

アトピー性皮膚炎における皮膚 pH と
皮膚バリアとの関連性に関する研究

Investigation of the relationship of skin pH and skin barrier function
in atopic dermatitis

2016.03

東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
共同先進健康科学専攻

張 孝善

目次

略語	5-8
緒言	7-9
I 章 アトピー性皮膚炎モデルマウスでの皮膚バリアの損傷や皮膚 pH の関連性	
[1] 序論	10-14
[2] 臨床症状と経皮水分蒸散量の変化	
1) 材料と方法	15-16
2) 結果	16-17
3) 考察	18
[3] 皮膚フィラグリンの変化	
1) 材料と方法	19-21
2) 結果	21-24
3) 考察	25
[4] 皮膚の pH 変化とそれに伴うアトピー性皮膚炎の発症メカニズム	
1) 材料と方法	26-28
2) 結果	28-34
3) 考察	35-36
[5] 小括	37-38
II 章 モデルマウスを用いた皮膚の弱酸性 pH 維持によるアトピー性皮膚炎の治療効果	
[1] 序論	39-41
[2] ラクトビオン酸塗布による皮膚表面の pH、表皮水分蒸散量、臨床症状の変化	
1) 材料と方法	42-43
2) 結果	43-47

3) 考察 48

[3] 弱酸性の pH 維持による皮膚炎緩和のメカニズム

1) 材料と方法 49-51

2) 結果 51-59

3) 考察 60

[4] 小括 61-62

III章 皮膚 pH の上昇によるアトピー性皮膚炎の誘発

[1] 序論 63-64

[2] テトラメチルグアニジン塗布による皮膚表面の pH、表皮水分蒸散量、臨床症状
の変化

1) 材料と方法 65-67

2) 結果 67-76

3) 考察 77-78

[3] 皮膚 pH の上昇によるアトピー性皮膚炎誘発のメカニズム

{1} 皮膚 pH の上昇によるアトピー性皮膚炎の誘発とそのメカニズムの解析

1) 材料と方法 79-81

2) 結果 81-86

3) 考察 87

{2} 上皮組織培養方法を使用したカリクレイン関連ペプチド加水分解酵素

(Kallikrein-related peptidase5) とプロテアーゼ活性化受容体 2 (Protease-activated receptor 2)

-胸腺間質性リンパ球新生因子 (Thymic stromal lymphopoietin) の関連性

1) 材料と方法 88-90

2) 結果 90-94

3) 考察 95

[4] 小括	96
総括	97-100
引用文献	101-111
謝辞	112

略称一覧

略称	正式名称 (英/和)
AEBSF	4 -(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride/ 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニル
cDNA	Complementary DNA/相補的 DNA
Conv	Conventional/通常飼育環境
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid/エチレンジアミン四酢酸
ELISA	Enzyme-linked immune sorbent assay/酵素免疫学的測定法
FLG	Filaggrin/フィラグリン
HPLC	High performance liquid chromatography/高速液体クロマトグラフィー
HRP	Horseradish peroxidase/ホースラディッシュペルオキシダーゼ
IFN- γ	Interferon-gamma/インターフェロンガンマ
IL	Interleukin/インターロイキン
KLK5	Kallikrein-related peptidase5/カリクレイン関連ペプチド加水分解酵素 5
LBA	Lactobionic acid/ラクトバイオン酸
LEKTI	Lymphoepithelial Kazal-type5 serine protease inhibitor/ リンパ上皮カザール型関連阻害因子
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9/マトリックスメタロプロテアーゼ 9
NF- κ B	Nuclear factor kappa-B/核内因子 κ B
NHE1	Sodium-Hydrogen Exchanger 1/ナトリウム-水素交換 1 型
nLBA	Neutralized 5% LBA/中性 LBA
NMF	Natural moisturizing factor/天然保湿因子
nTMG	Neutralized 0.65% TMG/中性 TMG

PHA	Polyhydroxyl acid/ポリヒドロキシル酸
PAR2	Protease-activated receptor2/プロテアーゼ活性化受容体
PBS	Phosphate-buffered saline/リン酸緩衝食塩水
PCA	Pyrrolidone carboxylic acid/ピロリドンカルボン酸
PVDF	Polyvinylidene fluoride/ポリフッ化ビニリデン樹脂
RT-PCR	Reverse transcription and polymerase chain reaction/逆転写核酸増幅法
SC	Stratum corneum/角質層
SDS	Sodium dodecyl sulfate/ドデシル硫酸ナトリウム
SPF	Specific pathogen free/特定病原菌除去
sPLA ₂	secretory Phospholipase A ₂ /分泌型ホスホリパーゼ A ₂
TBS	Tris-buffered saline/トリス緩衝生理食塩水
TEWL	Transepidermal water loss/経皮水分蒸散量
Th2	T helper 2
TMG	1,1,3,3-tetramethyl guanidine/テトラメチルグアニジン
trans-UCA	trans-urocanic acid/ トランスウロカニン酸
Tris	Tris(hydroxymethyl) -aminomethan/トリスヒドロキシメチルアミノメタン
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin/胸腺間質性リンパ球新生因子

緒言

アトピー性皮膚炎は皮膚の乾燥、痒み、発赤を伴う慢性炎症性皮膚疾患であり、皮膚バリアの指標となる経皮水分蒸散量 (transepidermal water loss, TEWL) と血中 IgE の増加を特徴とする。その発生メカニズムに関して、遺伝的背景や環境因子、皮膚バリアの損傷、免疫学的異常や痒みなどが複雑に関与すると考えられているが、詳細はいまだ不明なままである (Johansson et al., 1998; Kabashima, 2013)。

近年、皮膚バリアの機能異常はアトピー性皮膚炎の重要な原因であると考えられている (Elias et al., 1999; Elias et al., 2001)。なかでも、角質層 (Stratum corneum, SC) の主要構成タンパク質であるフィラグリン (filaggrin, FLG) は角質の物理的張力と付着性に寄与し (Dale et al., 1985)、その欠乏は皮膚バリアの損傷を誘発することから、アトピー性皮膚炎の重要な原因であると報告されている (Palmer et al., 2006; Kawasaki et al., 2012)。また、分解されたフィラグリンは天然保湿因子 (natural moisturizing factor, NMF) となり、角質層の水分保持と皮膚の弱酸性維持に重要な役割を果たしている (Rawlings and Harding, 2004)。

皮膚バリアの損傷は外部からアレルゲンの侵入を許し、皮膚に存在する抗原提示細胞や炎症関連細胞を活性化して、最終的に T helper 2 (Th2) 型免疫応答を惹起する (Cork et al., 2009)。この過程で重要な役割を果たすのが胸腺間質性リンパ球新生因子 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) である (Ebner et al., 2007; Nakajima et al., 2012)。ケラチノサイトから産生された TSLP は、直接ランゲルハンス細胞を活性化する。活性化ランゲルハンス細胞はリンパ節への遊走し、naïve CD4 陽性 T 細胞の CD4 陽性 Th2 細胞への分化を誘導して Th2 型の炎症反応を誘発する (Watanabe et al., 2004; Omori and Ziegler, 2007; Rochman et al., 2007)。アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、ケラチノサイトでの TSLP 発現量が増加していること (Ziegler, 2010; Soumelis et al., 2002)、また皮膚内の TSLP の注入は知覚

神経に直接作用して、激しいかゆみを誘発する可能性があることから (Wilson et al., 2013)、アトピー性皮膚炎における皮膚バリアの機能異常と TSLP 産生との因果関係が示唆されるが、そのメカニズムは明らかになっていない。

皮膚のバリア機能のひとつに皮膚の弱酸性化が挙げられる。これは透過障壁の恒常性や角質層の耐久性に働くとともに、抗菌作用の活性化などの自然免疫に貢献する (Schmid-Wendtner and Korting, 2006)。また、細胞外脂質二重膜の脂質間結合や (Gibbs et al., 1997)、セラミド産生酵素であるベターグルコセレブロシダーゼ (β -glucocerebrosidase)、酸性スフィンゴミエリナーゼ (acidic sphingomyelinase) の活性にも関与する (Hachem et al., 2010)。しかしながら、アトピー性皮膚炎患者では皮膚の pH が上昇することが知られており (Eberlein-König et al., 2000)、pH 上昇による皮膚バリアの回復の遅れと角質層セリンプロテアーゼの活性化が報告されている (Mauro et al., 1998; Hachem et al., 2005)。

角質層の剥離を促すセリンプロテアーゼは、上皮組織の分化と皮膚バリア機能に重要な役割を果たしている (Derian et al., 1997; Ekholm et al., 2000)。なかでも、角質層トリプシン様酵素であるカリクレイン関連ペプチド加水分解酵素 (kallikrein-related peptidase, KLK) 5 は、角質層キモトリプシン様酵素の KLK7、KLK14 を活性化させるとともに (Brattsand et al., 2005; Stefansson et al., 2006; Caubet et al., 2004; Emami and Diamandis, 2008)、自己活性化も可能であることから (Egelrud and Lundström, 1991; Egelrud, 1993; Ekholm and Egelrud, 1998)、角質層におけるタンパク質分解カスケード反応の中心的な調節分子と考えられている。一方、リンパ上皮カザール型関連阻害因子 (Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor, LEKTI) は KLK5 に対する内因性阻害因子であり (Deraison et al., 2007)、遺伝的な LEKTI の欠損症であるネザートン症候群 (魚鱗癬紅皮症) では KLK5 の活性化やプロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor, PAR) 2、TSLP 発現増加が認められる (Briot et al., 2009)。角質細胞と

ケラチノサイトに発現する PAR2 は、炎症性皮膚疾患との関連が深いことから (Santulli et al., 1995; D'Andrea et al., 1998; Steinhoff et al., 1999; 2005)、KLK の活性化異常とそれに伴う皮膚バリアの機能不全が、皮膚の炎症やアレルギー反応において重要な役割を果たすことが示唆されており (Descargues et al., 2005; Komatsu et al., 2007; Moniaga et al., 2013)、実際に皮膚炎症性疾患で KLK の発現増加が報告されている (Komatsu et al., 2005; 2007)。そこで本研究では、ヒトアトピー性皮膚炎モデルである NC/Tnd マウスを用い、アトピー性皮膚炎の初期における皮膚のバリア機能不全が起こるメカニズムを、とくに皮膚の pH に着目して詳細に検討した。

日本で樹立された近交系マウスである NC/Tnd マウスは、空気清浄を行わない通常飼育環境下で維持すると、およそ 6-8 週齢で臨床病理学的にヒトアトピー性皮膚炎と極めて類似した皮膚炎を自然発症する (Matsuda et al., 1997; Tanaka et al., 2012; Amagai et al., 2013)。2001 年、Aioi ら (Aioi et al., 2001) は、通常環境で飼育した NC/Tnd マウスで皮膚のセラミドの減少を含む皮膚バリアの損傷が認められることを報告した。また、特異的阻害剤を用いて NC/Tnd マウスの皮膚における核内因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) の活性を抑制すると皮膚炎症状が緩和することが示された (Tanaka et al., 2007)。これは NC/Tnd マウスのアトピー性皮膚炎の免疫学的病態における NF- κ B 関連シグナルの重要性を示唆している。一方で、アトピー性皮膚炎の初期に認められるの皮膚バリアの損傷を誘導するメカニズムについては、未だ明らかになっていない。

そこで、本研究ではヒトアトピー性皮膚炎モデルである NC/Tnd マウスを用いて、皮膚の pH による KLK5、PAR2、TSLP の変化とこれによる皮膚バリアと炎症反応の関連性について検討した。

1章 アトピー性皮膚炎モデルマウスでの皮膚バリアの損傷や皮膚 pH の関連性

[1] 序論

ヒトの皮膚表面の pH は弱酸性を呈しており、これらは皮膚バリアと呼ばれる角質層の機能に多くの影響を与える。角質層の代表的な機能では外部環境からの刺激物質やアレルゲンなどの侵入を防ぐ作用がある。このような角質層の構造的堅牢性を維持するために重要な役割を果たすのがコルネオデスモソーム (corneodesmosome) である。図 1 に示すように、角質層の構造はしばしば煉瓦の壁 (brick wall) に例えられる (Elias, 1983; Cork et al., 2006)。煉瓦となる角質細胞 (corneocyte) の周囲はセメントである脂質 (lipid) によって満たされている。また、コルネオデスモソームは煉瓦と煉瓦をつなぐ鉄心の役割を果たす。さらに、角質細胞の細胞膜には不溶性のタンパク質が付着し、角質化された膜 (cornified envelope) を形成する。これによって角質細胞の張力と脂質の付着性が強化され、皮膚バリアはさらに強固となる (Candi et al., 2005)。このような角質化された膜の重要な構成成分の一つがフィラグリンである (Steinert and Marekov., 1995)。フィラグリンはケラチン繊維に付着して角質細胞をより扁平な構造にする (Steinert et al., 1981)。また、複数のタンパク質分解酵素によって分解され、天然保湿因子となり角質層における水分保持と皮膚の酸性化に関与する (Harding et al., 2000)。一方、フィラグリンの欠乏は角質層の水分保持力の減少と、経皮水分蒸発量の増加につながる (Irvine et al., 2011)。したがって、フィラグリンの遺伝的欠損、または機能的異常がアトピー性皮膚炎の原因の一つと考えられている (Palmer et al., 2006; Kawasaki et al., 2012)。しかし、フィラグリンの完全欠損マウスでは自然的にアトピー性皮膚炎が誘発されない (Kawasaki et al., 2012)、アトピー性皮膚炎患者とフィラグリン遺伝的欠損の一致率は 20%程度であり (Morar et al., 2007)、この一致率も減少している状況で

ある。このことから、フィラグリンがアトピー性皮膚炎の重要な病因であるとするのには議論の余地がある。

分化した角質細胞は皮膚表面のタンパク質分解酵素の働きによって剥離・脱落する。適切な角質細胞の剥離は皮膚の恒常性維持に役立つ一方で、過度の剥離・脱落は皮膚バリアを脆弱化させ、外部からの刺激物質やアレルゲンの皮膚内侵入を容易にする（図 2）。したがって、私は本研究でアトピー性皮膚炎の病態メカニズムにおける角質細胞の剥離亢進とタンパク質分解酵素の活性化異常との相互作用に着目した。

角質細胞の剥離・脱落に関わるタンパク質分解酵素は、中性からアルカリ性に至適 pH を有するセリンプロテアーゼであり、コルネオデスモソームを分解して皮膚の剥離を誘発する。上皮に発現するセリンプロテアーゼには、角質キモトリプシン様酵素である KLK7 および KLK 14 と、角質トリプシン様酵素である KLK5 がある。通常、これらの酵素はいずれも活性を持たない前駆体として角質中に存在するが、KLK5 が KLK7 (Caubet et al., 2004)、KLK14 (Emami and Diamandis, 2008) を活性化することで機能を発現する。さらに、KLK5 の自己活性化 (Ekholm and Egelrud, 1998) も報告されていることから、KLK5 が KLK カスケードにおいて極めて重要な調節因子であることが示唆されている。しかし、アトピー性皮膚炎でのセリンプロテアーゼの発現変化とセリンプロテアーゼによる皮膚バリアと炎症との関係については報告がほとんどない。

一方、KLK5、KLK7 の強力な内因性阻害因子である LEKTI は serine protease inhibitor Kazal-type (SPINK) 5 遺伝子上にコードされ、皮膚の顆粒層で発現して KLK の過剰な活性を抑制する (Derason et al., 2007)。遺伝的な LEKTI 欠損症であるネザートン症候群では、LEKTI の欠失に起因する KLK5 の活性化亢進が認められるとともに、PAR2 の活性化や TSLP 分泌の増加にも関与することが報告されている (Briot et al., 2009)。

PAR2 は角質細胞膜表面に発現し (Santulli et al., 1995; D'Andrea et al., 1998;

Steinhoff et al., 1999)、炎症性皮膚疾患のみならず損傷を受けた皮膚バリアの回復にも関連することが報告されている (Steinhoff et al., 2005)。一方、TSLP は近年注目されているサイトカインで、角質細胞をはじめとする上皮細胞に発現し、皮膚に存在する樹状細胞の活性化を介して、アトピー性皮膚炎の炎症反応を惹起することが報告されている (Rochman et al., 2007)。事実、アトピー性皮膚炎患者の皮膚で TSLP 発現が増加することが知られているが (Soumelis et al., 2002)、TSLP と皮膚バリアとの因果関係はいまだ明らかになっていない。そこで本章では、ヒトアトピー性皮膚炎モデル NC/Tnd マウスを用い、アトピー性皮膚炎にともなう皮膚 pH の変化と皮膚バリアとの関連性、そして皮膚 pH 上昇によるセランプロテアーゼ、TSLP の変化について詳細に解析した。

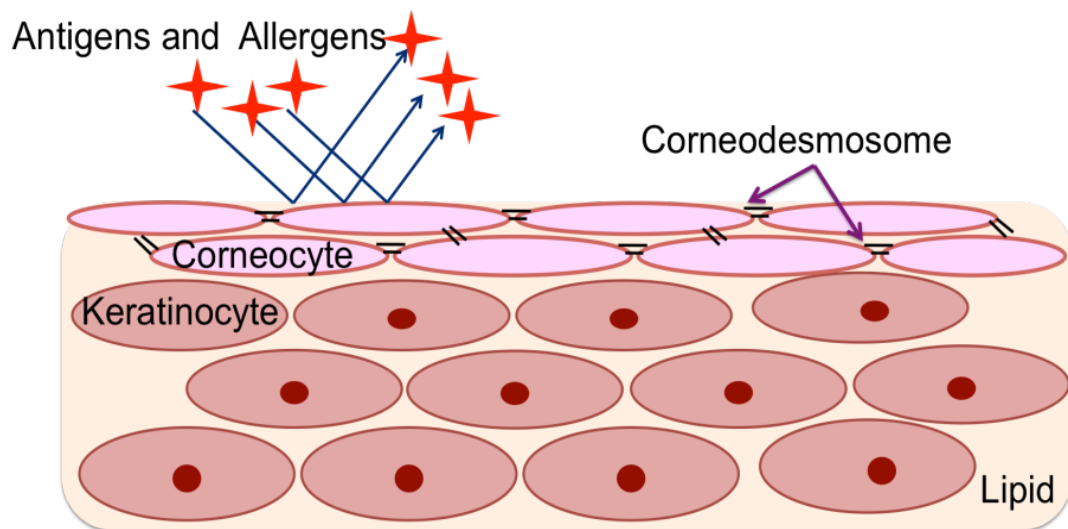


図1 皮膚バリアの構造

角質層は皮膚の最外層に存在し、外部環境に対するバリアとして機能し、刺激物質やアレルゲンなどの侵入を防止する。角質層は、ケラチノサイト (keratinocyte) から分解された角質細胞 (corneocyte) とその間隙を満たす脂質 (lipid)、そして角質細胞同士を連結させるコルネオデスモソーム (corneodesmosome) によって構成される。

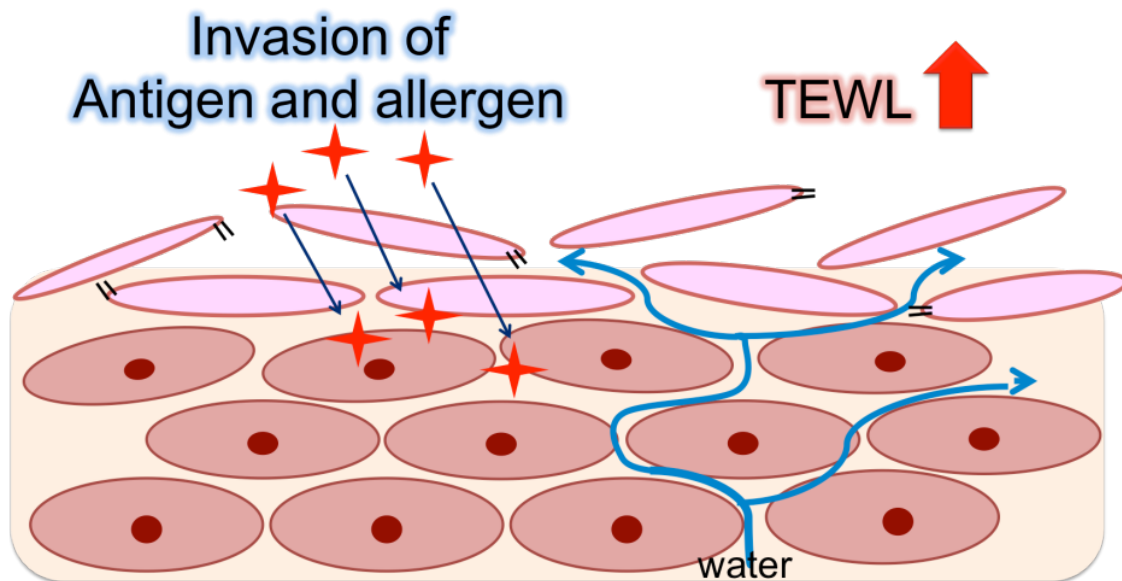


図2 皮膚バリアの損傷

コルネオデスモソームの分解や脂質構成の異常は皮膚バリアの機能不全につながる。皮膚バリアの損傷は外部環境からの抗原、アレルゲンなどの侵入を容易にするのみならず、経皮の水分蒸散量（TEWL）を増加させ皮膚乾燥を引き起こす。このようなバリア機能の障害は、アトピー性皮膚炎の発症および増悪化の過程で重要な役割を果たしている。

[2] 臨床症状と経皮水分蒸散量の変化

1) 材料と方法

1. 使用動物および飼育条件

動物は 5–12 週齢のオス NC/Tnd マウスを 5–6 頭ずつ使用した。特定病原菌除去 (specific pathogen free, SPF) マウスは室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $40 \pm 10\%$ 、12 時間明期 12 時間暗期の明暗条件を維持した SPF 動物室にて飼育した。食餌は 30 kGy 放射線滅菌した固形資料 CE-2 (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) を用い、滅菌水道水とともに自由給餌とした。空気清浄を行わない通常飼育 (conventional, Conv) マウスも同様の室温・湿度・明暗条件を維持した動物室で飼育し、固形飼料 CE-2 (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) および水道水を自由給餌した。実験は国立大学法人東京農工大学研究倫理委員会の承認を得て実施し、動物の取り扱いはその規定に即して行った (No.24-94)。

2. 臨床症状の肉眼的評価

NC/Tnd マウスにおける皮膚炎の重症度は、アトピー性皮膚炎に特徴的な臨床症状である皮膚の乾燥/鱗屑、発赤/出血、浮腫、擦過傷やびらん、かゆみについて肉眼的観察を行い評価した。

3. 経皮水分蒸散量 (transepidermal water loss, TEWL) の測定

皮膚のバリア機能は、背部の TEWL を測定して評価した。測定環境を一定に保つため、測定 30 分前にマウスを恒温恒湿室 (室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $40 \pm 10\%$) に移動させて順化させた。マウスを 2–3% のイソフルランで吸入麻酔し、背部に Multi probe adapter (CK Electronic, Cologne, Germany) のプローブを軽く接触させ TEWL を測定した。測定は 3 回行い、その平均値を算出した。

4. 統計学的解析

統計的有意差判定には、二元分散分析法および多重比較法を用いた。二元分

散分析は、独立変数を飼育環境および週齢、従属変数を経皮水分蒸散量値とし、各要因の主効果および交互作用を検定した。有意差の判定は F 境界値を用い、分散比 $F > F(1 - \alpha)$ のとき危険率 $\alpha = 0.05$ を有意な差とした。また、多重比較法としては Tukey 法を使用し、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

2) 結果

図 3A に SPF および Conv NC/Tnd マウスの各週齢における典型的な皮膚炎症状を示す。SPF NC/Tnd マウスは 5 週齢と 12 週齢の両方で皮膚炎症状が認められなかった。一方、Conv NC/Tnd マウスでは 5 週齢では皮膚炎の臨床症状を発症していないのに対し、12 週齢では肉眼的に中等度の臨床症状（皮膚の乾燥/鱗屑、発赤/出血、浮腫、擦過傷やびらん、かゆみ）を示す皮膚病変が観察された（図 3A）。

図 3B に TEWL の測定結果を示す。Conv NC/Tnd マウスでは軽度のアトピー性皮膚炎症状が現れる 7 週齢から TEWL が有意に上昇し、その後は皮膚炎症状の悪化に伴って増加した。一方、SPF NC/Tnd マウスでは各週齢における TEWL の有意な差は認められなかった（図 3B）。

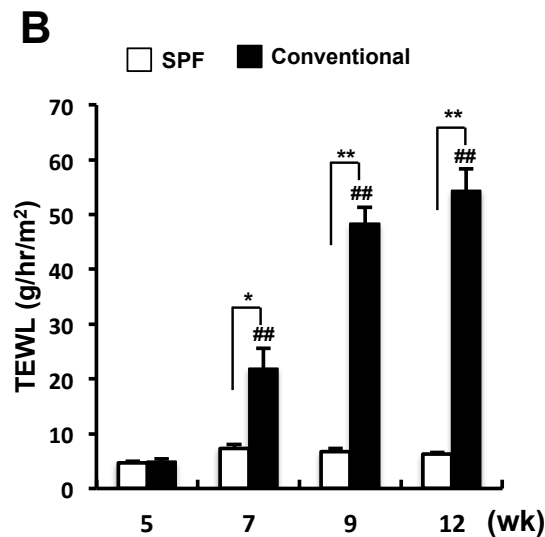
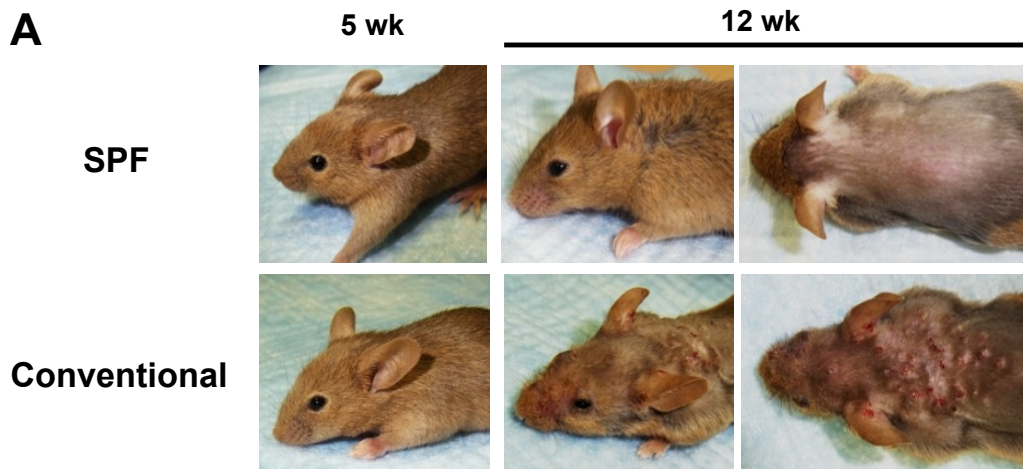


図3 NC/Tnd マウスの週齢に伴う肉眼的皮膚炎症状と TEWL の変化

5 および 12 週齢の SPF と conventional NC/Tnd マウスにおける典型的な皮膚炎症状 (A) と各週齢における TEWL の変化 (B) を示す。SPF、conventional NC/Tnd マウスともに各週齢あたり 5-6 頭のマウスを測定した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は、同じ週齢の SPF NC/Tnd マウスとの比較、#は 5 週齢の conventional NC/Tnd マウスと比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、**と##は危険率 $p < 0.01$ を示す。

3) 考察

NC/Tnd マウスは、1955 年名古屋大学の近藤恭司教授によって近交化され、現在はヒトアトピー性皮膚炎の動物モデルとして世界中で使用されている (Matsuda et al., 1997; Tanaka et al., 2012; Amagai et al., 2013)。通常飼育した conv NC/Tnd マウスは約 7 週齢から皮膚の乾燥、かゆみ、発赤などのアトピー性皮膚炎類似の臨床症状が現れる。また、ヒトアトピー性皮膚炎の特徴である血中 IgE の増加や皮膚でのセラミド含有量の減少が報告されている (Matsuda et al., 1997; Aioi et al., 2001)。

Conv NC/Tnd マウスで、臨床症状 (発赤、かゆみ、浮腫、びらん、乾燥) の発現に伴い、TEWL の増加が認められたことから、NC/Tnd マウスではアトピー性皮膚炎の発症とともに皮膚のバリア機能が障害されていることが示唆された。このことから、Conv NC/Tnd マウスは、皮膚炎症状のみならず皮膚のバリア機能不全という点においてもヒトアトピー性皮膚炎と極めて類似した病態を示し、アトピー性皮膚炎と皮膚バリア障害との関連を究明する上で有用なモデル動物であることが示された。

[3] 皮膚フィラグリンの変化

1) 材料と方法

1. ウェスタンブロッティング法

SPF および Conv NC/Tnd マウスの皮膚におけるフィラグリンのタンパク質量をウェスタンブロッティング法を用いて評価した。各群 3 頭のマウスから抽出した皮膚組織を 5 mM の ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む 50°C の phosphate-buffered saline (PBS) に 2 分間浸漬して上皮と真皮を分離した後、氷温の PBS で洗浄した。分離した上皮組織にプロテアーゼ阻害剤を添加した urea/Tris buffer を加え破碎した。破碎液を遠心分離 (13,000 xg, 20 分, 4°C) して不溶性分画を除去したのち、得られた上清を試料とした。BCA Protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA) を用いて試料中のタンパク質濃度を定量し、試料間のタンパク質濃度差がなくなるように urea/Tris buffer で希釈した。各試料と等量の 2 × Laemmli sample buffer (20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS: sodium dodecyl sulfate, 100 mM Tris : tris (hydroxymethyl) -aminomethan, 0.01% bromophenol blue, pH6.8) を混和し、95°C で 7 分間加熱した。4–12%の濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて電気泳動により試料を展開し、Immobilom-P polyvinylidene fluoride 膜 (PVDF; Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。非特異的反応の出現を防ぐために 5% のスキムミルク (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を含む 20 mM Tris-buffered saline (TBS) に 60 分間浸漬した後、各種一次抗体を添加し、4°C で一晩反応させた。0.05% Tween-20 を含む TBS で洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) で標識された二次抗体を添加して室温で 45 分間反応させた。再び TBS で洗浄した後、Immobilon Western

Detection Reagents (Milipore) を用いて発色させ ImageQuant LAS4000 (Fuji film, Tokyo, Japan) を用いて可視化した。一次抗体はウサギ抗フィラグリンポリクローナル抗体 (Covance, Princeton, NJ, USA) を、二次抗体は HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を使用し、希釈濃度は各抗体の添付書類に従った。

2. 免疫組織化学法

SPF および Conv NC/Tnd マウスの皮膚におけるフィラグリンのタンパク質局在を免疫組織化学法によって評価した。マウスから採取した皮膚組織を 10% ホルマリンに浸漬して固定した後、脱水しパラフィンに包埋した。ミクロトームを用いて厚さ 4 μm で皮膚組織を薄切し、スライドガラスに接着させた。キシレンに浸漬して脱パラフィン処理を行ったのち、エタノールを用いて水和させた。タンパク質の抗原性を回復させる目的で Liberate Antibody binding solution (Polysciences, Warrington, PA, USA) を作用させた後、PBS で洗浄した。非特異的反応を防ぐために 5% のヤギ血清を含む PBS に室温で 30 分間反応させた後、StreptAvidin/ Biotin blocking kit (Vectors Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて、組織内の Avidin/ Biotin を除去した。各種一次抗体を添加した PBS に 4°C で一晩反応させたのち、PBS で洗浄した。内因性の HRP 活性を阻害するため 3% の過酸化水素に反応させ、再度 PBS で洗浄後、二次抗体と HRP-streptavidin (Vectors) をそれぞれ室温で 45 分間反応させた。その後、HRP の発色基質であるジアミノベンジジンを作用させて可視化した。

一次抗体はウサギ抗フィラグリンポリクローナル抗体 (Covance)、二次抗体はビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用い、希釈濃度は各抗体の添付書類に従った。

3. 高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC)

フィラグリンの分解によって生じたアミノ酸は、天然保湿因子として皮膚の水分保持と酸性化の維持に寄与する。そこで、SPF および Conv NC/Tnd マウス

の角質層に含まれる天然保湿因子を解析するため、フィラグリン由来の主要構成成分であるピロリドンカルボン酸 (pyrrolidone carboxylic acid, PCA) ならびにトランスウロカニン酸 (trans-urocanic acid, trans-UCA) の濃度を HPLC を用いて測定した。角質層の分離には、直径 14 mm の D-Squame stripping discs と呼ばれる円形の粘着性フィルムを用いた。マウスの後背部皮膚の同一部位に D-squame フィルムを圧着させて剥がす操作を連続 5 回行い、角質層を採取した。皮膚表面に残留するほこりや被毛などが多く存在する最初に採取した D-squame フィルムを除いて、2 回目から 5 回目に採取した計 4 枚のフィルムを HPLC 分析に用いた。角質層が付着したフィルムを 100 μ L の 0.1 M 水酸化カリウム (KOH) 溶液に 1 時間浸漬して、その液体を回収した。過塩素酸 (HClO₄) を加えて中和したのち、濾過して得られた濾液を試料とした。

溶離液として 6 mM HCl、0.3 mM sodium octane sulfonate、1% acetonitrile を用い、試料 50 μ L を 250 \times 3 mm reversed-phase synergi Polar-RP column (Phenomenex) に注入した。流量は 0.4 mL/分、保持時間 (Retention time) はそれぞれ PCA が 6.14 ± 0.45 、trans-UCA が 8.37 ± 0.70 であった。測定は 2 回行い、平均値を得た。さらに、Pierce Micro BCA protein assay を用いて試料中の総タンパク質量を定量し、タンパク質 1 g あたりに含まれる PCA および trans-UCA 量を算出した。

4. 統計学的解析

統計的有意差判定は、t 検定を用い、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

(2) 結果

図 4A にウェスタンブロッティング法の結果を示した。5 週齢の NC/Tnd マウスでは、フィラグリンタンパク質量に飼育環境の違いによる有意な差は認められなかった。しかしながら、皮膚炎を発症していない SPF NC/Tnd マウスでは、週齢が上昇するにつれてフィラグリンタンパク質量が減少するのに対し、皮膚

炎を発症する Conv NC/Tnd マウスでは皮膚症状の悪化に伴ってタンパク質量が増加し、9 週および 12 週齢のマウスでは SPF NC/Tnd マウスと比較して有意な差が認められた (図 4A)。

12 週齢の SPF および Conv NC/Tnd マウスから採取した皮膚を用いた免疫組織化学法の結果を図 4B に示した。フィラグリンタンパク質は、SPF NC/Tnd マウスでは角質層に限局して発現が観察されるが、Conv NC/Tnd マウスでは角質層のみならず顆粒層にも発現していることが明らかになった (図 4B)。

図 5 には HPLC 方法を用いて測定した天然保湿因子の結果を示した。SPF NC/Tnd マウスと比較すると、フィラグリン由来の天然保湿因子である PCA、trans-UCA ならびに両者の合計量には、いずれにおいても Conv NC/Tnd マウスの角質層で有意な増加が認められた (図 4)。

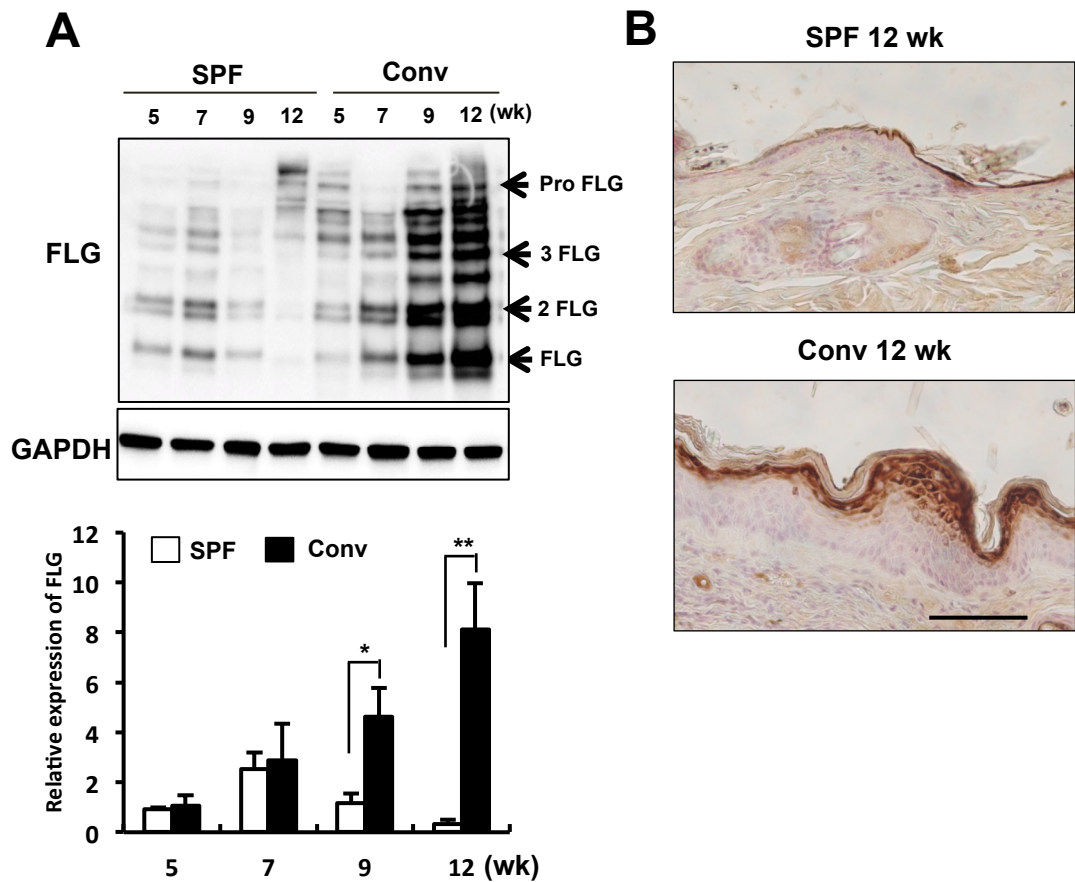


図4 NC/Tnd マウスにおけるフィラグリンタンパク質発現量の継時的変化

5-12 週齢の SPF および Conv NC/Tnd マウスにおけるフィラグリンタンパク質の発現レベル (A) を示す。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。黒の境界線は、同じ膜で得られた結果であることを意味する。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は同じ週齢の SPF NC/Tnd マウスと比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、**は危険率 $p < 0.01$ を示す。また、免疫組織化学法を用いた 12 週齢の NC/Tnd マウスの皮膚におけるフィラグリンタンパク質の局在 (B) を示す。バーは 100 μm を表す。

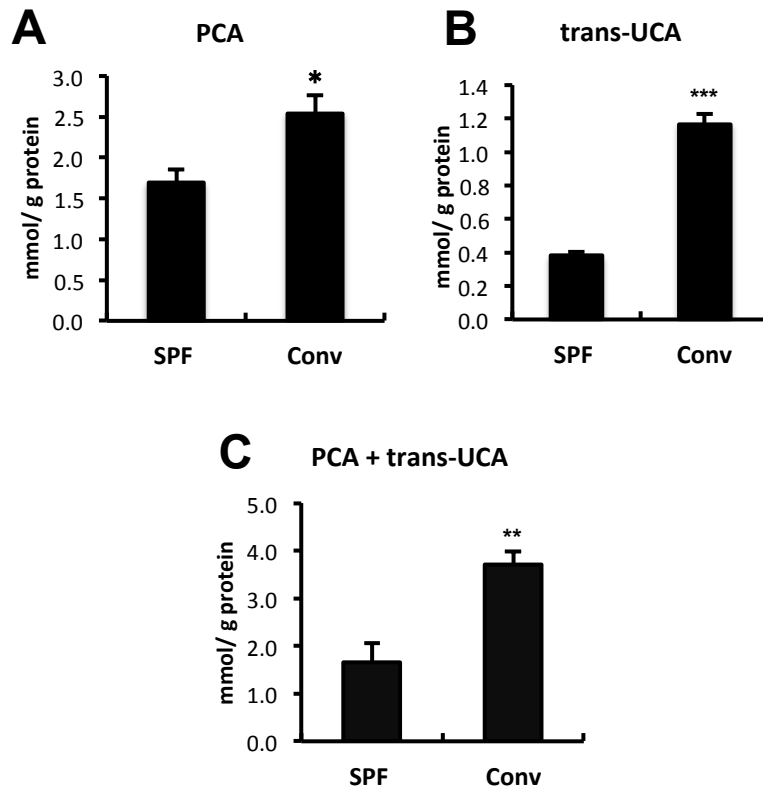


図5 NC/Tndマウスの角質層におけるフィラグリン天然保湿因子の発現量
HPLCを用いて、12週齢のSPFおよびConv NC/Tndマウスの角質層におけるPCA
(A)、tran-UCA (B)、PCA + tran-UCA (C)の含有量を測定した。測定は、各
群当たり3頭のマウスを使用して、2回測定の平均値を評価した。グラフは各
群の平均値、バーは標準誤差を示す。*はSPF NC/Tndマウスと比較して、危険
率 $p < 0.05$ を示す。また、**は危険率 $p < 0.01$ を、***は危険率 $p < 0.001$ を示す。

(3) 考察

フィラグリンの遺伝的欠損はアトピー性皮膚炎の重要な危険因子であることは広く知られている (Palmer et al., 2006; Kawasaki et al., 2012)。フィラグリンタンパク質は、角化膜を形成してケラチノサイトを外部の刺激から保護するし、様々なプロテアーゼによって分解され天然保湿因子を形成し、皮膚の水分保持と酸性化維持に関与すると報告されている。Törmä ら (Törmä et al., 2008) は、健康なヒトの皮膚でラウリル硫酸ナトリウムのような洗剤による皮膚バリアの損傷がフィラグリンの代償的な産生増加を誘発すると報告している。また、フィラグリン欠損マウスでは皮膚バリアの損傷によって、外部の刺激に対して皮膚の抵抗力が弱化され、抗原、アレルゲンが侵入しやすくなる (Kawasaki et al., 2012)。しかしながら、フィラグリン遺伝子に異常がない人もアトピー性皮膚炎を発症することから、フィラグリンの機能異常はアトピー性皮膚炎の病態メカニズムの全てを説明するには不十分である。また、Cole ら (Cole et al., 2014) によると、フィラグリンワイルドタイプのアトピー性皮膚炎患者で皮膚フィラグリンの産生は正常な人より増加する。本項で得られた結果では、SPF NC/Tnd マウスの皮膚では 7-12 週齢にフィラグリンタンパク質の量が減少する一方、アトピー性皮膚炎が発現された conv NC/Tnd マウスの皮膚でのフィラグリンタンパク質の量とその分解産物は有意に増加することを確認した。SPF NC/Tnd マウスの 7-12 週齢にフィラグリンの量が減少することは、成長によって堅固な皮膚バリアが形成されるためフィラグリンの代償的役割が減るものと予想される。なお、NC/Tnd マウスで認められる皮膚炎はフィラグリンの異常ではなく、他の原因によって引き起こされることを示唆している。さらに、皮膚炎の発症に伴ってフィラグリンとその分解産物の増加が認められたことは、フィラグリンワイルドタイプのアトピー性皮膚炎患者と同一に皮膚バリアの損傷に対する代償作

用と考えられる。

[4] 皮膚の pH 変化とそれに伴うアトピー性皮膚炎の発症メカニズム

1) 材料と方法

1. 皮膚表面の pH 測定

各群当たり 5-6 匹のマウスの後背部皮膚を測定部位として、皮膚表面における pH を評価した。測定環境を一定に保つため、測定 30 分前にマウスを恒温恒湿室（室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $40 \pm 10\%$ ）に移動させて順化させた。マウスを 2-3%のイソフルランで吸入麻酔し、背部に pH meter (HANNA Inc., Woonsocket, RI) に接続したガラス表面電極 (HANNA Inc.) を軽く接触させ pH を測定した。

2. ウェスタンブロッティング法

各群当たり 5-6 匹の 5、12 週齢の SPF および Conv NC/Tnd マウスから採取した皮膚組織を用いて、既述の方法での表皮を分離した後、試料を調整した。12%のポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories) を用いて電気泳動し、展開した試料を PVDF 膜 (Millipore) に転写した。転写後の膜を 5%のスキムミルク (Wako) を含む 20 mM TBS に 60 分間浸漬した後、各種一次抗体に 4°C で一晩作用させた。洗浄後、HRP で標識された二次抗体を添加して室温で 45 分間反応させた。再び洗浄した後、発色基質 Immobilon western detection reagents (Milipore) を作用させ、ImageQuant LAS4000 (Fuji film) を用いて可視化した。一次抗体として、ウサギ抗 KLK5 ポリクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, England)、ウサギ抗 LEKTI ポリクローナル抗体、マウス抗 PAR2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。二次抗体は、一次抗体の動物種に応じて HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体、もしくは HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用い、希釈濃度は各抗体の添付書類に従った。

3. 免疫組織化学法

前項で述べたように、パラフィン包埋した NC/Tnd マウスの皮膚組織を薄切し、スライドガラスに接着させた。タンパク質の抗原性復帰処理を行ったのち、免疫組織化学法によって目的とするタンパク質の発現解析を行った。一次抗体はウサギ抗 KLK5 ポリクローナル抗体 (Abcam)、ウサギ抗 LEKTI ポリクローナル抗体、マウス抗 PAR2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ヤギ抗 TSLP ポリクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を使用した。二次抗体は、一次抗体の動物種に応じてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体、ビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用い、希釈濃度は各抗体の添付書類に従った。

4. 酵素免疫学的測定法 (Enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA)

SPF および Conv NC/Tnd マウスの表皮に発現する TSLP を定量するため、ELISA を実施した。マウスから採取した皮膚組織を 5 mM EDTA を含む 50°C の PBS に 2 分間浸漬し、表皮と真皮を分離した。得られた表皮を氷温の PBS で洗浄し、タンパク質分解酵素阻害剤を添加した CellLytic MT reagent (Sigma-Aldrich) を加えて破碎した。破碎液を遠心分離して不溶性分画を取り除き、上清を試料とした。BCA Protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA) 法を用いて、試料中のタンパク質濃度を定量し、全ての試料が同一濃度となるように CellLytic MT reagent (Sigma-Aldrich) で希釈した。実験には Mouse TSLP ELISA MAX Deluxe Kit (BioLegend, San Diego, CA) を用い、添付書類にしたがって TSLP の定量を行った。

5. 統計学的解析

統計的有意差判定には、二元分散分析法および多重比較法を用いた。二元分散分析は、独立変数を飼育環境および週齢、従属変数を皮膚表面の pH、ウェスタブロットティング法による KLK5、PAR2、LEKTI タンパク質の相対的発現強度、ELISA 法による TSLP 発現量として、各要因の主効果および交互作用を検定した。有意差の判定は F 境界値を用い、分散比 $F > F(1 - \alpha)$ のとき危険率 $\alpha =$

0.05 を有意な差とした。また、多重比較法としては Tukey 法を使用し、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

(2) 結果

図 6 に皮膚 pH の測定結果を示した。5 週齢の NC/Tnd マウスでは、飼育環境に関わらず皮膚表面は pH 6 前後であった。しかし、Conv NC/Tnd マウスでは皮膚炎が発症する 7 週齢で急激に pH が上昇し、SPF NC/Tnd マウスと比較して有意な差が認められた。また、このような Conv NC/Tnd マウスの皮膚における高 pH は 12 週齢まで維持された。一方、皮膚炎を発症しない SPF NC/Tnd マウスでは週齢が進むにしたがって pH は低下し、皮膚表面が酸性化する傾向が認められた (図 6)。

KLK5 の至適 pH は中性からアルカリ性域に存在する。そこで、NC/Tnd マウスの皮膚 pH の上昇が KLK5 に与える影響を検討した。図 7 にウェスタンブロッティング法および免疫組織化学法による KLK5 のタンパク質の解析結果を示した。5 週齢の NC/Tnd マウスでは、飼育環境による KLK5 タンパク質のレベルに差は認められなかった。一方、12 週齢の Conv NC/Tnd マウスでは SPF NC/Tnd マウスと比較して KLK5 タンパク質の量がおおよそ 3.5 倍に増加した (図 7A)。また、KLK5 タンパク質の局在も、12 週齢の Conv NC/Tnd マウスでは角質層から顆粒層に渡って広範な発現が認められた (図 7B)。

続いて、KLK5 の内因性抑制因子である LEKTI の発現を図 8 に示す。NC/Tnd マウスの皮膚の飼育環境および皮膚炎の有無によるタンパク質のレベルの差は認められなかった (図 8A および図 8B)。

Briot ら (Briot et al., 2009) の報告から、LEKTI 欠損に起因する KLK5 の活性亢進は PAR2 の活性化や TSLP 産生量の増加を誘発するだけでなく、炎症性サイトカインの産生・分泌をも惹起する。そこで、NC/Tnd マウスにおける PAR2 お

よび TSLP の発現をそれぞれ図 9、10 に示す。PAR2 タンパク質のレベルは、5 週齢の NC/Tnd マウスでは飼育環境の違いによる差は認められなかったのに対して、12 週齢の Conv NC/Tnd マウスでは SPF マウスと比較して約 5 倍の顕著な発現量増加が認められた (図 9A)。また、PAR2 タンパク質の局在も Conv NC/Tnd マウスでは角質層から顆粒層に渡る発現領域の拡張のみならず、真皮に存在する免疫担当細胞での発現も観察された (図 9B)。また、TSLP の産生量は、5 週齢の Conv NC/Tnd マウスでは SPF で飼育したマウスと比較して顕著な差が認められなかったのに対して、12 週齢の Conv マウスでは SPF NC/Tnd マウスの約 3 倍量の TSLP が検出された (図 10A)。さらにその局在も、表皮全域から真皮にかけて広範な TSLP タンパク質の発現が観察された (図 10B)。

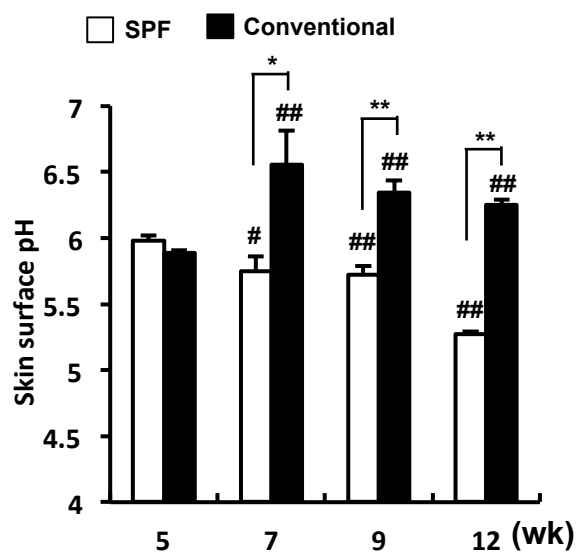


図6 NC/Tnd マウスにおける皮膚表面 pH の継時的変化

5-12 週齢の SPF および Conventional NC/Tnd マウスにおける皮膚表面の pH を測定した。各群当たり 5-6 匹のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は、同じ週齢の SPF NC/Tnd マウスと比較したとき、# はそれぞれの飼育環境の 5 週齢マウスと比較したとき、危険率 $p < 0.05$ を意味する。また、**、##は危険率 $p < 0.01$ を示す。

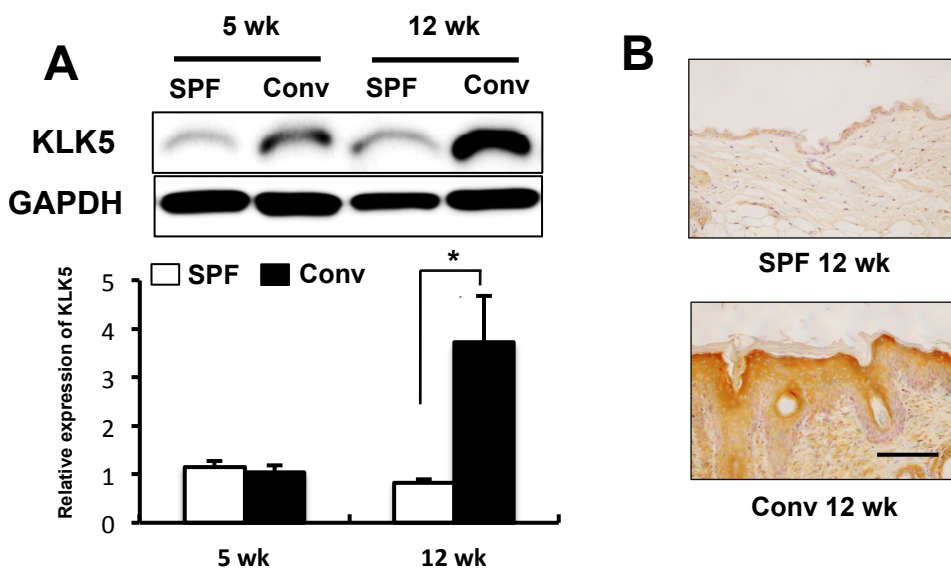


図7 NC/Tnd マウスの皮膚における KLK5 タンパク質量の変化

5 週齢および 12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの表皮における KLK5 タンパク質の量をウェスタンブロッティング法により検出した (A)。写真は 3 回の実験で得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒枠は同一膜上で得られた結果を意味する。グラフのカラムは 3 回の実験から得られた KLK5 タンパク質の平均相対発現強度、バーは標準誤差を表す。*は同じ週齢の SPF NC/Tnd マウスと比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、免疫組織化学法を用いて、12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの皮膚における KLK5 タンパク質の局在を可視化した (B)。バーは 100 μm を示す。

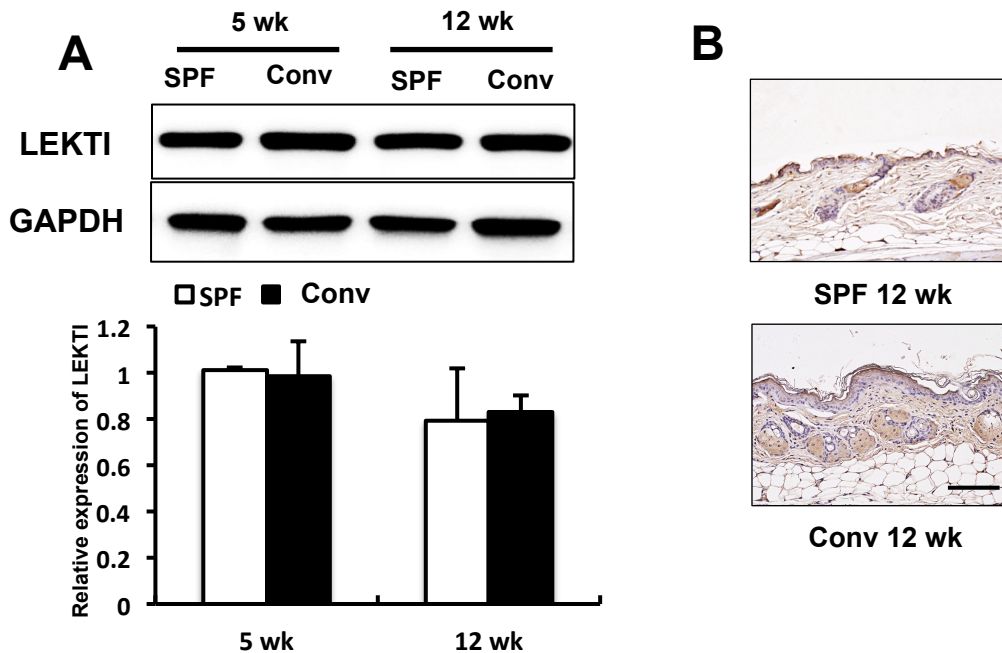


図8 NC/Tnd マウス皮膚における LEKTI タンパク質量の変化

5 週齢および 12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの表皮における LEKTI タンパク質発現をウェスタンブロッティング法により検出した (A)。写真は 3 回の実験で得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒枠は同一膜上で得られた結果であることを意味する。グラフのカラムは 3 回の実験からえられた LEKTI タンパク質の平均相対発現強度、バーは標準誤差を示す。また、免疫組織化学法を用いて、12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの皮膚における LEKTI タンパク質の領域を検出した (B)。バーは 100 μm を示す。

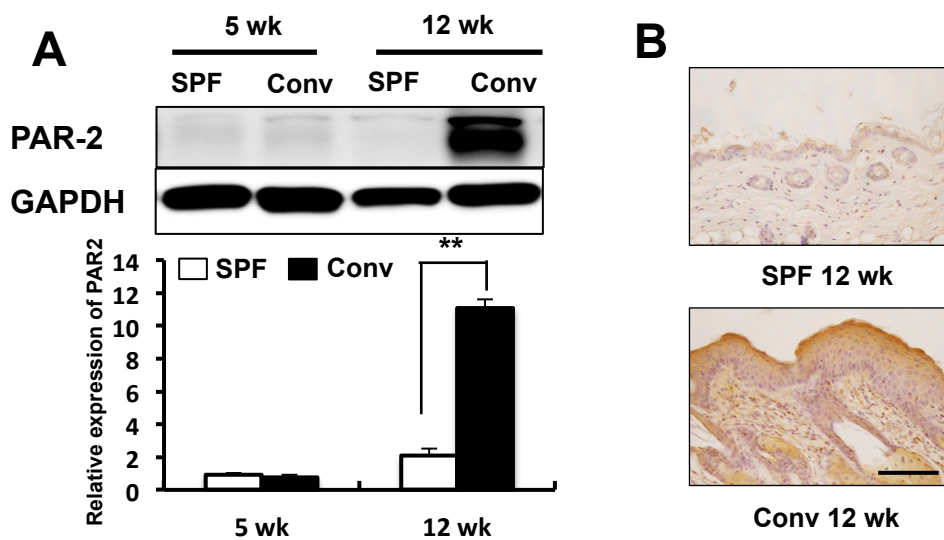


図9 NC/Tnd マウスの皮膚における PAR2 タンパク質量の変化

ウェスタンブロッティング法を用いて、5 週齢および 12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの表皮に産生する PAR2 タンパク質を検出した (A)。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒の枠線は、同一の膜で得られた結果を意味する。グラフのカラムは 3 回の実験で得られた PAR2 タンパク質の GAPDH タンパク質に対する平均相対発現強度、バーは標準誤差を示す。**は同じ週齢の SPF NC/Tnd マウスと比較して危険率 $p < 0.01$ を表す。また、免疫組織化学法を用いて、12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの皮膚における PAR2 タンパク質の領域を解析した (B)。バーは 100 μm を示す。

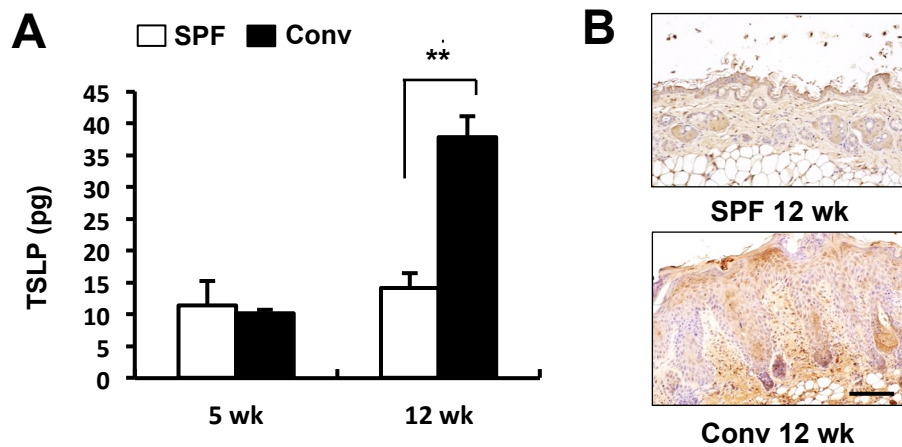


図 10 NC/Tnd マウスの皮膚における TSLP タンパク質の産生変化

5 週齢および 12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの表皮に発現する TSLP を ELISA を用いて定量した (A)。グラフは 100 μg タンパク質に該当する TSLP の濃度を示す。各群あたり 4-5 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を表す。**は同じ週齢の SPF NC/Tnd マウスと比較して、危険率 $p < 0.01$ を示す。また、免疫組織化学法を用いて、12 週齢の SPF と Conv NC/Tnd マウスの皮膚における TSLP タンパク質を検出した (B)。バーは 100 μm を示す。

(3) 考察

正常な成人の皮膚表面 pH は 4.5–5.5 として弱酸性を呈している。しかし、新生児の皮膚表面の pH は約 6.6 で (Fluhr et al., 2004a)、成長によってナトリウム–水素交換 1 型 (Sodium-Hydrogen Exchanger 1, NHE1)、分泌型ホスホリパーゼ A₂ (secretory phospholipase A₂, sPLA₂)、フィラグリンなどの内因性皮膚 pH 恒常性維持機構と汗腺、皮脂腺から分泌される自由脂肪酸や抗菌ペプチドなどの外因性皮膚 pH 恒常性維持機構が作動することで、皮膚 pH はますます弱酸性化される (Behne et al., 2002; Fluhr et al., 2004b; Sakai et al., 2014)。このような皮膚表面の弱酸性化の維持は皮膚の透過障壁の恒常性維持と堅牢性を強化し、病原体の侵入を防ぐ抗菌作用とサイトカインの活性化の調節をする。SPF NC/Tnd マウスでは週齢が増加するほど、皮膚 pH 恒常性維持機構が作用することで皮膚 pH が弱酸性化した。Conv NC/Tnd マウスでは、アトピー性皮膚炎の症状が発現する 7 週齢からバリア機能の低下を示す TEWL の増加と共に皮膚表面の pH 上昇が観察された。これは、皮膚 pH の上昇と皮膚バリア損傷の関連性が予想される。

2009 年、Briot ら (Briot et al., 2009) は、抑制されない KLK5 が複数のサイトカイン、特に TSLP の産生を誘導して炎症反応を誘発すると報告した。私は皮膚 pH の上昇が皮膚内に存在するセリンプロテアーゼである KLK5 を活性化させ PAR2、TSLP を増加させることではないか仮説を立てた。それで、検討した結果、進行した皮膚炎を有する 12 週齢の Conv NC/Tnd マウスの表皮では同じ週齢の SPF NC/Tnd マウスより KLK5、PAR2、TSLP のタンパク質の量が有意に増加した。しかし、KLK5 の内因性抑制因子である LEKTI はタンパク質の量には変化がなかった。

この結果から、Conv NC/Tnd マウスで観察された皮膚 pH の上昇が KLK5 タン

パク質の発現増加を引き起こし、それにもなって PAR2 の活性化と TSLP の産生を誘発したのではないかと推測できる。また、マウスの皮膚炎の発症および症状の進行にもなってこれらの一連の変化が認められたことから、KLK5 の発現増加や PAR2 の活性化、TSLP 産生が皮膚バリアの損傷と関連すると考えられる。

[5] 小括

健康な人の皮膚表面 pH は、4.5–5.5 で弱酸性を呈しており、このような皮膚の弱酸性化の維持は、皮膚透過障壁の維持と皮膚の堅牢性を強化し、抗菌作用に非常に重要な役割を担う。通常の飼育環境で維持した Conv NC/Tnd マウスでは、アトピー性皮膚炎の症状が発現する 7 週齢から皮膚バリアの機能不全を示唆する TEWL の増加と皮膚表面の pH 上昇が観察された。これは、NC/Tnd マウスがアトピー性皮膚炎の動物モデルとして皮膚バリアの損傷と皮膚 pH の上昇を伴うことを示唆している。

一方、角質層の構成要素であるフィラグリンは、皮膚の保湿と弱酸性の維持に働くことから、その機能異常はアトピー性皮膚炎の重要な危険因子のひとつと考えられているが、NC/Tnd マウスでは皮膚炎症状の発現に伴い、フィラグリンのタンパク質とその分解産物が有意に増加した。この結果から NC/Tnd マウスはフィラグリン欠損マウスではないため、ワイルドタイプのアトピー性皮膚炎患者と同様に、皮膚バリア損傷に対して代償的作用がはたらいたためではないかと推測される。

次は、皮膚の pH 上昇と関連する皮膚バリアの損傷原因について検討した。皮膚に存在するセリンプロテアーゼは、中性-アルカリ性の環境で高い活性化を有し、ケラチノサイトを結合するコルネオデスマソームを分解して、皮膚の堅牢性を悪化させる。さらに、セリンプロテアーゼの一つである KLK5 のトランジェニックマウスモデルでは TEWL の増加と炎症反応が発現された (Furio et al., 2014)。また、KLK5 によってケラチノサイトから TSLP を分泌する (Briot et al., 2009)。

中等度の臨床症状を有する 12 週齢の Conv NC/Tnd マウスの表皮では KLK5、PAR2、TSLP のタンパク質量が有意に増加し、その局在も角質層のみならず、顆粒層にまで広く発現していることが観察された。KLK5 は、中性からアルカリ

性領域に至適 pH を有するタンパク質分解酵素であることから、皮膚 pH の上昇にともなって KLK5 の活性増加だけではなくタンパク質量の増加と、KLK5 を介した PAR2 の活性化、TSLP の産生増加が惹起されると考えられた。この仮説の検証は 3 章で行う。また、アトピー性皮膚炎患者で認められる皮膚バリアの損傷に KLK5、PAR2、TSLP 活性化が関与する可能性が示唆された。

II 章 モデルマウスを用いた皮膚の弱酸性 pH 維持による

アトピー性皮膚炎の治療効果

[1] 序論

哺乳類の正常な角質層は、弱酸性 (pH4.5–5.5) に保たれている。これは、透過障壁の維持 (Hachem et al., 2003) や、角質層の付着力の強化 (Hachem et al., 2003)、細菌感染に対する防御作用 (Elias, 2007)、サイトカインの活性化 (Hachem et al., 2010) を調節する上で重要である。一方、皮膚表面の pH は新生児、高齢者で高く、また炎症反応によっても上昇することが知られている。皮膚表面の弱酸性 pH の維持には、NHE1、sPLA₂、フィラグリン分解産物などの内因性因子と皮脂腺、汗腺から分泌のする外因性因子が関与している (Fluhr et al., 2001; 2004b; Behne et al., 2001; Kezic et al., 2009; Murota et al., 2014; Kim et al., 2006)。

アトピー性皮膚炎患者の 90%以上で、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等による二次的な細菌感染症が認められ (Ong et al., 2002)、アレルギー感作反応や炎症反応を悪化させる。このような病原性細菌の感染を防御するために、皮膚は抗菌ペプチドを生産する。分泌性抗菌ペプチドのひとつである cathelicidin LL-37 は、皮膚の弱酸性化維持にも関与する (Reinholz et al., 2012)。すなわち、アトピー性皮膚炎患者で認められる cathelicidin LL-37 の減少は病原性細菌に対する抵抗性を減少させるだけでなく、皮膚表面の pH 上昇を招き、細菌が繁殖しやすい中性の環境を形成する。これによって皮膚の pH が維持できなくなると病原性細菌の繁殖を誘発し、二次的細菌感染を惹起する。また、細菌感染によって作り出される内毒素は、かゆみ物質や細菌毒素に対する特異的 IgE (enterotoxin-specific IgE) の産生を惹起し、免疫学的異常を誘発する。

皮膚が損傷を受けると、修復のためグルコセレブロシド加水分解酵素であるベタ-グルコセレブロシダーゼ (β -glucocerebrosidase) や、スフィンゴミエリン

(sphingomyelin) を加水分解してセラミドを産生する酸性スフィンゴミエリナーゼ (acidic sphingomyelinase) のような脂質生産酵素を増加させるとともに、層板顆粒 (lamellar body) の分泌を促進させ、セラミドの合成量を増加させる (Holleran et al., 1991)。セラミド生産に関与するベタ-グルコセレブロシダーゼやスフィンゴミエリナーゼは、皮膚の pH に対して鋭敏に反応する。これらの酵素はそれぞれグルコシルセラミド (Glucosylceramide)、スフィンゴミエリンを分解してセラミドを生成するが、至適 pH が弱酸性 (pH 5) であることから、pH が上昇するほどその活性は低下する。実際に、アトピー性皮膚炎患者の皮膚ではセラミドが減少しているが (Chamlin et al., 2002)、これは、皮膚 pH がセラミド生産を介して皮膚バリアの回復に関与していることを意味する。また、ヒトとマウスを用いて、粘着テープの接着・剥離によって急性の皮膚バリア損傷モデルを作成した時、皮膚の pH を正常角質層程度の pH に下げた場合、皮膚バリアの回復力が増強することが報告されている (Hachem et al., 2010)。

ポリヒドロキシル酸 (Polyhydroxyl acid, PHA) は皮膚の弱酸性を維持する実験に主に使われる物質として分子量が大きいことで、皮膚の浸透力が弱く、皮膚に対する副作用が少ないことが知られている。この PHA を急性皮膚損傷マウスモデルの皮膚に塗布したところ、角質層の酸性化や、皮膚の構造・機能に対する増強効果が認められた (Hachem et al., 2010)。また、接触性刺激性皮膚炎マウスモデルでも、PHA の塗布により皮膚 pH の正常化やバリア機能の強化が認められた (Hatano et al., 2009)。これをもとに、本章では PHA のひとつであるラクトビオン酸 (lactobionic acid, LBA) を使用し、皮膚 pH と皮膚バリア損傷後の回復力について、NC/Tnd マウスを用いて詳細に解析した。LBA は、主に角質除去剤として化粧品に使用され、皮膚に対する刺激性はほとんどないことが知られている。

I 章において皮膚炎の発症とともに皮膚 pH の上昇が認められた conv NC/Tnd マウスに LBA を塗布して皮膚表面の pH を弱酸性に復帰させた場合の、

皮膚バリアの回復力と炎症反応の緩和について検討した。また、皮膚の酸性化に関与する分子的メカニズムについても検討した。

[2] LBA 塗布による皮膚表面の pH、表皮水分蒸散量、臨床症状の変化

1) 材料および方法

1. 試薬の調整

LBA (Wako, Osaka, Japan) を蒸留水で希釈し、2.5%および5%の LBA 溶液を作成した。LBA 溶液の pH は、それぞれ 2.5% LBA 溶液が pH 2.8、5%LBA 溶液が pH 2.6 であった。また、陰性対照として 5% LBA 溶液に NaOH 加え pH 7.0 に調整した中和 LBA (neutralized 5% LBA, nLBA) を使用した。

2. 塗布実験

実験には、中等度の皮膚炎症状を示す 12 週齢の Conv NC/Tnd マウスを使用した。各群 5-6 頭のマウスの後背部の被毛を除去した後、5-6 cm² の範囲に蒸留水、2.5%、5% LBA 溶液、nLBA 溶液をそれぞれ 100 μL ずつ塗布した。塗布の回数は 1 日 2 回、期間は 2 週間とした。

3. TEWL および皮膚 pH の測定

皮膚のバリア機能を評価するため、LBA 塗布部位の TEWL を測定した。測定 30 分前に、マウスを恒温恒湿室（温度 23 ± 1°C、相対湿度 40 ± 10%）に移動させ順化させた後、既述の方法により TEWL を測定した。また、LBA 塗布部位の皮膚 pH もマウス恒温恒湿室で順化させたのち、既述した方法にしたがって測定した。

4. 臨床症状の評価

皮膚炎の重症度は、臨床症状により評価した。アトピー性皮膚炎に特徴的な 5 つの臨床症状であるかゆみ、発赤・出血、浮腫、擦過傷・糜爛、乾燥・フケの 5 つの項目について、0 点（なし）から 3 点（非常に強い）の 4 段階で評価し、その総和を算出した (Matsuda et al., 1997)。

5. 擦過行動の測定

皮膚炎によって生じるかゆみの程度を定量化するため、NC/Tnd マウスの擦過行動を測定した。測定 30 分前に、マウスを測定に使用する不透明な四角形の箱に入れ順化させた。その後、30 分間に認められる擦過行動の回数と擦過時間を SCLABA-Real system (Noveltec Inc., Kobe, Japan) を用いて測定した (Ishii et al., 2008)。

6. 統計学的解析

統計学的有意差判定は、一元分散分析法および多重比較法を用いた。一元分散分析は、独立変数を LBA の塗布、従属変数を同一の期間での皮膚表面の pH、経皮水分蒸発量、肉眼的臨床症状の評価、擦過行動の回数と時間として、有意差の判定は F 境界値を用い、分散比 $F > F(1 - \alpha)$ のとき危険率 $\alpha = 0.05$ を有意な差とした。また、多重比較法としては Tukey 法を使用し、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

2) 結果

図 11 に、LBA 塗布による pH と TEWL の変化を示した。蒸留水(図中 Vehicle) もしくは nLBA を塗布した対照群では、皮膚表面はおよそ pH 6.5 に保たれ、塗布による有意な変化は認められなかった。一方、2.5% LBA を塗布した群では pH 5.3 まで、5% LBA 群では pH 4.7 まで皮膚表面の pH が低下したことから、LBA 塗布による皮膚の弱酸性化が確認された (図 11A)。このとき、対照群と LBA 塗布群で TEWL を比較すると、2.5%および 5% LBA 塗布群では皮膚 pH が弱酸性維持されると同時に TEWL も減少した。一方、蒸留水もしくは nLBA と塗布した対照群では TEWL に顕著な変化は認められなかった (図 11B)。

図 12A に、肉眼的臨床症状の変化を示した。臨床スコア 11-12 に相当する中等度の皮膚炎症状を呈する Conv NC/Tnd マウスに 2.5%、5% LBA を塗布したところ、皮膚炎症状は徐々に緩和し、2.5% LBA 塗布群ではスコア 7 まで、5% LBA

塗布群ではスコア 7.5 まで臨床症状が改善した。しかしながら、蒸留水もしくは nLBA を塗布した対照群では、その臨床症状に大きな変化は認められなかった (図 12A)。図 12B には、2 週間の塗布実験終了時点における各群の典型的な皮膚炎症状を示した。蒸留水もしくは nLBA 塗布群では皮膚の発赤と出血、引っ掻き行動による擦過傷や糜爛、皮膚の乾燥など重度の臨床症状が観察されるのに対し、2.5%および 5% LBA 塗布群では、対照群と比較して軽度の皮膚炎症状であることが肉眼的に確認できた (図 12B)。

図 13 には擦過行動の変化を示した。アトピー性皮膚炎の重要な症状の一つであるかゆみが引き起こす擦過行動の回数と時間を、SCLABA-Real system を用いて、30 分間測定した。蒸留水もしくは nLBA を塗布した二つの対照群では、擦過行動に顕著な変化は認められなかったのに対して、2.5%および 5% LBA を塗布した群では擦過行動の回数と時間が有意に減少した (図 13A および図 13B)。

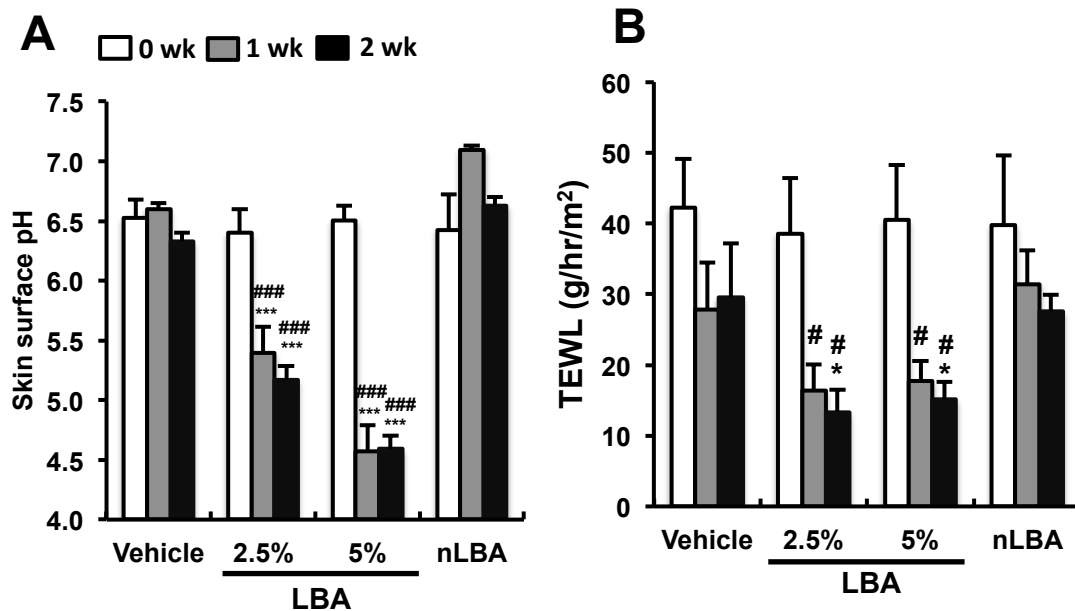


図 11 LBA 塗布による Conv NC/Tnd マウスの皮膚 pH と TEWL の変化
 中等度の皮膚炎症状を呈する Conv NC/Tnd マウスの後背部の皮膚に LBA を塗布した後、皮膚表面の pH (A) と TEWL (B) を測定した。測定には、各群当たり 5-6 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。* は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、# は nLBA 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、**、### は危険率 $p < 0.01$ を、***、#### は危険率 $p < 0.001$ を示す。

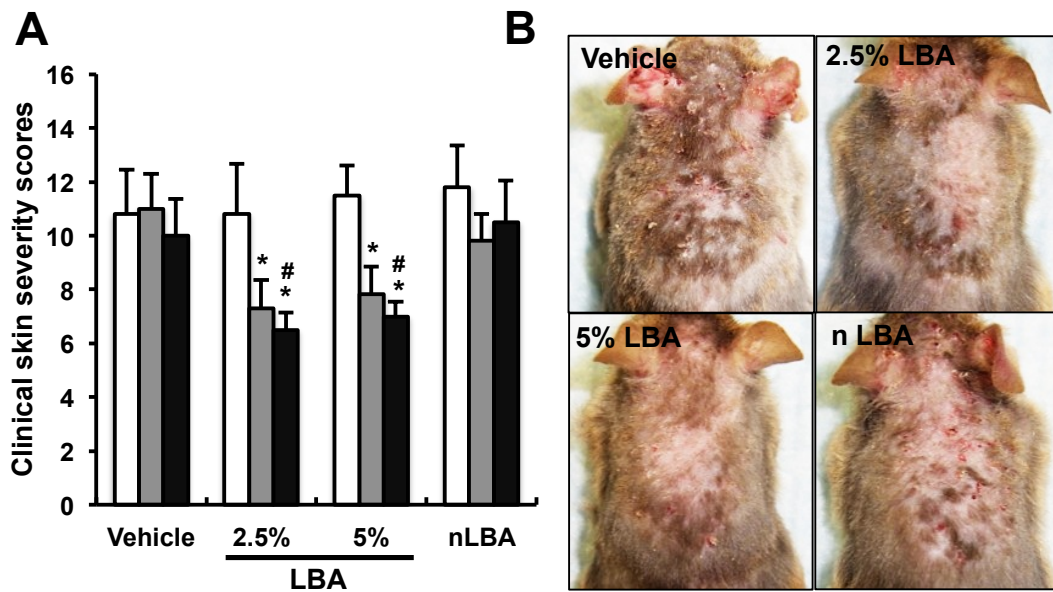


図 12 LBA 塗布による Conv NC/Tnd マウスの皮膚炎臨床症状の変化

中等度の臨床症状を有する Conv NC/Tnd マウスの後背部皮膚に LBA を塗布し、皮膚炎症状の変化を肉眼的に評価した (A)。実験には、各群当たり 5-6 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、#は nLBA 塗布群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を表す。また、塗布実験開始後 2 週間の時点における、各群の典型的な皮膚炎症状を示す (B)。

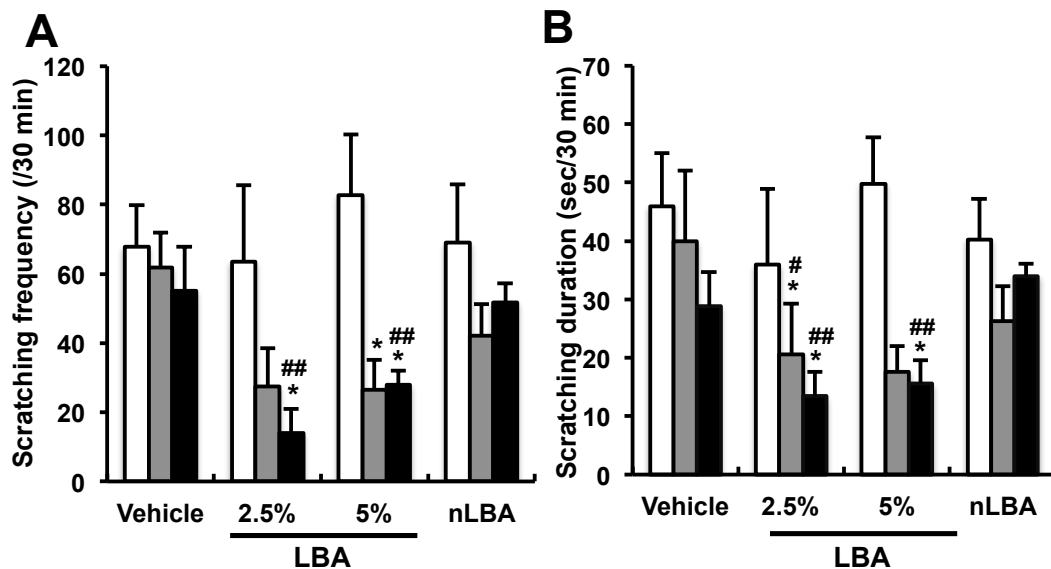


図 13 LBA 塗布による Conv NC/Tnd マウスの擦過行動の変化

中等度の臨床症状を呈する Conv NC/Tnd マウスの後背部皮膚に LBA を塗布し、擦過行動の回数 (A) ならびに擦過時間 (B) を測定した。実験には、各群当たり 5-6 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。

*は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、#は nLBA 群と比較して危険率 $p < 0.05$ を示す。また、##は危険率 $p < 0.01$ を示す。

3) 考察

角質層が弱酸性の pH に保たれていることは、様々な皮膚の生理機能に関与することから (Hachem et al., 2005; 2010)、皮膚 pH の上昇は、皮膚バリアが障害された際の回復力を低下させるという報告がある。I 章で、アトピー性皮膚炎を発症した Conv NC/Tnd マウスでは皮膚バリアの損傷を示唆する TEWL の増加のみならず、皮膚 pH の上昇や表皮における KLK5、PAR2、ならびに TSLP タンパク質レベルの亢進が認められることを明らかにした。

本項では、皮膚炎の発症に伴って上昇した Conv NC/Tnd マウスを用いて、皮膚の弱酸性化を維持による皮膚バリアの回復、病変の肉眼的変化、そして臨床症状の改善を検討した。皮膚の弱酸性化の維持のために 2.5%および 5%LBA を使用しており、これに対する対照群には蒸留水を塗布した Vehicle 群と中性 5%LBA を塗布した nLBA 群を比較した。その結果、皮膚 pH は 1 日 2 回 LBA 塗布によって弱酸性を維持し、TEWL が有意に減少し、肉眼的臨床スコアも改善された。特に皮膚の乾燥症状が顕著に緩和された。そして、アトピー性皮膚炎で重要な症状中の 1 つであるかゆみによる擦過行動が減少した。かゆみは、アトピー性皮膚炎患者で深刻なストレスであり、生活の質を低下させるもっとも重要な症状である。かゆみによる擦過行動は皮膚への物理的刺激を与え、皮膚のバリア機能をさらに低下させる。本項で得られた結果から、アトピー性皮膚炎に対する皮膚の弱酸性化は、皮膚バリアを回復させ、臨床症状を緩和させることが明らかとなって。次項では、これに関与するメカニズムを分析し、組織学的評価を行った。

[3] 弱酸性の pH 維持による皮膚炎緩和のメカニズム

1) 材料および方法

1. ウェスタンブロッティング法

皮膚の弱酸性の pH 維持による皮膚炎緩和のメカニズムを明らかにするため、LBA を塗布した NC/Tnd マウスの表皮を用いて KLK5、LEKTI、および PAR2 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティング法で解析した。

前述した方法で、各群のマウスの表皮を分離し、試料を調整した。12%のポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories) を用いて電気泳動により試料を展開して Immobilon-P PVDF 膜 (Millipore) に転写した。非特異的反応の出現を防ぐために 5% スキムミルク (Wako) を含む 20 mM TBS に 60 分間浸漬した後、各種一次抗体を添加し 4°C で一晩反応させた。0.05% Tween-20 を含む TBS で洗浄した後、HRP で標識された二次抗体を添加し室温で 45 分間反応させた。再び TBS で洗浄した後、発色基質 Immobilon western detection reagents (Millipore) を作用させ、ImageQuant LAS4000 を用いて可視化した。一次抗体は、ウサギ抗 KLK5 ポリクローナル抗体 (abcam)、ウサギ抗 LEKTI ポリクローナル抗体、マウス抗 PAR2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。二次抗体は、一次抗体の動物種にあわせて HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体もしくは HRP 標識抗マウス IgG (Cell Signaling Technology) を使用し、希釈濃度は各項目の添付書類に従った。

2. 組織学的評価と免疫組織化学法

特殊染色法および免疫組織化学法を用いて、酸性化した皮膚を組織学的に評価した。LBA を塗布した Conv NC/Tnd マウスから採取した皮膚を 10% の中性ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋した。厚さ 4 μm で薄切した組織をスライドガラスに接着させ、キシレンで脱パラフィン処理した。皮膚組織中に存在

する肥満細胞および好酸球を特異的に染色するため、それぞれトルイジンブルー染色液 (pH 4)、コンゴレッド染色液を使用した。染色した皮膚組織を倍率 200 倍の顕微鏡下で観察し、無作為に選択した 4 視野内の肥満細胞もしくは好酸球の個数を元に平均値を算出して、その個体における細胞数とした。

免疫組織化学法は、既述した方法にしたがって実施した。一次抗体は、ウサギ抗 KLK5 ポリクローナル抗体、ウサギ抗 LEKTI ポリクローナル抗体、マウス抗 PAR2 モノクローナル抗体、ヤギ抗 TSLP ポリクローナル抗体を使用した。二次抗体は、一次抗体の動物種に合わせて、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体、またはビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体を用い、希釈濃度は各抗体の添付書類に従った。

3. ELISA

皮膚の酸性化に伴う TSLP 産生量の変化を評価するため、ELISA を実施した。LBA を塗布した Conv NC/Tnd マウスの皮膚組織を採取し、5 mM EDTA を添加した 50°C の PBS に 2 分間浸漬して表皮と真皮を分離した。氷温の PBS で洗浄後、分離した表皮にタンパク質分解酵素を添加した CellLytic MT reagent を加えて破碎した。不溶性分画を除去するため、破碎液を遠心分離し、得られた上清を試料とした。BCA Protein assay 法で試料のタンパク質濃度を定量し、同一濃度となるように CellLytic MT reagent で希釈した。Mouse TSLP ELISA MAX Deluxe Kit を用い、添付書類にしたがって試料中の TSLP 量を測定した。

4. リアルタイム Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

皮膚の酸性化による炎症性サイトカインの発現変化をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検出した。LBA を塗布した Conv NC/Tnd マウスの皮膚を採取し、液体窒素で即座に凍結させた。マルチビーズショッカー (Yasui Kikai Co., Osaka, Japan) を用いて、凍結皮膚組織を破碎した後、Isogen (Nippogene) を用いて全 RNA を抽出した。PrimeScript 1st strand cDNA synthesis キット (TAKARA BIO) を用いて、逆転写反応により 1 µg の全 RNA から相補的 DNA (complementary DNA,

cDNA) を合成した。得られた cDNA に、特異的プライマーと核酸染色薬 SYBR green があらかじめ添加された DNA ポリメラーゼ、SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA BIO) を添加し、PCR 条件 (50°C で 2 分間、95°C で 10 分間、95°C で 15 秒、60°C で 1 分間) を 40 回繰り返す、DNA の増幅を行った。使用したプライマーは表 1 の通りである。

ABI Prism7000 Sequence Detector (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いて DNA 増幅に伴う SYBR green の蛍光強度を継時的に計測した。サイクル比較法を用いて、検出された蛍光強度から β -actin の mRNA 発現量に対する各遺伝子の相対的 mRNA 発現量を算出した。実験は 3 回行い、その平均値を図 19 に示した。

5. 統計学的解析

統計学的有意差判定は、一元分散分析法および多重比較法を用いた。一元分散分析は、独立変数を LBA の塗布、従属変数をウェスタンブロッティング法による KLK5、PAR2、LEKTI タンパク質の相対的発現強度、ELISA 法による TSLP 発現量、皮膚に浸潤した肥満細胞と好酸球の数、炎症性サイトカインの mRNA の発現とした。有意差の判定は F 境界値を用い、分散比 $F > F(1 - \alpha)$ のとき危険率 $\alpha = 0.05$ を有意な差とした。また、多重比較法としては Tukey 法を使用し、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

2) 結果

まず、皮膚を弱酸性に復帰させることで KLK5、LEKTI、PAR2、TSLP のタンパク質量にどのような影響を与えるかを確認した。表皮組織での KLK5 タンパク質量を検出した結果、2.5%および 5%LBA 塗布によってタンパク質量が有意に減少することを確認した (図 14A)。また、免疫染色で局在を調べると、二つの対照群では顆粒層まで KLK5 の陽性反応が認められた。一方で、2.5%および 5%LBA 塗布群では、その陽性反応は減弱し角質層に限定されていた (図

14B)。一方、KLK5 の内因性抑制因子である LEKT は、LBA 塗布によってタンパク質の量および局在ともに大きな変化は認められなかった (図 15A および図 15B)。また、PAR2 のタンパク質のレベルをウェスタンブロッティング法で確認した結果、LBA 塗布によって、その量が減少した (図 16A)。その局在も二つの対照群では広い範囲に陽性反応が認められたのに対して、LBA 群ではその陽性反応が制限されていた (図 16B)。同様に、TSLP の産生も LBA 塗布によって減少し、その局在も限定的となっていた (図 17)。

続いて、皮膚組織での炎症反応の変化を評価するため、肥満細胞および好酸球数を、それぞれトルイジンブルー染色法とコンゴレッド染色法で調べたところ、肥満細胞数および好酸球数は 2.5% および 5% LBA 塗布群で有意に減少していた (図 18A, B)。また、リアルタイム RT-PCR を用いた炎症性サイトカインの発現解析では、ケラチノサイトから分泌される炎症誘発性のサイトカインであるインターロイキン (Interleukin, IL) -33、初期炎症を誘導するサイトカインである IL-1 β 、Th2 炎症を誘導するサイトカインである IL-4、樹状細胞の遊走に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (Metalloproeinase-9, MMP-9)、および Th2 細胞から分泌され、かゆみに関連する IL-31 の有意な減少が確認された (図 19)。

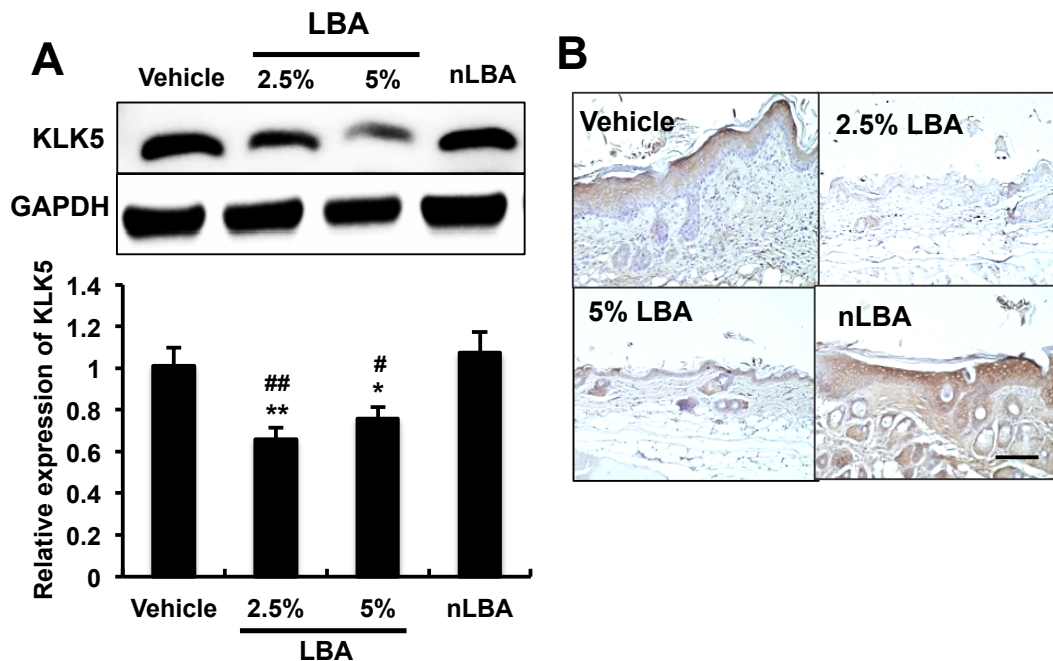


図 14 LBA 塗布による Conv NC/Tnd マウスの皮膚における KLK5 タンパク質量の変化

ウェスタンブロッティング法を用いて、LBA 塗布によって酸性化した表皮に発現する KLK5 タンパク質を検出した (A)。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒の枠線は、同一の膜で得られた結果を意味する。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を表す。*は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、#は nLBA 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を意味する。**、##は危険率 $p < 0.01$ を示す。また、免疫組織化学法を用いて、LBA 塗布による KLK5 タンパク質の領域変化を確認した (B)。バーは 100 μm を示す。

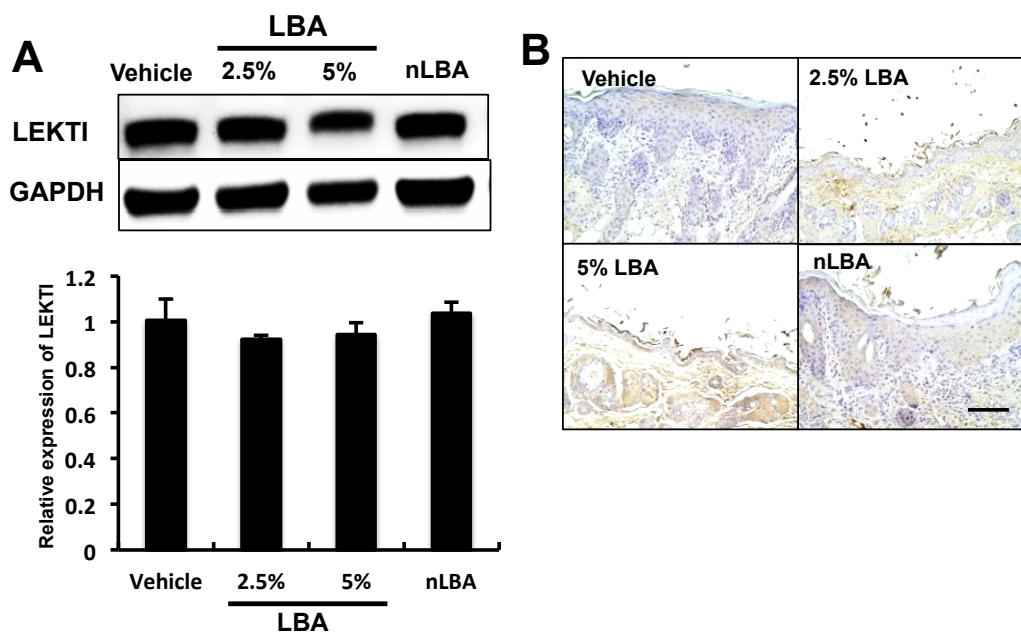


図 15 LBA 塗布による Conv NC/Tnd マウスの皮膚における LEKTI タンパク質の量の変化

ウェスタンブロッティング法を用いて、皮膚の酸性化に伴う LEKTI タンパク質のレベルの変化を検出した (A)。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒の枠線は、同じ膜で得られた結果であることを意味する。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。また、免疫組織化学法を用いて、LBA 塗布による LEKTI タンパク質の領域変化を確認した (B)。バーは 100 μ m を示す。

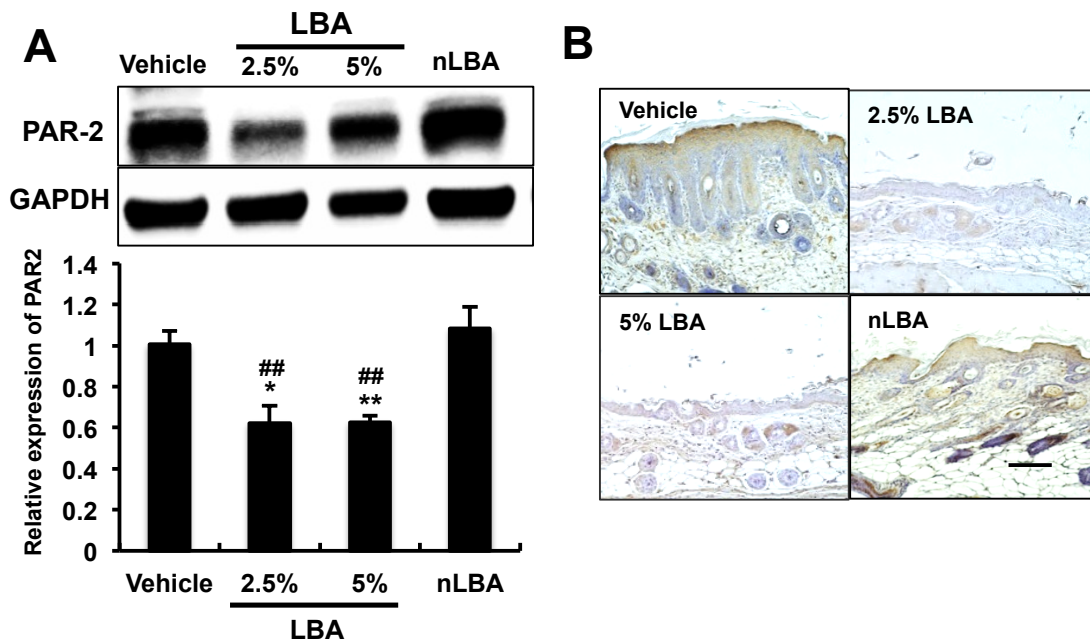


図16 LBA塗布によるConv NC/Tndマウスの皮膚におけるPAR2タンパク質量の変化

Conv NC/Tndマウスの皮膚を酸性化した際に生じるPAR2タンパク質の発現変化をウェスタンブロッティング法を用いて評価した(A)。写真は3回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒枠は同じ膜で得られた結果であることを意味する。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を表す。

*は蒸留水塗布群(図中Vehicle)と比較、#はnTMG群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。**、###は危険率 $p < 0.01$ を示す。また、免疫組織化学法を用いて、皮膚の酸性化に伴うPAR2タンパク質の局在の変化を検出した(B)。バーは100 μm を示す。

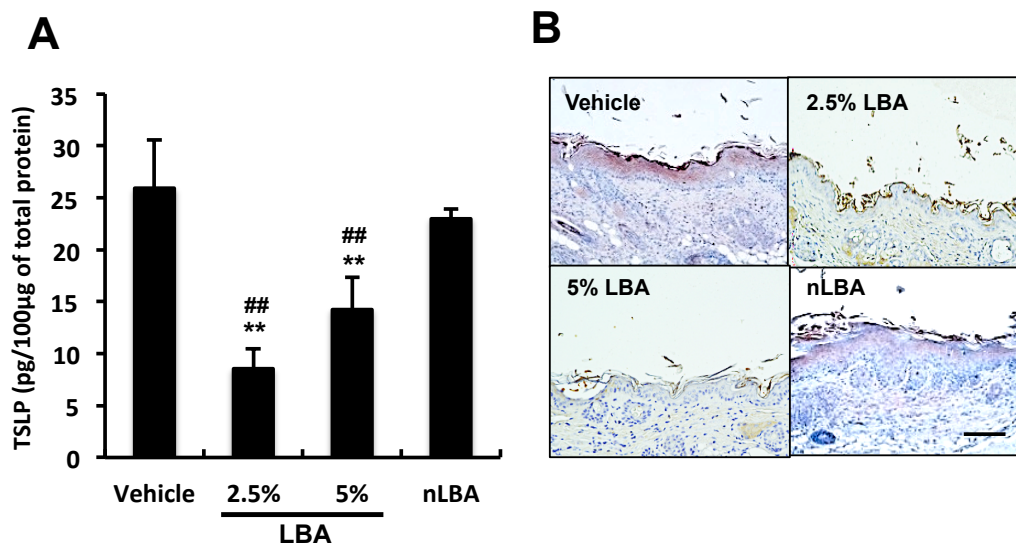


図 17 LBA 塗布による Conv NC/Tnd マウスの皮膚における TSLP タンパク質量の変化

ELISA を用いて、LBA を塗布した Conv NC/Tnd マウスの表皮に発現する TSLP タンパク質を定量した (A)。実験には、各群当り 4-5 頭のマウスを使用した。グラフは 100 µg タンパク質に該当する TSLP の濃度を示す。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。**は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、##は nLBA 群と比較して、危険率 $p < 0.01$ を示す。また、免疫組織化学法を用いて、皮膚の酸性化に伴う TSLP タンパク質の領域の変化を検出した (B)。バーは 100 µm を示す。

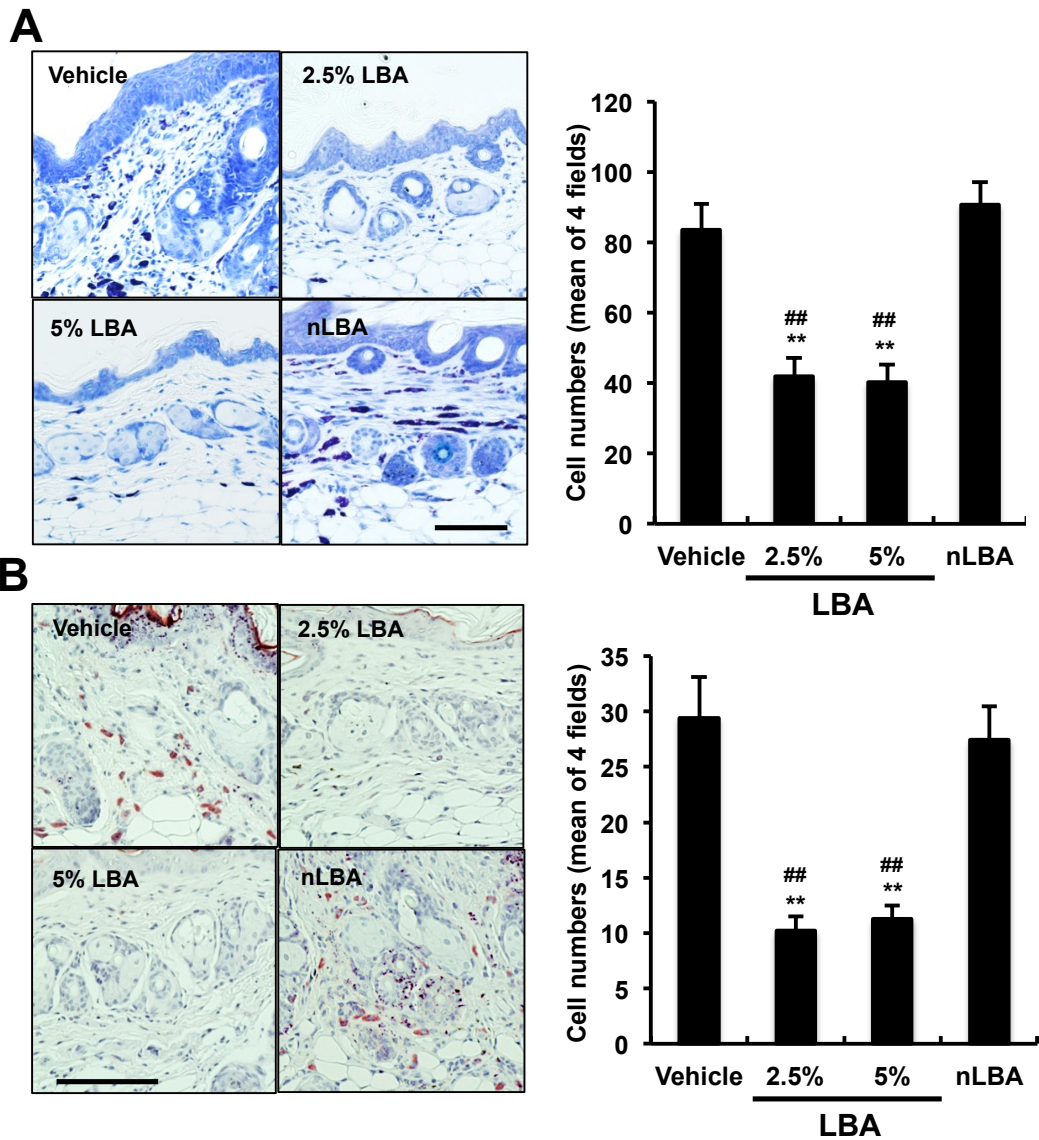


図 18 LBA 塗布による Conv NC/ Tnd マウスの皮膚における炎症性細胞の浸潤
 病変部における炎症性細胞浸潤の程度を評価するため、トルイジンブルー染色により肥満細胞を (A)、コンゴレッド染色により好酸球を (B) それぞれ特異的に検出した。実験には、各群あたり 4-5 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を表す。 **は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、##は nLBA 群と比較して、危険率 $p < 0.01$ を意味する。バーは 100 μm を示す。

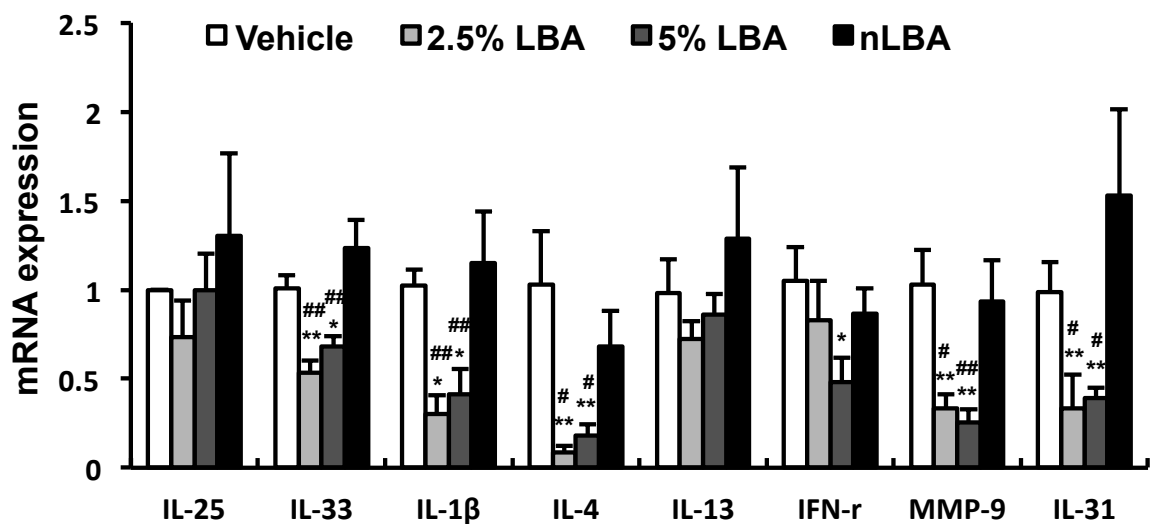


図 19 Conv NC/Tnd マウスの皮膚の酸性化に伴う炎症性サイトカインの発現変化

LBA 塗布によって酸性化した Conv NC/Tnd マウスの皮膚における炎症性サイトカインの mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 方法を用いて解析した。実験には、各群当り 4-5 頭のマウスを使用した。グラフのカラムは、蒸留水塗布群（図中 Vehicle）の mRNA 発現量に対する各群の相対的発現量を、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群と比較、#は nLBA 塗布群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、**、##は危険率 $p < 0.01$ を示す。

表 1 cDNA 増幅に使用したプライマー

Target cDNA	Forward sequence	Reverse sequence
Mouse Il-25	CTCAACAGCAGGGCCACTC	GTCTGTAGGCTGACGCAGTGTG
Mouse Il-33	GATGAGATGTCTCGGCTGCTTG	AGCCGTTACGGATATGGTGGTC
Mouse Il-1 β	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
Mouse Il-4	ACGGAGATGGATGTGCCAAAC	AGCACCTTGAAGCCCTACAGA
Mouse Il-13	CAATTGCAATGCCATCTACAGGAC	CGAAACAGTTGCTTTGTGTAGCTGA
Mouse Ifn- γ	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG
Mouse Mmp-9	GCCCTGGAACCTCACACGACA	TTGGAAACTCACACGCCAGAAG
Mouse Il-31	AAACAAGAGTCTCAGGATCTTTATAACAAC	ACGGCAGCTGTATTGATTTCGT
Mouse Tslp	CGAGCAAATCGAGGACTGTGAG	GCAGTGGTCATTGAGGGCTTC
Mouse β -actin	CATCCGTAAAGACCTCTAGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA

3) 考察

LBA の塗布による皮膚表面の pH を弱酸性に復帰させることで KLK5、PAR2、TSLP のタンパク質のレベルが有意に減少していることが明らかになった。同時に、これら因子の皮膚における発現範囲の縮小が認められた。KLK5 の活性化亢進による表皮の過度の剥離は外部因子の侵入や皮膚の水分蒸発を増加させる。また、PAR2 の活性化は未熟な層板顆粒の分泌を誘発し、皮膚の脂質形成に異常をもたらす (Hachem et al., 2006)。さらに、TSLP は Th2 炎症を惹起する最初のトリガーとして樹状細胞の遊走に関与するとともに、Th2 細胞の増殖と分化を誘発する (Watanabe et al., 2004; Omori and Ziegler, 2007; Rochman et al., 2007)。近年の Wilson ら (Wilson et al., 2013) の報告によると、TSLP は感覚神経に直接的に作用して、かゆみを誘発する作用がある。これは皮膚 pH の上昇が皮膚バリアの機能不全のみならず、炎症反応にも関与する可能性を示唆している。

本項では、皮膚炎を発症した Conv NC/Tnd マウスの皮膚を弱酸性化することで、損傷した皮膚バリアの回復と炎症反応の緩和が認められることを明らかにし、弱酸性化に伴い KLK5 の活性が低下することで、TSLP の産生が抑制され、かゆみや皮膚炎症状が緩和する可能性が示される。また、本項で得られた知見から、皮膚 pH の正常化がアトピー性皮膚炎の新規治療法となる可能性が示唆された。

[5] 小括

接着テープの接触と解離による急性皮膚バリアの損傷とハプテン誘導の接触性刺激性皮膚炎モデルでの皮膚 pH は正常マウスより有意に高い。Hachem ら (Hachem et al., 2009) と Hatano ら (Hatano et al., 2009) は、急性皮膚の損傷モデルと接触性刺激性皮膚炎モデルでの PHA 塗布による皮膚表面の弱酸性化の維持は皮膚バリアの回復力を上昇すると報告した。

本章では、皮膚炎の発症に伴って皮膚 pH が上昇した Conv NC/Tnd マウスを用いて、皮膚 pH の弱酸性化が皮膚バリアや炎症反応に与える影響について検討した。初めに、2.5% および 5% に希釈した LBA を、マウスの後背部の皮膚に塗布した。LBA の塗布によって皮膚の pH は弱酸性化 (およそ pH 4-5) に回復し、痛み等の副作用は観察されなかった。

皮膚の酸性化により、バリア機能の指標である TEWL が減少し、臨床症状の緩和が認められた。また、痒みによって誘発される擦過行動も有意に減少した。組織学的には、炎症細胞である肥満細胞や好酸球の浸潤が減少し、IL-33、IL-1 β 、IL-4、MMP-9 などの炎症性サイトカイン、ケモカインと痒み関連サイトカインである IL-31 の発現も有意に減少した。

皮膚の弱酸性化によって、表皮における KLK5、PAR2、TSLP の発現量も減少したことから、これらの分子の発現量低下が皮膚の炎症反応の緩和と皮膚バリアの回復に深く関与していると考えられる。もちろん、皮膚の弱酸性化によって弱酸性環境で活性が増加するセラミド生産酵素の機能上昇や酸性環境で生存、繁殖が困難な病原菌に対する殺菌効果が回復し、脂質の質が改善したことで、損傷した皮膚バリアが回復した可能性もある (Hachem et al., 2010; Reinholz et al., 2012)。しかし、今回、私は KLK5、PAR2、TSLP に着目して実験を行った。皮膚の弱酸性化は、KLK5 の発現亢進を抑制させることで、過剰な皮膚の剥離を防ぎ、同時に PAR2 や TSLP 活性を抑制することで、炎症反応を緩和した。

本項で得られた知見から、皮膚のバリア傷害に付随して上昇した皮膚 pH を正常化させると、皮膚のバリア機能回復や炎症反応の緩和を介して、アトピー性皮膚炎を改善させる可能性が示唆された

Ⅲ章 皮膚 pH の上昇によるアトピー性皮膚炎の誘発

[1] 序論

石鹼や洗剤などの過度な使用、生活用水の硬度、住環境中のチリダニや食品に含まれるアレルゲンに対する暴露など、環境的な要因とアトピー性皮膚炎の病因には強い因果関係がある (Colloff, 1992; Lack et al., 2003)。シャワー頻度の増加に伴って、石鹼を含む洗浄剤の使用量のみならず水の使用量が増加した (Cork et al., 2002)。また、住居の構造や生活様式の変化、すなわち暖房器具の使用による換気の低下や断熱材の使用などは、チリダニの生存に最適の環境を作り出す (Cork et al., 2002)。また、生活用水の硬度に関して、硬水を使用する地域では軟水を使用する地域より、アトピー性皮膚炎の発症率が高いと報告されている (McNally et al., 1998)。また、石鹼や洗剤の過度の使用は刺激性接触性皮膚炎を誘発する可能性があり、これはアトピー性皮膚炎の原因の一つと考えられている (Meding and Swanbeck, 1987)。すなわち、石鹼や洗剤との接触は角質細胞からの炎症誘発性サイトカインの分泌を惹起し (Wood et al., 1997)、経皮水分蒸散量を増加させ (Cowley and Farr, 1992)、結果として皮膚 pH を上昇させる可能性がある (Mucke et al., 1993)。これは、皮膚 pH の上昇と皮膚のバリア機能障害との因果関係を示唆する。

損傷された皮膚に中性の pH を示す溶媒を作用させると、皮膚バリアの回復が遅延する (Mauro et al., 1998)。また、皮膚 pH の調節に関与することが知られている NHE1 や sPLA₂ の機能を阻害もしくは遺伝子欠損させたマウスでは、透過障壁の恒常性維持が損傷され、角質層の抵抗性が弱体化した (Fluhr et al., 2001; Behne et al., 2001)。正常なマウスの角質層に非毒性の強塩基性物質を塗布した場合でも、同様の変化が認められた (Hachem et al., 2003; 2005)。さらに、新生児では皮膚の透過障壁が損傷を受けやすく、角質層は耐久性に乏しいことが知ら

れているが、これは、皮膚の pH 調節因子が未熟なことで、外部環境因子の影響から、容易に皮膚 pH が上昇すると考えられる。

角質層に存在するセリンプロテアーゼの活性化は、セラミド産生酵素であるベタ-グルコセレブロシダーゼや酸性スフィンゴミエリナーゼ、そして角質細胞同士を強固に連結させ、角質層の堅牢性維持に働くコルネオデスモゾームの分解を引き起こす (Hachem et al., 2005)。また、セリンプロテアーゼによる PAR2 の活性化は層板顆粒の分泌を減少させ、脂質の異常を誘発し、皮膚のバリア機能障害を増悪化させる (Hachem et al., 2006)。さらに、角質層におけるセリンプロテアーゼの活性化は、不活性型の IL-1 β 前駆体を活性型に転換させ、炎症反応を惹起する (Nylander-Lundqvist and Egelrud, 1997)。

本章では、人為的に皮膚の pH を上昇させたときの皮膚のバリア機能の変化と炎症反応の誘発とこれに関連する分子的メカニズムについて注目、解析を行った。

[2] テトラメチルグアニジン塗布による皮膚表面の pH、表皮水分蒸散量、 臨床症状の変化

1) 材料と方法

1. 試薬の製造

テトラメチルグアニジン (1,1,3,3-tetramethyl guanidine, TMG) にプロピレンとエタノールが 7 対 3 の割合で混合された溶媒 (pH 7) を加え、0.65% TMG 溶液を作成した (pH 13)。陰性対照として、0.65%TMG 溶液に HCl を加えて pH 7 に調整した中和 0.65% TMG (neutralized 0.65% TMG, nTMG) を作成した。

2. 塗布実験

実験には、7 週齢の皮膚炎を発症していない SPF NC/Tnd マウスを使用した。各群当たり 5-6 頭のマウスの後背部の被毛を除去し、5-6 cm² の範囲に蒸留水、0.65% TMG 溶液、0.65% nTMG 溶液をそれぞれ 1 日 2 回、4 週間塗布した。

3. TEWL および皮膚 pH の測定

皮膚バリア機能を測定するために、TMG 塗布部位の TEWL を Multi probe adapter (CK Electronic) を用いて測定した。測定 30 分前に、マウスを恒温恒湿室 (温度 23±1°C、相対湿度 40±10%) に移動させて順化させた。2-3%のイソフルランで吸入麻酔し、背部にプローブを軽く接触させて TEWL を測定した。測定は 3 回行い、その平均値を算出した。また、皮膚表面の pH は pH meter (HANNA Inc.) に接続されたガラスの表面電極 (HANNA Inc.) をマウス背中の皮膚表面に軽く接触させて測定した。TEWL と皮膚 pH の測定は一週間に 1 回行った。

4. 擦過行動の測定

塗布実験によって起こるかゆみを定量化するため、擦過行動を測定した。測定前に、マウスを測定に使用する不透明な四角形の箱に入れ、少なくとも 30 分

間順化させた。その後、30 分間に認められる擦過行動の回数と擦過時間を SCLABA-Real system (Noveltec Inc.) を用いて測定した。擦過行動の測定は、一週間に一度行った。

5. 組織学的評価と免疫組織化学法

TMG を 4 週間塗布したマウスを安楽殺したのち、塗布実験に使用した領域とは異なる部位の皮膚組織を採取した。10% の中性ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋した。厚さ 4 μm で薄切した組織をスライドガラスに接着させ、キシレンで脱パラフィン処理した。このスライドガラスを用いて、表皮の厚さを測定するためにヘマトキシリン・エオシン染色を、皮膚での肥満細胞の浸潤を評価するためにトリジンブルー (pH 4) 染色を実施した。表皮の肥厚は染色した皮膚組織を倍率 200 倍の顕微鏡下で観察し、無作為に選択した 5 箇所の上皮の厚さを計測しその平均を算出して、その個体における計測値とした。皮膚での肥満細胞の浸潤は倍率 200 倍の顕微鏡下で無作為に選択した視野内に認められる肥満細胞数を計測して評価した。一個体あたり無作為に 4 視野選択し、その平均細胞数をその個体における測定値とした。

6. リアルタイム RT-PCR 法

炎症性サイトカインの発現変化を評価するため、リアルタイム RT-PCR 法を実施した。TMG を塗布したマウスの皮膚を採取し、液体窒素で即座に凍結させた。マルチビーズショッカー (Yasui Kika) を用いて皮膚組織を破碎し、Isogen (Nippongene) を添加して全 RNA を抽出した。PrimeScript 1st strand cDNA synthesis キットを用いて逆転写反応を行い、全 RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA に IL-25、IL-33、IL-13、インターフェロンガンマ (Interferon-gamma、IFN- γ)、MMP-9、IL-31 および内在性対照である β -actin の特異的プライマー、SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA BIO) を用い、PCR 条件 (50°C で 2 分間、95°C で 10 分間、95°C で 15 秒、60°C で 1 分間) を 40 回繰り返す、目的とする DNA の増幅を行った。使用したプライマーは表 2 の通りである。

ABI Prism7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて DNA 増幅に伴う SYBR green の蛍光強度を継時的に計測した。サイクル比較法を用いて、検出された蛍光強度から β -actin の mRNA 発現量に対する各サイトカインの相対的 mRNA 発現量を算出した。実験は 3 回行い、その平均値を測定値とした。

7. 統計学的解析

統計学的有意差判定は、一元分散分析法および多重比較法を用いた。一元分散分析は、独立変数を TMG の塗布、従属変数を同一の期間での皮膚表面の pH、経皮水分蒸発量、擦過行動の回数と時間、炎症性サイトカインの mRNA の発現、皮膚で浸潤した肥満細胞、好酸球数として、有意差の判定は F 境界値を用い、分散比 $F > F(1 - \alpha)$ のとき危険率 $\alpha = 0.05$ を有意な差とした。また、多重比較法としては Tukey 法を使用し、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

2) 結果

図 20、21 に、TMG 塗布による SPF NC/Tnd マウスと C57BL/6 マウスの皮膚表面の pH と TEWL の変化を示した。蒸留水 (図中 Vehicle) もしくは nTMG を塗布した対照群では、皮膚 pH と TEWL の有意な変化は認められなかった。一方、TMG を塗布した群では皮膚 pH の有意な上昇と、TEWL の経時的な増加が観察された (図 20 および図 21)。

SPF NC/Tnd マウスでは TMG 塗布によって皮膚 pH は 8.4 以上に上昇するのに対して、C57BL/6 マウスでは TMG 塗布による pH の上昇は緩やかで pH 7.6 程度であった (図 21A)。さらに、TEWL のレベルでも TMG を塗布した C57BL/6 マウスより SPF NC/Tnd マウスでもっと大きいな変化があった (図 21B)。

続いて、図 22、23 には TMG 塗布にともなう SPF NC/Tnd マウスと C57BL/6 マウスの擦過行動の変化を示した。30 分間の擦過行動の回数と時間を測定した結果、SPF NC/Tnd マウスは塗布期間が続くほど、擦過行動の回数と時間が有意

に増加した（図 22A および図 22B）。しかし、C57BL/6 マウスでは有意な変化が見られなかった（図 23A および図 23B）。

図 24 に SPF NC/Tnd マウスの皮膚における炎症性サイトカイン、ケモカイン mRNA の平均相対発現量を示した。ケラチノサイトで発現する Th2 反応誘発性サイトカインである IL-25、IL-33 と炎症誘発性サイトカインである IL-1 β 、Th2 サイトカインである IL-4、IL-13、Th1 サイトカインである IFN- γ 、樹状細胞の移動に関与する MMP-9、および Th2 細胞から分泌され、かゆみを誘発する IL-31 の発現変化を測定したところ、IL-25 を除くサイトカインで TMG 塗布による有意な mRNA の発現量増加が認められた（図 24）。

最後に、組織学的評価を図 25、26 に示す。ヘマトキシリン・エオシン染色の結果から、TMG を塗布した SPF NC/Tnd マウスの皮膚における炎症細胞の浸潤と上皮の肥厚を確認した。また、トルイジンブルー染色の結果から TMG 塗布部位に対する肥満細胞浸潤の有意な増加が認められた（図 25A および図 25B）。一方、C57BL/6 マウスでは TMG 塗布による顕著な組織学的変化は観察されなかった（図 26A および図 26B）。

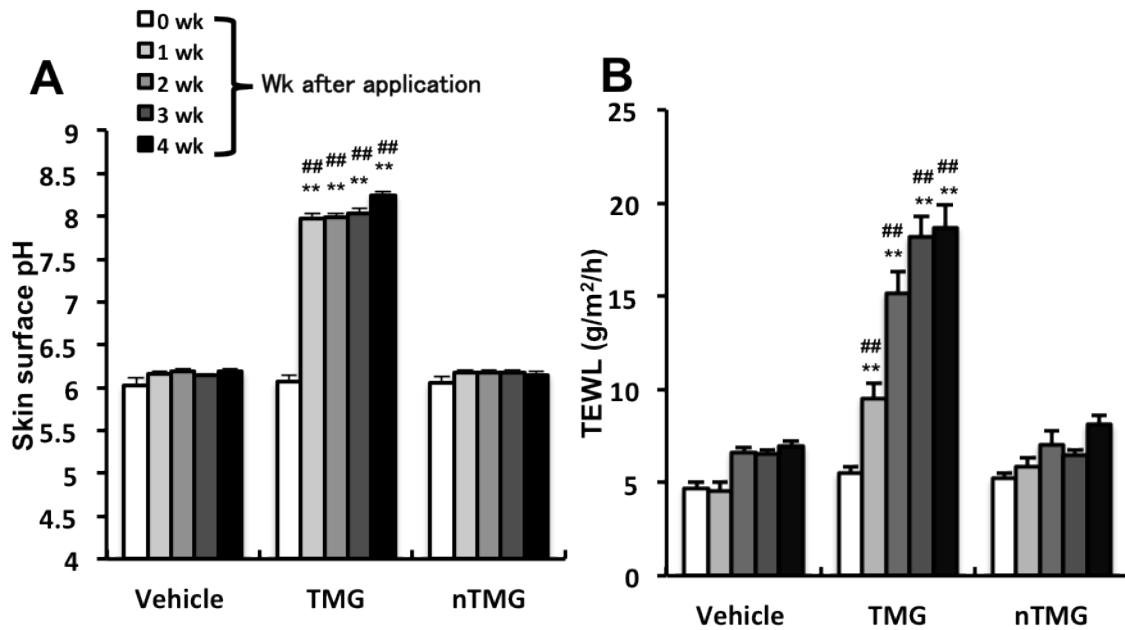


図 20 TMG 塗布による SPF NC/Tnd マウスの皮膚表面の pH と TEWL の変化
皮膚炎を発症していない7週齢の SPF NC/Tnd マウスの後背部皮膚に蒸留水(図中 Vehicle)、TMG、nTMG を4週間塗布するうち、皮膚表面の pH (A)と TEWL (B) の変化を測定した。実験には、各群当たり 5-6 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群と比較、#は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、**、###は危険率 $p < 0.01$ を示す。

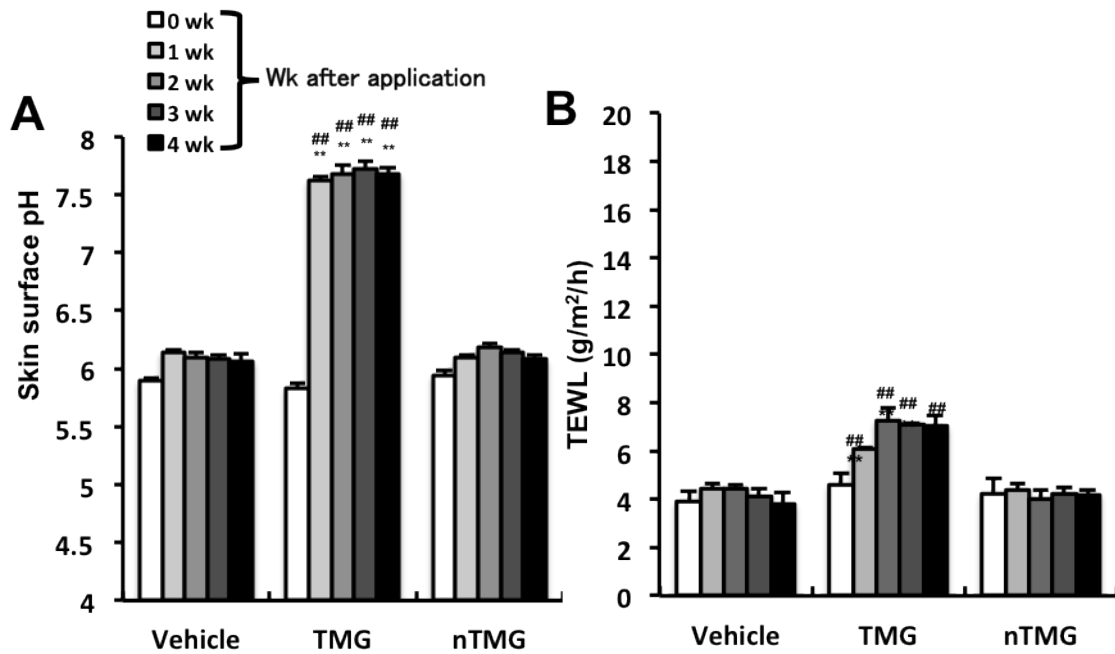


図 21 TMG 塗布による C57BL/6 マウスの皮膚表面の pH と TEWL の変化

7 週齢の C57BL/6 マウスの後背部皮膚に蒸留水 (図中 Vehicle)、TMG、nTMG を 4 週間塗布するうち、皮膚表面の pH (A) と TEWL (B) の変化を測定した。実験には、各群当たり 5-6 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群と比較して、#は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を表す。また、**、###は危険率 $p < 0.01$ を表す。

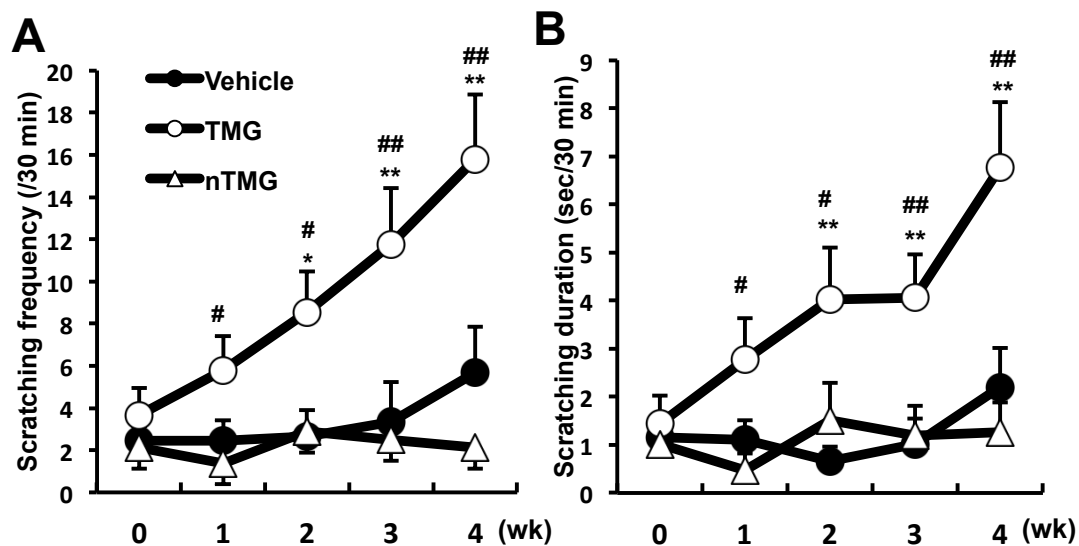


図 22 TMG 塗布による SPF NC/Tnd マウスの擦過行動の変化

皮膚炎を発症していない7週齢の SPF NC/ Tnd マウスの後背部皮膚に蒸留水(図中 Vehicle)、TMG、nTMG を4週間塗布うち、擦過行動の回数 (A) と擦過時間 (B) を測定した。実験には各群当たり 5-6 頭のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群との比較、#は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、**、##は危険率 $p < 0.01$ を示す。

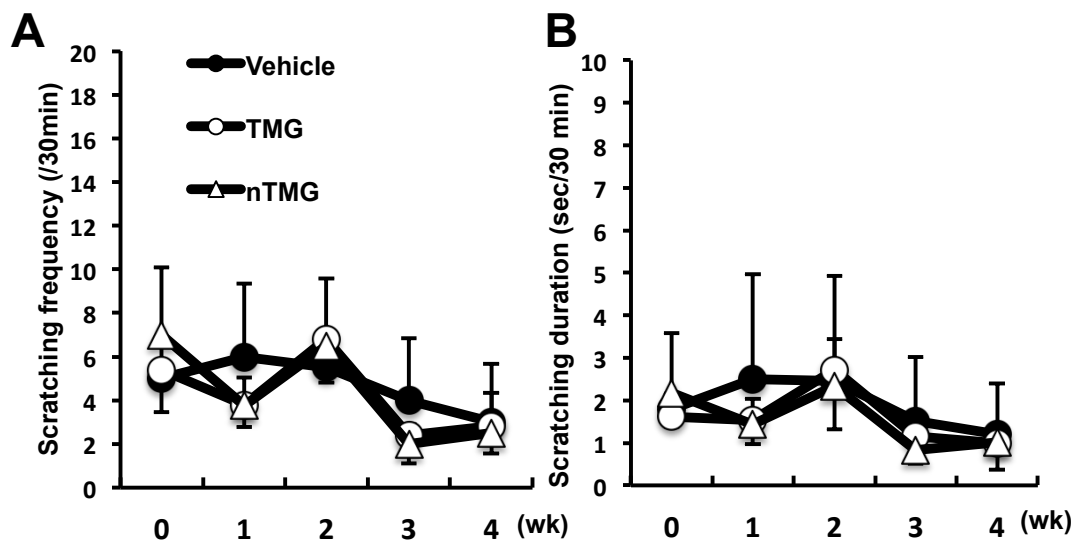


図 23 TMG 塗布による C57BL/6 マウスの擦過行動の変化

7 週齢の C57BL/6 マウスの後背部皮膚に蒸留水 (図中 Vehicle)、TMG、TMG、nTMG を 4 週間塗布うち、擦過行動の回数 (A) と擦過時間 (B) を測定した。各群当たり 5-6 匹のマウスを使用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群と比較、#は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。また、**、##は危険率 $p < 0.01$ を示す。

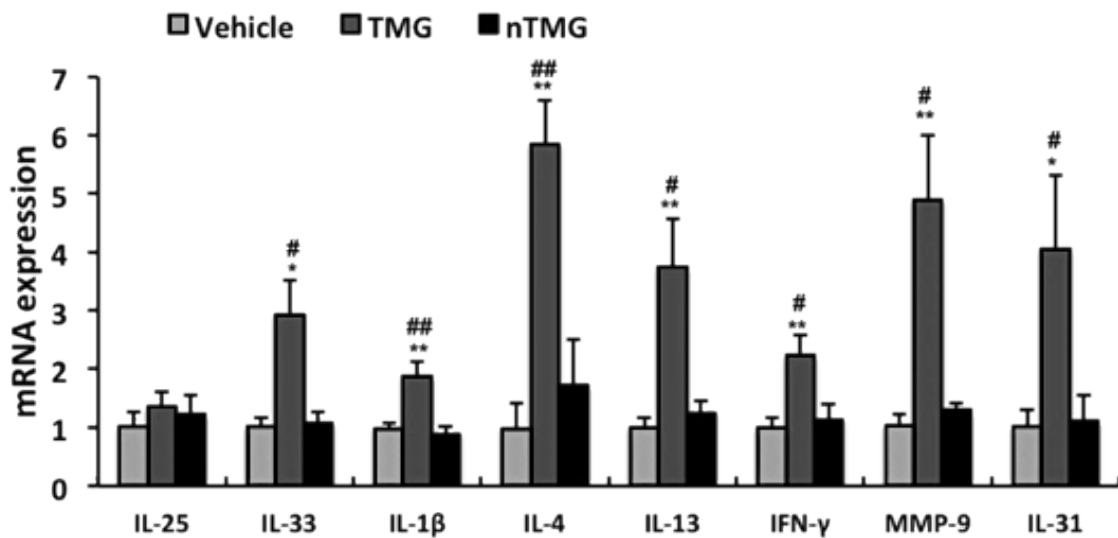


図24 TMG 塗布による SPF NC/Tnd マウスの皮膚での炎症性サイトカインとケモカインの発現変化

TMG 塗布によって皮膚表面がアルカリ化された SPF NC/Tnd マウスの皮膚における炎症性サイトカインとケモカインの mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 方法を用いて解析した。実験には各群当り 4-5 頭のマウスを使用した。グラフのカラムは蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) の mRNA 発現量に対する各群の平均相対的発現量を、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群と比較、#は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を意味する。また、**、##は危険率 $p < 0.01$ を表す。

表 2 cDNA 増幅に使用されたプライマー

Target cDNA	Forward sequence	Reverse sequence
Mouse Il-25	CTCAACAGCAGGGCCACTC	GTCTGTAGGCTGACGCAGTGTG
Mouse Il-33	GATGAGATGTCTCGGCTGCTTG	AGCCGTTACGGATATGGTGGTC
Mouse Il-1 β	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
Mouse Il-4	ACGGAGATGGATGTGCCAAAC	AGCACCTTGAAGCCCTACAGA
Mouse Il-13	CAATTGCAATGCCATCTACAGGAC	CGAAACAGTTGCTTTGTGTAGCTGA
Mouse Ifn- γ	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG
Mouse Mmp-9	GCCCTGGAACCTCACACGACA	TTGGAAACTCACACGCCAGAAG
Mouse Il-31	AAACAAGAGTCTCAGGATCTTTATAACAAC	ACGGCAGCTGTATTGATTTCGT
Mouse Tslp	CGAGCAAATCGAGGACTGTGAG	GCAGTGGTCATTGAGGGCTTC
Mouse β -actin	CATCCGTAAAGACCTCTAGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA

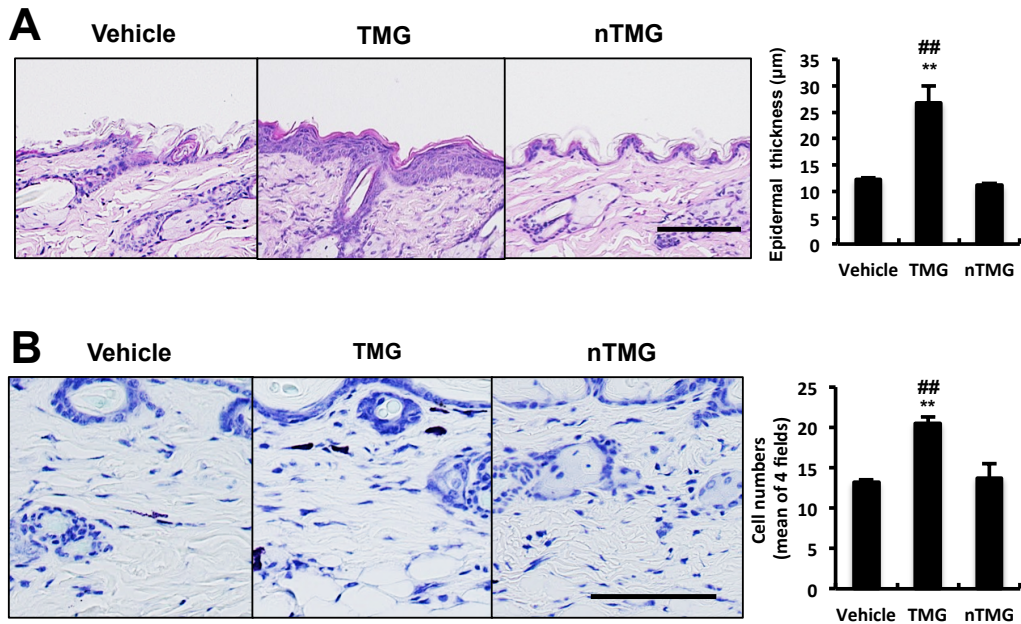


図 25 TMG 塗布による SPF NC/Tnd マウスの表皮の肥厚と炎症性細胞の蓄積
皮膚炎を発症していない 7 週齢の SPF NC/Tnd マウスの後背部皮膚に蒸留水 (図
中 Vehicle)、TMG、nTMG を 4 週間塗布したあと、表皮の厚さ (A) と真皮に蓄
積した肥満細胞の数 (B) を測定した。実験には各群当たり 5-6 頭のマウスを使
用した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*^{*}は蒸留水塗布群と
比較、^{##}は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.01$ を意味する。バーは 100 µm を
示す。

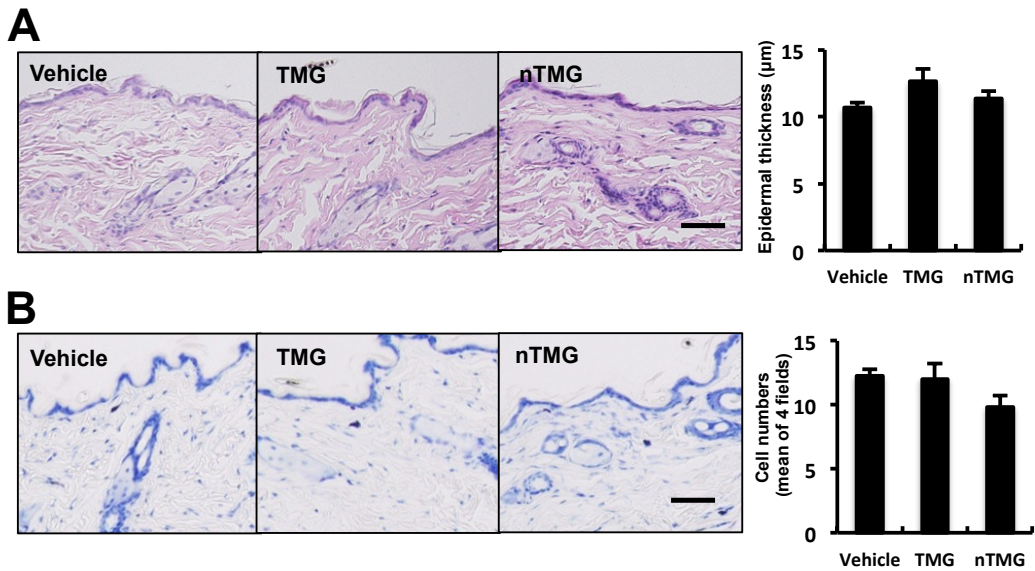


図 26 TMG 塗布による C57BL/6 マウスの表皮の肥厚と炎症性細胞の蓄積
 7 週齢の C57BL/6 マウスの後背部皮膚に蒸留水 (図中 Vehicle)、TMG、nTMG
 を 4 週間塗布したあと、表皮の厚さ (A) と真皮に蓄積した肥満細胞の数 (B)
 を測定した。実験には各群当たり 5-6 頭のマウスを使用した。グラフは各群の
 平均値、バーは標準誤差を示す。バーは 100 µm を示す。

3) 考察

本項では、皮膚表面の pH を上昇させることで、皮膚のバリア機能や免疫系に与える影響について検討した。実験には SPF 環境で飼育され皮膚炎を発症していない SPF NC/Tnd マウスと、対照として C57BL/6 マウスを使用した。

TMG は塗布によって角質層の pH を上昇させるが (Hachem et al., 2003)、皮膚に対する毒性や副作用は示さないことが知られている。TMG 塗布によって、SPF NC/Tnd マウスの皮膚表面の pH は 8.4 以上に上昇し、同時にバリア機能の低下を示唆する TEWL の増加、かゆみによる擦過行動の増加が観察された。さらに、皮膚における炎症性サイトカイン、ケモカイン (IL-33、IL-1 β 、IL-4、IL-13、IFN- γ 、MMP-9) とかゆみを誘発する IL-31 の mRNA 発現の増加も認められた。組織学的変化としても表皮の肥厚と真皮での肥満細胞の蓄積増加が確認された。一方、C57BL/6 マウスでは、TMG 塗布によって皮膚 pH の上昇と TEWL の増加は認められたが、その変化は SPF NC/Tnd マウスより弱かった。また、痒みによる擦過行動の増加や、皮膚における炎症性サイトカインとケモカインの mRNA 発現レベル、組織学的変化は観察されなかった。

代表的な皮膚 pH 恒常性維持機構は二つに分けられる。まず、内因性皮膚 pH 維持機構としては、水素イオンとナトリウムイオンを細胞中と外に交換する NHE1 (Behne et al., 2002)、自由脂肪酸を生産する sPLA₂ (Fluhr et al., 2004b)、そして酸性化の維持に寄与する PCA と trans-UCA の前駆体であるフィラグリン (Fluhr et al., 2010) がある。外因性皮膚 pH 維持機構は、汗腺や脂腺で生産される自由脂肪酸や抗菌ペプチドがある。特に、内因性 pH 維持機構の機能低下は、外部の刺激に対して皮膚バリア回復を遅延させることが報告されている (Behne et al., 2002; Fluhr et al., 2004; Sakai et al., 2014)。

本実験では TMG 塗布に対する NC/Tnd マウスと C57BL/6 マウスの反応の差を確認した。この結果は NC/Tnd マウスでは皮膚 pH 恒常性維持器具の損傷と、

炎症の発現を抑制するメカニズムの異常を示唆する。すなわち、NC/Tnd マウスは外部からの刺激に対する恒常性維持能力が低下し、負荷に応じて皮膚の pH が上昇、それにより皮膚バリアの損傷や免疫学的異常が起こると考えられた。

[3] 皮膚 pH 上昇による皮膚炎誘発のメカニズム

{1} 皮膚 pH の上昇によるアトピー性皮膚炎の誘発とそのメカニズムの解析

1) 材料方法

1. ウェスタンブロットティング法

皮膚の pH 上昇による皮膚炎誘発メカニズムを明らかにするため、TMG を塗布したマウスの表皮を用いて KLK5、LEKTI、および PAR2 のタンパク質発現をウェスタンブロットティング法で解析した。

既述した方法に従って、各群のマウスの表皮を分離し、試料を調整した。12% のポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories) を用いて電気泳動により試料を展開して Immobilom-P PVDF 膜 (Millipore) に転写した。非特異的反応の出現を防ぐために 5% のスキムミルク (Wako) を含む 20 mM TBS に 60 分間浸漬した後、各種一次抗体を添加した 5% のスキムミルクで一晩 4°C で反応させた。0.05% Tween-20 を含む TBS で洗浄した後、HRP で標識された二次抗体を添加して室温で 45 分間反応させた。再び TBS で洗浄した後、発色基質 Immobilon western detection reagents (Millipore) を作用させ、ImageQuant LAS4000 (Fuji film) を用いて可視化した。一次抗体は、ウサギ抗 KLK5 ポリクローナル抗体 (Abcam)、ウサギ抗 LEKTI ポリクローナル抗体、マウス抗 PAR2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。二次抗体は、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体、もしくは HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を使用し、希釈濃度は各項目の添付書類に従った。

2. 免疫組織化学法

前述した方法に従い、免疫組織化学法を行った。一次抗体は、ウサギ抗 KLK5 ポリクローナル抗体 (Abcam)、ウサギ抗 LEKTI ポリクローナル抗体、マウス抗

PAR2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ヤギ抗 TSLP ポリクローナル抗体 (R&D systems) を使用した。二次抗体は、一次抗体の動物種に合わせて、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体、もしくはビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用し、希釈濃度は各抗体の添付書類に従った。

3. ELISA

皮膚表面のアルカリ化に伴う TSLP 産生量の変化を評価するため、ELISA を実施した。TMG を塗布したマウスの皮膚組織を採取し、5 mM EDTA を添加した 50°C の PBS に 2 分間浸漬して、表皮と真皮を分離した。得られた表皮を氷温の PBS で洗浄し、タンパク質分解酵素阻害剤を含む CellLytic MT reagent (Sigma-Aldrich) を加えて破碎した。破碎液を遠心分離して不溶性分画を取り除き、得られた上清を試料とした。BCA Protein assay (Thermo Scientific) を用いて、総タンパク質濃度を定量し、同じ濃度になるよう CellLytic MT reagent で希釈した。Mouse TSLP ELISA MAX Deluxe Kit (BioLegend) を用いて、添付書類に従って試料中の TSLP 量を測定した。

4. TSLP による痒み誘発試験

試験実施の 2 日前に、マウスを 2-3% イソフルランで吸入麻酔して、後背中の被毛を除去した。擦過行動の測定に先立ち、マウスを測定に使用する不透明な四角型の箱に移動し、30 分間順化させた。後背中の皮内に 1 μ g のレコンビナント murine TSLP (R&D systems) を含む 20 μ L の PBS を接種し、接種後 60 分間の擦過行動の回数と擦過時間を SCLABA-Real system を用いて測定した。また、対照群としては 20 μ L の PBS を皮内投与したマウスの擦過行動を測定した。

5. 統計学的解析

統計学的有意差判定は、一元分散分析法および多重比較法を用いた。一元分散分析は、独立変数を TMG の塗布、従属変数をウェスタンブロッティング法による KLK5、PAR2、LEKTI タンパク質の相対的発現強度、ELISA 法による TSLP

発現量とした。有意差の判定は F 境界値を用い、分散比 $F > F(1 - \alpha)$ のとき危険率 $\alpha = 0.05$ を有意な差とした。また、多重比較法としては Tukey 法を使用し、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。一方、TSLP 誘発性の擦過行動の統計的有意差判定は、t 検定を用い、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

3) 結果

皮膚表面の pH 上昇による皮膚バリアの損傷メカニズムを解析した。SPF NC/Tnd マウスの皮膚における KLK5 および LEKTI タンパク質のレベルの変化を図 27 に示した。SPF NC/Tnd マウスでは、皮膚の pH 上昇によって KLK5 のタンパク質の量が有意に増加した (図 27 A)。しかしながら、KLK5 の内因性抑制因子である LEKTI のタンパク質のレベルには大きな変化は認められなかった (図 27B)。

図 28 に SPF NC/Tnd マウスにおける PAR2 および TSLP タンパク質のレベルを示した。皮膚の pH 上昇による KLK5 の発現亢進に伴って、PAR2、TSLP のタンパク質の量も有意に増加した (図 28A および図 28B)。対照的に、C57BL/6 マウスでは、皮膚の pH 上昇に伴う KLK5、LEKTI、PAR2、TSLP のタンパク質の量に有意な差は認められなかった (図 29 および図 30)。

次に、SPF NC/Tnd マウスに認められた皮膚の pH 上昇に伴う TSLP の産生増加が炎症反応のみならずかゆみを誘発する可能性を検討するため、TSLP を皮内投与した時の擦過行動の変化を測定した。図 31 に示したように、TSLP 皮内投与によって擦過行動の回数が有意に増加した。

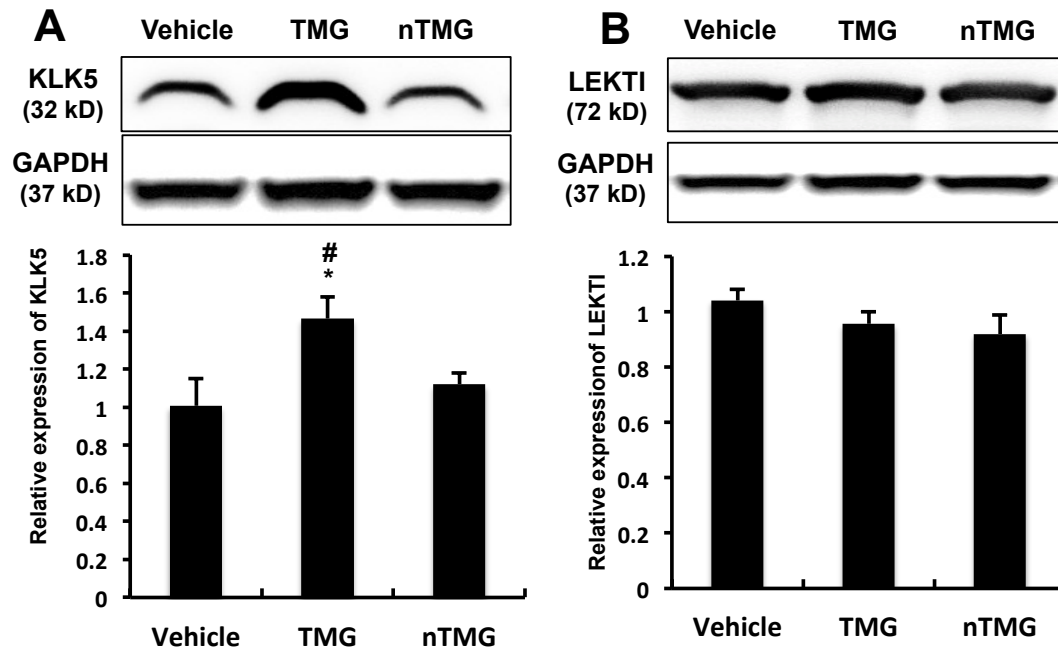


図 27 TMG 塗布による SPF NC/Tnd マウスの表皮での KLK5 および LEKTI タンパク質の変化

ウェスタンブロッティング法を用いて、SPF NC/Tnd マウスにおける皮膚のアルカリ化に伴う KLK5 (A) と LEKTI (B) のタンパク質発現量の変化を検出した。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒の枠線は、同一膜上で得られた結果であることを意味する。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、#は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を示す。

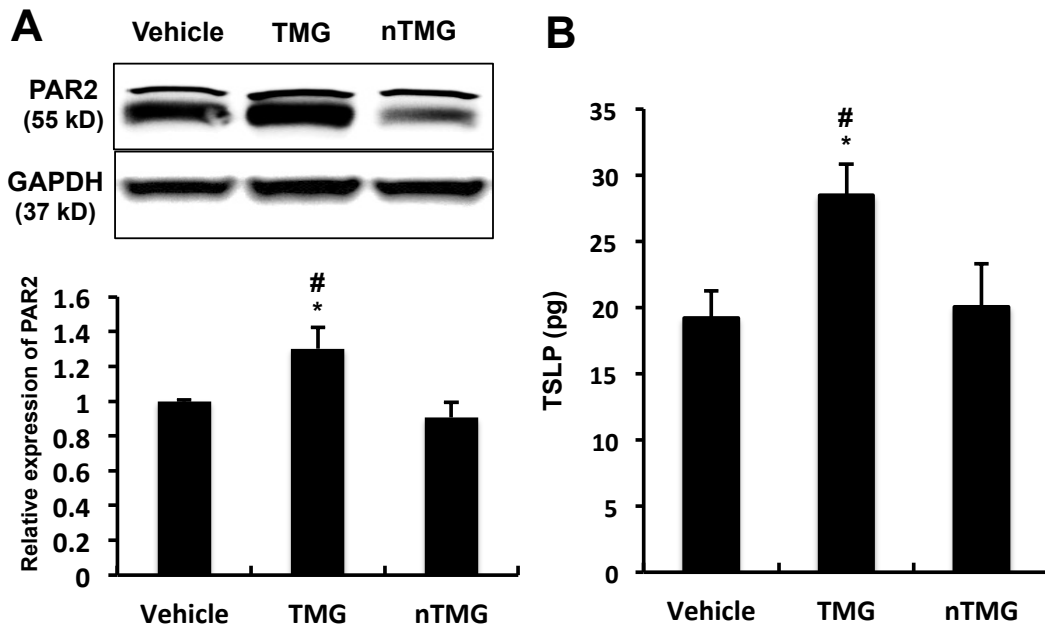


図 28 SPF NC/Tnd マウスの TMG 塗布に伴う表皮の PAR2 および TSLP タンパク質の発現変化

ウェスタンブロッティング法を用いて、SPF NC/Tnd マウスにおける皮膚表面のアルカリ化に伴う PAR2 タンパク質の発現量の変化を検出した (A)。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒の枠線は、同一の膜上で得られた結果であることを意味する。また、ELISA を用いて皮膚のアルカリ化による TSLP 発現量の変化を測定した (B)。グラフの縦軸は、総タンパク質量 100 μg あたりに占める TSLP タンパク質量 (pg) を表す。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。*は蒸留水塗布群 (図中 Vehicle) と比較、#は nTMG 群と比較して、危険率 $p < 0.05$ を意味する。

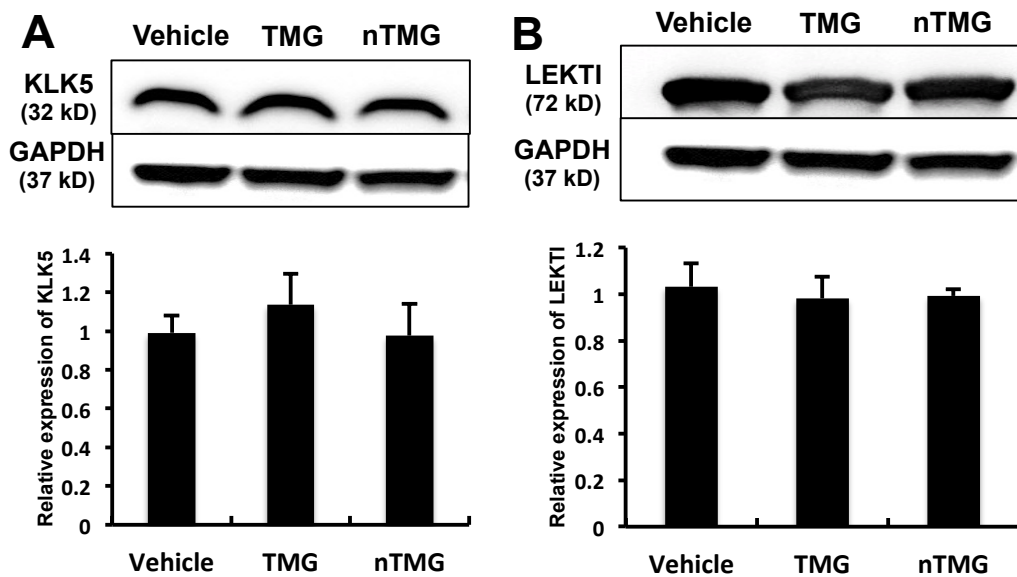


図 29 C57BL/6 マウスの TMG 塗布に伴う表皮の KLK5 および LEKTI タンパク質の変化

ウェスタンブロッティング法を用いて、C57BL/6 マウスにおける皮膚のアルカリ化にともなう KLK5 (A) と LEKTI (B) のタンパク質の量の変化を検出した。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒の枠線は、同一の膜で得られた結果であることを意味する。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。

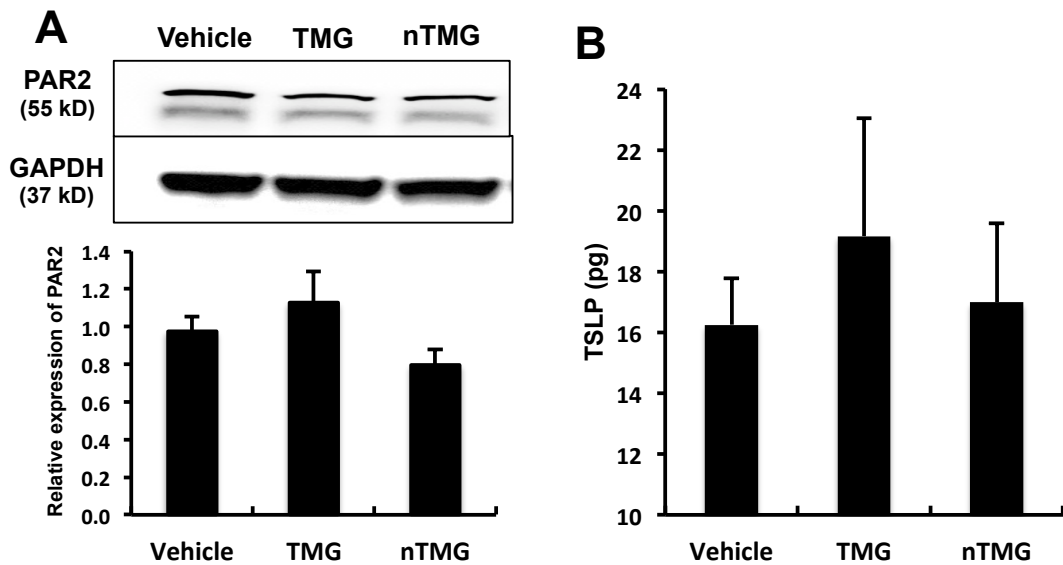


図 30 C57BL/6 マウスの TMG 塗布に伴う表皮の PAR2 および TSLP タンパク質の産生変化

ウェスタンブロッティング法により、C57BL/6 マウスにおける皮膚のアルカリ化に伴う PAR2 タンパク質の量の変化を検出した (A)。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒枠は同一の膜で得られた結果を意味する。また、ELISA により表皮に産生する TSLP の量を測定した (B)。縦軸は 100 μg の総タンパク質に占める TSLP タンパク質量 (pg) を表す。グラフのカラムは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。

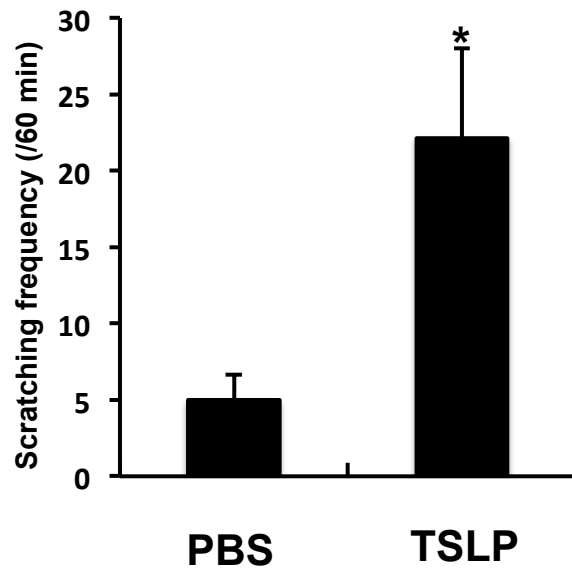


図 31 SPF NC/Tnd マウスにおける TSLP 誘発性の擦過行動

SPF NC/Tnd マウスを用いて、後背部の皮内に $1 \mu\text{g}$ の TSLP または PBS を投与し、投与後 60 分間に観察された擦過行動の回数を測定した。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を表す。*は危険率 $p < 0.05$ を示す。

4) 考察

本項では、皮膚 pH 上昇に伴う KLK5、PAR2、TSLP タンパク質の変化を解析した。C57BL/6 マウスでは、皮膚の pH 上昇に伴い、これらのタンパク質の量には統計学的有意差は認められなかった。一方、NC/Tnd マウスでは、皮膚 pH の上昇とともに KLK5、PAR2、TSLP のタンパク質発現量も有意に増加した。pH の変化による KLK5、PAR2、TSLP タンパク質の増加は皮膚バリアの損傷や免疫学的反応との関連性を示唆している。また、TSLP がかゆみを誘発することにより、擦過行動によって皮膚バリアを物理的にさらに損傷することができる。

同じ刺激に対する C57BL/6 マウスと NC/Tnd マウスの反応の違いは、pH 調節因子の異常に起因するものと推測される。すなわち、C57BL/6 マウスでは pH 調節器具が正常に作用することで、皮膚 pH の上昇が制限されて、KLK5 の活性化亢進には至らない。一方、SPF NC/Tnd マウスでは pH 調節器具の異常によって皮膚 pH の恒常性が維持できず、その結果として KLK5 が活性化されるのではないかと考えられる。

{2}表皮組織培養方法を使用したカリクレイン関連ペプチド加水分解酵素 (Kallikrein-related peptide5) とプロテアーゼ活性化受容体 2 (Protease-activated receptor 2) -胸腺間質性リンパ球新生因子 (Thymic stromal lymphopoietin) の
関連性

1) 材料と方法

1. 動物

実験には 8-12 週齢の C57BL/6、SPF NC/Tnd、original PAR-2 deficient (C57BL/6)、PAR2-deficient NC/Tnd マウスを使用した。

2. 表皮組織の分離と培養

マウスを 2-3% のイソフルランで吸入麻酔し、後背中の被毛を除去した。その後、マウスを頸椎脱臼方法で安楽死させ、ノルバサン洗浄剤で洗浄し、マウスの体表面に付着した異物を除去した。マウスを 50% イソプロパノールに浸漬したあと、クリーンベンチ内で無菌的に表皮の分離・培養操作を行った。まず、マウスの背中の皮膚を採取したあと、直径 6 mm の生検トレパンを用いて皮膚片をトリミングした。0.25% トリプシン-EDTA に皮膚片を浮遊させ、37°C で一時間静置した。その後、ピンセットを用いて真皮と脂肪組織を除去し、分離した表皮を keratinocyte serum-free medium (Life Technologies) で培養・維持した。

3. KLK5 刺激

分離・培養した表皮を 400 nM のレコンビナント murine KLK5 (R&D systems) を含む keratinocyte serum-free medium (Life Technologies) に浮遊させた。

4. KLK5 の活性化の抑制

400 nM のレコンビナント murine KLK5 を添加する一時間前に、1 mM の 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニル(4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, AEBSF) (Sigma-Aldrich) を含む keratinocyte serum-free medium (Life

Technologies) に浮遊させた。

5. ウェスタンブロッティング法

前述した方法に従って、分離・培養した表皮を用いて試料を調整した。一次抗体は、マウス抗 PAR2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を、二次抗体は、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を使用し、希釈濃度は各項での添付書類に従った。

6. ELISA

分離・培養した表皮にタンパク質分解酵素阻害剤を含む CellLytic MT reagent (Sigma-Aldrich) を加え破碎したあと、遠心分離して不溶性分画を除去した抽出液を得た。BCA Protein assay (Thermo Scientific) を用いて抽出液に含まれるタンパク質の濃度を定量し、同一濃度となるよう CellLytic MT reagent で希釈した。これを試料として、Mouse TSLP ELISA MAX Deluxe Kit (BioLegend) を用い、添付資料に従って表皮に発現する TSLP 量を測定した。

7. リアルタイム RT-PCR

既述した方法に従って、分離・培養した表皮から全 RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA に SYBR Premix Ex Taq (TAKARA BIO) と TSLP および内在性対照である β -actin の特異的プライマーを添加して、PCR 条件 (50°C で 2 分間、95°C で 10 分間、95°C で 15 秒、60°C で 1 分間) を 40 回繰り返し、DNA の増幅を行った。ABI Prism7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて、DNA 増幅に伴う SYBR green の蛍光強度を継時的に計測し、サイクル比較法を用いて β -actin の mRNA 発現量に対する TSLP の相対的 mRNA 発現量を算出した。実験は 3 回行い、その平均値を測定結果とした。

8. 統計学的解析

KLK5 刺激による PAR2 タンパク質と TSLP mRNA の相対的発現強度の統計学的有意差判定は、一元分散分析法および多重比較法を用いた。一元分散分析は、独立変数を KLK5 の添加、従属変数をウェスタンブロッティング法による

PAR2 タンパク質の相対的発現強度、リアルタイム RT-PCR による TSLP mRNA の相対的発現程度とした。有意差の判定は F 境界値を用い、分散比 $F > F(1 - \alpha)$ のとき危険率 $\alpha = 0.05$ を有意な差とした。また、多重比較法としては Tukey 法を使用し、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

一方、KLK5 刺激による TSLP タンパク質量の統計的有意差判定は、t 検定を用い、危険率 $p < 0.05$ を有意な差とした。

4) 結果

まず、C57BL/6 マウスの表皮に対する KLK5 刺激による PAR2 タンパク質の経時的な変化を図 32 に示した。ウェスタンブロッティング法で解析した結果、刺激時間に依存して PAR2 タンパク質の量が増加し、刺激開始 6 時間目以降で、未刺激と比較した場合、有意な増加が認められた (図 32)。

次は KLK5 刺激による TSLP の mRNA とタンパク質のレベルの変化を、それぞれリアルタイム RT-PCR と ELISA を用いて解析した。PAR2 と同様に TSLP の mRNA 発現量は KLK5 の刺激時間依存性に増加し、刺激開始 6 時間後以降で、有意に増加することが認められた (図 33A)。また、TSLP のタンパク質の量も KLK5 刺激 24 時間後には 3.3 倍に増加した (図 33B)。

次は PAR2 と TSLP の相互作用を明らかにするため、PAR2 欠損マウスを用いて解析した。PAR2 を欠損させた C57BL/6 マウスと NC/Tnd マウスを 20 世代以上交配させて PAR2 欠損 NC/Tnd マウスを作出した。実験には、C57BL/6 マウス、PAR2 欠損 C57BL/6 マウス、SPF NC/Tnd マウス、PAR2 欠損 NC/Tnd マウスを用いて、それぞれのマウスから採取・培養した表皮を使用した。、内因性、外因性の KLK5 の活性を排除するために、KLK5 を刺激させる前に 1 mM AEBSF を前処理した。リアルタイム RT-PCR を用いて TSLP の mRNA 発現を比較すると、C57BL/6 マウスと SPF NC/Tnd マウスでは KLK5 刺激による TSLP 発現の増加が

認められた。なお、KLK5 の活性を抑制した場合、TSLP の mRNA 量が減少した。一方、PAR2 欠損 C57BL/6 マウスと PAR2 欠損 NC/Tnd マウスでは、KLK5 刺激および KLK5 抑制の有無に関わらず TSLP の発現増加は認められなかった (図 34)。

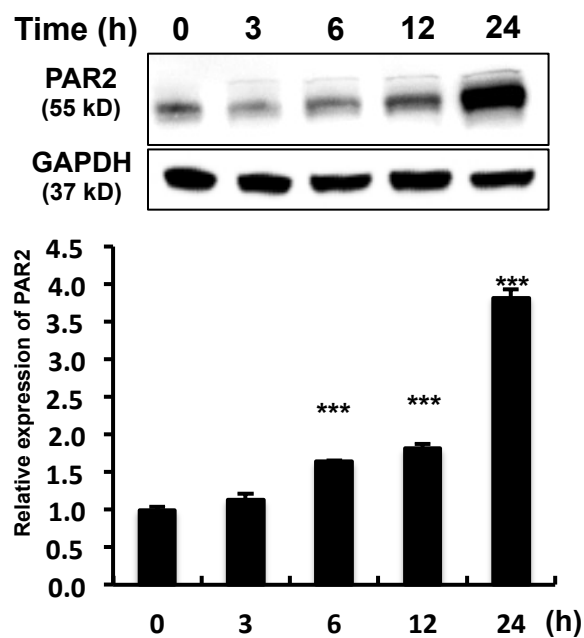


図 32 KLK5 刺激による PAR2 の発現変化

培養した表皮シートに 400 nM のレコンビナント KLK5 を刺激したときの PAR2 タンパク質量の変化をウェスタンブロッティング法を用いて解析した。写真は 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的なバンドを示す。また、黒の枠線は同一の膜で得られた結果であることを意味する。グラフは各群の平均値、バーは標準誤差を示す。***は 0 時間と比較して危険率 $p < 0.001$ を示す。

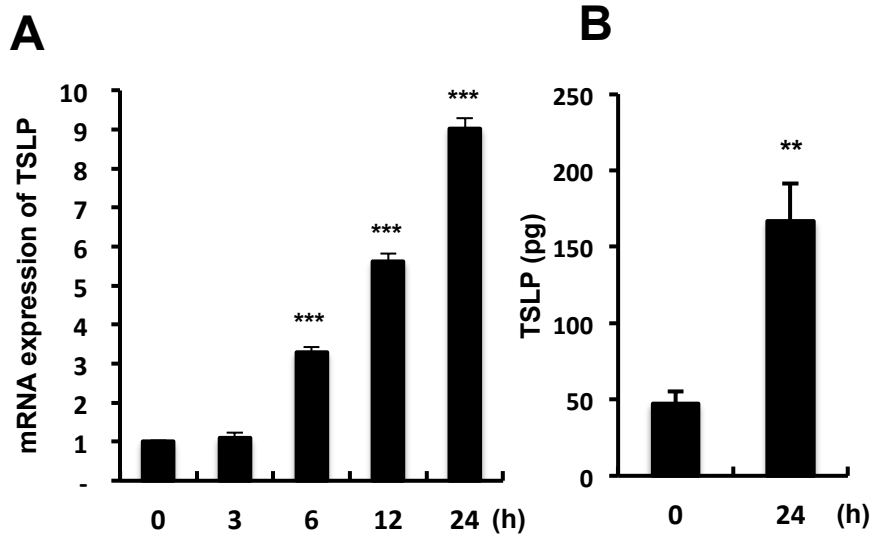


図 33 KLK5 刺激による TSLP の mRNA とタンパク質量の変化

培養した表皮シートを用いて、400 nM のレコンビナント KLK5 を刺激させたときの TSLP 産生量の変化をリアルタイム RT-PCR 法と ELISA で測定した。グラフ (A) は、0 時間における発現量を 1 としたときの相対的 mRNA 発現量を表す。グラフ (B) は総タンパク質量 100 μ g に占める TSLP タンパク質量 (pg) を表す。また、バーは標準誤差を示す。** は 0 時間と比較して危険率 $p < 0.01$ を、*** は 0 時間と比較して危険率 $p < 0.001$ を意味する。

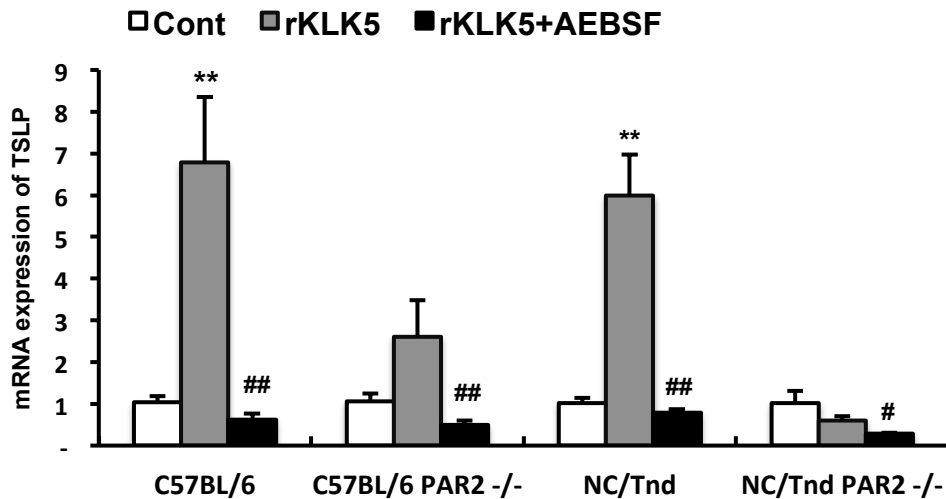


図 34 KLK5 による TSLP 産生の PAR2 の関与

TSLP 産生に KLK5-PAR2 経路が直接的に関与していることを PAR2 欠損マウスを用いて確認した。C57BL/6 マウス、NC/Tnd マウス、PAR2 欠損 C57BL/6 マウス、PAR2 欠損 NC/Tnd マウスの背中の皮膚組織を採取して、培養表皮シートを作成した。それぞれの表皮組織に 400 nM のレコンビナント KLK5 を添加した後、TSLP の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法で解析した。また、内因性および外因性 KLK5 活性を排除するために、KLK5 添加の 1 時間前にセリンプロテアーゼ阻害剤である AEBSF を前処理した。グラフのカラムは KLK5 無処理の対照群 (図中 Cont) の 0 時間で発現する mRNA 量を 1 とした場合の相対 mRNA 発現量を、バーは標準誤差を表す。*は KLK5 無処理の対照群と比較、#は KLK5 処理群 (図中 rKLK5) と比較して、危険率 $p < 0.05$ を意味する。また、**、##は危険率 $p < 0.01$ を示す。

3) 考察

KLK5 は PAR2 を開裂、活性化させてケラチノサイト内のカルシウム分布の異常を誘発して脂質分泌の異常と NF- κ B の活性化を起こす (Stefansson et al., 2008; Hachem et al., 2006; Briot et al., 2009)。LEKTI の欠乏マウスでは KLK5 の過活性と PAR2 の発現、TSLP の産生が増加しており (Briot et al., 2009)、PAR2 と LEKTI が同時に欠損されたマウスでは LEKTI のみ欠損されたマウスより皮膚の TSLP の発現が減少した (Briot et al., 2010)。また、ケラチノサイトの PAR2 抑制は炎症性サイトカインと TSLP の発現を減少させた (Briot et al., 2009)。これらは、PAR2 が TSLP の産生と炎症反応に重要な部分のことを示唆される。一方で、KLK5 トランスジェニックマウスでは皮膚のバリアの損傷と炎症症状の発現、そして皮膚の TSLP 発現が急激に増加した (Furio et al., 2014)。これは PAR2 と TSLP の産生が直接関連していることおよびその経路に KLK5 が関連する可能性を示唆している。

本研究では KLK5 刺激によって時間依存的に PAR2 の発現が増加すること、PAR2 の発現とともに時間依存的に TSLP の mRNA とタンパク質の産生が増加することが明らかになった。また、PAR2 欠損マウスの皮膚を用いて KLK5 刺激による TSLP の生産に PAR2 が不可欠であることを証明した。

マウスの表皮組織のみを分離して KLK5 刺激による TSLP mRNA の相対的な量を比較した時、C57BL/6 および NC/Tnd マウスでは KLK5 刺激によって TSLP mRNA 発現量が増加したが、AEBSF によって KLK5 の活性を抑制させると TSLP の産生が減少することを確認した。また、この KLK5 刺激による TSLP 産生の増加は PAR2 欠損マウスでは証明されなかった。この結果から、KLK5 による PAR2 の活性化と TSLP の産生増加は、両者の直接的相互関係に由来すると推測される。すなわち、皮膚における直接的な KLK5-PAR2-TSLP 経路の存在が示唆される。

4) 小括

我々は日常生活の中で、常に様々な外部環境に現れている。その中には入浴や石鹸、化粧品など、皮膚の pH を変化させる可能性を有する因子も含まれている。本研究において使用した C57BL/6 マウスと SPF NC/Tnd マウスは、同じ刺激に対して異なる反応を示した。すなわち、皮膚表面の pH を上昇させた時、それに反応して pH を正常な弱酸性に回復させる力が異なっていた。SPF NC/Tnd マウスでは、皮膚表面の pH を上昇させると弱酸性への回復が遅れ、経皮水分蒸散量が増加し、皮膚の炎症反応が惹起されたが、同じ刺激でも C57BL/6 マウスではわずかに経皮水分蒸散量が増加したのみ皮膚炎は誘導されなかった。また、C57BL/6 では KLK5、PAR2、TSLP 発現の変化がなかったのに対し、SPF NC/Tnd マウスではこれら因子のタンパク質量が有意に増加した。また、組織学的な解析により、表皮の肥厚、炎症性細胞の浸潤、そして炎症性サイトカインの発現の増加が NC/Tnd マウスでは顕著に見られることに対し、C57BL/6 マウスではこのような組織学的な変化も認められなかった。これはアトピー性皮膚炎の素因を有する NC/Tnd マウスにおける皮膚表面の pH 調節機能の低下によるものではないかと考えられるが、現段階では不明であり、今後更なる研究を行う必要がある。

また、KLK5-PAR2-TSLP 経路の直接的な関係については、PAR2 遺伝子欠損マウスの皮膚を用いた *ex vivo* 試験を導入して検討した。PAR2 を欠損していない野生型マウスでは、KLK5 刺激によって TSLP の発現が増加したが、PAR2 欠損マウスの皮膚では KLK5 刺激による TSLP の発現増加起こっていないことから、KLK5 は PAR2 を介して TSLP の産生を誘導し初期のアレルギー性炎症の引き金を引くことが明らかとなった。

総括

石鹼、洗剤などのアルカリ性物質の接触、細菌やカビなどの病原体、そしてチリダニとの接触は皮膚表面の pH を上昇させ、皮膚バリアの損傷やセリンプロテアーゼの活性化を誘導する可能性が指摘されている (Hachem et al., 2005)。皮膚の恒常性異常による皮膚表面の pH 上昇は、皮膚バリアの損傷や炎症性皮膚炎と関連すると考えられる。しかし、アトピー性皮膚炎において皮膚表面の pH 異常による皮膚バリアの損傷や免疫学的異常に関連するメカニズムはまだ明らかになっていなかった。本研究では、アトピー性皮膚炎の自然発症モデルマウスとして世界的に知られている NC/Tnd マウスを用いて、皮膚表面の pH と皮膚のバリア機能やアレルギー性炎症の関連性を検証し、皮膚表面の pH 上昇は、KLK5-PAR2-TSLP 経路を経由して、皮膚炎を誘発することを明らかにした。つまり、皮膚の pH の上昇が KLK5 のタンパク質発現を上昇させ、KLK5 の作用によって PAR2 の活性化を介して、TSLP の産生を増強させ、皮膚バリアの損傷と皮膚炎を誘発することが考えられた (図 35)。

NC/Tnd マウスでは LEKTI の発現低下は認められなかったため、LEKTI の機能不全により発症するネザートン症候群とは異なっている。PAR2 の活性化は NF- κ B 経路によって TSLP を生産させることが知られており (Briot et al., 2009)、TSLP も NF- κ B 経路依存的に以降の炎症反応を開始する。これはアトピー性皮膚炎で NF- κ B の重要性を強調している 2007 年の Tanaka らの研究を裏付けるものである (Tanaka et al., 2007)。本研究では、皮膚表面の pH 上昇が KLK5 および PAR2 を介して TSLP の産生を誘導することが明らかになったが、これらの経路に NF- κ B が関与している可能性は高い。つまり皮膚表面の pH 上昇を防ぐことで、最終的に NF- κ B を経由する強い炎症反応を回避できるかもしれない。アトピー性皮膚炎の原因因子のひとつと考えられるフィラグリンは、NC/Tnd マウスでは発症に伴いそのタンパク質発現量および機能的低分子へのプロセッシングが

亢進した。これは皮膚バリアの損傷に対する代償的作用と考えられると同時に、NC/Tnd マウスがアトピー性皮膚炎患者の約 80%に相当するフィラグリンの欠失に依存しないアトピー性皮膚炎のモデルであることを示している。これらの知見を基に、発症している Conv NC/Tnd マウスの皮膚に LBA を塗布して正常な状態と同じ弱酸性に復帰させると、皮膚バリア機能が回復して経皮水分蒸散が抑制し、痒みが軽減するなど、アトピー性皮膚炎の症状が緩和された。このことは、弱酸性の状況では KLK5 の活性が抑制され、KLK5 によって誘導される PAR2 の活性化や、連動する TSLP の産生が抑えられたと考えられる。

SPF NC/ Tnd マウスでの実験的皮膚 pH の上昇は KLK5、PAR2、TSLP タンパク質発現量を増加させ、皮膚バリア機能の損傷と Th2 炎症反応を誘発した結果に対し、C57BL/6 マウスではわずかに経皮水分蒸散量を増加の変化しかみとめられなかった。これは NC/Tnd マウスの pH 恒常性維持機能の異常を意味し、これがアトピー性皮膚炎を誘発する原因のひとつと考えられるため、今後さらに研究を行う必要がある。KLK5 は、中性からアルカリ性の環境で活性を發揮し (Ekholm et al., 2000)、コルネオデスモソームを分解して剥離を誘発する (Caubet et al., 2004; Fortugno et al., 2011)。KLK5 のトランスジェニックマウスでは皮膚バリアの損傷だけではなく、TSLP 生産の増加と Th2 炎症反応の誘導が観察されている (Furio et al., 2014)。これらの知見から NC/Tnd マウスでも皮膚表面の pH を上昇させると、KLK5 タンパク質の発現量が増加し、これにより皮膚バリアの損傷と炎症反応が誘発されることが考えられる。結果として産生された TSLP は、感覚神経に存在する TSLP 受容体に直接作用してかゆみを誘発することが報告されており (Wilson et al., 2013)、TSLP による痒みの惹起は本研究でも明らかになった。TSLP は Th2 細胞が産生する IL-31 とともに、アトピー性皮膚炎の特徴的な臨床症状である痒みの誘発に関与すると考えられる。

本研究では、日常的に起こる皮膚表面の pH の変化が、素因を持つ個体に対してアトピー性皮膚炎を誘導しうる十分な刺激となることを明らかにした。この

ことは一方で、皮膚表面の弱酸性の pH を保つことが、アトピー性皮膚炎の発症、増悪化、あるいは慢性化を防ぐ重要な療法となることを提起するものである。

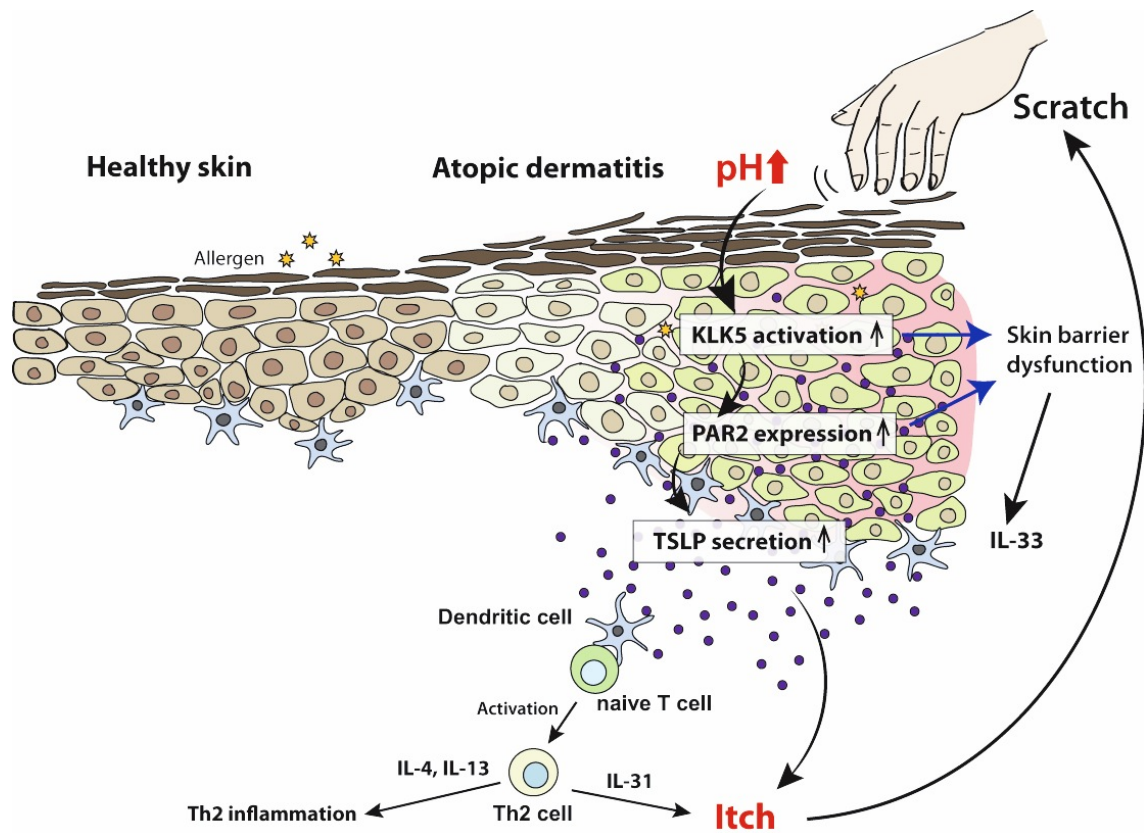


図 35 仮説

アトピー性皮膚炎患者での pH の上昇はセリンプロテアーゼである KLK5 発現を活性化させ PAR2 活性化型に分解させてケラチノサイトから TSLP 分泌を誘導する。ケラチノサイトから分泌された TSLP は Th2 細胞の活性化を誘導するだけでなく、かゆみに関与する。活性化した Th2 細胞は Th2 炎症性のサイトカインと IL-31 を分泌して、Th2 炎症反応やかゆみを誘発する。これによる痒みは擦過行動を起こし、皮膚のバリアをさらに損傷させアトピー性皮膚炎を悪化させる。

参考文献

- 1) Aioi, A., H. Tonogaito, H. Suto, K. Hamada, C.R. Ra, H. Ogawa, H. Maibach, and H. Matsuda. 2001. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 144:12–18.
- 2) Amagai, Y., H. Matsuda, and A. Tanaka. 2013. Abnormalities in itch sensation and skin barrier function in atopic NC/Tnd mice. *Biol. Pharm. Bull.* 36:1248–1252.
- 3) Behne, M.J., J.W. Meyer, K.M. Hanson, N.P. Barry, S. Murata, D. Crumrine, R.W. Clegg, E. Gratton, W.M. Holleran, P.M. Elias, and T.M. Mauro. 2002. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging. *J. Biol. Chem.* 277:47399–47406.
- 4) Brattsand, M., K. Stefansson, C. Lundh, Y. Haasum, and T. Egelrud. 2005. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 124:198–203.
- 5) Briot, A., C. Deraison, M. Lacroix, C. Bonnart, A. Robin, C. Besson, P. Dubus, and A. Hovnanian. 2009. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J. Exp. Med.* 206:1135–1147.
- 6) Briot, A., M. Lacroix, A. Robin, M. Steinhoff, C. Deraison, and A. Hovnanian. 2010. Par2 inactivation inhibits early production of TSLP, but not cutaneous inflammation, in Netherton syndrome adult mouse model. *J. Invest. Dermatol.* 130:2736–2742.
- 7) Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:328–340.
- 8) Caubet, C., N. Jonca, M. Brattsand, M. Guerrin, D. Bernard, R. Schmidt, T. Egelrud, M. Simon, and G. Serre. 2004. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine

proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J. Invest. Dermatol.* 122:1235–1244.

- 9) Chamlin, S.L., J. Kao, I.J. Frieden, M.Y. Sheu, A.J. Fowler, J.W. Fluhr, M.L. Williams, and P.M. Elias. 2002. Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47:198–208.
- 10) Cole, C., K. Kroboth, N.J. Schurch, A. Sandilands, A. Sherstnev, G.M. O'Regan, R.M. Watson, W.H. McLean, G.J. Barton, A.D. Irvine, and S.J. Brown. 2014. Filaggrin-stratified transcriptomic analysis of pediatric skin identifies mechanistic pathways in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134:82–91.
- 11) Colloff, M.J. 1992. Exposure to house dust mites in homes of people with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 127:322–327.
- 12) Cork, M.J., S.G. Danby, Y. Vasilopoulos, J. Hadgraft, M.E. Lane, M. Moustafa, R.H. Guy, A.L. Macgowan, R. Tazi-Ahnini, and S.J. Ward. 2009. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 129:1892–1908.
- 13) Cork, M.J., D.A. Robinson, Y. Vasilopoulos, A. Ferguson, M. Moustafa, A. MacGowan, G.W. Duff, S.J. Ward, and R. Tazi-Ahnini. 2006. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:3–21.
- 14) Cork, M.J., R. Murphy, J. Carr, D. Buttle, S. Ward, s. Ward, C. Bavic, and R. Tazi-Ahnini. 2002. The rising prevalence of atopic eczema and environmental trauma to the skin. *Dermatol. Pract.* 10:22–26
- 15) Cowley, N.C., and P.M. Farr. 1992. A dose-response study of irritant reactions to sodium lauryl sulphate in patients with seborrhoeic dermatitis and atopic eczema. *Acta. Derm. Venereol.* 72:432–435.
- 16) Dale, B.A., K.A. Resing, and J.D. Lonsdale-Eccles. 1985. Filaggrin: a keratin filament

associated protein. *Ann. N Y Acad. Sci.* 455:330–342.

- 17) D'Andrea, M.R., C.K. Derian, D. Leturcq, S.M. Baker, A. Brunmark, P. Ling, A.L. Darrow, R.J. Santulli, L.F. Brass, and P. Andrade-Gordon. 1998. Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 46:157–164.
- 18) Deraison, C., C. Bonnart, F. Lopez, C. Besson, R. Robinson, A. Jayakumar, F. Wagberg, M. Brattsand, J.P. Hachem, G. Leonardsson, and A. Hovnanian. 2007. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol. Biol. Cell.* 18:3607–3619.
- 19) Derian, C.K., A.J. Eckardt, and P. Andrade-Gordon. 1997. Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ.* 8:743–749.
- 20) Descargues, P., C. Deraison, C. Bonnart, M. Kreft, M. Kishibe, A. Ishida-Yamamoto, P. Elias, Y. Barrandon, G. Zambruno, A. Sonnenberg, and A. Hovnanian. 2005. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat. Genet.* 37:56–65.
- 21) Eberlein-König, B., T. Schäfer, J. Huss-Marp, U. Darsow, M. Möhrensclager, O. Herbert, D. Abeck, U. Krämer, H. Behrendt, and J. Ring. 2000. Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. *Acta. Derm. Venereol.* 80:188–191.
- 22) Ebner, S., V.A. Nguyen, M. Forstner, Y.H. Wang, D. Wolfram, Y.J. Liu, and N. Romani. 2007. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:982–990.
- 23) Egelrud, T., and A. Lundström. 1991. A chymotrypsin-like proteinase that may be

- involved in desquamation in plantar stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* 283:108–112.
- 24) Egelrud, T. 1993. Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 101:200–204.
 - 25) Ekholm, I.E., M. Brattsand, and T. Egelrud. 2000. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J. Invest. Dermatol.* 114:56–63.
 - 26) Ekholm, I.E., and T. Egelrud. 1998. The expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in human anagen hair follicles: further evidence for its involvement in desquamation-like processes. *Br. J. Dermatol.* 139:585–590.
 - 27) Elias, P.M., L.C. Wood, and K.R. Feingold. 1999. Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am. J. Contact. Dermat.* 10:119–26.
 - 28) Elias, P.M., and K.R. Feingold. 2001. Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. *Arch. Dermatol.* 137:1079–1081.
 - 29) Elias, P.M. 1983. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80:44s–49s.
 - 30) Elias, P.M. 2007. The skin barrier as an innate immune element. *Semin. Immunopathol.* 29:3–14.
 - 31) Emami, N., and E.P. Diamandis. 2008. Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade. Possible function in seminal plasma and skin. *J. Biol. Chem.* 283:3031–3041.
 - 32) Fluhr, J.W., J. Kao, M. Jain, S.K. Ahn, K.R. Feingold, and P.M. Elias. 2001. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J. Invest. Dermatol.* 117:44–51

- 33) Fluhr, J.W., M.J. Behne, B.E. Brown, D.G. Moskowitz, C. Selden, M. Mao-Qiang, T.M. Mauro, P.M. Elias, and K.R. Feingold. 2004a. Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 122:320–329.
- 34) Fluhr, J.W., M. Mao-Qiang, B.E. Brown, J.P. Hachem, D.G. Moskowitz, M. Demerjian, M. Haftek, G. Serre, D. Crumrine, T.M. Mauro, P.M. Elias, and K.R. Feingold. 2004b. Functional consequences of a neutral pH in neonatal rat stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 123:140–151.
- 35) Fortugno, P., A. Bresciani, C. Paolini, C. Pazzagli, M. E, Hachem, M. D'Alessio, and G. Zambruno. 2011. Proteolytic activation cascade of the Netherton syndrome-defective protein, LEKTI, in the epidermis: implications for skin homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 131:2223–2232.
- 36) Furio, L., S. de Veer, M. Jaillet, A. Briot, A. Robin, C. Deraison, and A. Hovnanian. 2014. Transgenic kallikrein 5 mice reproduce major cutaneous and systemic hallmarks of Netherton syndrome. *J. Exp. Med.* 211:499–513.
- 37) Gibbs, S., J. Vicanová, J. Bouwstra, D. Valstar, J. Kempenaar, and M. Ponc. 1997. Culture of reconstructed epidermis in a defined medium at 33 degrees C shows a delayed epidermal maturation, prolonged lifespan and improved stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* 289:585–595.
- 38) Hachem, J.P., T. Roelandt, N. Schürer, X. Pu, J. Fluhr, C. Giddelo, M.Q. Man, D. Crumrine, D. Roseeuw, K.R. Feingold, T. Mauro, and P.M. Elias. 2010. Acute acidification of stratum corneum membrane domains using polyhydroxyl acids improves lipid processing and inhibits degradation of corneodesmosomes. *J. Invest. Dermatol.* 130:500–510.
- 39) Hachem, J.P., M.Q. Man, D. Crumrine, Y. Uchida, B.E. Brown, V. Rogiers, D. Roseeuw, K.R. Feingold, and P.M. Elias. 2005. Sustained serine proteases activity by prolonged

increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity. *J. Invest. Dermatol.* 125:510–520.

- 40) Hachem, J.P., D. Crumrine, J. Fluhr, B.E. Brown, K.R. Feingold, and P.M. Elias. 2003. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J. Invest. Dermatol.* 121:345–353.
- 41) Hachem, J.P., E. Houben, D. Crumrine, M.Q. Man, N. Schurer, T. Roelandt, E.H. Choi, Y. Uchida, B.E. Brown, K.R. Feingold, and P.M. Elias. 2006. Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 126:2074–2086.
- 42) Harding, C.R., A. Watkinson, A.V. Rawlings, and I.R. Scott. 2000. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int. J. Cosmet. Sci.* 22:21–52.
- 43) Hatano, Y., M.Q. Man, Y. Uchida, D. Crumrine, T.C. Scharschmidt, E.G. Kim, T.M. Mauro, K.R. Feingold, P.M. Elias, and W.M. Holleran. 2009. Maintenance of an acidic stratum corneum prevents emergence of murine atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 129:1824–1835.
- 44) Holleran, W.M., K.R. Feingold, M.Q. Man, W.N. Gao, J.M. Lee, and P.M. Elias. 1991. Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J. Lipid Res.* 32:1151–1158.
- 45) Irvine, A.D., W.H. McLean, and D.Y. Leung. 2011. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* 365:1315–1327.
- 46) Ishii, I., S. Kurozumi, K. Orito, and H. Matsuda. 2008. Automatic scratching pattern detection for laboratory mice using high-speed video images. *IEEE Trans. Autom. Sci. Eng.* 5:176–182.
- 47) Johansson, O., Y. Liang, J.D. Heilborn, and J.A. Marcusson. 1998. Langerhans cells in prurigo nodularis investigated by HLA-DR and S-100 immunofluorescence double staining. *J. Dermatol. Sci.* 17:24–32.

- 48) Kabashima, K. 2013. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. *J. Dermatol. Sci.* 70:3–11.
- 49) Kawasaki, H., K. Nagao, A. Kubo, T. Hata, A. Shimizu, H. Mizuno, T. Yamada, and M. Amagai. 2012. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129:1538–1546.
- 50) Kezic, S., A. Kammeyer, F. Calkoen, J.W. Fluhr, and J.D. Bos. 2009. Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: evaluation of minimally invasive methods. *Br. J. Dermatol.* 161:1098–1104.
- 51) Kim, M.K., S.Y. Choi, H.J. Byun, C.H. Huh, K.C. Park, R.A. Patel, A.H. Shinn, and S.W. Youn. 2006. Comparison of sebum secretion, skin type, pH in humans with and without acne. *Arch. Dermatol. Res.* 298:113–119.
- 52) Komatsu, N., K. Saijoh, T. Toyama, R. Ohka, N. Otsuki, G. Hussack, K. Takehara, and E.P. Diamandis. 2005. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *Br. J. Dermatol.* 153:274–281.
- 53) Komatsu, N., K. Saijoh, C. Kuk, A.C. Liu, S. Khan, F. Shirasaki, K. Takehara, and E.P. Diamandis. 2007. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp. Dermatol.* 16:513–519.
- 54) Lack, G., D. Fox, K. Northstone, and J. Golding. 2003. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N. Engl. J. Med.* 348:977–985.
- 55) Matsuda, H., N. Watanabe, G.P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi, M. Matsumoto, H. Ushio, S. Saito, P.W. Askenase, and C. Ra. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* 9:461–466.
- 56) Mauro, T., W.M. Holleran, S. Grayson, W.N. Gao, M.Q. Man, E. Kriehuber, M. Behne, K.R. Feingold, and P.M. Elias. 1998. Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch.*

Dermatol. Res. 290:215–222.

- 57) McNally, N.J., H.C. Williams, D.R. Phillips, M. Smallman-Raynor, S. Lewis, A. Venn, and J. Britton. 1998. Atopic eczema and domestic water hardness. *Lancet.* 1352:527–531.
- 58) Meding, B., and G. Swanbeck. 1987. Prevalence of hand eczema in an industrial city. *Br. J. Dermatol.* 116:627–634.
- 59) Moniaga, C.S., S.K. Jeong, G. Egawa, S. Nakajima, M. Hara-Chikuma, J.E. Jeon, S.H. Lee, T. Hibino, Y. Miyachi, and K. Kabashima. 2013. Protease activity enhances production of thymic stromal lymphopoietin and basophil accumulation in flaky tail mice. *Am J Pathol.* 182:841-851.
- 60) Morar, N., W.O. Cookso, J.I. Harper, and M.F. Moffatt. 2007. Filaggrin mutations in children with severe atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 127:1667-1672.
- 61) Murota, H., S. Matsui, E. Ono, A. Kijima, J. Kikuta, M. Ishii, and I. Katayama. 2015. Sweat, the driving force behind normal skin: An emerging perspective on functional biology and regulatory mechanisms. *J Dermatol Sci.* 77:3–10.
- 62) Nakajima, S., B.Z. Igyártó, T. Honda, G. Egawa, A. Otsuka, M. Hara-Chikuma, N. Watanabe, S.F. Ziegler, M. Tomura, K. Inaba, Y. Miyachi, D.H. Kaplan, and K. Kabashima. 2012. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129:1048–1055
- 63) Nylander-Lundqvist, E., and T. Egelrud T. 1997. Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta. Derm. Venereol.* 77:203–206.
- 64) Omori, M., and S. Ziegler. 2007. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J. Immunol.* 178:1396–1404.
- 65) Ong, P.Y., T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R.L. Gallo,

and D.Y. Leung. 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347:1151–1160.

- 66) Palmer, C.N., A.D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S.P. Lee, D.R. Goudie, A. Sandilands, L.E. Campbell, F.J. Smith, G.M. O'Regan, R.M. Watson, J.E. Cecil, S.J. Bale, J.G. Compton, J.J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C.S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L.B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, and W.H. McLean. 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* 38:441–446.
- 67) Rawlings, A.V., and C.R. Harding. 2004. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* 17 Suppl 1:43–48.
- 68) Reinholz, M., T. Ruzicka, and J. Schaubert. 2012. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Ann. Dermatol.* 24:126–135.
- 69) Rochman, I., N. Watanabe, K. Arima, Y.J. Liu, and W.J. Leonard. 2007. Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 178:6720–6724.
- 70) Santulli, R.J., C.K. Derian, A.L. Darrow, K.A. Tomko, A.J. Eckardt, M. Seiberg, R.M. Scarborough, and P. Andrade-Gordon P. 1995. Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:9151–9155.
- 71) Schmid-Wendtner, M.H., and H.C. Korting. 2006. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19:296–302.
- 72) Soumelis, V., P.A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R.A. Kastelein, and T.J. Liu. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by

producing TSLP. *Nat. Immunol.* 3:673–680.

- 73) Stefansson, K., M. Brattsand, A. Ny, B. Glas, and T. Egelrud. 2006. Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biol. Chem.* 387:761–768.
- 74) Stefansson, K., M. Brattsand, D. Roosterman, C. Kempkes, G. Bocheva, M. Steinhoff, and T. Egelrud. 2008. Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *J. Invest. Dermatol.* 128:18–25.
- 75) Steinert, P.M., and L.N. Marekov. 1995. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 270:17702–17711.
- 76) Steinert, P.M., J.S. Cantieri, D.C. Teller, J.D. Lonsdale-Eccles, and B.A. Dale. 1981. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78:4097–4101.
- 77) Steinhoff, M., C.U. Corvera, M.S. Thoma, W. Kong, B.E. McAlpine, G.H. Caughey, J.C. Ansel, and N.W. Bunnett. 1999. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp. Dermatol.* 8:282–294.
- 78) Steinhoff, M., J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenhol, Moormann C, N. Vergnolle, T.A. Luger, and M.D. Hollenberg. 2005. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.* 26:1–43.
- 79) Tanaka, A., S. Muto, K. Jung, A. Itai, and H. Matsuda. 2007. Topical application with a new NF-kappaB inhibitor improves atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. *J. Invest. Dermatol.* 127:855–863.
- 80) Tanaka, A., Y. Amagai, K. Oida, and H. Matsuda. 2012. Recent findings in mouse

models for human atopic dermatitis. *Exp. Anim.* 61:77–84.

- 81) Törmä, H., M. Lindberg, and B. Berne 2008. Skin barrier disruption by sodium lauryl sulfate-exposure alters the expressions of involucrin, transglutaminase 1, profilaggrin, and kallikreins during the repair phase in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 128:1212–1219.
- 82) Watanabe, N., S. Hanabuchi, V. Soumelis, W. Yuan, S. Ho, R. de Waal Malefyt, and Y.J. Liu. 2004. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat. Immunol.* 5:426–434.
- 83) Wilson, S.R., L. Thé, L.M. Batia, K. Beattie, G.E. Katibah, S.P. McClain, M. Pellegrino, D.M. Estandian, and D.M. Bautista. 2013. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell.* 155:285–295
- 84) Wood, L.C., A.K. Stalder, A. Liou, I.L. Campbell, C. Grunfeld, P.M. Elias, and K.R. Feingold. 1997. Barrier disruption increases gene expression of cytokines and the 55 kD TNF receptor in murine skin. *Exp. Dermatol.* 6:98–104.
- 85) Ziegler, S.F. 2010. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr. Opin. Immunol.* 22:795–799.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、様々な方面からご支援・ご教授を賜りました東京農工大学・比較動物医学研究室の田中あかね教授、獣医分子病態治療学研究室の松田浩珍教授、早稲田大学・先進理工学研究室の柴田重信教授、東京農工大学・農学部附属硬蛋白質利用研究室の野村義宏教授、工学部先端健康科学人間行動システム分野の田中秀幸准教授、全南大学校・解剖学研究室の Kim sung-ho 教授、組織学研究室の Moon changjong 教授に深謝いたします。最後に、研究や心的にサポートしてくれた家族、研究室の諸先輩方、研究生、大学院生のみなさんにお礼を申し上げます。