

【9】

氏 名	小 ^こ 林 ^{ばし} 圭 ^{けい} 介 ^{すけ}
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第840号
学位授与の日付	令和5年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (先端内科学)
学位論文題目	Oestrogen inhibits psoriasis-like dermatitis induced by imiquimod in mice in relation to increased IL-10 producing cells despite elevated expression of IL-22, IL-23, IL-17 mRNA (エストロゲンは、IL-22、IL-23、IL-17mRNAの発現上昇にもかかわらず、IL-10産生細胞の増加と関連して、マウスのイミキモドによる乾癬様皮膚炎を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 井 川 健 (副査) 教授 橋 本 貢 士 教授 松 原 知 代

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

尋常性乾癬は、IL-23/IL-17炎症を基軸とし、あらゆる年齢層に発症する複雑な病態を有した皮膚疾患である。女性ホルモンも発症や経過に影響を及ぼす因子とされ、乾癬の思春期発症、妊娠時の改善や悪化、閉経後や卵巣摘出後の悪化、性周期での症状の変動など、女性ホルモン、中でもエストロゲンが病態に強く影響することが推測されている。しかし、乾癬におけるエストロゲンの効果やメカニズムへの研究は少ない。本研究でその一部を明らかにすることは、乾癬の更なる病態解明につながると思われる。

【目 的】

本研究では、imiquimod (IMQ) によって誘発されたマウスの乾癬様皮膚炎に、エストロゲンがどのような影響を与え、17 β -エストラジオール (E2) が乾癬様皮膚炎の重症度にどのような影響を与えるかのメカニズムを解析する。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行なった。

8週齢の雌C57BL/6マウスおよびBALB/cマウスを使用し、卵巣摘出術 (OVX群)、ホルモン補充療法 (HRT群)、コントロール (Sham群) の処置をIMQ塗布の1週間前に施行した。HRTは、OVX

直後にE2の最大生理的濃度を維持する徐放性0.025 mg (for 60 days) E2錠を皮下に埋入した。乾癬様皮膚炎モデルは、剃毛後にIMQを5日間連日塗布して作成し、紅斑、鱗屑、浸潤の臨床スコアにより評価した。

IMQの最終塗布から24時間後に皮膚を採取し、real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) による各種サイトカインmRNA発現解析、フォークヘッドボックスP3 (Foxp3)、Ki-67、ケラチン6、ロリクリン、インボルクリンの免疫染色およびヘマトキシリン・エオジン染色を行った。各グループには少なくとも6匹のマウスが含まれており、すべての実験を少なくとも3回繰り返した。2群間の比較は、Student's t検定を用いて分析した。p<0.05を有意とみなした。

【結 果】

臨床スコアはOVXマウス、Shamマウス、HRTマウスの順で高いが、HRTマウスで皮膚の浸潤が弱い以外には統計的有意差はなかった。

浸潤細胞数、好中球数、表皮中のKi-67陽性細胞数は、OVXマウス、Shamマウス、HRTマウスの順で多かった。ロリクリンとインボルクリンの免疫染色では、OVXマウスとShamマウス間で同程度であり、HRTマウスよりも発現が低下していた。これらのデータから、HRTマウスはOVXマウスやShamマウスに比べて、乾癬様皮膚炎の重症度が低く、OVXマウスはShamマウスよりも高度な皮膚炎が誘発された。しかし、HRTマウスの中には、ShamやOVXマウスより程度は低いものの、高度な皮膚炎を生じるマウスも混在していた。

皮膚のRT-PCRでは、HRTマウスのIL-10が有意に増加した。IL-17、IL-22、IL-23は、Shamマウスと比較して、HRTマウスで有意に上昇した。OVXマウスにおけるIL-22、IL-23は、Shamマウスよりも高く、HRTマウスと同等であった。Foxp3陽性の細胞数は、HRTマウスで他群より多かった。IL-10の免疫蛍光染色はHRTマウスの大細胞で陽性となったが、Shamマウス、OVXマウスでは観察されなかった。

IMQ塗布後にマウスを1時間鎮静状態に保つため、上述の実験系はメドミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの混合物による腹腔内麻酔を用いた。セボフルランによる吸入麻酔下でIMQ外用を行った実験系（IMQ塗布後に鎮静が保てないために、結果的に外用が不十分と判断）では、好中球浸潤が少ないなど全体に炎症誘導が弱かった。吸入麻酔下での実験系では、OVXマウス、Shamマウスと比べて、HRTマウスでの炎症の減弱、IL-10 mRNA発現亢進、IL-10陽性細胞出現、Foxp3陽性細胞増加は上述の実験系と同様だが、IL-17、IL-23 mRNAの発現は抑制されていた。

【考 察】

本研究では、生理的血中濃度を誘導する量のE2投与による乾癬様皮膚炎への抑制効果とIL-10 mRNA、IL-10陽性細胞、Foxp3陽性細胞の増加の関連性が明らかとなった。

E2の効果は、皮膚炎が完全に誘発された場合と、不完全に誘発された場合とで異なる反応であった。好中球浸潤を伴う乾癬様皮膚炎を誘発した場合、HRTは好中球浸潤を抑制していたが、乾癬様皮膚炎を悪化させる可能性のある紅斑スコアおよびIL-22、IL-23のmRNA発現は増加していた。一方、HRTは好中球浸潤の少ない乾癬様皮膚炎では、皮膚炎を抑制し、IL-17、IL-23、CCL20のmRNA発現

も抑制した。

E2の抑制効果はIL-10 mRNA、IL-10陽性細胞の増加と関連しており、制御性免疫応答が誘導されたと考えられる。IL-10と乾癬の抑制との関連性は、治療に成功した患者や乾癬モデルマウスで繰り返し検証されているが、IL-10による乾癬患者への治療効果は限定的である。本研究におけるE2による乾癬様皮膚炎の部分的抑制とIL-10の増加は、従来の臨床および研究結果と一致している。

また、興味深いことに、HRTを投与したマウスの中には、IL-10 が誘導されているにもかかわらず、強固な皮膚炎を示したものがあつた。この現象は、OVXマウスやShamマウスと比較して、HRT投与マウスではIL-17、IL-22、IL-23のmRNAレベルが上昇していることと関連している可能性がある。一方、皮膚炎が不完全に誘発された実験系では、HRTはIL-17、IL-23のmRNAを抑制した。このことから、HRTによるIL-10の誘導は、E2の生理的な最大値で、乾癬様皮膚炎の発症を抑制する閾値に近いと思われる。あるいは、IL-10を介したE2の抑制効果が損なわれた場合、IL-23やIL-22の誘導を介して、E2が乾癬様皮膚炎の誘発・増悪を促進する可能性もある。HRTでは、表皮分化分子のロリクリンとインボルクリンの発現が増強しており、E2による乾癬様皮膚炎の抑制には、エストロゲンによる表皮の分化促進作用が関与している可能性も考えられる。

【結 論】

エストロゲンは、免疫学のおよび表皮の修飾を介して乾癬様皮膚炎の病態に影響を及ぼす可能性がある。これらの作用はヒト乾癬に直接関連しないかもしれないが、エストロゲンの乾癬様皮膚炎に対する保護作用への豊富な支持的データとともに、これらの知見は、同様のメカニズムがヒト乾癬の病因に寄与し、乾癬の治療において考慮されるべきことを示唆するものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

尋常性乾癬は、IL-23/IL-17炎症を基軸とし、あらゆる年齢層に発症する複雑な病態を有した皮膚疾患である。女性ホルモンも発症や経過に影響を及ぼす因子とされ、中でもエストロゲンが病態に強く影響することが推測されているが、乾癬におけるエストロゲンの効果やメカニズムへの研究は少ない。

Imiquimod (IMQ) によって誘発されたマウスの乾癬様皮膚炎に卵巣摘出 (OVX) とホルモン補充療法 (HRT) をおこない、コントロール (Sham) と比較して、エストロゲン特に 17β -エストラジオール (E2) が乾癬様皮膚炎の重症度にどのような影響を与えるかのメカニズムを検討している。

その結果として、生理的血中濃度を誘導する量のE2投与による乾癬様皮膚炎への抑制効果とIL-10 mRNA、IL-10陽性細胞、Foxp3陽性細胞の増加の関連性が明らかとなった。E2の抑制効果は、IL-10 mRNA、IL-10陽性細胞の増加と関連しており、制御性免疫応答が誘導されたと考えられた。HRTマウスの中には、IL-10が誘導されているにもかかわらず、強固な皮膚炎を示したものがあつた。この現象は、OVXマウスやShamマウスと比較して、HRTマウスではIL-17、IL-22、IL-23のmRNAレベルが上昇していることと関連していると推測した。HRTでは、表皮分化分子のロリクリンとインボルク

リンの発現が増強しており、E2による乾癬様皮膚炎の抑制には、エストロゲンによる表皮の分化促進作用が関与している可能性も考えられた。エストロゲンは、免疫学のおよび表皮の修飾を介して乾癬様皮膚炎の病態に影響を及ぼす可能性がある」と結論付けている。

【研究方法の妥当性】

申請論文は、本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従い行われている。対象マウスは、週数、飼育環境、実験条件など適切に設定し、客観的な統計解析を行っており、本研究は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

卵巣摘出による更年期（OVX）モデルの角質異常を世界で初めて報告したのは申請者らの研究室であり（Chen Y, Yokozeki H, Katagiri K : Exp Dermatol.26, 394-401, 2017）、その発展型として乾癬モデルを使用した。このモデルにおいて、E2投与による乾癬様皮膚炎への抑制効果とIL-10 mRNA、IL-10陽性細胞、Foxp3陽性細胞の増加の関連性を明らかにした。さらに、上述したようにOVXマウスやShamマウスと比較して、HRTマウスではIL-17、IL-22、IL-23のmRNAレベルが上昇していることを見出しており、新奇性、独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な実験環境で対象群の設定の下、客観的な統計解析を用いて、エストロゲンは、IL-10、IL-17、IL-22、IL-23 mRNAによる免疫学のおよびロリクリンとインボルクリンによる表皮の修飾を介して乾癬様皮膚炎の病態に影響を及ぼすと結論付けている。これらの結論は数回の追試を行い同様の結果を得られており、妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

国内外で乾癬に関する研究は多数実施されている。しかし、OVXモデルに生理的血中濃度を誘導する量のE2投与をしている点は独自性が高い。申請者らの研究では、IL-10の関与が大きいことが推測されており、この観点からも今後独自の女性ホルモンの乾癬に対するメカニズム解明のアプローチが可能と考える。

【申請者の研究能力】

申請者は、皮膚科学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Experimental Dermatology

(32 : 203-209, 2023)