

糖尿病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

2022

堀川 恒樹

Moisturizing ability in diabetic mice
and skin injury caused by dapagliflozin

2022

Tsuneki Horikawa

目 次

| | |
|--|----|
| 緒論 | 1 |
| 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 | |
| 第 1 節 緒言 | 3 |
| 第 2 節 実験方法 | 4 |
| 第 3 節 結果 | 8 |
| 第 4 節 考察 | 17 |
| 第 5 節 小括 | 19 |
| 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 | |
| 第 1 節 緒言 | 20 |
| 第 2 節 実験方法 | 21 |
| 第 3 節 結果 | 23 |
| 第 4 節 考察 | 29 |
| 第 5 節 小括 | 32 |
| 結論 | 33 |
| 引用文献 | 35 |
| 謝辞 | 41 |
| 英文要旨 | 42 |

略号一覧

STZ: streptozotocin

TEWL: transepidermal water loss

AGEs: advanced glycation end products

MMP: matrix metalloproteinase

TNF: tumor necrosis factor

SPF: specific pathogen free

HE: hematoxylin eosin

IL: interleukin

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

SD: standard deviation

RAGE: receptor for AGEs

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

SGLT: Sodium-glucose cotransporter

TGF: transforming growth factor

HAS: hyaluronan synthase

QOL: quality of life

NF- κ B: nuclear factor-kappaB

諸論

近年、糖尿病患者数は、増加の一途をたどっている。特に生活習慣の変化により増加している 2 型糖尿病は、糖尿病性腎症などの血管合併症を引き起こすため大きな社会問題となっている¹⁾。糖尿病はその成因から、体内でインスリンを分泌する膵β細胞がなんらかの理由により破壊され、インスリン分泌が枯渇して発症する 1 型糖尿病と、インスリン分泌の低下、あるいはインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）により相対的なインスリン作用不足により発症する 2 型糖尿病に分類される。治療は、血糖をいかにコントロールするかに委ねられ、生活習慣の改善とともに薬物療法が重要となる。高血糖が続くことで、体内のアミノ酸やタンパク質と還元糖の非酵素的化学反応で糖化が生じ、糖化反応中間体を経て終末糖化産物（AGEs）となる。さらに AGEs は、受容体である receptor for AGEs（RAGE）と結合し、細胞シグナル伝達により炎症を惹起する²⁾。これを認識したマクロファージは、インターロイキン（IL）-1、腫瘍壊死因子（TNF）-α などの分泌を行い合併症進展に関与する。

糖尿病で生じる皮膚障害は、自律神経失調による汗腺活性低下、高血糖による脱水から乾燥皮膚などが生じるものと考えられる。乾燥皮膚は真皮中の保湿物質であるコラーゲンとヒアルロン酸が深く関わっていることから、本研究では、これらに注目して影響する分子化学物質の特性を確認することで乾燥皮膚発現機序を解明することを目的とする。

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。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。さらに 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、腎臓でのブドウ糖再吸収を抑制することで、インスリン非依存的に血糖をコントロールする。発売後服用した患者から皮膚障害の発現が数多く報告された。これにより日本糖尿病学会が「SGLT-2 阻害薬の適正使用に関する Recommendation」を発表して、重篤な場合は投与を中止する旨が記載された。糖尿病患者は高血糖による脱水症状に伴う乾燥皮膚にダパグリフロジンを投与することでさらに乾燥皮膚が悪化しているのではないかと考え、それらの発症機構について解明することを目的とする。

第 1 章では、1 型糖尿病マウス、2 型糖尿病マウス (非肥満型と肥満型) の動物モデルを使用した。総コラーゲン量、基底膜構成の IV 型コラーゲン、ヒアルロン酸量を測定し、変動に関わるサイトカイン等の因子を確認することで乾燥皮膚発現機構の解明を行う。

第 2 章では、肥満型 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乾燥皮膚を増悪させる因子について解明する。

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生機序の違いについて

第 1 節 緒言

糖尿病は、1 型糖尿病（インスリン依存性糖尿病）と 2 型糖尿病（非インスリン依存性糖尿病）に分類され、1 型糖尿病は自己免疫疾患であり、膵 β 細胞が破壊されることで症状が進行していく。T-リンパ球による膵島細胞への細胞毒性については、動物モデルで確認されている^{3,4)}。2 型糖尿病の発症は、遺伝および環境因子の影響を受けることでインスリンの働きが低下することにより、血糖値が慢性的に高くなってインスリン分泌不全やインスリン抵抗性をもたらす。酸化ストレスはインスリン分泌不全を引き起こす要因の一つでもある⁵⁾。インスリン分泌細胞である膵 β 細胞は、特に細胞間スーパーオキシドディスムターゼが少ないため、酸化ストレスに弱いとされている⁶⁾。糖尿病は、慢性的な高血糖状態において、過剰なグルコースがタンパク質と結合して糖化タンパク質を形成し、その過程で酸化ストレスが発生する。そのため、血糖値の上昇によりインスリン分泌が低下して、血糖値上昇を引き起こす悪循環を引き起こす。さらに、酸化ストレス状態が慢性化すると、膵 β 細胞はアポトーシスを起こし、機能的な膵 β 細胞の減少を招く事になる。インスリン抵抗性には、脂肪細胞から分泌される腫瘍壊死因子 (TNF)- α やアディポネクチンなどの重要な因子が関与し、2 型糖尿病の原因の一つにもなっている。TNF- α はインスリンの効果を低下させる一方⁷⁾、アディポネクチンは耐糖能を向上させることが確認されている⁸⁾。

糖尿病による症状の一つである皮膚障害は、自律神経失調症による汗腺活性の低下や高

血糖による脱水により、皮膚が乾燥することで発症する。乾燥に伴い皮膚のバリア機能が低下するため、細菌侵入に対する抵抗力が低下し、皮膚感染症のリスクが高まり⁹⁾、ほてり、局所的な発汗、カロテノイド色素沈着などの症状を呈する¹⁰⁾。糖尿病は免疫系に大きく影響し^{11,12)}、糖尿病性皮膚疾患においても影響している可能性がある。

そこで、本研究では、1 型糖尿病および 2 型糖尿病における乾燥皮膚発現の機序について検討を試みた。1 型糖尿病モデルマウスとしてストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウス、さらに 2 型糖尿病モデルマウスは、非肥満型の N-STZ 誘発糖尿病マウスと肥満型 KK-Ay/TaJcl マウスについて糖尿病のタイプの違いによる乾燥皮膚発現の評価を行った。

第 2 節 実験方法 (Fig.1)

1. 実験動物

本研究では、雄性の (SPF C57BL/6N ; 10 週齢)、(SPF C57BL/6N ; 2 日齢) 、および (SPF KK-Ay/TaJcl ; 14 週齢) を使用した。すべて日本クレア株式会社 (Tokyo,Japan) から購入した。これらのマウスは、温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル (Light:8:00~20:00) の環境下、水と固形飼料を自由に摂取させた。実験最終日に、血糖値を測定し 300 mg/dL 以上を糖尿病発症とみなした。また、本研究では C57BL/6N マウスを用いたが、他のマウス系統 (BALB/c, ICR マウス) でも同様の結果が示されている (データ非公表)。手術はペントバルビタール麻酔下で行われ、動物の苦痛を最小限にするための努力を払った。全ての動物実験は、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。

研究デザイン

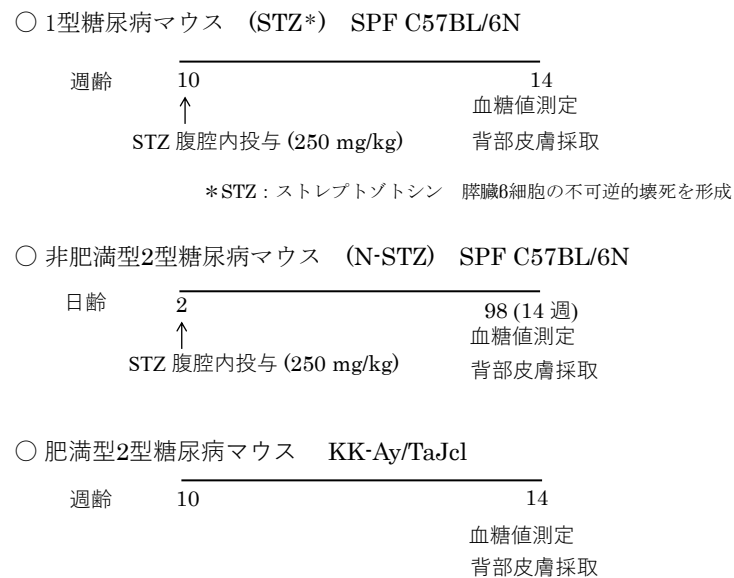


Figure 1. Schema of the study-procedure

1 型糖尿病¹³⁻¹⁶⁾

雄性 SPF C57BL/6N; 9 週齢マウスを最初の 7 日間隔離した後、体重に応じて 2 群 (STZ 群および対照群) に無作為に分け、1 群 10 匹とした。STZ 群では、マウスに STZ (250 mg/kg) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, HE, Germany) を単回腹腔内投与した。STZ は *Streptomyces achromogenes* から抽出された抗生物質であり、グルコースの N-ニトロソ誘導体である¹⁷⁾。STZ は膵 β 細胞の迅速かつ不可逆的な細胞壊死を形成する¹⁸⁾。投与 4 週目に体重、飲水量と尿量、血糖値を測定した。対照マウスは、実験期間中無処置とした。

2 型糖尿病 (非肥満型)¹⁹⁻²¹⁾

SPF C57BL/6N 新生児マウスを 2 群 (N-STZ 群、対照群) に分類し、1 群 10 匹とした。N-STZ 群の STZ マウスには、生後 2 日目に STZ (250 mg/kg) を単回腹腔内投与した。投与後 14 週目に体重、飲水量と尿量、血糖値を測定した。対照マウスは、実験期間中無処置とした。

2 型糖尿病 (肥満型)^{22,23)}

KK-Ay/TaJcl マウスは、複数の遺伝子が影響を受けている非インスリン依存性糖尿病モデルマウスである。最初の 7 日間はマウスを隔離し、その後 2 群 (KK-Ay/TaJcl マウスと対照群) に分け、1 群 10 匹とした。注射から 4 週目に体重、飲水量と尿量、血糖値を測定した。対照として、同齢の C57BL/6N マウスを用いた。

経表皮水分喪失量 (Transepidermal water loss: TEWL) および角層水分量の測定

実験最終日に背部皮膚の TEWL と角層水分量を測定するために²⁴⁾、

Tewameter TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologn, Germany)

および Corneometer CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH) を使用した。

背部皮膚の採取と染色

実験最終日に背部皮膚組織を、リン酸緩衝パラホルムアルデヒド (4%) で固定し、Tissue-Tek optimum cutting temperature Compound を用いて凍結包埋し、5 μ m の厚さの切片を、ヘマトキシリン・エオジン (HE) にて染色した。コラーゲン発現を評価するために、試料をマッソントリクローム法で染色した (trichrome stain kit [modified Masson's] ; ScyTec Laboratories, Inc., Logan, UT, USA)²⁵⁾。さらに、マスト細胞を可視化するために皮膚標本をトルイジンブルーで染色し、顕微鏡で観察した。次に、抗体を用いて標本を染色

した²²⁾。ウサギポリクローナル抗コラーゲン IV (1:1000; Abcam) の一次抗体とインキュベートした。その後、フルオレセインイソチオシアネート標識抗ウサギ二次抗体 (1:30; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)、を用いてインキュベートし、IV 型コラーゲンの発現を蛍光光学顕微鏡で観察した。

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を用いたマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-1、MMP-2、MMP-9、ヒスタミン、ヒアルロン酸分解酵素のヒアルロニダーゼ、ヒアルロン酸、インターロイキン (IL)-6、TNF- α および終末糖化産物 (AGEs) の測定

実験最終日にマウスの心臓から採血し、血漿中の MMP-1, MMP-2, MMP-9, ヒスタミン、ヒアルロニダーゼ、ヒアルロン酸、AGEs の濃度を、ELISA 法を用いて測定した。(MMP-1 : MyBioSource, San Diego, San Diego, CA, USA; MMP-2, MMP-9, ヒアルロン酸、TNF- α : R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; ヒスタミン : Bertin Pharm., Montigny-le-Bretonneux, France; ヒアルロニダーゼ : AB Clonal Inc. Tokyo, Japan; IL-6 : Proteintech, Rosemont, IL, USA; および AGEs: OxiSelect AGE connection ELISA kit, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA

統計分析

全てのデータは、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。結果は、Microsoft Excel 2010 ソフトウェア (Microsoft Corp.) を使用し分析した。各群間の統計的有意性は、Tukey Post-hoc test によって評価した。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 SPSS version 20 software (IBM, Armonk, NY, USA) にて実施した。

第3節 結果

1. 体重、飲水量、尿量、血糖値への影響

STZマウス (Fig. 2A), N-STZマウス (Fig. 2B), KK-Ay/TaJclマウス (Fig. 2C) の体重、飲水量、尿量、血糖値を測定した。体重は対照マウスに比べると、STZマウスで減少し、KK-Ay/TaJclマウスで1.7倍増加した。N-STZマウスの体重は、対照マウスと差がなかった。また、飲水量、尿量は、すべての糖尿病マウスで、対照マウスよりも増加し、血糖値も上昇した。

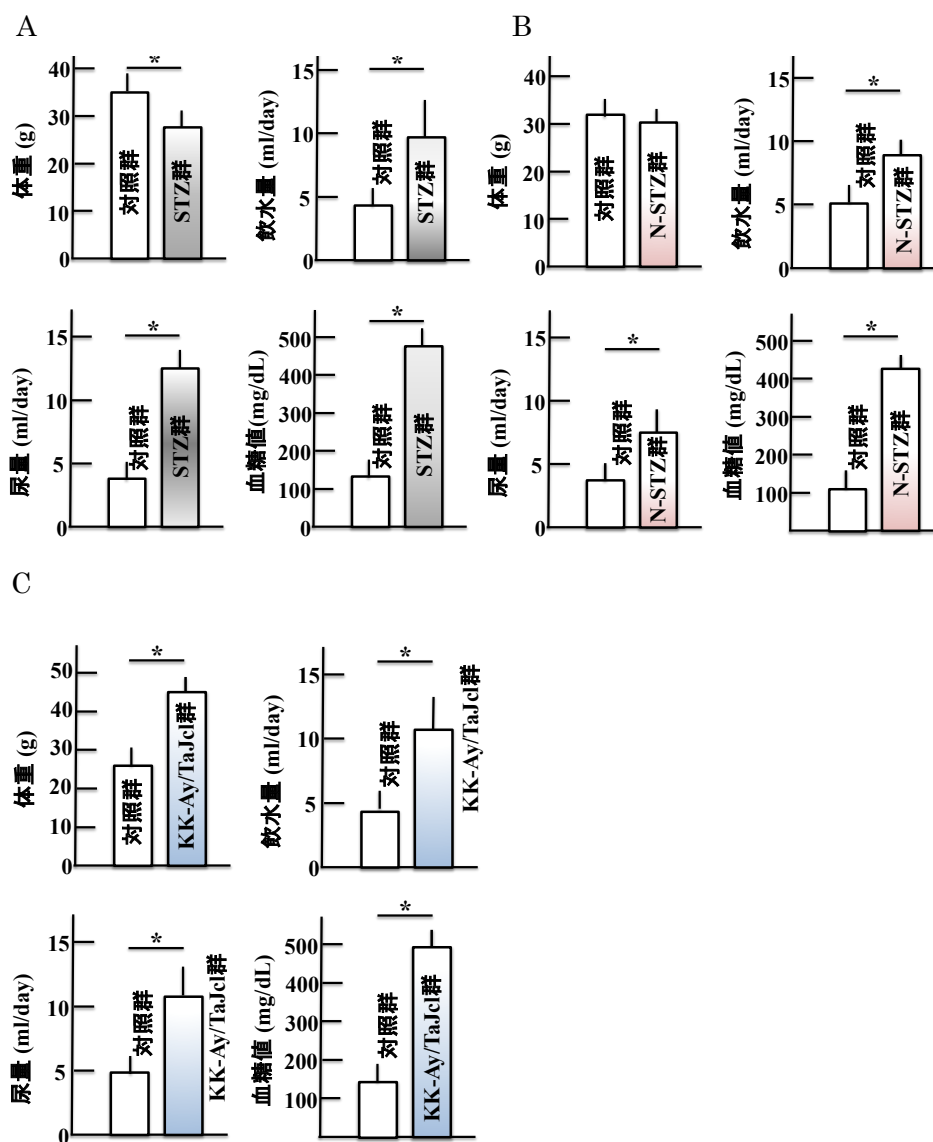


Figure 2. Effect of diabetes on body weight, water intake, urine volume, and blood glucose levels in mice. Type 1 diabetes model mice (A: STZ)、non-obesity type 2 model mice (B: N-STZ)、and obesity type 2 model mice (C: KK-Ay/TaJcl) . The values are expressed as the mean \pm SD of six animals. *P < 0.05.

2. TEWL と角層水分量への影響

糖尿病モデルマウスの TEWL と角層水分量を測定した (Fig.3)。TEWL は STZ マウスで対照マウスより有意に増加しており (Fig. 3A) N-STZ マウス、KK-Ay/TaJcl マウスでは大きな変化はなかった (Fig.3B,3C)。角層水分量は、N-STZ マウス、KK-Ay/TaJcl マウスにおいて対照マウスより有意に減少していた (Fig.3D,3E,3F)

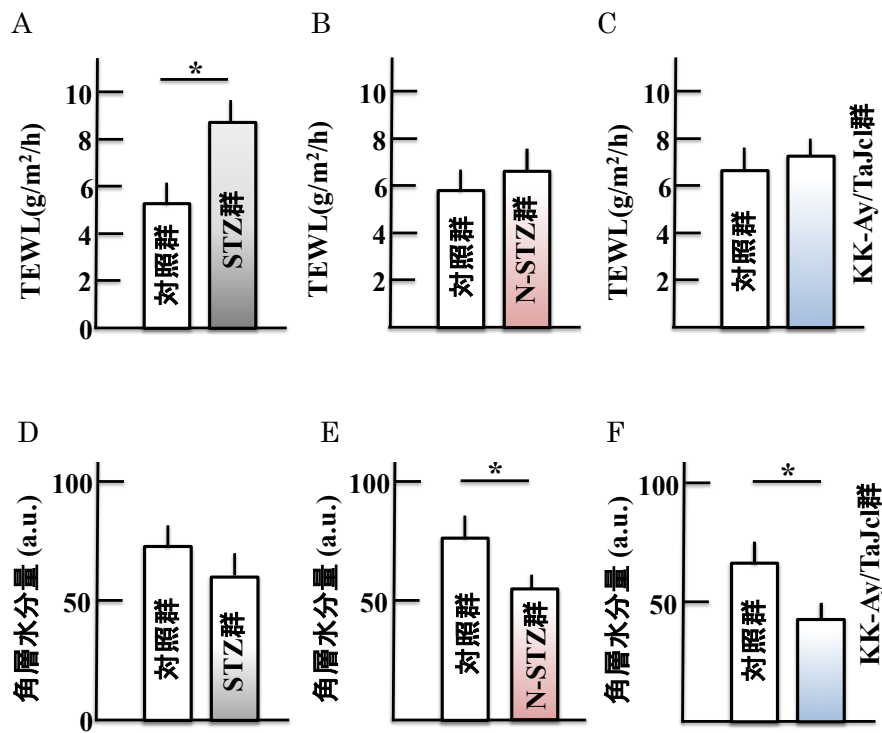


Figure 3. Effect of diabetes on TEWL and skin hydration in mice. Type 1 diabetes model mice (A, D: STZ)、non-obesity type 2 model mice (B, E: N-STZ)、and obesity type 2 model mice (C, F: KK-Ay/TaJcl). The values are expressed as the mean \pm SD of six animals. *P < 0.05.

a.u. : arbitrary unit

3. AGEs への影響

すべての糖尿病モデルマウスにおいて、AGEs の血漿中濃度が対照マウスに比べ有意に増加した。中でも STZ マウスは 2.8 倍の増加が見られた (Fig. 4)

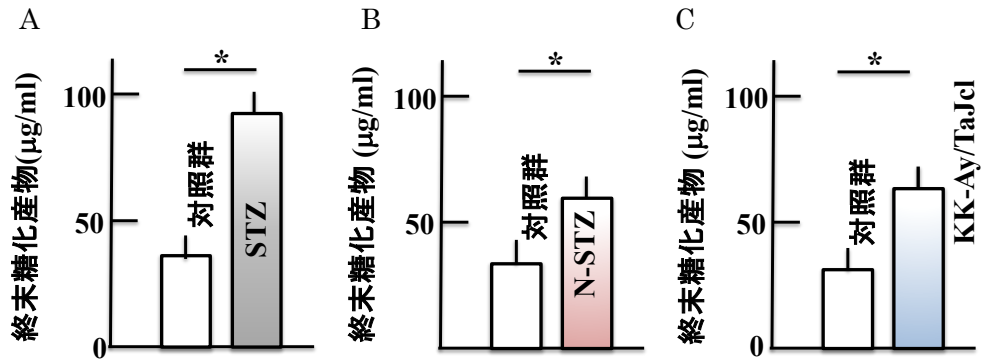


Figure 4. Effect of diabetes on the plasma level of AGEs in mice. Type 1 diabetes model mice (A: STZ)、non-obesity type 2 model mice (B: N-STZ)、and obesity type 2 model mice (C: KK-Ay/TaJcl). The values are expressed as the mean \pm SD of six animals. * $P < 0.05$.

4. 皮膚コラーゲンへの影響

すべての糖尿病モデルマウスで、真皮におけるコラーゲン発現量が対照マウスに比べて減少し (Fig. 5D,5E,5F)、N-STZ マウスおよび KK-Ay/TaJcl マウスでは大きな減少が見られた。

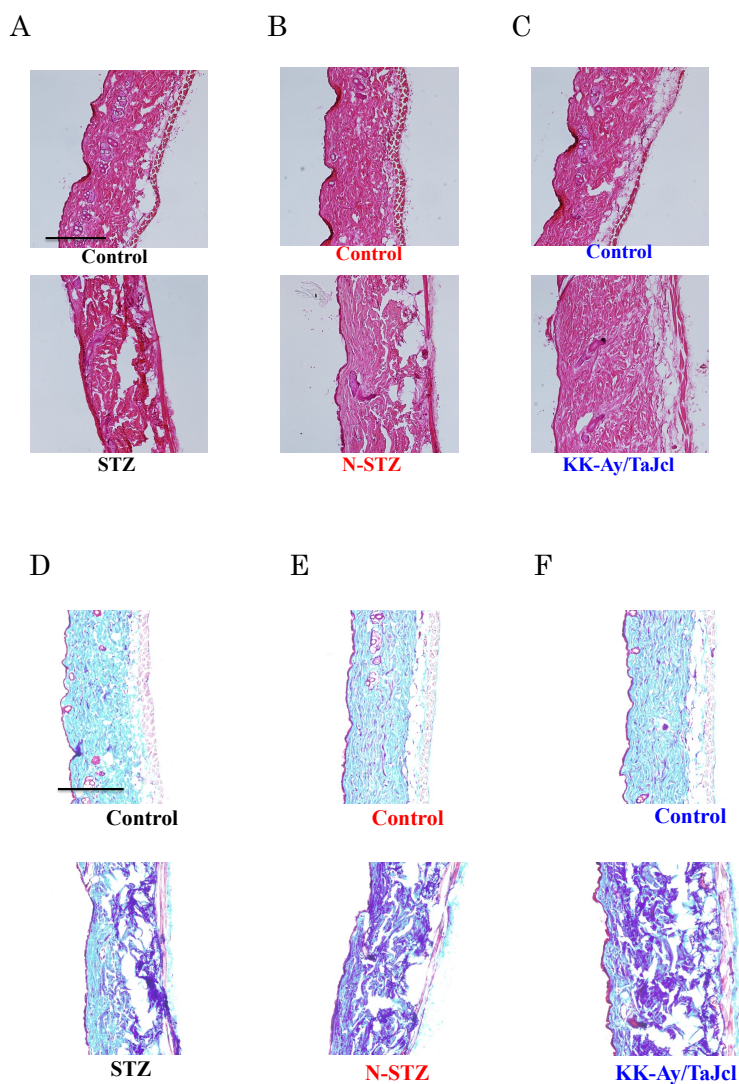


Figure 5. Effects of diabetes on collagen expression in the dorsal skin of mice. Histological analysis of skin sections, HE staining, and Masson-trichrome staining. Type 1 diabetes model mice (A, D: STZ), non-obesity type 2 model mice (B, E: N-STZ), and obesity type 2 model mice (C, F: KK-Ay/TaJcl). The data show 1 representative experiment performed on 10 animals. Scale bar = 100 μ m.

5. 皮膚 IV 型コラーゲンへの影響

基底膜における IV 型コラーゲンの発現量は、STZ マウスでは対照マウスに比べて減少したが、N-STZ マウスと KK-Ay/TaJcl マウスでは変化は見られなかった (Fig. 6)。

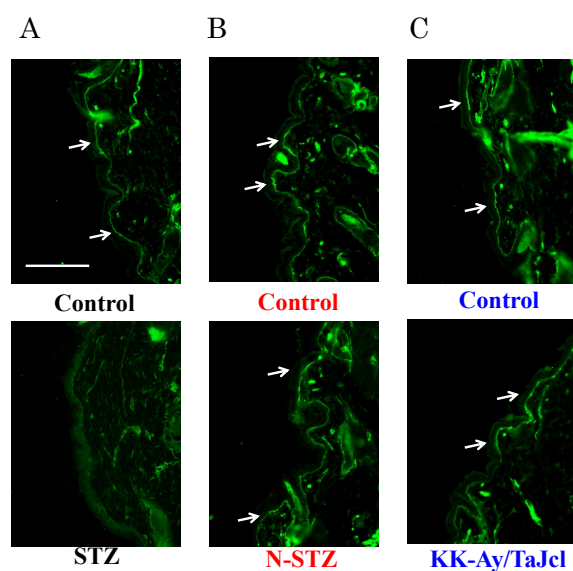


Figure 6. Effects of diabetes on collagen IV expression in the dorsal skin of mice. Type 1 diabetes model mice (A: STZ)、non-obesity type 2 model mice (B: N-STZ)、and obesity type 2 model mice (C: KK-Ay/TaJcl). Arrows indicate the collagen IV. The data show 1 representative experiment performed on 10 animals. Scale bar = 100 μ m.

6. MMP-1、MMP-2、MMP-9 への影響

STZ マウスでは対照マウスに比べ、MMP-1 は 2.9 倍、MMP-2 は 3 倍、MMP-9 は 5.3 倍の増加が見られた。N-STZ マウスと KK-Ay/TaJcl マウスでは、MMP-1 の血漿中濃度が増加したが、MMP-2 と MMP-9 の濃度に大きな変化は見られなかった (Fig. 7)。

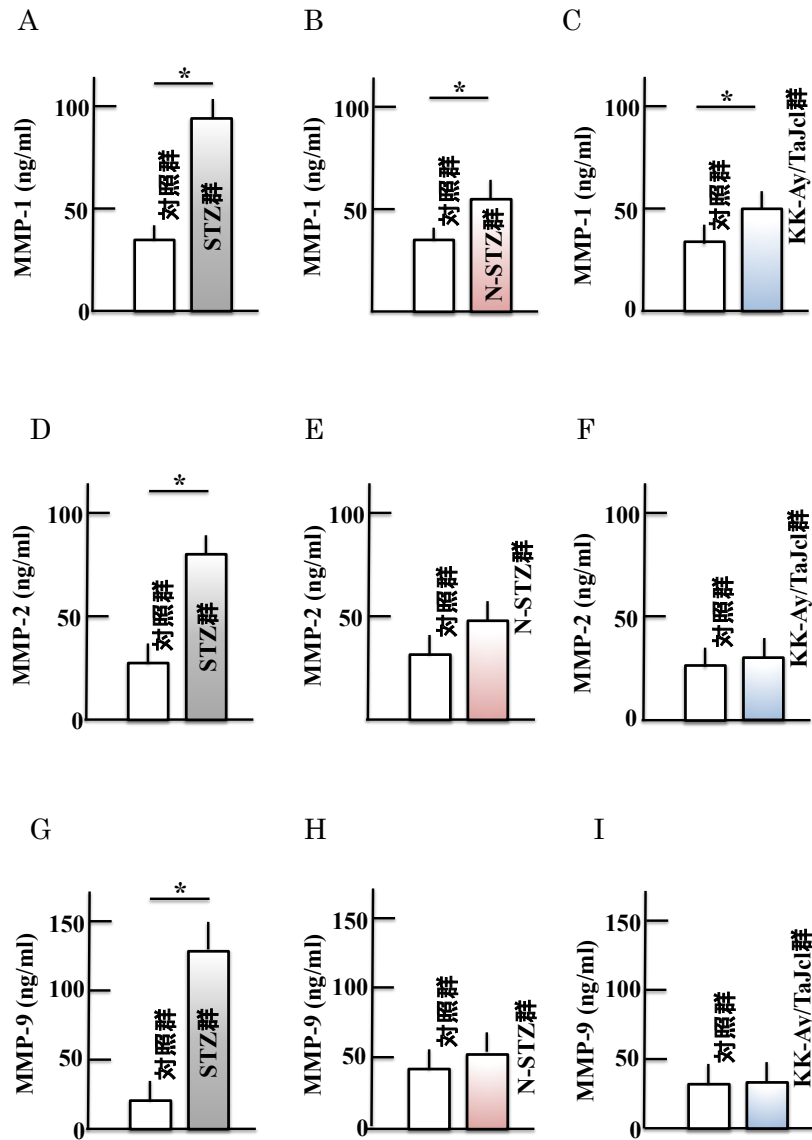
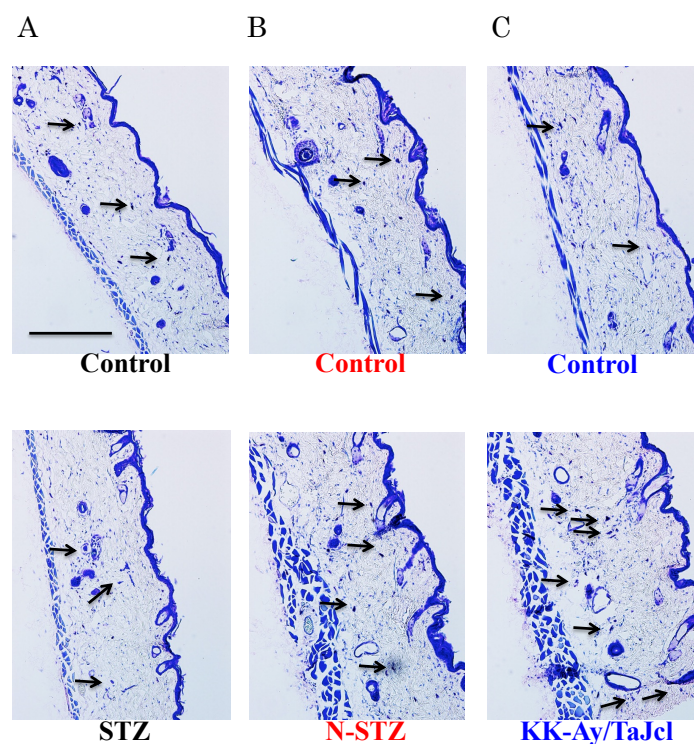


Figure 7. Effect of diabetes on the plasma levels of MMP-1, MMP-2, and MMP-9 in mice. Type 1 diabetes model mice (A, B, C: STZ), non-obesity type 2 model mice (D, E, F: N-STZ), and obesity type 2 model mice (G, H, I: KK-Ay/TaJcl). The values are expressed as the mean \pm SD of six animals. * $P < 0.05$.

7. 皮膚マスト細胞とヒスタミン、ヒアルロニダーゼへの影響

N-STZ マウスと KK-Ay/TaJcl マウスでは、対照マウスに比べマスト細胞発現量が増加し (Fig. 8B,8C)、特に KK-Ay/TaJcl マウスでは大きく増加した。STZ マウスと対照マウスのマスト細胞発現量に大きな変化はなかった。ヒスタミンとヒアルロニダーゼの血漿中濃度は、KK-Ay/TaJcl マウスでは対照マウスに比べて 4.4 倍、4.8 倍増加した (Fig. 8F, 8I)。しかし、STZ マウスと N-STZ マウスでは、ヒスタミンとヒアルロニダーゼの血漿中濃度は対照マウスと有意な差は見られなかった (Fig. 8D, 8E, 8G, 8H)。



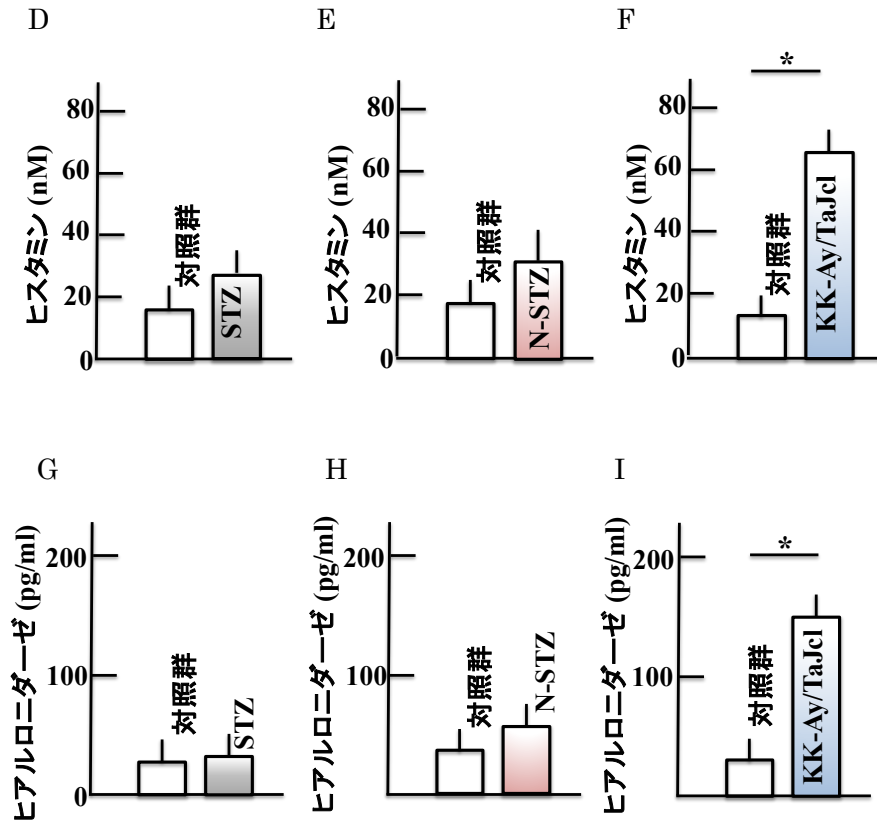


Figure 8. Effect of diabetes on the expression of mast cells in the dorsal skin and the plasma levels of histamine and hyaluronidase in mice. Type 1 diabetes model mice (A, D, G: STZ), non-obesity type 2 model mice (B, E, H: N-STZ), and obesity type 2 model mice (C, F, I: KK-Ay/TaJcl). Arrows indicate collagen IV. The data show 1 representative experiment performed on 10 animals. Scale bar = 100 μ m. The values are expressed as the mean \pm SD of six animals. *P < 0.05.

8. ヒアルロン酸への影響

ヒアルロン酸の血漿中濃度は、N-STZ マウスと KK-Ay/TaJcl マウスで有意に減少したが、STZ マウスでは、対照マウスと大きな変化はなかった (Fig. 9A)。ヒアルロン酸の血漿中濃度は、対照マウスと比較して KK-Ay/TaJcl マウスで大きく減少となった (Fig. 9C)。

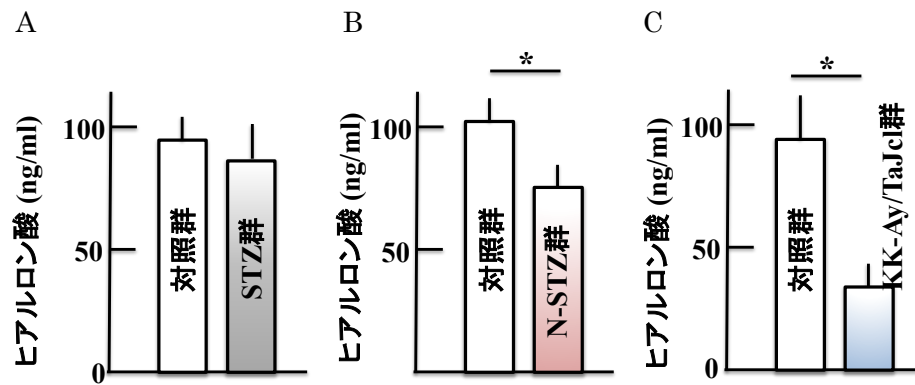


Figure 9. Effect of diabetes on the plasma level of hyaluronic acid in mice. Type 1 diabetes model mice (A: STZ)、non-obesity type 2 model mice (B: N-STZ)、and obesity type 2 model mice (C: KK-Ay/TaJcl). The values are expressed as the mean \pm SD of six animals. * $P < 0.05$.

9. IL-6 および TNF- α への影響

IL-6 と TNF- α の血漿中濃度は、N-STZ マウスと KK-Ay/TaJcl マウスで有意に増加したが、STZ マウスでは大きな変化は見られなかった (Fig.10)。

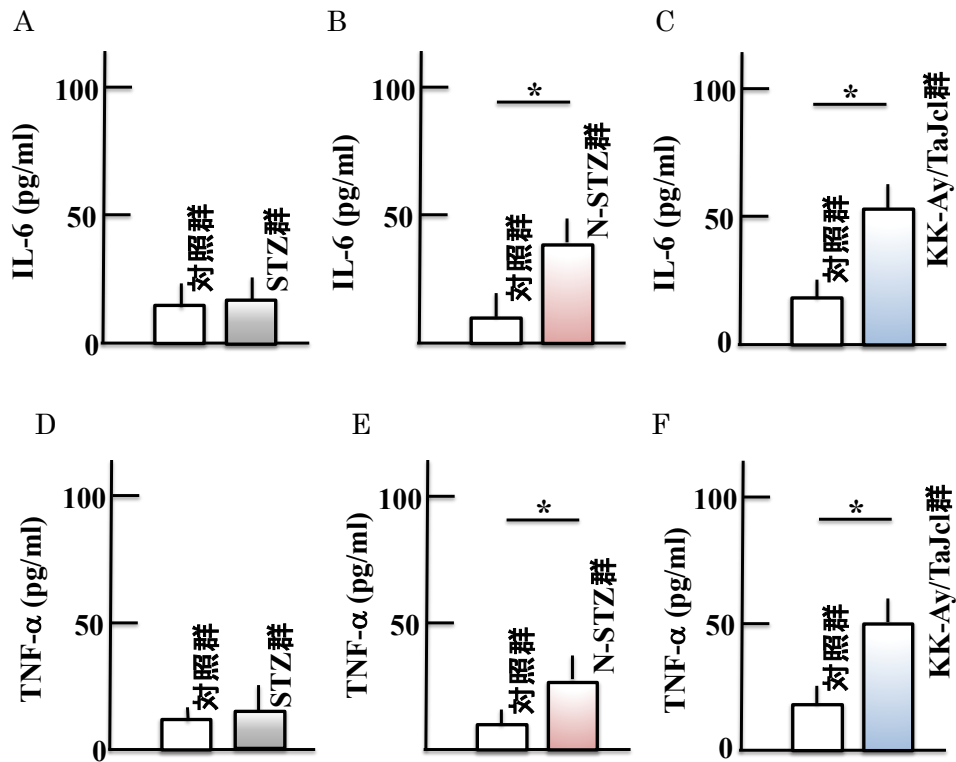


Figure 10. Effect of diabetes on the plasma levels of IL-6 and TNF- α in the mice. Type 1 diabetes model mice (A, D: STZ), non-obesity type 2 model mice (B, E: N-STZ), and obesity type 2 model mice (C, F: KK-Ay/TaJcl). The values are expressed as the mean \pm SD of six animals. *P < 0.05.

第4節 考察

本研究では、STZ マウス、N-STZ マウス、および KK-Ay/TaJcl マウスを用い、乾燥皮膚発現機序の解明を行った。皮膚の総コラーゲン量はすべての糖尿病モデルマウスで減少し、特に KK-Ay/TaJcl マウスで大きな減少が見られた。基底膜の IV 型コラーゲンの発現量においては、N-STZ マウス、KK-Ay/TaJcl マウスでは変化は見られなかったが、STZ マウス

では大きく減少した。

MMP-1、MMP-2、MMP-9 は STZ マウスで上昇し、N-STZ マウス、KK-Ay/TaJcl マウスでは MMP-1 のみ上昇、MMP-2、MMP-9 については大きな変化は見られなかった。KK-Ay/TaJcl マウスでは、皮膚マスト細胞の発現量と放出されるヒスタミンとヒアルロニダーゼ濃度が大きく上昇し、ヒアルロン酸濃度は KK-Ay/TaJcl マウスで大きく減少した。また、IL-6 と TNF- α 濃度は N-STZ マウスと KK-Ay/TaJcl マウスで増加したが、STZ マウスでは大きな変化は見られなかった。1 型および 2 型糖尿病モデルマウスの両方で角層水分量の減少があり、乾燥皮膚が観察されたが、1 型と 2 型の糖尿病モデルマウスでは、乾燥皮膚の発現機序が異なっている。先行研究により 1 型糖尿病モデルマウスでは、糖尿病が発症すると、AGEs の蓄積に伴い高血糖が生じて慢性的な高血糖状態となり、循環血液中や組織内に AGEs が蓄積することで臓器障害を引き起こす²⁶⁾。AGEs は AGEs の受容体 (RAGE) を誘導させ、この AGE-RAGE 系は、活性酸素産生促進、ミトジェン活性化プロテインキナーゼの活性化、低分子 G 蛋白の活性化を通じて NF- κ B を中心とした転写因子のリン酸化を誘導する。その結果、MMP-9 の発現が上昇し²⁷⁾、基底膜の IV 型コラーゲンを分解する²⁸⁾。それゆえ、本研究において 1 型糖尿病モデルマウスでは、AGEs の増加により MMP-9 の分泌が促進され (Fig. 7)、基底膜(Fig. 6)が破壊されて蒸散により TEWL が増加し、結果として乾燥皮膚が誘導されたと考えられる。

2 型糖尿病を伴う肥満では、肥大した脂肪細胞の間にマクロファージが過剰に浸潤し、肥満の脂肪細胞から TNF- α が多く分泌され、炎症性サイトカインの放出が起こる²⁹⁾。肥満においては、単球走化性因子 (MCP)-1 のようなケモカインが分泌され、M1 マクロファージは、脂肪組織で誘導される MCP-1 の受容体である CC ケモカイン受容体 2 を過剰に発現する³⁰⁾。本研究で用いた肥満型 2 型糖尿病モデルマウスである KK-Ay/TaJcl マウスでは、M1 マクロファージから分泌される炎症性サイトカインが対照マウスに比べて 2.6 倍増加していた (Fig. 10)。これらの炎症性サイトカインがマスト細胞を活性化することで、マスト細

胞からヒスタミンが放出され³¹⁻³³⁾ (Fig. 8)、誘導されたヒアルロニダーゼが³⁴⁾、ヒアルロン酸を分解することで保湿力の低下を招き皮膚の乾燥を引き起こしたと考えられる。

N-STZ マウスでは、TNF- α 、IL-6 は増加しているが、KK-Ay/TaJcl マウスの様に、脂肪細胞からの分泌に比べ少なく、ヒアルロン酸の減少も対照群に比べ小さかった。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。しかしコラーゲンは減少して乾燥皮膚は観察されているので、AGE-RAGE 系によって誘導される炎症性サイトカインや活性酸素が皮膚コラーゲンを分解することが関与しているのではないかと考えられる。

第5節 小括

本研究では、1 型糖尿病および 2 型糖尿病のいずれにおいても乾燥皮膚が観察されたが、それぞれの糖尿病で乾燥皮膚の機序が異なることが示された。乾燥皮膚は痒みを誘発し、様々な感染症の原因にも成り得るため、糖尿病患者にとって深刻な問題の一つである。

1 型糖尿病では、高血糖から AGEs の増加により乾燥皮膚発現が誘導されることから血糖コントロールの管理が重要であることが示唆された。2 型糖尿病では肥満による脂肪細胞から放出されるサイトカインにより乾燥皮膚が発現することから、体重コントロールの厳格化など、糖尿病タイプ別に乾燥皮膚発現機序を解明することにより、患者の生活の質 (QOL) 向上につながるものである。本研究において十分な知見を得ることは、糖尿病治療の重要性を示唆するものになると考えられる。

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

第 1 節 緒言

近年、食生活の欧米化や社会環境の変化に伴い、糖尿病患者数が急速に増加している。2 型糖尿病の治療には、生活習慣改善と薬物療法が重要となる。2 型糖尿病が進行すると、腎症、網膜症、神経障害、心筋梗塞、脳梗塞などの合併症を引き起こす可能性がある³⁵⁾。薬物治療の目的は、血糖コントロールを正常化させ、これらの症状の発現と進展を抑えることである。2014 年に腎臓でのブドウ糖再吸収を抑制する SGLT-2 阻害剤が薬価収載された。この SGLT-2 阻害剤は、インスリン非依存的に血糖をコントロールすることから膵臓の β 細胞への負担を軽減できる。しかし、服用した患者からは投与後皮膚障害の発現が報告された。これにより日本糖尿病学会が「SGLT-2 阻害薬の適正使用に関する Recommendation」を示して重篤な場合は投与を中止する旨が記載された。

全身を覆う皮膚は、物理的、免疫的バリアとして機能し、乾燥皮膚は、アレルゲンや細菌が侵入しやすいため³⁶⁾、感染症やアレルギーの原因となる。また、乾燥皮膚によりかゆみが生じたり、掻きむしる事により炎症がひどくなったりするため³⁷⁾、皮膚バリア機能を正常に維持することが重要である。

先行研究では、2 型糖尿病モデルマウスにおける皮膚ヒアルロン酸やコラーゲンの減少も観察され^{38,39)}、乾燥皮膚が発現することが示されている⁴⁰⁾。また、様々な疾患において乾燥皮膚の発現に、コラーゲンの減少が見出されている⁴¹⁻⁴⁴⁾。このコラーゲンの減少は、

真皮の破壊と皮膚バリア機能低下によるものと考えられている。KK-Ay/TaJcl マウスは、肥満型 2 型糖尿病モデルであり、脂肪細胞から炎症性サイトカインや活性酸素が分泌されて⁴⁵⁾、線維芽細胞やマスト細胞が関与することにより乾燥皮膚が誘導される⁴⁶⁾。今回は、KK-Ay/TaJcl マウスの乾燥皮膚へのダパグリフロジン投与における影響について検討する。

第 2 節 実験方法

1. 実験動物

本研究は、雄性の (SPF C57BL/6N ; 10 週齢) および (SPF KK-Ay/TaJcl ; 10 週齢) のマウス (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) を使用した。マウスは、温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル (Light:8:00~20:00)、飲料水と固形飼料を自由に摂取させた。4 週間後に体重 (g)、飲水量 (mL/d)、尿量 (g/d) を測定した。さらに、各マウスの尾静脈から採血して、血糖値を測定した。血糖値が 300 mg/dL 以上のマウスを糖尿病とした。手術はペントバルビタール麻酔で行い、動物の苦痛を最小限にするよう努めた。全ての動物実験は、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。

2. ダパグリフロジン投与群

ダパグリフロジン (Carbosynth, Compton, Berkshire, U.K.) を 1 日 1 mg/kg を 4 週間連日経口投与し、対照群には蒸留水を投与した⁴⁷⁾。

3. TEWL および角層水分量の測定

皮膚バリア機能の指標としてダパグリフロジン並びに蒸留水投与 4 週間目に背部皮膚の TEWL および角層水分量を測定する為に Tewameter TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologn, Germany) および Corneometer CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH) を使用した⁴⁸⁾。

4. 背部皮膚の調製と染色

マウスの背部皮膚を採取し、リン酸塩緩衝液 4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定後、Tissue Tec OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) で凍結した。凍結切片は 5 μ m に切断し、HE 染色した。コラーゲンの発現は、マッソントリクローム法 (trichrome stain kit[modified Masson's] ; ScyTec Laboratories, Inc., Logan, UT, U.S.A.) により観察した⁴⁹⁾。マスト細胞はトルイジンブルーで染色し、切片を顕微鏡で観察した。I 型コラーゲンは、Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) を用い、無作為に 5 か所のエリアを抽出して算出した。

5. ELISA による血漿中のサイトカインと MMP-1、および皮膚中のヒアルロン酸、ヒアルロニダーゼ、HAS2 の測定

IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , MMP-1, ヒアルロン酸、ヒアルロニダーゼ、および HAS2 を ELISA キット (IL-1 and IL-10, Proteintech, Rosemont, IL, U.S.A.; IL-6, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, U.S.A.; TNF- α , TGF- β , and hyaluronic acid, R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.; MMP-1, MyBioSource, San Diego, CA, U.S.A.; hyaluronidase, AB Clonal Inc., Tokyo, Japan; and HAS2, LSBio, Seattle, WA, U.S.A.) を使用して測定した。光学密度は、microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) を用いて測定した。

6. 統計分析

全てのデータは平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。各群間の統計的有意性は Tukey's post-hoc test または Steel-Dwass test によって評価した。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 SPSS version 20 software (IBM, Armonk, NY, USA) にて実施した。

第3節 結果

1. 体重、飲水量、尿量、血糖値への影響

KK-Ay/TaJcl マウスの体重 (Fig. 1A)、飲水量 (Fig. 1B)、尿量 (Fig. 1C)、血糖値 (Fig. 1D)の推移を示した。KK-Ay/TaJcl マウスの体重、飲水量、尿量は対照マウスよりも増加した。一方、ダパグリフロジンを投与した KK-Ay/TaJcl マウスは、体重、飲水量、尿量において KK-Ay/TaJcl マウスと大きな変化は見られなかった。一方、血糖値はダパグリフロジン投与により大きく低下した。

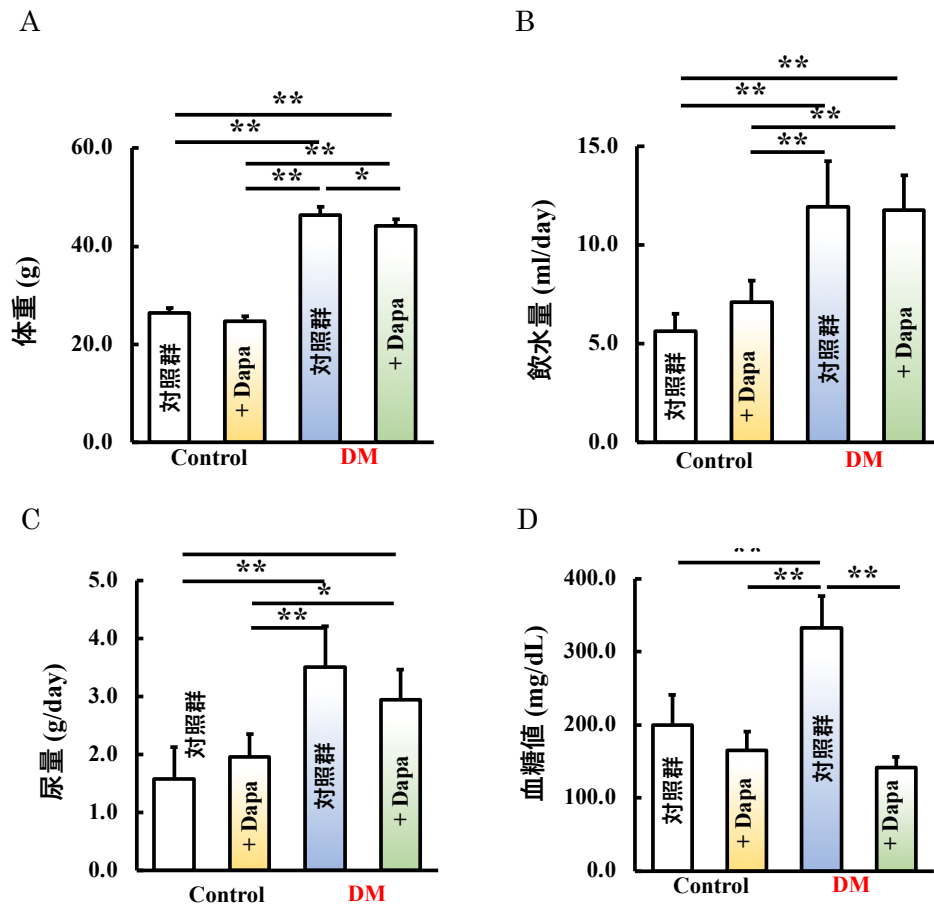


Fig. 1. Effect of Dapagliflozin Treatment on Body Weight (A), Water Intake (B), Urine Volume (C), and Glucose Levels (D) in KK-Ay/TaJcl Mice

Values are expressed as the mean \pm SD of five animals. * P < 0.05, ** P < 0.01.

Dapa: Dapagliflozin. DM: KK-Ay/TaJcl mice. Control: C57BL/6j mice.

2. TEWL および角層水分量への影響

KK-Ay/TaJcl および対照マウスの TEWL (Fig. 2A) と角層水分量 (Fig. 2B) の両方を測定した。その結果、4 群間で TEWL に有意な差は見られなかった。一方、角層水分量は、KK-Ay/TaJcl マウスが対照マウスより減少し、ダパグリフロジン投与 KK-Ay/TaJcl マウスは Control 対照マウスの約半分まで減少した。

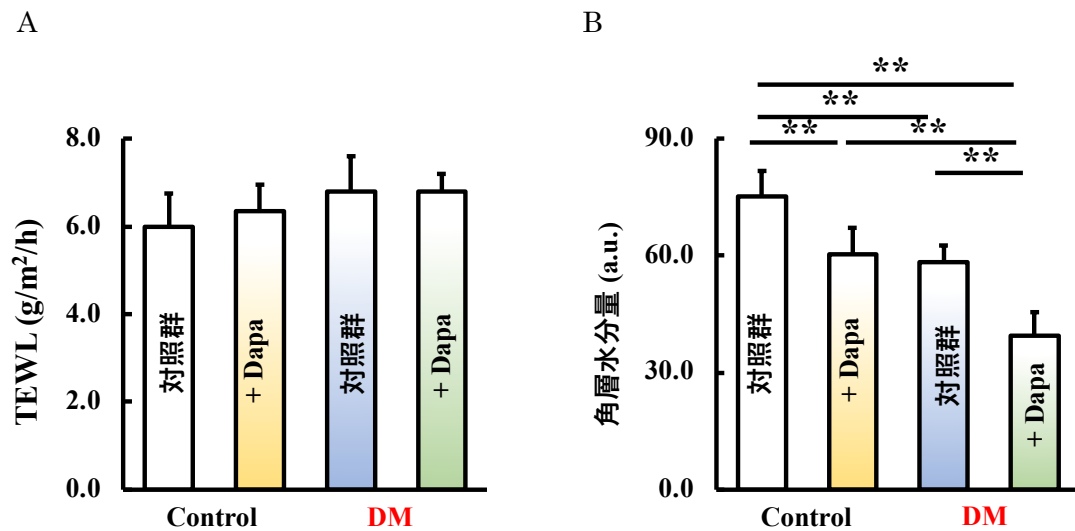


Fig. 2. Effect of Dapagliflozin Treatment on TEWL (A) and Skin Hydration (B) in KK-Ay/TaJcl Mice

Values are expressed as the mean \pm S.D. of five animals. ** $P < 0.01$.

Dapa: Dapagliflozin. DM: KK-Ay/TaJcl mice. Control: C57BL/6j mice.

3. 皮膚コラーゲンへの影響

皮膚コラーゲン発現量は、KK-Ay/TaJcl マウスでは対照マウスより減少した (Fig.3)。

KK-Ay/TaJcl マウスにおいては、ダパグリフロジン投与群が対照群より増加した。

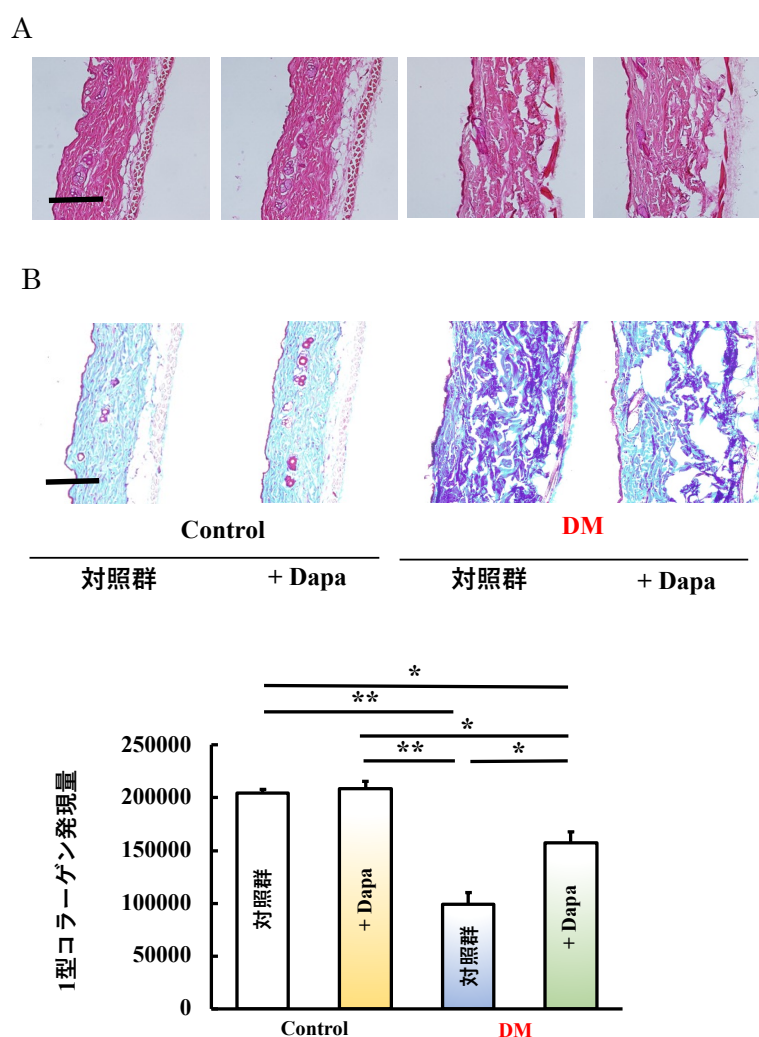


Fig. 3. Effect of Dapagliflozin Treatment on Collagen Type I Expression in the Dorsal Skin of KK-Ay/TaJcl Mice

Histological analysis of skin sections, performed using hematoxylin–eosin staining (A) and Masson-trichrome staining (B). The data show one representative experiment performed on five animals. Values are expressed as the mean \pm SD derived from five animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Scale bar = 100 μ m.

Dapa: Dapagliflozin. DM: KK-Ay/TaJcl mice. Control: C57BL/6j mice.

4. IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β への影響

血漿中の TNF- α (Fig. 4A), IL-6 (Fig. 4B) および IL-10 (Fig. 4C) 濃度が KK-Ay/TaJcl マウスで増加した。ダパグリフロジンを投与した KK-Ay/TaJcl マウスでは、TNF- α は KK-Ay/TaJcl マウスと差がなかったが、IL-6 と IL-10 は KK-Ay/TaJcl マウスと比較して 2 倍増加した。一方、TGF- β 濃度 (Fig. 4D) は KK-Ay/TaJcl マウスの方が対照マウスよりも減少し、ダパグリフロジン投与 KK-Ay/TaJcl マウスでは、TGF- β 濃度が KK-Ay/TaJcl マウスよりもさらに減少した。

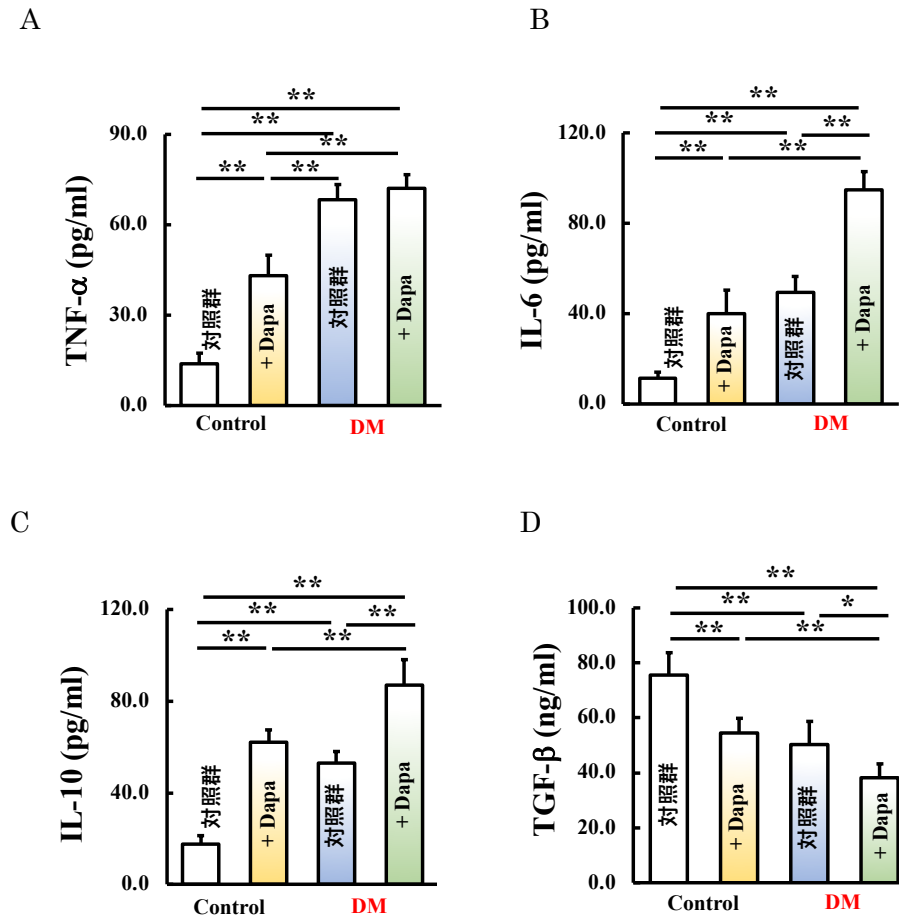


Fig. 4. Effect of Dapagliflozin Treatment on the Plasma Levels of TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C), and TGF- β in KK-Ay/TaJcl Mice

We measured the plasma levels of TNF- α , IL-6, IL-10, and TGF- β in mice using ELISA. Values are expressed as the mean \pm SD derived from five animals.* P < 0.05, ** P < 0.01. Dapa: Dapagliflozin.DM: KK-Ay/TaJcl mice.Control: C57BL/6j mice.

5. HAS2、ヒアルロニダーゼおよびヒアルロン酸への影響

KK-Ay/TaJcl マウスの HAS2 レベルは、対照群に比べ減少した (Fig. 5A)。さらに、ダパグリフロジン投与 KK-Ay/TaJcl マウスの HAS2 濃度は、KK-Ay/TaJcl マウスの HAS2 より半分減少した。逆に、ヒアルロニダーゼは KK-Ay/TaJcl マウスで増加し、ダパグリフロジン投与 KK-Ay/TaJcl マウスでは 1.6 倍増加した (Fig. 5B)。ヒアルロン酸値は、KK-Ay/TaJcl マウスでは対照マウスよりも減少していた。さらに、ダパグリフロジン投与 KK-Ay/TaJcl マウスでは、ヒアルロン酸値が KK-Ay/TaJcl マウスよりも大きく減少した (Fig. 5C)。

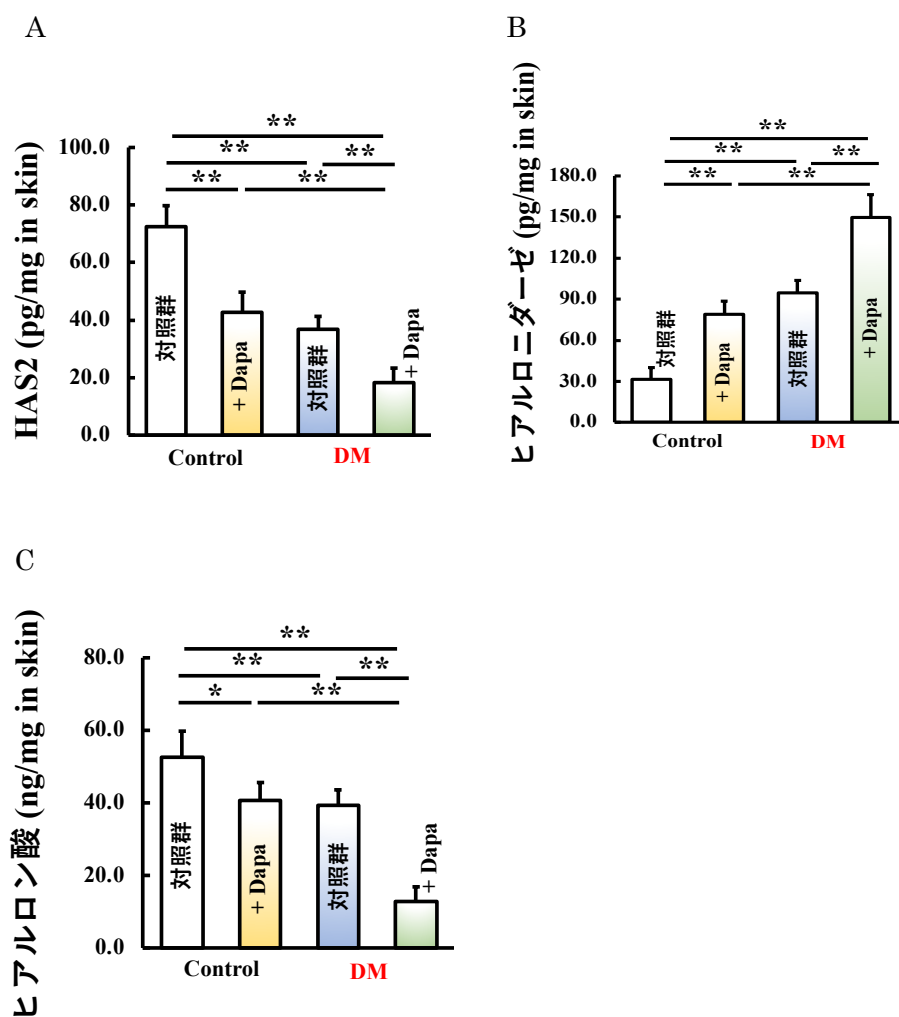
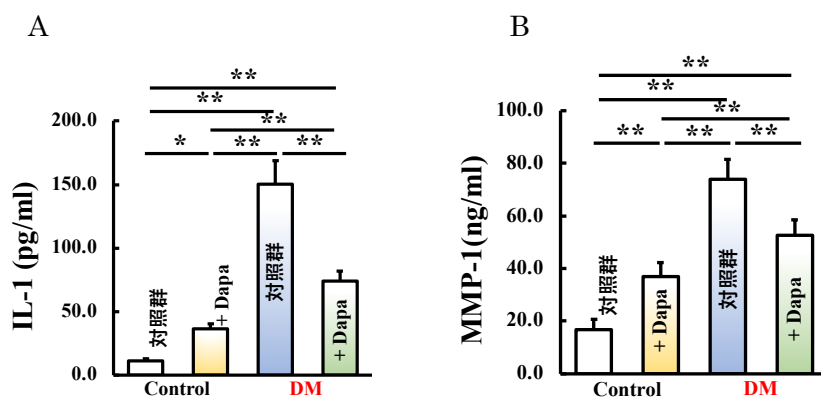


Fig. 5. Effect of Dapagliflozin Treatment on the Skin Levels of HAS2 (A), Hyaluronidase (B), and Hyaluronic Acid (C) in KK-Ay/TaJcl Mice

We measured the levels of HAS2, hyaluronidase, and hyaluronic acid in the skin of mice using ELISA. Values are expressed as the mean \pm SD derived from five animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Dapa: Dapagliflozin. DM: KK-Ay/TaJcl mice. Control: C57BL/6j mice.

6. IL-1, MMP-1 およびマスト細胞への影響

血漿中 IL-1 (Fig. 6A) および MMP-1 (Fig. 6B)、マスト細胞の発現 (Fig. 6C) は KK-Ay/TaJcl マウスが最も増加し、この発現はダパグリフロジン投与後に減少した。特にマスト細胞と IL-1 は半分にまで減少した。



C

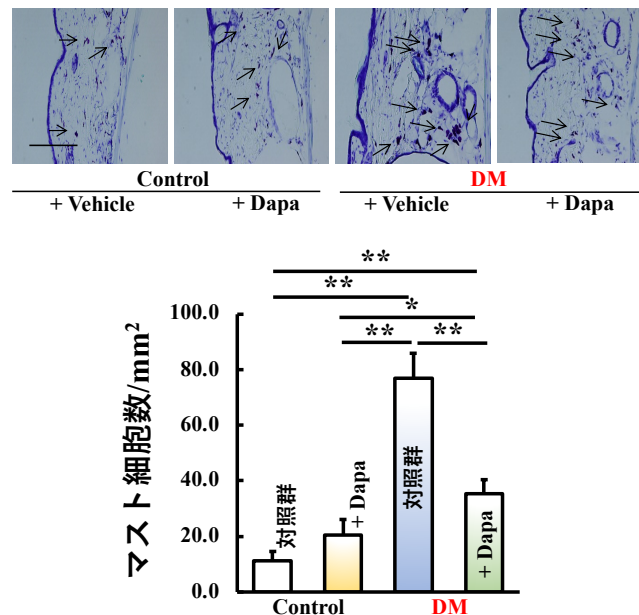


Fig. 6. Effect of Dapagliflozin Treatment in KK-Ay/TaJcl Mice on the Expression of Mast Cells (C) in the Dorsal Skin and Levels of IL-1 (A) and MMP-1 (B) in the Plasma. Arrows indicate mast cells. The expression of mast cells in skin sections was determined using toluidine blue staining. The data show one representative experiment performed on five animals. Scale bar = 100 μ m. The plasma levels of IL-1 and MMP-1 in mice were measured using an ELISA kit. Values are expressed as mean \pm S.D. derived from five animals. *P < 0.05, **P < 0.01.

Dapa: Dapagliflozin. DM: KK-Ay/TaJcl mice. Control: C57BL/6j mice.

第4節 考察

本研究では、KK-Ay/TaJcl マウスにおける乾燥皮膚発現は、ダパグリフロジン投与後に顕著に悪化した。KK-Ay/TaJcl マウスでは、総コラーゲン発現量が減少したが、ダパグリフロジン投与によりコラーゲン発現量の減少は抑制された。また、KK-Ay/TaJcl マウスにおいて血漿中の TNF- α 、IL-6、IL-10 は、対照マウスより増加した。さらに、ダパグリフロジンの投与により IL-6、IL-10 は増加した。逆に、TGF- β は、KK-Ay/TaJcl マウスで対照マウスに比べて減少し、ダパグリフロジン投与後さらに減少した。HAS2 とヒアルロン酸は、

KK-Ay/TaJcl マウスに比べ、ダパグリフロジン投与により有意に減少し、ヒアルロニダーゼは有意に増加した。さらに、IL-1、MMP-1、およびマスト細胞数は、KK-Ay/TaJcl マウスでは対照マウスより有意に増加した。一方、ダパグリフロジン投与 KK-Ay/TaJcl マウスでは KK-Ay/TaJcl マウスより減少した。KK-Ay/TaJcl マウスでは乾燥皮膚が起こり、ヒアルロン酸やコラーゲンの減少がその原因として考えられる。この糖尿病モデルマウスは肥満モデルで、コラーゲンの減少の原因は、肥満に起因する糖尿病によって引き起こされる炎症であると考えられた。炎症性サイトカインである IL-1 の濃度が上昇すると、マスト細胞が活性化され⁵⁰⁾、コラーゲン分解酵素である MMP-1 の分泌を促し、コラーゲンの減少につながる⁵¹⁾。IL-6 は、ヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼを合成し、ヒアルロン酸を分解することから^{52,53)}、ダパグリフロジン投与 KK-Ay/TaJcl マウスでは、ヒアルロニダーゼが KK-Ay/TaJcl マウスに比べ 1.6 倍の増加により、ヒアルロン酸は 3.3 倍減少した。

KK-Ay/TaJcl マウスにダパグリフロジンを投与することで、TGF- β の低下と IL-10 が上昇した。IL-10 は炎症性サイトカインを抑制し、コラーゲンの分解を抑制する^{54,55)} ことから、ダパグリフロジンを投与した KK-Ay/TaJcl マウスでは、KK-Ay/TaJcl マウスと比べ乾燥が抑制されると考えられている。しかし、本研究では、ダパグリフロジンを投与した KK-Ay/TaJcl マウスは、KK-Ay/TaJcl マウスと比較して皮膚乾燥が悪化していた。ヒアルロン酸の合成を促進する⁵⁶⁾ TGF- β は、ダパグリフロジン投与により抑制され HAS が減少し、その結果ヒアルロン酸量が減少した。ダパグリフロジン投与によりコラーゲン量は増加するが、ヒアルロン酸の減少が乾燥皮膚に強く関与していることが示された。また、ダパグリフロジン投与により、血糖値の改善は認められたものの、肥満の改善は認められなかった。したがって、脂肪細胞由来の炎症性サイトカインの放出やヒアルロン酸の分解が抑制されなかった可能性がある。さらに、対照マウスにダパグリフロジンを投与したところ、乾燥皮膚が誘発された。ダパグリフロジンを投与すると、対照群では IL-1、IL-6、TNF- α などの

炎症性サイトカインが上昇し、この炎症性サイトカインがヒアルロン酸を分解していると考えられた。しかし、ダパグリフロジンがこれらのサイトカインにどのような影響を与えるかは不明である。

これまでダパグリフロジンの皮膚をはじめとした各臓器への影響についての報告はない。本研究が、ダパグリフロジンによる皮膚への影響を 初めて乾燥皮膚として捉えた成果である。

第5節 小括

本研究では、KK-Ay/TaJcl (2 型糖尿病モデル) マウスにおいて、乾燥皮膚が観察された。さらに、抗糖尿病薬である SGLT-2 阻害薬のダパグリフロジンの投与により、乾燥皮膚がより悪化した。KK-Ay/TaJcl マウスの乾燥皮膚は、IL-1/マスト細胞/MMP-1 系による I 型コラーゲンの減少によるものが大きいと考えられる。ダパグリフロジン投与後、TGF- β /HAS 経路が抑制され、ヒアルロン酸量の減少が誘導された。さらに IL-6/ヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸が減少した結果である (Fig. 7)。このことよりダパグリフロジン投与による乾燥皮膚発現にはヒアルロン酸の減少が大きく関わっていることが示唆された。

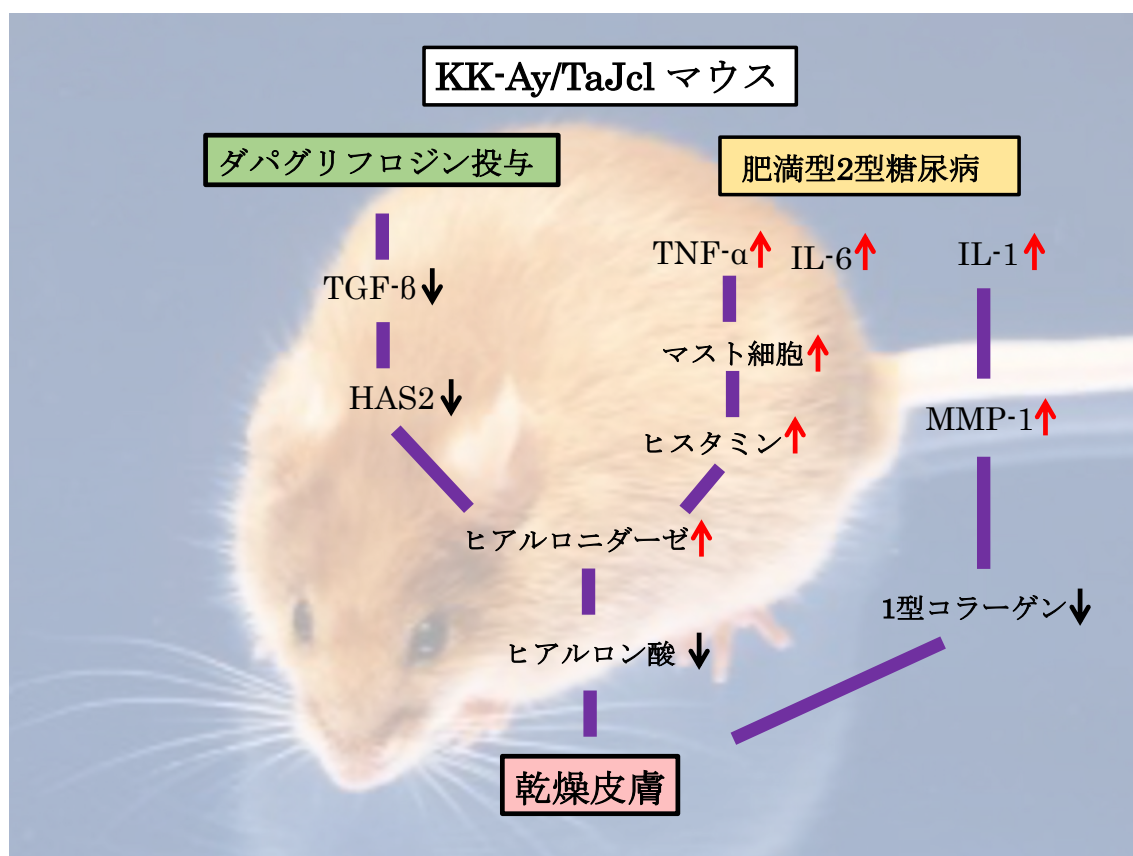


Fig. 7. Mechanism of Dapagliflozin-Induced Exacerbation of Skin Dryness in Diabetic Model Mice

結論

本研究では、近年増加が著しい糖尿病患者における皮膚障害に関して 1 型と 2 型、非肥満と肥満の特性と、新規糖尿病治療薬の SGLT-2 阻害薬であるダパグリフロジン投与における皮膚障害への影響については、炎症を惹起させる乾燥皮膚誘導機構である真皮内保湿物質のコラーゲンとヒアルロン酸に関与する変動因子の検討を行った。

第 1 章では、糖尿病マウスを 1 型糖尿病、2 型糖尿病（非肥満型、肥満型）のモデルとして再現した。すべてのモデルにおいて血糖値の上昇とともに AGEs の上昇が見られた。特に 1 型糖尿病マウスにおいては約 2 倍以上増加することで、高血糖状態となり AGE-RAGE 系を誘導して MMP-9 発現量を促進させ、結果として IV 型コラーゲンの分解が観察された。

これにより基底膜の破壊から皮膚からの水分蒸散が進み乾燥皮膚への誘導となった。これにより TEWL は、型糖尿病マウスのみ有意に増加したと考えられる。2 型糖尿病マウスの肥満型においては、脂肪細胞から炎症性サイトカインの TNF- α 、IL-6 が放出されマスト細胞を刺激することでヒスタミンが分泌される。このヒスタミンがヒアルロニダーゼを活性化しヒアルロン酸を分解することで乾燥皮膚が生じたと考えられる。2 型糖尿病マウスの角質水分量は著しく減少していることから肥満型 2 型糖尿病マウスの乾燥皮膚が最も顕著に発現した。非肥満型 2 型糖尿病マウスにおいてはさらなる検証が必要と思われる。

第 2 章では、肥満型 2 型糖尿病マウスを使って、ダパグリフロジン投与における乾燥皮膚発現メカニズムを確認した。Control 対照群にダパグリフロジンを投与すると IL-1、マスト細胞、MMP-1 の増加が見られたが、I 型コラーゲン発現量に大きな変化は見られなかった。次に肥満型 2 型糖尿病マウスにダパグリフロジンを投与すると、IL-1、マスト細胞、MMP-1 が減少して I 型コラーゲン量が増加した。これは、ダパグリフロジン投与により血糖値が大きく減少にて改善したことで AGEs が減少し炎症性サイトカインである IL-1 の減

少がⅠ型コラーゲンの分解を抑えたと推測されるが、今後の検証が必要である。肥満型 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、TGF- β の減少により HAS が減少し、ヒアルロン酸の合成が減少することで乾燥皮膚に導かれた。同時に、抑制性サイトカインである IL-10 が増加したにも関わらず、炎症性サイトカインの IL-6 が増加することで、ヒアルロニダーゼが増加してヒアルロン酸が分解されて減少した。これにより乾燥皮膚が生じた (Fig.7)。この IL-10 は対照に比べてダパグリフロジン投与、肥満型 2 型糖尿病、そして肥満型 2 型糖尿病マウスにダパグリフロジン投与の全てで増加している。本来は抑制性サイトカインであることからこれに関しても検証が必要である。

以上のことから、糖尿病のタイプにより乾燥皮膚発現の機序が異なり、特に 2 型糖尿病における肥満はさらに乾燥皮膚を助長していることが確認された。コラーゲン量は、肥満型 2 型糖尿病マウスで減少したにも関わらずダパグリフロジン投与において増加しているが、乾燥皮膚は悪化していた。これによりコラーゲンの影響よりダパグリフロジン投与時の乾燥皮膚にはヒアルロン酸の減少が大きく関わっていることが示唆された。

ダパグリフロジンをはじめとする SGLT-2 阻害薬は、糖尿病治療だけではなく心血管イベントの抑制効果など、臨床での使用経験が増すごとに新たな知見が報告されてきている。しかし、臨床現場で患者からの訴えが多いものの、皮膚障害に関する報告が少ないことが、指摘されている。本研究では、糖尿病特有の皮膚生理機能を明らかにし、さらに治療薬の一つであるダパグリフロジンの投与による皮膚障害発現の可能性についても示唆することができた。糖尿病治療は、厳格な血糖管理が極めて重要であることは周知の事実である。しかし、治療が長期化するために皮膚症状の出現も患者の QOL 低下の観点から決して軽視することはできない。糖尿病による皮膚症状は、臨床上での治療優先順位は決して高くはないが、漫然と治療されている可能性が高い。その様な背景も考えると、我々の研究は、糖尿病治療において皮膚症状にも留意すべき根拠を提示するものであり、今後の臨床現場において大いに参考になる有益な情報を提示したものであると考えられる。

引用文献

- 1) Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N.Engl. J. Med*, 346, 393-403, 2002.
- 2) 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.
- 3) Kitagawa Y, Kanatsuna T, Kajiyama S, Nakamura N, Nakamura Y, et al. Islet cell surface antibodies preferentially inhibit glucose-stimulated insulin release in vitro. *Diabetes Res Clin Pract*, 9(1), 7-13, 1990.
- 4) Nakamura N, Woda BA, Tafuri A, Greiner DL, Reynolds CW, et al. Intrinsic cytotoxicity of natural killer cells to pancreatic islets in vitro. *Diabetes*, 39(7), 836-843, 1990.
- 5) Matsuoka T, Kajimoto Y, Watada H, Kaneto H, Kishimoto M, et al. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J Clin Invest*, 99(1), 144-150, 1997.
- 6) Tiedge M, Lortz S, Drinkgem J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46, 1733-1742, 1997.
- 7) Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem*, 268(35), 26055-26058, 1993.
- 8) Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, et al. Proteolytic cleavage product of 30-KDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(4), 2005-2010, 2001.
- 9) Sasaki S, Kikuchi K, Satoh J, Tagami H, Inoue S. Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis. *Br J Dermatol*, 153(2), 319-323, 2005.

- 10) Arai S, Konaka R, Wakita K, Katsuoka K, Kanamori A. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus in inpatients. *Jpn J Dermatol*, 119, 2359-2364, 2009.
- 11) Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*, 26(2), 510-513, 2003.
- 12) Schuetz P, Castro P, Shapiro NI. Diabetes and sepsis: preclinical findings and clinical relevance. *Diabetes Care*, 34(3), 771-778, 2011.
- 13) Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother*;29: 91-98. 1963.
- 14) Brosky G, Logothetopoulos J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes*, 18(9), 606-611. 1969.
- 15) Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*, 48(11), 2129-2139, 1969.
- 16) Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*, 22(4), 485-518, 1970.
- 17) Herr RR, Eble TE, Bergy ME, Jahnke HK. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot Annu*, 7, 236-240, 1959-1960.
- 18) Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 126(1), 201-205, 1967.
- 19) Giroix MH, Portha B, Kergoat M, Bailbe D, Picon L. Glucose insensitivity and amino-acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes. A study with the perfused pancreas. *Diabetes*, 32(5), 445-451, 1983.
- 20) Tsuji K, Taminato T, Usami M, Ishida H, Kitano N, et al. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. *Metabolism*, 37(11), 1040-1044, 1988.
- 21) Wang RN, Bouwens L, Kloppel G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia*, 37(11), 1088-1096, 1994.
- 22) Ninimiya H, Inomata T, Ogihara K. Obstructive uropathy and hydronephrosis in male KK-Ay mice: a report of cases. *J Vet Med Sci*, 61(1), 53-57, 1999.

- 23) Ishikawa Y, Takeno H, Watanabe K, Tani T. Lipogenic action of the novel oral antidiabetic Agent HQL-975 in genetically obese diabetic KK-Ay mice. *Biol Pharm Bull.* 22(6), 572-576,1999.
- 24) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin induced small intestine injury in mice. *Exp Dermatol*, 23(9), 659–663, 2014.
- 25) Bekerredjian R, Walton CB, MacCannell KA, Ecker J, Kruse F, et al. Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS One*, 5(7),e11693,2010.
- 26) Yamagishi S, Imaizumi T. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des*,11(18),2279-2299,2005.
- 27) 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.
- 28) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GL. 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.
- 29) Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011; 121(6): 2111–2117.
- 30) Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*,11(2), 98-107, 2011.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) Okayama Y. The roles of mast cells in human skin allergic diseases. *Jpn J Vet Dermatol*, 21(3), 137-141, 2015.
- 34) 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.
- 35) Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med*, 358, 580–591, 2008.
 - 36) Sakai S, Kikuchi K, Satoh J, Tagami H, Inoue S. Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis. *Br. J. Dermatol*, 153, 319–323, 2005.
 - 37) Sreebny LM, Valdini A, Yu A. Xerostomia. Part II: relationship to nonoral symptoms, drugs, and diseases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*, 68, 419–427, 1989.
 - 38) Sekijima H, Goto K, Hiramoto K, Komori R, Ooi K. Characterization of dry skin associated with type 2 diabetes mellitus using the KK-Ay/TaJcl mouse model. *Cutan. Ocul. Toxicol*, 37, 391–395, 2018.
 - 39) Horikawa T, Hiramoto K, Goto K, Sekijima H, Ooi K. Differences in the mechanism of type 1 and 2 diabetes-induced skin dryness by using model mice. *Int. J. Med. Sci*, 18, 474–481, 2021.
 - 40) Iddamalgoda A, Le QT, Ito K, Tanaka K, Kojima H, Kido H. Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extracellular matrix and basement membrane proteins. *Arch. Dermatol. Res*, 300 Suppl. 1, S69–S76, 2008.
 - 41) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Exp. Dermatol*, 23, 659–663, 2014.
 - 42) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impaired skin barrier function in mice with colon carcinoma induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Biol. Pharm. Dermatol*, 38, 947–950, 2015.
 - 43) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Chronic liver injury in mice promotes impairment of skin barrier function via tumor necrosis factor- α . *Cutan. Ocul. Toxicol*, 35, 194–203, 2016.
 - 44) Goto K, Hiramoto K, Kita H, Ooi K. Role of mast cells in the induction of dry skin in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Cutan. Ocul. Toxicol*, 37, 61–70,

2018.

- 45) Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci. Rep*, 2, 799,2012.
- 46) Hiramoto K, Sugiyama D, Takahashi Y, Mafune E. The amelioration effect of tranexamic acid in wrinkles induced by skin dryness. *Biomed. Pharmacother*, 80, 16–22, 2016.
- 47) Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Nagashima M, Kushima H, Watanabe T, Hirano T. Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor presents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice. *PLOS ONE*, 10, e0143396, 2015.
- 48) 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*, 8, 186–195, 1995.
- 49) Bekerredjian R, Walton CB, MacCannell KA, Ecker J, Kruse F, Outten JT, Sutcliffe D, Gerard RD, Bruick RK, Shohet RV. Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS ONE*, 5, e11693,2010.
- 50) Nagano T, Nakamura M, Nishida T. Differential regulation of collagen degradation by rabbit keratocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Curr. Eye Res.*, 24, 240–243 2002.
- 51) Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces of the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J. Biol. Chem.*, 266, 2017–2020, (1991).
- 52) 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.
- 53) Wang Z, Guo C, Xu Y, Liu G, Lu C, Liu Y. Two novel functions of hyaluronidase from streptococcus agalactiae are enhanced intracellular survival and

- inhibition of proinflammatory cytokine expression. *Infect. Immun*, 82, 2615–2625, 2014.
- 54) Park SY, Lee YS, Lee SY, Lee SW, Hong KW, Kim CD. Multitarget-based cotreatment with cilostazol and celecoxib synergistically suppresses collagen-induced arthritis in mice by enhancing interleukin-10 expression. *Int. Immunopharmacol*, 73, 461–470, 2019.
- 55) Kim YI, Oh WS, Song PH, Yun S, Kwon YS, Lee YJ, Ku SK, Song CH, Oh TH. Anti-photoaging effects of low molecular-weight fucoidan on ultraviolet B-irradiated mice. *Mar. Drugs*, 16, 286, 2018.
- 56) Sugiyama Y, Shimada A, Sayo T, Sakai S, Inoue S. Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF- β upregulates their expression in cultured human skin cells. *J. Invest. Dermatol*, 110, 116–121, 1998.

謝辞

本研究に際して、終始一貫して御懇切なる御指導、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。

本学位論文の審査にあたり、種々の御助言と御指導を賜りました、鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 飯田靖彦教授、藤川隆彦教授、大倉一人教授、郡山恵樹教授ならびに坂晋准教授、榎屋友幸准教授に深く感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 平本恵一助教ならびに田中章太助手に深謝の意を表します。

本研究の遂行において、有益な御助言と御教示を賜りました、三重大学法医法科学分野 関島秀久博士、ニチニチ製薬株式会社 五藤健児博士に深く感謝いたします。

研究生生活において様々なご助言をいただき、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。

最後に、長年の大学院生活において、理解を持って応援し支えてくれた、両親をはじめアルフレッサ株式会社 上野支店の関係諸氏に心から感謝いたします。

Abstract

Moisturizing ability in diabetic mice and skin injury caused by dapagliflozin

Introduction

In our laboratory, we have used model mice to elucidate the mechanism of dry skin development caused by inflammatory diseases such as enteritis, colitis, and arthritis¹⁾⁻³⁾. Currently, most of the research on dry skin in diabetes mellitus is due to dehydration due to hyperglycemia and decreased sweat glands. The purpose of this study was to elucidate the induction mechanism to collagen and hyaluronic acid that express dry skin. The skin is the largest organ in the human body and plays a role in maintaining the homeostasis of the body by regulating transepidermal water loss (TEWL) and stratum corneum water content while preventing the intrusion of external factors such as temperature, humidity, and foreign substances. Skin consists of epidermis, dermis and subcutaneous tissue. In the epidermis, the stratum corneum, the outermost layer, maintains the skin barrier function through the turnover of keratinocytes. If this skin barrier function is lowered for some reason, it will lead to the development of dry skin. In this study, we investigated the mechanism of dry skin development in diabetes, which is one of chronic inflammation, in model mice of type 1 diabetes and type 2 diabetes (nonobese and obese). Next, dapagliflozin, a sodium-glucose cotransporter (SGLT)-2 inhibitor, a new antidiabetic drug that was listed in the NHI drug price list in 2014, was reported to develop skin disorders in patients who took it after its launch. The Japan Diabetes Association issued a “recommendation for the proper use of SGLT-2 inhibitors” and stated that administration should be discontinued in severe cases. By administering this dapagliflozin to type 2 diabetes model mice, we clarified the mechanism of dry skin development.

Chapter 1 About the difference in dry skin development mechanism in type 1 diabetes and type 2 diabetes model mice

In this chapter, we investigated the variables involved in collagen and hyaluronic acid

that lead to dry skin in type 1 diabetes and type 2 diabetes (non-obese and obese) mice.

Streptozotocin (STZ)-administered male mice (C57BL/6N) were treated as type 1 diabetes mellitus (STZ mice) at 10 weeks of age, and non-obese type 2 diabetes mellitus (N-STZ mice) at 2 days of age (very young). And male mice (KK-Ay/TaJcl 14 weeks old) were used as obese type 2 diabetic (KK-Ay/TaJcl mice). First, when TEWL and stratum corneum water content were measured, TEWL was significantly higher in STZ mice, and stratum corneum water content was significantly lower in all diabetic model mice than in the control group. Advanced glycation end products (AGEs) increased in all diabetic model mice, especially STZ mice showed a 2.8-fold increase. Total collagen content decreased in all diabetic model mice compared to the control group, and a particularly large decrease was observed in type 2 diabetic mouse groups (N-STZ, KK-Ay/TaJcl). The expression level of type IV collagen was significantly decreased in STZ mice, and no change was observed in type 2 diabetes model mice.

dry skin was observed in all diabetic model mice. However, the expression mechanisms of dry skin in both cases were different. In type 1 diabetes model mice, hyperglycemia persists with the accumulation of AGEs⁴⁾, and the expression of the receptor AGEs (RAGE) increases matrix metalloproteinase (MMP)-9 and increases type IV collagen in the basement membrane. TEWL increased by decomposing, and it is thought that dry skin was induced⁵⁾⁻⁷⁾. In non-obese type 2 diabetes mellitus (N-STZ mice), an increase in MMP-9 and degradation of type IV collagen were not observed, but inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 increased and hyaluronic acid production increased. A decrease was seen. In type 2 diabetic obese mice, oncolytic factor (TNF)- α is abundantly released from obese adipose tissue⁸⁾, and interleukin (IL)-6, an inflammatory cytokine, activates mast cells to release histamine⁹⁾⁻¹²⁾. Hyaluronic acid is decomposed by this, leading to dry skin due to decreased moisturizing power.

Chapter 2: Dry skin developed by dapagliflozin administration in KK-Ay/TaJcl mice

In this chapter, KK-Ay/TaJcl mice (type 2 diabetic mice) were orally administered an SGLT-2 inhibitor (1 mg/kg/day) daily for 4 weeks. This study used 10-week-old male SPF C57BL/6N and KK-Ay/TaJcl mice (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan). First, TEWL did not show a significant difference in all mice, but stratum corneum water content decreased in type 2 diabetic mice compared to controls, and was further decreased by administration of dapagliflozin. The expression level of type I collagen decreased in type 2 diabetes model mice, but was increased by administration of dapagliflozin. This was due to an increase in type I collagen due to a decrease in MMP-1 resulting from an increase in inhibitory cytokine IL-10 and a decrease in inflammatory cytokine IL-1¹³⁾⁻¹⁴⁾. When dapagliflozin was administered to diabetic mice, there was no significant change

in the inflammatory cytokine (TNF)- α , but IL-6 was increased, resulting in an increase in hyaluronidase¹⁵⁾⁻¹⁶⁾, and further inducing transforming proliferation. Decreased hyaluronic acid synthase (HAS) 2 was caused by decreased factor (TGF)- β , leading to dry skin. Therefore, it was confirmed that the decrease in hyaluronic acid rather than collagen caused dry skin in dapagliflozin administration.

Conclusion

In previous research at the laboratory, it was clarified that inflammatory diseases such as enteritis induce skin disorders, and in this study, we investigated the characteristics of skin physiology due to diabetes, which is one of the chronic inflammatory diseases. . As a result, each cytokine and the mast cells that release them are greatly involved in the fluctuation of collagen and hyaluronic acid, which are moisturizing factors, in the development of dry skin that causes skin disorders. It was confirmed that the expression mechanism of dry skin is different between the non-obese type and the obese type. Blood sugar control is also important because the increase in AGEs due to hyperglycemia is one of the factors. It was suggested that the reduction of hyaluronic acid during administration of dapagliflozin is a major factor of dry skin.

- 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.