

学位論文要旨

横山 聡

皮膚生理・機能に及ぼす腸管障害の影響に関する研究

【諸言】 皮膚は人体で最も大きな臓器であり、人体を包み、外界からの様々な異物の侵入を防ぐとともに、経表皮水分喪失量や角層水分量の調節によって生体の恒常性を維持する役割も有する。皮膚は表皮、真皮ならびに皮下組織から構成される。表皮では角化細胞のターンオーバーによって皮膚バリア機能が維持されている。真皮においては、線維芽細胞がコラーゲンなどの新しい結合組織を作り出しながら、一方で matrix metalloproteinases (MMPs) によって古くなった結合組織の分解を行っている。真皮に存在するマスト細胞は皮膚の免疫反応を司っているが、MMPs の活性化にも関与している。

皮膚は全身の状態を映し出す鏡であると考えられており、生体内で発症した内科疾患が皮膚の性状を変化させていることが経験的に知られている。例えば慢性肝疾患の患者や透析患者では、皮膚において乾燥や弾性の低下などの症状が認められる。したがって、内科疾患が何らかのシグナル伝達を介して、離れた臓器である皮膚の生理機能に影響を及ぼしている可能性が示唆される。腸管は皮膚と同様に免疫系が発達しているという共通点を有することから、本研究では腸管に焦点を当てた。腸管障害を惹起させたマウスを用いて、皮膚の生理機能に及ぼす腸管障害の影響について検討を行った。

【第1章 皮膚の生理機能に及ぼす小腸炎の影響】 インドメタシンは抗炎症・鎮痛薬として広く使用されているが、インドメタシンを漫然と投与すると、消化管で MMPs が誘導され、小腸粘膜障害が惹起される。この MMPs は皮膚にも存在し、皮膚組織の分解や修復に重要な役割を果たしている。インドメタシンの経口投与によって小腸炎を誘導したマウスの皮膚中では、MMPs の活性化に関与するマスト細胞トリプターゼが増加しており、さらに、MMP-1 と MMP-9 の発現量の増加を認めた。また、インドメタシンを投与されたマウスでは、皮膚中の I 型ならびに IV 型コラーゲンの減少と経表皮水分喪失量の増加、角層水分量の減少を認めた。マスト細胞を活性化するシグナル伝達としてコリン作動性シグナル伝達経路を疑ったが、アセチルコリン受容体アンタゴニストによって皮膚障害を抑制することはできなかった。マスト細胞ノックアウトマウスを用いて検討した結果、インドメタシンの投与によって小腸炎は生じたものの、経表皮水分喪失量の増加や角層水分量の減少は認めなかった。以上より、小腸に炎症が生じている病態下では、皮膚中のマスト細胞の活性化が誘導され、脱顆粒によって発生したトリプターゼが直接的に皮膚中のコラーゲン分解を引き起こし、さらには、トリプターゼによって活性化を受けた MMP-1 や MMP-9 もコラーゲン分解を引き起こすことで、皮膚障害が惹起された可能性が示唆された。

【第2章 皮膚の生理機能に及ぼす大腸炎の影響】 大腸炎やクローン病は炎症性腸疾患に分類される腸管の疾患であり、炎症反応が活発化することで腸管の機能を障害するだけでなく、血液凝固系疾患や関節疾患などの腸管外合併症を発症することが知られている。そこで、炎症性腸疾患のモデル動物である dextran sodium sulfate (DSS) 誘導大腸炎マウスを用いて、皮膚の生理機能に及ぼす大腸炎の影響について検討を行った。DSS を投与されたマウスでは著明な体重の減少と大腸の長さの短縮が認められた。また、DSS の投与によって、主に皮膚の真皮に発現している I 型コラーゲンや基底膜に発現している IV 型コラーゲンの発現量の有意な減少を認めた。さらに、DSS 投与後、経表皮水分喪失量の有意な増加と角層水分量の有意な減少を認めた。DSS を投与されたマウスの皮膚中ではマスト細胞が増加しており、マスト細胞上にアセチルコリン受容体の発現を認めた。DSS の投与と同時にムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストであるアトロピンの投与したところ、皮膚バリア機能障害の発現が抑制された。以上より、大腸炎マウスにおいてコリン作動性のシグナル伝達を介したマスト細胞の活性化が皮膚障害を惹起している可能性が示唆された。

【第3章 皮膚の生理機能に及ぼす大腸癌の影響】 一般的に、大腸癌は大腸炎のように全周性の大腸の炎症を伴うことなく、大腸粘膜が癌化することで発症する。癌化の一要因として酸化ストレスによる DNA 損傷が挙げられる。そこで、Azoxymethane (AOM) と DSS よって大腸癌を誘導したマウスを用いて、酸化ストレスの指標である血中の $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ の濃度を測定した結果、大腸癌誘導マウスの血中の $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度はコントロールマウスよりも有意に高かった。また、大腸癌誘導マウスの皮膚中では、酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine が増加しており、さらに、コントロールマウスに比して経表皮水分喪失量の増加と角層水分量の減少、皮膚中の I 型コラーゲン減少を認めた。大腸癌誘導マウスの皮膚中のマスト細胞数はコントロールマウスと同程度であった。以上より、大腸癌の病態下では酸化ストレスを介した皮膚障害が発現し、さらに、この皮膚障害にはマスト細胞は関与していない可能性が示唆された。

【結論】 本研究では皮膚生理・機能に及ぼす腸管障害の影響について検討した。腸管疾患として取り上げた小腸炎、大腸炎、大腸癌を誘導したいずれのマウスにおいても経表皮水分喪失量の増加や角層水分量の低下、コラーゲン発現量の低下を伴った皮膚障害が惹起された。しかしながら、皮膚障害の発現機構は起因する腸管障害によって異なる可能性が示唆された。本研究は、皮膚が加齢や環境などの因子によって影響を受けるだけでなく、腸管障害によっても影響を受ける可能性を示唆しており、臨床の常識に新たな提起をもたらした。また、腸管障害由来の皮膚障害の発現を念頭に入れた患者の皮膚のケアの必要性という医療薬学の新たな着想点を築いた。

Summary of Academic Dissertation

Satoshi Yokoyama

The influence of intestinal disorders on skin physiology

Introduction: Skin is the largest organ in the human body and plays a role in preserving body construction. It prevents invasion of various foreign microorganisms and antigens from the external environment and has the ability to exchange heat between the human skin surface and thermal environment. Skin also maintains homeostasis and hydration levels through the management of trans-epidermal water loss (TEWL). Skin consists of an outermost layer, the epidermis, forming an epithelial tissue; dermis consisting of connective tissue; and subcutaneous tissue existing in the deep parts. The epidermis contains keratinocytes, and maintains skin-barrier function by keratinocyte turnover. In the dermis, connective tissue such as collagens produced by fibroblasts maintains the skin structure. Fibroblasts produce new connective tissue and break down the old tissue constantly with the help of matrix metalloproteinases (MMPs). There are mast cells in the dermis, which control immunoreactivity in the skin and participate in MMP activation. The excessive activation of MMPs leads to decreased skin elasticity and thereby, wrinkle formation.

It is thought that skin is a mirror reflecting the state of the whole body. It has been known that visceral diseases empirically change the properties of human skin. For example, dry skin and a decrease of skin elasticity have been clinically documented to occur in patients undergoing dialysis or those with liver disease. Recently, it was also revealed that patients with diabetes mellitus tend to show reduced skin hydration. Together, these findings indicate that visceral disease has an influence on the skin barrier function via signal transduction; however, the detailed pathogenetic mechanism of skin disruption is not clear. Because the intestinal tract has a well-developed immune system like the skin, this study focused on the intestinal tract. To clarify the detailed mechanisms of skin disruption, the influence of intestinal tract disorders on skin physiology was examined using a mouse model with intestinal tract disorders.

Influence of small intestinal injury on skin physiology: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely prescribed for treating painful conditions and inflammatory diseases. A recent study revealed that NSAID-induced small intestinal injury involves induction of intestinal MMPs. Specifically, they determined that indomethacin can induce the expression of MMPs that are involved in the physiological recycling of the extracellular matrix, causing degradation and remodeling as part of the inflammatory response. MMPs are also known to be expressed spontaneously in the skin. The dermal and epidermal skin tissues contain large amounts of extracellular matrix components like collagens. These collagens are known to be degraded by MMPs.

To evaluate the effects of indomethacin on the animal skin, indomethacin was orally administered to hairless mice for 4 days. After the indomethacin treatment, a number of mast cells containing granules, which were involved in MMP activation, were also increased in mice. Further, indomethacin treatment caused an increase in the levels of MMP-1 and MMP-9 in the skin of mice with small intestinal injury. Both histological staining and western blotting indicated that a lower level of type I collagen in dermis was present in indomethacin-treated mice than in control mice. The expression levels of type IV collagen were also significantly decreased in the basement membrane of dorsal skin samples from indomethacin-treated mice compared to control mice. After the treatment, TEWL in indomethacin-treated mice was significantly higher than in control mice. On the other hand, skin hydration levels were lower in indomethacin-treated mice. The administration of cholinergic receptor antagonists did not prevent the onset of skin barrier function disruption. As was performed for hairless mice, the effect of indomethacin treatment was assessed in mast cell *-/-* mice. An increase in TEWL and a decrease in skin hydration levels were not observed in indomethacin-treated mast cell *-/-* mice. These data showed that skin disruption was caused by indomethacin-induced small intestinal injury in mice, and that mast cell activation, with associated induction of tryptase, MMP-1 and MMP-9, plays an important role in this process.

Influence of colitis on skin physiology: Inflammatory bowel disease—one of the major diseases affecting the colon—is a chronic, relapsing intestinal inflammatory disorder. Notably, activation of the inflammatory response has been shown to influence processes in the entire body as well as the function of the intestine. To determine the effects of this disease on skin condition, the skin of mice with dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis was examined. Following treatment with DSS, we observed diarrhea and fecal bleeding in all treated mice. The dermal expression of type I and IV collagen was decreased in DSS-treated mice compared to control mice. Furthermore, post-treatment TEWL was significantly higher and skin hydration levels were significantly lower in DSS-treated mice compared to the control mice. Immunohistochemistry and western blotting of skin tissue indicated that the expression of mast cell tryptase was upregulated in the dermis of DSS-treated mice. The upregulation of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptor expression was immunohistochemically observed as well as colocalization of these receptors with mast cell tryptase in the DSS-treated mice. The blockage of muscarinic acetylcholine receptors with atropine prevented colitis-induced skin disruption. These results provide evidence supporting the morbid association of DSS-induced colitis with disruptions of normal skin function. Further, these colonic disease-linked changes in the skin are modulated through the activation of mast cells via cholinergic signal transduction.

Influence of colon carcinoma on skin physiology: In general, colon carcinoma is induced by the carcinogenesis of the colonic mucosa and is not accompanied by inflammation of the entire colonic tract, like with colitis. The colonic mucosa divides the inside and the outside of the body like skin, and is always exposed to endogenous or exogenous oxidative stress. The damage of DNA by oxidative stress is one of the causes for the occurrence of colon carcinoma. On the other hand, the skin tissue located on the outside of the body is also exposed to various oxidative stresses. There is a possibility that oxidative stress induced by colon carcinoma has an influence on skin physiology. To clarify this hypothesis, we examined the skin of mice with colon carcinoma induced by azoxymethane (AOM) and DSS. After the treatment, plasma concentration of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, a surrogate marker for inducible nitric oxide synthase expression, in AOM+DSS-treated mice was significantly higher than in control mice. TEWL and skin hydration levels for the dorsal skin were measured after treatment. Further, the expression levels of type I collagen in skin were examined by western blotting. Significantly greater TEWL and significantly lower skin hydration levels were observed in AOM+DSS-treated mice than the control mice. Moreover, AOM+DSS-treated mice had significantly lower expression of type I collagen than the control mice. These findings provided evidence that support the morbid association of colon carcinoma with skin disruption. Furthermore, it was suggested that this skin disruption did not show mast-cell involvement.

Conclusion: In this study, the influence of intestinal tract disorders on the skin physiology and function was examined. The obtained results suggested that the onset of skin disruption with an increase of TEWL, decrease of skin hydration levels, and degradation of type I collagen in the skin were recognized in all mice with small intestinal injury, colitis, or colon carcinoma. However, some differences were recognized in these results. The upregulation of mast cells in skin was recognized in mice with small intestinal injury or colitis, but this finding was not observed in mice with colon carcinoma. Furthermore, mast cells in skin of mice with colitis were activated via cholinergic signal transduction with muscarinic receptors; however, no cholinergic signal transduction seemed to be involved in the skin disruption in mice with small intestinal injury. These results indicated that the detailed pathogenetic mechanisms of skin disruption appear distinct across different intestinal tract disorders.

This study suggested that skin condition is affected by intestinal tract disorders as well as by aging or environment factors. These results provide a solid foundation for continued research concerning the clinical treatment of a dysfunctional skin barrier. Additional large-studies with a larger sample size as well as cell culture studies should be performed for better understanding of the association between skin physiology and intestinal tract disorders.

論文審査の結果の要旨

内科疾患が皮膚の性状に影響を与えていることは経験的に知られているものの、皮膚の生理機能に影響を及ぼすメカニズムの解明に関する研究は少ない。一方、皮膚の構造と機能については非常に多くの知見が蓄積されている。表皮は、角化を繰り返すことによって角層のバリア機能を維持する。真皮にはコラーゲンを代表とする結合組織が豊富に存在し、エラスチンとともに皮膚の弾性を保ち、これらの結合組織の間隙に存在するヒアルロン酸が水分保持を担っている。皮膚の恒常性を維持するためには、真皮の線維芽細胞中のコラーゲンやエラスチンの合成と分解のバランスに依存するが、その分解には種々の **matrix metalloproteinase (MMP)** が中心的な役割を果たしている。また、真皮や皮下組織では免疫反応に関与するマスト細胞が、**MMPs** の機能を調節して炎症時の皮膚のリモデリングや外部からの刺激に対して顆粒の放出などによってアレルギー反応を惹起することで皮膚の防衛機構を担っている。

内科疾患が皮膚構造やその機能に影響を及ぼす数少ない事例として、大腸刺激性の緩下剤センナの報告がある。センナを長期投与すると、大腸でのマスト細胞の増加に伴い、皮膚の表皮において免疫反応を担うランゲルハンス細胞が減少して、皮膚の免疫機能が低下する報告がある。

本論文は、上記のように内臓の障害が何らかのシグナル伝達を介して皮膚に影響を及ぼすのではないかと考え、免疫系が発達している腸管に焦点を当て、マスト細胞の機能や皮膚のバリアに関与する各種項目を指標として、腸管に生じた障害が皮膚障害を惹起する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、非ステロイド性鎮痛薬のインドメタシンによって小腸炎を惹起させたマウスの皮膚障害について、第2章では **dextran sodium sulfate (DSS)** による大腸炎マウスを用いて、第3章では **azoxymethane** と **DSS** を組み合わせた大腸癌誘導マウスによる皮膚障害について検討し、以下の結果を得た。

第1章では、インドメタシン誘導小腸炎マウスにおいて、皮膚中のコラーゲンが減少して経表皮水分喪失量 (**TEWL**) の増加と角層水分量の減少などから皮膚バリア機能の低下による皮膚障害が発現すること、この障害にはトリプターゼやこれによって活性化された **MMP-1** や **MMP-9** が関与していることを明らかにした。特に、この作用のトリガーが、マスト細胞から放出されたトリプターゼによるものであることを証明するために、マスト細胞ノックアウトマウスを用いて明瞭に証明している。ただし、将来的にはマスト細胞の活性化が免疫学的なメカニズムによるものだけでなく、非免疫学的な機序の可能性についても考慮する必要があるとしている。一方、臨床的な見地からインドメタシンの使用によって皮膚障害を発現する事例が報告されつつあり、アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症では皮膚バリア機能が著しく低下するとの知見を加味すると、これら患者へ本剤を投与する際には皮膚状態への注意喚起が必要であると結論している。

第2章では、大腸炎マウスを用いて、皮膚への影響を評価している。第1章と同様にコラーゲン量の減少による皮膚バリアの低下をきたしているものの、血中の **tumor necrosis**

factor- α や inducible nitric oxide synthase の発現増加と皮膚障害に直接因果関係があるとする結論は得られなかったとしている。しかし、皮膚中のマスト細胞がムスカリン受容体とニコチン受容体を共発現していることを見出し、それぞれの受容体アンタゴニストを用いた実験から、ムスカリン受容体を介した伝達経路によって皮膚障害が惹起されることを明らかにした。これらの結果から、大腸炎に起因する皮膚障害の治療には、皮膚中のマスト細胞の活性化とアセチルコリンを介したシグナル伝達をターゲットとした戦略が考えられるとした。

第3章では、これまでの章で腸管での炎症により生じた病態マウスで皮膚障害が発現することをさらに発展させるために、大腸癌での皮膚障害の有無について調査した。大腸癌の発生には酸化ストレスが関与すること、一方で皮膚組織においては紫外線や放射線などの様々な外因性酸化ストレスに暴露され、その結果、皮膚の免疫システムに関与するマスト細胞や好中球が産生する内因性酸化ストレスが病態の悪化を招いていると考えられている。距離的には離れている大腸と皮膚の関係を結びつけるために、アトピー性皮膚炎患者では大腸癌の罹患率が低下するとの知見を拠り所として、皮膚炎患者で亢進した免疫システムが大腸癌を予防する可能性があると考えられるものである。したがって本章は、大腸癌と皮膚の間に相互に影響しあうシグナル伝達システムの存在を予想した内容である。その結果、大腸癌を発症したマウス血中の NO_2/NO_3 が増加していること、また皮膚組織中の酸化ストレスマーカーが増加していること、さらに皮膚中の I 型コラーゲンが減少し、TEWL の増加と角層水分量が低下して皮膚バリア機能の低下を確認した。一方、皮膚中のマスト細胞には変化が認められなかった。このように、大腸癌マウスにおける皮膚障害にはマスト細胞の活性化は関与しないことから、今後どのようなシグナルが皮膚障害に繋がるかについて解明することが重要であるとした。

以上述べたように、本論文では皮膚生理・機能におよぼす腸管障害の影響について検討した。腸管疾患として用いた小腸炎、大腸炎、大腸癌のいずれのマウスにおいても TEWL の増加や角層水分量の減少、コラーゲン発現量の低下を伴う皮膚障害が認められた。その一方で、皮膚障害のメカニズムについては原因となる腸管疾患の種類によって異なっていたことから、起因する腸管障害によって皮膚障害の発現機構が異なると結論付けた。皮膚中にはマスト細胞以外にも角化細胞、繊維芽細胞、ランゲルハンス細胞などの多種多様な細胞が存在することからも、今後これら細胞との相互作用にも注意してより詳細な皮膚障害の発現機構について明らかにしていくことが必要であるとしている。

皮膚の状態が加齢や環境などの因子によってのみ影響を受けるのではなく、腸管障害によっても影響を受けることを本論文は示しており、臨床の常識に新たな視点を提起したものである。今後は、腸管障害由来の皮膚障害の発現を想定して、患者の皮膚ケアを図るべきであるとしており、この提案は医療薬学を発展させるための新たな着眼点となりうる。

したがって、本論文は、研究の意義に加えて新規性および独創性のどの観点においても本研究科課程によらない博士（薬科学）論文として十分価値のあるものと判断した。

以上