




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 529 号	氏 名	酒 井 貴 史
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	西園 晃 	
	副査氏名	久保田 直治 	
	副査氏名	西田 欣太 	
<p>論文題目 Defective maintenance of pH of stratum corneum is correlated with preferential emergence and exacerbation of atopic dermatitis-like dermatitis in flaky-tail mice (角層 pH 調節の障害が, flaky-tail マウスにおけるアトピー性皮膚炎様皮膚炎の発症, 増悪に関与している)</p> <p>論文掲載雑誌名 Journal of Dermatological Science</p> <p>論文要旨 表皮角層の pH は通常弱酸性に保たれており、透過性バリア機能や皮膚の炎症と密接に関連している。搔破行動やアルカリ性石鹼の使用、皮膚の炎症などの刺激により角層 pH は上昇し、透過性バリア機能の障害や炎症を惹起する。角層 pH の弱酸性維持はバリア機能の回復促進効果や、アトピー性皮膚炎 (AD) 様皮膚炎発症の予防効果を有することが知られており、角層 pH の弱酸性維持は皮膚の健全性を保つために必須である。角層に存在し角層 pH 調節に寄与するフィラグリン蛋白の遺伝子異常が AD の主な発症因子とされ、フィラグリンおよび <i>matted</i> 遺伝子異常を有する flaky-tail マウス (FTM) は、AD 様皮膚炎を発症しやすいことも知られている。しかしその詳細な発症機序は明確ではないため、FTM における AD 様皮膚炎の発症し易さに角層 pH 調節機能の異常が関与するかの検討を行った。 野生型マウス (WT C57BL/6) と FTM に 1,1,3,3-tetramethylguanidine (TMG) を塗布し角層 pH を上昇させ、pH 値の回復能や皮膚の反応等について生理学的、組織化学的、生化学的、免疫学的解析により比較した。 明らかな皮膚炎を生じていない生後 7-8 週の時点でのマウスを検討に用いた。定常状態ではフィラグリン蛋白の低下にも関わらず、WT より FTM の角層 pH がやや酸性側に傾いていたが、TMG 単回塗布による角層 pH 上昇刺激後、FTM では角層 pH の回復が WT に比べて明らかに遅延していた。フィラグリン以外の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 1 (NHE1) が、FTM では定常状態で既に発現が増強しており、TMG 外用に対する NHE1 の反応が WT に比べて低下していた。これが FTM の角層 pH 回復遅延の原因の一つと考えられた。24 時間毎の TMG 連続塗布により FTM では角層 pH が一貫して上昇し、二週間の TMG 長期塗布によって、表皮のセリンプロテアーゼ活性および thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の発現増強を伴う皮膚炎が FTM でのみ誘発された。さらに TMG を長期塗布された FTM では TMG 外用部位以外の皮膚炎および血清 IgE、TSLP その他のケモカイン値の上昇が認められた。 本研究は、FTM という角層 pH の調節機能に異常があり、pH 上昇刺激後の角層 pH が高値で推移する結果、全身性の AD 様皮膚炎が惹起される特殊なマウスを用いることで、FTM における AD 様皮膚炎発症のし易さに、遺伝的背景を基礎とした角層 pH 調節機能の低下が関与している可能性を示めたものである。FTM の角層 pH の調節機能はフィラグリンのみならず <i>matted</i> 遺伝子異常によることも考えられるが、AD の病態研究・治療戦略に新たな視座を提供するものと考えられ、FTM におけるアトピー性皮膚炎用の発症、増悪に、角層 pH 調節の異常が関与していることを明らかにしたものであり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

審査区分 課・論	第529号	氏名	酒井貴史
審査委員会委員	主査氏名	西園晃	
	副査氏名	久保田直治	
	副査氏名	西田欣広	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <p>主査</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ADとAD様皮膚炎の違いとterminologyの使い分け</li> <li>2. 実験に使用したマウスの妥当性（系統、遺伝子学的背景、純系性）、飼育時の食餌の影響について</li> <li>3. ADにおける皮膚常在細菌叢の性状変化、皮膚のバリア機能を担う微生物の影響</li> <li>4. ウロカニン酸による皮膚バリア機能維持の役割</li> <li>5. アトピー発症における環境因子の重要性とその意義づけ</li> <li>6. ヒトにおけるフィラグリン遺伝子異常と発現蛋白量、正常の違い</li> <li>7. 皮膚の病理組織学的変化を肉眼的に変化のみられる眼瞼でなく側腹部皮膚で評価したのは何故か</li> <li>8. フィラグリン、matted遺伝子以外に病態に影響を与える遺伝子の可能性について</li> <li>9. 将来の治療に向けた展望</li> </ol> <p>副査1</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 角層の酸性がSPase活性を抑制し、逆に角層の中和がSPase活性化を刺激するという論文を引用しているが、そのメカニズムは？</li> <li>2. 角層のpH中和剤としてのTMGの塗布方法の規格化について</li> <li>3. TMG塗布後の角層pHの回復率を塗布直後でなく、塗布後1時間の値を基準としているがなぜか</li> <li>4. Fig. 1の角層pHは、角層のhydrationおよびwater lossの値と相関すると思われるが見解は</li> <li>5. Fig. 4の(a)角層pHと(c)皮膚厚を比較したとき、WTおよびFTMにおけるvehicleおよびTMGの計4種類とも結果が全く同じ傾向を示しているが、矛盾は無いのか</li> </ol> <p>副査2</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. フィラグリンの角質における作用と保湿因子の関係</li> <li>2. フィラグリン遺伝子、matted遺伝子異常</li> <li>3. 定常状態でのフィラグリン蛋白の発現が免疫やウェスタンブロットにより確認されているか</li> <li>4. 定常状態でFTMはWTより酸性になっているが、出生時はどうか</li> <li>5. WTにTMGを塗布して角質pHは上昇してくるのか。Agingとの関係はどうか</li> <li>6. フィラグリンKOマウスでは皮膚炎の自然発症も高IgE血症との関連もなかったとの報告に対する見解は</li> <li>7. Matted遺伝子異常については現在どこまで解明されているか</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、学位申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 酒井 貴史

## 論 文 題 目

Defective maintenance of pH of stratum corneum is correlated with preferential emergence and exacerbation of atopic-dermatitis-like dermatitis in flaky-tail mice

(角層 pH 調節の障害が、flaky-tail マウスにおけるアトピー性皮膚炎様皮膚炎の発症、増悪に關与している)

## 要 旨

緒言：表皮の最外層である角層の pH は、通常弱酸性に保たれており、透過性バリア機能や皮膚の炎症と密接に關連している。癢破行動やアルカリ性石鹼の使用、皮膚の炎症など様々な刺激によって角層 pH は上昇し、透過性バリア機能の障害や炎症を惹起する。一方で、角層 pH の弱酸性維持は、動物実験でバリア機能の回復促進効果や、アトピー性皮膚炎 (AD) 様皮膚炎発症の予防効果を有することが知られており、角層 pH の弱酸性維持は健常な皮膚を保つために必須と考えられている。角層に存在するフィラグリン蛋白の分解産物は、角層 pH 調節に寄与する因子の一つであるが、近年、フィラグリン遺伝子異常が AD の主な発症因子であることが示された。さらにフィラグリンおよび *matted* 遺伝子異常を有する flaky-tail マウス (FTM) は、AD 様皮膚炎を発症しやすい事が確認されている。しかしその詳細な発症機序は未だ明確ではない。そこで、FTM における AD 様皮膚炎の発症し易さに角層 pH 調節機能の異常が關与する、との仮説を立て、研究を行った。

研究対象及び方法：Wild-type マウス (WT, C57BL/6) と FTM に、1,1,3,3-tetramethylguanidine (TMG);

細胞毒性や炎症等の刺激なしに角層 pH を上昇させる事が確認されている)を塗布し角層 pH を上昇させ、pH 値の回復能や皮膚の反応等を解析、比較した。尚、FTM は加齢に伴い自然に AD 様皮膚炎を発症することが知られており、皮膚炎自体が角層 pH に影響を及ぼしうるため、本研究では AD 様皮膚炎発症前の FTM を使用した。

結果：生後 7-8 週の時点で FTM は明らかな皮膚炎を生じていないことを確認し、週齢 7-8 週以下のマウスを用いて各実験を行った。定常状態では、フィラグリン蛋白の低下にも関わらず、WT より FTM の角層 pH がやや酸性側に傾いていた。しかし、TMG 単回塗布による角層 pH 上昇刺激後、FTM では角層 pH の回復が WT に比べて明らかに遅延していた。フィラグリン以外の角層 pH 調節因子である Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 1 (NHE1) が、FTM では定常状態で既に発現が増強しており、TMG 外用に対する NHE1 の反応が WT に比べて低下していた。この事が FTM の角層 pH 回復遅延の原因の一つであると考えられた。24 時間毎の TMG 連続塗布により FTM では角層 pH が一貫して上昇し、二週間の TMG 長期塗布によって、表皮のセリンプロテアーゼ活性および thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の発現増強を伴う皮膚炎が FTM でのみ誘発された。さらに TMG を長期塗布された FTM では TMG 外用部位以外の皮膚炎および血清 IgE、TSLP、thymus and activation-regulated chemokine 値の上昇が認められた。

考察：FTM は角層 pH の調節機能に異常があり、pH 上昇刺激後の角層 pH が高値で推移する結果、全身性の皮膚炎、即ち AD 様皮膚炎が惹起されることを確認した。FTM はフィラグリンのみならず *matted* 遺伝子異常を有している。したがって、本研究は AD の主要な発症因子であるフィラグリン遺伝子異常と角層 pH 調節異常との直接的な関連性については言及できない。しかしながら、FTM における AD 様皮膚炎発症のし易さに、遺伝的背景を基礎とした角層 pH 調節機能の低下が関与している可能性を示した本研究は、AD の病態研究、治療戦略に新たな視座を提供するものと考えた。

結語：FTM におけるアトピー性皮膚炎様皮膚炎の発症、増悪に、角層 pH 調節の異常が関与していることを明らかにした。