

【12】

氏 名	いち ます な お 一 栞 菜 央
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第808号
学位授与の日付	令和4年3月4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	Possible involvement of type 2 cytokines in alopecia in mouse models of menopause and dry skin (少量のTh2サイトカインが更年期、乾燥肌モデルマウスでアロペーシスを引き起こす)
論文審査委員	(主査) 教授 井 川 健 (副査) 教授 松 原 知 代 教授 福 島 康 次

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

女性ホルモンが低下する更年期では掻痒、蟻走感、過敏症など乾燥肌に起因する多くの皮膚症状を引き起こす。当研究室では更年期障害のマウスモデルにおいて角質機能不全を惹起することを見出した。高齢化時代を迎え、更年期以降の異常は多くの女性を悩ませる現象であり、その半数は角質異常に起因すると推測される。しかし、その異常やメカニズムへの研究は皆無であり、本研究でその一部を明らかにすることは更年期における皮膚症状に対する、よりよい対策に発展するものと考えられる。

【目 的】

更年期のかゆみのメカニズムに関する報告はこれまでになく、本研究では、表皮内神経支配、allopecia関連分子、ならびにIL-4、IL-13に対する中和抗体などの皮内投与の効果を調べることにより、更年期および人工乾燥肌モデルにおけるallopecia誘導のメカニズム解明する。

【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、指針にしたがって行った。

マウスは雌のB6マウスを使用し、卵巣摘出術（OVX群）、エストロゲン置換術（HRT群）、コントロール（Sham群）の処置を検査の4週間前に施行した。

また、人工乾燥肌モデルマウスはB6マウス剃毛後、アセトン、ジエチルエーテル、水で5日間連日処理し、人工乾燥肌モデルを作成した。

allopecia誘導はTouch-allopeciaとPrurigen-evoked allopeciaで評価した。Touch-allopeciaでは

マウスの頸部を様々な太さのvon Frey filamentsを用いて繰り返し刺激し、それにより誘発された搔痒行動の数を測定した。Pruritogen-evoked allokneseisではマウスの頸部に搔痒誘発物質(ヒスタミン、セロトニン、クロロキン)を皮内注射し、注射後35~60分間のvon Frey filaments (0.07g)で刺激による搔痒の数を測定した。

マウスの背部より5mmパンチで皮膚を摘出し、皮膚における神経成長因子、allokneseis関連分子など遺伝子発現をReal-time polymerase chain reaction (Real-time-PCR)で測定し、微量で測定困難と考えられたIL-4、IL-13はさらにELISA法で測定した。

ヘマトキシリン・エオジン染色にて好酸球数を、トルイジンブルー染色で肥満細胞を、抗mMCP-8抗体による免疫染色で好塩基球数を測定し、炎症細胞浸潤を評価した。

皮膚神経線維の伸長は抗PGP9.5抗体を用いて免疫蛍光染色にて解析を行った。表皮真皮境界部を貫く神経の数を測定した。

また、allokneseisの抑制を観察するためにマウスの頸部にIL-4、IL-13の中和抗体を皮内投与し、Touch-allokneseisを測定した。続いてサイトカインによるallokneseisの誘導を観察するためにIL-4、IL-13をそれぞれ同様にマウスの頸部に投与しTouch-allokneseisを測定した。

2つ以上のグループを比較する場合は、Tukey検定を用いた一元化分散分析を用いてデータを分析した。2群間の比較は必要に応じて、unpaired t検定またはpaired t検定を行った。エラーバーは平均値±標準偏差を示す。p<0.05となるものを有意とみなした。

【結 果】

OVXマウスで、touch-evoked allokneseis, pruritogen-evoked allokneseisを観察した。

OVXマウス、人工的乾燥肌モデルマウスで表皮内神経伸長を観察した。また、両モデルにおいて好酸球数、好塩基球数の増加がみられた。

OVXマウスでは、既知のallokneseis関連分子の特異的なmRNA発現はなかった。

両モデルにおいて、allokneseisはIL-4、IL-13の中和抗体で阻止された。IL-4もしくはIL-13の少量皮内注射により、allokneseisが誘導された。

【考 察】

本研究では、更年期障害のモデルであるOVXマウスを用いて、更年期障害の臨床症状である皮膚の炎症や搔痒に関連する機能変化とそのメカニズムを検討した。

OVXマウスでは、3つの観察結果が得られた。触覚や痒み物質によって誘発されるallokneseisの存在、表皮の神経支配、そして、IL-4、IL-13に対する中和抗体を投与すると、allokneseisが抑制されたことである。OVXマウスの結果はすべて、人工乾燥肌マウスの結果と同等であった。したがって、今回の結果からOVXマウスの角質機能不全は、皮膚の安定性を崩壊させる上で重要な役割を果たしていると考えられる。

角質機能不全のマウスでallokneseisが誘発されるメカニズムは解明されていないが、表皮の神経支配が一つのメカニズムとして考えられる。今回の研究では、OVXマウスと人工乾燥肌マウスともに表皮の神経支配を示したが、神経伸長に関与するSema3とNGFのmRNAのレベルは同等であった。

強い痒みを伴う皮膚疾患である結節性痒疹の患者には表皮の神経支配が見られないことから、表皮の神経支配だけではalloknesisを直接説明することはできないと考える。

IL-4やIL-13の皮内投与がalloknesisを誘発するかどうかを調べたところ、用量依存的にalloknesisを誘発した。また、IL-4、IL-13の中和抗体を投与するとalloknesisは抑制された。これらの結果は、Th2サイトカインがalloknesisに関与していることを示唆している。好塩基球や好酸球に由来すると思われる少量のTh2サイトカインの存在が、alloknesisの誘導に重要な役割を果たしている可能性がある。

次に、ELISA法によりIL-4検出したが、そのレベルは測定限界に近くほとんど検出されなかった。以上より、我々が検出できなかった「内因性IL-4」がalloknesis誘導に重要な役割を果たしている可能性がある。今回の研究で示されたように、角質機能不全と関連したTh2のサイトカインが、更年期女性に見られる痒みにつながる可能性がある。

【結 論】

卵巣摘出による更年期モデルマウスでは、かゆみ過敏が誘導される。抗IL-4抗体、抗IL-13抗体を皮内投与により、OVXマウス、人工乾燥肌モデルにおいてalloknesisが消失した。両モデルマウスの皮膚では少数の好塩基球、好酸球浸潤があり、測定できないほど少量のTh2サイトカインを含む軽微な炎症がalloknesis誘導に関与していると推測した。2つの乾燥皮膚モデルにおいて、角質機能不全に加えIL-4/IL-13がalloknesisの誘導に関与していることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

Alloknesisは、無害な刺激によって引き起こされる異常な痒み感覚であり、アトピー性皮膚炎患者における「痒み、ひっかきの悪循環」の重要な現象である。また、皮膚の乾燥とalloknesisを含む痒痒症は、更年期の重要な皮膚症状の一つである。申請者らは先行する研究として、卵巣摘出（ovariectomised (OVX)）マウスにおける透過性バリア機能不全を報告している。

乾燥肌を特徴とする代表的疾患であるアトピー性皮膚炎の治療において、IL-4、IL-13の作用を抑制する抗IL-4受容体抗体や同様の作用を有するJAK阻害薬が強い止痒効果を発揮し、その他の痒痒性疾患にも有効であるとの知見が増えているが、そのメカニズムは不明な点も多い。そこで、申請者は2種の乾燥肌モデルマウス（OVXマウスとアセトン・エーテル・水処理による人工乾燥肌モデルマウス）を用い、触覚および痒み物質によって誘発されるalloknesisと表皮の神経支配について検討した。

Alloknesisと表皮内神経伸長は、OVXマウスと人工乾燥肌マウスで亢進していた。また、両マウスにおいてIL-4およびIL-13に対する中和抗体投与によりalloknesisが抑制されることを見出した。しかし、皮膚からIL-4、IL-13のmRNAはいずれの群でも検出されず、ELISA法においても検出限界近くの値であった。一方、両モデルマウスの皮膚では少数の好塩基球、好酸球浸潤が観察された。これらの結果より、軽微な炎症により誘導される検出できないほど少量のTh2サイトカインがalloknesis誘導に関与している、あるいは内因性のTh2サイトカインがalloknesisに関与している可能性があること

推測し、これらのサイトカインは、乾燥肌に伴う痒みの治療ターゲットになる可能性があると考えられる。

【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】

OVXによる更年期マウスモデルの角質機能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）、本モデルを乾皮症モデルとして使用し、従来から表皮内神経伸長、alloknesisが誘導されることが知られているアセトン・エーテル・水処理による人工乾燥肌モデルと比較しつつ検討を行った。まず、更年期モデルでは、人工乾燥肌モデルと同様に表皮内神経伸長、alloknesisを検出した。さらに、両モデルにおいて、IL-4、IL-13中和抗体でalloknesisが阻止されることを見出した。加えて、微量のIL-4やIL-13を投与することで正常マウスにalloknesisを誘導できることを見出した。これらの発見はいずれも他に報告がなく、新奇性、独創性が強い研究と言える。さらに、人工的乾皮症だけでなく、更年期モデルを使用することで急性誘導および慢性誘導による複数の乾皮症モデルで解析を行い、発症メカニズムにかかわらず、同様の異常が誘導されることを見出したことは、本研究の成果に普遍性があることを示している。

【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、乾燥肌モデルマウスにおいて微量のTh2サイトカインがalloknesisを引き起こ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】

国内外でかゆみに関する研究は多数実施されている。しかし、更年期モデルを乾皮症モデルとして使用する点は独自性が高い。人工的乾皮症モデルはわずか5日間で完成する急性モデルであり、卵巣摘出による更年期モデルは4週間以上かけて完成するモデルである。申請者らの研究では急性期モデルではIL-4、更年期モデルではIL-13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痒みやalloknesis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

(30 : 1745-1753, 2021)