

105. ざ瘡の発症機序の解明

大日 輝記

香川大学 医学部 皮膚科学

Key words : 上皮-免疫微小環境 (EIME), ざ瘡, Th17, LXR, p38-MAP キナーゼ

結 言

ざ瘡 (にきび) は患者が多く市場規模が最も大きい皮膚疾患のひとつである。毛包漏斗部の角化異常、脂腺の活性化、*Cutibacterium acnes* の増殖を特徴とするが、必ずしも一元的な感染症に当たらない。各種の外用や内服治療が行われるものの、治療面で 30 年以上大きな進展がない。毛包脂腺系を場とする点、ステロイドや免疫抑制剤でむしろ誘発される点で、他の炎症性皮膚疾患と大きく異なり、病態の理解も十分に進んでいるとはいえない。

ざ瘡は、好中球の遊走や T ヘルパー (Th) 17 型リンパ球の活性化を伴う慢性炎症である点、レチノイドによる角化の正常化が治療に結びつく点で、毛包間上皮を場とする炎症性疾患である乾癬に似ている。我々は動物モデルを用いて、上皮細胞の TRAF6 経路の活性化が乾癬の必要条件であること、p38-mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化が十分条件となることを示し[1, 2]、上皮を中心とする微小環境が慢性炎症の回路を形成することを提案した[3]。

ざ瘡の臨床面での知見と、これまでの研究成果をふまえ、1. ざ瘡は顔面の毛包の微小環境における慢性炎症の回路形成で生じる、2. 毛包漏斗部や脂腺導管の上皮細胞が回路の中心となる、3. 上皮細胞の細胞内シグナルと脂質代謝の相互作用の病的破たんが疾患の本態であり、治療標的となる可能性がある、と考えた。

本研究では、脂質代謝経路の肝臓 X 受容体 (LXR) 経路に着目し、動物モデル、および初代培養細胞を用いて、上皮細胞の炎症性メディエーターの産生と脂質代謝の相互作用を明らかにし、ざ瘡の発症機序の解明に結びつける。

方 法

1. 動物モデル

皮膚炎のモデルとして、Toll 様受容体 (TLR) 7 のリガンドであるイミキモドの塗布による皮膚炎を用いた。10%イミキモド (ベセルナ®クリーム、持田製薬株式会社) 計 10 mg を 1 日 1 回、マウスの耳介に連日外用した。LXR 経路の活性化に、LXR アゴニストである GW3965 (Selleck Biotech Inc.) の 10 mM エタノール溶液または溶媒のエタノールのいずれか 20 μ L を 1 日 1 回、マウスの耳介に連日外用した。耳介の肥厚をシクネスゲージ (株式会社テクロック) で測定した。

2. 初代培養細胞

マウスの初代培養ケラチノサイトを以下の手順で用意した。新生マウスの皮膚を採取し、1 U/mL ディスパーゼ処理を 4°C で一晩行い、真皮から表皮を分離した。表皮を細かく裁断し、0.05%トリプシンで 37°C 5 分間の処理により細胞浮遊液とした。低カルシウム EMEM 培地 (0.05 mM Ca^{2+} 、8%キレート化ウシ胎児血清) で培養した。刺激の 24 時間前に無血清培地に交換し解析を行った。

3. 統計解析

実験群の測定値を平均値±標準偏差で示した。2 群間の有意差を one-way ANOVA で検定し、P 値が 0.05 未満を有意とした。検定には GraphPad Prism 8 を用いた。

結果および考察

1. 皮膚の LXR の遺伝子発現は炎症により低下する

皮膚や腸管など、外界に接する臓器では、上皮を中心とする微小環境の相互関係が、生体防御や炎症の恒常性を担っていると考えられている [1]。慢性炎症性皮膚疾患のうち、尋常性乾癬や化膿性汗腺炎といった疾患は、Th17 型免疫と好中球性炎症によって特徴づけられる。皮膚の p38-MAP キナーゼの活性化は、乾癬型の炎症の十分条件となり、皮膚の p38-MAP キナーゼの活性化が持続する回路が形成されると考えられる [3]。尋常性ざ瘡も同様に、Th17 型免疫と好中球性炎症によって特徴づけられるため、皮膚の 17 型炎症の機序を明らかにすることで、ざ瘡の発症機序やその治療標的を明らかにすることができる可能性がある。

肝臓 X 受容体 (LXR) は核内受容体のひとつである。とくに、コレステロールの代謝調節に中心的な役割を果たす。一方、マクロファージを対象とした解析では、LXR 経路の活性化が、コレステロールトランスポーターの ABCA1 の発現を介して、マクロファージの活性化に関わる NF- κ B 経路の活性化を阻害することが報告されている。また、慢性炎症性皮膚疾患の尋常性乾癬を対象としたトランスクリプトーム解析では、LXR のサブユニットである LXR α 、LXR β の遺伝子発現が、健常部に比べて病変部の皮膚で低下していることが報告されている。

以上より皮膚でも、上皮細胞の活性化と、LXR 経路の活性化が相互制御の関係にあり、この恒常性の破たんによって、乾癬やざ瘡などの慢性炎症がおこるのではないかと考えた。

皮膚の 17 型炎症における LXR 経路の役割を明らかにするため、乾癬の動物モデルとして用いられている、イミキモド皮膚炎を用いて解析を行った。イミキモド皮膚炎の病変部の皮膚を採取し、LXR のサブユニットである LXR α (*Nr1h3*)、LXR β (*Nr1h2*) の遺伝子発現を測定したところ、いずれの発現も健常皮膚に比べて低下していた (図 1)。

以上より、ヒトの乾癬の病変部皮膚と同様、マウスの皮膚でも LXR の発現が 17 型炎症により低下しており、17 型炎症が LXR 経路を抑制している可能性が示唆された。

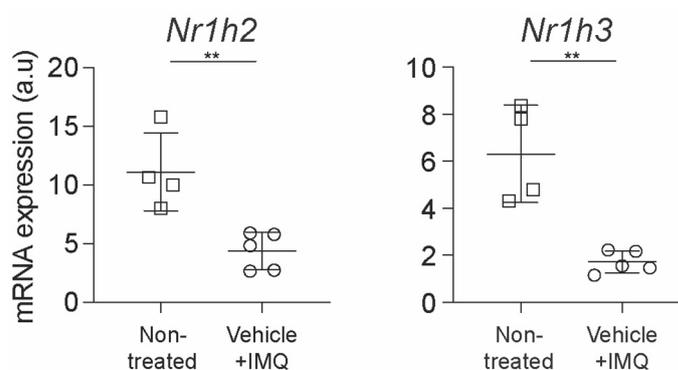


図 1. 皮膚炎の誘導は脂質代謝受容体 LXR の遺伝子発現を抑制する
マウスの耳介の皮膚にイミキモドまたは基剤を連日塗布し、7 日後に LXR α (*Nr1h3*)、LXR β (*Nr1h2*) の遺伝子発現を測定した (** $P < 0.001$)。

2. 皮膚の LXR 経路の活性化はイミキモド塗布による皮膚炎を抑える

次に、皮膚の LXR 経路の活性化が 17 型炎症におよぼす影響を検討した。イミキモド皮膚炎の誘導に際して、LXR のアゴニストである GW3965、または基剤を同じ部位に塗布して、耳介厚を測定し、皮膚炎の程度を耳介厚の変化で評価した。LXR アゴニストを連日塗布した群では、基剤を塗布した群に比べて、耳介の肥厚が減弱した (図 2)。

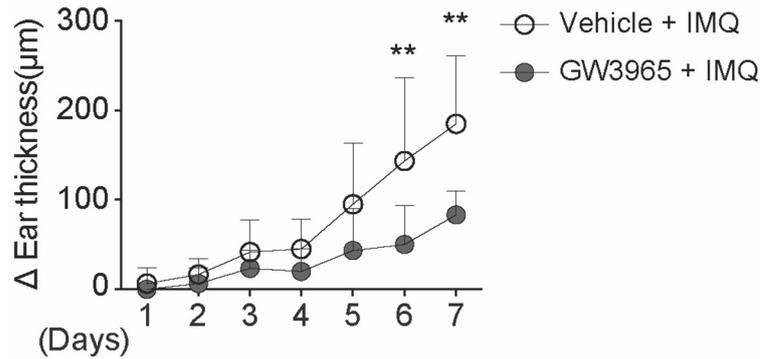


図2. LXR リガンドの GW3965 はイミキモドの塗布による皮膚炎を減弱させる
マウスの耳介の皮膚に、イミキモドと同時に、GW3965 または基剤を連日塗布し、
耳介の肥厚を計測した (** $P < 0.001$)。IMQ : イミキモド塗布群。

3. 皮膚の LXR 経路の活性化は炎症初期の好中球浸潤を抑える

LXR の活性化の影響を病理組織学的にも評価した。イミキモド皮膚炎では表皮の肥厚と炎症細胞の浸潤がみられる。LXR アゴニストを連日塗布した群では、基剤を塗布した群に比べて、表皮の肥厚も炎症細胞の浸潤も減弱した (図 3a)。

イミキモド皮膚炎は、好中球の浸潤と、インターロイキン (IL) -17 の産生を伴う 17 型の炎症で特徴づけられる。フローサイトメトリーを用いて病変部の好中球浸潤を評価したところ、LXR アゴニストを連日塗布した群では、基剤を塗布した群に比べて、第 3 日目の好中球の浸潤が少なかった (図 3b)。

以上の検討結果より、皮膚の LXR 経路の活性化は、乾癬やざ瘡で見られるような好中球浸潤を抑える可能性が示唆された。

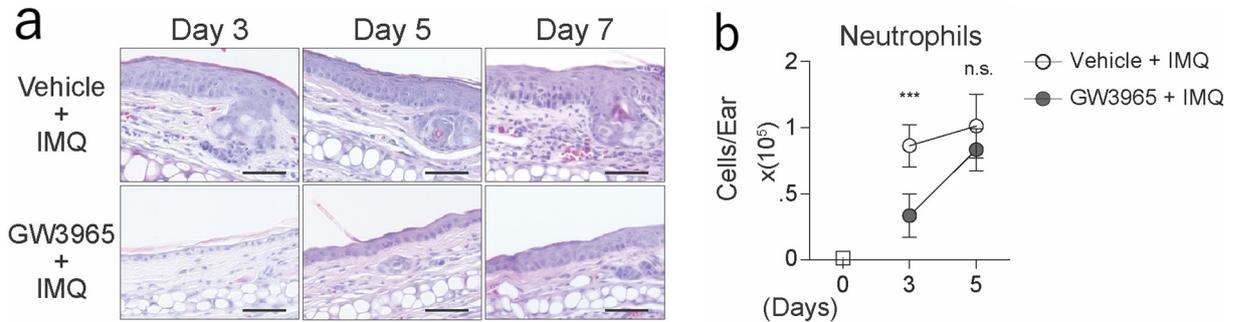


図3. GW3965 はイミキモドの塗布による 17 型炎症、好中球性炎症を抑制する

- イミキモド皮膚炎の第 3、5、7 日目の病変部の耳介皮膚の病理組織像。ヘマトキシリン-エオジン染色 (スケールバー : $50 \mu\text{m}$)。IMQ : イミキモド塗布群。
- イミキモド皮膚炎の第 0、3、5 日目の病変部の好中球分画 ($\text{CD}64^+$ 、 GR-1^+ 、 F4/80^+ 、 CD11b^+) の耳介当たり細胞数 (***) $P < 0.0001$ 。IMQ : イミキモド塗布群。

4. 皮膚の LXR 経路の活性化は炎症性ケモカインやサイトカインの産生を抑える

イミキモド皮膚炎を誘導して第 3 日目の病変部での遺伝子発現を測定した。LXR アゴニストを連日塗布した群では、基剤を塗布した群に比べて、LXR 反応遺伝子である *ABCA1* の発現誘導がみられた。 $\text{T}_\text{H}17$ 型サイトカインである IL-17a や、 $\text{T}_\text{H}17$ の活性化を促す IL-23 のサブユニットである IL-23p19、また $\text{T}_\text{H}17$ 細胞を表皮に遊走させるケモカインの *CCL20* の遺伝子発現が有意に低下していた (図 4)。

以上の検討結果より、皮膚の LXR 経路の活性化は、皮膚の 17 型炎症を抑える可能性が示唆された。

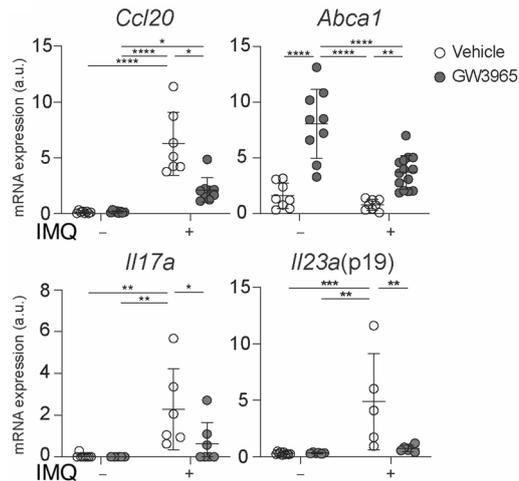


図4. GW3965 はイミキモド皮膚炎の 17 型炎症を抑える

イミキモド皮膚炎の第3日目の病変部の遺伝子発現を逆転写定量的 PCR で測定した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$)。IMQ : イミキモド塗布群。

5. ケラチノサイトの LXR 経路の活性化は炎症性メディエーターの発現や p38-MAP キナーゼの活性化を抑える

ここまでの検討結果より、表皮のケラチノサイトの LXR 経路が活性化することで、17 型炎症が低下すると仮説を立てた。LXR アゴニストの GW3965 の有無の条件下にイミキモドで刺激したマウス初代培養ケラチノサイトでは、炎症性メディエーターの遺伝子発現も、p38-MAP キナーゼの活性化も、LXR 経路の活性化で減弱した一方、LXR 反応遺伝子である *ABCA1* の発現誘導がみられた (図5)。

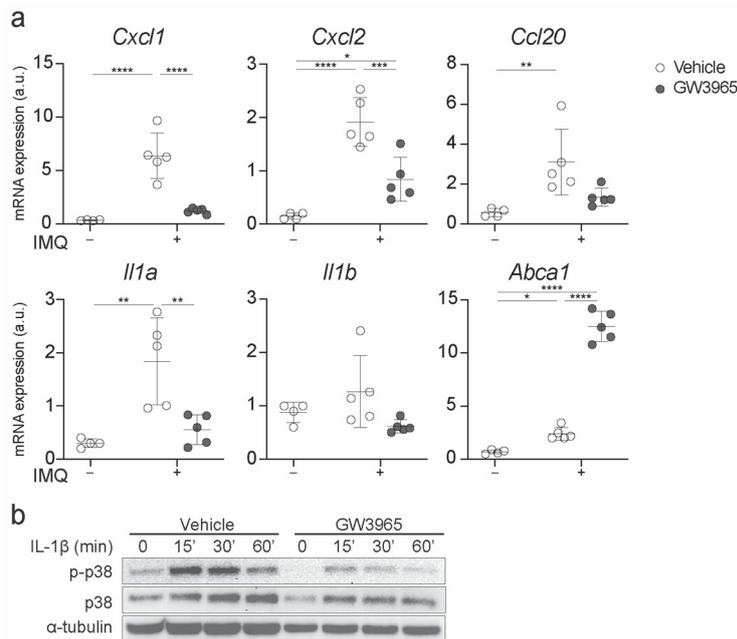


図5. GW3965 はマウス初代培養ケラチノサイトの炎症性の活性化を抑える

- マウス初代培養ケラチノサイトの遺伝子発現を逆転写定量的 PCR で測定した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$)。IMQ : イミキモド。
- マウス初代培養ケラチノサイトを IL-1 β 組換え体で刺激し、p38-MAP キナーゼのリン酸化をウエスタンブロッティングで経時的に評価した。

6. LXR 経路の活性化はヒトのケラチノサイトでも炎症性メディエーターの発現を負に制御する

さらに、ヒトのケラチノサイト細胞株である HaCaT でも同様の検討を行った。IL-1 β 刺激による各種炎症性メディエーターの産生は、LXR アゴニストの GW3965 により減弱した一方、*ABCA1* の発現誘導がみられた (図 5)。

以上より、ヒトでも、ケラチノサイトの LXR 経路の活性化が、炎症を抑制する可能性が示唆された。

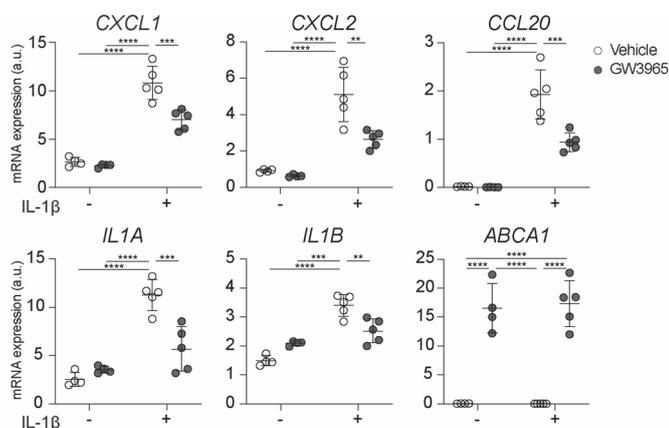


図 6. GW3965 はヒトのケラチノサイト細胞株の炎症性の活性化を抑える
IL-1 β 刺激による HaCaT の遺伝子発現を逆転写定量的 PCR で測定した
(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.001$ 、*** $P < 0.0001$)。IMQ : イミキモド。

以上の研究成果より、ケラチノサイトの LXR 経路は、定常状態において p38-MAP キナーゼ経路の制御を介して炎症を制御している可能性が示唆された。この制御機構の毛包脂腺系上皮細胞での破綻が、ざ瘡の発症に関与する可能性について、検討する価値があることが本研究によって示された [4]。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科皮膚科学の Masayuki Otsuka、江川形平、石田雄大、Zachary Chow、朝比奈良太、三宅俊哉、野村尚史、鬼頭昭彦、椛島健治、順天堂大学大学院医学研究科生化学第一講座の横溝岳彦である。

文献

- 1) Matsumoto R, Dainichi T, Tsuchiya S et al: Epithelial TRAF6 drives IL-17-mediated psoriatic inflammation. *JCI Insight*. 2018 Aug 9;3(15):e121175. eCollection 2018 Aug 9. PMID: 30089718 DOI: 10.1172/jci.insight.121175
- 2) Sakurai K, Dainichi T, Garcet S et al: Cutaneous p38 mitogen-activated protein kinase activation triggers psoriatic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Oct;144(4):1036-1049. PMID: 31378305 DOI: 10.1016/j.jaci.2019.06.019
- 3) Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A et al: The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol*. 2018 Dec;19(12):1286-1298. PMID: 30446754 DOI: 10.1038/s41590-018-0256-2
- 4) Otsuka M, Egawa G, Dainichi T et al: Cutaneous Liver X Receptor Activation Prevents the Formation of Imiquimod-Induced Psoriatic Dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2022 Apr;142(4):1233-1237.e1. PMID: 34555417 DOI: 10.1016/j.jid.2021.08.432