

皮膚生理・機能に及ぼす腸管障害の影響に関する研究

横山 聡

## 目次

略語一覧.....	1
緒論.....	2
第1章 皮膚生理・機能に及ぼす小腸炎の影響.....	4
第1節 緒言.....	4
第2節 実験方法.....	6
1. 実験動物	
2. マウスの血液ならびに小腸と皮膚の組織の採取	
3. 組織染色	
4. ウェスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析	
5. 血中分子マーカーの濃度測定	
6. マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量と角層水分量の測定	
7. 統計解析	
第3節 結果.....	10
1. インドメタシン投与後の小腸ならびに皮膚の組織学的な検討	
2. 皮膚中のマスト細胞と MMPs の発現に及ぼすインドメタシンの影響	
3. 皮膚中のコラーゲンの発現量に及ぼすインドメタシンの影響	
4. ELISA による血中分子マーカーの解析	
5. インドメタシン投与後の TEWL と角層水分量の測定	
6. アセチルコリン受容体アンタゴニストが及ぼす皮膚バリア機能への影響	
7. マスト細胞ノックアウトマウスの小腸組織に及ぼすインドメタシンの影響	
8. マスト細胞ノックアウトマウスの皮膚バリア機能に及ぼすインドメタシンの影響	
第4節 考察.....	20
第5節 小括.....	23
第2章 皮膚生理・機能に及ぼす大腸炎の影響.....	24
第1節 緒言.....	24

第2節 実験方法.....	26
1. 実験動物	
2. DSS 投与による大腸炎の誘発	
3. マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量と角層水分量の測定	
4. マウスの血液ならびに大腸と皮膚の組織の採取	
5. 組織染色	
6. ウェスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析	
7. 血中 TNF- $\alpha$ と IL-6 の濃度測定	
8. 血中の亜硝酸/硝酸とアセチルコリンの濃度測定	
9. 統計解析	
第3節 結果.....	31
1. DSS 投与後のマウスの体重や血中分子マーカーの濃度測定	
2. DSS 投与後の小腸ならびに皮膚の組織学的な検討	
3. 皮膚障害の検討	
4. DSS 投与による皮膚組織中の iNOS の発現	
5. 大腸炎マウスの体重や大腸の長さに及ぼす L-NAME の影響	
6. 皮膚バリア機能に及ぼす L-NAME の影響	
7. DSS 投与による皮膚組織中の TNFR の発現	
8. 大腸炎マウスの体重や大腸の長さに及ぼす抗 TNF- $\alpha$ 抗体の影響	
9. 皮膚バリア機能に及ぼす抗 TNF- $\alpha$ 抗体の影響	
10. 皮膚中のマスト細胞の発現	
11. マスト細胞上に発現するアセチルコリン受容体	
12. アセチルコリン受容体アンタゴニストが及ぼす皮膚バリア機能への影響	
第4節 考察.....	45
第5節 小括.....	48
第3章 皮膚生理・機能に及ぼす大腸癌の影響.....	49
第1節 緒言.....	49
第2節 実験方法.....	51
1. 実験動物	

2.	大腸癌マウスの作製	
3.	マウスの血液ならびに小腸と皮膚の組織の採取	
4.	組織染色	
5.	血中 IL-6 と亜硝酸／硝酸の濃度測定	
6.	マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量と角層水分量の測定	
7.	ウェスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析	
8.	統計解析	
第3節	結果.....	54
1.	AOM と DSS による大腸癌の誘発	
2.	大腸癌マウスにおける血中の $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$	
3.	皮膚中の 8-OHdG の発現	
4.	皮膚中のマスト細胞の発現	
5.	TEWL と角層水分量の測定	
6.	皮膚中の I 型コラーゲンの発現解析	
第4節	考察.....	60
第5節	小括.....	62
結論	.....	63
謝辞	.....	64
引用文献	.....	65

## 略語一覽

ANOVA	: analysis of variance
AOM	: azoxymethane
AP-1	: activator protein 1
a.u.	: arbitrary unit
COX	: cyclooxygenase
DSS	: dextran sodium sulfate
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
HE	: hematoxylin and eosin
IBD	: inflammatory bowel disease
IgA	: immunoglobulin A
IgE	: immunoglobulin E
IgG	: immunoglobulin G
IL-6	: interleukin 6
iNOS	: inducible nitric oxide synthase
L-NAME	: N(G)-nitro-L-arginine methyl ester
MMPs	: matrix metalloproteinases
$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$	: Nitrite/Nitrate
NSAIDs	: non-steroidal anti-inflammatory drugs
PGs	: prostaglandins
TEWL	: transepidermal water loss
TNFR	: tumor necrosis factor receptor
TNF- $\alpha$	: tumor necrosis factor- $\alpha$
TRITC	: tetramethylrhodamine isothiocyanate

## 緒論

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。特に長期間、内臓に疾患を患っている患者、例えば慢性肝疾患の患者や透析患者では、皮膚において艶の減少や乾燥、弾性の低下などの症状が認められる<sup>1-3)</sup>。しかしながら、内科疾患が皮膚の生理機能に影響を及ぼす詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。

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、体の形を維持させる役割を担っている。さらに、発汗による放熱や皮膚中の血流調節による外界との熱交換、経表皮水分喪失量 (transepidermal water loss: TEWL) の調節などによって生体機能を維持する役割も有する。皮膚は上皮組織を形成する表皮、結合組織からなる真皮、さらに深部に存在する皮下組織によって構成される。大気中に触れる最外層の表皮には角化細胞が存在し、基底層で産生された角化細胞は4週間かけて後から分裂した細胞に徐々に外界に向かって押し上げられ、角層に到達し、最終的には垢となって剥がれ落ちていく。この一連の流れを角化と呼び、角化の過程では細胞間脂質を構成するセラミドや角層細胞中の保湿を担う天然保湿因子なども産生され、角層水分量を保ちつつ過剰な水分の蒸散を防いでいる。このように、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している<sup>4)</sup>。一方、真皮において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っている。また、これらの結合組織の間隙にはヒアルロン酸が蓄えられ、水分が一定量保持されている。コラーゲンやエラスチンは真皮の線維芽細胞によって生成されている。線維芽細胞は常に新しい組織を作り出しながら、一方では古くなった組織の分解を行っている。この分解を担う酵素として代表的なものが **matrix metalloproteinases (MMPs)** である。皮膚の恒常性を保つためにはこの **MMPs** が必須であるが、過剰な **MMP** の活性化、例えば紫外線による **MMP** の活性化は、コラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスの分解を加速させ、皮膚の弾性の低下や皺の過剰形成へとつながる<sup>5)</sup>。また、真皮や皮下組織においては免疫反応に関与するマスト細胞も存在し、**MMPs** を活性化することで炎症時の皮膚のリモデリングに関与している。さらに、マス

ト細胞はヒスタミンや tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの化学伝達物質を顆粒内に保持しており、外部からの刺激を受けることで顆粒を放出し、アレルギー反応を惹起させることで皮膚の防御機構を担っている<sup>6)</sup>。皮膚はこのような機能を維持しながら、生体恒常性を保っている。

仮に内科疾患が皮膚の状態に影響を及ぼしているのであれば、表皮や真皮の構造や機能に変化が生じていると考えられる。動物を用いた実験では、大腸刺激性の緩下剤であるセンナをマウスに長期投与することで、便の性状の変化に伴い、大腸ではマスト細胞の増加や蠕動運動の低下などが認められ、一方、皮膚においては、表皮での免疫反応を担うランゲルハンス細胞の減少が認められている<sup>7)</sup>。ランゲルハンス細胞はアトピー性皮膚炎の病態下では炎症反応に伴う免疫系のシグナルによってマスト細胞と同様に増加する。また、神経系のシグナルを受けることによっても、その発現数に変化が生じる<sup>8,9)</sup>。センナの長期投与による大腸への刺激が免疫系あるいは神経系のシグナルを介してランゲルハンス細胞数を減少させ、皮膚の免疫状態を低下させた可能性が考えられる。実臨床においてもセンナの長期投与によって大腸に刺激を与え続けることによって急性汎発性発疹性膿疱症が発症した症例も過去に報告されていることから<sup>10)</sup>、刺激を受けた大腸が皮膚の性状に変化をもたらすことが推察される。

以上より、内臓の障害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状態に影響を及ぼしていることが示唆される。腸管は皮膚と同様に生体内部と外環境との境界線を形成しており、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ることとした。免疫系で重要な役割を担うマスト細胞や、皮膚のバリア機能の指標となる TEWL や角層含水量、皮膚組織中のコラーゲン等を調べることによって、腸管に生じた障害が皮膚障害を引き起こすメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

第 1 章では非ステロイド性消炎鎮痛薬であるインドメタシンによって小腸炎を惹起させたマウスを用いて皮膚障害の検討を行った。また、第 2 章では, dextran sodium sulfate (DSS) によって大腸炎を惹起させたマウスを用いて、第 3 章では azoxymethane と DSS を組み合わせることによって大腸癌を誘導したマウスを用いて、それぞれ皮膚障害の検討を行った。これらの研究から得られた新しい知見を以下に報告する。

## 第1章 皮膚の生理機能に対する小腸炎の影響

### 第1節 緒言

非ステロイド性抗炎症薬 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) は鎮痛・消炎を目的として临床上広く一般的に使用されている<sup>11)</sup>。NSAIDs は cyclooxygenase (COX) を阻害することによって prostaglandins (PGs) の生合成を抑制する<sup>12)</sup>。COX には COX-1 と COX-2 という2つのアイソフォームが存在することが知られている<sup>13-15)</sup>。COX-1 は様々な組織や臓器において恒常的に発現しているが、COX-2 は炎症性細胞や炎症を惹起した組織において限局的に発現している。NSAIDs は炎症部位において COX-2 を阻害することによって、炎症反応が進行することを抑制する。しかし、インドメタシンのような COX 非選択性の NSAIDs においては胃粘膜に発現している COX-1 をも阻害し、その結果、PGs 産生の抑制や胃粘膜への炎症や潰瘍などの障害を引き起こすとされている<sup>16-18)</sup>。さらに、临床上、NSAIDs を長期間投与された患者においては胃粘膜のみならず小腸粘膜に障害を引き起こすケースがあることも知られている<sup>19)</sup>。

NSAIDs による消化管粘膜障害のメカニズムについては現在も研究が進められている。最近の報告では、インドメタシンによって惹起された小腸粘膜障害が MMPs を誘導することを明らかにしている。インドメタシンによって誘導された MMPs は、炎症反応の一部として細胞外マトリックスのリモデリングに関与しており、腸管組織の修復や再生に必須の酵素である<sup>20)</sup>。この MMPs は皮膚においても恒常的に発現している。皮膚組織中の線維芽細胞はコラーゲンやエラスチンなどの多量の細胞外マトリックス構成物を産生し、基底細胞は真皮と表皮の境となる基底膜を作り出している。I型コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な構成物であり、皮膚に弾力性を持たせる働きがある<sup>21)</sup>。また、IV型コラーゲンは基底膜に存在する重要な構成物であり、特に表皮と真皮の結合に役立っている<sup>22)</sup>。これら I型コラーゲンや IV型コラーゲンは MMPs によって分解されるが、主に I型コラーゲンは MMP-1 によって、IV型コラーゲンは MMP-9 によって分解されることが知られている<sup>23, 24)</sup>。

炎症性メディエーターである TNF- $\alpha$  は、インドメタシンにより誘導される小腸炎に関与しており<sup>25, 26)</sup>、この現象には TNF- $\alpha$  によって誘導される MMPs の活



性化が関与していることが示唆されている<sup>27)</sup>。小腸炎の病態下では血中に多量の TNF- $\alpha$  が放出され、全身を循環することから、この TNF- $\alpha$  が皮膚中の MMPs を活性化している可能性が考えられる。また、MMPs はマスト細胞のトリプターゼによっても活性化される<sup>24)</sup>。腸管の炎症時にはマスト細胞の脱顆粒によって、炎症性メディエーターであるヒスタミンやトリプターゼ、キマーゼといったプロテアーゼなども血中へ放出される。腸管障害時に発生したこれら炎症性メディエーターやプロテアーゼなどが、皮膚の性状に影響を与える可能性が考えられる。そこで、インドメタシン誘導小腸炎マウスを用いて、皮膚中の MMP-1 や MMP-9, トリプターゼ, I 型ならびに IV 型コラーゲンの発現を調べ、皮膚の生理機能に及ぼす小腸炎の影響について検討を行った。

## 第2節 実験方法

### 1. 実験動物

ヘアレスマウス Hos:HR-1, WBB6F1/J-Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W<sup>v</sup></sup> マスト細胞ノックアウトマウス, および WBB6F1/J-Kit<sup>+</sup>/Kit<sup>+</sup> マスト細胞野生型マウス (7 weeks old, Japan SLC, Shizuoka, Japan) を温度 23±2°C, 湿度 55±10%, 照度サイクル 12 時間 (light: 8:00 – 20:00 h) の環境下, 固形飼料および水を自由に摂取させ飼育した。1 週間の予備飼育後, マウスをランダムにコントロール群, インドメタシン群, インドメタシン+アトロピン群, インドメタシン+ヘキサメトニウム群の 4 つの群 (n = 10/each group) に振り分けた。インドメタシン群, インドメタシン+アトロピン群, インドメタシン+ヘキサメトニウム群のマウスには, 蒸留水に溶解したインドメタシン (40 mg/kg/day; Sigma, St Louis, MO, USA) を 4 日間連日経口投与した。さらに, インドメタシン+アトロピン群のマウスにはアトロピン (1 mg/kg/day; Wako, Osaka, Japan) を, インドメタシン+ヘキサメトニウム群のマウスにはヘキサメトニウム (10 mg/kg/day; Wako) を, それぞれインドメタシンを投与する前に腹腔内に投与した。マスト細胞ノックアウトマウスとマスト細胞野生型マウスはそれぞれランダムにコントロール群とインドメタシン群の 2 群 (n = 6/each group) に振り分け, インドメタシン群はヘアレスマウスと同様の方法でインドメタシンを投与した。コントロール群のマウスには同様のスケジュールで蒸留水を投与した。5 日間の試験期間後, ペントバルビタールナトリウムを用いて深麻酔し安楽死させた。すべての動物実験は, 鈴鹿医療科学大学動物実験委員会による研究計画書の承認を得た後に, 総理府の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」, ならびに「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」に従って実施した。

### 2. マウスの血液ならびに小腸と皮膚の組織の採取

実験開始 5 日後, ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を腹腔内投与してマウスに麻酔したのち, 心臓穿刺により 1 mL の

血液を採取した。また、脱血を行ったのちに小腸と皮膚の組織を採取し、凍結保存した。

### 3. 組織染色

採取した小腸と皮膚の組織の一部は免疫組織化学に用いるため、パラホルムアルデヒド溶液（4%、Wako）を用いて固定した。固定された小腸と皮膚の組織を凍結した Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋し、5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切を行った。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色によって薄切した切片を染色し、光学顕微鏡にて観察し、組織学的に傷害の検討を行った。皮膚の組織切片はトルイジンブルー染色を行って、マスト細胞の評価を行った。また、以下の 1 次抗体を用いて、免疫組織化学的な検討を行った。1 次抗体は、ヤギ抗マスト細胞トリプターゼ抗体 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), ウサギ抗 MMP-1 抗体 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc.), ウサギ抗 MMP-9 抗体 (1:50; Abnova, Taipei, Taiwan), ウサギ抗 I 型コラーゲン抗体 (1:40; EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA), あるいはウサギ抗 IV 型コラーゲン抗体 (1:100; Abcam, Cambridge, MA, USA) である。1 次抗体で処理したのち、2 次抗体の処理を行った。2 次抗体は、tetramethylrhodamine isothiocyanate で標識された抗ヤギ immunoglobulin G (IgG) 抗体 (1:30; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), もしくは fluorescein isothiocyanate で標識された抗ウサギ IgG 抗体 (1:30; Dako Cytomation) を用いた。トリプターゼ, MMP-1, MMP-9, I 型コラーゲン, あるいは IV 型コラーゲンは蛍光顕微鏡 BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて免疫組織化学的に評価を行った。マスト細胞やトリプターゼ, MMP-1, MMP-9 の陽性細胞数の計測には、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いた。無作為に 3 か所のエリアを抽出して陽性細胞の数を計測し、平均値を算出した。

### 4. ウェスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析

採取した皮膚組織 100 mg を剪刀で細かく刻んだのち、組織用懸濁試薬

(KURABO, Osaka, Japan) に浸漬し、氷上でハンドミキサー (POLYTRON PT 1200 CL; Kinematica AG, Littau, Switzerland) を用いて、ホモジナイズ (20,000 rpm, 60 sec) した。懸濁液を  $8,000 \times g$  で 10 分間遠心分離したのち、上清を取り出し、解析に用いるまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。上清を溶解後、総タンパク質量  $12.5 \mu\text{g}$  となるように調整したサンプルを、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて 175V の定電圧で電気泳動を行った。電気泳動されたタンパク質を Immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩、5%スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後、 $25^{\circ}\text{C}$  で 1 時間、1 次抗体としてウサギ抗 I 型コラーゲン抗体 (1:1,000, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA), ウサギ抗 IV 型コラーゲン抗体 (1:1,000, Abcam, Cambridge, MA, USA), あるいはマウス抗  $\beta$ -アクチン抗体 (1:10,000, Sigma, St. Louis, MO, USA) で反応させたのち、horseradish peroxidase で標識された 2 次抗体で処理を行った。免疫複合体は化学発光試薬 (Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA) 処理したのちに、lumino-image analyzer (LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan) 用いて検出した。

#### 5. 血中分子マーカーの濃度測定

血液サンプルを  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し、上清部分を採取し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に用いた。血中の immunoglobulin E (IgE), immunoglobulin A (IgA), ヒスタミン, TNF- $\alpha$  の濃度は、それぞれの ELISA kit (IgE, Yamasa Shoyu Co., Ltd., Chiba, Japan; IgA, Abnova; Histamine, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France; TNF- $\alpha$ , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。測定にはマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いた。

#### 6. マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量と角層水分量の測定

インドメタシンの投与終了後、ヘアレスマウスの背部皮膚の経表皮水分喪失量 (transepidermal water loss: TEWL) と角層水分量の測定を行った。マスト細胞

ノックアウトマウスは背部の毛を剃った後に測定した。TEWL は皮膚から体外へ蒸散する水分量を示すマーカーであり、皮膚のバリア機能を反映している。Tewameter<sup>®</sup> TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)を用いて<sup>28)</sup>、実験開始 5 日後の TEWL を測定した。測定値は測定開始後およそ 10 秒程度が経過し、数値が安定した状態で読み取り、3 回測定した値の平均値を算出した。

皮膚の最も外側の層を形成する角層の水分量のレベルは、Corneometer<sup>®</sup> CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH) を用いて測定した<sup>29)</sup>。Corneometer<sup>®</sup> のプローブ部分を背部の皮膚に押し当てることによって、角層の水分量がキャパシタンスとして測定され、その数値は arbitrary unit で表される。実験開始 5 日後、マウス背部皮膚の角層水分量を 3 回測定し、平均値を算出した。

## 7. 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差で示した。2 群間の比較には Student's *t*-test を用いた。危険率が 5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。

### 第3節 結果

#### 1. インドメタシン投与後の小腸ならびに皮膚の組織学的な検討

インドメタシンによるヘアレスマウスの小腸や皮膚への影響を確認するために、インドメタシンを4日間連日、マウスに経口投与した。5日目にマウスを安楽死させた後、小腸と皮膚の状態をHE染色により評価した。その結果、インドメタシンの投与によって病理組織学的に重篤な小腸の粘膜傷害の発現を認めた (Fig. 1B の矢印)。コントロール群と比較して、インドメタシン群では小腸粘膜表面が著明に傷害を受けており、部分的に粘膜の深部まで傷害を認めた。また背部の皮膚においてもインドメタシン群では明らかな傷害を認めた。特に、真皮の厚みが薄くなっており、結合組織の間隙の増大を認めた (Fig. 1D)。

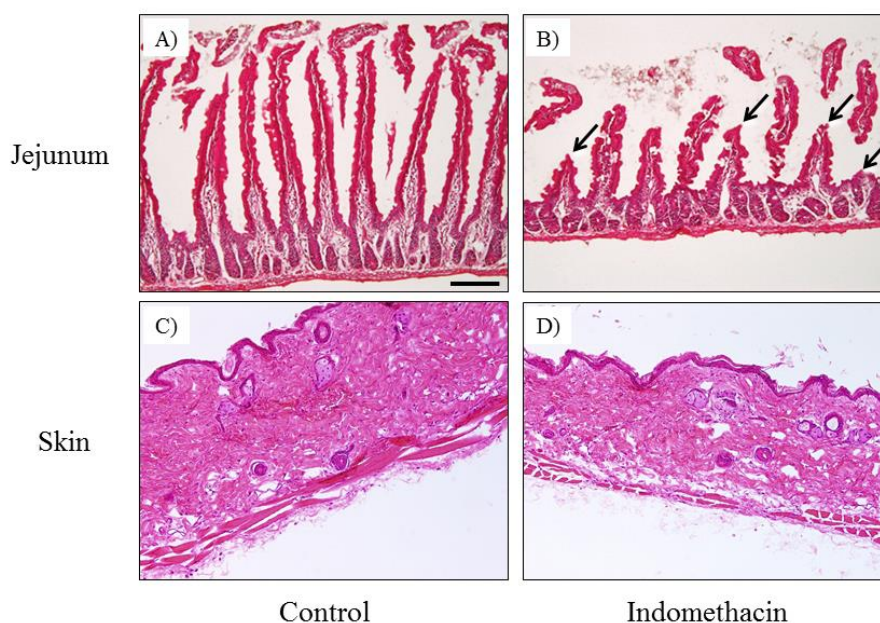


Figure 1. Histological observations of jejunum (A, B) and skin tissue sections (C, D) from hairless mice. Indomethacin (40 mg/kg, *p.o.*) was administered for four consecutive days. Arrows indicates the destruction of the jejunal epithelium. Scale bar = 100  $\mu$ m.

## 2. 皮膚中のマスト細胞と MMPs の発現に及ぼすインドメタシンの影響

トルイジンブルー染色の結果、コントロール群の皮膚中にはほとんどマスト細胞を認めなかったが、インドメタシン群では皮膚中において多数のマスト細胞が発現していることを認めた (Fig. 2A)。また、マスト細胞トリプターゼの免疫組織化学の結果、トリプターゼを有するマスト細胞数がインドメタシン群の皮膚中で、特に真皮において増加していることを認めた (Fig. 2B)。

インドメタシン投与によって、インドメタシン群の皮膚中の MMP-1 と MMP-9 の発現量の増加が認められた (Fig. 2C, D)。主に MMP-1 は真皮において、MMP-9 は表皮において増加した。

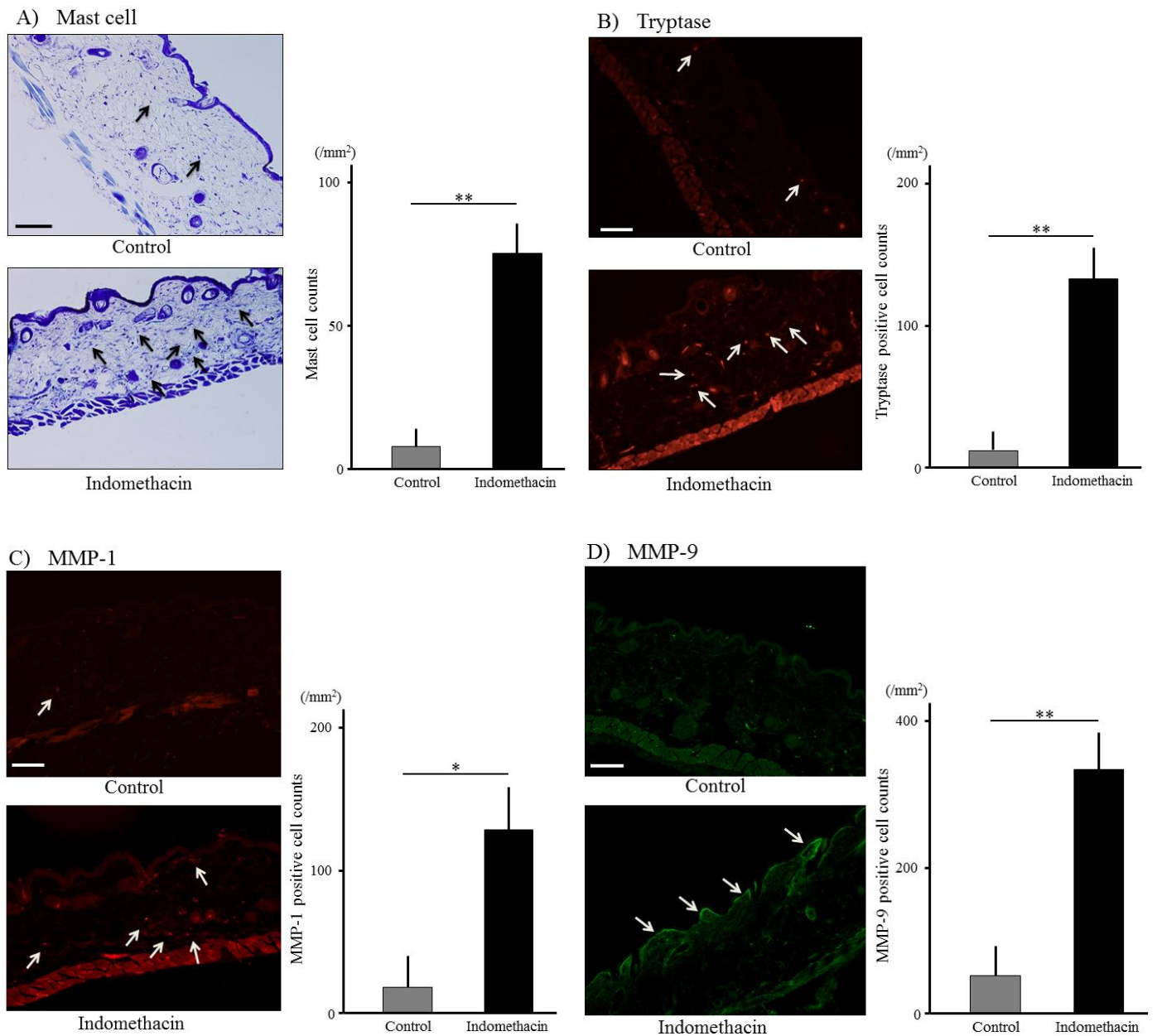


Figure 2. A) Toluidine blue staining of mast cells in skin sections from hairless mice and stained mast cell counts. B) Immunohistochemistry of mast cell tryptase in skin of hairless mice and tryptase positive cell counts. C) Immunohistochemistry of MMP-1 in skin of hairless mice and MMP-1 positive cell counts. D) Immunohistochemistry of MMP-9 in skin of hairless mice and MMP-9 positive cell counts. Indomethacin (40 mg/kg, *p.o.*) was administered for four consecutive days. Arrows indicates positive staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .



### 3. 皮膚中のコラーゲンの発現量に及ぼすインドメタシンの影響

免疫組織化学とウェスタンブロット解析の結果から、インドメタシン群において皮膚中の I 型コラーゲンの発現量がコントロール群に比して有意に減少した (Fig. 3A, B)。また、IV 型コラーゲンの発現量も同様にコントロール群に比してインドメタシン群において有意に減少した (Fig. 3C, D)。

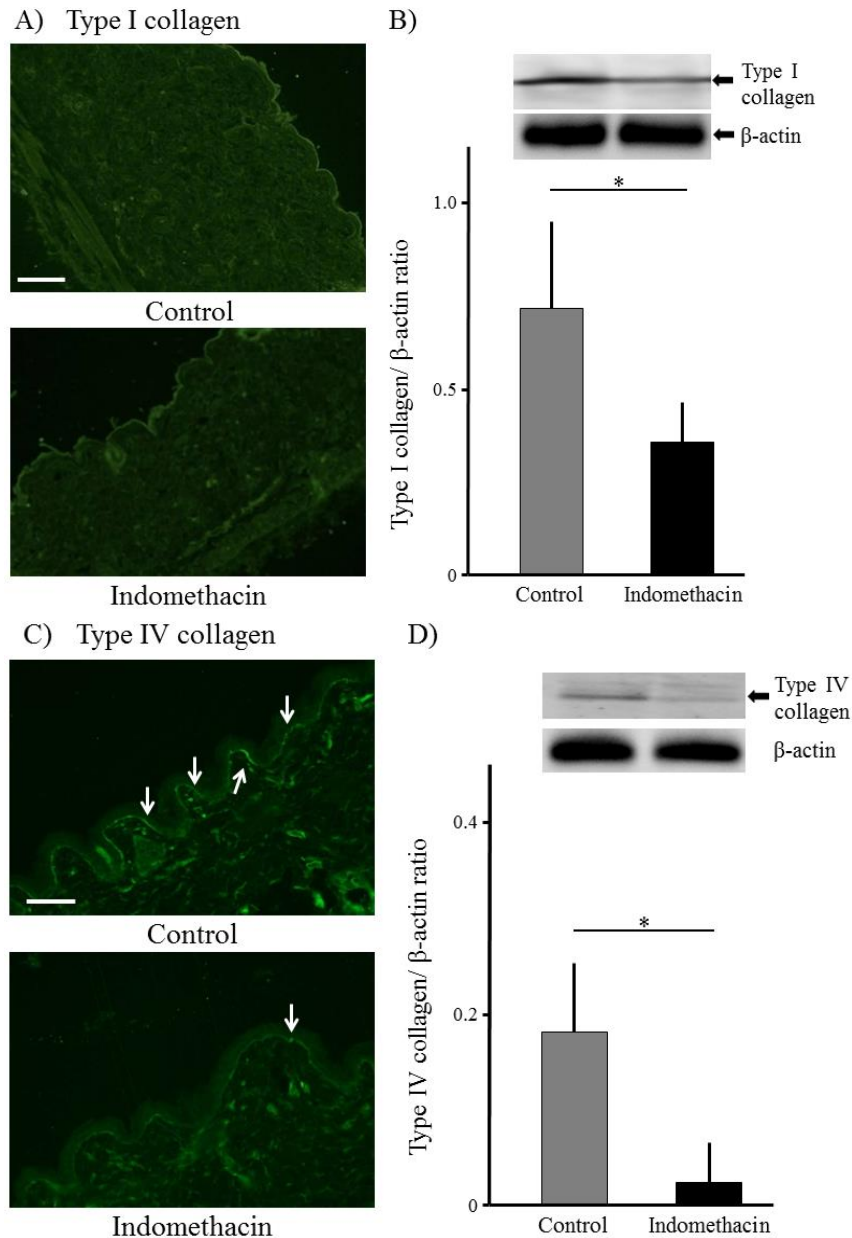


Figure 3. Immunohistochemistry of type I (A) and IV (C) collagen in skin of hairless mice. Type I collagen/ $\beta$ -actin ratio (B) and type IV collagen/ $\beta$ -actin ratio (D) determined by western blotting. Indomethacin (40 mg/kg, *p.o.*) was administered for four consecutive days. Arrows indicates positive staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m, \*:  $p < 0.05$ .

#### 4. ELISA による血中分子マーカーの解析

4日間のインドメタシン連日投与終了後、血中のIgEやIgA, ヒスタミン, TNF- $\alpha$ について、それぞれのELISA kitを用いて測定を行った。コントロール群と比較してインドメタシン群では、これらすべての分子マーカーの有意な上昇を認めた (Fig. 4A-D)。

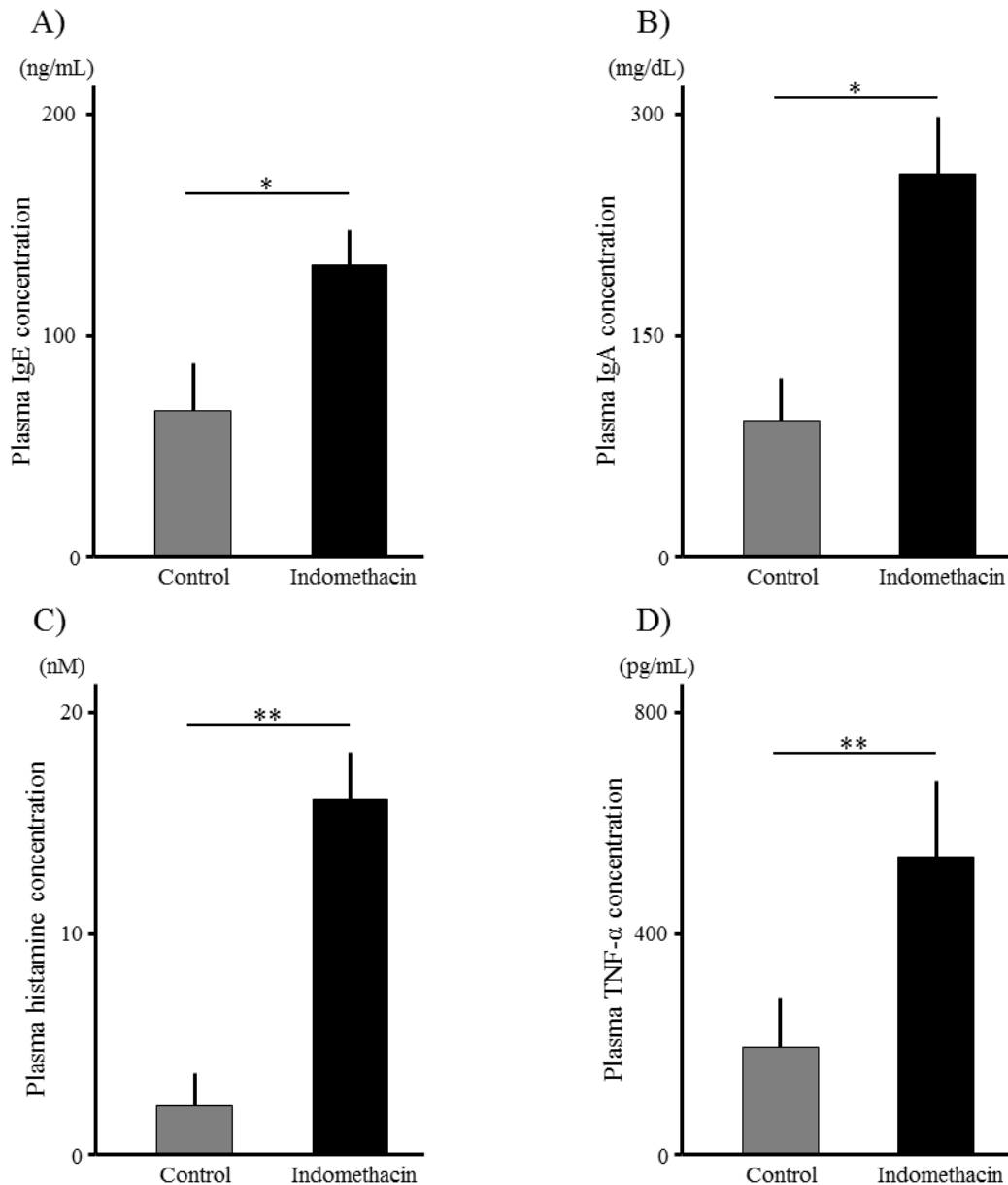


Figure 4. Plasma IgE (A), IgA (B), histamine (C), TNF- $\alpha$ (D) concentrations in hairless mice. Indomethacin: indomethacin (40 mg/kg, *p.o.*) was administered for four consecutive days. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

## 5. インドメタシン投与後の TEWL と角層水分量の測定

インドメタシン投与前, インドメタシン群のマウス背部皮膚の TEWL はコントロール群と同程度であり, 有意な差を認めなかった。インドメタシン投与後, インドメタシン群の TEWL はコントロール群に比して有意な増加を認めた (Fig. 5A)。また, インドメタシン投与前のインドメタシン群のマウス背部皮膚の角層水分量はコントロール群と同程度であり, 有意な差を認めなかった。インドメタシン投与後, インドメタシン群の角層水分量はコントロール群に比して有意な減少を認めた (Fig. 5B)。

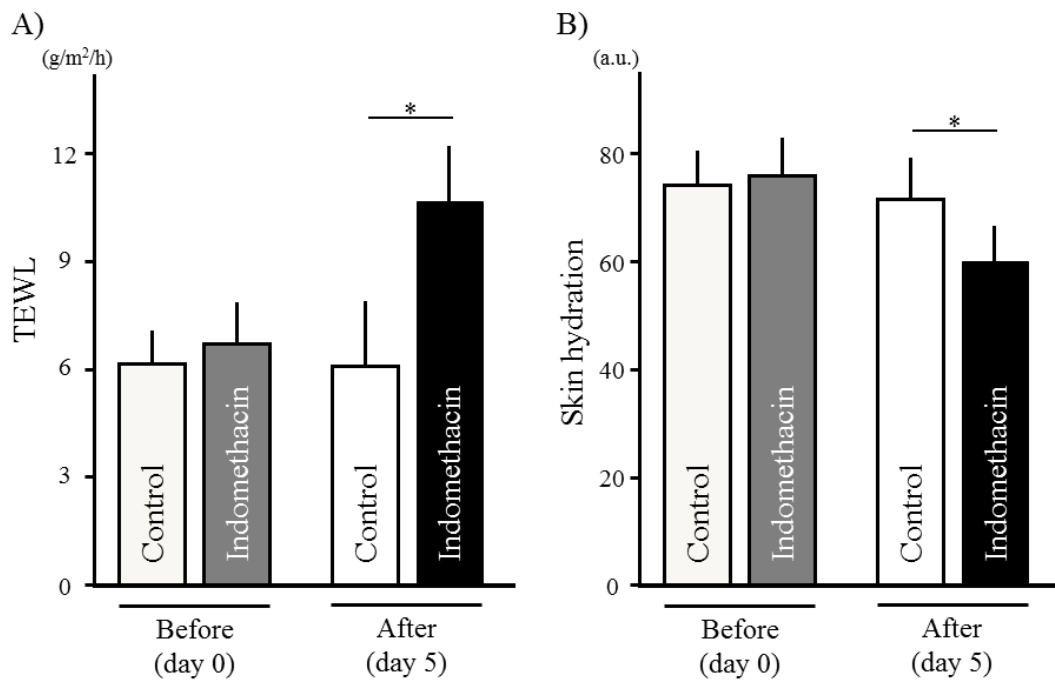


Figure 5. TEWL (A) and skin hydration levels (B) on dorsal skin of hairless mice before (day 0) and after (day 5) indomethacin treatment. TEWL: transepidermal water loss, a.u.: arbitrary unit, \*:  $p < 0.05$ .

## 6. アセチルコリン受容体アンタゴニストが及ぼす皮膚バリア機能への影響

実験開始前のインドメタシン+アトロピン群のマウス背部の TEWL はコントロール群と同程度であり、有意な差を認めなかった。実験終了後、インドメタシン+アトロピン群の TEWL はコントロール群に比して有意な増加を認めた (Fig. 6A)。また、実験開始前のインドメタシン+アトロピン群のマウス背部皮膚の角層水分量はコントロール群と同程度であり、有意な差を認めなかった。実験終了後、インドメタシン+アトロピン群の角層水分量はコントロール群に比して有意な減少を認めた (Fig. 6B)。

また、実験開始前のインドメタシン+ヘキサメトニウム群のマウス背部の TEWL はコントロール群と同程度であり、有意な差を認めなかった。実験終了後、インドメタシン+ヘキサメトニウム群の TEWL はコントロール群に比して有意な増加を認めた (Fig. 6C)。また、実験開始前のインドメタシン+ヘキサメトニウム群のマウス背部皮膚の角層水分量はコントロール群と同程度であり、有意な差を認めなかった。実験終了後、インドメタシン+ヘキサメトニウム群の角層水分量はコントロール群に比して有意な減少を認めた (Fig. 6D)。

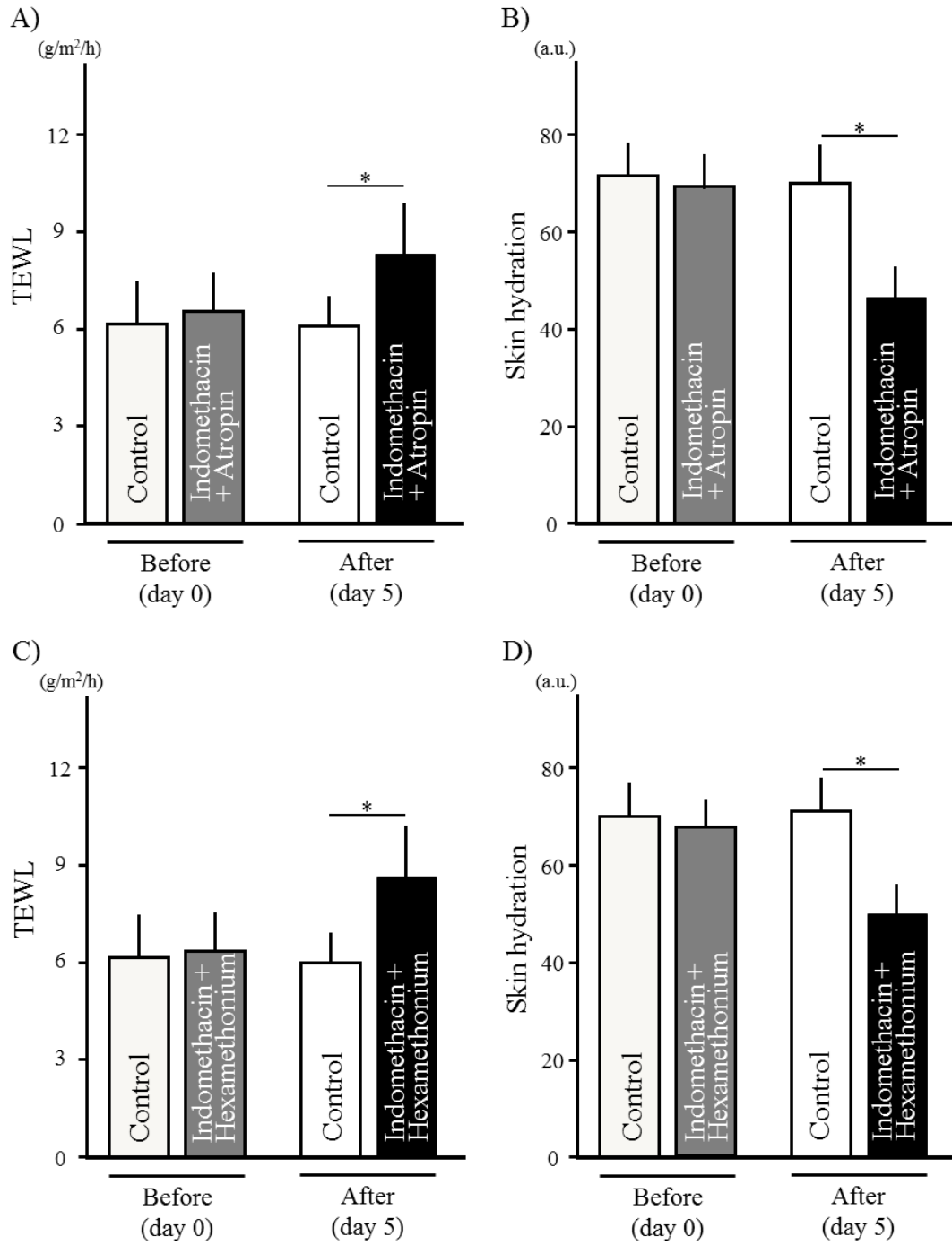


Figure 6. TEWL (A) and skin hydration levels (B) on dorsal skin of hairless mice before (day 0) and after (day 5) indomethacin + atropine treatment. TEWL (C) and skin hydration levels (D) on dorsal skin of hairless mice before (day 0) and after (day 5) indomethacin + hexamethonium treatment. TEWL: transepidermal water loss, a.u.: arbitrary unit, \*:  $p < 0.05$ .

## 7. マスト細胞ノックアウトマウスの小腸組織に及ぼすインドメタシンの影響

マスト細胞野生型マウスならびにマスト細胞ノックアウトマウスのコントロール群の小腸粘膜は多数の絨毛が整然と並んでいることが確認された。一方、インドメタシンが投与されたマスト細胞野生型マウスとマスト細胞ノックアウトマウスの小腸粘膜では、絨毛の傷害や絨毛数の著明な減少が認められた (Fig. 7の矢印)。

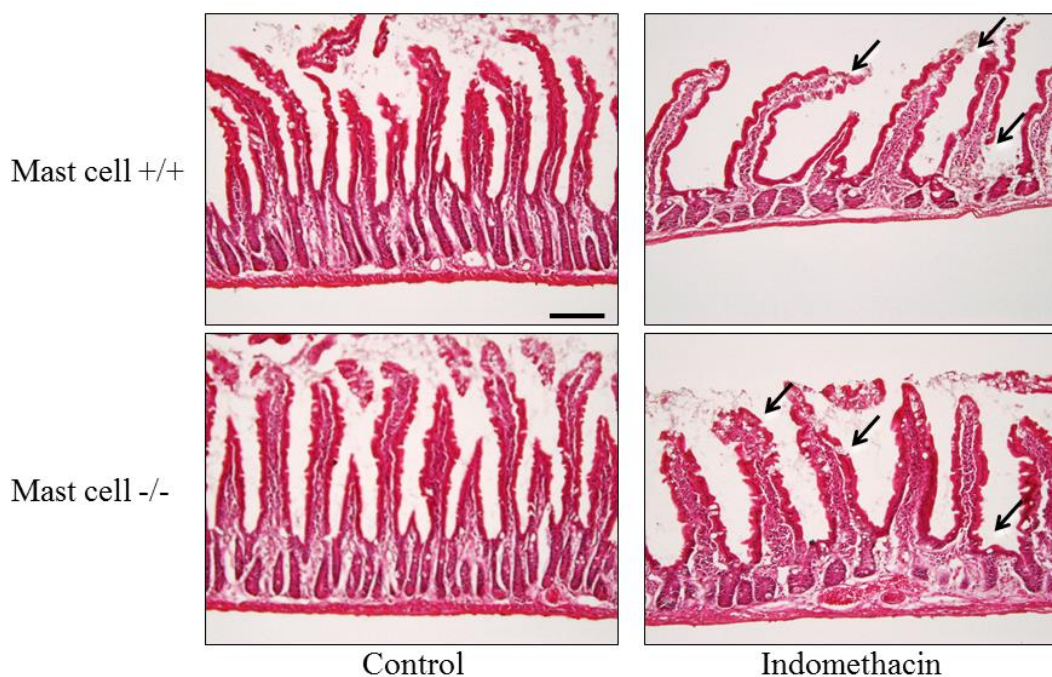


Figure 7. Histological observations of jejunum. Indomethacin (40 mg/kg, *p.o.*) was administered for four consecutive days, mast cell +/+ : WBB6F1/J-Kit<sup>+/+</sup> wild-type control mice, mast cell -/- : mast cell deficient strain WBB6F1/J-Kit<sup>W/Kit<sup>W</sup>. Arrows indicates the destruction of the jejunal epithelium. Scale bar = 100  $\mu$ m.</sup>

## 8. マスト細胞ノックアウトマウスの皮膚バリア機能に及ぼすインドメタシンの影響

マスト細胞ノックアウトマウスとマスト細胞野生型マウスの TEWL と角層水分量を調べた結果、マスト細胞野生型マウスにインドメタシンを投与した群では、コントロール群と比べて TEWL は有意に増加し、角層水分量は有意に減少した。一方、マスト細胞ノックアウトマウスにおいては、インドメタシン投与終了後の TEWL (Fig. 8A) や角層水分量 (Fig. 8B) はコントロール群と同程度を示した。

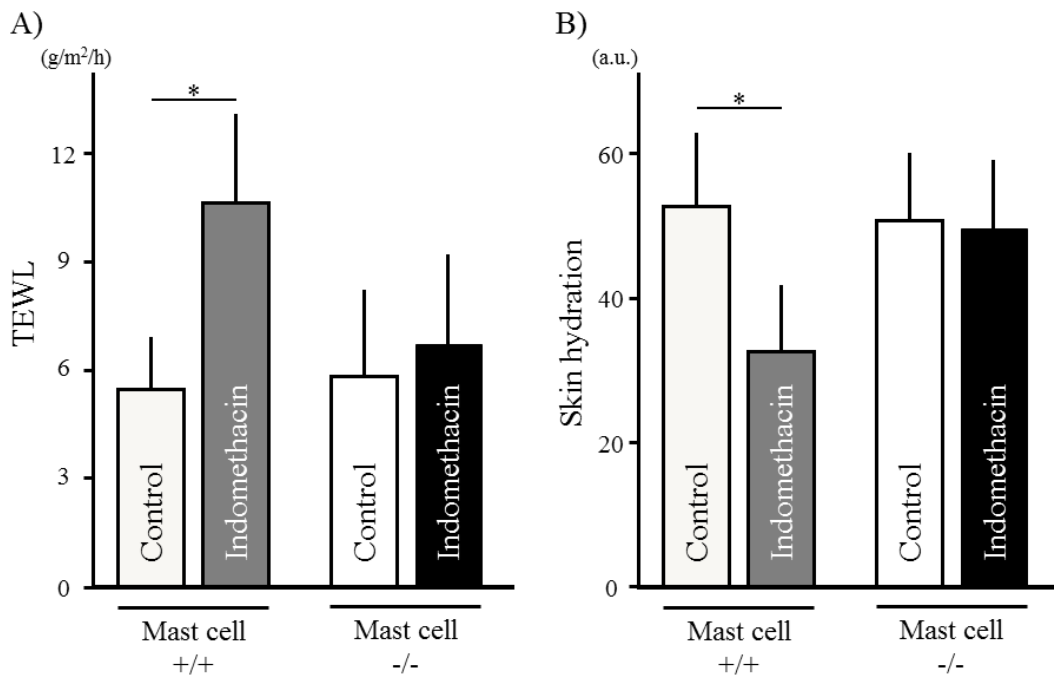


Figure 8. TEWL (A) and skin hydration levels (B) on dorsal skin of mast cell wild type (+/+) or deficient (-/-) mice after indomethacin administration (day 5). Indomethacin (40 mg/kg, *p.o.*) was administered for four consecutive days, mast cell +/+ : WBB6F1/J-Kit<sup>+</sup>/Kit<sup>+</sup> wild-type control mice, mast cell -/- : mast cell deficient strain WBB6F1/J-Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>Wv</sup>, TEWL: transepidermal water loss, a.u.: arbitrary unit, \*:  $p < 0.05$ .

#### 第4節 考察

本章では、インドメタシンによって小腸で起こった炎症反応が皮膚へと伝達され、結果として皮膚障害を誘導し、その反応には皮膚中のマスト細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにした。マスト細胞の脱顆粒によって放出されたトリプターゼは皮膚のコラーゲンを破壊し<sup>24)</sup>、さらに種々の MMPs を活性化させる<sup>30)</sup>。MMPs は皮膚の細胞外マトリックスの分解やリモデリングにおいてとても重要な役割を担っている酵素群である。MMPs の中でも特に MMP-1 や MMP-9 は、トリプターゼ陽性のマスト細胞によって、タンパク質レベルあるいは遺伝子レベルで発現の制御がなされている<sup>27)</sup>。マスト細胞による MMP-1 の産生は炎症反応部位において、細胞の浸潤や遊走に重要なプロセスと考えられている<sup>31,32)</sup>。産生された MMP-1 はトリプターゼによって活性化され、主に I 型コラーゲンの分解を引き起こす。また、MMP-9 は、皮膚では特に基底膜を構成する IV 型コラーゲンの分解を引き起こすことが分かっている<sup>24)</sup>。したがって、トリプターゼは皮膚の構造を直接的あるいは MMPs を介して間接的に破壊していると考えられる。

インドメタシン誘導小腸炎マウスの皮膚ではマスト細胞数やトリプターゼの増加が認められた。さらに、MMP-1 や MMP-9 も皮膚組織中で増加したことから、マスト細胞によって産生されたトリプターゼや MMP-1, MMP-9 が、皮膚の細胞外マトリックスを構成している重要なコンポーネントを分解へと導き、皮膚障害が惹起されたと考えられる。

本研究で用いた小腸炎マウスでは、IgE や IgA、ヒスタミンや TNF- $\alpha$  が放出され、血中濃度が上昇した。そこで、小腸炎によって増加したこれら炎症性メディエーターなどが皮膚に伝わり、皮膚組織中のマスト細胞を活性化させた可能性が考えられる。IgE はマスト細胞が有する高親和性 IgE 受容体と高い親和性を有しており、この受容体に結合することでマスト細胞を活性化させる代表的な物質である。IgE が結合したマスト細胞は脱顆粒によってヒスタミンやトリプターゼ、ヘパリンなどを放出し、炎症反応を促進させる<sup>33, 34)</sup>。しかしながら、インドメタシン誘導小腸炎マウスには特定の antigen が存在していないことから、血中で増加した IgE が皮膚のマスト細胞の活性化を引き起こし、皮膚障害を惹起させたとは考えにくい。ヒスタミンはマスト細胞の活性化にも関与しており、



特にマスト細胞中の顆粒の成熟を促進させる作用を有している<sup>35)</sup>。さらに、H4受容体を介してマスト細胞を遊走させる能力も有する<sup>36)</sup>。しかしながら、ヒスタミンが直接マスト細胞の脱顆粒を誘導させるといった報告は認められない。TNF- $\alpha$  は NSAIDs による腸管の炎症の病因の一つとして著明な分子マーカーである。NSAIDs は PGs の生合成を阻害する。PGs の中でも、特に腸管に存在する PGE2 は TNF- $\alpha$  の合成を抑制することから、NSAIDs に起因する PGE2 の発現レベルの減少は、TNF- $\alpha$  合成の促進を引き起こす<sup>26)</sup>。TNF- $\alpha$  は主にマクロファージによって産生されるが、マスト細胞によっても産生されることが報告されている<sup>37)</sup>。また、TNF- $\alpha$  はマスト細胞中において、MMP-9 mRNA の発現や MMP-9 のタンパク質レベルでの活性化を誘導する<sup>27)</sup>。このように、MMP-9 の活性化にはマスト細胞やマクロファージから放出された TNF- $\alpha$  が関与していることが考えられるが、TNF- $\alpha$  がマスト細胞の脱顆粒を誘導するという報告は認められない。IgA は腸管に広く分布している免疫グロブリンであり、腸管の感染に対して免疫防御反応を担っているが、マスト細胞を直接活性化して脱顆粒を誘導するといった報告は認められない。以上より、小腸炎マウスにおいて血中で増加した IgE や IgA、ヒスタミンや TNF- $\alpha$  が皮膚のマスト細胞を活性化した可能性は低いと考えられることから、他の炎症性メディエーターを介したシグナル伝達経路の存在が推察される。マスト細胞ノックアウトマウスを用いた検討により、マスト細胞が皮膚障害の発現に必須であることが示唆されたが、現時点では、腸管の障害がどのようなシグナル伝達経路を介して皮膚のマスト細胞に伝達されているのかは明らかになっていない。

近年、眼球への紫外線照射によって交感神経系が刺激を受けて、腸管粘膜のマスト細胞産生が誘導され、腸管蠕動運動が抑制されることが報告された<sup>38)</sup>。この現象は、傷害されたある組織から生じたシグナルが、離れた別の組織に神経系のシグナル伝達経路を介して影響を及ぼすという生体のメカニズムの存在を明らかにしている。小腸炎マウスにおいても、小腸炎が神経系のメカニズムを介してシグナル伝達を行い、皮膚のマスト細胞を活性化した可能性が考えられる。そこで、小腸炎マウスに対してアトロピンやヘキサメトニウムといった神経節遮断剤を投与して検討を行ったが、皮膚障害の発現を抑制することはできなかった。この結果から、アトロピンやヘキサメトニウムによって遮断される神経伝達系以外の、他の神経系シグナルが関与している可能性もあると考え

られる。

本研究では、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減少や皮膚バリア機能低下を伴った皮膚障害が発現し、この障害には皮膚中の活性化されたマスト細胞によって放出されたトリプターゼやトリプターゼ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。皮膚中のマスト細胞の活性化には、体内に吸収されたインドメタシンが直接関与している可能性は否定できないが、このマスト細胞の活性化には腸管と皮膚の間に介在する免疫学的なメカニズムや非免疫学的なメカニズム、あるいは神経系のメカニズムが関与していることも考えられる<sup>39)</sup>。NSAIDs による腸管障害と皮膚中のマスト細胞とのシグナル伝達の詳細を明らかにするためには、今後、マスト細胞に影響を与える様々な因子を総合的に検討していく必要がある。インドメタシンは世界中で広く使用されているが、使用している患者の中にはすでに皮膚障害を発現している者も含まれる。アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症は皮膚のバリア機能が顕著に低下していることから<sup>40, 41)</sup>、これらの患者に対してインドメタシンを投与する際には、より皮膚の状態に注意を払う必要があると考える。

## 第5節 小括

第1章では、インドメタシン誘導小腸炎マウスを用いて、皮膚の生理機能に対する小腸炎の影響について検討を行った。

1. 小腸炎マウスの血中では、IgE や IgA, ヒスタミン, TNF- $\alpha$  の増加を認め、皮膚組織ではマスト細胞数の増加や, MMP-1, MMP-9 の増加, I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンの減少が認められた。
2. 小腸炎マウスの皮膚はコントロールと比較して結合組織の間隙が大きく, 皮膚の厚みも薄くなった。
3. TEWL の増加や角層水分量の減少といった皮膚バリア機能の低下を示すデータが得られた。
4. マスト細胞ノックアウトマウスに小腸炎を誘導したが, 皮膚バリア機能に変化が認められなかったことから, 小腸炎マウスでは皮膚中のマスト細胞を介した障害が惹起されることが示唆された。
5. 皮膚のマスト細胞へのシグナル伝達に, ムスカリン受容体あるいはニコチン受容体を介した経路が関与することは否定された。

以上より, 小腸炎マウスでは, マスト細胞を介した皮膚の障害が発現することを明らかにした。

## 第2章 皮膚の生理機能に対する大腸炎の影響

### 第1節 緒言

アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症といった代表的な皮膚疾患は、病態の進行に皮膚のバリア機能障害を伴っている<sup>42-44)</sup>。さらに、これらの原疾患が掻痒感を誘発させ、痒みと掻破の悪循環 (itch scratch cycle) を引き起こし、さらなる症状の悪化を招く事態を引き起こす。このように、皮膚疾患を原疾患として皮膚病変が進行していくケースがある一方で、様々な組織や臓器に発症した障害が皮膚の病態に関わってくることも知られている。例えば、慢性肝疾患や糖尿病などの内臓疾患が皮膚の障害を引き起こすことが知られている<sup>1-3)</sup>。また、第1章で述べたように、小腸炎マウスにおいて皮膚障害が誘導されるケースも認められた<sup>45)</sup>。以上より、内臓疾患が離れた臓器である皮膚においても障害を引き起こす可能性が示唆されるが、この内臓疾患による皮膚障害の詳細な発症メカニズムについては明らかになっていない。

大腸は消化管の一部であり、経口で摂取された電解質や水分の吸収を担っており、生体にとって重要な臓器の一つである<sup>46)</sup>。大腸に発症する代表的な疾患の一つである炎症性腸疾患 inflammatory bowel disease (IBD) は活動期と寛解期を慢性的に繰り返しながら、進行していく炎症性の腸疾患である<sup>47)</sup>。この疾患は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はなく、全身へ影響を及ぼす点が特徴的である。例えば、IBD 患者では静脈血栓塞栓症の発症リスクが増加することが報告されており、特にその傾向は活動期において顕著なことが知られている<sup>48-49)</sup>。IBD はその他にも皮膚<sup>50-51)</sup>や関節、眼などの他の器官<sup>52)</sup>においても障害を引き起こすことが報告されているが、これらの詳細な発症メカニズムについては解明されていない。

興味深いことに IBD 病態下では tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) が大量に産生されており、この TNF- $\alpha$  は大腸の炎症反応の進行に重要な炎症性メディエーターとなっている<sup>53)</sup>。TNF- $\alpha$  はインターロイキン 6 (interleukin-6: IL-6) の産生を促し、サイトカインのネットワークを活性化するとともに、白血球の遊走も誘導し炎症反応を亢進させる。一方、TNF- $\alpha$  は皮膚疾患の一つである乾癬でも、その病態の進行に深く関与している<sup>54)</sup>。TNF- $\alpha$  は真皮の線維芽細胞に作用して

コラーゲンの分解を誘導することから、過剰な TNF- $\alpha$  は皮膚の構造に変化をきたす可能性が考えられる。また、IBD 病態下では TNF- $\alpha$  によって誘導された inducible nitric oxide synthase (iNOS) 陽性細胞が増加している<sup>55)</sup>。iNOS によって産生された nitric oxide (NO) は酸化ストレスとして腸管の組織障害に関与している<sup>56)</sup>。この NO は TNF- $\alpha$  と共に皮膚で発現する炎症反応時に増加することが認められている<sup>57)</sup>。この TNF- $\alpha$  の増加は iNOS ノックアウトマウスでは認められないこと、また、iNOS ノックアウトマウスに TNF- $\alpha$  を投与しても炎症反応が亢進しないことから、NO と TNF- $\alpha$  はお互いに影響しあいながら炎症反応を亢進させる働きを持っていると考えられる。以上より、TNF- $\alpha$  や NO によって生じた酸化ストレスが、大腸のみならず皮膚においても影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、第2章では dextran sodium sulfate (DSS) によって大腸炎を誘導したマウスを用いて、皮膚の生理機能に対する大腸炎の影響について検討を行った。

## 第2節 実験方法

### 1. 実験動物

ヘアレスマウス Hos:HR-1 (7 weeks old, Japan SLC, Shizuoka, Japan) を温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (light: 8:00 – 20:00 h) の環境下、固形飼料および水を自由に摂取させ飼育した。1 週間の予備飼育後、マウスをランダムにコントロール群、DSS 群、DSS+アトロピン群、DSS+ヘキサメトニウム群、DSS + N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 群、DSS+抗 TNF- $\alpha$  群の 6 つの群 ( $n = 5/\text{each group}$ ) に振り分けた。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験委員会による研究計画書の承認を得た後に、総理府の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、ならびに「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」に従って実施した。

### 2. DSS 投与による大腸炎の誘発

DSS 群、DSS + アトロピン群、DSS + ヘキサメトニウム群、DSS + L-NAME 群、DSS + 抗 TNF- $\alpha$  群の 5 つの群のマウスには、5.0% (W/V) DSS (molecular weight: 36,000-50,000 Da; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) を給水ボトルに入れて摂取させ、大腸炎を誘発させた。コントロール群のマウスには給水ボトルに水を入れて摂取させた。大腸炎誘発までの投与期間は、DSS + 抗 TNF- $\alpha$  群は 21 日間、その他の群は 7 日間であった。

大腸炎の発現をモニタリングするため、各マウスの体重と糞の状態を観察した。大腸炎の重症度は、マウスの体重、糞の状態、さらに大腸の長さに基づいて評価した。糞の状態は、糞の硬さ (0 = normal; 1 = soft; 2 = very soft, but formed; 3 = liquid) と出血の状態 (0 = negative; 1 = faintly blue; 2 = moderately blue; 3 = dark blue; 4 = blood visible using the guaiac paper test) の 2 つのパラメーターを用いて数値化し、その合計を算出して大腸炎スコアとした<sup>58)</sup>。

DSS+アトロピン群、DSS+ヘキサメトニウム群、DSS + L-NAME 群のマウスには、それぞれアトロピン (1 mg/kg/day; Wako, Osaka, Japan)、ヘキサメトニウム

(10 mg/kg/day; Wako), L-NAME (20 mg/kg/day; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を既報に倣って7日間連日腹腔内に投与した<sup>44,59)</sup>。DSS+抗TNF- $\alpha$ 群においては, 抗TNF- $\alpha$ 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)が大腸炎の発症を遅延させるため, 発症までの投与期間が21日間と他の群と比して長くなった。投与終了後, マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*)によって麻酔をしたのち, 実験に用いた。

### 3. マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量と角層水分量の測定

マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量 (transepidermal water loss: TEWL) と角層水分量について, 第1章と同様の実験手法を用いて測定を行った。実験開始前と実験開始7日後 (抗TNF- $\alpha$ を投与した群は21日後) のTEWLならびに角層水分量を測定した。

### 4. マウスの血液ならびに大腸と皮膚の組織の採取

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を腹腔内投与してマウスに麻酔したのち, 心臓穿刺により1 mLの血液を採取した。また, 脱血を行ったのちに大腸と皮膚の組織を採取し, 凍結保存した。

### 5. 組織染色

マウスから採取した大腸と皮膚の組織の一部は免疫組織化学に用いるため, パラホルムアルデヒド溶液 (4%, Wako) を用いて固定した。固定された大腸と皮膚の組織を凍結したTissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋し, 5  $\mu$ mの厚さで薄切を行った。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色によって薄切した切片を染色し, 光学顕微鏡にて観察し, 組織学的に傷害の検討を行った。表皮の厚みを評価するため, 画像上でランダムに10か所の平坦な部

分を選出し、表皮の最外層から真皮との境目までの長さを測定し、平均値を算出した。

皮膚の組織切片はトルイジンブルー染色を行って、マスト細胞の評価を行った。また、以下の1次抗体を用いて、免疫組織化学的な検討を行った。1次抗体は、ヤギ抗マスト細胞トリプターゼ抗体 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), マウス抗 TNF-receptor 1 (TNFR1) 抗体 (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc.), マウス抗 TNFR2 抗体 (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc.), ウサギ抗 iNOS 抗体 (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc.), マウス抗ニコチン受容体抗体 (1:100; GeneTex, Irvine, CA, USA), ウサギ抗ムスカリン受容体抗体 (1:100; Abcam, Cambridge, MA, USA) である。1次抗体処理後、fluorescein isothiocyanate 標識抗マウス IgG 抗体, tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) 標識抗ヤギ IgG 抗体 (1:30; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), あるいは TRITC 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:30; Dako Cytomation) を用いて2次抗体処理を行った。タンパク質の発現は、蛍光顕微鏡 BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて免疫組織化学的に評価を行った。iNOS 陽性細胞数の計測は、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、第1章と同様の手法で解析した。

## 6. ウェスタンブロッティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析

採取したマウスの皮膚組織 100 mg を剪刀で細かく刻んだのち、組織用懸濁試薬 (KURABO, Osaka, Japan) に浸漬し、氷上でハンドミキサー (POLYTRON PT 1200 CL; Kinematica AG, Littau, Switzerland) を用いてホモジナイズ (20,000 rpm, 60 sec) した。懸濁液を  $8,000 \times g$  で 10 分間遠心分離したのち、上清を取り出し、解析に用いるまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。上清を溶解後、総タンパク質量  $12.5 \mu\text{g}$  となるようにサンプルを調整し、4-12% BIS-TRIS Bolt gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて 200V の定電圧で電気泳動を行った。電気泳動後、iBlot Western blotting system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いてニトロセルロース膜へタンパク質の転写を行い、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩、5% スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後、 $25^{\circ}\text{C}$  で 1 時間、ウサギ抗 I 型コラーゲン



ン抗体 (1:1,000, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA), ウサギ抗 IV 型コラーゲン抗体 (1:1,000, Abcam), マウス抗 TNFR1 抗体 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), マウス抗 TNFR2 抗体 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), ウサギ抗 iNOS 抗体 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), ヤギ抗マスト細胞トリプターゼ抗体 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), あるいはマウス抗  $\beta$ -アクチン抗体 (1:5,000; Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて 1 次抗体処理した。膜上の免疫複合体は horseradish peroxidase で標識された 2 次抗体 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) で処理を行ったのち, ImmunoStar Zeta (Wako) で化学発光させ, lumino-image analyzer (LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

#### 7. 血中 TNF- $\alpha$ と IL-6 の濃度測定

血液サンプルを 4°C, 10,000  $\times g$  で 10 分間遠心分離し, 上清部分を採取し, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に用いた。血中の TNF- $\alpha$  と IL-6 の濃度は, それぞれの ELISA Kit (R&D Systems) を用いて測定した。測定にはマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いた。

#### 8. 血中の亜硝酸/硝酸とアセチルコリンの濃度測定

iNOS のサロゲートマーカーとして血中の亜硝酸/硝酸 ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) について,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  Assay Kit-C II (Colorimetric) Griess Reagent Kit (DOJINDO Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を用いて測定した。また, 血中のアセチルコリン濃度について, Acetylcholine Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。

#### 9. 統計解析

全てのデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。2 群間のデータの比較には

Student's *t*-test を用いた。3 群間以上のデータの比較には一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) を用い、その後の多重比較には Tukey の方法を用いた。危険率が 5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。

### 第3節 結果

#### 1. DSS 投与後のマウスの体重や血中分子マーカーの濃度測定

DSS 群のマウスにおいて下痢の発症と血便を確認した。コントロール群の大腸炎スコアは0であったが、DSS 群では  $5.0 \pm 0.8$  と高値を示した。また、DSS 群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 (Fig. 9A, B)。DSS 投与7日後、血中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、アセチルコリンの濃度はそれぞれコントロール群と比して有意に増加した (Fig. 9C-F)。

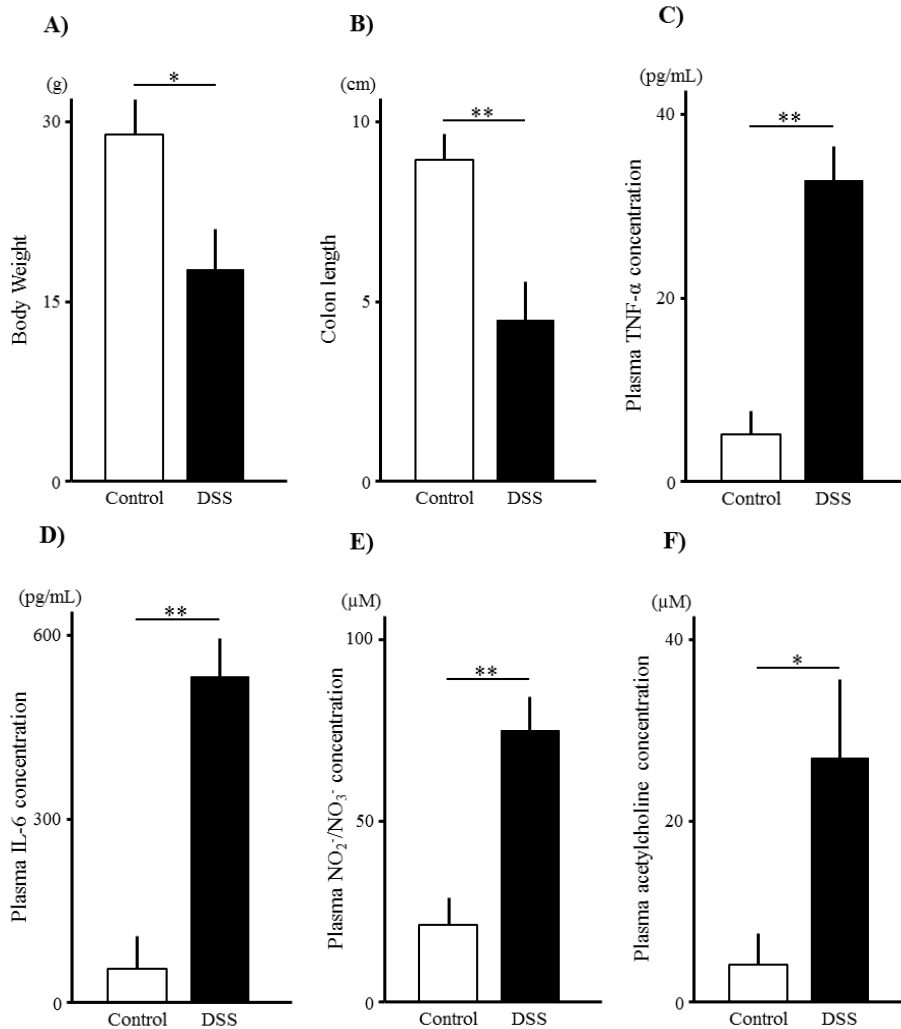


Figure 9. Analysis of body weight (A), colon length (B), plasma TNF- $\alpha$  concentration (C), plasma IL-6 concentration (D), plasma NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration (E), and plasma acetylcholine concentration (F) after DSS treatment. Treatment groups: Control and DSS (Treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

## 2. DSS 投与後の小腸ならびに皮膚の組織学的な検討

大腸の組織を HE 染色で確認したところ、コントロール群では粘膜固有層において陰窩が整然と配列していた (Fig. 10A)。一方、DSS 群では粘膜下層の浮腫や炎症性細胞の浸潤 (Fig. 10B の四角の中) と陰窩膿瘍が認められた (Fig. 10B の矢印)。皮膚の組織を HE 染色で確認したところ、DSS 群では表皮が薄くなっており、真皮の結合組織の間隙が大きくなっていることが認められた (Fig. 10C, D)。

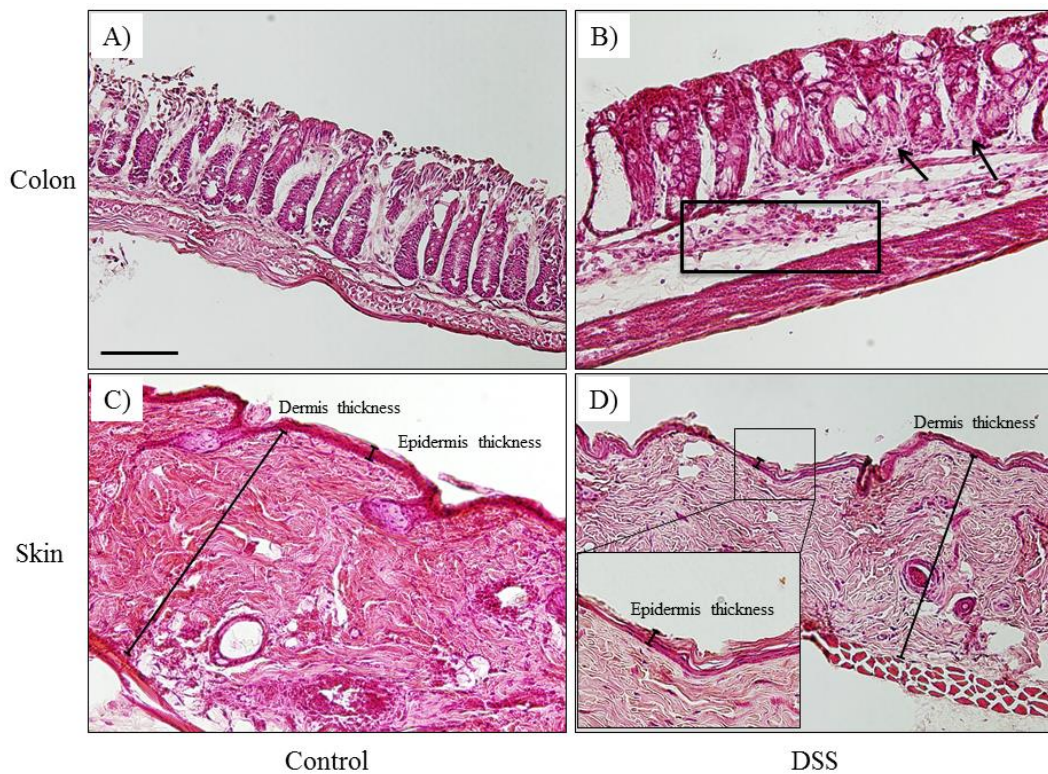


Figure 10. Histological analysis of colon (A, B) and skin tissue sections (C, D). Treatment groups: Control (untreated) and DSS (Treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days). Arrows indicates crypt abscess. The square area indicates immune cell infiltration and edema. Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 3. 皮膚障害の検討

DSS 群の皮膚中に発現している I 型コラーゲンならびに IV 型コラーゲンの発現量は、コントロール群に比して有意に減少した (Fig. 11A)。また、DSS の処置終了後、DSS 群の TEWL はコントロール群に比して有意に増加し (Fig. 11B), DSS 群の角層水分量はコントロール群に比して有意に減少した (Fig. 11C)。

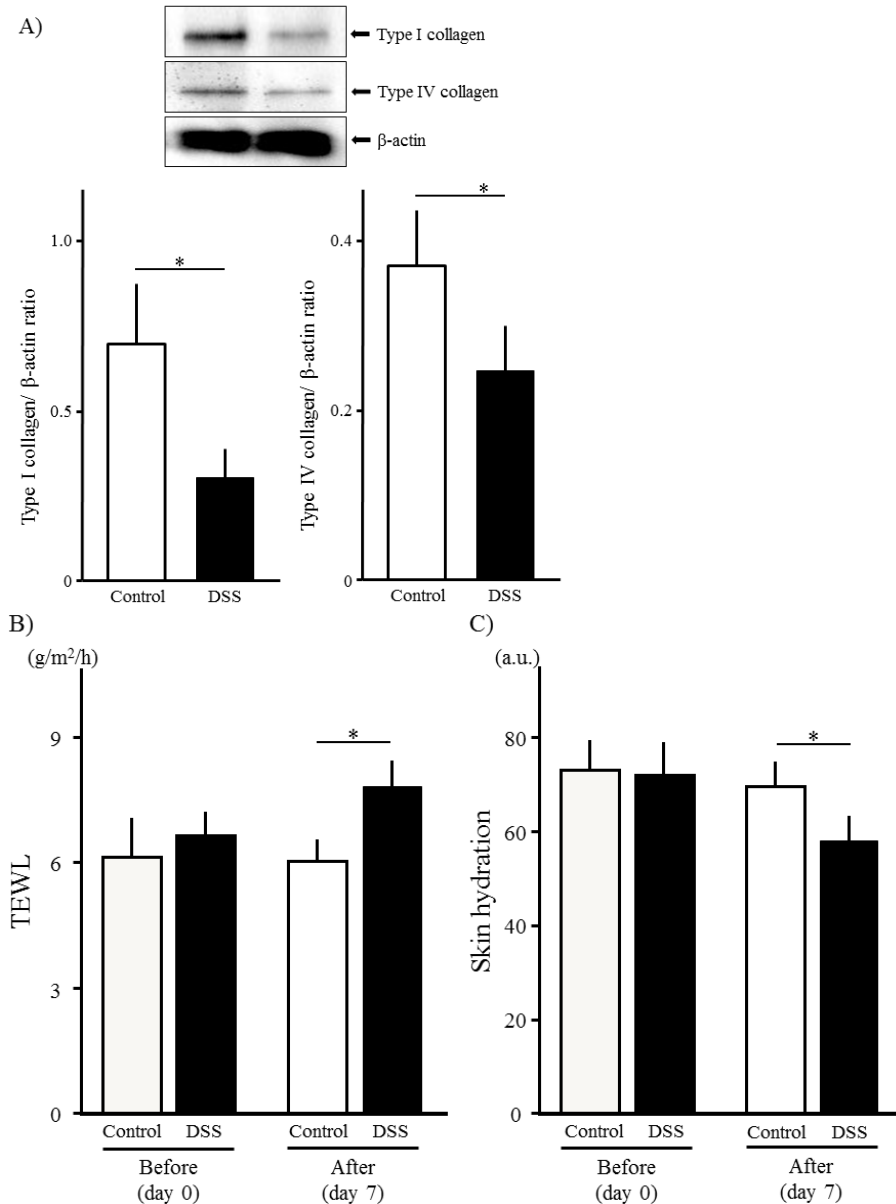


Figure 11. (A) Expression of types I and IV collagen in the skin. Measurements of TEWL (B) and skin hydration (C) on the dorsal skin before and after DSS treatment. Treatment groups: Control and DSS (Treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days). TEWL: transepidermal water loss. a.u.: arbitrary units. Scale bar = 100  $\mu$ m. \*:  $p < 0.05$ .

#### 4. DSS 投与による皮膚組織中の iNOS の発現

免疫組織化学による検討の結果, DSS 群の皮膚組織中, 特に真皮において iNOS 陽性細胞数の増加を認めた (Fig. 12A, B)。ウェスタンブロッティングによる検討の結果, DSS 群の皮膚組織中の iNOS の発現量はコントロール群に比して有意に増加した (Fig. 12C)。

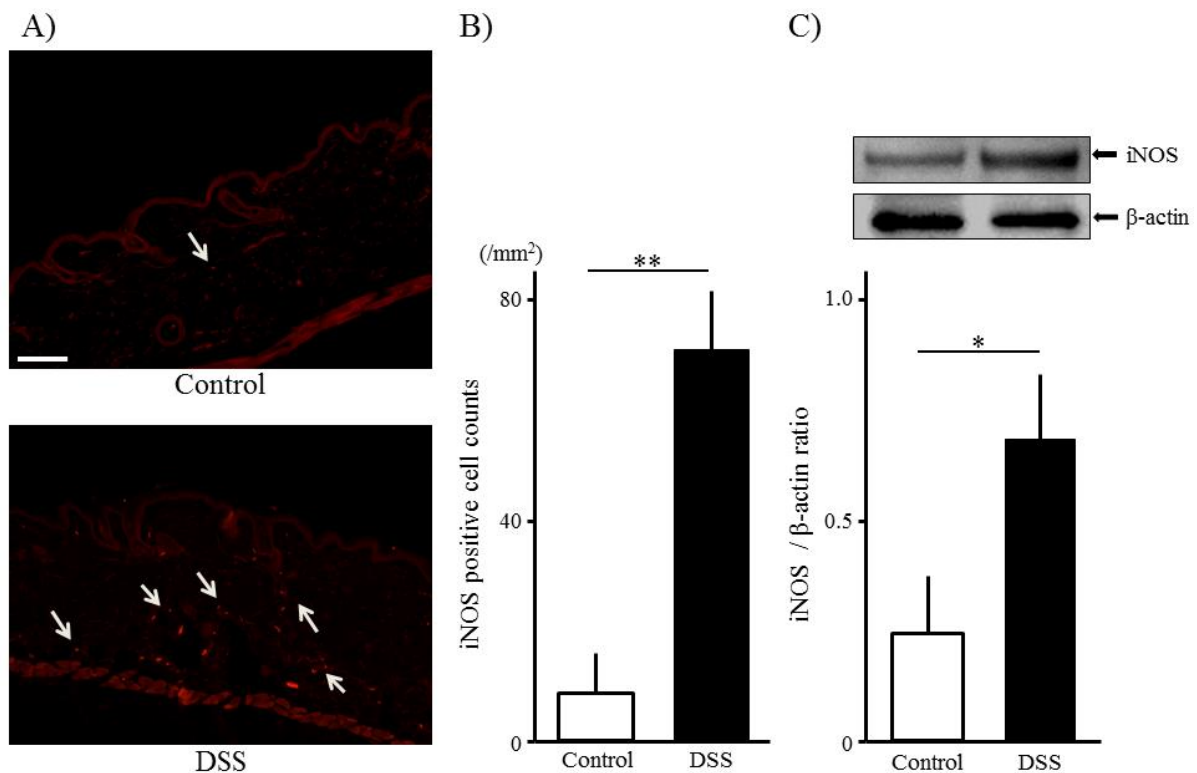


Figure 12. Immunohistochemical analysis of iNOS (A) and stained iNOS positive cell counts in the skin (B). Western blotting analysis for iNOS in skin (C). Treatment groups: Control and DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days). iNOS: inducible nitric oxide synthase. Arrows indicates positive staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

## 5. 大腸炎マウスの体重や大腸の長さに及ぼす L-NAME の影響

DSS 群の体重ならびに大腸の長さはコントロール群に比して有意に減少した。NOS 阻害剤である L-NAME を投与された DSS + L-NAME 群においても、体重ならびに大腸の長さはコントロール群に比して有意に減少し、DSS 群と同程度であった (Fig. 13A, B)。

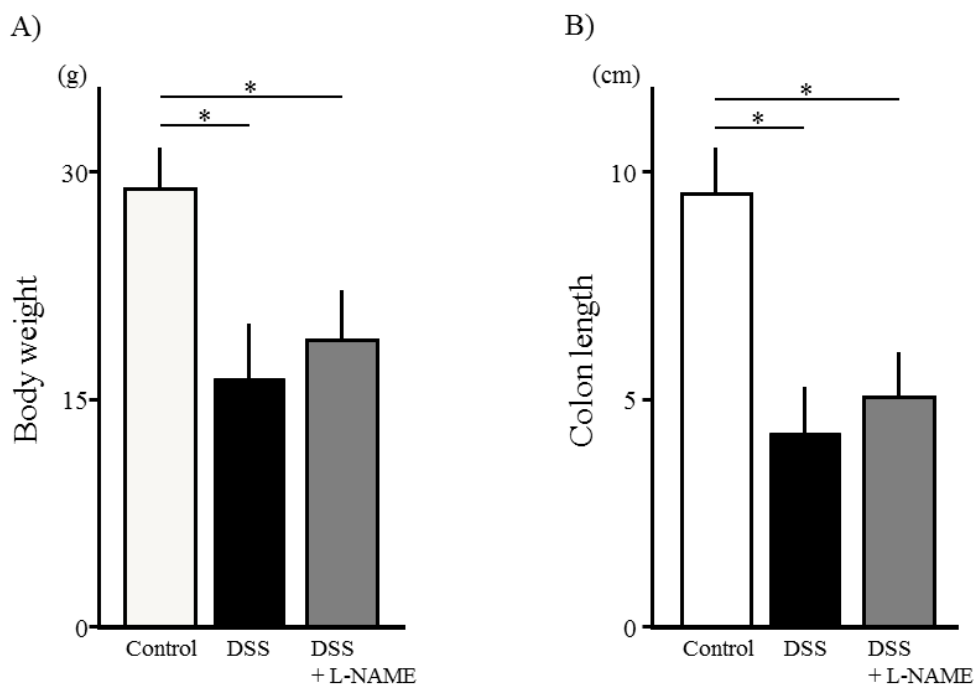


Figure 13. Analysis of body weight (A) and colon length (B) after treatment. Treatment groups: Control, DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days) and DSS + L-NAME (treated with 5.0% DSS and 20 mg/kg of L-NAME for 7 consecutive days). L-NAME: N(G)-nitro-L-arginine methyl ester. \*:  $p < 0.05$  (One-way ANOVA, post hoc Tukey's test).

## 6. 皮膚バリア機能に及ぼす L-NAME の影響

ウェスタンブロッティングの結果, DSS 群の皮膚中における iNOS の発現量はコントロール群に比して有意に増加した。DSS + L-NAME 群の皮膚中の iNOS の発現量もコントロール群に比して有意に増加したが, その発現量は DSS 群に比して有意に少なかった (Fig. 14A)。続いて, 皮膚バリア機能を評価するため, DSS + L-NAME 群の TEWL と角層水分量を測定した結果, これらの値は DSS 群と同程度を示した (Fig. 14B, C)。

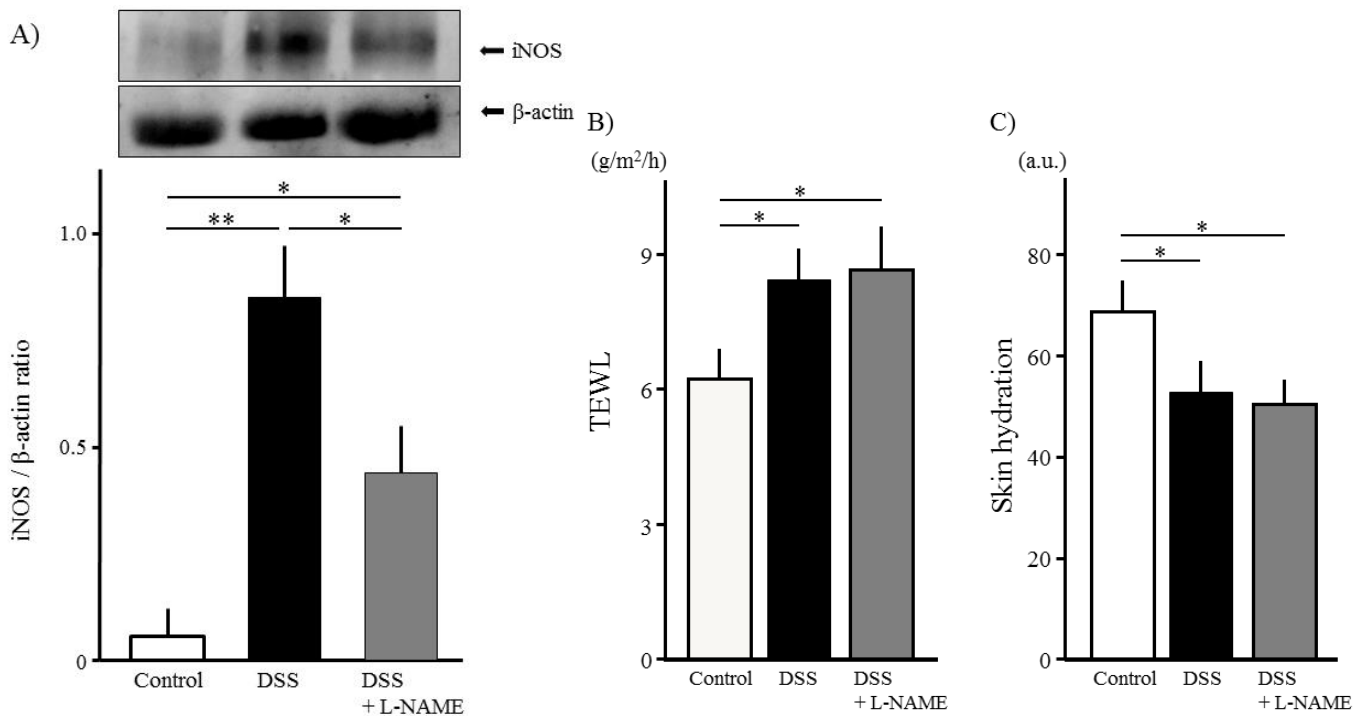


Figure 14. Plasma expression levels of iNOS after treatment measured by western blotting (A). Measurements of TEWL (B) and skin hydration (C) on the dorsal skin after treatment. Treatment groups: Control, DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days), and DSS + L-NAME (treated with 5.0% DSS and 20 mg/kg of L-NAME for 7 consecutive days). L-NAME: N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, iNOS: inducible nitric oxide synthase, TEWL: transepidermal water loss. a.u.: arbitrary units. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  (One-way ANOVA, post hoc Tukey's test).



## 7. DSS 投与による皮膚組織中の TNFR の発現

免疫組織化学による検討の結果、DSS 群の皮膚中において TNFR1 の陽性細胞の発現が認められた (Fig. 15A の矢印)。一方、DSS 群の皮膚中では TNFR2 の顕著な増加は認められなかった。ウェスタンブロッティングによる検討の結果、DSS 群の皮膚中の TNFR1 の発現量はコントロール群に比して有意に増加した。一方、TNFR2 の発現量はコントロール群と同程度であった (Fig. 15B)。

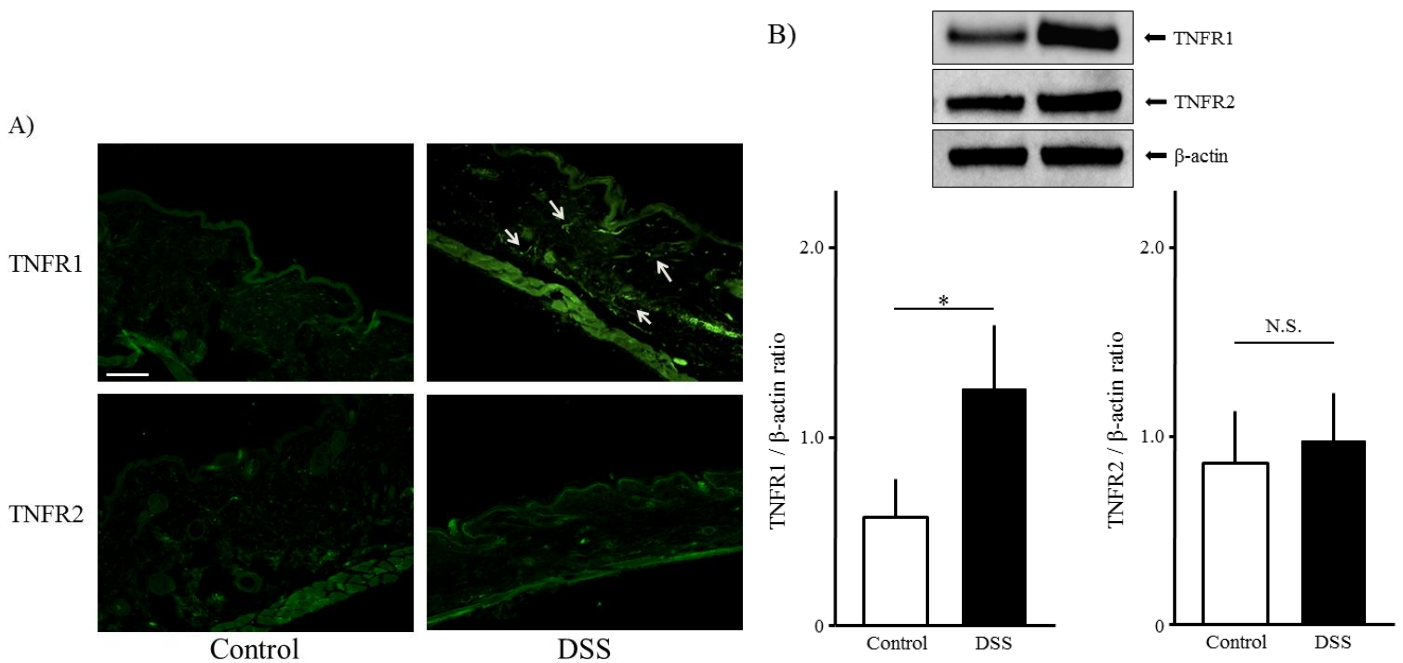


Figure 15. Immunohistochemistry (A) and western blotting (B) of TNFR1 and TNFR2 expression after DSS treatment. Treatment groups: Control and DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days). TNFR: tumor necrosis factor receptor. Arrows indicates positive staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m. N.S.: not significant. \*:  $p < 0.05$ .

## 8. 大腸炎マウスの体重や大腸の長さおよび抗 TNF- $\alpha$ 抗体の影響

DSS 群の体重ならびに大腸の長さはコントロール群に比して有意に減少した。抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与された DSS+抗 TNF- $\alpha$  群においても、体重ならびに大腸の長さはコントロール群に比して有意に減少し、DSS 群と同程度であった (Fig. 16A, B)。

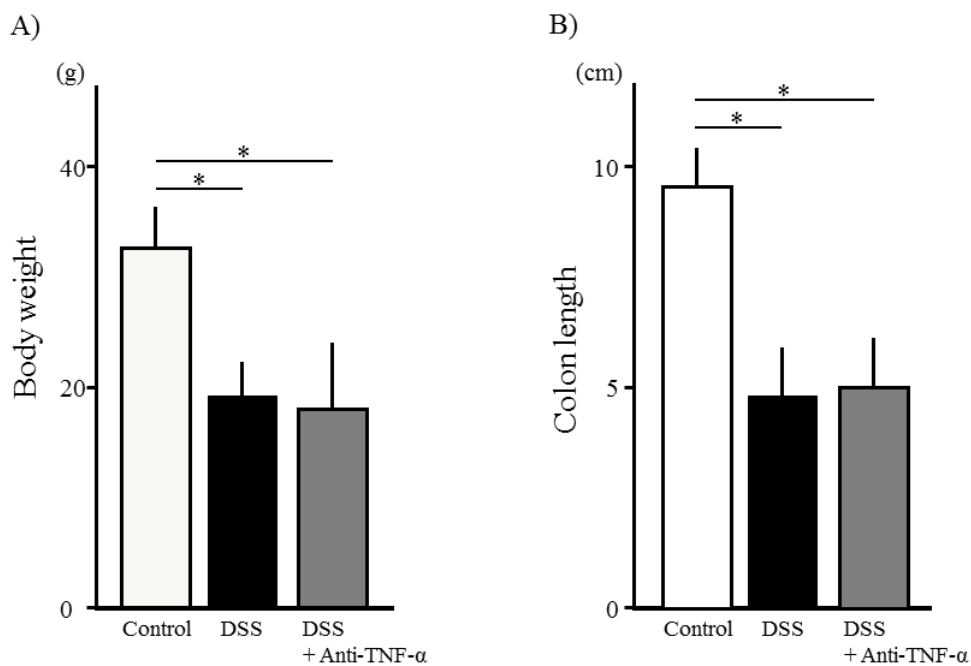


Figure 16. Analysis of body weight (A) and colon length (B) after treatment. Treatment groups: Control, DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days) and DSS + Anti-TNF- $\alpha$  (treated with 5.0% DSS and 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of antibody for 21 consecutive days). \*:  $p < 0.05$  (One-way ANOVA, post hoc Tukey's test).

## 9. 皮膚バリア機能に及ぼす抗 TNF- $\alpha$ 抗体の影響

DSS 群の血中 TNF- $\alpha$  濃度は、コントロール群に比して有意に増加した。DSS + 抗 TNF- $\alpha$  群の血中 TNF- $\alpha$  濃度もコントロール群に比して有意に増加したが、その発現量は DSS 群に比して有意に少なかった (Fig. 17A)。続いて、皮膚バリア機能を評価するため、DSS + 抗 TNF- $\alpha$  群の TEWL と角層水分量を測定した結果、これらの値は DSS 群と同程度を示した (Fig. 17B, C)。

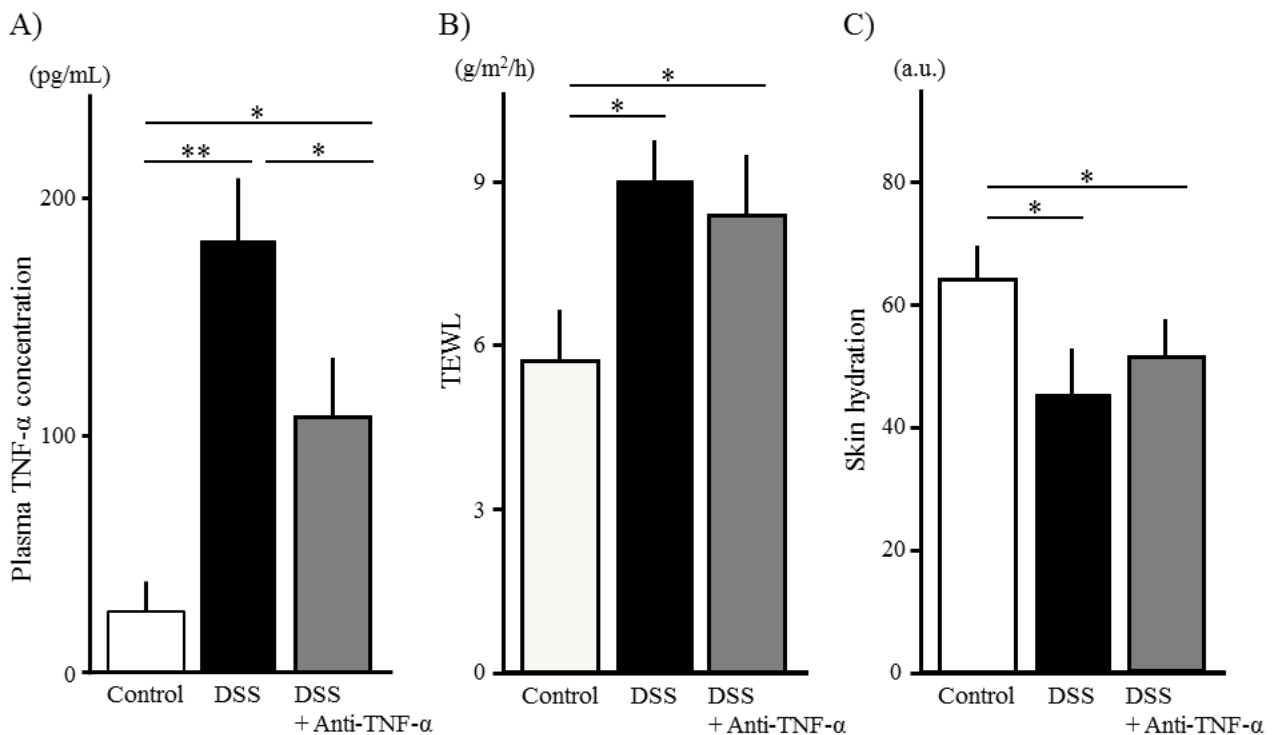


Figure 17. Plasma TNF- $\alpha$  concentration after treatment (A). Measurements of TEWL (B) and skin hydration (C) on the dorsal skin after treatment. Treatment groups: Control, DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days), and DSS + Anti-TNF- $\alpha$  (treated with 5.0% DSS and 3.0  $\mu$ g/kg of antibody for 21 consecutive days). TEWL: transepidermal water loss. a.u.: arbitrary units. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  (One-way ANOVA, post hoc Tukey's test).

## 10. 皮膚中のマスト細胞の発現

皮膚中のマスト細胞についてトルイジンブルー染色を行った結果、コントロール群に比して DSS 群の皮膚中ではマスト細胞数の増加が認められた (Fig. 18A の矢印)。同様に、マスト細胞のトリプターゼを免疫組織化学によって検出した結果、DSS 群の皮膚中ではコントロール群に比してマスト細胞数が増加した (Fig. 18B の矢印)。ウェスタンブロッティングによってマスト細胞のトリプターゼの発現量を解析した結果、DSS 群の皮膚中ではコントロール群に比してマスト細胞トリプターゼの発現量が増加した (Fig. 18C)。

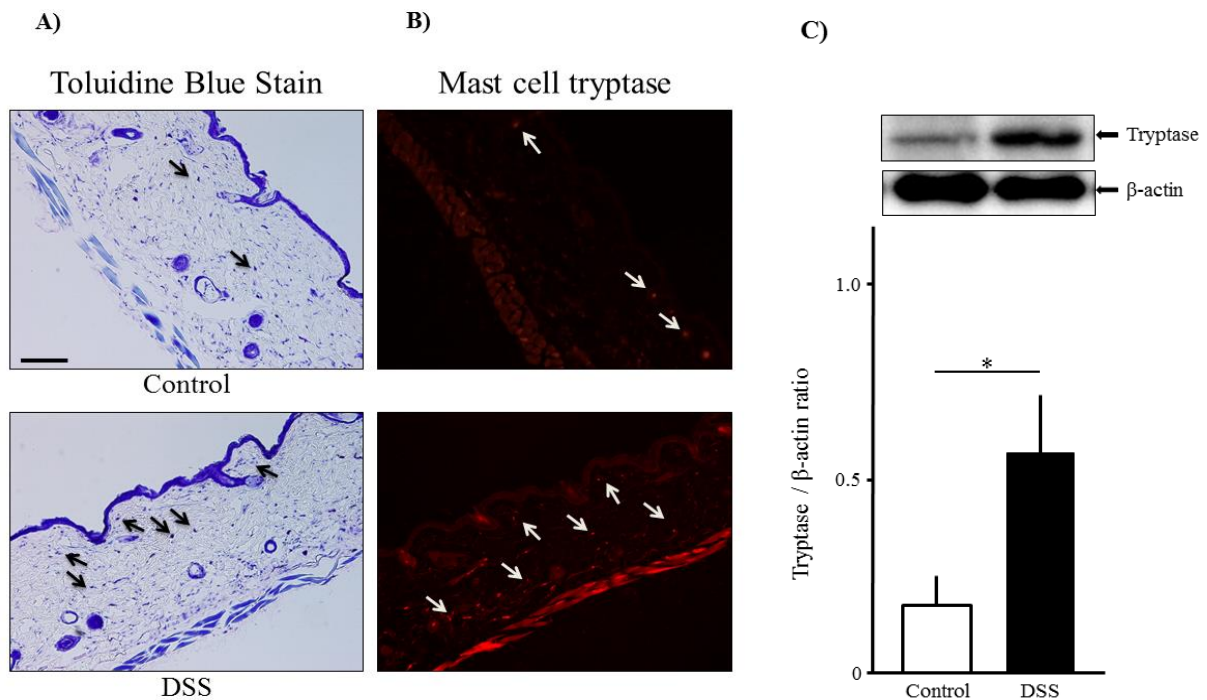


Figure 18. Mast cell tryptase in skin after treatment. (A) Toluidine blue staining of mast cells in skin sections. (B) Expression of mast cell tryptase in the skin. (C) Western blotting analysis for mast cell tryptase. Arrows indicates positive staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m. \*:  $p < 0.05$ .

## 11. マスト細胞上に発現するアセチルコリン受容体

皮膚中に発現するマスト細胞について、アセチルコリン受容体の発現を検討するため、免疫組織化学によってニコチン受容体、ムスカリン受容体、さらにマスト細胞トリプターゼの染色を行った。コントロール群に比して DSS 群ではマスト細胞トリプターゼの陽性細胞が検出された (Fig. 19E, K)。また、DSS 群の皮膚中でニコチン受容体ならびにムスカリン受容体の発現も認められた (Fig 19D, J)。これらの染色陽性細胞を組み合わせた結果、マスト細胞上でのニコチン受容体の発現ならびにムスカリン受容体の発現が認められた (Fig. 19F, L)。

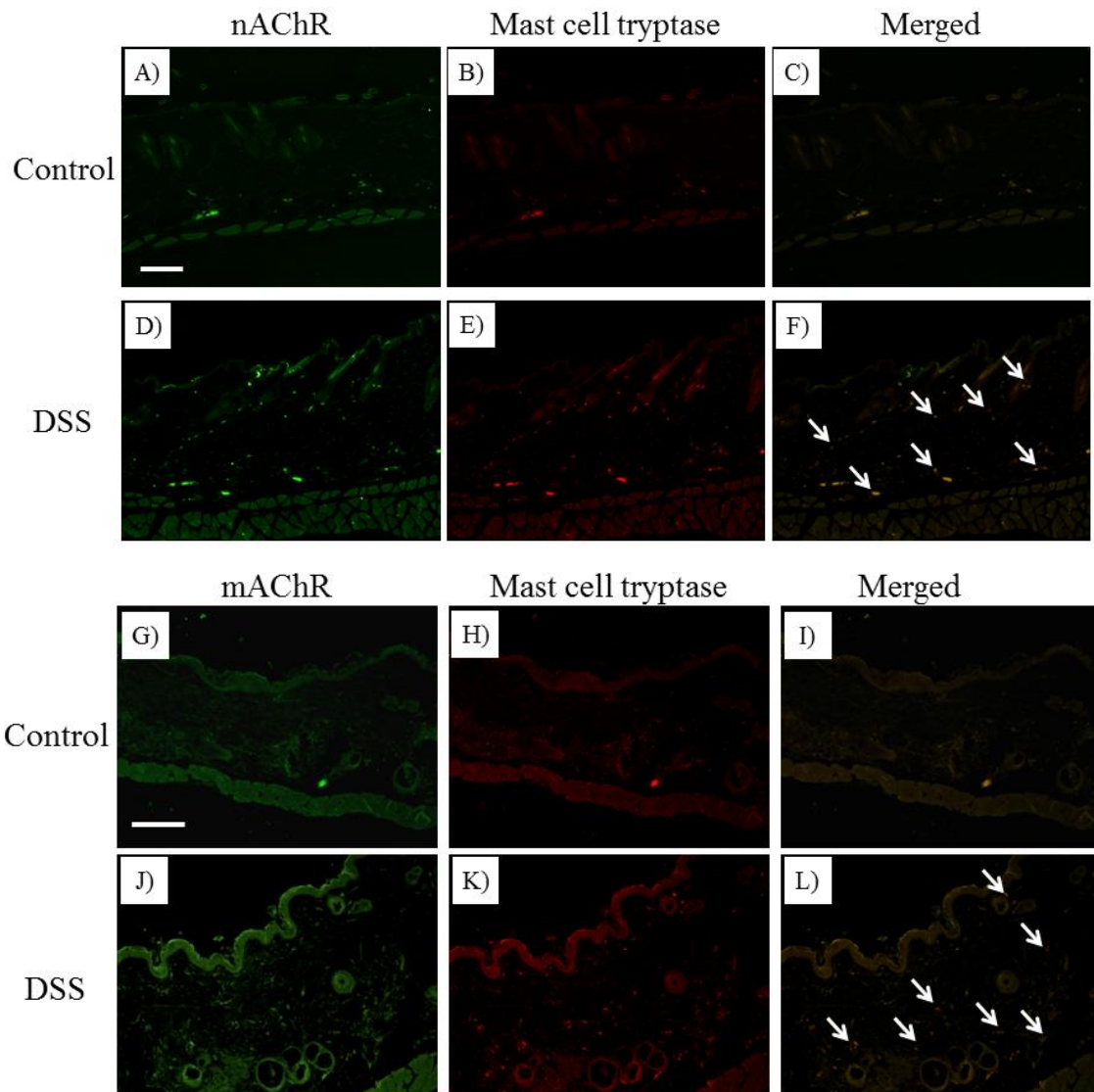


Figure 19. Immunohistochemical analysis of nicotinic acetylcholine receptor (A, D), muscarinic acetylcholine receptor (G, J), mast cell tryptase (B, E, H, K), and merged signal (C, F, I, L) expression in the skin. Treatment groups: Control, DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days). nAChR: nicotinic acetylcholine receptor, mAChR: muscarinic acetylcholine receptor. Arrow indicates merged staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m.

## 12. アセチルコリン受容体のアンタゴニストが及ぼす皮膚バリア機能への影響

DSS 群の体重ならびに大腸の長さはコントロール群に比して有意に減少した。アトロピンあるいはヘキサメトニウムを投与された DSS+アトロピン群, DSS+ヘキサメトニウム群においても, 体重ならびに大腸の長さはコントロール群に比して有意に減少し, DSS 群と同程度であった (Fig. 20A, B)。

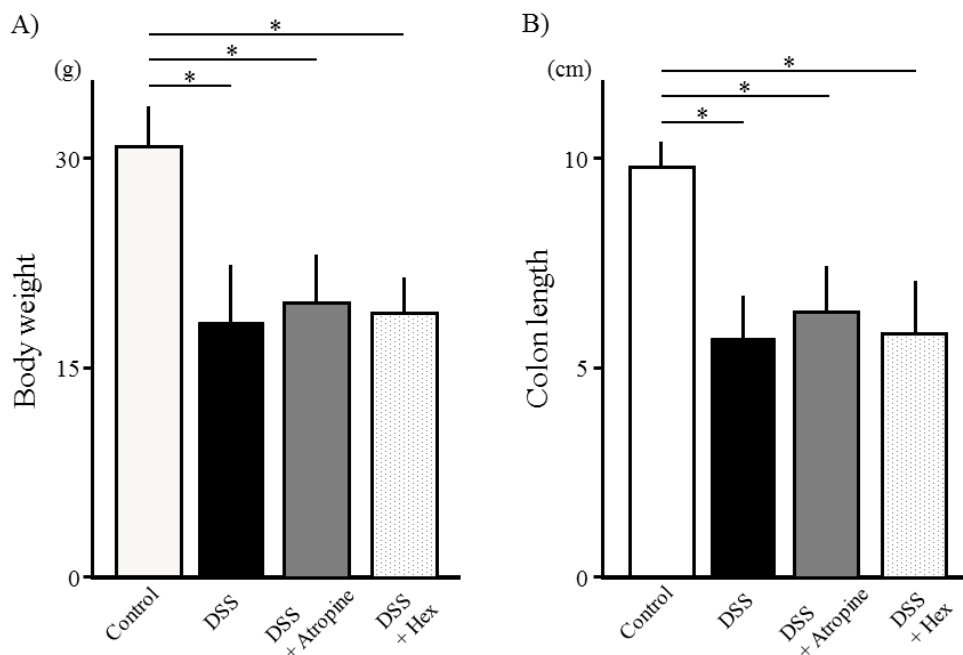


Figure 20. Analysis of body weight (A) and colon length (B) after treatment. Treatment groups: Control, DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days), DSS + Atropine (treated with 5.0% DSS and 1 mg/kg of atropine for 7 consecutive days), DSS + Hex (treated with 5.0% DSS and 10 mg/kg of hexamethonium for 7 consecutive days). L-NAME: N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, Hex: hexamethonium. \*:  $p < 0.05$  (One-way ANOVA, post hoc Tukey's test).

TEWL と角層水分量を測定したところ, DSS+アトロピン群の TEWL と角層水分量はコントロール群と同程度の値を示した。一方, DSS+ヘキサメトニウム群の TEWL と角層水分量は DSS 群と同程度であった (Fig. 21A, B)。

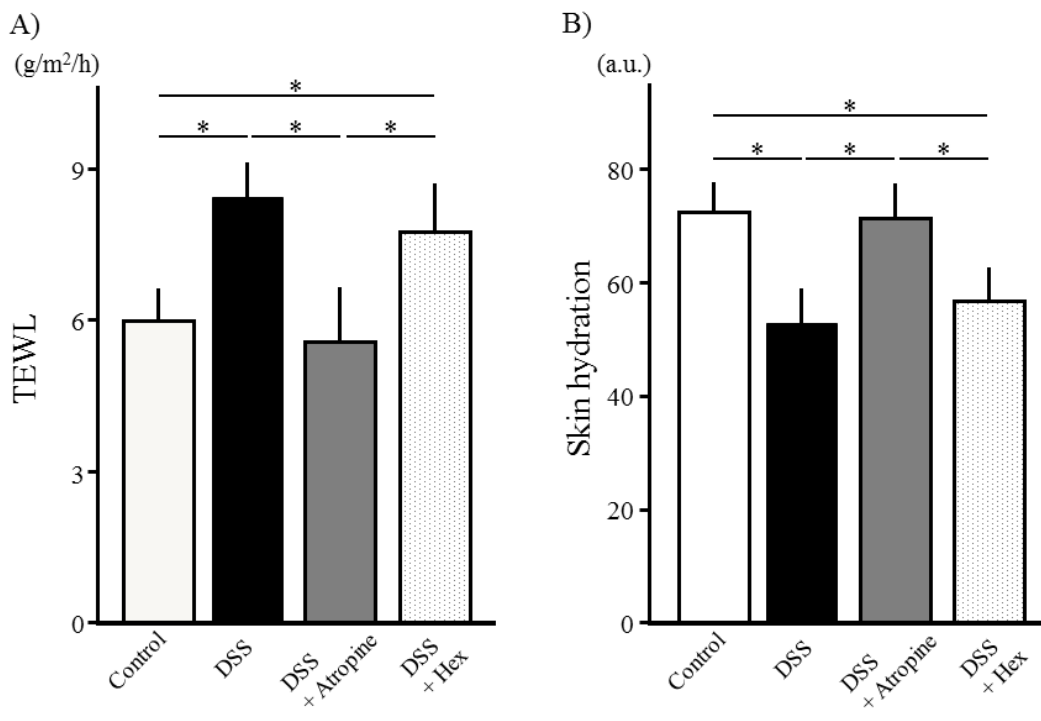


Figure 21. Analysis of TEWL (A) and skin hydration (B) on the dorsal skin after treatment. Treatment groups (n = 5 per group): Control, DSS (treated with 5.0% DSS for 7 consecutive days), DSS + Atropine (treated with 5.0% DSS and 1 mg/kg of atropine for 7 consecutive days), and DSS + Hex (treated with 5.0% DSS and 10 mg/kg of hexamethonium for 7 consecutive days). Hex: hexamethonium. \*:  $p < 0.05$  (One-way ANOVA, post hoc Tukey's test).



## 第4節 考察

本章ではDSSによる大腸炎マウスにおいてTEWLの増加ならびに角層水分量の減少、さらにはI型コラーゲンとIV型コラーゲンの減少を伴った皮膚の障害について報告した。さらに、この障害の発現過程において、マスト細胞が重要な役割を担っていることが示唆された。大腸炎ではTNF- $\alpha$ の発現レベル<sup>60)</sup>やiNOSによって生じた酸化ストレスが増加していることから<sup>61)</sup>、大腸炎によって惹起される皮膚の障害には、これらの炎症性メディエーターが関与していることが考えられた。

TNF- $\alpha$ は細胞の表面に存在するTNFR1とTNFR2という二つの受容体を介して機能する。TNF- $\alpha$ による免疫調節プロセスはこれら2つの受容体によって拮抗的、相加的、あるいは相乗的に制御されているが、どちらか1つの受容体単独でも機能することが分かっている<sup>62, 63)</sup>。TNFR1と比較してTNFR2は、IBDの患者や大腸炎モデル動物において劇的に増加することが知られている<sup>64, 65)</sup>。そこで、DSS大腸炎マウスの皮膚中のTNFR2の発現について検討を行ったところ、皮膚組織においてはTNFR2と比較してTNFR1の発現の方がより増加していることを認めた。TNFR1はTNF- $\alpha$ によって皮膚の炎症反応を誘導する作用を有し<sup>66)</sup>、また、慢性関節リウマチ<sup>67)</sup>や多発性硬化症<sup>68)</sup>などの疾患で主要なシグナル伝達を担っている。大腸炎病態下でのTNF- $\alpha$ と皮膚の障害との関連を明らかにするため、TNF- $\alpha$ の抗体をDSS大腸炎マウスに投与したところ、皮膚障害の発現を遅延させることはできたが、完全に抑制することはできなかった。この結果から、大腸炎による皮膚の組織障害の発現にはTNF- $\alpha$ の関与がそれほど大きくないことが推察された。

iNOSによるNOの産生はアトピー性皮膚炎や乾癬といった皮膚の炎症病態下において進行し、一酸化窒素に由来するフリーラジカルによる酸化ストレスは皮膚の構造を破壊する<sup>69, 70)</sup>。大腸炎マウスでは血中でNO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の増加を認めた。そこで、NOS阻害剤であるL-NAMEを投与することでNOによる皮膚障害に対する影響を検討したところ、TEWLの増加や角層水分量の減少を抑制することはできなかった。したがって、大腸炎マウスにおける皮膚障害には一酸化窒素に由来する酸化ストレスの関与は低いことが推察された。以上より、TNF- $\alpha$ やiNOSは大腸炎により引き起こされる皮膚障害を惹起するための重要な分子とは

考えにくい。しかし、大腸炎の進行には TNF- $\alpha$  や iNOS 以外のシグナル伝達物質も関与していることから、TNF- $\alpha$  や iNOS のノックアウト動物を用いたさらなる実験によって、より詳細な皮膚障害発現への関与を検討する必要があると考える。

インドメタシン誘導小腸炎マウスにおける皮膚障害の発現メカニズムには、マスト細胞の脱顆粒が関与していることを第 1 章で述べた<sup>44)</sup>。マスト細胞は、獲得免疫応答や自然免疫応答を制御する役割について広く研究されてきた。DSS 大腸炎マウスでも皮膚においてマスト細胞の増加が認められたことから、皮膚の状態を変化させるためにマスト細胞が何らかの関与をしていることが考えられる。しかしながら、大腸炎によって引き起こされるマスト細胞を介した皮膚障害の詳細な発症メカニズムについては分かっていない。マスト細胞上にはニコチン受容体あるいはムスカリン受容体が発現しており<sup>71)</sup>、これら受容体にリガントが結合することによって脱顆粒が誘導されることが知られている<sup>72)</sup>。DSS 大腸炎マウスの皮膚中のマスト細胞は実際にこれらの受容体を発現しており、また、血中のアセチルコリンの濃度が上昇したことから、このアセチルコリンがシグナル伝達物質として機能している可能性が示唆された。そこで、ムスカリン受容体のアンタゴニストであるアトロピンとニコチン受容体のアンタゴニストであるヘキサメトニウムを用いて検討を行ったところ、大腸炎マウスの皮膚障害の発現はヘキサメトニウムでは抑制されなかったが、アトロピンによって抑制された。したがって、マスト細胞の活性化にはムスカリン受容体を介したコリン作動性シグナル伝達経路が関与していることが示唆された。一方で、マスト細胞だけがコリン作動性シグナル伝達経路を介したシグナルで制御されているわけではなく、例えばマクロファージもムスカリン受容体を発現しており、この受容体を介することで TNF- $\alpha$  や leukotriene B4 などのメディエーターを放出して炎症反応を制御している<sup>73)</sup>。皮膚においては線維芽細胞や角化細胞もアセチルコリン受容体を発現しており、皮膚の基本的な機能の制御に関与している<sup>74, 75)</sup>。それゆえ、これらの細胞も部分的に大腸炎マウスの皮膚障害に関与していることが推察される。

第 2 章では大腸炎によって皮膚障害が誘導されるという新しい可能性について報告した。この結果から、皮膚は腸管の状態に大きく影響を受けていることが推察される。また、大腸炎に起因する皮膚障害の治療のとして、皮膚中のマ

スト細胞の活性化とアセチルコリン受容体を介したシグナル伝達がターゲットになる可能性を見出した。皮膚においてマスト細胞はstem cell factorやCD44, ATPなどの様々な因子によって影響を受けている<sup>76-78)</sup>。その結果, マスト細胞はその働きに多様性を獲得し, 周囲の状況に応じて免疫システムを活性化あるいは抑制させることが可能となった<sup>79)</sup>。皮膚中のマスト細胞の活性化による皮膚障害の発現メカニズムは, 動物実験に加えヒトの組織や細胞などを用いることで, さらなる研究を進め, 詳細を解明していく必要がある。

## 第5節 小括

第2章では、大腸炎マウスを作製し、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。

1. 大腸炎マウスでは、I型コラーゲンおよびIV型コラーゲンの減少が認められ、皮膚が薄くなっていることを認めた。
2. 大腸炎マウスでは、TEWLの増加と角層水分量の減少を認め、皮膚バリア機能が低下していることが示唆された。
3. 大腸炎により、血中のTNF- $\alpha$ の濃度が増加し、皮膚中のTNFR1の発現量も増加したが、抗TNF- $\alpha$ 抗体を用いて検討した結果、TNF- $\alpha$ の皮膚障害への関与は低いことが示唆された。
4. 大腸炎マウスの血中ではNO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の濃度が増加し、皮膚中ではiNOSの発現量も増加したが、iNOS阻害剤を用いて検討した結果、NOの皮膚障害への関与は低いことが示唆された。
5. 大腸炎マウスの皮膚中のマスト細胞において、ムスカリン受容体とニコチン受容体の共発現を認めた。また、血中のアセチルコリンの濃度の増加を認めた。ムスカリン受容体のアンタゴニストを用いた検討の結果、ムスカリン受容体を介したシグナル伝達経路によって皮膚障害が惹起されていることが示唆された。

以上より、大腸炎マウスではムスカリン受容体を介したマスト細胞の活性化に伴う皮膚障害の発現機構が存在することを明らかにした。

### 第3章 皮膚の生理機能に対する大腸癌の影響

#### 第1節 緒言

第1章と第2章ではそれぞれ小腸炎マウス、大腸炎マウスを用いた実験で、腸管で炎症が生じた際に皮膚障害が発現することを報告した<sup>44, 80)</sup>。これらの動物実験の結果は、皮膚と腸管との間に密接な関連が認められることを示唆している。小腸炎や大腸炎が誘導されたマウスにおいては、小腸粘膜や大腸粘膜の全周に亘る炎症が連続して認められた。一方、代表的な大腸の疾患の一つである大腸癌は、一般的に全周性の大腸の炎症を伴うことなく、大腸粘膜が癌化し、粘膜下層への浸潤や遠隔臓器への転移という進展を遂げる。大腸粘膜は皮膚と同様に体の内側と外側を分ける境目の働きを有している。この大腸粘膜は常に内因性あるいは外因性の酸化ストレスに曝されており、酸化ストレスによるDNA鎖の損傷やDNAの点突然変異、染色体異常が大腸癌発生の原因の一つとなっている<sup>81)</sup>。活性酸素還元酵素である glutathione peroxidase が欠損したマウスにおいては、酸化ストレスの亢進によって大腸癌の発生率が増加する<sup>82)</sup>。酸化ストレスの指標として用いられる 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) はDNAを構成する塩基の一つである deoxyguanosine が酸化ストレスでヒドロキシ化されることによって生成される。大腸癌においても 8-OHdG の増加が認められており、酸化ストレスが大腸癌の発生に関与していることを裏付けるものである<sup>83)</sup>。一方、生体の最も外側に位置して、外界と生体との接点となっている皮膚組織も紫外線や放射線などの様々な外因性酸化ストレスに曝されている。また、アトピー性皮膚炎や乾癬などの皮膚疾患では、皮膚の免疫システムに関与するマスト細胞や好酸球などが産生する内因性の酸化ストレスが病態の悪化を招いている<sup>84)</sup>。

大腸と皮膚は互いに離れた臓器ではあるが、アトピー性皮膚炎の患者において大腸癌の罹患率が低下することが近年報告された<sup>85)</sup>。アトピー性皮膚炎患者の亢進した免疫システムが大腸癌を潜在的に予防している可能性があることから、大腸癌と皮膚の間にも相互に影響しあうシグナル伝達システムが介在することが予想される。そこで、本研究では大腸癌の病態下において、発生した酸化ストレスが免疫システムを介して皮膚の生理機能に影響を及ぼしているの

ではないかと仮定した。第3章では azoxymethane (AOM) と dextran sodium sulfate (DSS) の投与によって大腸癌マウスを作製し，皮膚の生理機能に及ぼす大腸癌の影響について検討を行った。

## 第2節 実験方法

### 1. 実験動物

ヘアレスマウス Hos:HR-1 (7 weeks old, Japan SLC, Shizuoka, Japan) を温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (light: 8:00 – 20:00 h) の環境下、固形飼料および水を自由に摂取させ飼育した。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験委員会による研究計画書の承認を得た後に、総理府の「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、ならびに「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」に従って実施した。

### 2. 大腸癌マウスの作製

マウスは 1 週間の予備飼育後、ランダムにコントロール群、AOM + DSS 群の 2 つの群 ( $n = 5/\text{each group}$ ) に振り分けた。AOM + DSS 群のマウスには、既報に基づき、AOM (10 mg/kg; Sigma, St Louis, MO, USA) を腹腔内投与し、投与 1 週間後から大腸癌発現の促進剤として 2.0 % DSS (molecular weight: 36,000-50,000 Da; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) を給水ボトルに入れて 1 週間自由摂取させた。その後は処置をせずにコントロール群と同様に 18 週間飼育した<sup>86)</sup>。コントロール群のマウスは 20 週間に亘り、給水ボトルに水を入れて自由摂取させた。20 週間後、ペントバルビタールナトリウムで麻酔させた後、すべてのマウスを深麻酔し安楽死させた。

### 3. マウスの血液ならびに小腸と皮膚の組織の採取

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を腹腔内投与してマウスに麻酔したのち、心臓穿刺により 1 mL の血液を採取した。採取した血液は  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $10,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し、上清部分を採取し、凍結保存した。また、脱血を行ったのちに大腸と皮膚の組織を採取し、凍結保存し

た。

#### 4. 組織染色

採取した小腸と皮膚の組織の一部は免疫組織化学に用いるため、パラホルムアルデヒド溶液 (4%, Wako, Osaka, Japan) を用いて固定した。固定された大腸と皮膚の組織を凍結した Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋し、5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切を行った。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色法によって薄切した切片を染色し、光学顕微鏡にて観察し、組織学的に傷害の検討を行った。また、皮膚の組織切片を用いてトルイジンブルー染色によるマスト細胞の検出を行った。さらに、免疫組織化学によって皮膚中の酸化ストレスを検出するため、1 次抗体としてマウス抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体 (1:1,000, Abcam, Cambridge, MA, USA) を用いた。1 次抗体で処理したのち、2 次抗体の処理を行った。2 次抗体には fluorescein isothiocyanate 標識抗マウス IgG 抗体 (1:30; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を用いた。蛍光顕微鏡 BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて蛍光を検出したのち、蛍光強度については、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて無作為に 3 か所のエリアを抽出して測定し、平均値を算出した。

#### 5. 血中 IL-6 と亜硝酸/硝酸の濃度測定

血液サンプルを 4°C, 10,000  $\times g$  で 10 分間遠心分離し、上清部分を採取し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) に用いた。血中インターロイキン 6 (interleukin-6: IL-6) の濃度は、ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。また、iNOS のサロゲートマーカーである亜硝酸/硝酸 ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) の濃度は、 $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  Assay Kit-C II (Colorimetric) Griess Reagent Kit (DOJINDO Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を用いて測定した。測定にはマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いた。



## 6. マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量と角層水分量の測定

マウス背部皮膚の経表皮水分喪失量 (transepidermal water loss: TEWL) と角層水分量については、それぞれ Tewameter<sup>®</sup> TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) と Corneometer<sup>®</sup> CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH) を用いて、第 1 章と同様の手法によって測定した<sup>44)</sup>。

## 7. ウェスタンブロットティングによる皮膚組織中のタンパク質の発現解析

ウェスタンブロット解析は、第 2 章と同様の手法を用いて行った<sup>80)</sup>。要約すると、採取した皮膚組織 100 mg を剪刀で細かく刻んだのち、組織用懸濁試薬 (KURABO, Osaka, Japan) に浸漬し、ハンドミキサーでホモジナイズしたのち、上清を採取した。総蛋白量が 12.5  $\mu\text{g}$  となるように調整したサンプルを 4-12% BIS-TRIS Bolt gel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて電気泳動を行った。次いで、iBlot Western blotting system (Life Technologies, Carlsbad) を用いてニトロセルロース膜へタンパク質の転写を行い、4°C で一晩、5% スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後、25°C で 1 時間、ウサギ抗 I 型コラーゲン抗体 (1:1,000, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA)、あるいはマウス抗  $\beta$ -アクチン抗体 (1:5,000; Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて 1 次抗体処理した。膜上の免疫複合体は horseradish peroxidase 標識された 2 次抗体 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) で処理を行ったのち、ImmunoStar Zeta (Wako, Osaka, Japan) で化学発光させ、lumino-image analyzer (LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

## 8. 統計解析

全てのデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。2 群間の比較には Student's *t*-test を用いた。危険率が 5% 未満の場合を統計学的に有意と判断した。

### 第3節 結果

#### 1. AOM と DSS による大腸癌の誘発

20 週間の処置を終了したのち、血液と大腸組織のサンプルを採取した。大腸組織の肉眼的所見では多数の結節性の腫瘍の形成を肉眼で確認できた (Fig. 22A の矢印)。また、HE 染色の結果から、大腸粘膜において異常な粘膜形成が認められた (Fig. 22B)。IL-6 は大腸粘膜が発癌へと進行するために必要なプロモーターであるため<sup>87)</sup>、血液サンプルを用いて、血中の IL-6 の濃度を測定した。その結果、AOM + DSS 群の血中 IL-6 はコントロール群に比して有意に高い値を示した (Fig. 22C)。以上より、AOM + DSS 群において 20 週間の実験期間で大腸癌を誘発できることを確認した。

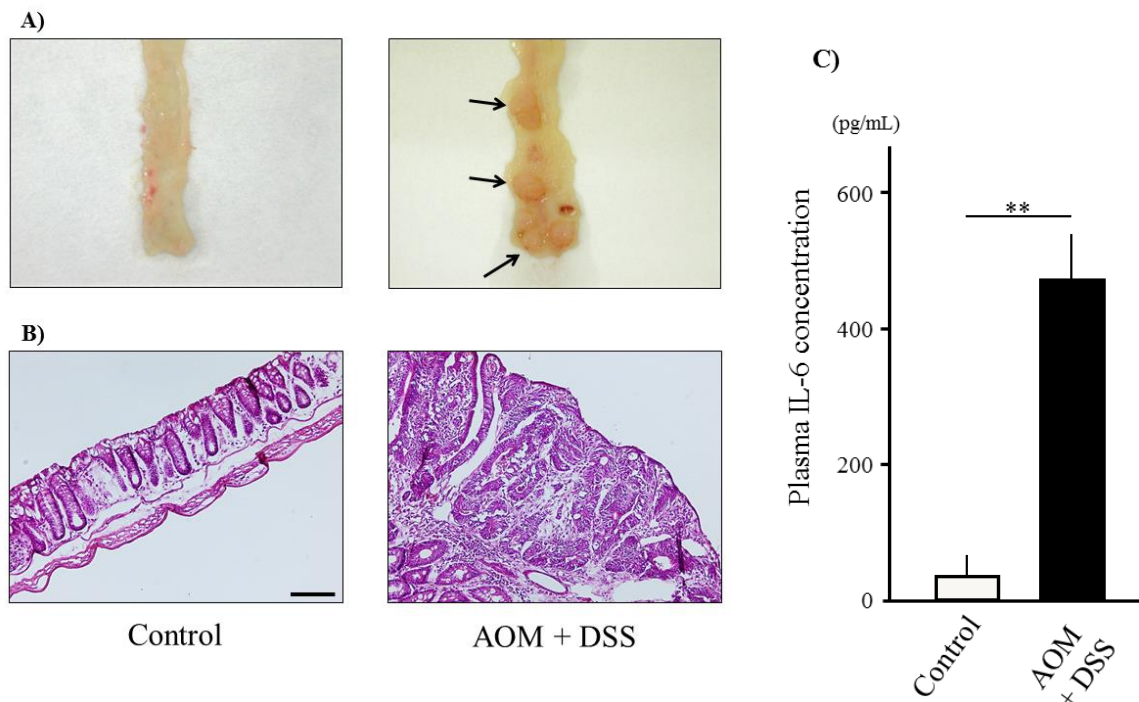


Figure 22. (A) Macroscopic view and (B) hematoxylin and eosin staining of colon tissue sections after treatment. (C) Plasma IL-6 concentrations in the induced colon carcinoma models. Treatment groups: Control, AOM + DSS (treated with AOM and 2.0% DSS). Scale bar = 100  $\mu$ m. Arrows indicate colon carcinoma. \*\*:  $p < 0.01$ .

## 2. 大腸癌マウスにおける血中の $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$

AOM + DSS 群の血中の  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  を測定したところ、コントロール群と比較して有意に増加していることを認めた (Fig. 23)。

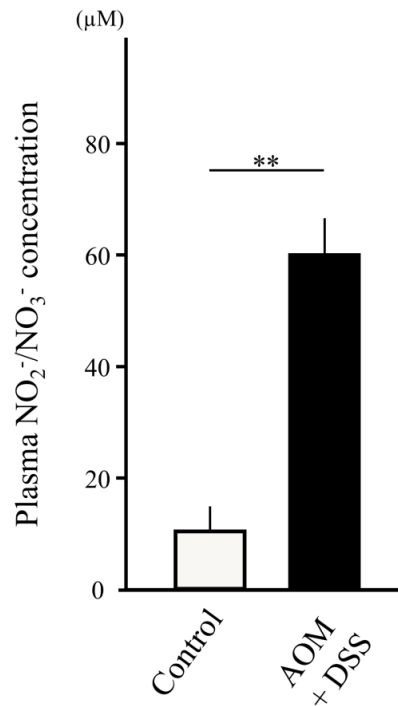


Figure 23. Plasma levels of  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  after treatment. Treatment groups: Control, AOM + DSS (treated with AOM and 2.0% DSS). \*\*:  $p < 0.01$ .

### 3. 皮膚中の 8-OHdG の発現

皮膚中の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG を免疫組織化学によって検討した結果、AOM + DSS 群の皮膚中の 8-OHdG はコントロール群に比して有意に増加した (Fig. 24)。

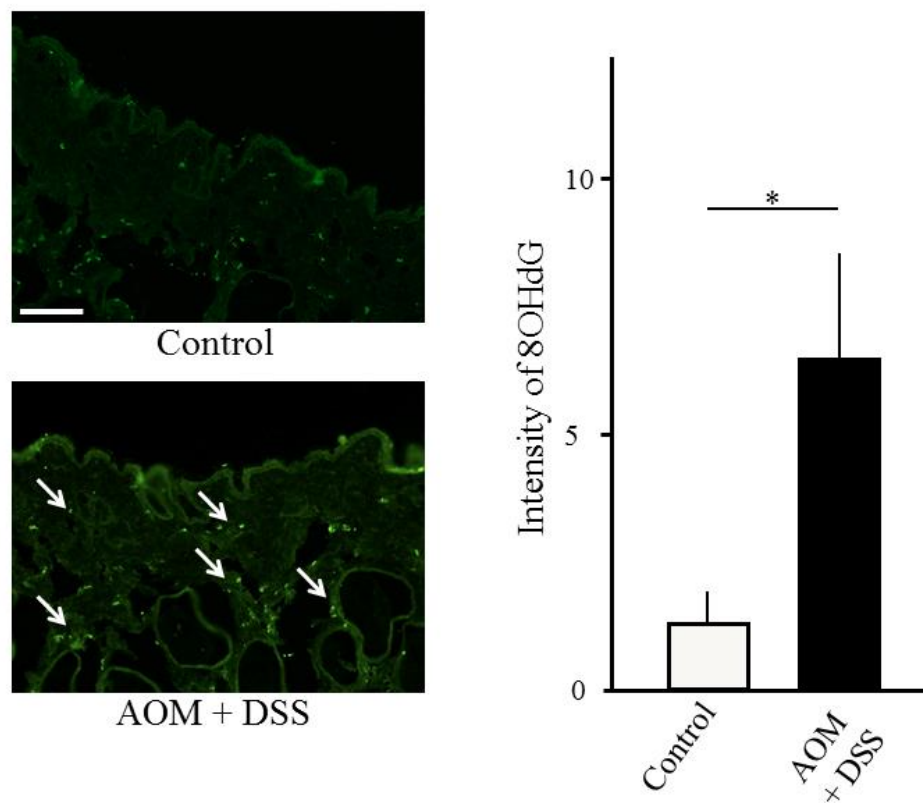


Figure 24. Immunohistochemistry of 8-OHdG after AOM + DSS treatment. 8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. Treatment groups: Control, AOM + DSS (treated with AOM and 2.0% DSS). Arrows indicate positive staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m. \*:  $p < 0.05$ .

#### 4. 皮膚中のmast細胞の発現

皮膚の組織切片をトルイジンブルーで染色した結果、AOM + DSS 群とコントロール群の皮膚組織中に発現しているmast細胞の数は同程度であることが示唆された (Fig. 25)。

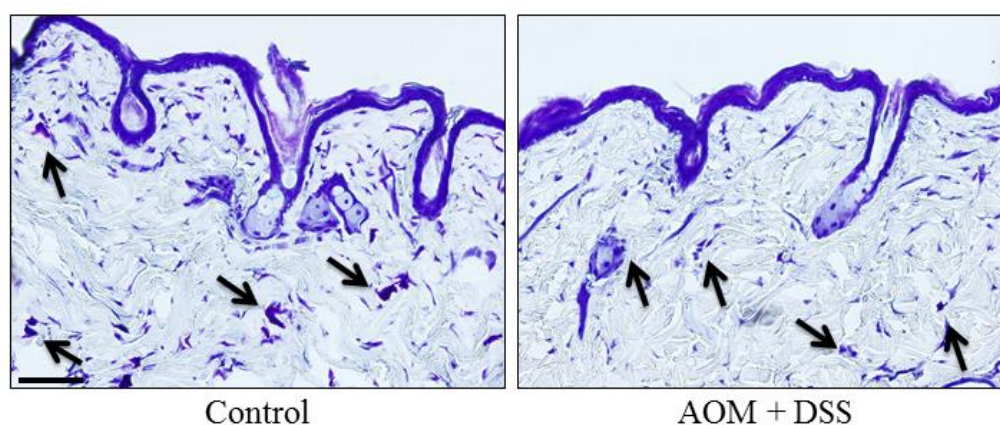


Figure 25. Toluidine blue staining of mast cells in skin sections after treatment. Treatment groups: Control, AOM + DSS (treated with AOM and 2.0% DSS). Arrows indicate positive staining cells. Scale bar = 100  $\mu$ m.

## 5. TEWL と角層水分量の測定

マウス背部の TEWL と角層水分量を測定したところ、AOM + DSS 群の TEWL はコントロール群に比して有意に増加し (Fig. 26A), 角層水分量はコントロール群に比して有意に減少していることを認めた (Fig. 26B)。

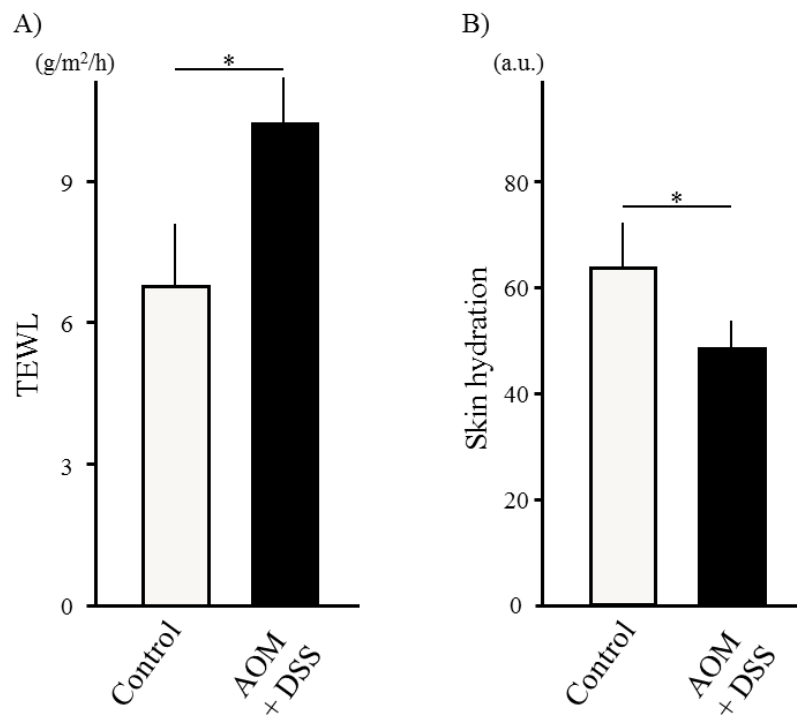


Figure 26. Analysis of TEWL (A) and skin hydration (B) on the dorsal skin after treatment. TEWL: transepidermal water loss. Treatment groups: Control, AOM + DSS (treated with AOM and 2.0% DSS). \*:  $p < 0.05$ .

## 6. 皮膚中の I 型コラーゲンの発現解析

AOM + DSS 群の皮膚中の I 型コラーゲンの発現量をウェスタンブロッティングによって解析したところ、コントロール群に比して有意に発現量が減少していることを認めた (Fig. 27)。

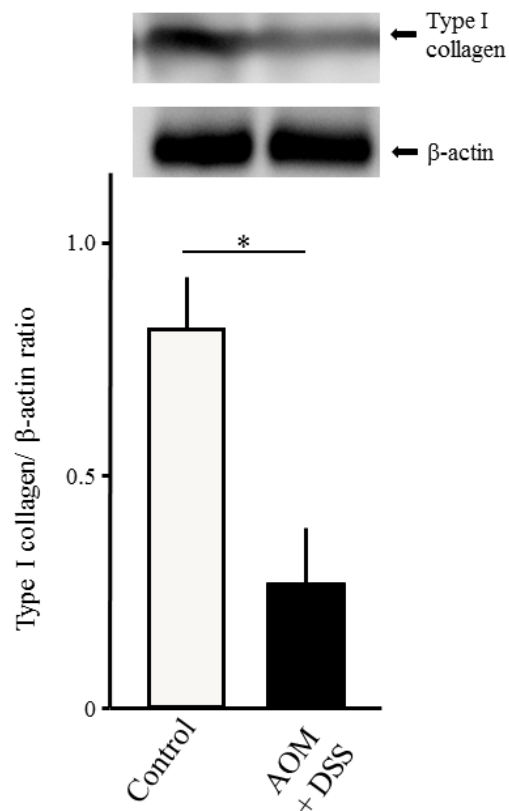


Figure 27. Relative expression level of type I collagen in the skin. Treatment groups: Control, AOM + DSS (treated with AOM and 2.0% DSS). \*:  $p < 0.05$ .

#### 第4節 考察

大腸癌マウスを用いた検討によって、大腸癌という病態が皮膚中のI型コラーゲンの減少やTEWLの増加、角層水分量の減少といった皮膚障害を引き起こすことが示唆された。さらに、その皮膚障害の発現過程には、NOから生じたフリーラジカルに起因する酸化ストレスが関与している可能性も示唆された。過剰な酸化ストレスは皮膚において細胞外マトリックスを分解することで皮膚障害を惹起させる。酸化ストレスによる皮膚障害のメカニズムには、皮膚中に存在する脂質の過酸化やタンパク質への傷害、さらには細胞核内のDNA鎖切断などが関与している<sup>88)</sup>。酸化ストレスは核酸塩基であるグアニンやアデニンに損傷を与え、イミダゾール環の開裂や8-OHdGの産生を惹起する。今回検討を行った大腸癌マウスの皮膚中においても8-OHdGが増加したことから、皮膚障害への酸化ストレスの関与が考えられる。この酸化ストレスがどのようにして皮膚障害を惹起したのかは今回の実験では明らかにすることができなかった。大腸癌マウスの血中ではNOの濃度が上昇したことから、大腸癌の病態が進行する過程において生じたNO由来の酸化ストレスが、皮膚において皮膚障害を惹起させた可能性も考えられる。あるいは、大腸癌で生じた酸化ストレスが転写因子を活性化させ、誘導されたメディエーターを介して皮膚障害が発現した可能性も考えられる。大腸癌で生じたシグナルが皮膚へ伝達される経路の解明には、さらなる検討が必要である。

酸化ストレスによる皮膚障害の作用機序については、皮膚中のMMPsが関与することが知られている。酸化ストレスは転写因子であるactivator protein 1 (AP-1)の発現を誘導し、誘導されたAP-1は線維芽細胞や角化細胞においてMMPsの発現を引き起こす<sup>89,90)</sup>。MMPsはコラーゲンやエラスチンといった細胞外マトリックスの分解を惹起させる。またAP-1はTGF- $\beta$ を阻害することによってコラーゲンの産生を阻止する作用も有している<sup>91)</sup>。また、別の転写因子であるnuclear factor- $\kappa$ Bも酸化ストレスによって誘導され、MMPsの活性化を引き起こす<sup>92)</sup>。また酸化ストレスによる皮膚障害についてはカルボニルタンパクの関与も報告されている。酸化ストレスが角層細胞のタンパク質をカルボニル化することによって皮膚のバリア機能障害が生じる。さらに、バリア機能障害が生じた皮膚は乾燥を来し、この現象が線維芽細胞によるMMP-1の産生を増加さ



せ、真皮のコラーゲンの破壊が亢進することで皮膚構造の変化を惹起させる<sup>93)</sup>。したがって、大腸癌マウスの皮膚中でも、酸化ストレスが転写因子やカルボニルタンパクを介して MMPs を誘導して皮膚障害が惹起された可能性も考えられる。

皮膚中においてマスト細胞は免疫反応や炎症反応に関する重要な役割を果たしている。マスト細胞による脱顆粒には酸化ストレスが関与しており、酸化ストレスがマスト細胞を活性化させて炎症反応を遷延化させる引き金となっている<sup>94)</sup>。大腸癌マウスではマスト細胞数の増加は認められず、コントロール群と同程度であった。この結果から、大腸癌マウスにおいて発現した皮膚障害には、マスト細胞の活性化は関与していない可能性が示唆された。

第 3 章では大腸癌の病態下において皮膚障害が引き起こされるという新しい知見を、大腸癌マウスを用いて明らかにした<sup>95)</sup>。どのようなシグナルが大腸癌と皮膚障害を結び付けているのか、より詳細な発現機構を解明することが今後の課題である。

## 第5節 小括

第3章では大腸癌マウスを用いて皮膚の生理機能について検討を行った。

1. 大腸癌マウスでは、血中  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  の濃度の増加を認めた。また、皮膚組織中において酸化ストレスのマーカである 8-OHdG の増加を認めた。
2. 大腸癌マウスの皮膚中において、I型コラーゲン減少を認めた。また、TEWL の増加と角層水分量の減少も認められ、皮膚バリア機能が低下していることが示唆された。
3. 大腸癌マウスの皮膚中のマスト細胞の数は、コントロールと同程度であった。

以上より、大腸癌マウスでは皮膚障害が認められたものの、その発現にはマスト細胞の関与が低いことが示唆された。

## 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。得られた結果より、腸管の疾患として取り上げた小腸炎、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った皮膚障害が惹起された。しかしながら、その皮膚障害の発現メカニズムについては、原因となる腸管の疾患によって差異が生じていることも示唆された。例えば、小腸炎マウスや大腸炎マウスでは、皮膚中においてマスト細胞数の増加を認めたが、大腸癌マウスでは増加を認めていない。また、大腸炎マウスではムスカリン受容体を介したシグナル伝達経路が皮膚中のマスト細胞の活性化に結び付いたことが示唆されたが、小腸炎マウスにおいては、このようなシグナル伝達経路の存在は否定的であった。したがって、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ある。また、皮膚中にはマスト細胞以外にも角化細胞や線維芽細胞、ランゲルハンス細胞などの様々な細胞が存在し、お互いに情報交換をしながら皮膚の恒常性を維持している。腸管障害がこれらの細胞にも影響を及ぼしている可能性は十分にある。したがって、さらなる研究によってマスト細胞やこれらの細胞との相互作用を経時的に検討することで、より詳細な皮膚障害の発現機構を明らかにすることが可能になると考える。

皮膚の状態は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本研究は示唆しており、臨床の常識に新たな提起をもたらした。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と考える。

## 謝辞

本研究に臨み終始懇切なご指導，ご鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 病態・治療学分野 臨床薬理学研究室 大井 一弥 教授に深甚なる謝意を表します。

また，本研究をまとめるにあたり有益なご指導，ご助言を賜りました城西大学薬学部薬科学科 薬粧品動態制御学研究室 杉林 堅次 教授に心から深謝の意を表します。

本学位論文の作成にあたり，ご閲覧とご教示を賜りました城西大学薬学部薬学科 生体分析化学研究室 新津 勝 教授ならびに城西大学薬学部薬学科 医薬品安全性学研究室 金本 郁男 教授に深く感謝いたします。

本学位論文の審査にあたり，ご教示とご校閲を賜りました城西大学薬学部医療栄養学科 予防栄養学研究室 日比野 康英 教授，城西大学薬学部薬学科 生理学研究室 加園 恵三 教授ならびに城西大学薬学部薬学科 臨床病理学研究室 太田 昌一郎 教授に深く感謝いたします。

最後に，本研究の実施にご協力いただきました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 病態・治療学分野 平本 恵一 博士をはじめとする関係諸氏ならびに終始支えてくれた家族に心より感謝いたします。

## 引用文献

1. Park TH, Park CH, Ha SK, Lee SH, Song KS, Lee HY, Han DS. Dry skin (xerosis) in patients undergoing maintenance haemodialysis: the role of decreased sweating of the eccrine sweat gland. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1995; **10**: 2269–2273.
2. Niederau C, Lange S, Frühauf M, Thiel A. Cutaneous signs of liver disease: value for prognosis of severe fibrosis and cirrhosis. *Liver Int.*, 2008; **28**: 659–666.
3. 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.*, 2005; **153**: 319–323.
4. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.*, 2008; **17**: 1063–1072.
5. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2009; **14**: 20–24.
6. Navi D, Saegusa J, Liu FT. Mast cells and immunological skin diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2007; **33**: 144–155.
7. Yamate Y, Hiramoto K, Yokoyama S, Ooi K. Immunological changes in the intestines and skin after senna administration. *Pharm. Biol.*, 2015; **53**: 913–920.
8. Seiffert K, Hosoi J, Torii H, Ozawa H, Ding W, Campton K, Wagner JA, Granstein RD. Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.*, 2002; **168**: 6128–6135.
9. Seiffert K, Granstein RD. Neuroendocrine regulation of skin dendritic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006; **1088**: 195–206.

10. Sugita K, Nishio D, Kabashima K, Tokura Y. Acute generalized exanthematous pustulosis caused by sennoside in a patient with multiple myeloma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2008; **22**: 517–519.
11. Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, Smolen J, Breedveld F, Day R, Dougados M, Ehrich EW, Gijon-Baños J, Kvien TK, Van Rijswijk MH, Warner T, Zeidler H. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology (Oxford)*, 1999; **38**: 779–788.
12. Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol. Rev.*, 2008; **88**: 1547–1565.
13. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, 1991; **266**: 12866–12872.
14. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; **88**: 2692–2696.
15. O'Banion MK, Winn VD, Young DA. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; **89**: 4888–4892.
16. Vane J. Towards a better aspirin. *Nature* 1994; **367**: 215–216.
17. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; **95**: 13313–13318.
18. Laine L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *J. Pain. Symptom Manage.*, 2003; **25**(2 Suppl): S32-40.

19. Graham DY, Opekun AR, Willingham FF, Qureshi WA. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005; **3**: 55–59.
20. Yamada S, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Horie R, Fukumoto K, Inoue K, Harusato A, Uchiyama K, Handa O, Yagi N, Ichikawa H, Yoshikawa T. Rebamipide ameliorates indomethacin-induced small intestinal injury in rats via the inhibition of matrix metalloproteinases activity. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012; **27**: 1816–1824.
21. Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, Wang ZQ, Datta SC, Fisher GJ, Voorhees JJ. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2000; **114**: 480–486.
22. Leblond C P, Inoue S. Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am. J. Anat.*, 1989; **185**: 367–390.
23. Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem. Photobiol.*, 2003; **78**: 43–48.
24. Iddamalgoda A, Le Q T, Ito K, Tanaka K, Kojima H, Kido H. Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins. *Arch. Dermatol. Res.*, 2008; **300**: S69–S76.
25. Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, Yamagami H, Okazaki H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Higuchi K, Takeuchi K, Arakawa T. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2009; **297**: G506–G513.

26. Bertrand V, Guimbaud R, Tulliez M, Mauprivez C, Sogni P, Couturier D, Giroud JP, Chaussade S, Chauvelot-Moachon L. Increase in tumor necrosis factor-alpha production linked to the toxicity of indomethacin for the rat small intestine. *Br. J. Pharmacol.*, 1998; **124**: 1385–1394.
27. Di Girolamo N, Indoh I, Jackson N, Wakefield D, McNeil HP, Yan W, Geczy C, Arm JP, Tedla N. Human mast cell-derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration. *J. Immunol.*, 2006; **177**: 2638–2650.
28. 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.*, 1995; **8**: 186–195.
29. Berardesca E; European Group for Efficacy Measurements on Cosmetics and Other Topical Products (EEMCO). *Skin Res., Technol.*, 1997; **3**: 126–132.
30. Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; **18**: 1707–1715.
31. Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *FEBS J.*, 2006; **273**: 1871–1895.
32. Di Girolamo N, Wakefield D. In vitro and in vivo expression of interstitial collagenase/MMP-1 by human mast cells. *Dev. Immunol.*, 2000; **7**: 131–142.
33. Bax HJ, Keeble AH, Gould HJ. Cytokinergic IgE Action in Mast Cell Activation. *Front. Immunol.*, 2012; **6**: 229.
34. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol. Rev.*, 1997; **77**: 1033–1079.
35. Nakazawa S, Sakanaka M, Furuta K, Natsuhara M, Takano H, Tsuchiya S, Okuno Y, Ohtsu H, Nishibori M, Thurmond RL, Hirasawa N, Nakayama K, Ichikawa A,



- Sugimoto Y, Tanaka S. Histamine synthesis is required for granule maturation in murine mast cells. *Eur. J. Immunol.*, 2014; **44**: 204–214.
36. Marson CM. Targeting the histamine H4 receptor. *Chem. Rev.*, 2011; **111**: 7121–7156.
37. Rijniere A, Koster AS, Nijkamp FP, Kraneveld AD. TNF-alpha is crucial for the development of mast cell-dependent colitis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2006; **291**: G969-76.
38. Yamate Y, Hiramoto K, Kasahara E, Jikumaru M, Sato EF, Inoue J, Inoue M. *Photochem. Photobiol.*, 2011; **87**: 191–198.
39. Berger TG, Shive M, Harper GM. Pruritus in the older patient: a clinical review. *JAMA* 2013; **310**: 2443–2450.
40. Maurer M, Church MK. Inflammatory skin responses induced by icatibant injection are mast cell mediated and attenuated by H(1)-antihistamines. *Exp. Dermatol.*, 2012; **21**: 154–155.
41. Berke R, Singh A, Guralnick M. Atopic dermatitis: an overview. *Am. Fam. Physician.*, 2012; **86**: 35–42.
42. Norman RA. Xerosis and pruritus in the elderly: recognition and management. *Dermatol. Ther.*, 2003; **6**: 254–259.
43. Kim DW, Park JY, Na GY, Lee SJ, Lee WJ. Correlation of clinical features and skin barrier function in adolescent and adult patients with atopic dermatitis. *Int. J. Dermatol.*, 2006; **45**: 698–701.
44. Tagami H, Kobayashi H, O’Goshi K, Kikuchi K. Atopic xerosis: employment of noninvasive biophysical instrumentation for the functional analyses of the mildly abnormal stratum corneum and for the efficacy assessment of skin care products. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2006; **5**: 140–149.

45. Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Exp. Dermatol.*, 2014; **23**: 659–663.
46. Cummings JH. Absorption and secretion by the colon. *Gut*, 1975; **16**: 323–329.
47. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J. Inflamm. Res.*, 2014; **23**: 113–120.
48. Grainge MJ, West J, Card TR. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. *Lancet*, 2010; **375**: 657–663.
49. Murthy SK, Nguyen GC. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: an epidemiological review. *Am. J. Gastroenterol.*, 2011; **106**: 713–718.
50. Weizman A, Huang B, Berel D, Targan SR, Dubinsky M, Fleshner P, Ippoliti A, Kaur M, Panikkath D, Brant S, Oikonomou I, Duerr R, Rioux J, Silverberg M, Rotter JJ, Vasiliauskas E, Haritunians T, Shih D, Li D, Melmed GY, McGovern DP. Clinical, serologic, and genetic factors associated with pyoderma gangrenosum and erythema nodosum in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2014; **20**: 525–533.
51. Huang BL, Chandra S, Shih DQ. Skin manifestations of inflammatory bowel disease. *Front. Physiol.*, 2012; **3**: 13.
52. Williams H, Walker D, Orchard TR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2008; **10**: 597–603.
53. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut*, 1996; **39**: 684–689.

54. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK 3rd. Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp. Dermatol.*, 2004; **13**: 193–222.
55. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J. Exp. Med.*, 2001; **194**: 1207–1218.
56. Naito Y, Takagi T, Ishikawa T, Handa O, Matsumoto N, Yagi N, Matsuyama K, Yoshida N, Yoshikawa T. The inducible nitric oxide synthase inhibitor ONO-1714 blunts dextran sulfate sodium colitis in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001; **412**: 91–99.
57. Orita K, Hiramoto K, Kobayashi H, Ishii M, Sekiyama A, Inoue M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormones of iNOS origin play important roles in the allergic reactions of atopic dermatitis in mice. *Exp. Dermatol.*, 2011; **20**: 911–914.
58. Nishimura T, Andoh A, Hashimoto T, Kobori A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Cellobiose Prevents the Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Experimental Colitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2010; **46**: 105–110.
59. Imai A, Nabe T, Mizutani N, Sakurai H, Takenaka H, Kohno S. Involvement of nitric oxide in pollen-induced biphasic nasal blockage in sensitised guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001; **423**: 63–70.
60. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1994; **106**: 1455–1466.
61. Schreiber O, Petersson J, Waldén T, Ahl D, Sandler S, Phillipson M, Holm L. iNOS-dependent increase in colonic mucus thickness in DSS-colitic rats. *PLoS One*, 2013; **8**: e71843.

62. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.*, 2003; **10**: 45–65.
63. Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl. Cell Differ.*, 2009; **49**: 1–15.
64. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, Cario E, de Jong YP, Ooi CJ, Xavier RJ, Terhorst C, Podolsky DK, Bhan AK. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology*, 2002; **122**: 134–144.
65. Holtmann MH, Douni E, Schütz M, Zeller G, Mudter J, Lehr HA, Gerspach J, Scheurich P, Galle PR, Kollias G, Neurath MF. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 2002; **32**: 3142–3151.
66. Kondo S, Sauder DN. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. *Eur. J. Immunol.*, 1997; **27**: 1713–1718.
67. Mori L, Iselin S, De Libero G, Lesslauer W. Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J. Immunol.*, 1996; **157**: 3178–3182.
68. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J. Exp. Med.*, 2001; **193**: 427–434.
69. Taniuchi S, Kojima T, Hara Mt K, Yamamoto A, Sasai M, Takahashi H, Kobayashi Y. Increased serum nitrate levels in infants with atopic dermatitis. *Allergy*, 2001; **56**: 693–695.
70. Ormerod AD, Weller R, Copeland P, Benjamin N, Ralston SH, Grabowksi P, Herriot R. Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.*, 1998; **290**: 3–8.

71. Radosa J, Dyck W, Goerdts S, Kurzen H. The cholinergic system in guttate psoriasis with special reference to mast cells. *Exp. Dermatol.*, 2011; **20**: 677–679.
72. Blandina P, Fantozzi R, Mannaioni PF, Masini E. Characteristics of histamine release evoked by acetylcholine in isolated rat mast cells. *J. Physiol.*, 1980; **301**: 281–293.
73. Koarai A, Traves SL, Fenwick PS, Brown SM, Chana KK, Russell RE, Nicholson AG, Barnes PJ, Donnelly LE. Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur. Respir. J.*, 2012; **39**: 698–704.
74. Buchli R, Ndoye A, Rodriguez JG, Zia S, Webber RJ, Grando SA. Human skin fibroblasts express m2, m4, and m5 subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Cell Biochem.*, 1999; **74**: 264–277.
75. Grando S A. Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp. Dermatol.*, 2006; **15**: 265–282.
76. Ito T, Smrž D, Jung MY, Bandara G, Desai A, Smržová Š, Kuehn HS, Beaven MA, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Stem cell factor programs the mast cell activation phenotype. *J. Immunol.*, 2012; **188**: 5428–5437.
77. Tanaka S. Targeting CD44 in mast cell regulation. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2010; **14**: 31–43.
78. Kurashima Y, Amiya T, Fujisawa K, Shibata N, Suzuki Y, Kogure Y, Hashimoto E, Otsuka A, Kabashima K, Sato S, Sato T, Kubo M, Akira S, Miyake K, Kunisawa J, Kiyono H. The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* 2014; **40**: 530–541.
79. Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp. Dermatol.*, 2013; **22**: 507–510.

80. Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impairment of skin barrier function via cholinergic signal transduction in a dextran sulphate sodium-induced colitis mouse model. *Exp. Dermatol.*, 2015: **24**: 779–784.
81. Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur. J. Nutr.*, 1999: **38**: 28–34.
82. Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshov JH. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res.*, 2004: **64**: 962–968.
83. Płachetka A, Adamek B, Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Migula P, Nowak P, Wiczkowski A. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in colorectal adenocarcinoma--is it a result of oxidative stress? *Med. Sci. Monit.*, 2013: **19**: 690–695.
84. Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.*, 2005: **4**: 517–519.
85. Tambe NA, Wilkens LR, Wan P, Stram DO, Gilliland F, Park SL, Cozen W, Martínez-Maza O, Le Marchand L, Henderson BE, Haiman CA. Atopic allergic conditions and colorectal cancer risk in the Multiethnic Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.*, 2015: **181**: 889–897.
86. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, 2004: **95**: 721–727.
87. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 2009: **15**:103–13.
88. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*. 2015: **5**: 545–589.

89. Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies RM. Skin ageing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2011; **25**: 873–884.
90. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996; **379**: 335–339.
91. Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2005; **280**: 8079–8085.
92. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 2000; **16**: 239–244.
93. Yokota M, Shimizu K, Kyotani D, Yahagi S, Hashimoto S, Masaki H. The possible involvement of skin dryness on alterations of the dermal matrix. *Exp. Dermatol.*, 2014; **23**: 27–31.
94. Henderson WR, Kaliner M. Immunologic and nonimmunologic generation of superoxide from mast cells and basophils. *J. Clin. Invest.*, 1978; **61**: 187–196.
95. 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. Bull.*, 2015; **38**: 947–950.