

関節炎により誘導される乾燥皮膚

— モデルマウスを用いたメカニズム解析 —

五藤 健児^{1), 2)}, 大井 一弥²⁾

1) ニチニチ製薬株式会社 中央研究所

2) 鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 臨床薬理学研究室

研究紹介

関節炎により誘導される乾燥皮膚

— モデルマウスを用いたメカニズム解析 —

五藤 健児^{1), 2)}, 大井 一弥²⁾

1) ニチニチ製薬株式会社 中央研究所

2) 鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 臨床薬理学研究室

キーワード： 関節炎, 乾燥皮膚, マスト細胞, 活性酸素, グルココルチコイド, 樹状細胞

要 旨

超高齢社会の進展により関節リウマチ患者は増加しており、一部では乾燥皮膚の発現が確認されている。しかし、乾燥皮膚発現に関する分子レベルの誘導メカニズムの詳細は明らかではない。我々は、関節リウマチを模倣したコラーゲン誘導関節炎マウスを用いて、乾燥皮膚発現の誘導に関わるメカニズムの解明を試みた。乾燥皮膚の発現が誘導された関節炎マウスでは、乾燥皮膚を生じていないコントロールマウスに比べて、マスト細胞から放出されるヒスタミンや樹状細胞によって活性化される Th2 および Th17 細胞から放出されるサイトカインが増加していた。また、それらの増加は活性酸素やグルココルチコイドによって活性化される Thymic stromal lymphopoietin を介して生じることが明らかとなった。これらの乾燥皮膚の誘導メカニズムに関わる因子を抑えることで、関節リウマチ患者に生じる乾燥皮膚症状を緩和することに繋がる可能性が示唆された。

1. はじめに

皮膚は主に最外層の表皮，その下層の真皮，さらに深部に存在する皮下組織から形成される人体における最大臓器である。皮膚には，体内と外界を隔て，生体内の水分を保持する働きや外部刺激から諸器官を守るバリアとしての働きがある。皮膚バリア機能が低下した状態である乾燥皮膚は，経表皮水分喪失量（Transepidermal water loss: TEWL）の上昇や角層水分量の低下がみられることが知られており¹⁾，痒みを生じるきっかけとなる。痒みが繰り返されれば，生じた傷による皮膚感染症の発症や，睡眠障害の誘発など精神的に与える影響も大きい²⁾。

皮膚疾患は，様々な疾患から誘発されることがあるが，我々は炎症性自己免疫疾患として関節リウマチに着目し，乾燥皮膚の誘導にはどのようなメカニズムが関わるのかについて検討してきた。本稿では，筆者の研究成果を中心に我々の研究室におけるこれまでの成果を紹介する。

2. 関節リウマチと皮膚疾患

関節リウマチは遺伝的な要因や微生物感染，ストレス，ホルモンバランスの異常などの様々な因子が原因となって発症する自己免疫疾患である³⁾。世界人口の約1%が罹患し，我が国においては現在およそ80万人の罹患者がいるとされており，高齢化の影響も相まってその数は年々増加の傾向にある。主症状としては関節の炎症および進行性関節破壊があり，主症状のほかにも血管，肺，腎臓，皮下組織などにも病巣が広がる。関節リウマチ患者における皮膚疾患としては，皮膚潰瘍をはじめとして結節や乾皮症など様々である。そのうち，搔痒を呈することや乾燥皮膚が見られることは，臨床では既知の事実として症例報告されているが，その誘導に関するメカニズムは明らかにされていなかった^{4,5)}。

3. 関節炎モデル動物

関節リウマチの病態を網羅したモデル動物は存在しないが，主徴である関節炎を模倣したモデル動物は数多く

存在する。基礎研究にて用いられる代表的なモデルとしては，アジュバント惹起ラットやII型コラーゲン誘導関節炎マウス，大腸菌感作関節炎ウサギなどが挙げられる⁶⁾。なかでも，コラーゲン誘導関節炎モデルは1977年にTrenthamらが発表し，現在では関節リウマチの動物モデルとしてメトトレキサートをはじめとしたリウマチ治療薬の承認時における薬理試験などに頻用されているモデルである^{7,8)}。接種する動物とは異なる種のII型コラーゲンを注射することで，動物体内で抗原抗体反応が起こり，抗原に対する抗体が大量に産生される。産生された抗体は異種II型コラーゲンを抗原として認識・排除する一方で，自身のII型コラーゲンも抗原として認識し，主にII型コラーゲンを構成成分とする関節軟骨が破壊される。我々は，ヒト慢性関節リウマチに酷似し，使用実績も多いコラーゲン誘導関節炎マウスを用いて，乾燥皮膚に関する検討を行った。

4. 関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚に生体内因子が及ぼす影響

(1) 乾燥皮膚発現にマスト細胞がもたらす影響

関節リウマチ患者における滑膜組織ではマスト細胞が増加し，滑液中のトリプターゼおよびヒスタミン濃度が増加したとの報告があることから⁹⁾，関節リウマチの病態にはマスト細胞が関与していることが示唆されている。マスト細胞は炎症やアレルギー反応などの生体防御に重要な役割を持つ免疫担当細胞であり，トリプターゼや炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor (TNF)- α ，interleukin (IL)-6，特異顆粒であるヒスタミンなどを放出する¹⁰⁾。マスト細胞をノックアウトさせることで小腸炎モデルマウスにおける乾燥皮膚が改善したことや¹¹⁾，蕁麻疹治療にマスト細胞を標的とした治療法が期待されていることなどから¹²⁾，マスト細胞の皮膚疾患への関与が示唆でき，関節リウマチにおける乾燥皮膚発現にも関係する可能性がある。

前項で述べたコラーゲン誘導関節炎モデルマウスは抗リウマチ薬の薬理試験の際に用いられるモデル動物であ

るが、乾燥皮膚の評価に適したモデルであるかについては定かではなかった。

そこで我々は、関節リウマチモデルであるコラーゲン誘導関節炎モデルマウスの乾燥皮膚発現の再現性について確認し、関節炎における乾燥皮膚発現へのマスト細胞の影響を以下のように明らかにした。

まず、コラーゲン誘導関節炎を発症させないマウス(コントロールマウス)と比較して関節炎マウスでは TEWL が上昇し、乾燥皮膚が生じたことから、コラーゲン誘導関節炎マウスは乾燥皮膚の評価に適したモデルであると確認した (Fig. 1)。皮膚中のコラーゲンは、マスト細胞から放出されるトリプターゼによって活性化される Matrix metalloproteinase (MMP) によって分解され、TEWL を上昇させる¹¹⁾。関節炎マウスにおける皮膚中の I 型および IV 型コラーゲンは低値であり、それらの分解酵素である MMP-1 および MMP-9 は高値であった (Fig. 2)。さら

に、関節炎マウスの皮膚におけるマスト細胞数および血漿中におけるヒスタミン量は増加していた (Fig. 3)。これらのことから、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に

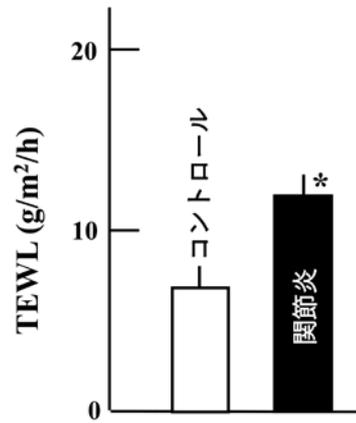


Fig. 1 関節炎マウスにおける乾燥皮膚
除毛処置をした翌日の背部皮膚における Transepidermal water loss (TEWL) を Tewameter[®]TM300 を用いて測定した。Student's *t*-test (n = 5)。* *p* < 0.05。(文献 13 より引用、一部改変)

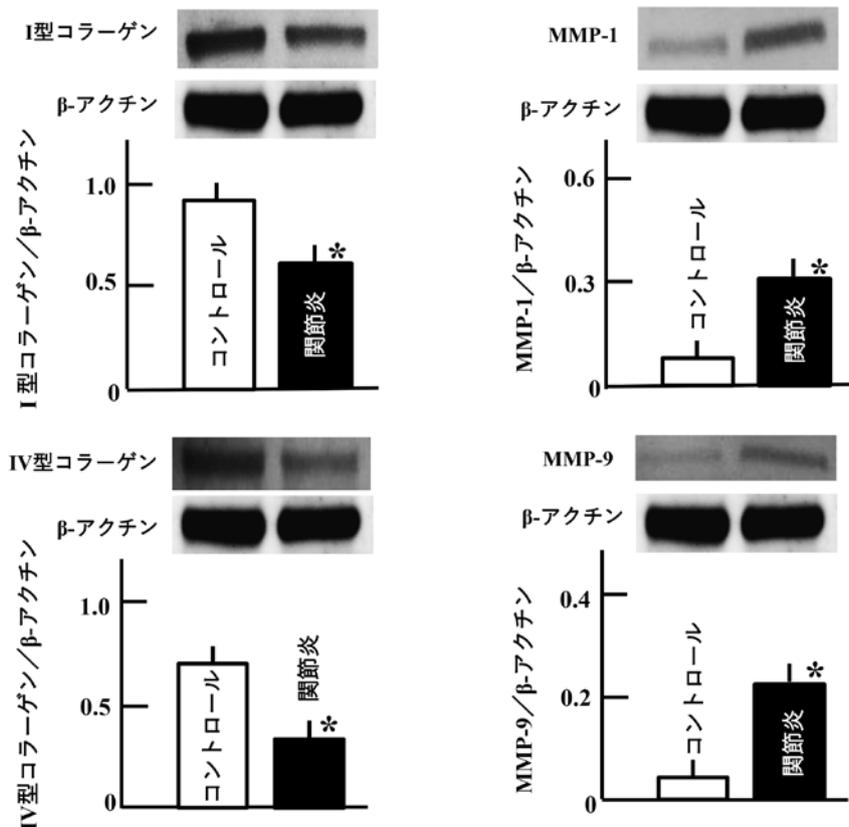


Fig. 2 マウス背部皮膚における I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、MMP-1 および MMP-9 の発現量
ウエスタンブロッティングにより皮膚中の I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、MMP-1 および MMP-9 の発現を lumino-image analyzer を用いて検出し、数値化した。Student's *t*-test (n = 5)。* *p* < 0.05。(文献 13 より引用、一部改変)

マスト細胞の関与が考えられたため、マスト細胞の増殖に関わる c-kit の抗体を 1 日 1 回 4 日間連続で関節炎マウスに投与することで、マスト細胞の増殖阻害による乾燥皮膚への影響を確認した。その結果、上昇していた TEWL を低下させ、関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善した (Fig. 4A)。また、皮膚中の I 型コラーゲンの減少、MMP-1、マスト細胞数およびヒスタミン量の増加が抑制された (Fig. 4B-D)。したがって、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現にマスト細胞の関与が明らかとなった¹³⁾。

(2) 関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚発現にマスト細胞活性化因子が及ぼす影響

関節炎モデルマウスで乾燥皮膚を確認し、その発症にマスト細胞の活性化が関わっていることが明らかになったので、次に、マスト細胞を活性化させる因子の同定を試みた。本項ではいくつか候補を選出し、関節炎における乾燥皮膚への影響についてさらに検討した。

マスト細胞を活性化する因子としては Thymic stromal

lymphopoietin (TSLP)、その上流にある好中球や好中球から出されるとされる Reactive oxygen species (ROS) が予測され¹⁴⁻¹⁶⁾、TSLP はストレスホルモンであるグルココルチコイドからの影響も受ける¹⁷⁾。それら因子の影響を確認するために、1 日 1 回 4 日間連続で抗 TSLP 抗体¹⁸⁾、単回で抗好中球抗体¹⁹⁾、1 日 1 回 4 日間連続で抗酸化物質のグルタチオン前駆体として活性酸素を除去する N-acetyl cysteine (NAC)²⁰⁾、1 日 1 回 4 日間連続でグルココルチコイド受容体遮断薬 (RU486: mifepristone)²¹⁾ をそれぞれ関節炎マウスに投与した。それらの投与により、関節炎マウスにおける皮膚中マスト細胞数は減少し、乾燥皮膚は改善した (Fig. 5A and 5B)。さらに、NAC の投与に加えて RU486 を併用した場合には、より一層の乾燥皮膚の改善と皮膚中マスト細胞数および血漿ヒスタミン濃度の減少効果が得られた (Fig. 5A-C)。したがって、TSLP、好中球、ROS およびグルココルチコイドはマスト細胞を介して、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現を誘導していることが明らかとなった²²⁾。

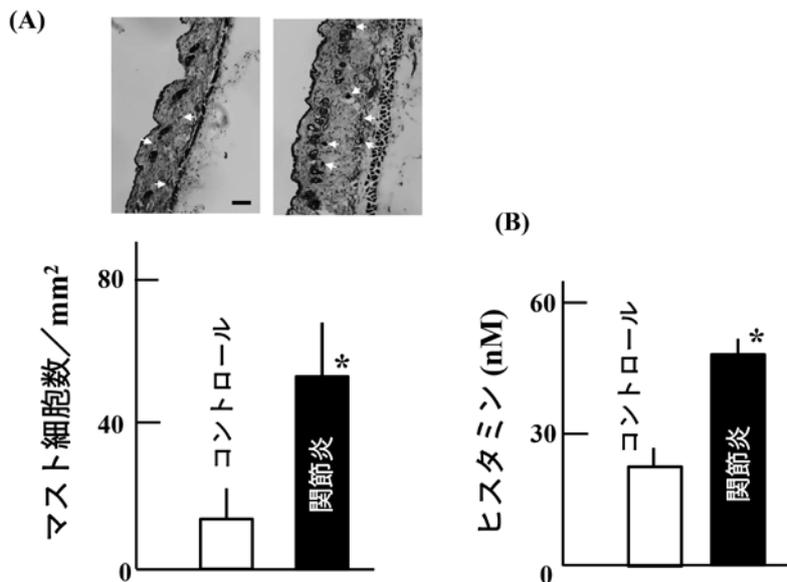


Fig. 3 関節炎マウスの皮膚におけるマスト細胞および血漿ヒスタミン濃度
 (A) 皮膚切片におけるマスト細胞をトルイジンブルー染色により検出した後、発現数を計測した。Scale bar = 200 μ m。 (B) 血漿中のヒスタミン濃度を ELISA により測定した。Student's *t*-test ($n = 5$). * $p < 0.05$ 。(文献 13 より引用、一部改変)

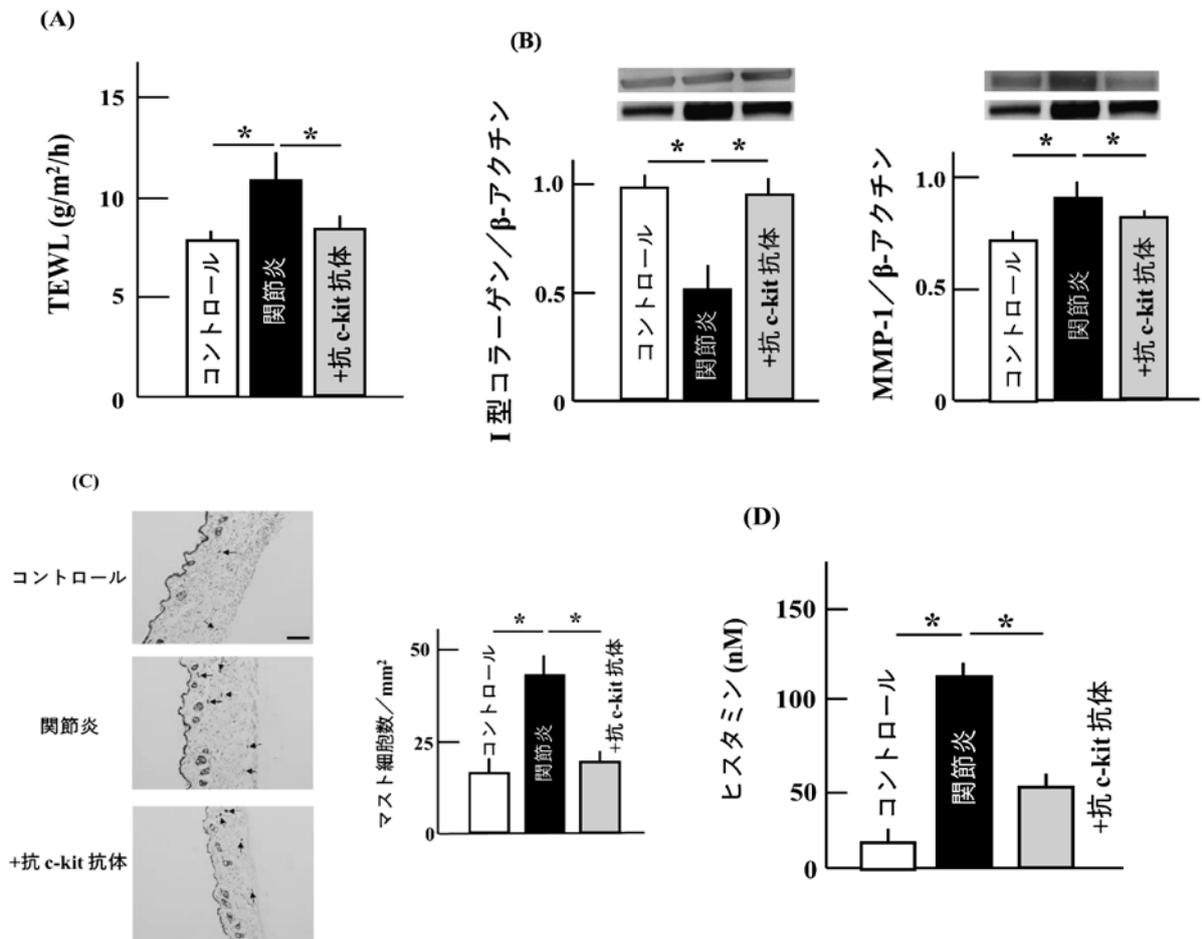


Fig. 4 関節炎マウスにおける抗 c-kit 抗体投与による乾燥皮膚への効果
 (A) 抗 c-kit 抗体を投与し、背部皮膚における TEWL を測定した。(B) ウェスタンブロッティングにより皮膚中の I 型コラーゲンおよび MMP-1 の発現を検出し、数値化した。(C) 皮膚切片におけるマスト細胞をトルイジンブルー染色により検出した後、発現数を計測した。Scale bar = 200 μm。(D) 血漿中のヒスタミン濃度を ELISA により測定した。Tukey's test (n = 5)。* p < 0.05。(文献 13 より引用、一部改変)

(3) 関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚発現に Th2 細胞および Th17 細胞が及ぼす影響

前述までにマスト細胞をはじめ、TSLP や好中球、活性酸素など様々な因子が関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に関わることを明らかにした。我々は TSLP から刺激を受けるマスト細胞以外の免疫担当細胞として樹状細胞に着目し、樹状細胞の刺激により分化する Th2 細胞および Th17 細胞が関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に与える影響を検討した。Th2 阻害薬²³⁾ および Th17 阻害薬²⁴⁾ をそれぞれ 1 日 1 回 4 日間連続で投与した際、関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善された (Fig. 6)。Th2 阻害薬を投与した関節炎マウスでは無投与の関節炎マウ

スと比較して IL-6 および TNF-α が低下していた (Fig. 7A)。また、Th17 阻害薬を投与した関節炎マウスでは、TEWL が低下しており、血中 IL-17 や皮膚中マスト細胞数が減少した (Fig. 7A and 7B)。以上の結果より、樹状細胞により分化が促進されるヘルパー T 細胞といえども、Th2 細胞および Th17 細胞それぞれに異なるメカニズムで乾燥皮膚の発現を誘導することが明らかとなった²⁵⁾。

5. おわりに

本稿では、関節リウマチ患者において症例報告された乾燥皮膚について、我々がこれまで行ってきた関節炎モデルマウスを用いたメカニズム解析について記述した。そ

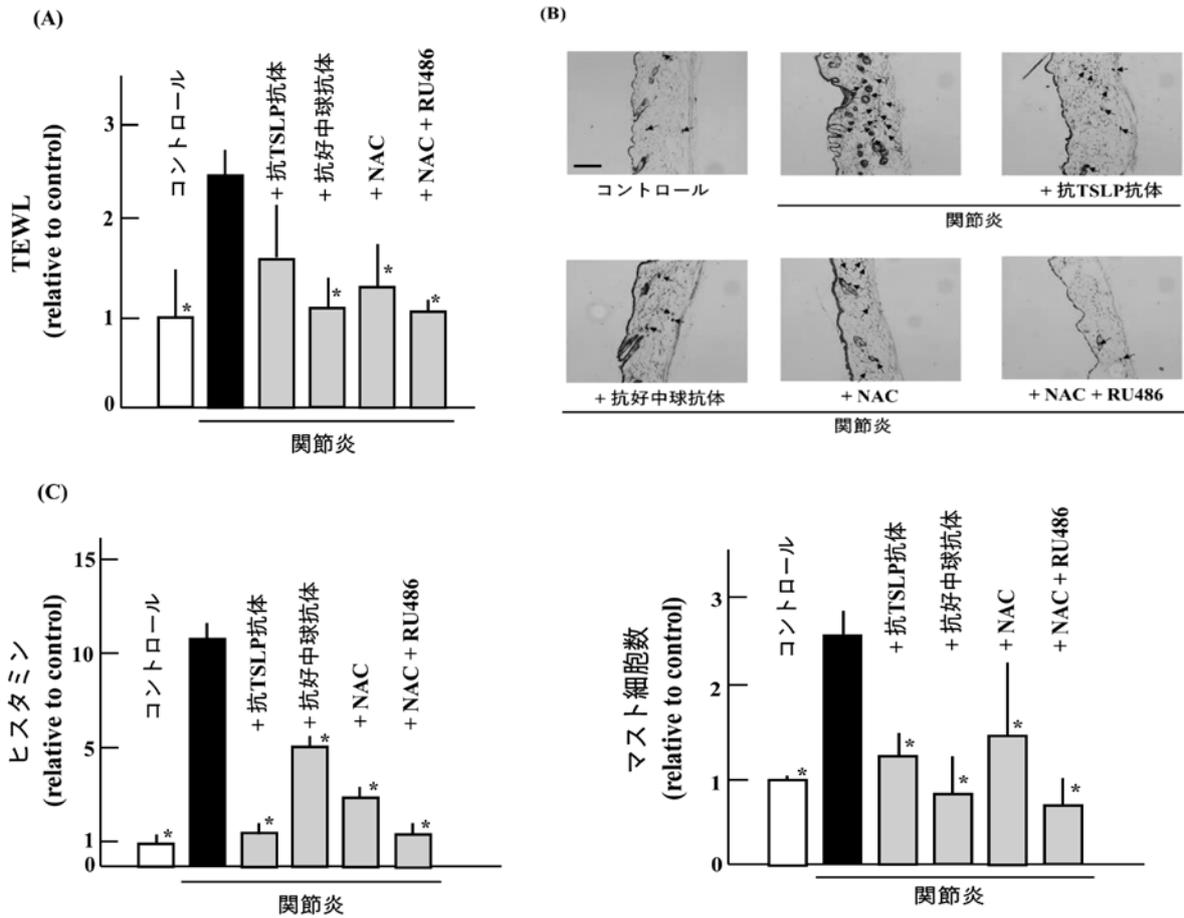


Fig. 5 各試薬投与による TEWL, マスト細胞数, ヒスタミンへの影響

各種抗体および試薬を投与し, (A) 除毛処置した翌日の TEWL を測定した。(B) 皮膚切片におけるマスト細胞をトリジンブルー染色により検出し, 計測した。Scale bar = 200 μ m。(C) 血漿中のヒスタミン濃度を ELISA により測定した。Student's *t*-test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。(文献 22 より引用, 一部改変)

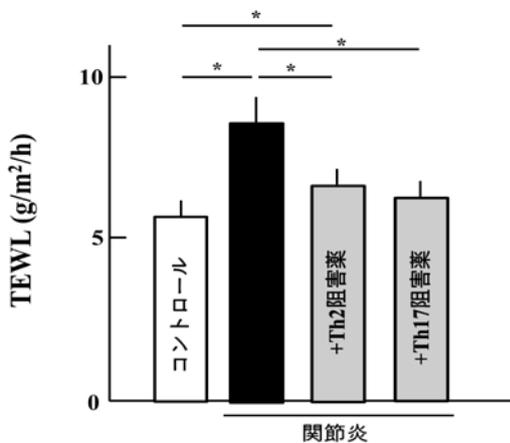


Fig. 6 Th2 阻害薬および Th17 阻害薬の投与による TEWL の変化

阻害剤投与後, 除毛処置翌日の背部皮膚における TEWL を測定した。Tukey's test ($n = 5$)。* $p < 0.05$ 。(文献 25 より引用, 一部改変)

のメカニズムとしては, 活性酸素やグルココルチコイドによって活性化される TSLP を介したマスト細胞から放出されるヒスタミンおよび樹状細胞によって活性化される Th2 および Th17 細胞から放出されるサイトカインの関連が考えられた (Fig. 8)。現在では, 疼痛緩和を目的として利用される非ステロイド性抗炎症薬をマウスに投与することで, 関節炎により誘導される乾燥皮膚が抑制されるかについて検討している。これらの知見により, 関節リウマチ患者に生じる乾燥皮膚症状に対して, 適正な対処方法を講じる有益な情報となり得ることを期待している。

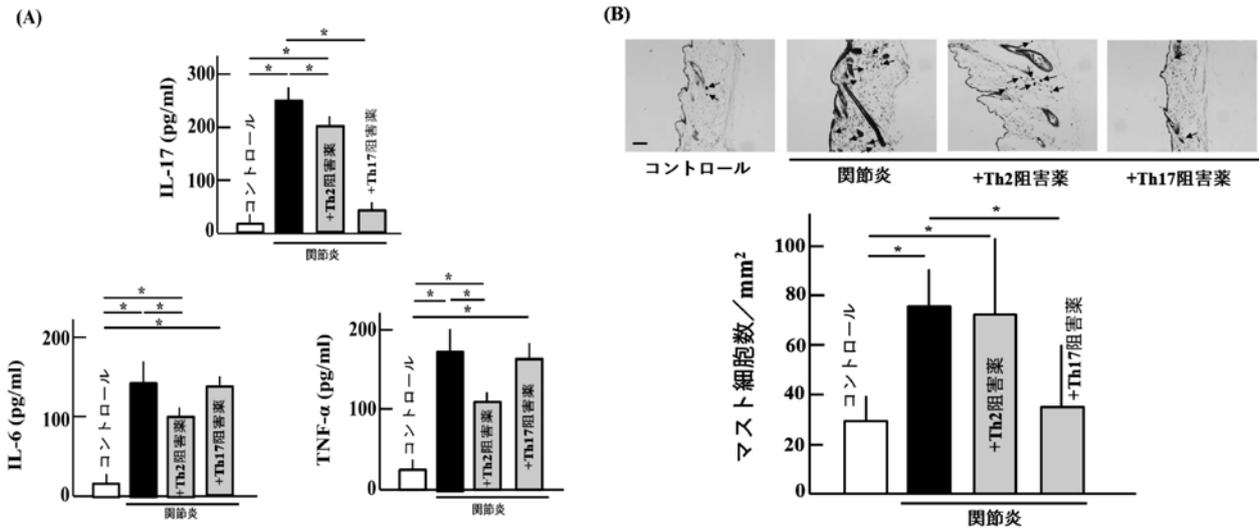


Fig. 7 Th2 阻害剤および Th17 阻害剤投与による血漿中 IL-6, TNF-α および IL-17 および皮膚中マスト細胞への影響
 阻害剤投与後, (A) 血漿中 IL-17, IL-6 および TNF-α 濃度を ELISA により計測した。(B) 皮膚切片におけるマスト細胞をトルイジンブルー染色により検出し, 計測した。Scale bar = 100 μm。Tukey's test (n = 5)。* p < 0.05。(文献 25 より引用, 一部改変)

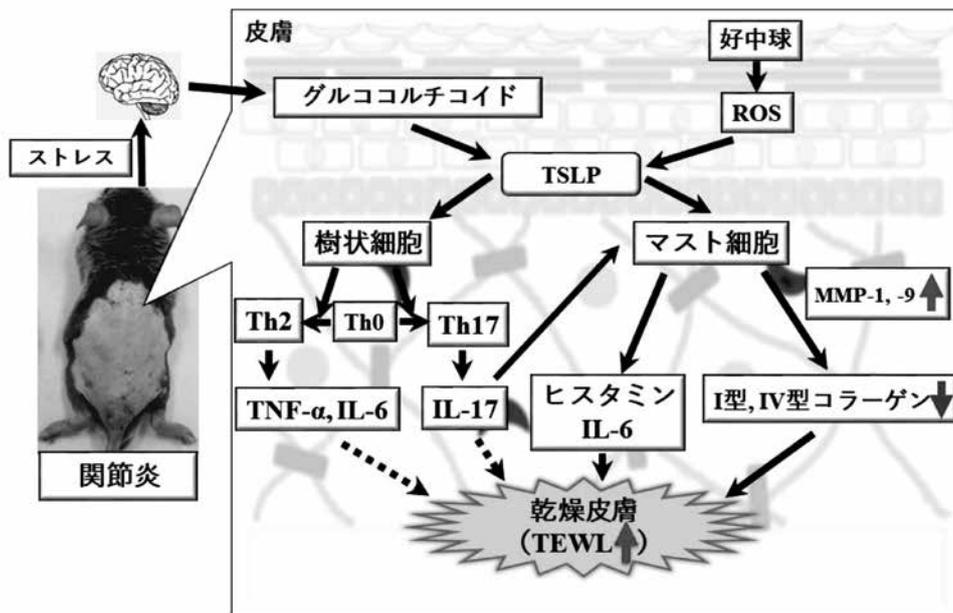


Fig. 8 関節炎マウスにおける乾燥皮膚発現の誘導メカニズム

参考文献

- 1) Miyamoto T, Nojima H, Shinkado T, Nakahashi T, Kuraishi Y. Itch-associated Response Induced by Experimental Dry Skin in Mice. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 88: 285-292.
- 2) Ayres S Jr. THE FINE ART OF SCRATCHING. *JAMA.* 1964; 189: 1003-1007.
- 3) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid Arthritis. *Cell.* 1996; 85: 307-310.
- 4) Lora V, Cerroni L, Cota C. Skin Manifestations of Rheumatoid Arthritis. *G Ital Dermatol Venereol.* 2018;

- 153: 243-255.
- 5) Ghosh SK, Bandyopadhyay D, Biswas SK, Darung I. Mucocutaneous Manifestations in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Cross-sectional Study From Eastern India. *Indian J Dermatol.* 2017; 62: 411-417.
 - 6) 安倍 千之 . 関節炎モデル . 炎症 . 1991; 11: 551-558.
 - 7) Trentham DR. The Twelfth Colworth Medal Lecture. The Adenosine Triphosphatase Reactions of Myosin and Actomyosin and Their Relation to Energy Transduction in Muscle. *Biochem Soc Trans.* 1977; 5: 5-22.
 - 8) 青野 浩之 , 笹野 稔 . 関節リウマチの動物モデル . 臨床リウマチ . 2018; 30: 28-37.
 - 9) Malone DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE, Metcalfe DD. Mast Cell Numbers and Histamine Levels in Synovial Fluids From Patients With Diverse Arthritides. *Arthritis Rheum.* 1986; 29: 956-963.
 - 10) Okayama Y, Hageman DD, Metcalfe DD. A Comparison of Mediators Released or Generated by IFN-gamma-treated Human Mast Cells Following Aggregation of Fc Gamma RI or Fc Epsilon RI. *J Immunol.* 2001; 166: 4705-4712.
 - 11) 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.
 - 12) 岡山 吉道 , 藤澤 大輔 , 山田 賢鎬 , 権 寧博 , 橋本 修 , 浅野 正岳 , 他 . 関節リウマチおよび慢性蕁麻疹におけるマスト細胞を標的とした新規治療法の確立 . 日本大学医学部総合医学研究所紀要 . 2014; 2:15-27.
 - 13) Goto K, Hiramoto K, Kita H, Ooi K. Role of Mast Cells in the Induction of Dry Skin in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis. *Cutan Ocul Toxicol.* 2018; 37: 61-70.
 - 14) Ziegler SF, Roan F, Bell BD, Stoklasek TA, Kitajima M, Han H. The Biology of Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP). *Adv Pharmacol.* 2013; 66: 129-155.
 - 15) Lear JT, Atherton MT, Byrne JP. Neutrophilic Dermatoses: Pyoderma Gangrenosum and Sweet's Syndrome. *Postgrad Med J.* 1997; 73: 65-68.
 - 16) Tang H, Cao W, Kasturi SP, Ravindran R, Nakaya HI, Kundu K, et al. The T Helper Type 2 Response to Cysteine Proteases Requires Dendritic Cell-Basophil Cooperation via ROS-mediated Signaling. *Nat Immunol.* 2010; 11: 608-617.
 - 17) Shibata M, Katsuyama M, Onodera T, Ehama R, Hosoi J, Tagami H. Glucocorticoids Enhance Toll-like Receptor 2 Expression in Human Keratinocytes Stimulated With *Propionibacterium Acnes* or Proinflammatory Cytokines. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 375-382.
 - 18) You H, Li R, Wei C, Chen S, Mao L, Zhang Z, et al. Thymic Stromal Lymphopoietin Neutralization Inhibits the Immune Adjuvant Effect of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate in Balb/c Mouse Asthma Model. *PLoS One.* 2016; 11: e0159479
 - 19) Zhou J, Pham L, Zhang N, He S, Gamulescu MA, Ryan SJ et al. Neutrophils Promote Experimental Choroidal Neovascularization. *Mol Vis.* 2005; 11: 414-424.
 - 20) Hiramoto K, Yamate Y. Gp91phox-derived Reactive Oxygen Species/Urocortin 2/Corticotropin-releasing Hormone Receptor Type 2 Play an Important Role in Long-term Ultraviolet A Eye Irradiation-induced Photoaging. *Photochem Photobiol.* 2016; 92: 180-186.
 - 21) Hiramoto K, Yamate Y, Sato EF. The Effects of Ultraviolet Eye Irradiation on Dextran Sodium Sulfate-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Photochem Photobiol.* 2016; 92: 728-734.
 - 22) Goto K, Hiramoto K, Kawakita M, Yamaoka M, Ooi K. The Influence of Reactive Oxygen Species and Glucocorticoids on Dry Skin in a Mouse Model of Arthritis. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018; 31: 188-197.
 - 23) Yamaya H, Basaki Y, Togawa M, Kojima M, Kiniwa M, Matsuura N. Down-regulation of Th2 Cell-Mediated Murine Peritoneal Eosinophilia by Antiallergic Agents. *Life Sci.* 1995; 56: 1647-1654.
 - 24) Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I,

Kimura A, et al. Transcription Factor Smad-independent T Helper 17 Cell Induction by Transforming-Growth Factor- β Is Mediated by Suppression of Eomesodermin. *Immunity*. 2011; 34: 741-754.

- 25) Goto K, Hiramoto K, Ooi K. Th2 and Th17 Induce Dry Skin in a Mouse Model of Arthritis. *Biol Pharm Bull*. 2019; 42: 468-474.

— プロフィール —

五藤 健児 ニチニチ製薬株式会社中央研究所・研究員 博士（薬学）

〔経歴〕 2020年鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科博士課程修了，2020年ニチニチ製薬株式会社中央研究所研究員。〔専門〕 皮膚薬科学，生理学。

大井 一弥 鈴鹿医療科学大学薬学部・教授 博士（薬学）

〔経歴〕 1986年城西大学薬学部薬学科卒業，2003年名古屋市立大学薬学部研究員，2005年城西大学薬学部病院薬剤学講座助教授，2008年鈴鹿医療科学大学薬学部臨床薬理学研究室教授，2010年同薬学科長（2014年3月まで），2014年鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科教授を兼任，2020年同薬学部長現在に至る。〔専門〕 薬物治療学，皮膚薬科学。

Dry skin induced by arthritis

—Mechanistic analysis by using a mouse model—

Kenji GOTO^{1), 2)}, Kazuya OOI²⁾

1) Central Research Laboratories, Nichinichi Pharmaceutical Co., Ltd.

2) Laboratory of Clinical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science

Key words: Arthritis, Dry skin, Mast cell, Reactive oxygen species, Glucocorticoid, Dendritic cell

Abstract

The number of patients with rheumatoid arthritis (RA) is increasing owing to an increase in life expectancy. Clinical studies have demonstrated that patients with RA may induce dry skin. To date, the mechanism underlying the induction of dry skin in RA patients has not been investigated. This study aimed to demonstrate the induction of dry skin by arthritis in (RA mimic) mice and reveal the underlying mechanisms. Dry skin was induced in mice with arthritis through histamine release from mast cells and cytokine release from Th2 and Th17 cells. Mast cells and T-helper cells were activated by dendritic cells via thymic stromal lymphopoietin, the release of which had been triggered by reactive oxygen species and glucocorticoids. The findings of this study suggest that suppressing these immune factors would alleviate dry skin symptoms in patients with RA.