はなかった(Fig. 21)。

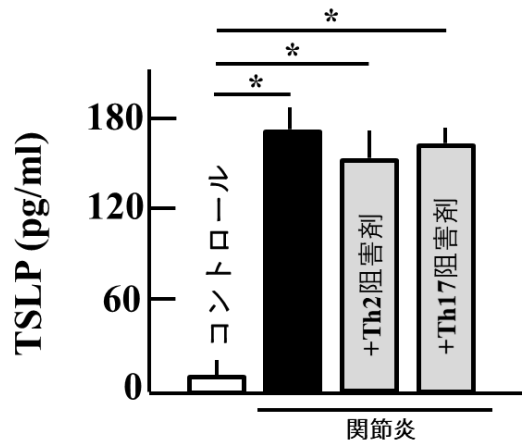


Fig. 21 Th2 阻害剤および Th17 阻害剤投与による TSLP への影響

血漿中の TSLP を ELISA により測定した。測定値は平均値±SD 値として示した。Tukey's test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

6. 皮膚中のマスト細胞数

第 1 章で、関節炎マウスの皮膚ではマスト細胞が増加しており、それが乾燥皮膚を引き起こす要因であることを見出した。本章では、Th2 細胞および Th17 細胞のマスト細胞との関連を調べるために、トルイジンブルーにて皮膚を染色し、マスト細胞数を計測した。関節炎マウスではコントロールマウスと比較して、マスト細胞数は約 3 倍増加していた。Th17 阻害剤によりコントロールと同程度まで抑えられたが、Th2 阻害剤では関節炎マウスとの差異はなかった (Fig. 22)。

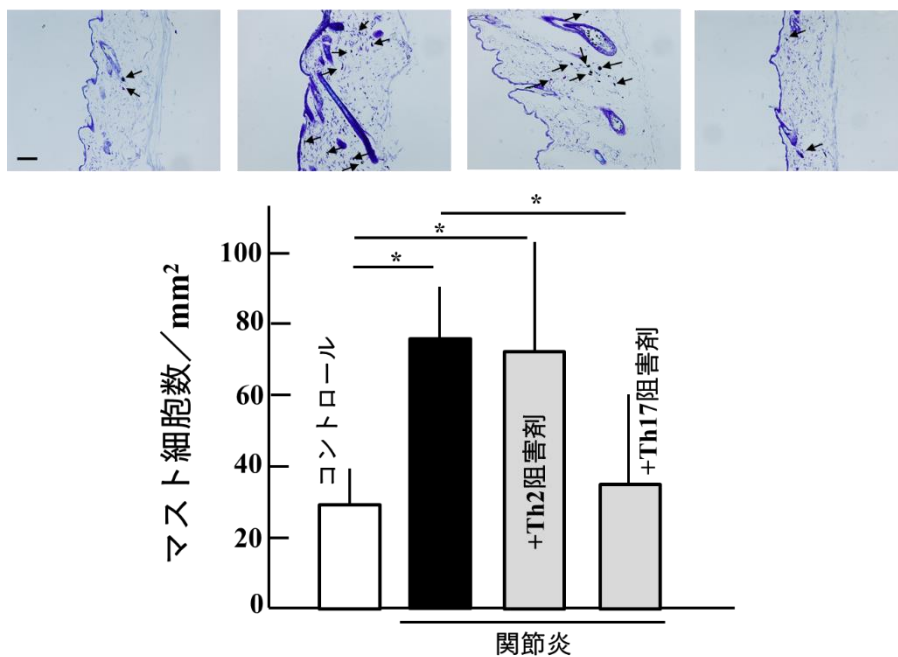
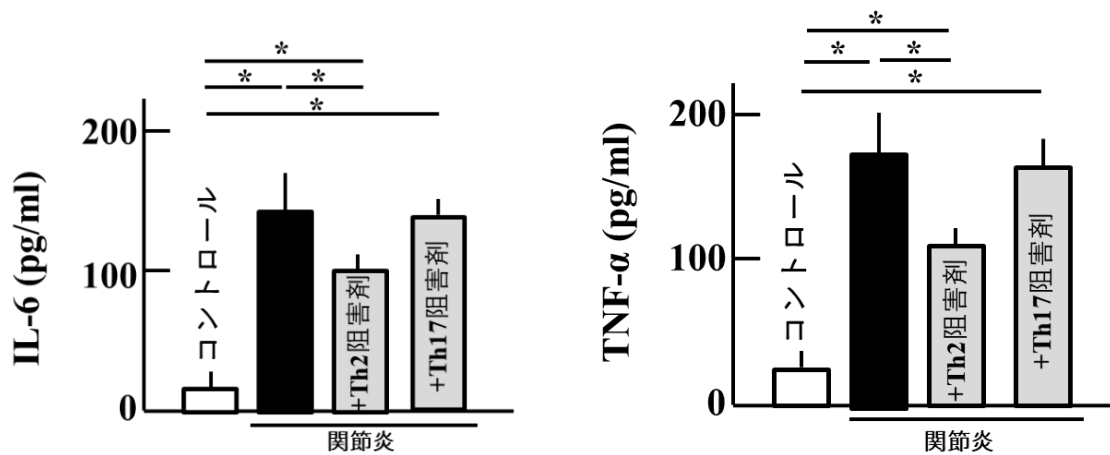


Fig. 22 Th2 阻害剤および Th17 阻害剤投与による皮膚中マスト細胞への影響

皮膚切片におけるマスト細胞をトリイズンブルー染色により検出した後、細胞数を計測した。Scale bar = 100 μ m。測定値は平均値 \pm SD 値として示した。Tukey's test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

7. 血中の IL-6、TNF- α 、IL-17 濃度

関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に Th2 細胞および Th17 細胞の関与が示唆されたので、マスト細胞や Th2 細胞から放出される炎症性サイトカインである IL-6、TNF- α の血中濃度を測定した。また、Th17 細胞から放出され、アトピー性皮膚炎のような乾燥皮膚を生じる疾患の発現に関わる IL-17 について [Ref. 56]、血中の濃度を測定した。IL-6 および TNF- α は関節炎マウスではコントロールマウスに比べて、それぞれ約 7 倍から 12 倍増加していた。Th2 阻害剤の投与により IL-6、TNF- α とともに減少したが、コントロールマウスの濃度までは抑えられなかった。また、IL-6 および TNF- α は Th17 阻害剤の投与では変化しなかった。IL-17 は Th2 阻害剤の投与により減少したが、コントロールマウスの濃度までは抑えられなかった。IL-17 は Th17 阻害剤の投与により顕著に減少し、コントロールマウスと同程度であった (Fig. 23)。



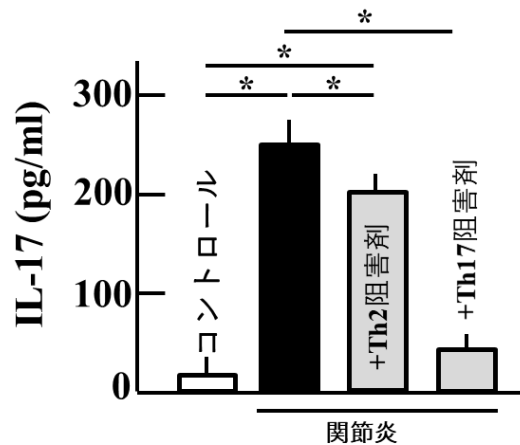


Fig. 23 Th2 阻害剤および Th17 阻害剤投与による血漿中 IL-6、TNF- α および IL-17 への影響

血漿中 IL-6、TNF- α および IL-17 は ELISA により計測した。測定値は平均値 \pm SD 値として示した。Tukey's test (n = 5)。* $p < 0.05$ 。

第 4 節 考察

本章において、関節炎マウスでは皮膚中の樹状細胞の発現がコントロールマウスより増加した(Fig. 17)。また、関節炎マウスにおける皮膚では、Th2 細胞の転写因子である GATA3 および Th17 細胞の転写因子である ROR γ t が増加していた(Fig. 18)。これらのことから、樹状細胞により分化が促進される Th2 細胞と Th17 細胞が乾燥皮膚の発現に関わっている可能性があると考えられた。

コントロールマウスと比較して、関節炎マウスで上昇していた TSLP 濃度は、Th2 および Th17 阻害剤を投与しても変化は見られなかったため、Th2 細胞および Th17 細胞は TSLP より下流に存在する免疫担当細胞であることが確認された(Fig. 21)。

炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- α は関節リウマチにおける関節の炎症を引き起こす要因であることに加え、皮膚中のコラーゲンの低下を誘導し、TEWL の上昇を招くことが報告されている [Ref. 8, 51]。本章において、Th2 阻害剤を投与した関節炎マウスでも、TEWL が無投与の関節炎マウスと比較して低下していた(Fig. 20A)。また、IL-6 および TNF- α が低下していた(Fig. 23)。これらのことから、IL-6 および TNF- α の量を低下させることが皮膚におけるコラーゲンの低下を抑え、乾燥皮膚を改善する可能性が考えられた。IL-6 が JAK1 を介して STAT3 を刺激し、樹状細胞による Th17 細胞の分化を促進すると報告

されているため[Ref. 56, 59]、Th2 阻害剤の投与により、Th2 細胞からの IL-6 放出が減少し、Th0 細胞から Th17 細胞の分化が抑制されたため、IL-17 が減少したことも TEWL を減少させた要因であると考えられた。しかしながら、Th2 阻害剤の投与では、Th17 阻害剤を投与した場合ほど IL-17 は減少しなかった (Fig. 23)。この原因としては、Th2 阻害剤を投与してもマスト細胞数の増加が抑制されなかったため、マスト細胞より分泌される IL-6 が Th17 細胞への分化を誘導することが考えられた。

TEWL が上昇する代表的な疾患である乾癬の発症原因である Th17 細胞は、樹状細胞により分化が活性化される [Ref. 54]。ROR γ t は Th17 の特異的な転写因子として同定されており、STAT3 と協調的な働きを行い、IL-23 を誘導する。IL-23 は ROR γ t の発現増加を介して、Th17 細胞への分化や IL-17 の放出を促進する [Ref. 54, 55]。IL-6 もまた、樹状細胞による Th17 細胞の分化を促進する [Ref. 56, 59]。本章において、Th17 阻害剤を投与した関節炎マウスでは、TEWL が低下しており、血中 IL-17 や皮膚中マスト細胞数が減少した (Fig. 20A, 22, 23)。Th17 細胞から放出される IL-17 はマスト細胞の幹細胞の発現を促進することが報告されているため [Ref. 60]、Th17 阻害剤の投与はマスト細胞数を減少させると考えられた。Th17 阻害剤を投与しても血中 IL-6 および TNF- α は変化せず、この原因は Th17 阻害剤の投与により、Th2 細胞を抑えることはできなかったからだと考えられる。

以上のことから、樹状細胞から分化を促される細胞といえども、Th2 細胞と Th17 細胞では乾燥皮膚の発現における誘導メカニズムが異なることが明らかとなった。具体的には、Th2 細胞は IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインを介したメカニズムであり、Th17 細胞は IL-17 およびマスト細胞を介したメカニズムであると考えられた。

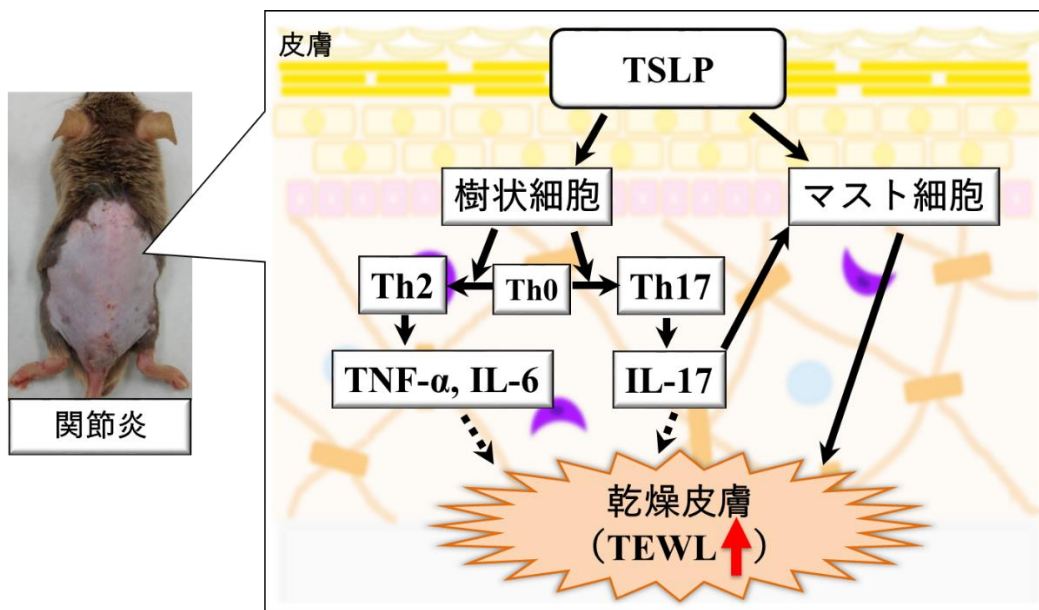


Fig. 24 樹状細胞の刺激により Th0 細胞から分化される Th2 細胞および Th17 細胞の関節炎マウスにおける乾燥皮膚発現に関わる模式図

第 5 節 小括

本章の結果より、関節炎における乾燥皮膚の発現に樹状細胞により Th0 細胞から分化される Th2 細胞および Th17 細胞が関与しており、それらは異なるメカニズムによって誘導することが示された。具体的には、Th2 細胞は、IL-6 および TNF- α などの炎症性サイトカインの増加を介して誘導するが、Th17 細胞は、IL-17 の増加およびマスト細胞の活性化によって誘導すると考えられた (Fig. 24)。

結論

本論文では、超高齢社会の影響により増加の傾向にある関節リウマチ患者で症例報告された乾燥皮膚に着目した。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、分子レベルの誘導メカニズムの詳細は明らかではない。そこで、関節リウマチを模倣したコラーゲン誘導関節炎モデルマウスを用いて、消化器疾患で起こる乾燥皮膚の誘導メカニズムに基づき、乾燥皮膚発現の誘導に関わるメカニズムの解明を試みた。

第1章では、関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚発現の再現性について確認した。そのメカニズムとしては、関節炎によりマスト細胞が増加し、そこからMMP-1やヒスタミンが増加することで乾燥皮膚を発現することが明らかとなった(Fig. 8)。第2章では、TSLPや好中球、ROS、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を誘導することが明らかとなった(Fig. 15)。第3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細胞によって引き起こされる乾燥皮膚は、IL-6およびTNF- α 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明らかとなった(Fig. 24)。以上の結果より、関節炎マウスにおいても乾燥皮膚の発現が誘導され、その誘導のメカニズムとしては活性酸素やグルココルチコイド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。これら関節炎における乾燥皮膚の誘導メカニズムに関わる因子を抑えることで、関節リウマチ患者で報告され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。

以上のことから、マスト細胞が乾燥皮膚の誘導に関わる点においては、消化器疾患モデルマウスにおける乾燥皮膚発現と類似するが、TSLPやグルココルチコイド、樹状細胞などが関わる点については、関節炎特有の乾燥皮膚の誘導メカニズムであると考えられた。また、疾患によって乾燥皮膚の誘導メカニズムが異なる可能性が提示されたため、本論文は、疾患ごとの適正な乾燥皮膚対策を講じるための有益な情報となり得るものとする。

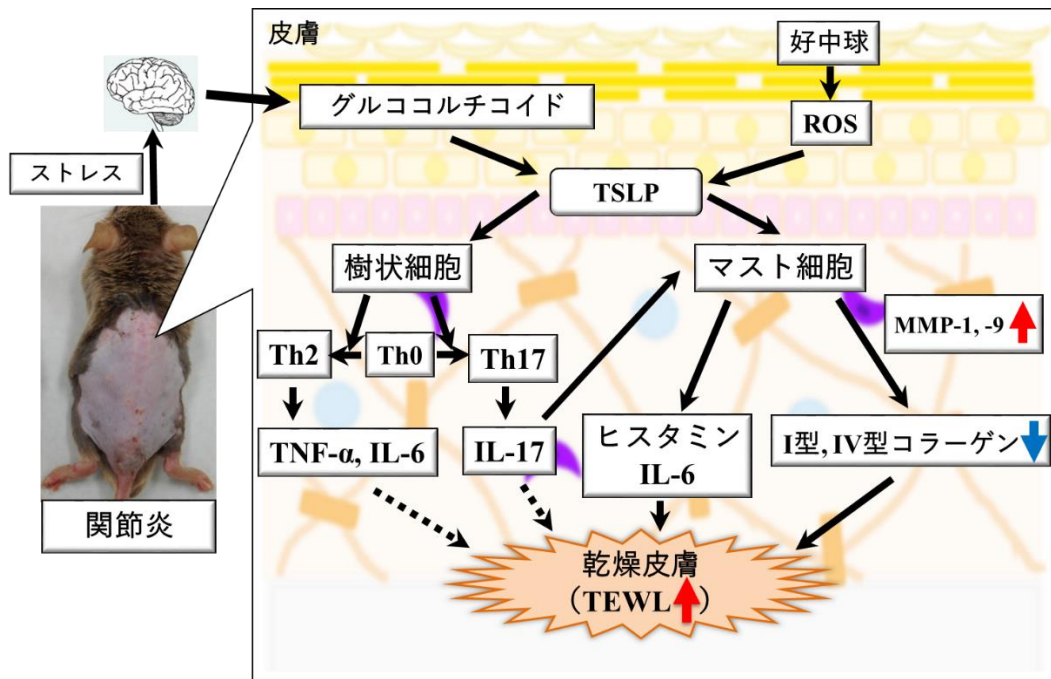


Fig. 25 関節炎マウスの乾燥皮膚発現における TSLP を介した誘導メカニズム

引用文献

1. Yokota M, Shimizu K, Kyotani D, Yahagi S, Hashimoto S, Masaki H. 2014. *Exp Dermatol* 23 Suppl 1: 27-31
2. Kim YM, Jung HJ, Choi JS, Nam TJ. 2016. *Int J Mol Med* 37: 92-98
3. Miyamoto T, Nojima H, Shinkado T, Nakahashi T, Kuraishi Y. 2002. *Jpn J Pharmacol* 88: 285-292
4. Yosipovitch G, Papoiu AD. 2008. *Curr Allergy Asthma Rep* 8: 306-311
5. Ayres S, Jr. 1964. *JAMA* 189: 1003-1007
6. Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. 2014. *Exp Dermatol* 23: 659-663
7. Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. 2015. *Exp Dermatol* 24: 779-784
8. Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. 2016. *Cutan Ocul Toxicol* 35: 194-203
9. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. 1996. *Cell* 85: 307-310
10. Lora V, Cerroni L, Cota C. 2018. *G Ital Dermatol Venereol* 153: 243-255
11. Ghosh SK, Bandyopadhyay D, Biswas SK, Darung I. 2017. *Indian J Dermatol* 62: 411-417
12. 安倍 千之. 1991. *炎症* 11: 551-558
13. Trentham DR. 1977. *Biochem Soc Trans* 5: 5-22
14. 青野 浩之, 笹野 稔. 2018. *臨床リウマチ* 30: 28-37
15. Rock K, Joosse SA, Muller J, Heinisch N, Fuchs N, et al. 2016. *Sci Rep* 6: 30482
16. Malone DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE, Metcalfe DD. 1986. *Arthritis Rheum* 29: 956-963
17. Okayama Y, Hageman DD, Metcalfe DD. 2001. *J Immunol* 166: 4705-4712
18. Brauchle M, Gluck D, Di Padova F, Han J, Gram H. 2000. *Exp Cell Res* 258: 135-144
19. 岡山 吉道, 藤澤 大輔, 山田 賢鎬, 権 寧博, 橋本 修, 浅野 正岳, 斎藤 修, 徳橋 泰明, 照井 正. 2012. *日本大学医学部総合医学研究所紀要* 2:15-27.
20. Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, Veroni C, Aloisi F, Shoenfeld Y. 2016. *Ann Ist Super Sanita* 52: 205-212
21. Valent P. 2013. *Allergy* 68: 417-424
22. Cosgrove KA, Alon G, Bell SF, Fischer SR, Fowler NR, et al. 1992. *Phys*

Ther 72: 227-233

23. Barel AO, Clarys P. 1995. *Skin Pharmacol* 8: 186-195
24. Park G, Kim TM, Kim JH, Oh MS. 2014. *Environ Toxicol Pharmacol* 38: 305-315
25. Nakazawa S, Sakanaka M, Furuta K, Natsuhara M, Takano H, et al. 2014. *Eur J Immunol* 44: 204-214
26. Amano T, Takeda T, Yano H, Tamura T. 2007. *Br J Dermatol* 156: 906-912
27. He R, Oyoshi MK, Garibyan L, Kumar L, Ziegler SF, Geha RS. 2008. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11875-11880
28. Ziegler SF, Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H. 2013. *Adv Pharmacol* 66: 129-155
29. Kim S. 2014. *Immune Netw* 14: 123-127
30. Weissmann G, Korchak H. 1984. *Inflammation* 8 Suppl: S3-14
31. Lear JT, Atherton MT, Byrne JP. 1997. *Postgrad Med J* 73: 65-68
32. Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. 2008. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 7: 195-202
33. Benedetti S, Nuvoli B, Catalani S, Galati R. 2015. *Oncotarget* 6: 16848-16865
34. Tang H, Cao W, Kasturi SP, Ravindran R, Nakaya HI, et al. 2010. *Nat Immunol* 11: 608-617
35. Shen S, Li J, You H, Wu Z, Wu Y, et al. 2017. *Food Chem Toxicol* 99: 60-69
36. Choi EH, Demerjian M, Crumrine D, Brown BE, Mauro T, et al. 2006. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1657-1662
37. Shibata M, Katsuyama M, Onodera T, Ehama R, Hosoi J, Tagami H. 2009. *J Invest Dermatol* 129: 375-382
38. Mizuno K, Morizane S, Takiguchi T, Iwatsuki K. 2015. *J Dermatol Sci* 80: 45-53
39. You H, Li R, Wei C, Chen S, Mao L, et al. 2016. *PLoS One* 11: e0159479
40. Zhou J, Pham L, Zhang N, He S, Gamulescu MA, et al. 2005. *Mol Vis* 11: 414-424
41. Hiramoto K, Yamate Y. 2016. *Photochem Photobiol* 92: 180-186
42. Hiramoto K, Yamate Y, Sato EF. 2016. *Photochem Photobiol* 92: 728-734
43. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, et al. 2002. *J Clin Invest* 109: 1351-1359
44. Kohda F, Koga T, Uchi H, Urabe K, Furue M. 2002. *J Dermatol Sci* 28: 34-41

45. Kimura A, Kishimoto T. 2010. *Eur J Immunol* 40: 1830-1835
46. Kennedy CL, Najdovska M, Jones GW, McLeod L, Hughes NR, et al. 2011. *J Pathol* 225: 255-264
47. Loures FV, Araujo EF, Feriotti C, Bazan SB, Calich VL. 2015. *Front Microbiol* 6: 261
48. Lay MK, Cespedes PF, Palavecino CE, Leon MA, Diaz RA, et al. 2015. *Eur J Immunol* 45: 1680-1695
49. Zheng W, Flavell RA. 1997. *Cell* 89: 587-596
50. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. 2002. *J Clin Invest* 109: 431-435
51. Abdollahzad H, Aghdashi MA, Asghari Jafarabadi M, Alipour B. 2015. *Arch Med Res* 46: 527-533
52. Ogawa H, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. 2012. *Biochem Biophys Res Commun* 420: 114-118
53. Solus JF, Chung CP, Oeser A, Li C, Rho YH, et al. 2015. *Clin Rheumatol* 34: 1375-1382
54. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, et al. 2006. *Cell* 126: 1121-1133
55. Maeda S, Hayami Y, Naniwa T, Ueda R. 2012. *Int J Rheumatol* 2012: 539683
56. Lin XL, Lv JJ, Lv J, Di CX, Zhang YJ, et al. 2017. *Allergy* 72: 1972-1987
57. Yamaya H, Basaki Y, Togawa M, Kojima M, Kiniwa M, Matsuura N. 1995. *Life Sci* 56: 1647-1654
58. Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, et al. 2011. *Immunity* 34: 741-754
59. Murray PJ. 2007. *J Immunol* 178: 2623-2629
60. Cho KA, Park M, Kim YH, Woo SY. 2017. *Biochem Biophys Res Commun* 487: 856-861

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御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。

本論文の審査過程において、数々のご助言と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 中山浩伸 教授、飯田靖彦 教授、川西正祐 教授、佐藤英介 教授、ならびに田口博明 教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、研究遂行に対する御指導、御激励を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 病態・治療学分野 平本恵一 助教に深謝の意を表します。

研究生活において様々のご助力をいただき、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、事務面で大変お世話になりました大学院担当 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に感謝いたします。

最後に、長きにわたる学生生活において、深い愛情と理解をもって応援し、支え続けてくれた家族に心から感謝いたします。

Abstract

Mechanistic analysis of dry skin induced by arthritis

Introduction

The skin is the largest organ of the human body, and comprises primarily of the epidermis, dermis, and subcutaneous tissue. The outermost layer of the skin is stratum corneum, which forms the barrier between the body and the external environment. Additional skin components include collagen, hyaluronic acid, and natural moisturizing factors, which aid the prevention of water loss from the body, thereby supporting life functions.

Dry skin, caused by suppression of the skin barrier function, can trigger pruritus and cause sleep disorders or a secondary sickness (i.e. skin infection). Previous studies had shown the induction of dry skin in model animals suffering from inflammatory bowel disease, such as inflammation of the small intestine and colitis [1, 2]. The current study focused on dry skin associated with rheumatoid arthritis (RA), which is well known as an inflammatory disease caused in parts other than the digestive organs. RA is a systemic inflammatory disease, predominantly characterized by progressive joint destruction and continuing arthritis. RA can, however, adversely affect other parts of the body as well, such as the blood vessels, lungs, kidneys, and subcutaneous tissues. Clinical studies have shown the occurrence of dry skin in patients with RA [3, 4]. However, till date, investigation of the dry skin-induction mechanism in RA has not been performed. Results of this study indicated the induction of dry skin by arthritis (RA mimic) in mice, and revealed its underlying mechanisms.

Chapter 1: Role of mast cells in the induction of dry skin in a mouse model of rheumatoid arthritis

In this study, specific pathogen-free, 10-week-old DBA/1J mice were used. Mice were divided into two groups (n = 5 per group), namely the control and arthritis-induced model group. Transepidermal water loss (TEWL), as an indicator of dry skin, was assessed on the dorsal skin of each mouse. Results demonstrated mice with arthritis to have higher TEWL levels than the control mice. In the former, the expression of MMP-1 and MMP-9 was

increased while that of type I and IV collagens was decreased compared to that in the control. Additionally, both the number of mast cells in skin and plasma levels of histamine were increased in the mice with arthritis. Administration of anti-c-kit antibody (inhibitor of mast cell proliferation) decreased the number of mast cells and concentration of histamine in mice with arthritis, subsequently improving the dry skin. Thus, these results suggest that increasing mast cells would induce dry skin in mice with arthritis.

Chapter 2: The influence of reactive oxygen species and glucocorticoids on dry skin in an arthritis mouse model

In this chapter, we explored the factors that activate mast cells of dry skin in arthritis. Based on previous studies, we selected thymic stromal lymphopoietin (TSLP), neutrophils, and reactive oxygen species (ROS), located upstream of TSLP, as candidates [5]. Administration of anti-TSLP antibody, anti-neutrophil antibody, and ROS scavenger (*N*-acetylcysteine: NAC) ameliorated dry skin by decreasing both the number of mast cells and concentration of histamine. When glucocorticoid-receptor inhibitor was administered in addition to NAC, dry skin was further ameliorated, reducing the number of mast cells to a greater extent, since TSLP is also activated by the stress hormone (glucocorticoid) [6]. These results thus suggest that ROS and glucocorticoids would induce dry skin in mice with arthritis via the stimulation of mast cells.

Chapter 3: Th2 and Th17 induce dry skin in a mouse model of arthritis

In this chapter, we focused on dendritic cell as an immunocompetent cell stimulated by TSLP, other than mast cells. We hypothesized that cytokines released from Th2 and Th17 cells that had been activated by dendritic cells could contribute to the induction of dry skin in mice with induced arthritis. Results showed dry skin to be ameliorated by the inhibition of Th2 and/or Th17 function. Consistently, inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , were decreased by the administration of a Th2 inhibitor and IL-17, and activation of mast cells was suppressed by administration of a Th17 inhibitor, hence indicating that activation of Th2 and Th17 cells by dendritic cells would contribute to induce dry skin by arthritis with distinct pathways.

Conclusion

In conclusion, it was revealed that dry skin was induced in mice with arthritis, the induction mechanism being related to mast cells and dendritic cells via TSLP activated by ROS and glucocorticoids. We, therefore, suggest that suppressing these factors would alleviate dry skin symptoms in patients with RA.

References

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