

研究課題：乳酸菌によるアトピー性皮膚炎発症制御機構の解析

| | |
|-----|---|
| 著者 | 古賀 貴之 |
| 雑誌名 | 第一薬科大学研究年報 |
| 号 | 32 |
| ページ | 28-35 |
| 発行年 | 2016-03-31 |
| URL | http://id.nii.ac.jp/1154/00000043/ |



原 著

平成 27 年度 第一薬科大学・若手研究者奨励金
研究計画報告書

研究課題：乳酸菌によるアトピー性皮膚炎発症制御機構の解析

古賀 貴之
第一薬科大学 衛生化学分野

Lactobacilli aggravate atopic dermatitis via regulation of hepatic PPARalpha
expression.

Takayuki Koga
*Laboratory of Hygienic Chemistry, Daiichi University of Pharmacy,
22-1, Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511, Japan*

1. 諸言

アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, AD) は強い痒みを伴いながら慢性の経過をたどる湿疹病変である。日本や欧米諸国などの先進国を中心に多数の患者が存在しているおり¹⁾、その発症率は子供において 7~30%、大人では 1~10%程度であると推定されている²⁻⁶⁾。AD は全身いたるところで発症するが、特に顔や腕などの露出部における発症は、患者やその家族にとって精神的および肉体的負担が大きく、生活の質 (quality of life) の低下を招く危険性が高まることが危惧されている⁷⁾。AD の発症機構については多くの報告がなされており、未解明な点が残されているものの、特にひっかき行動や外部環境因子の刺激による皮膚のバリア機能障害、遺伝的素因、免疫応答反応の攪乱等の機構が中心となって発症すると考えられている^{6, 8-14)}。しかし、これら AD 発症機構に関する先行研究の多くは病変組織である皮膚組織を中心に検討が展開されており、皮膚 - 他臓器間相互作用など他臓器による皮膚 AD 症状の制御に着目した検討はほとんどなされていない。そのため、AD 発症機構の更なる解明を目指した研究において、多臓器間相互作用の観点からのアプローチは新しい知見を得るうえで重要であると考えられる。

また、上述の通り AD 発症機構について多くの報告がなされているものの、未解明な点が残されていることや、発症機構そのものの複雑さから、現在 AD 発症機構を標的とした根治に向けた治療法の確立には至っていない。そのため、現在用いられている AD 治療法は、根治を目指したものではなく、日本皮膚科学会のアトピー性皮膚炎治療ガイドラインに沿って皮膚の炎症、掻痒、皮膚の乾燥に対する治療、悪化因子の除去、心理

的アプローチや生活指導などの対症療法を中心に行われている¹⁵⁾。中でも、薬物療法は主として実施されている治療法であり、抗炎症性ステロイド薬や免疫抑制薬が汎用されている^{3, 8, 16, 17)}。しかしこの治療法は、症状の緩和と悪化を繰り返す可能性、継続的に治療を行う必要性、副作用の惹起等の問題を内包しており、患者への負担の少ない治療法とは言い難い^{3, 17-20)}。また、薬物療法以外の治療法として、食事や環境因子など AD 発症に関与すると考えられている悪化因子の除去療法も汎用されているが、有効性は症例や報告により大きな差があることから、その実施法などについて更なる検討を必要としている²¹⁻²⁴⁾。このような背景により、AD の根治に向けた新規治療法の確立は喫緊の課題であると考えられている。これに関して、昨今新たな AD 治療法としての乳酸菌の有用性が着目されている²⁵⁾。その作用機構として経口摂取された乳酸菌による腸内常在細菌叢 (腸内フローラ) の調節/改善が重要であると考えられている²⁶⁻²⁹⁾。しかし、腸管内で発生する乳酸菌の腸内フローラへの影響が、どのような機構によって病変組織である皮膚へと伝播し AD 症状の抑制/改善に寄与するかについては未だ明らかにされていない。経口摂取された乳酸菌そのものが腸管内で吸収され、病変部である皮膚へと到達し直接作用するとは考えにくく、腸管から皮膚に至る間に何らかの介在因子がその情報伝達に関与していることが想定される。一般に腸管膜で吸収された栄養物質等は門脈を経て、先ず肝臓に辿り着き、その後皮膚を含めた全身へと伝播することが知られている。そのため、腸管内の腸内フローラと皮膚との相互作用を考えるにあたって、肝臓は重要な介在組織であると考えられる。これらの背景の下、我々は乳酸菌による腸内フローラの調節を情報として皮膚組織へと伝達する介在因子は、肝臓からの何らかの制御を受ける、もしくは肝臓に影響を与えているとの作業仮説を立て、腸管 - 肝臓 - 皮膚連関について検討を行っている。その中で本研究では、特に肝臓 - 皮膚連関について、乳酸菌経口投与による肝臓内核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) への影響に着目し検討を行ったので報告する。

2. 方法

1) 動物実験

本研究では、AD 自然発症モデルマウスである NC/Nga マウス (日本 SLC 株式会社) を用いた。乳酸菌投与実験では 6 週齢 NC/Nga マウスに乳酸菌 *Lactobacillus Gasseri* (*L. Gasseri*, 福岡大学 微生物薬品化学教室 見明史雄教授ならびに鹿志毛信広教授より供与) を 1×10^4 CFU/g 体重の投与量にて 2 もしくは 10 週間連続経口投与し、最終投与 24 時間後にマウスより肝臓を摘出し実験に供した。乳酸菌非投与実験では 10 週齢 NC/Nga マウスについて、自由摂水/摂餌条件下の下 6 週間飼育し、肝臓並びに血清の採取を行い実験に供した。飼育期間中は一週間ごとに皮膚症状の重症度スコアを算出

した。重症度スコアは4項目（紅斑・発赤、痂皮・乾燥、浮腫、傷・組織欠損）について各4段階（無症状；0、軽症；1、中等症；2、重症；3）にて採点を行い、それらの合計値（12点満点）より算出した。また、解剖日当日のそれら合計値に応じて無症状群（None）、軽度群（Mild）、中等度群（Moderate）、重症度群（Severe）の4群への振り分けを行い、以下の実験に供した。

2) PCR

摘出した肝臓について、Total RNAを抽出後、それを鋳型としてcDNAを合成し、real-time PCR法にて標的遺伝子の発現量の測定を行った。

3) 肝トリグリセリド測定

肝臓からの総脂質の抽出はFolchらの方法³⁰⁾の変法を用いた。PBSにて20%肝ホモジネートを作成後、4倍量のFolch reagent（クロロホルム：メタノール=2：1）を添加し、1時間激しく攪拌を行った。遠心分離後（3,000 rpm、10分、4°C）、クロロホルム層を回収し遠心エバポレーターにて溶媒留去した。得られたサンプルは使用まで-30°Cにて保存した。トリグリセリド測定に際し、サンプルはIsopropanol (containing 10% Triton X-100)にて再溶解後、市販のキット（トリグリセリド テスト-E ワコー）を用いて肝トリグリセリド含量の測定を行った。

4) 血清メタボローム解析

採取した血清150 µLに内標準物質を添加後、750 µLの60%メタノール（-20°C）を添加し30分間激しく攪拌した。遠心分離後（12,000 rpm、15分、4°C）、上清を回収し、遠心エバポレーターにて溶媒留去した。得られたサンプルは使用まで-30°Cにて保存した。使用時には、50%アセトニトリルに再溶解しLC-TOF-MS（九州大学分子衛生薬学専攻分野 山田教授）に付して、positive ion mode 及び negative ion modeにて測定を行った。得られた結果はMarker Lynx ソフトウェアを用いて解析を行った。

3. 結果・考察

1) L. Gasseri によるAD症状への影響

今回用いたAD自然発症モデルマウスであるNC/Ngaマウスは、個体差はあるものの、生後8週齢前後からADが発症することが知られている^{31,32)}。そこで本研究ではAD発症前である6週齢よりL. Gasseriの投与を行い、L. GasseriによるAD発症/進行度や重症度への影響を観察した。その結果、L. Gasseriの経口投与はAD皮膚症状の悪化を惹起することが確認されたが（Fig. 1A）、体重増加並びに肝臓重量に対しては

影響を及ぼさなかった (Fig. 1B, C)。一方、L. Gasseri 投与による AD 症状の重症化と肝臓 *Ppar* 各分子種の mRNA 発現量との相関性を検討した結果、*Ppara* 発現量の AD 重症度依存的な有意な発現の抑制 ($p=0.0012$, Fig. 1D)、並びに *Ppar β/δ* 発現量の有意な発現の増加が観察された ($p=0.0003$, Fig. 1D)。しかし、AD 重症度依存的な *Ppar γ* 発現量の変動は観察されなかった ($p=0.0910$, Fig. 1D)。これらの結果より、L. Gasseri の経口摂取は AD 症状の増悪を惹起する可能性が示唆された。しかし、Chen らは過去に L. Gasseri 種の AD などのアレルギー疾患抑制への有効性を報告しており³³⁾、L. Gasseri の AD に対する効果には本研究と先行研究では差異がある。本研究ではこの差異の原因を明らかにすることはできなかったが、その一因として種差による影響の違いが推測される。すなわち、本研究では AD モデルマウスを用いたのに対し、Chen らはヒトを対象として検討を行っていることから、これら種差が差異の一因であると考えられる。しかし、種差で結論付けるのは早計であり、L. Gasseri の AD 症状への影響については、投与方法や投与スケジュール、対象生物の種差・系統差など、各種条件に関して更なる検討を慎重に行う必要があると考えられる。

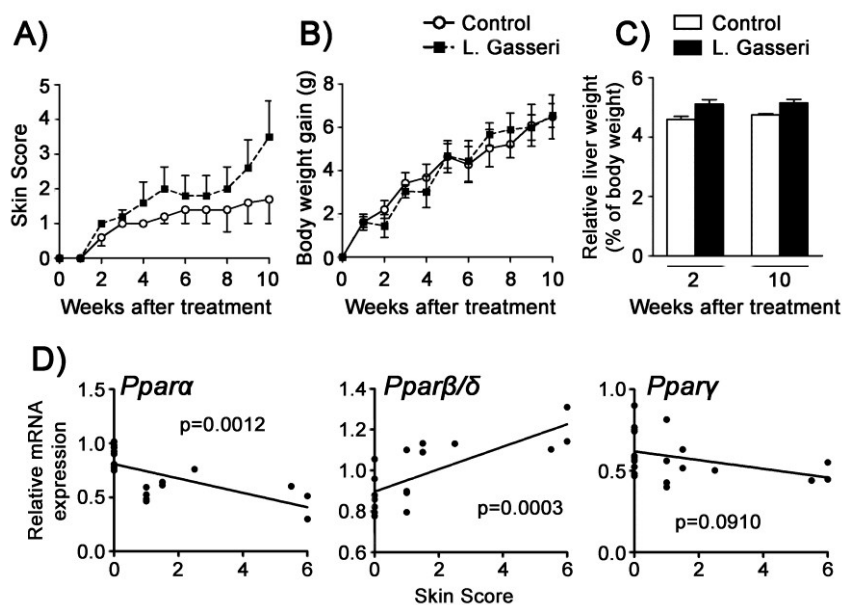


Fig. 1. Oral administration of L.Gasseri exacerbates symptom of AD.

(A) Disorder of skin with AD was exacerbated by treatment with L. Gasseri. (B) L.Gasseri did not affect to changes in the body weight of NC/Nga mice. (C) L.Gasseri did not affect to liver weight of NC/Nga mice. (D) *Ppara* and *Ppar β/δ* mRNA expression were suppressed and induced respectively, with AD severity-dependent manner. The plots in panel A and B, and the bars in panel B, represent the mean \pm S.E. of 5 mice. Open circle and bar represent control group, and closed circle and bar represent L. Gasseri-treated group, respectively.

2) AD 重症度による肝 PPAR 発現量の影響

AD 重症度依存的な肝 *Ppara* mRNA 発現抑制並びに *Ppar β/δ* mRNA 発現増加が観察されたことから、続いて AD 重症度が肝 PPAR に及ぼす影響について更なる検討を行

った。本節では、乳酸菌による影響を排除するために乳酸菌の投与は行わず、異なる AD 症状重症度の NC/Nga マウスを用いて検討を行った。なお、本節で用いたマウスは AD 重症度スコアに応じて 4 群 (1 群 8-11 匹) に分けたが、AD 重症度について群間で良好な差異が観察されている (Fig. 2A)。これらマウスについて肝重量を測定したところ、乳酸菌投与実験 (Fig.1C) と同様に、AD 重症度依存的な肝重量の変化は観察されなかった (Fig. 2B)。一方、肝 *Ppara* mRNA 発現量は乳酸菌投与実験 (Fig. 1D) と同様に AD 重症度依存的な発現抑制が観察されたのに対し、*Ppar β/δ* mRNA は乳酸菌投与実験とは異なり AD 重症度依存的な発現変動は観察されなかった (Fig. 1 D and 2C)。これらの結果より、肝 *Ppara* は AD 重症度依存的かつ乳酸菌非依存的な発現制御を受けるのに対し、肝 *Ppar β/δ* は乳酸菌、少なくとも *L. Gasseri* 依存的な発現制御を受ける可能性が示唆された。一般に、PPAR α は肝臓において脂質代謝の制御に関与することが知られている³⁴⁾。そこで、AD 重症度と脂質代謝の関連性を検討するために肝トリグリセリド含量の測定を行った。その結果、AD 重症度依存的な肝トリグリセリド含量の減少が観察された (Fig. 2D)。これらの結果より、AD はその症状依存的な PPAR 分子種特異的な発現の変動並びにそれを介した脂質代謝異常を惹起する可能性が示唆された。

3) AD 症状依存的肝 PPAR 発現変動の制御因子の探索

AD 症状依存的な肝 *Ppara* mRNA 発現の抑制が観察されたことから、皮膚 - 肝臓間には、皮膚の AD 重症度に関する情報 (シグナル) を肝臓へと伝え、肝 *Ppar* の発現を調節する何らかのシグナル伝達機構が存在すると考えられる。一般にホルモンなどを介した *paracrine/ endocrine* 様式の情報伝達において、血液がそれら情報伝達因子の輸送に寄与することが知られている。そこで我々は、血液中の何らかの構成成分/因子が皮膚 - 肝臓間情報伝達因子として働き、AD 症状依存的な肝 PPAR 発現変動を惹起するとの仮説を立て検討を行っている。本研究では、血液中に多種多様に存在する因子の中でも特に血液中の生体内低分子化合物 (生体内代謝物など) に着目し、メタボローム解析の手法を用いて AD 重症度依存的な変動が観察される低分子化合物の網羅的な解析を試みた。PCA プロットを用いた解析では、ある程度の AD 重症度依存的な低分子化合物発現プロファイルの変動が確認された (Fig. 3A)。さらにこのプロファイルの変動について解析を行った結果、AD 重症度依存的に有意に増加したイオンが *m/z* 204.1232 のイオンなど 4 種類、減少したイオンが *m/z* 230.1527 のイオンなど 22 種類、それぞれ観察された (Fig. 3B)。しかしながら、本年度の研究ではこれら変動が観察されたイオンの同定や、肝 PPAR 発現変動や AD 重症化への関与の有無については検討するに至らなかった。そこで、次年度はこのメタボロームの解析結果に基づき、これらについて更なる検討を行うことを予定している。

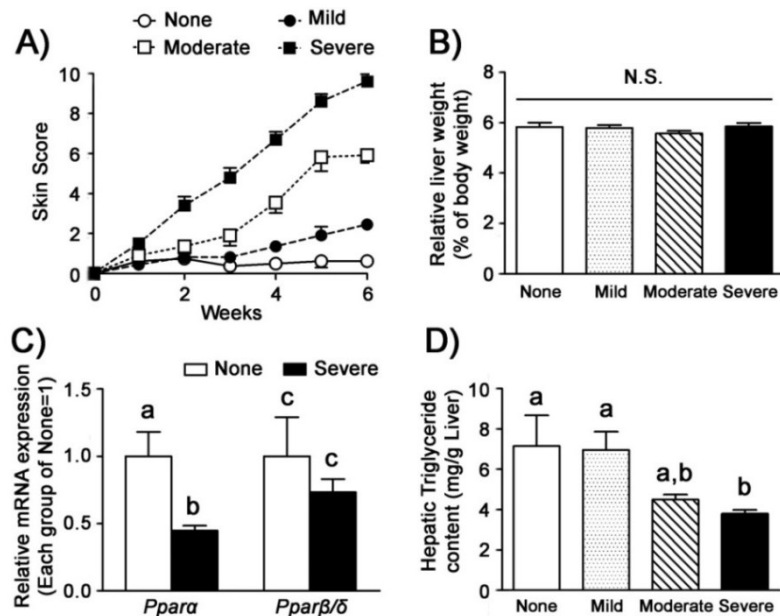


Fig. 2. *Ppara*, but not *Pparβ/δ*, is suppressed with the severity of AD-dependent manner.

(A) The NC/Nga mice were divided in four groups with severity of AD skin disorder. (B) The severity of AD skin disorder did not affect to liver weight of NC/Nga mice. (C) The severity of AD skin disorder suppressed hepatic *Ppara* mRNA expression, but not *Pparβ/δ*, of NC/Nga mice. (D) Hepatic Triglyceride contents were reduced with AD severity-dependent manner. The plots in panel A, and the bars in panel B and D, represent the mean \pm S.E. of 8-11 mice, and the bars in panel C represent the mean \pm S.E. of 3 mice. In panel A, open circle, closed circle, open square and closed square represent “None” group, “Mild” group, “Moderate” group, and “Severe” group, respectively. In panel B, C and D, the open bar, shaded bar, slashed bar and closed bar represent “None” group, “Mild” group, “Moderate” group, and “Severe” group, respectively.

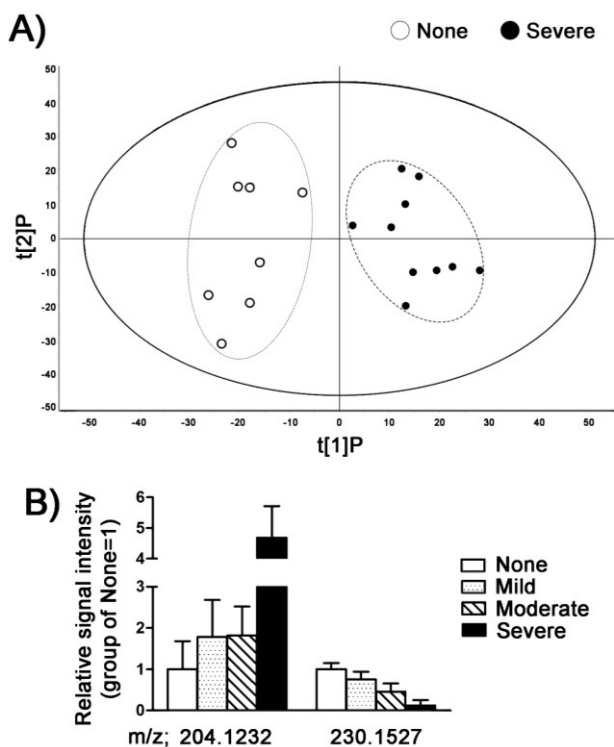


Fig. 3. Severity of AD symptoms induce metabolome profile of sera obtained from NC/Nga mice.

(A) PCA score map, obtained by LC-TOF-MS analysis, for the metabolome profile of serum in “None” (white, outlined with solid line) and “Severe” (black, outlined with dotted line); analysis in a negative ion mode (n=8-11/group). (B) The ions, m/z 204.1232 and 230.1527, were increased and decreased, respectively, with severity of AD symptoms-dependent manner. The bars represent the mean \pm S.E. of 8-11 mice,

4. 終わりに

本研究では、AD 症状の重症化は肝 PPAR の発現量の分子種特異的な変動を惹起することを明らかにした (Fig. 1 and 2)。現在、PPAR と AD 症状の関連については多くの報告がなされているが³⁵⁻³⁷⁾、それらの多くは皮膚の PPAR の活性化と AD 症状の改善の関係性に着目したものであり、AD と肝 PPAR の関連性に着目した報告はほとんどなされていない。そのため、肝 PPAR による AD の制御など、AD 発症機構における肝 PPAR の役割などについては未解明な点が多く残されている。これらより、AD による肝 PPAR 分子種特異的制御機構の解明は、今までとは異なるアプローチからの AD 発症機構の理解の一助となると予想される。さらに、肝 PPAR を新規治療標的とした AD 治療薬の開発等に今後発展していく可能性も十分にあると考えられる。

また、本研究で行ったメタボローム解析は、変動が観察されたイオンの同定などについて、更なる検討を必要としている。しかし、これらの解析を進めることにより、AD 症状の増悪/改善に関与する因子の特定やそれに基づく治療法の開発を可能にすると考えられる。加えて、これらの結果は他の網羅的解析手法と組み合わせることにより (トランスオミクス技術等)、新たな AD 発症機構の提唱も可能であると考えられ、この点について今後検討を重ねていくことを予定している。

参考文献

1. Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, Asher I, Beasley R, Björkstén B, Burr M, Clayton T, Crane J, Ellwood P, Keil U, Lai C, Mallol J, Martinez F, Mitchell E, Montefort S, Pearce N, Shah J, Sibbald B, Strachan D, von Mutius E and Weiland SK. *J Allerg Clin Immunol*, 103: 125-138 (1999).
2. Ortiz de Frutos FJ, Torrelo A, de Lucas R, Gonzalez MA, Alomar A, Vera A, Ros S, Mora AM and Cuervo J. *Actas Dermosifiliogr*, 105:487-496 (2014).
3. Ibler KS and Jemec GB. *Expert Opin Investig Drugs*, 24:61-68 (2015).
4. Flohr C and Mann J. *Allergy*, 69:3-16 (2014).
5. Harskamp CT and Armstrong AW. *Semin Cutan Med Surg*, 32:132-139 (2013).
6. Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I and Hamid QA. *J Clin Invest*, 113:651-657 (2004).
7. Finlay AY. *J Am Acad Dermatol*, 45:S64-S66 (2001).
8. Wolter S, Price HN. *Pediatr Clin North Am*, 61:241-260 (2014).
9. Auriemma M, Vianale G, Amerio P and Reale M. *Eur Cytokine Netw*, 24:37-44 (2013).
10. Brandt EB and Sivaprasad U. *J Clin Cell Immunol*, 10: 2 (2011).
11. Guttman-Yassky E, Nograles KE and Krueger JG. *J Allergy Clin Immunol*, 127:1110-1118 (2011).

12. Boguniewicz M and Leung DY. *Immunol Rev*, 242:233-246 (2011).
13. Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, Mitsui H, Cardinale I, de Guzman Strong C, Krueger JG and Guttman-Yassky E. *J Allergy Clin Immunol*, 130:1344-1354 (2012).
14. Baker BS. *Clin Exp Immunol*, 144:1-9 (2006).
15. 山本昇壮ら 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2004 改訂版 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン改訂委員会(古江増隆ら) 日本皮膚科学会雑誌 114,135-142 (2004)
16. Walling HW and Swick BL. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 28:99-117 (2010).
17. Schmitt J, Schäkel K, Schmitt N and Meurer M. *Acta Derm Venereol*, 87:100-11 (2007).
18. Fukaya M, Sato K, Sato M, Kimata H, Fujisawa S, Dozono H, Yoshizawa J and Minaguchi S. *Drug Healthc Patient Saf*, 6:131-138 (2014).
19. Belloni B, Andres C, Ollert M, Ring J and Mempel M. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 8:423-427 (2008).
20. Furue M, Terao H, Rikihisa W, Urabe K, Kinukawa N, Nose Y and Koga T. *Br J Dermatol*, 148:128-133 (2003).
21. Atherton DJ, Sewell M, Soothill JF, Wells RS and Chilvers CE. *Lancet*, 1: 401-403 (1978).
22. Neild VS, Marsden RA, Bailes JA and Bl and JM. *Br J Dermatol*, 114:117-123 (1986).
23. Oosting AJ, de Bruin-Weller MS, Terreehorst I, Tempels-Pavlica Z, Aalberse RC, de Monchy JG, van Wijk RG and Bruijnzeel-Koomen CA. *J Allergy Clin Immunol*, 110:500-506 (2002).
24. Koopman LP, van Strien RT, Kerkhof M, Wijga A, Smit HA, de Jongste JC, Gerritsen J, Aalberse RC, Brunekreef B and Neijens HJ. *Am J Respir Crit Care Med*, 166:307-313 (2002).
25. Elazab N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Quizon A and Forno E. *Pediatric*, 132:e666-676 (2013).
26. Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ and Isolauri E. *Gut*, 51:51-55 (2002).
27. Romagnani S. *Clin Immunol Immunopathol*, 80:225-235 (1996).
28. Ouwehand AC. *J Nutr*, 137:794S-797S (2007).
29. Ogden NS and Bielory L. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5:179-184 (2005).
30. Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH. *J Biol Chem*, 226:497-509 (1957).
31. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW and Ra C. *Int Immunol*, 9:461-466 (1997).
32. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, Ogawa H and Ra C. *Int Arch Allergy Immunol*, 120 Suppl 1:70-75 (1999).
33. Chen YS, Jan RL, Lin YL, Chen HH and Wang JY. *Pediatr Pulmonol*. 45:1111-1120 (2010).
34. Chinetti G, Fruchart JC and Staels B. *Inflamm Res*, 49:497-505 (2000).
35. Kuenzli S and Saurat JH. *Br J Dermatol*, 149:229-236 (2003).
36. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W and Reichrath J. *Am J Clin Dermatol*, 9:15-31 (2008).
37. Schmuth M, Jiang YJ, Dubrac S, Elias PM and Feingold KR. *J Lipid Res*, 49:499-509 (2008).