

博士論文(2023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 ほりかわ つねき堀川 恒樹

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博(薬)甲第11号

学位授与の日付 令和5年3月10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「糖尿病モデルマウスにおける保湿能とダパグリフロジンによる皮膚障害発現に関する研究」

論文審査委員(主査)教授 藤川 隆彦 博士(医学)

(副査)教授 大倉 一人 薬学博士、博士(工学)

教授 郡山 恵樹 博士(医学)、博士(薬学)

准教授 榎屋 友幸 博士(医学)

准教授 坂 晋 博士(薬学)

論文要旨

氏名	堀川 恒樹
----	-------

論文の題名

糖尿病モデルマウスにおける保湿能とダパグリフロジンによる皮膚障害発現に関する研究

論文の要旨

当該研究室では、これまで小腸炎、大腸炎、関節炎など炎症性疾患による乾燥皮膚発現機構の解明を、モデルマウスを用いて行ってきた¹⁾³⁾。現在、糖尿病における乾燥皮膚の研究は、高血糖による脱水や汗腺の低下によるものが多く、皮膚バリア機能を維持するために必要なコラーゲンや天然保湿因子のような、生化学的因子への影響についてはほとんど検討されていないことから、本研究では乾燥皮膚を発現するコラーゲンとヒアルロン酸への誘導機構の解明を目的とした。皮膚は、人体最大の臓器であり、外界からの温度や湿度、異物などの侵入を防ぎながら経表皮水分喪失量 (TEWL) や角層水分量を調節することで生体の恒常性を維持する役割を担っている。皮膚は表皮、真皮、皮下組織から構成されている。表皮では、最外層の角層が角化細胞のターンオーバーによって皮膚バリア機能を維持している。何かの要因でこの皮膚バリア機能が低下すると乾燥皮膚の発現を招くことになる。本研究では、慢性炎症の一つである糖尿病における乾燥皮膚発現機構について、1型糖尿病と2型糖尿病 (非肥満型と肥満型) のモデルマウスで検討を行った。次に、2014年に薬価収載された新規糖尿病治療薬のナトリウム-グルコース共輸送体 (SGLT)-2 阻害剤のダパグリフロジンは、発売後服用した患者から皮膚障害の発現が報告されたことから、日本糖尿病学会が「SGLT-2 阻害薬の適正使用に関する Recommendation」を示し重篤な場合には、投与を中止する旨が記載された。このダパグリフロジンを2型糖尿病モデルマウスに投与することで乾燥皮膚発現機構の解明を行った。

第1章 1型糖尿病および2型糖尿病モデルマウスにおける乾燥皮膚発現機序の違いについて

本章では、1型糖尿病、2型糖尿病 (非肥満型と肥満型) マウスにおいて乾燥皮膚を導くコラーゲンとヒアルロン酸に関わる変動因子について検討した。

ストレプトゾトシン (STZ) 投与の雄性マウス (C57BL/6N) の10週齢を1型糖尿病 (STZ マウス)、2日齢 (超若年) を非肥満型2型糖尿病 (N-STZ マウス) とした。そして雄性マウス (KK-Ay/TaJcl 14週齢) を肥満型2型糖尿病 (KK-Ay/TaJcl マウス) として使用した。まず TEWL と角層水分量を測定すると、TEWL は STZ マウスが有意に高く、角層水分量はすべての糖尿病モデルマウスで対照群より有意に減少していた。終末糖化産物 (AGEs) はすべての糖尿病モデルマウスにて増加し、特に STZ マウスでは 2.8 倍の増加が見られた。総コラーゲン量は、対照群に比べすべての糖尿病モデルマウスで減少し、特に2型糖尿病マウス群 (N-STZ、KK-Ay/TaJcl) においては大幅な減少が観察された。IV型コラーゲンの発現量は STZ マウスにおいて大きく減少し、2型糖尿病モデルマウス群では変化は見られなかった。乾燥皮膚は、すべての糖尿病モデルマウス

で観察された。しかし両者の乾燥皮膚の発現機序は異なっていた。1型糖尿病モデルマウスでは、AGEsの蓄積とともに高血糖が持続し⁴⁾、受容体であるAGEs (RAGE) を発現させることでマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9が増加し、基底膜のIV型コラーゲンを分解することでTEWLが上昇し、乾燥皮膚が誘発されたと考えられる^{5,7)}。非肥満型2型糖尿病 (N-STZマウス) ではMMP-9の増加や、IV型コラーゲンの分解は観察されなかったが、炎症性サイトカインのTNF- α 、IL-6が増加してヒアルロン酸の減少が見られた。2型糖尿病肥満モデルマウスでは、腫瘍崩壊因子 (TNF)- α が肥満の脂肪組織から豊富に放出され⁸⁾、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)-6 がマスト細胞を活性化してヒスタミンを放出させ、ヒアルロニダーゼの活性が促進された⁹⁾⁻¹²⁾。これによりヒアルロン酸が分解され、保湿力の低下によって乾燥皮膚へ導かれた。

第2章： KK-Ay/TaJclマウスにおけるダパグリフロジン投与で発現する乾燥皮膚について

本章では、KK-Ay/TaJclマウス (2型糖尿病マウス) にSGLT-2阻害薬を (1mg/kg/日) 4週間毎日経口投与した。本研究は、10週齢の雄性SPF C57BL/6N、およびKK-Ay/TaJclのマウス (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) を使用した。まずTEWLは、すべてのマウスで有意差は見られなかったが、角層水分量は、対照群に比べて2型糖尿病マウスで減少し、さらにダパグリフロジン投与にて減少した。I型コラーゲンの発現量は、2型糖尿病モデルマウスで減少したが、ダパグリフロジン投与で増加が見られた。これは抑制性サイトカインIL-10の上昇と炎症性サイトカインIL-1の減少からMMP-1が減少したために、I型コラーゲンが増加となった^{13),14)}。糖尿病マウスにダパグリフロジンを投与すると、炎症性サイトカインの (TNF)- α には大きな変化は見られないが、IL-6が増加したことから、ヒアルロニダーゼが増加し^{15),16)}、さらにトランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β の減少よりヒアルロン酸合成酵素 (HAS)2 が減少したことから、ヒアルロン酸が減少して乾燥皮膚へと導いた。したがってダパグリフロジン投与においてはコラーゲンよりもヒアルロン酸の減少が乾燥皮膚をもたらしていることが確認された。

結論

当該研究室での先行研究において腸炎などの炎症性疾患によって皮膚障害を誘発することを明らかにしており、本研究では慢性炎症性疾患の一つである糖尿病による皮膚生理機能に及ぼす特性について検討した。結果、皮膚障害を引き起こす乾燥皮膚発現には、各サイトカインとこれらを放出するマスト細胞が、保湿因子であるコラーゲン、ヒアルロン酸の変動に大きく関与し、さらに糖尿病のタイプ (1型と2型) と非肥満型、肥満型で乾燥皮膚の発現機構が異なることが確認できた。高血糖によるAGEsの増加が、一つの要因になっていることから血糖コントロールも重要となる。ダパグリフロジン投与時はヒアルロン酸の減少が乾燥皮膚の大きな要因であることが示唆された。

引用文献

- 1) Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. Satoshi Yokoyama, Kazuya Ooi, et al. *Exp Dermatol*, 23(9), 659-663, 2014.
- 2) Impairment of skin barrier function via cholinergic signal transduction in a DSS-induced colitis mouse model. Satoshi Yokoyama, keiichi Hiramoto, Mayu Koyama, Kazuya Ooi, *Exp Dermatol*, 24(10), 779-784, 2015.
- 3) Deterioration of dry skin in arthritis model mice via stress-induced changes in immune cells

- in the thymus and spleen. Kenji Goto, Keiichi Hiramoto, Ion Takada, Kazuya Ooi. *Journal of Biosciences and Medicines*, 08(01), 23-37, 2020.
- 4) Yamagishi S, Imaizumi T. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des*, 11(18), 2279-2299, 2005.
 - 5) Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel therapeutic target for diabetic vascular complication. *Curr Pharm Des*, v14(5), 487-495, 2008.
 - 6) Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold For the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res*, 93(12),1159–1169, 2003.
 - 7) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 91kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem*,264(29), 17213-17221,1989.
 - 8) Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*, 121(6), 2111-2117,2011.
 - 9) Nagarkar DR, Poposki JA, Comeau MR, Biyasheva A, Avila PC, et al. Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. *J Allergy Clin Immunol*, 130(1), 225-232, 2013.
 - 10) Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int*, 62(1),13-20, 2013.
 - 11) Okayama Y. The roles of mast cells in human skin allergic diseases. *Jpn J Vet Dermatol*, 21(3),137-141, 2015.
 - 12) Sawabe Y, Nakagomi K, Iwagami S, Suzuki S, Nakazaki H. Inhibitory effects of pectin substances on activated hyaluronidase and histamine release from mast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1137(3), 274-278, 1992.
 - 13) Nagano T, Nakamura M, Nishida T. Differential regulation of col-lagen degradation by rabbit keratocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Curr. Eye Res*, 24, 240-243, 2002.
 - 14) Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces of the synthesis of tis-sue inhibitor of metalloproteinase-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J. Biol. Chem*, 266, 2017-2020, 1991.
 - 15) Pereira PAT, Bitencourt CS, Reis MB, Frantz FG, Sorgi CA, Souza COS, Silva CL, Gardinassi LG, Faccioli LH. Immunomodulatory activity of hyaluronidases associated with metabolic adaptations during acute inflammation. *Inflamm. Res*, 69, 105-113, 2020.
 - 16) Wang Z, Guo C, Xu Y, Liu G, Lu C, Liu Y. Two novel functions of hyaluronidase from streptococcus agalactiae are enhanced intracel-lular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expres-sion. *Infect. Immun*, 82, 2615-2625, 2014.

※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、堀川恒樹氏による学位申請論文「糖尿病マウスにおける皮膚生理機能とダパグリフロジン投与により発現する皮膚障害の特性に関する研究」の審査及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】

堀川氏の学位論文は、近年の糖尿病患者の増加に関連した皮膚障害に焦点を置き、1型および2型糖尿病（非肥満型、肥満型）モデルマウスを用いて、それぞれの皮膚乾燥に関係する変動因子の探査を通して、すべての糖尿病マウス皮膚における角層水分量および総コラーゲン量の低下を明らかにした。また、サイトカインを放出するマスト細胞が保湿因子の変動に関わっていることも報告した。1型糖尿病マウスにおいて、AGEs と AGEs 受容体 (RAGE) が増加することで、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 が活性化し、基底膜の保湿因子である IV 型コラーゲンが分解されて、皮膚乾燥の誘導につながることを検証した。2型糖尿病（肥満型）マウスでは、脂肪組織から腫瘍壊死因子 (TNF)- α が放出され、炎症性サイトカイン・インターロイキン (IL)-6 のマスト細胞活性化によりヒスタミンが放出され、ヒアルロニダーゼが活性化して保湿因子であるヒアルロン酸が分解されることで皮膚乾燥が惹起するメカニズムを提唱した。2型糖尿病（非肥満型）マウスでは、IL-6、TNF- α の増加によるヒアルロン酸の減少が皮膚乾燥を誘導していることを明らかにした。

また、角層水分量を減少させた 2 型糖尿病マウスにダパグリフロジンを投与することで角層水分量がさらに減少した。さらに、IL-6 が増加することでヒアルロン酸分解酵素・ヒアルロニダーゼが増加すること、および、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β の減少を基点としてヒアルロン酸合成酵素 (HAS) 2 の活性が低下し、ヒアルロン酸が減少することを確認した。すなわち、ダパグリフロジン投与によって、ヒアルロン酸が減少し皮膚乾燥を誘導していることを明らかにした。

以上のことから、ダパグリフロジンが処方された場合には、皮膚が乾燥しやすい 2 型糖尿病患者に対しては、低分子量ヒアルロン酸を含んだ保湿剤の使用を提案することに繋がった。