

皮膚傷害が消化管に及ぼす影響の検討

たねもと りな
種本 理那

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

目次

第1章	緒言	1
第1節	他臓器と腸管の関連性	1
第2節	腸管と皮膚の解剖学的な共通点	3
第3節	本検討における仮説と目的	4
第2章	各種皮膚傷害モデルの作製	6
第1節	目的と各種モデルの説明	6
第2節	方法	8
第1項	動物	8
第2項	慢性機械的皮膚傷害モデル作成	8
第3項	MC903 アトピー性皮膚炎モデルの作製	9
第4項	Croton oil (刺激性接触皮膚炎)モデルの作製	9
第5項	統計学的処理	9
第3節	CMS の結果	10
第1項	腸管長結果	10
第2項	病理結果	10
第4節	MC903 アトピー性皮膚炎モデルの結果	11
第5節	Croton oil (刺激性接触皮膚炎)モデルの結果	11

第1項	腸管長結果	11
第2項	病理結果	11
第6節	考察	12
第3章	CMSモデルでの腸管透過性および腸管免疫に与える影響	13
第1節	目的	13
第2節	方法	14
第1項	動物とモデル作成	14
第2項	腸管透過性試験	14
第3項	小腸の mRNA の抽出および RT-qPCR 法	14
第4項	病理標本の免疫染色と CAE 染色の方法	16
第5項	フローサイトメトリーによる各種細胞の解析	17
第6項	統計学的処理	19
第3節	結果	20
第1項	腸管粘膜透過性試験結果	20
第2項	小腸の mRNA 発現結果	20
第3項	小腸病理標本の免疫染色と CAE 染色の結果	21
第4項	フローサイトメトリーによる各種細胞の解析結果	21
第5項	考察	23

第4章	慢性機械的皮膚傷害(短期)モデルの検討	24
第1節	目的	24
第2節	方法	25
第1項	動物	25
第2項	慢性機械的皮膚傷害(短期)モデルの作製	25
第3項	小腸病理観察	25
第4項	小腸の mRNA の抽出及び RT-PCR 法	25
第5項	皮膚病理観察	26
第6項	皮膚の mRNA の抽出及び RT-PCR 法	26
第7項	血漿ヒスタミン濃度測定	26
第8項	フローサイトメトリーによる各種細胞の解析方法	27
第9項	統計学的処理	27
第3節	結果	27
第1項	腸管長結果	27
第2項	病理結果	28
第3項	小腸の mRNA 発現結果	28
第4項	皮膚病理観察結果	28
第5項	皮膚の mRNA 発現結果	29

第6項	血漿ヒスタミン濃度結果	30
第7項	フローサイトメトリーによる各種細胞の解析結果	30
第8項	考察	31
第5章	CMSの腸管形態変化への肥満細胞の関与の検討	32
第1節	目的	32
第2節	方法	33
第1項	動物	33
第2項	肥満細胞阻害剤投与モデルの作製	33
第3項	病理観察	34
第4項	腸管透過性試験	34
第5項	統計学的処理	34
第3節	結果	34
第1項	腸管長結果	34
第2項	病理結果	35
第3項	腸管透過性試験結果	35
第4節	考察	35
第6章	CMSの腸管形態変化へのIL-13の関与	36
第1節	目的	36

第2節	方法	37
第1項	動物	37
第2項	抗IL-13抗体投与モデルの作成	37
第3項	統計学的処理	38
第3節	結果	38
第1項	小腸長結果	38
第2項	病理結果	38
第3項	考察	39
第7章	CMSの腸管形態変化へのアポトーシスの関与	39
第1節	目的	39
第2節	方法	39
第1項	動物	39
第2項	TUNEL染色	39
第3項	統計学的処理	40
第3節	結果	40
第1項	TUNEL陽性細胞数結果	40
第2項	考察	40
第8章	考察	41

第1節	慢性機械的皮膚傷害による腸管への影響	41
第2節	本モデルにおける神経系への影響	45
第3節	本検討の展望	47
第9章	結論	47

謝辞

略語一覧

引用文献

附記

図表

第1章 緒言

第1節 他臓器と腸管の関連性

消化管は消化・吸収の場として重要な役割を果たしているのみならず、体内における最大の免疫器官としての様々な役割が近年明らかとなってきた。特に腸内細菌を中心とした消化管免疫が、消化管のみならず他臓器にも影響し、全身の健康状態を左右する(1)。腸管と他臓器の関連として代表的なものに腸脳軸(gut-brain axis) が知られているが(2)、他にも腸肝軸(gut-liver axis)(3)や腸腎軸(gut-kidney axis) (4)に加え、皮膚と腸管の双方向的な関連を示す腸皮膚軸(gut-skin axis) という概念も提唱されている(5-7)。

小腸は、管腔側から単層円柱上皮である腸管上皮、粘膜固有層、粘膜筋板により形成されている。粘膜上皮の表面には粘液層が存在し、管腔に存在する異物が直接的に腸管上皮細胞に接するのを阻むことで、粘膜固有層に侵入することをブロックする。また腸管上皮細胞同士の隙間からの異物の侵入を防ぐタイトジャンクションも(8)、粘液層とともに粘膜バリアとして重要な役割を担う。

粘膜バリアが何らかの原因で破綻すると粘膜の透過性が亢進し、いわゆる leaky gut となる。これにより異物の粘膜固有層への侵入が容易になり、そこに存在する免疫担当細胞により様々な免疫反応を惹起され、腸管炎症が誘発される。その mediator は血流、リンパ流等を介して他臓器に伝達され、様々な病態

を形成する。Leaky gut との関連として、腸脳軸ではうつ病(9)、腸肝軸では nonalcoholic steatohepatitis (NASH)(10)や 1 型糖尿病、また全身性エリテマトーデスといった自己免疫性疾患の発症が報告されている(11)。このように腸粘膜バリアの破綻、すなわち leaky gut は、腸管が原因となって他臓器疾患の病態を形成する重要な状態であると考えられる。

また精神的ストレス、抗菌薬の投与、食事の近代化などにより、腸内細菌叢の多様性の低下や善玉菌の減少、悪玉菌の増加をきたすことが知られている (dysbiosis)(12)。腸粘膜バリアが破綻し、腸内細菌の細胞構成成分が腸管免疫を介して全身に影響を及ぼすため、dysbiosis は多くの疾患の誘因となりうるということが明らかとなった(13)。近年プロバイオティックスの投与や糞便移植が dysbiosis を改善させ疾患改善に有効であるといった報告が相次いでいる(14, 15)。

皮膚疾患においても腸皮膚軸の観点に着目した病態の研究が進んでいる。例えばニキビ患者の腸内細菌を調べた研究では、腸内細菌の多様性が低下し、*Firmicutes* に対する *Bacteroidetes* の比率が増加しているといったものや(16)、腸粘膜のバリアダメージや炎症を防ぐ *Lactobacillus*、*Bifidobacterium*、*Butyricicoccus*、*Coprobacillus*、*Allobaculum* といった細菌が減少しているといった報告がある(16-18)。また皮膚疾患に対するプロバイオティックスの効果につい

て、最も調べられているのがアトピー性皮膚炎であり、大規模コホート、ランダム化比較試験が実施されている(19)。1070 人の子供を対象とした最近のメタ分析では、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus salivarius*、および異なる菌株を混合した経口プロバイオティクスを摂取しているアトピー性皮膚炎患者のスコアリング(SCORAD: Scoring Atopic Dermatitis) 値の大幅な改善が観察され、プロバイオティクスの効果が示されている(20)。また、アトピー性皮膚炎は炎症性腸疾患との双方向の関連性もメタ解析で示されている(21)。このように消化管の影響は脳や肝臓だけでなく、皮膚にも大きな影響を及ぼしていることが分かっている。

第2節 腸管と皮膚の解剖学的な共通点と相違点

皮膚は外部環境に対する最前線のバリアであり表皮、真皮、皮下組織の3層で構成されている。表皮は皮膚の最も外側の層で、角質層、顆粒層、有棘層、基底層の4層(部位によって5層)に分類され、大部分が重層扁平上皮で構成されているが、最内層は基底細胞と呼ばれる円柱細胞の単一列から成る。皮膚も腸管同様、透過性バリアとなるタイトジャンクションを形成する。タイトジャンクションを超えた真皮には、腸管の粘膜固有層と同様に多数の免疫細胞が控えており、様々な免疫応答が行われている(22,23)。このように、腸管同様、皮膚も外

界の異物と直接接し、タイトジャンクションを含むバリア機能を持ち、それを超えた内側で免疫応答が行われるという解剖的にも機能的にも共通点がある。

しかしながら、皮膚と腸には相違点もある。先に述べたように皮膚は重層扁平上皮で覆われているのに対して、腸管は単層円柱上皮で覆われている。この解剖学的な違いは機能面に反映されており、皮膚が外界から全身を異物や乾燥から守る機能に重きを置いているのに対して、腸管は異物へのバリア機能を発揮しながら、同時に吸収機能も行っているという解剖学的、機能的な相違点もある。

第3節 本検討における仮説と目的

皮膚は脳、肝臓、腎臓と同様に腸管の病態と密接に関係しているが、皮膚とこれら他臓器との決定的な違いに、外界と直接接することが挙げられる。皮膚も腸も外界に対するバリアの役割があり、その内側に多数の免疫細胞を従え、免疫応答を行う。そのため、皮膚は薬剤などによる皮膚傷害や皮膚感染症が皮膚免疫を活性化させ、腸管免疫修飾の起点となっている可能性がある。

また、近年提唱されている上皮バリア仮説 (the epithelial barrier hypothesis) からも皮膚が腸管同様に他臓器に影響を与える可能性が説明できる(13)。この仮説は、ライフスタイルの近代化によって有毒物質への環境曝露が、皮膚、上気道、下気道、腸粘膜といった上皮バリアに影響を与えるという仮説である。

産業化、都市化によるライフスタイルの近代化は、腸管、気道、皮膚といった外界と接する上皮組織への化学物質の暴露機会を増加させた。具体的には皮膚へは界面活性剤や酵素を含む洗剤や石鹼といった化学物質、腸粘膜へは粘張剤、乳化剤を含む食品、気道や肺といった呼吸器官へは PM2.5 といった物質への暴露機会を増加させた(24)。これらの物質の上皮組織への暴露は、暴露部位のバリア機能を破綻させ、組織深部への異物の侵入を容易にし、免疫細胞を誘導して局所の炎症を起こし、バリアが破綻した臓器から離れた臓器に影響を及ぼし、アトピー性皮膚炎、クローン病、アレルギー性喘息といった慢性疾患を増加させたのではないかと説明されている(13)。

この仮説に基づくならば、皮膚も腸管同様に上皮バリアの破綻により、抗原等の刺激に過剰に反応することによって離れた臓器に疾患を引き起こす可能性を秘めている。

実際、現代社会では衛生観念の向上により、多くの人は毎日入浴し全身を石鹼で洗うため、日常的に界面活性剤の暴露を受けている。界面活性剤は洗剤の主要成分で、皮膚角質層の脂質、蛋白構造に相当なダメージをもたらす、乾燥肌や肌荒れの状態をもたらす(25)。さらに、界面活性剤は表皮のケラチノサイトタイトジャンクションに直接的に影響を与え、皮膚バリアの透過性を亢進させ、細胞レベルでダメージを与えることも分かっている(25)。

そこで、近年報告されるようになった腸から皮膚への影響(腸皮膚軸)だけでなく、皮膚から腸へ影響を及ぼす皮膚腸軸も存在するのではないかという仮説を立てた。各種の皮膚傷害が腸管に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、「肌荒れ」の状態に洗剤(界面活性剤)刺激が加わる状況を模倣したマウスモデル、アトピー性皮膚炎モデル、接触性皮膚炎モデルを作成した。皮膚傷害が腸管へ影響する病態の存在とその機序の解明により今まで不定愁訴とされていた症状の一部が説明される可能性がある。

第2章 各種皮膚傷害モデルの作製

第1節 目的と各種モデルの説明

皮膚傷害が腸管に及ぼす影響を検討するために3種類の皮膚傷害モデルを作成した。

1つ目は慢性機械的皮膚傷害モデル(CMS: Chronic mechanical skin injury model)である。これは一般的に生じうるシチュエーションである、肌荒れ部位に洗剤(主成分である界面活性剤)が付着した状態を想定したモデルである。

2つ目はアトピー性皮膚炎モデルである。尋常性乾癬の治療に使用される活性化型ビタミンD3製剤であるMC903(Calcipotriol)をマウスの皮膚に連日使用することで表皮角化細胞のTSLP(thymic stromal lymphopoietin)発現を誘導し、

アトピー性皮膚炎様症候群を起こすモデルである(26, 27)。

3つ目は接触性皮膚炎モデルとして古典的に使用されている Croton oil を使用したモデルを採用した。Croton oil の主成分は 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) であり、これをげっ歯類に塗布すると紅斑、浮腫、および多形核白血球浸潤を促進し接触性皮膚炎を起こす(28-30)。

Control 群については、下記の理由で剃毛による刺激も皮膚傷害の一部と考え麻酔のみの処置とした。皮膚の最外層の表皮角質層は核や小器官を失った角質細胞で形成され、水及び水溶性物質の出入りをブロックする役割を持つが、皮膚付属器である毛包や汗腺は角質細胞による覆いがないためバリア機能が不完全となっている部位でもある(23)。そのため、体中を毛で覆われているマウスの剃毛を行うことは、それ自体が皮膚バリア機能の低下を起こすと考えられる。また、表皮内に存在する組織在住マクロファージのランゲルハンス細胞は、定常状態でも樹状突起を上方の角質層へと伸ばして外来抗原の補足ができるように見回りを行っているため、剃毛刺激も何らかの免疫反応を惹起する可能性があると考え、Control 群の剃毛処置は控えることとした。

第2節 方法

第1項 動物

5 週齢の雌性マウス(C57BL/6Jcl; 日本クレア、日本)を使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て(承認番号 20023)、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインを遵守した。

飼育環境は室温 24℃、湿度 55%、12 時間明暗サイクル環境下で、自由飲水、飼料 (CE-7; 日本クレア、日本) を自由に摂取させた。動物の種類、取扱いは以降の動物実験も同様である。

第2項 慢性機械的皮膚傷害モデル作成

イソフルラン吸入麻酔(導入時 4-5%、維持濃度は 2-3%) による鎮静を行った後、皮膚処理を行った。皮膚処理は、まず背部全体を剃毛し、布粘着テープ (No.102N: ニチバン、日本) で tape-stripping (粘着テープを皮膚に貼ってはがすことで角層を採取、除去する手法のこと) を行い、界面活性剤液である 4% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 液を 1000 μ l 塗布する工程を 1 日 1 回、day 0 (初日)、day 1、day 2、day 7、day 8、day 9 に行い day 14 に頸椎脱臼により安楽死させ (Figure 1A)、検体採取を行った。

第3項 MC903 アトピー性皮膚炎モデルの作製

イソフルラン吸入麻酔(導入時 4-5 %、維持濃度は 2-3 %) による鎮静を行った後、背部全体を剃毛し、Calcipotriol (CS-0387; CEM、USA) 2 nmol/10 μ L EtHO を 1 日 1 回、9 日間連続塗布し、10 日目に頸椎脱臼により安楽死させ検体採取を行うこととした(Figure 1B)。

第4項 Croton oil (刺激性接触皮膚炎)モデルの作製

イソフルラン吸入麻酔(導入時 4-5 %、維持濃度は 2-3 %) による鎮静を行った後、皮膚処理を行った。背部全体を剃毛し、アセトンを溶媒とした 1 % Croton oil (C6957; LKT、USA) 1000 μ L を塗布する工程を 1 日 1 回、day 0 (初日)、day 1、day 2、day 7、day 8、day 9 に行い day 14 に頸椎脱臼により安楽死させ(Figure 1C)、検体採取を行った。

第5項 統計学的処理

Control 群 n=5、CMS 群 n=6、MC903 アトピー性皮膚炎群 n=6、Croton oil 群 n=6 で実施した。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。すべての検定は Wilcoxon 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 CMSの結果

第1項 腸管長結果

小腸長は Control 群と CMS 群で有意な差は認めなかった(30.9 ± 0.82 cm vs 29.3 ± 0.50 cm) (Figure 2A)。

第2項 病理結果

小腸を均等に3等分して口側から jejunum、mid-SI (middle of small intestine)、ileum に分け、Hematoxylin Eosin (HE) 染色標本の観察を行った。Jejunum の絨毛長は Control 群と比べて CMS 群は有意に短縮した(280.5 ± 22.3 μ m vs 141.0 ± 16.7 μ m、* $p < 0.05$) (Figure 2B)。陰窩長は有意な変化を認めず、絨毛陰窩比は絨毛長を反映して CMS 群で有意に低下した (Figure 2B)。

Mid-SI は Control 群と CMS 群で絨毛長、陰窩長ともに有意な変化は認めなかった (Figure 2C)。

Ileum の絨毛長は Control 群に比べ、CMS 群では絨毛長(149.3 ± 10.7 μ m vs 109.1 ± 5.6 μ m、* $p < 0.05$)、陰窩長(74.6 ± 7.1 μ m vs 51.2 ± 3.9 μ m、* $p < 0.05$) (Figure 2D) と有意な低下を認めた。

大腸も小腸と同様に、上行結腸、横行結腸、S 上結腸～直腸の3か所に分けて炎症細胞浸潤、粘膜変化の項目につき標本観察を行ったが目立った変化は観察

できなかった(data not shown)。

また小腸の詳細観察では、明らかな炎症細胞浸潤の増加は確認できなかった(Figure 2B-D)。

第4節 MC903 アトピー性皮膚炎モデルの結果

MC903 アトピー性皮膚炎モデルは day 9 までに全頭死亡したため解析できなかった。

第5節 Croton oil (刺激性接触皮膚炎)モデルの結果

第1項 腸管長結果

Control 群と比べ、Croton oil 群の小腸長(30.9 ± 0.82 cm vs 32.5 ± 0.70 cm) (Figure 2A)は変化しなかった。

第2項 病理結果

Croton oil 群の jejunum の絨毛長(451.3 ± 16.6 μ m) は Control 群(280.5 ± 22.3 μ m) に比べて有意に延長していた(**p<0.01)(Figure 2B)。陰窩長は有意な変化を認めなかった(Figure 2B)。

Mid-SI の絨毛長は変化しなかったものの(Figure 2C)、陰窩長は Control 群

と比べて有意な低下を認め(86.0 ± 4.3 μm vs 64.2 ± 4.39 μm、*p<0.05)、絨毛陰窩比は Croton oil 群で有意に上昇した(Figure 2C)。

Ileum では絨毛長、陰窩長ともに変化を認めなかったが、絨毛陰窩比は Croton oil 群で有意に上昇した(Figure 2D)。

第6節 考察

本章では異なる3つの皮膚傷害モデルでの腸管に与える影響を調べ、MC903 アトピー性皮膚炎モデルは全例死亡し評価不能であった。CMS 群は Control 群に比べて jejunum、ileum の絨毛長の有意な低下を認め、小腸において病的な変化が起こったものと考えられた。対して、Croton oil 群では Control 群に比べて jejunum で絨毛長が延長し、皮膚傷害の種類によって腸管へ異なる変化が起こることが示された。Croton oil 群において絨毛長が延長した理由は検討できていない。MC903 アトピー性皮膚炎モデルは全例、モデル作成中に死亡したため解析はできなかった。このモデルの原著論文では耳に塗布するモデルであるが、高濃度の MC903 アトピー性皮膚炎モデルでは死亡したとの記載があり、背部塗布では投与量が致死量となっていた可能性が考えられる。そのため、本研究では粘膜傷害が組織学的に確認された CMS の機序解明に焦点を絞ることとした。Jejunum は解剖学的に胆汁や膵液の暴露を受けやすいという特徴や、ileum

では jejunum に比較して腸内細菌が多いといった差があり(31)、jejunum と ileum では異なる機序が影響しているかもしれないため、jejunum と ileum に分けて病態解明することとした。

第3章 CMSモデルでの腸管透過性および腸管免疫に与える影響

第1節 目的

前章で示した通り、CMS 群の jejunum と ileum に形態学的変化を認めたため、機能的変化の有無を腸管透過性試験で検討した。また、この形態学的変化がどのような免疫学的機序で引き起こされたのかを検討する目的で、小腸粘膜内のサイトカイン等の mRNA の発現を検討した。

さらに、どのような炎症細胞が病態に関与したかを検討する目的で小腸病理標本を用いて T (CD 3 陽性)細胞、肥満細胞を組織学的に検討した。併せて、T 細胞系、B 細胞系、樹状細胞系、自然リンパ球といった免疫細胞の病態への関与の有無を確認する目的でフローサイトメトリーを用いて、腸粘膜固有層リンパ球(lamina propria lymphocyte: LPL)、腸間膜リンパ節(mesenteric lymph node: MLN)、脾臓におけるこれらの細胞の増減の検討を行った。

第2節 方法

第1項 動物とモデル作成

腸管透過性試験、フローサイトメトリーでの検討のための検体採取は第2章と同様の動物、方法を使用してモデルを作成した。RNAの抽出と小腸の細胞染色は第2章で採取した検体を使用した。

第2項 腸管透過性試験

Day 14の早朝より6時間絶食とした後、3種混合麻酔(塩酸メドミジン 0.15 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg)を使用した鎮痛、鎮静下で Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (分子量 4000) 600 mg/kg を強制経口投与し、1時間後に血清を採取した。採取した血清をマイクロプレート蛍光高度計(Gemini EM; Molecular Devices、日本)で測定した。

第3項 小腸の mRNA の抽出および RT-qPCR 法

RNeasy Mini Kit (74106; Qiagen、Germany) を使用し小腸各部位(jejunum、mid-SI、ileum) の RNA 抽出し、逆転写反応を行って cDNA 合成した。リアルタイム PCR 法で、Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System を使用して測定を行い、SDS 2.4 (Thermo Fisher Scientific、USA) および RQ

Manager 1.2.1 (Thermo Fisher Scientific) を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて解析した。

使用するプライマーは以下の通りとする。腸管炎症と関連する mouse Tnfa (Mm00443258: Thermo Fisher Scientific)、mouse Il17a (Mm00439618: Thermo Fisher Scientific)、mouse Ifng (Mm00801778: Thermo Fisher Scientific)、及び mouse Muc2 (Mm00458299: Thermo Fisher Scientific) を選択した。加えて、tape-stripping によりマウスの十二指腸の肥満細胞が増加したという報告では(32)、皮膚由来の IL-33 および腸由来の IL-25 がグループ 2 自然リンパ球(group 2 innate lymphoid cells: ILC2s) の活性化を誘導し、活性化された ILC2s は IL-4 と IL-13 の分泌を促進し、腸の肥満細胞増加を促したと説明している。そのため、この機序が作用した可能性も念頭におき、mouse Il33 (Mm00505403: Thermo Fisher Scientific)、mouse Il25 (Mm00499822: Thermo Fisher Scientific)、mouse Il4 (Mm00445259: Thermo Fisher Scientific)、mouse Il13 (Mm00434204: Thermo Fisher Scientific)、mouse Mcpt4 (Mm00487636: Thermo Fisher Scientific) の測定を行った。また、食物アレルギーの皮膚感作で重要な役割を果たす好塩基球の代理マーカーとして使用される mouse Mcpt8 (Mm00484933: Thermo Fisher Scientific) の測定も行った。また Th2 細胞の分化誘導やアトピー性皮膚炎の成立に関与するとされる TSLP も(33)、mouse Tslp (Mm01157588: Thermo Fisher Scientific) を用いて

測定することとした。なお、内部標準は mouse GAPDH (Mm4331182: Thermo Fisher Scientific) を使用した。

第4項 病理標本の免疫染色と CAE 染色の方法

CMS の腸管の形態学的変化の誘因となった細胞を同定するため、T 細胞、肥満細胞を病理標本組織染色により検出した。

摘出した小腸を 10 %ホルマリンで 1 日固定し、PBS 冷蔵保管後にパラフィンブロックを作製した。脱パラフィン後、T 細胞の検出には CD3 染色を、肥満細胞の検出にはパラローズアニリン (164-09491; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation、日本) を使用した酵素組織化学的染色である CAE (chloroacetate esterase) 染色を実施した。

CD3 染色は 3 % H_2O_2 で内因性ペルオキシダーゼ不活化を 10 分間行い、抗原賦活化は、オートクレーブ 120 °C、10 分で実施した。ブロッキングは Block Ace Powder (UKB80; KAC Co., Ltd., 日本) で行った。1 次抗体として CD3 antibody (Clone CD3-12: BIO RAD) を使用した。2 次抗体にはヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO(Rat) (414311; ニチレイ、日本) を使用し、DAB (8059P; Cell Signaling Technology、USA) で比色検出した。

CAE 染色は 10 mM 基質保存液(ナフトール AS-D クロロアセテート 20 mg、

N,N-ジメチルホルムアミド 20 ml)、パラローズアニリン液(パラローズアニリン 1 g を 2N 塩酸 25 ml に入れ加温溶解し、冷却後濾過したもの)を 4 %亜硝酸ナトリウム 100 μ l に溶解した反応基質液 HPR (hexazonium pararosaniline) と 1/15M リン酸緩衝液(pH 6.8) を混ぜた基質液を使用して室温 30 分で染色した。

核染色は全て Mayer's Hematoxylin Solution (131-09665; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation、日本) を使用した。

第5項 フローサイトメトリーによる各種細胞の解析

頸椎脱臼により安楽死させたマウスの腹部を正中切開し、回腸から盲腸周囲の MLN を採取した後、小腸、脾臓を採取した。

LPL の採取は以下のように実施した。まず、パイエル板を取り除き 1 cm 程度の小腸を、RPMI 1640 medium (以下 RPMI) を溶媒として EDTA を 0.5 mM で溶解したものに浸漬し 37 °C、15 分間インキュベートした。RPMI を使用して小腸を洗浄し、EDTA 成分を取り除いた後、RPMI を溶媒に 2 %の濃度に fetal bovine serum (以下 FBS) を溶解したもので 37 °C、15 分間インキュベートした。FBS 成分を取り除いた後、検体を鑷子で細切し、RPMI に collagenase (032-22364; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation、日本) を 0.5 mg/ml に溶かしたもので 37 °C、15 分インキュベートした。上清を除去し、4 °C、1200 rpm

で5分間遠心した。上記 collagenase 処理を3回実施し、小腸全体から細胞成分を回収した。回収した細胞は Cell Strainers (352360; CORNING, USA) でろ過し、RPMI に懸濁し氷上管理し、抗体染色を実施した。

MLN は、採取後 RPMI 内に浸漬し、スライドガラスですり潰すことで被膜から細胞成分を取り出して、リンパ球を回収した。Cell Strainers を用いてろ過した後、RPMI に懸濁し氷上管理し、抗体染色を実施した。

脾臓は RPMI に浸した後、Cell Strainers 上で濾過し、塩化アンモニウムを含む溶血バッファで溶血処理を5分間行い、PBS を加えて反応を停止させ、遠心分離(300 g、4 °C、5 分)し細胞を回収した。回収した細胞は Cell Strainers 上でろ過し、RPMI に懸濁し氷上管理し、抗体染色を実施した。

すべての染色前に RPMI に懸濁した細胞は Trypan Blue Solution, 0.4 % (15250061; Thermo Fisher Scientific, USA) で2倍希釈し、TC20™ 全自動セルカウンター(1450101J1; BIO RAD, USA) を使用して細胞濃度を計測し、総細胞数を算出した。染色はまず Fc block (Clone CD16/CD32: BD Biosciences) を実施し、死細胞検出目的で LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405 nm excitation (eBioscience) を使用した染色を実施した。

測定には BD FACSCanto™ II Flow cytometer (BD Biosciences) を使用し、ダブレット細胞、死細胞を除去、CD45.2 (Clone 104: Biolegend) 陽性細胞をゲー

トし、さらに forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) を使用してリンパ球と考えられる細胞群をゲートし、既報を参考にして絶対数で結果を算出した(34)。

T細胞系の細胞の検出のために CD3 (Clone 145-2C11: eBioscience)、B細胞系の細胞の検出のために B220 (Clone RA3-6B2: Biolegend) を、樹状細胞系の細胞の検出のために CD11b (Clone M1/70: Biolegend) と CD11c (Clone N418: Biolegend) を使用した。自然リンパ球は既報を参考にして(35)、ILCs は Lineage marker (以下 Lin) 陰性、IL-7R α (Clone A7R34: Biolegend) 陽性細胞として検出した。Lin として CD3 (同上)、CD5 (Clone 53-7.3: eBioscience)、B220 (同上)、CD11b/c (同上)を用いて、リンパ球集団から Lin 陰性細胞集団を検出した。ILC s のサブセットの解析には核内転写因子を用いて、ILC1s には T-bet (Clone 4B10: eBioscience)、ILC 2 s には GATA-3 (Clone TWAJ: eBioscience)、ILC 3 s には ROR γ t (Clone AFKJS-9: eBioscience)を用いた。核内染色前には Foxp3 transcription staining buffer (eBioscience)を用いた。分析には Flow Joe™10 を使用した。

第 6 項 統計学的処理

腸管透過性試験では Control 群、CMS 群ともに n=6 で実施した。病理標本、

mRNA の検体は第 2 章で採取した検体を使用したため Control 群 n=5、CMS 群 n=6 で実施した。フローサイトメトリーにおける LPL の CD3 陽性細胞染色、B220 陽性細胞染色は両群とも n=6、CD11 b 陽性細胞染色、CD11 c 陽性細胞染色は Control 群 n=7、CMS 群 n=6 で実施した。ILCs の染色は LPL のみで実施し Control 群 n=6、CMS 群 n=5 で実施した。MLN は、Control 群 n=8、CMS 群 n=9 で実施した。脾臓は両群とも n=10 で検討した。

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。すべての検定は Wilcoxon 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 腸管粘膜透過性試験結果

血清 FITC-dextran 濃度は Control 群 ($6.81 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$) に比べ、CMS 群 ($8.72 \pm 0.84 \mu\text{g/ml}$ 、* $p < 0.05$) では有意に上昇し、CMS 群では腸管透過性が亢進していた (Figure 3)。

第 2 項 小腸の mRNA 発現結果

腸管での各因子の mRNA の発現量を Figure 4 に示す。Jejunum では Muc2 の発現が有意に低下している以外は両群に明らかな差は認められなかった

(Control 群 vs CMS 群、* $p < 0.05$)(Figure 4A)。一方、ileum では Il13、Mcpt8 (Control 群 vs CMS 群、* $p < 0.05$) の発現が CMS 群において有意に増加していたが、その他の測定項目では明らかな差は認められなかった(Figure 4B)。また、両群とも Il4 の発現は認めなかった。

第3項 小腸病理標本の免疫染色と CAE 染色の結果

肥満細胞(CAE 染色陽性)は、jejunum では変化を認めなかったが(Figure 5 A)、ileum では Control 群(10.3 ± 1.98 個/100 μm) と比較して CMS 群(21.9 ± 2.08 個/100 μm) で有意に上昇していた(Figure 5B)。

CD3 陽性細胞は jejunum で Control 群(15.7 ± 6.36 個/100 μm) と CMS 群(6.73 ± 1.03 個/100 μm) で有意な差は認めなかった(Figure 5C)。同様に ileum においても Control 群(4.94 ± 0.68 個/100 μm) と CMS 群(2.67 ± 0.54 個/100 μm) で有意な差を認めなかった(Figure 5D)。

第4項 フローサイトメトリーによる各種細胞の解析結果

LPL、MLN、spleen における 1 匹当たりの CD3 陽性細胞、B220 陽性細胞、CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞、ILCs サブセットの総数を比較した。

LPL においては、CMS 群では Control 群と比べて ILC1s が低下している以

外はいずれも差を認めなかった(Figure 6A-G)。[CD3 陽性細胞($1.18 \times 10^5 \pm 4.08 \times 10^4$ 個/mouse vs $1.39 \times 10^5 \pm 4.38 \times 10^4$ 個/mouse)、B220 陽性細胞($2.45 \times 10^5 \pm 1.53 \times 10^5$ 個/mouse vs $2.00 \times 10^5 \pm 4.59 \times 10^4$ 個/mouse)、CD11b 陽性細胞($6.82 \times 10^3 \pm 3.27 \times 10^3$ 個/mouse vs $9.13 \times 10^3 \pm 4.57 \times 10^3$ 個/mouse)、CD11c 陽性細胞($1.36 \times 10^5 \pm 5.42 \times 10^4$ 個/mouse vs $1.77 \times 10^5 \pm 7.48 \times 10^4$ 個/mouse)、ILC1s ($3.59 \times 10^3 \pm 7.90 \times 10^2$ 個/mouse vs $8.65 \times 10^2 \pm 2.70 \times 10^2$ 個/mouse、* $p < 0.05$)、ILC2s ($8.07 \times 10^3 \pm 2.63 \times 10^3$ 個/mouse vs $2.24 \times 10^3 \pm 6.87 \times 10^2$ 個/mouse)、ILC3s ($4.89 \times 10^3 \pm 1.87 \times 10^3$ 個/mouse vs $1.16 \times 10^3 \pm 4.27 \times 10^2$ 個/mouse)]

MLN では Control 群に対して CMS 群では、CD11b 及び CD11c 陽性細胞では変化が認められなかったが、CD3 陽性細胞と B220 陽性細胞の有意な低下を認めた(Figure 6H-K) [CD3 陽性細胞($9.00 \times 10^6 \pm 1.37 \times 10^6$ 個/mouse vs $4.76 \times 10^6 \pm 8.27 \times 10^5$ 個/mouse、* $p < 0.05$)、B220 陽性細胞($4.96 \times 10^6 \pm 8.84 \times 10^5$ 個/mouse vs $2.09 \times 10^6 \pm 2.77 \times 10^5$ 個/mouse、* $p < 0.05$)、CD11b 陽性細胞($9.01 \times 10^3 \pm 1.70 \times 10^3$ 個/mouse vs $1.19 \times 10^4 \pm 3.56 \times 10^3$ 個/mouse)、CD11c 陽性細胞($1.16 \times 10^5 \pm 1.95 \times 10^4$ 個/mouse vs $1.48 \times 10^5 \pm 2.52 \times 10^4$ 個/mouse)]。

Spleen では Control 群に対して CMS 群では、CD3 陽性細胞、B220 陽性細胞

胞、CD11c 陽性細胞の有意な低下を認めた(Figure 6L-O) [CD3 陽性細胞($1.60 \times 10^7 \pm 1.44 \times 10^6$ 個/mouse vs $1.31 \times 10^7 \pm 9.56 \times 10^5$ 個/mouse、** $p < 0.01$)、B220 陽性細胞($3.08 \times 10^7 \pm 3.26 \times 10^6$ 個/mouse vs $1.51 \times 10^7 \pm 2.44 \times 10^6$ 個/mouse、** $p < 0.01$)、CD11b 陽性細胞($1.09 \times 10^6 \pm 1.77 \times 10^5$ 個/mouse vs $1.19 \times 10^6 \pm 2.40 \times 10^5$ 個/mouse)、CD11c 陽性細胞($6.24 \times 10^5 \pm 8.29 \times 10^4$ 個/mouse vs $2.77 \times 10^5 \pm 6.00 \times 10^4$ 個/mouse、** $p < 0.01$)]。

第5項 考察

CMS 群において有意な腸管透過性亢進を認め、leaky gut の状態となることが確認できた。

Jejunum の mRNA の結果は Muc2 の低下以外有意なものは認めなかった。

Ileum では Il13 及び Mcpt8 の mRNA 発現が有意に上昇していた。肥満細胞はマウスでは一般に、結合組織型 (connective tissue-type mast cells: CTMC) と粘膜型 (mucosal-type mast cells: MMC) に分けられ、皮膚では CTMC が優勢である(36)。CTMC と MMC はキマーゼの発現が異なり、CTMC は Mcpt4 と Mcpt5 を発現するとされ、MMC は Mcpt1 と Mcpt2 を発現する(36)。また一般的に Mcpt8 は好塩基球のマーカーとされるが(37)、最近報告された β^7 High Mast Cell という肥満細胞は、CTMC に関連するプロテアーゼ (Mcpt4、Cma1、

Tpsb2、および Cpa3) の発現を減少させ、MMC に関連するプロテアーゼ (Mcpt1、Mcpt2) をコードする転写産物の発現、及び Mcpt8 の発現が高いと報告されている(38)。

また、IL-13 は肥満細胞から分泌される他に ILC2s、CD4⁺T 陽性細胞なども分泌することが知られている(39)。本研究ではフローサイトメトリーで解析した LPL の結果及び病理標本において T 細胞の増加を認めず、フローサイトメトリーで解析した ILC2s も増加していなかったことから、回腸で増加を認めた肥満細胞から分泌されたものと考えた。

第4章 慢性機械的皮膚傷害(短期)モデルの検討

第1節 目的

前述の通り、CMS 群の jejunum、ileum においては上皮細胞に形態学的変化と腸管透過性亢進を認めたが、特に jejunum は変化した機序や責任細胞について、測定した mRNA 発現から推察することは困難であった。この理由として、CMS が、それより早時に炎症が生じた結果として高度に腸管ダメージが起きた時期である可能性が考えられた。そこで本章では CMS の短期(CMS-short) モデルを作成し、病態の早期段階における小腸の評価をすることを目的とした。また発症機序の皮膚局所の関与も併せて評価することを目的とした。

第2節 方法

第1項 動物

第2章第1節第1項と同様のものを使用した。

第2項 慢性機械的皮膚傷害(短期)モデルの作製

第2章第2節第2項と同様の工程でモデル作成を行い、day 10 に頸椎脱臼により安楽死させ、検体採取を行った(Figure 1A)。

第3項 小腸病理観察

CMS 群と同様に小腸を3部位に分けて jejunum と ileum を検討した。まず HE 染色での観察を行い、第3章第2節第4項と同様の工程で CD3 染色と CAE 染色を行った。

第4項 小腸の mRNA の抽出及び RT-PCR 法

第3章第2節第3項と同様の方法で実施した。

第5項 皮膚病理観察

HE 染色標本で全体を観察、及び好酸球の有無を確認し、ギムザ染色で肥満細胞数をカウントした。CD3 陽性細胞については第3章第2節第4項で記載したものと同様の工程を実施した。

第6項 皮膚の mRNA の抽出及び RT-PCR 法

RNeasy Plus Universal Mini Kit (1062832; Qiagen, Germany) を使用し皮膚の RNA を抽出し、逆転写反応を行って cDNA 合成した。内部標準として GAPDH を用いて、リアルタイム PCR 法で TNF- α 、IFN- γ 、IL-13、IL-25、IL-33、TSLP、MCPT4、MCPT8 を測定した。計測、解析の手順、プライマーはいずれも第3章第2節第3項と同様の手順、製品を用いて実施した。

第7項 血漿ヒスタミン濃度測定

前述した3種混合麻酔で鎮静、鎮痛を行い、心臓採血により血液を採取し、4°C、3000 rpm で遠心分離し血漿を採取した。

Histamine ELISA Kit (A05890; Bertin Pharma, France) を使用して、計測は Benchmark Plus Microplate Reader (BIO RAD) で行った。

第8項 フローサイトメトリーによる各種細胞の解析方法

第3章第2節第5項と同様の方法で LPL、MLN、spleen を検討した。ILCs の検討は LPL のみ実施した。

第9項 統計学的処理

フローサイトメトリー以外の検討は Control 群、CMS-short 群とも n=6 で検討した。結果は平均値 ± 標準誤差で示した。すべての検定は Wilcoxon 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

フローサイトメトリーの検体数は LPL の検体は CD3 染色、B220 染色、ILCs の染色は両群 n=6、CD11b、CD11c 染色は Control 群 n=7、CMS-short 群 n=6、MLN の検体は CD3 染色、B220 染色で両群とも n=6、CD11b、CD11c 染色は Control 群 n=6、CMS-short 群 n=7、spleen の検体は CD3、B220、CD11b、CD11c 染色で両群ともに Control 群 n=7、CMS-short 群 n=8 で実施した。

第3節 結果

第1項 腸管長結果

CMS-short 群は Control 群と比べ小腸長は両群に有意な差は認めなかった

(28.8 ± 0.60 cm vs 30.5 ± 0.66 cm)(Figure 7A)。

第2項 病理結果

第2章と同様に小腸を jejunum、mid-SI、ileum の3部位に分けて標本を作製した。Jejunum と ileum の、絨毛長、陰窩長、並びにそれらの比は両群間で有意な差は認めず、CMS-short モデルにおいて目立った炎症細胞、好酸球の発現は認めなかった(Figure 7B-C)。CD3 陽性細胞数も CAE 陽性細胞数も明らかな変化は認めなかった(Figure 8)。

第3項 小腸の mRNA 発現結果

Jejunum の測定項目はいずれも両群で発現の差はなく、Mcpt8、Il17、Tslp は両群ともに発現を認めなかった(Figure 9A)。

Ileum の Muc2 の上昇を認める(Control 群 vs CMS-short 群、*p<0.05) 以外は、両群で明らかな mRNA 発現量の変化は認められなかった(Figure 9B)。

Il25、Tslp は両群で発現を認めなかった。

第4項 皮膚病理観察結果

HE 染色の観察では総じて真皮の細胞増多が観察されたが、好酸球の増加は認

めなかった(Figure 10A)。増加した細胞の判断をする目的で、ギムザ染色標本の観察を行ったところ肥満細胞数の増加を認めた(Control 群 vs CMS-short 群 4.24 ± 0.64 個/100 μm vs 10.41 ± 1.11 個/100 μm 、** $p < 0.01$)(Figure 10B-C)。CD3 は両群で差を認めなかった(3.01 ± 0.26 個/100 μm vs 3.90 ± 0.55 個/100 μm)(Figure 10D)。

第5項 皮膚の mRNA 発現結果

各群における mRNA の発現量を Figure 11 に示す。Tnfa の発現量は CMS-short 群で有意に増加していた(Control 群 vs CMS-short 群、** $p < 0.01$)。

皮膚では肥満細胞の増加を認めていたが Mcpt4 の発現増加は認めなかった。Mcpt8 の発現は CMS-short 群で有意に増加しており(Control 群 vs CMS-short 群、* $p < 0.05$)、先述した β^7 High Mast Cell の様な特殊なフェノタイプの肥満細胞の増加を反映しているものと考えられた。肥満細胞の増加を認めるものの、皮膚における Il13 の mRNA 発現は低下していた(Control 群 vs CMS-short 群、** $p < 0.01$)。

Ifng、Il25、Il33、Tslp の発現は両群で有意な差を認めなかった。Il4 は両群ともに殆ど発現を認めなかった。

第6項 血漿ヒスタミン濃度結果

各群におけるヒスタミン濃度結果を Figure 12 に示す。CMS-short 群では Control 群に比べて血漿ヒスタミン濃度が有意に上昇していた(Control 群 vs CMS-short 群 81.89 ± 0.41 nM vs 85.68 ± 0.15 nM)。

第7項 フローサイトメトリーによる各種細胞の解析結果

LPL、MLN、spleen すべて 1 匹当たりの CD3 陽性細胞、B220 陽性細胞、CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞、ILCs サブセットの総数を比較した。

LPL では Control 群と比べて CMS-short 群ではいずれも差を認めなかった (Figure 13A-G) [CD3 陽性細胞($2.77 \times 10^5 \pm 8.16 \times 10^4$ 個/mouse vs $1.19 \times 10^5 \pm 2.24 \times 10^4$ 個/mouse)、B220 陽性細胞($3.92 \times 10^5 \pm 1.51 \times 10^5$ 個/mouse vs $1.62 \times 10^5 \pm 5.02 \times 10^4$ 個/mouse)、CD11b 陽性細胞($1.15 \times 10^4 \pm 8.33 \times 10^3$ 個/mouse vs $1.63 \times 10^4 \pm 8.33 \times 10^3$ 個/mouse)、CD11c 陽性細胞($3.13 \times 10^5 \pm 8.03 \times 10^4$ 個/mouse vs $3.74 \times 10^5 \pm 1.35 \times 10^5$ 個/mouse)、ILC1s ($1.18 \times 10^3 \pm 2.57 \times 10^2$ 個/mouse vs $2.41 \times 10^3 \pm 1.04 \times 10^3$ 個/mouse)、ILC2s ($2.76 \times 10^3 \pm 8.39 \times 10^2$ 個/mouse vs $8.21 \times 10^3 \pm 4.85 \times 10^3$ 個/mouse)、ILC3s ($1.81 \times 10^3 \pm 4.0 \times 10^2$ 個/mouse vs $5.23 \times 10^3 \pm 2.66 \times 10^3$ 個/mouse)]。

MLN では Control 群と比べて CMS-short 群ではいずれの細胞も有意な低下

を認めた(Figure 11H-K) [CD3 陽性細胞($1.06 \times 10^7 \pm 8.02 \times 10^5$ 個/mouse vs $1.12 \times 10^6 \pm 3.31 \times 10^5$ 個/mouse、** $p < 0.01$)、B220 陽性細胞($4.64 \times 10^6 \pm 6.51 \times 10^5$ 個/mouse vs $8.23 \times 10^5 \pm 3.33 \times 10^5$ 個/mouse、** $p < 0.01$)、CD11b 陽性細胞($1.30 \times 10^4 \pm 1.93 \times 10^3$ 個/mouse vs $2.55 \times 10^3 \pm 1.42 \times 10^3$ 個/mouse、** $p < 0.01$)、CD11c 陽性細胞($2.47 \times 10^5 \pm 1.87 \times 10^4$ 個/mouse vs $2.95 \times 10^4 \pm 9.43 \times 10^3$ 個/mouse、** $p < 0.01$)]

Spleen では Control 群と比べて CMS-short 群では B220 陽性細胞、CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞の低下を認めた(Figure11L-O) [CD3 陽性細胞($1.04 \times 10^7 \pm 2.79 \times 10^6$ 個/mouse vs $1.01 \times 10^6 \pm 3.69 \times 10^6$ 個/mouse)、B220 陽性細胞($2.89 \times 10^7 \pm 6.25 \times 10^6$ 個/mouse vs $3.23 \times 10^6 \pm 1.14 \times 10^6$ 個/mouse、** $p < 0.01$)、CD11b 陽性細胞($1.50 \times 10^6 \pm 4.79 \times 10^5$ 個/mouse vs $1.71 \times 10^5 \pm 2.93 \times 10^4$ 個/mouse、** $p < 0.01$)、CD11c 陽性細胞($6.66 \times 10^5 \pm 1.81 \times 10^5$ 個/mouse vs $9.24 \times 10^4 \pm 2.54 \times 10^4$ 個/mouse、** $p < 0.01$)]

第 8 項 考察

慢性機械的皮膚傷害(短期)モデルを作成し、病態の早期段階の評価を行ったところ、組織学的には腸管の形態学的変化は認めなかった。小腸において、早期段階では上昇していると予測していた炎症性サイトカインを含め、mRNA 発現に

特徴的な変化は認められなかった。

皮膚の検討では肥満細胞の増加と TNF- α の上昇を捉えられた。TNF- α の上昇の由来は肥満細胞からの可能性もあるが、それだけでなくマクロファージからの可能性も考えられたが、発現の由来の特定までは至らなかった。血漿ヒスタミン濃度は上昇しており、皮膚の肥満細胞は増加とともに活性化、脱顆粒しているものと考えられた。

また、CMS-short 群、CMS 群ともに腸間膜リンパ節、脾臓における CD3、B220、CD11b、CD11c 陽性細胞が概して減少していたが、これは肥満細胞の活性化が影響している可能性がある。最近の報告によると、肥満細胞特異的受容体 Mrgprb2 が炎症性の機械的および熱的痛覚過敏を媒介し、損傷部位での自然免疫細胞を動員することから(40)、腸間膜リンパ節、脾臓でみられた各細胞の減少の一因として、皮膚局所の肥満細胞からのシグナルを介して皮膚局所へ細胞が動員された可能性が考えられる。

第5章 CMS の腸管形態変化への肥満細胞の関与の検討

第1節 目的

CMS-short モデルの皮膚において肥満細胞の増加と活性化、TNF- α の発現増加を認めた。そのため、CMS の腸管病態形成に肥満細胞が関与している可能

性を考えて、肥満細胞阻害剤を使用したモデルを作成し、各種検討を行った。

第2節 方法

第1項 動物

第2章第2節第1項で記載したものと同種のものを使用した。

第2項 肥満細胞阻害剤投与モデルの作製

肥満細胞阻害剤として doxantrazole (T341231-1G; Sigma-Aldrich, USA) を使用した。これは mast cell stabilizing agent (stabilizer) として知られ、CTMC、MMC とともに脱顆粒を阻害し(41)、肥満細胞メディアエーターの放出を阻害する(42)。Doxantrazole (16.5 mg kg^{-1}) は NaHCO_3 (0.5% w/v) に溶解し、25 分間の sonication を行い使用した。

Doxantrazole は、第2章第2節第2項と同様の皮膚処置を行う1時間前に腹腔内投与した。その他の工程は第2章第2節第2項と同様である。

コントロール群には NaHCO_3 (0.5% w/v) を、皮膚処置を行う1時間前に腹腔内投与した。その他の工程は第2章第2節第2項と同様である。

腸管透過性試験は小腸検体を採取した個体とは別の個体で検討を行った。

第3項 病理観察

HE染色の小腸標本を使用して腸管観察を行った。

第4項 腸管透過性試験

第3章第2節第2項と同様の処置を前々項で作成したマウスに対して行った。

第5項 統計学的処理

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。すべての検定はWilcoxon検定を使用し、p値 0.05未満を有意差ありとした。小腸長は、小腸検体採取目的で作成した個体を測定した。両群ともにn=6ずつモデルを作成したが、コントロール群は、腹腔内投与の処置により死亡しn=5となった。

腸管透過性試験は両群ともにn=6で解析を行った。

第3節 結果

第1項 腸管長結果

コントロール(CMS + NaHCO₃)群と肥満細胞阻害剤投与(CMS + stabilizer)群で小腸長はコントロール(CMS + NaHCO₃)群(35.2 ± 0.26 cm)に対して肥満細胞阻害剤投与(CMS + stabilizer)群(33.5 ± 0.74 cm)は有意に短縮し

た(* $p < 0.05$)(Figure 14A)。

第2項 病理結果

第2、4章と同様に腸管は jejunum、ileum に分け、HE 染色切片を観察した。Jejunum は疾患コントロール(CMS + NaHCO₃) 群と肥満細胞阻害剤投与(CMS + stabilizer) 群で絨毛長に変化は認めなかったものの(Figure 14B)、肥満細胞阻害剤投与(CMS + stabilizer) 群の陰窩長はコントロール(CMS + NaHCO₃) 群に比べて有意に延長した(** $p < 0.01$)(Figure 14C)。一方で回腸では、絨毛長、陰窩長、絨毛陰窩比率ともに stabilizer の投与による変化は認めなかった(Figure 14E-G)。

第3項 腸管透過性試験結果

腸管透過性試験の結果を Figure 14H に示す。血清 FITC-dextran 濃度はコントロール(CMS + NaHCO₃) 群($22.17 \pm 5.59 \mu\text{g/ml}$) と肥満細胞阻害剤投与(CMS + stabilizer) 群($26.52 \pm 7.86 \mu\text{g/ml}$) で差を認めなかった。

第4節 考察

CMS モデルで変化を認めた jejunum の病変、及び ileum の病変の病態に肥満

細胞が関与しているか、肥満細胞阻害剤(脱顆粒阻害剤)を用いて検討した。

Jejunum に関しては肥満細胞阻害剤で陰窩長は延長し、病態に肥満細胞の関与が考えられた。しかし、回腸では同様の粘膜傷害の抑制効果は認めず、部位により病態に違いがある可能性が考えられた。

今回、肥満細胞阻害剤(脱顆粒阻害剤)は皮膚処置の前に投与したが、皮膚処置は背部全体に実施しており、皮膚処置前だけの投与では病変部の肥満細胞の脱顆粒を完全に抑制できなかった可能性がある。今後、肥満細胞の関与を検討する際には、*Kit^{W-sh/W-sh}* のような肥満細胞欠損マウスを用いた検討を行う必要がある(43)。

第6章 CMS の腸管形態変化への IL-13 の関与

第1節 目的

CMS の回腸で IL-13 の上昇を認めた。そこで、IL-13 が回腸の傷害に関与した可能性を考えた。

IL-13 の腸管における重要な役割は腸管上皮のアポトーシスを誘導することである(44)。IL-13 はタイトジャンクションの構成要素である claudin-2 の発現を増加させ(44, 45)、タイトジャンクションの構成を変えることにより透過性を亢進させ(45, 46)、アポトーシスが誘導されると言われている。さらに、IL-13 は

TACE (TNF alpha converting enzyme) により、膜貫通型 TNF- α 前駆体をシェディングし、カスパーゼを活性化させてアポトーシスを誘導するという報告もある(47)。

In vivo の報告では IL-13 が小腸炎を惹起するという報告がある。TNF family receptor のひとつである DR3 (death receptor 3) の family ligand である TL1A (TNF-like ligand 1A) を T 細胞、樹状細胞に発現させるトランスジェニックマウスを作成したところ、偶発的に IL-13 依存性小腸炎が認められ、寄生虫感染時に認められるような胚細胞過形成とそれに伴う粘液分泌亢進、筋層肥大を伴う小腸炎を惹起するというものである(48)。

上記から IL-13 が回腸の変化に関与したかについて、抗 IL-13 抗体を使用したモデルを作製し、検討した。

第2節 方法

第1項 動物

第2章第2節第1項で記載したものと同種のものを使用した。

第2項 抗 IL-13 抗体投与モデルの作成

抗 IL-13 抗体として Anti-mIL-13-mIgG1 (mil13-mab9-1; InvivoGen, USA)を

使用した。抗 IL-13 抗体の投与は既報に倣い(49)、実施した。作成スケジュールを Figure 15A に示す。CMS は第 2 章第 2 節第 2 項と同様の工程で作成し、抗 IL-13 抗体は 1 mg/kg を PBS に 200 μ l に溶解し、皮膚処置開始一日前から投与開始し(-1 day)、2 日毎、計 8 回腹腔内投与した。

第 3 項 統計学的処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。すべての検定は Wilcoxon 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 小腸長結果

CMS 群に対して、抗 IL-13 抗体投与群の小腸長は両群で差は認めなかった (Figure 15B)。

第 2 項 病理結果

回腸の絨毛長、陰窩長ともに CMS 群に対して、抗 IL-13 抗体投与群で有意に延長していた(絨毛長 $109.1 \pm 5.60 \mu\text{m}$ vs $203.1 \pm 7.58 \mu\text{m}$ 、Figure 15C)(陰窩長 $51.2 \pm 3.87 \mu\text{m}$ vs $76.8 \pm 5.68 \mu\text{m}$ 、Figure 15D)。

第3項 考察

抗 IL-13 抗体投与により、回腸病変は改善を認めた。CMS の回腸病変には IL-13 が機序に関係することが示唆された。

第7章 CMS の腸管形態変化へのアポトーシスの関与

第1節 目的

第6章で回腸の変化に IL-13 が関与していることが確認できた。IL13 による小腸粘膜傷害にはアポトーシスが関与しているとの既報があることから、本モデルの小腸傷害にアポトーシスが関与しているかを調べることにした。

第2節 方法

第1項 動物

第2章第2節第2項で作成した CMS の小腸検体を使用した。

第2項 TUNEL 染色

In situ Apoptosis Detection Kit (MK500; Takara、日本)を用いた TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法でアポトーシス細胞を検出し DAB 染色

し、核は 3 %メチルグリーン(43051; 武藤化学、日本)を使用した。

第 3 項 統計学的処理

検体は第 2 章で採取した検体を使用したため Control 群 n=5、CMS 群 n=6 で実施した。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。すべての検定は Wilcoxon 検定を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 3 節 結果

第 1 項 TUNEL 陽性細胞数結果

Control 群に比べて CMS 群は TUNEL 陽性細胞が多く観察された(0.15 ± 0.026 個/ $100 \mu\text{m}$ vs 0.34 ± 0.052 個/ $100 \mu\text{m}$)(Figure 16)。

第 2 項 考察

CMS の回腸において TUNEL 陽性細胞の増加が認められ、CMS の回腸病変にアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

第8章 考察

第1節 慢性機械的皮膚傷害による腸管への影響

本研究のきっかけはマウスの皮膚感作による食物アレルギーモデルの検討であった。本検討の前に行っていたマウスの検討では、アレルギー群は皮膚に感作としてオボアルブミン溶液を塗布し、チャレンジ試験として経口でオボアルブミンを投与するモデルを用いていた(50)。下痢症状に代表するアナフィラキシー様症状は明らかではなかったものの、腸管の標本を確認したところ、アレルギー群だけでなく、コントロール群でも正常とは言えない形態変化を認めたことから、皮膚傷害のみで腸管に何らかの影響が起きるのではないかと考えたことが本検討のきっかけとなった。すでに腸皮膚軸という概念は提唱されており、そのほとんどは腸内細菌を介した腸管から皮膚への報告であった(5-7)。しかし、先に述べたように Leyva-Castillo らの報告では(32)、皮膚への機械的刺激だけで、空腸の肥満細胞が増加し、透過性が亢進するという興味深い報告があった。この報告によると、皮膚からの IL-33 刺激と空腸の tuft 細胞からの IL-25 分泌により、ILC2s の活性化が誘発され、IL-4 と IL-13 が分泌される。しかし、どのような機序で皮膚からの IL-33 が腸管の tuft 細胞への刺激を送るのか詳細なメカニズムは示されていない。またこの報告では透過性亢進という機能的変化を認めているものの本実験のような組織学的な傷害には至っていない。

本研究では、同報告と異なり、空腸だけではなく回腸にも形態学的変化を認められた。空腸では mRNA 定量による炎症性サイトカイン発現や、免疫染色による炎症細胞浸潤の検討でも特異的な変化は認められず、その変化のメカニズムの解析は困難であった。回腸は IL-13、MCPT8 の上昇、肥満細胞の増加を認めたことから、これらをヒントに検討を進めることとした。IL-13 は肥満細胞、好塩基球、ILC2s、CD4⁺T 細胞といった細胞から分泌されることが知られているが、本研究ではこれらの細胞の中で、肥満細胞の増加以外は認めなかったことから、IL-13 は回腸の肥満細胞から分泌されたものと考えた。ただ、肥満細胞脱顆粒阻害剤は、空腸病変の一部は抑制したものの回腸病変には抑制効果が確認できず、肥満細胞の関与について確証は得られなかった。今回使用した肥満細胞脱顆粒阻害剤で十分な肥満細胞脱顆粒阻害が得られなかった可能性もあり、投与方法の適正化や、他の肥満細胞脱顆粒阻害剤による検討や、肥満細胞ノックアウトマウスによる検討が今後必要になると思われる。

腸管上皮細胞と IL-13 を反応させた *in vitro* 検討ではタイトジャンクションプロテインである Claudin-2 発現が 3 倍増加し、アポトーシス細胞も増加しているという報告(44)、Conductance scanning technique でイオン透過性を測定した検討では、アポトーシス細胞のある部位に一致したコンダクタンスの増加が報告されている(51)。本モデルで IL-13 の上昇を認めた回腸でも、アポトーシス細

胞の増加、抗 IL-13 抗体の効果が確認できたことから、IL-13 が絡むアポトーシスの機序が関連しているものと考えられた。

本研究では、皮膚傷害により腸管局所で肥満細胞と IL-13 が増加することは分かったが、皮膚傷害がどのような経路で腸管局所での変化を誘発したかは十分に解明できなかった。Leyva-Castillo らの報告では(32)、皮膚で IL-33 の発現亢進を認め、腸を含む全身への影響の原因となったと報告されたが、本実験では IL-33 の上昇をとらえていない。また腸の tuft 細胞からの IL-25 の分泌や ILC2s の増加が指摘されているが、本実験ではいずれも認めず、異なる機序が想定される。1つ目の可能性は皮膚からは TNF- α の産生亢進が確認されたが、既報によると TNF- α は IL-13 による反応に強く関わっていると報告されており皮膚で産生された TNF- α が血液を介して消化管に影響した可能性がある。また TNF- α は上皮細胞のアポトーシスを惹起すると報告されている。しかし、消化管粘膜には TNF- α 受容体細胞は血管内皮細胞や免疫系細胞など豊富にある一方で、血管内皮細胞の活性化を示す接着分子の発現亢進(data not shown) や免疫系細胞の活性化を示す炎症性サイトカインの発現亢進を認めなかった。以上から、アポトーシスを惹起するほどの高濃度の TNF- α が血液中に放出されたとは考えにくい。2つ目の可能性は、皮膚の肥満細胞から様々なプロテアーゼなどのメディエーターも放出された可能性がある。肥満細胞は抗

原などの刺激により活性化されるとヒスタミン、トリプターゼやキマーゼなどのプロテアーゼ、ヘパリン、各種脂質メディエーターのプロスタグランジン D2 やロイコトリエン、TNF- α などの様々なサイトカイン、ケモカインなどを分泌する(52)。これら皮膚で産生されたプロテアーゼが血流を介して消化管の TNF- α 受容体陽性細胞を刺激し臓器相関を惹起した可能性も想定される。実際に本研究では肥満細胞の脱顆粒によって分泌される代表的な血管作用性アミンであるヒスタミンの上昇を認めた。ヒスタミンはヒスタミン受容体を介して血管内皮細胞から一酸化窒素(nitric oxide: NO) の産生を促して、血管弛緩と血流量増大により血管透過性を亢進させる(53)。ヒスタミン受容体は H1 から H4 の 4 種類が存在するが、その中で H4 がヒトの炎症性腸疾患やマウスの腸炎モデルの病態で重要な働きをしており治療標的となる可能性が示唆されていることから、血中で増加したヒスタミンが腸管局所の受容体に作用した可能性はあるかもしれない。今後、ヒスタミン阻害剤が小腸傷害を軽減するか検討したい。他の可能性として、機械刺激による搔痒感がトリガーになり、神経-脳-消化管連関を介して小腸傷害をきたした可能性や、腸内細菌叢の変化が関与している可能性もあるが、機序の解明は今後の課題である。

第2節 本モデルにおける神経系への影響

最後に、神経-脳-消化管連関に関して考案を加えたい。CMS モデルは背中全体の皮膚にダメージを与えているため、掻痒感、ひいては疼痛を伴うモデルであることは否定できない。皮膚疾患の代表症状である掻痒感は、痛みと同様に神経の C 繊維を介して伝達される。近年、皮膚の掻痒感にはヒスタミン非依存性の機序として TSLP や IL-33 による非ヒスタミン作動性神経の刺激が原因として大きいと報告がされている(54)。本実験では TSLP や IL-33 の皮膚での発現増加は捉えられておらず、積極的には示唆されなかった。しかし、皮膚傷害、皮膚疾患はそれ自体が元来、精神的ストレスとは切り離せない性質を持ち、腸皮膚相関について紐解いてみると古くは 1930 年に、脳も含めた腸-脳-皮膚相関(gut-brain-skin axis) が Stokes、Pillsbury らにより提唱されていた(55)。

腸脳相関がベースにあるとされているのが FGIDs (Functional gastrointestinal disorders) である。機能性ディスぺプシア(functional dyspepsia: FD)、過敏性腸症候群(irritable bowel syndrome: IBS) など、一般的な臨床検査において器質的な病変が認められないにも関わらず慢性的な消化器症状を呈する疾患群として臨床的には扱われている。国際的にはローマ基準(Rome criteria) を使用することが標準とされており、2023 年現在は Rome IV diagnostic criteria (RomeIV) が適用されている。FGIDs の定義はローマ基準の改定毎に見直されており、現

在は腸と脳の相互作用の障害をベースとした、消化管運動異常、内臓知覚過敏、消化管粘膜および免疫機能の変化、腸内細菌叢の変化、および中枢神経系 (CNS) 処理の変化のいずれかの組み合わせに関連する消化管症状によって分類される障害のグループとされている(56)。その FGIDs とアトピー性疾患の近年報告がある。Jones らは、イギリスで IBS 症状単独の患者、FD 症状単独の患者、慢性特発性便秘単独の患者、複数の FGIDs 症状を持つ患者とアトピー性疾患の発生率とリスクに関するコホート研究を実施し、FGIDs、気分障害、アトピー性疾患の間の 3 方向の相互接続を示唆している。彼らは IBS 単独、FD 単独、便秘単独、および複数の FGIDs を持つ患者におけるアトピー性疾患の有病率が、FGIDs を持たないコントロールと比較して高く、年齢、性別、気分障害といった他のリスク因子を除外した統計学的検討においても、FD 単独と複数の FGIDs を持つ患者のアトピー性疾患の有病率が有意に高いことを報告している。また、FGIDs とアトピー性疾患の両方が確認された患者 5968 人のうち、大多数 (78.6%、n = 4692) は、FGIDs が最初に記録された時点でアトピー性疾患を持っていなかったとも報告している(57)。この事実から FGIDs とアトピー性疾患が紐づけられ、脳も含めた腸-脳-皮膚相関の可能性が示唆される。このことにより皮膚疾患とストレスの要素が臨床的にも切り離せないともいえるだろう。

本研究では Control 群のマウスには、第 2 章第 1 節第 1 項に述べたような理

由から、皮膚処置をしていない麻酔処置のみを実施したが、剃毛処理しただけの群は検討しておらず、剃毛処理がどの程度、腸管病変へ影響するかを検討していない点が limitation として挙げられる。

第3節 本検討の展望

本研究により、肌荒れ時に界面活性剤の暴露が起きることにより腸管に器質的な傷害が惹起される能性が示唆された。アトピー性皮膚炎患者に IBS 様症状が多いという既報から腸-脳-皮膚相関の存在の可能性が示唆されているが(57)、本研究により皮膚病変が直接腸管に影響を及ぼす可能性が考慮されるようになれば、複雑な病態や症状を持つ IBS の病状の一部が説明できるかもしれない。また衛生観念の強い現代社会において、急激に増加している炎症性腸疾患などの消化器病の一因に皮膚傷害が関係している可能性があり、機序解明が発症予防につながる可能性がある。

第9章 結論

慢性機械的皮膚傷害は皮膚の肥満細胞の増加と TNF- α の上昇を惹起し、何らかの機序を介することにより、回腸の肥満細胞の増加と IL-13 分泌をもたらした。この変化はアポトーシスを誘導し、回腸に形態学的変化を生じさせたものと

考えられた。皮膚傷害が腸管病変を引き起こす可能性が示された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座講師 東山正明博士および防衛医科大学校内科学講座教授 穂苺量太博士に衷心より感謝申し上げます。

皮膚の検討に対し、貴重な御助言と御協力を賜りました防衛医科大学皮膚科学教授 佐藤貴浩博士に衷心より感謝申し上げます。

免疫染色に関して、貴重な御助言と御協力を賜りました病態病理学 穂苺玲羽様、大沼千波様、病態病理学教授 津田均博士に衷心より感謝申し上げます。また、フローサイトメトリーでの解析に関して、貴重な御助言と御協力を賜りました理化学研究所生命医科学研究センター粘膜システム研究チーム 佐藤尚子博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、貴重な御助言と御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座の諸先生に感謝申し上げます。また本研究の一部は、一般財団法人 防衛医学振興会からの助成金により実施しました。この場を借りて深謝いたします。

略語一覽

CAE: chloroacetate esterase

CD: crypt depth

CMS: chronic mechanical skin injury model

CMS-short: chronic mechanical skin injury -short term model

FITC: fluorescein isothiocyanate

HE: hematoxylin eosin

IFN- γ : interferon-gamma

ILCs: innate lymphoid cells

LPL: lamina propria lymphocyte

MC903: calcipotriol

MCPT: mast cell protease

MLN: mesenteric lymph node

ns: not significant

SDS: sodium dodecyl sulfate

SI: small intestine

T/S: tape-stripping

TNF- α : tumor necrosis factor alfa

TSLP: thymic stromal lymphopietin

TUNEL: TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) - mediated dUTP (2'-Deoxyuridine-5'-triphosphate) nick end labeling

VH: villous height

VH to CD ratio: villous height of crypt depth ratio

引用文献

1. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* 2020;30(6):492-506.doi:10.1038/s41422-020-0332-7
2. Liang S, Wu X, Jin F. Gut-Brain Psychology: Rethinking Psychology From the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Integr Neurosci.* 2018;12:33.doi:10.3389/fnint.2018.00033
3. Tilg H, Adolph TE, Trauner M. Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications. *Cell Metab.* 2022;34(11):1700-18.doi:10.1016/j.cmet.2022.09.017
4. Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int.* 2013;83(6):1010-6.doi:10.1038/ki.2012.440
5. O'Neill CA, Monteleone G, McLaughlin JT, Paus R. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. *Bioessays.* 2016;38(11):1167-76.doi:10.1002/bies.201600008
6. Sinha S, Lin G, Ferenczi K. The skin microbiome and the gut-skin axis.

Clin Dermatol. 2021;39(5):829-39.doi:10.1016/j.clindermatol.2021.08.021

7. Sanchez-Pellicer P, Navarro-Moratalla L, Nunez-Delegido E, Ruzafa-Costas B, Aguera-Santos J, Navarro-Lopez V. Acne, Microbiome, and Probiotics: The Gut-Skin Axis. *Microorganisms*. 2022;10(7).doi:10.3390/microorganisms10071303

8. Santilli A, Stefanopoulos S, Cresci GAM. The gut barrier and chronic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2022;25(3):178-85.doi:10.1097/MCO.0000000000000820

9. Smythies LE, Smythies JR. Microbiota, the immune system, black moods and the brain-melancholia updated. *Front Hum Neurosci*. 2014;8:720.doi:10.3389/fnhum.2014.00720

10. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, Motola DL, Luther S, Bohr S, Jeoung SW, Deshpande V, Singh G, Turner JR, Yarmush ML, Chung RT, Patel SJ. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):222-32.doi:10.1016/j.jcmgh.2015.01.001

11. Mu Q, Kirby J, Reilly CM, Luo XM. Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases. *Front Immunol*.

2017;8:598.doi:10.3389/fimmu.2017.00598

12. Martel J, Chang SH, Ko YF, Hwang TL, Young JD, Ojcius DM. Gut barrier disruption and chronic disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2022;33(4):247-65.doi:10.1016/j.tem.2022.01.002

13. Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat Rev Immunol.* 2021;21(11):739-51.doi:10.1038/s41577-021-00538-7

14. Matheson JT, Holsinger RMD. The Role of Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2).doi:10.3390/ijms24021001

15. Huang Z, Liu K, Ma W, Li D, Mo T, Liu Q. The gut microbiome in human health and disease-Where are we and where are we going? A bibliometric analysis. *Front Microbiol.* 2022;13:1018594.doi:10.3389/fmicb.2022.1018594

16. Deng Y, Wang H, Zhou J, Mou Y, Wang G, Xiong X. Patients with Acne Vulgaris Have a Distinct Gut Microbiota in Comparison with Healthy Controls. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(8):783-90.doi:10.2340/00015555-2968

17. Yan HM, Zhao HJ, Guo DY, Zhu PQ, Zhang CL, Jiang W. Gut microbiota alterations in moderate to severe acne vulgaris patients. *J Dermatol.*

2018;45(10):1166-71.doi:10.1111/1346-8138.14586

18. Yan H-M, Zhao H-J, Guo D-Y, Zhu P-Q, Zhang C-L, Jiang W. Gut microbiota alterations in moderate to severe acne vulgaris patients. *The Journal of Dermatology*. 2018;45(10):1166-71.doi:<https://doi.org/10.1111/1346-8138.14586>

19. Yu Y, Dunaway S, Champer J, Kim J, Alikhan A. Changing our microbiome: probiotics in dermatology. *Br J Dermatol*. 2020;182(1):39-46.doi:10.1111/bjd.18088

20. Huang R, Ning H, Shen M, Li J, Zhang J, Chen X. Probiotics for the Treatment of Atopic Dermatitis in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7.doi:10.3389/fcimb.2017.00392

21. Lee H, Lee JH, Koh SJ, Park H. Bidirectional relationship between atopic dermatitis and inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83(5):1385-94.doi:10.1016/j.jaad.2020.05.130

22. Fenner J, Clark RAF. Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2016. p. 1-17.

23. Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(1):19-30.doi:10.1038/s41577-018-0084-5
24. Celebi Sozener Z, Cevhertas L, Nadeau K, Akdis M, Akdis CA. Environmental factors in epithelial barrier dysfunction. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(6):1517-28.doi:10.1016/j.jaci.2020.04.024
25. Xian M, Wawrzyniak P, Ruckert B, Duan S, Meng Y, Sokolowska M, Globinska A, Zhang L, Akdis M, Akdis CA. Anionic surfactants and commercial detergents decrease tight junction barrier integrity in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):890-3 e9.doi:10.1016/j.jaci.2016.07.003
26. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(31):11736-41.doi:10.1073/pnas.0604575103
27. Moosbrugger-Martinz V, Schmuth M, Dubrac S. A Mouse Model for Atopic Dermatitis Using Topical Application of Vitamin D3 or of Its Analog MC903. *Methods Mol Biol.* 2017;1559:91-106.doi:10.1007/978-1-4939-6786-5_8

28. Wilmer JL, Burleson FG, Kayama F, Kanno J, Luster MI. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 1994;102(6):915-22.doi:10.1111/1523-1747.ep12383512
29. Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della Loggia R. The croton oil ear test revisited. *Agents Actions.* 1986;17(3-4):347-9.doi:10.1007/BF01982641
30. Kitajima M, Kimura A, Suzuki H. Cutting Edge: Nqo1 Regulates Irritant Contact Hypersensitivity against Croton Oil through Maintenance of Dendritic Epidermal T Cells. *J Immunol.* 2018;200(5):1555-9.doi:10.4049/jimmunol.1701389
31. Elmes ME, Howells CH, Lowe GH. Mucosal flora of the small intestine and the effect of preoperative antibiotics. *J Clin Pathol.* 1984;37(11):1272-5.doi:10.1136/jcp.37.11.1272
32. Leyva-Castillo JM, Galand C, Kam C, Burton O, Gurish M, Musser MA, Goldsmith JD, Hait E, Nurko S, Brombacher F, Dong C, Finkelman FD, Lee RT, Ziegler S, Chiu I, Austen KF, Geha RS. Mechanical Skin Injury Promotes Food Anaphylaxis by Driving Intestinal Mast Cell Expansion. *Immunity.* 2019;50(5):1262-75 e4.doi:10.1016/j.immuni.2019.03.023

33. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 2002;3(7):673-80.doi:10.1038/ni805
34. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention JJ, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, Eberl G, Di Santo JP. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity.* 2008;29(6):958-70.doi:10.1016/j.immuni.2008.11.001
35. Mackley EC, Houston S, Marriott CL, Halford EE, Lucas B, Cerovic V, Filbey KJ, Maizels RM, Hepworth MR, Sonnenberg GF, Milling S, Withers DR. CCR7-dependent trafficking of RORgamma(+) ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. *Nat Commun.* 2015;6:5862.doi:10.1038/ncomms6862
36. Pejler G. Novel Insight into the in vivo Function of Mast Cell Chymase: Lessons from Knockouts and Inhibitors. *J Innate Immun.* 2020;12(5):357-72.doi:10.1159/000506985

37. Poorafshar M, Helmby H, Troye-Blomberg M, Hellman L. MMCP-8, the first lineage-specific differentiation marker for mouse basophils. Elevated numbers of potent IL-4-producing and MMCP-8-positive cells in spleens of malaria-infected mice. *Eur J Immunol.* 2000;30(9):2660-8.doi:10.1002/1521-4141(200009)30:9<2660::AID-IMMU2660>3.0.CO;2-I
38. Derakhshan T, Samuchiwal SK, Hallen N, Bankova LG, Boyce JA, Barrett NA, Austen KF, Dwyer DF. Lineage-specific regulation of inducible and constitutive mast cells in allergic airway inflammation. *J Exp Med.* 2021;218(1).doi:10.1084/jem.20200321
39. Akdis CA, Arkwright PD, Bruggen MC, Busse W, Gadina M, Guttman-Yassky E, Kabashima K, Mitamura Y, Vian L, Wu J, Palomares O. Type 2 immunity in the skin and lungs. *Allergy.* 2020;75(7):1582-605.doi:10.1111/all.14318
40. Green DP, Limjunyawong N, Gour N, Pundir P, Dong X. A Mast-Cell-Specific Receptor Mediates Neurogenic Inflammation and Pain. *Neuron.* 2019;101(3):412-20 e3.doi:10.1016/j.neuron.2019.01.012
41. Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP, Henricks PA, Folkerts G. Sodium cromoglycate and doxantrazole are oxygen radical scavengers. *Eur Respir J.*

2002;20(4):867-72.doi:10.1183/09031936.02.00382002

42. Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. *Dig Dis Sci.* 1998;43(4):727-37.doi:10.1023/a:1018853728251

43. Grimaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ. Mast cell-deficient *W-sash* c-kit mutant *Kit W-sh/W-sh* mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol.* 2005;167(3):835-48.doi:10.1016/S0002-9440(10)62055-X

44. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005;129(2):550-64.doi:10.1016/j.gastro.2005.05.002

45. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4969-76.doi:10.1242/jcs.00165

46. Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD. Epithelial

apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function.

Mucosal Immunol. 2008;1 Suppl 1:S58-61.doi:10.1038/mi.2008.46

47. Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T. Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice—a pathway associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2011;141(6):2119-29 e8.doi:10.1053/j.gastro.2011.08.040

48. Meylan F, Song YJ, Fuss I, Villarreal S, Kahle E, Malm IJ, Acharya K, Ramos HL, Lo L, Mentink-Kane MM, Wynn TA, Migone TS, Strober W, Siegel RM. The TNF-family cytokine TL1A drives IL-13-dependent small intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2011;4(2):172-85.doi:10.1038/mi.2010.67

49. Kasaian MT, Page KM, Fish S, Brennan A, Cook TA, Moreira K, Zhang M, Jesson M, Marquette K, Agostinelli R, Lee J, Williams CM, Tchistiakova L, Thakker P. Therapeutic activity of an interleukin-4/interleukin-13 dual antagonist on oxazolone-induced colitis in mice. *Immunology.* 2014;143(3):416-27.doi:10.1111/imm.12319

50. Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita

K, Yoshimoto T. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *Int Immunol.* 2014;26(10):539-49.doi:10.1093/intimm/dxu058

51. Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K, Mankertz J, Schmitz H, Wagner S, Fromm M, Schulzke JD. Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol.* 2001;535(Pt 2):541-52.doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00541.x

52. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunological Reviews.* 2018;282(1):121-50.doi:10.1111/imr.12634

53. Ashina K, Tsubosaka Y, Nakamura T, Omori K, Kobayashi K, Hori M, Ozaki H, Murata T. Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132367.doi:10.1371/journal.pone.0132367

54. Egawa G. [the Mechanism of Itch]. *Arerugi.* 2020;69(4):256-9.doi:10.15036/arerugi.69.256

55. Stokes JH. The Effect on the Skin of Emotional and Nervous States. *Archives of Dermatology and Syphilology.* 1930;22(6):962-

93.doi:10.1001/archderm.1930.01440180008002

56. Drossman DA. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV. *Gastroenterology*. 2016.doi:10.1053/j.gastro.2016.02.032

57. Jones MP, Walker MM, Ford AC, Talley NJ. The overlap of atopy and functional gastrointestinal disorders among 23,471 patients in primary care. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(4):382-91.doi:10.1111/apt.12846

附記

本研究の主旨は下記の学会で発表した。

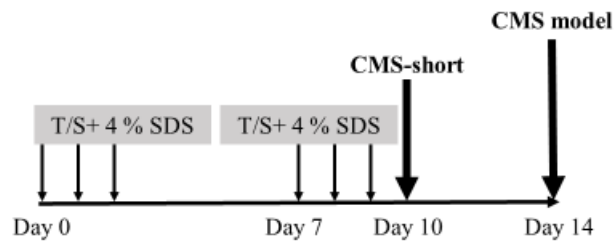
(1)第4回アレルギー消化器疾患研究会(2021年8月、Web)

(2)第108回日本消化器病学会総会(2022年4月、東京)

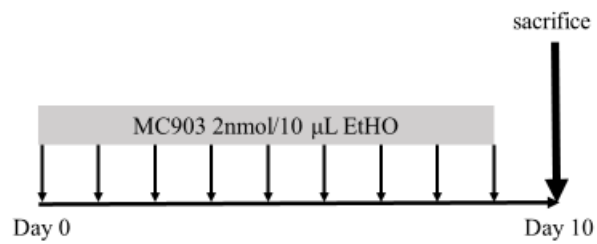
(3)米国消化器病週間 2023 (2023年5月、シカゴ)

図表

A



B



C

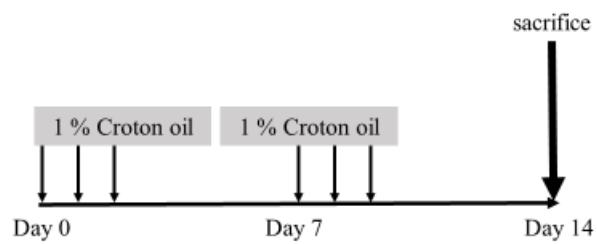


Figure 1. 各種皮膚傷害モデルのプロトコール

A. 慢性機械的皮膚傷害モデル (CMS: Chronic mechanical skin injury model) と慢性機械的皮膚傷害(短期)モデル (CMS-short: chronic mechanical skin injury -short term model)、T/S: tape-stripping

B. MC903 アトピー性皮膚炎モデル

C. 接触性皮膚炎モデル (Croton oil モデル)

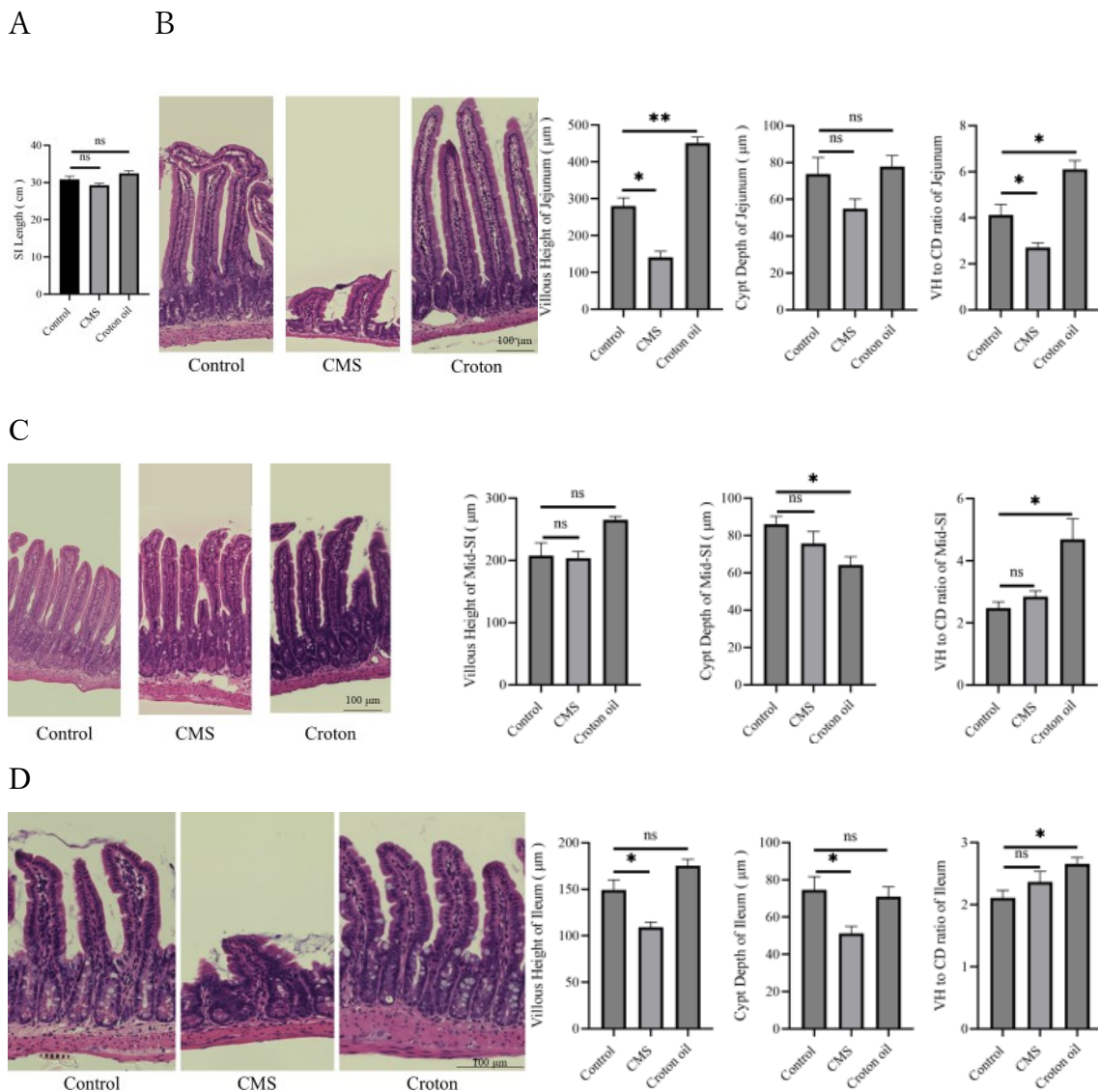


Figure 2. 各種皮膚傷害モデルの各種結果

A. 小腸長結果、B-D はそれぞれ jejunum、Mid-SI (middle of small intestine)、ileum の HE 標本、絨毛長(Villous Height: VH) 結果、陰窩長(crypt depth) 結果、絨毛陰窩比(Villous Height to Crypt depth ratio) 結果。統計はすべて Wilcoxon 検定を用い、Control 群 n=5、CMS 群 n=6、数値は平均 ± 標準誤差で記し、結果を有意差(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)、ns (not significant) で示す。

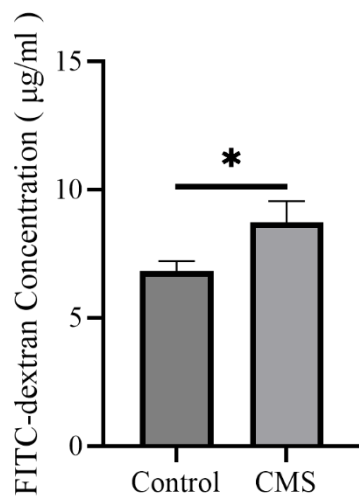
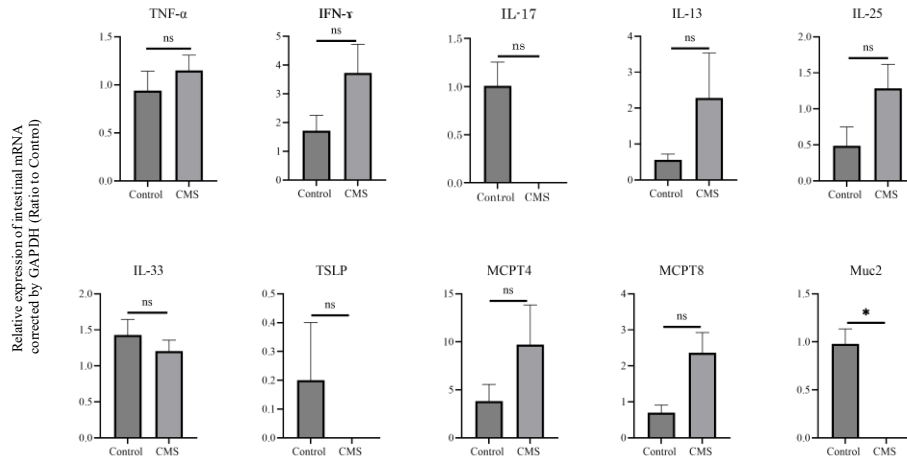


Figure 3. 慢性機械的皮膚傷害モデル(CMS) の腸管透過性試験結果

統計は Wilcoxon 検定を用い、両群ともに n=6、数値は平均 ± 標準誤差で表記

し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(* $p < 0.05$) で示す。

A



B

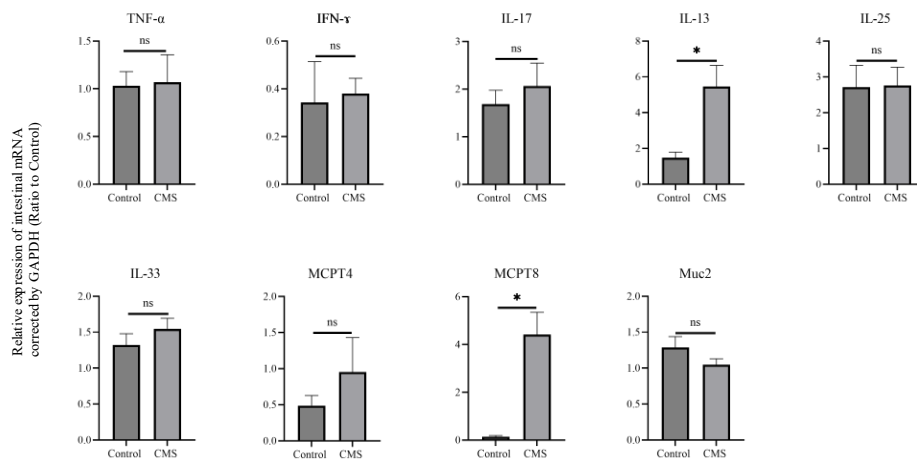


Figure 4. 慢性機械的皮膚傷害モデル(CMS) のmRNA 結果

A. Jejunum、B. Ileum のmRNA 結果、統計は Wilcoxon 検定を用い、Control 群 n=5、CMS 群 n=6 で実施し、数値は平均 ± 標準誤差で記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差 (* $p < 0.05$)、ns: not significant で示す。

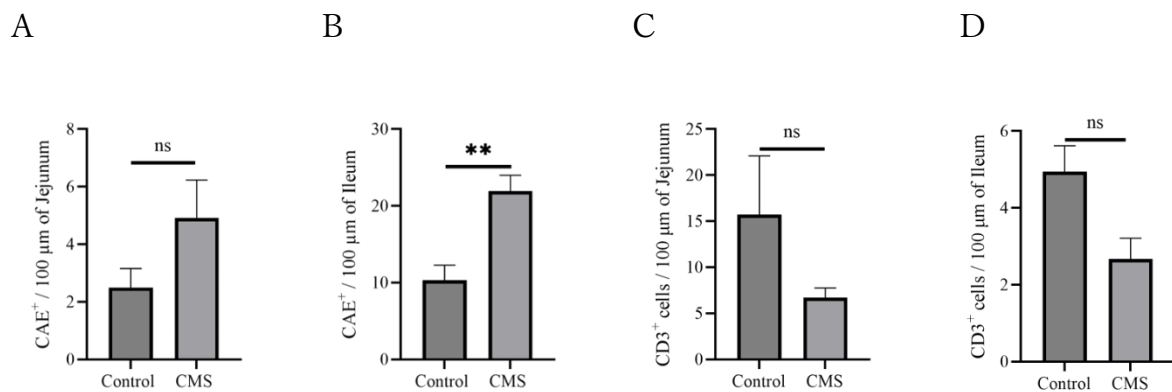


Figure 5. 慢性機械的皮膚傷害モデル(CMS) の CAE (chloroacetate esterase) 染色及び CD3 陽性細胞結果

A. Jejunum、B. Ileum の CAE 陽性細胞結果、C. Jejunum、D. Ileum の CD3 陽性細胞結果、統計は Wilcoxon 検定を用い、Control 群 n=5、CMS 群 n=6 で実施し、数値は平均 ± 標準誤差で表記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(**p<0.01)、ns (not significant) で示す。

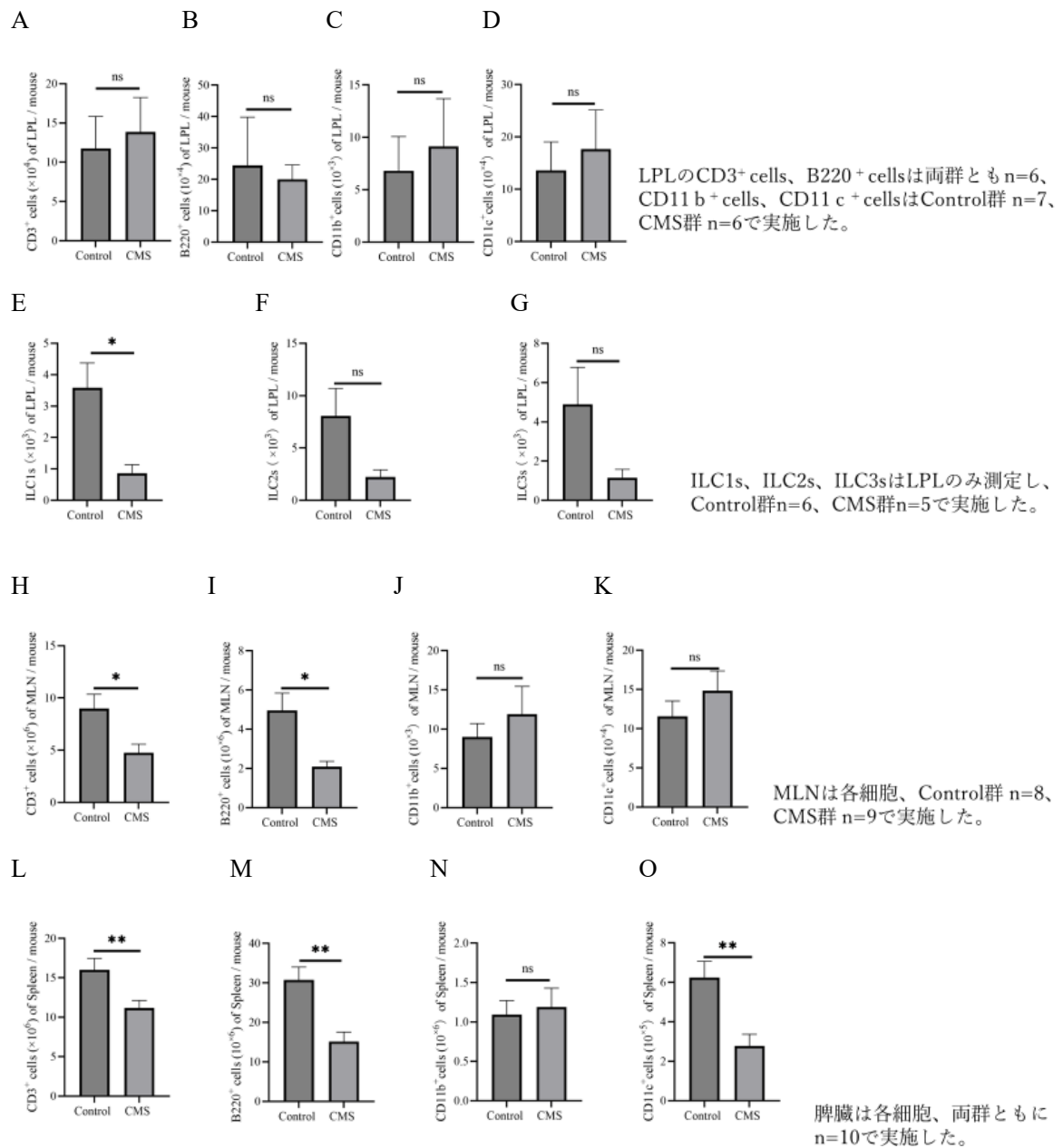
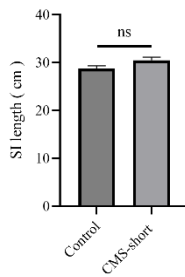
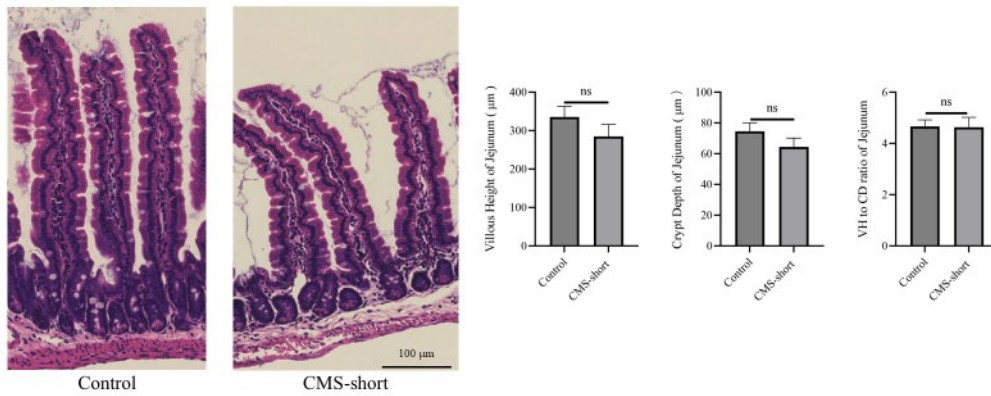


Figure 6. 慢性機械的皮膚傷害モデル(CMS) のフローサイトメトリーによる検討結果
A-G は LPL (lamina propria lymphocyte)、H-K は MLN (mesenteric lymph node)、L-O は spleen の結果である。各部位で CD3、B220、CD11 b、C D 11 c 陽性細胞を検討した。LPL では ILCs の検討も行った。統計は Wilcoxon 検定を用い、数値は平均 \pm 標準誤差で表記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)、ns (not significant) で示す。

A



B



C

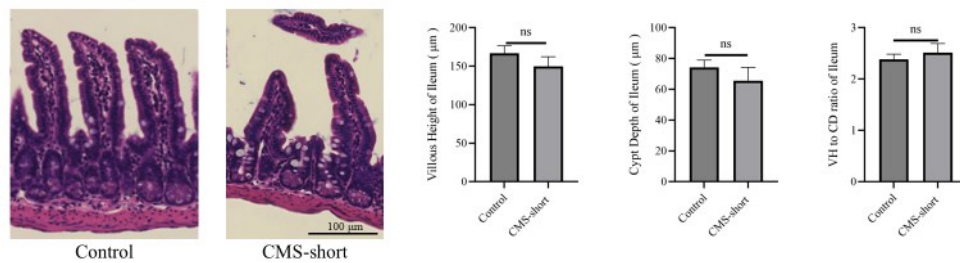


Figure 7. 慢性機械的皮膚傷害(短期)モデル(CMS-short) の各種結果

A.小腸結果、B. Jejunum、C. Ileum の HE 標本、絨毛長(Villous Height: VH) 結果、陰窩長(crypt depth) 結果、絨毛陰窩比 (Villous Height to Crypt depth ratio) 結果。統計はすべて Wilcoxon 検定を用い、両群ともに n=6 で実施し、数値は平均 ± 標準誤差で表記し、対象群に対して比較した場合の結果を示す。ns: not significant。

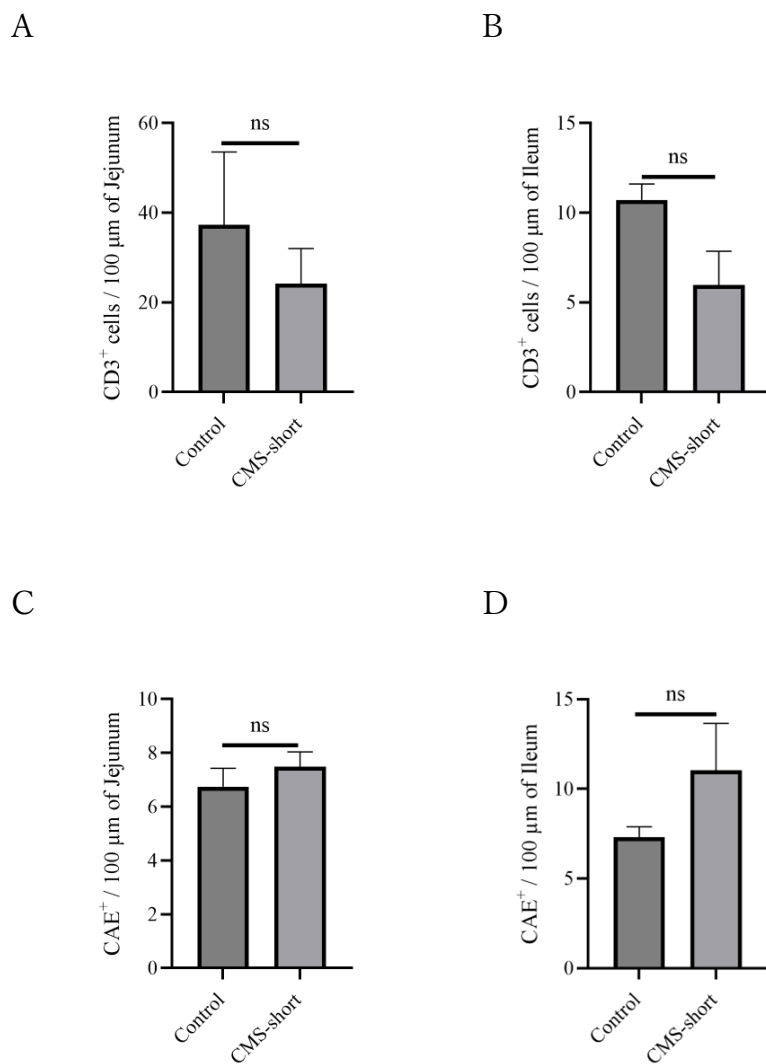
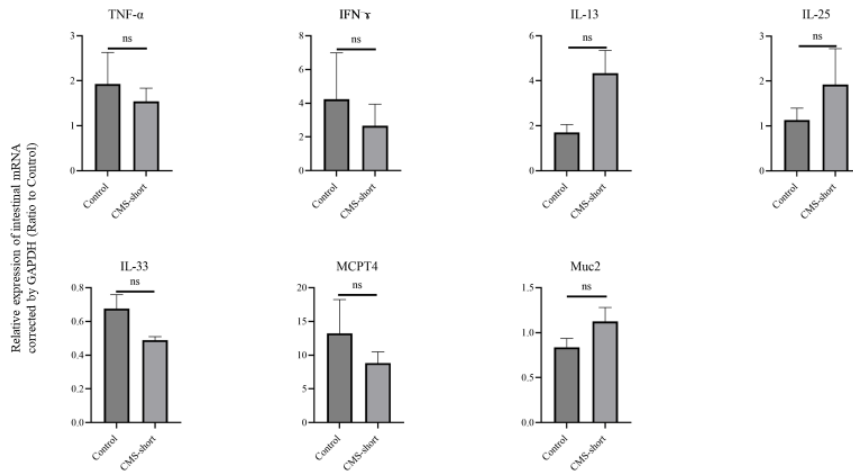


Figure 8. 慢性機械的皮膚傷害(短期)モデル(CMS-short) の A. Jejunum、B. Ileum の CD3 陽性細胞結果、C. Jejunum、D. Ileum の CAE (chloroacetate esterase) 陽性細胞結果。統計はすべて Wilcoxon 検定を用い、両群ともに n=6 で実施し、数値は平均 ± 標準誤差で表記し、対象群に対して比較した場合の結果を示す。
ns: not significant。

A



B

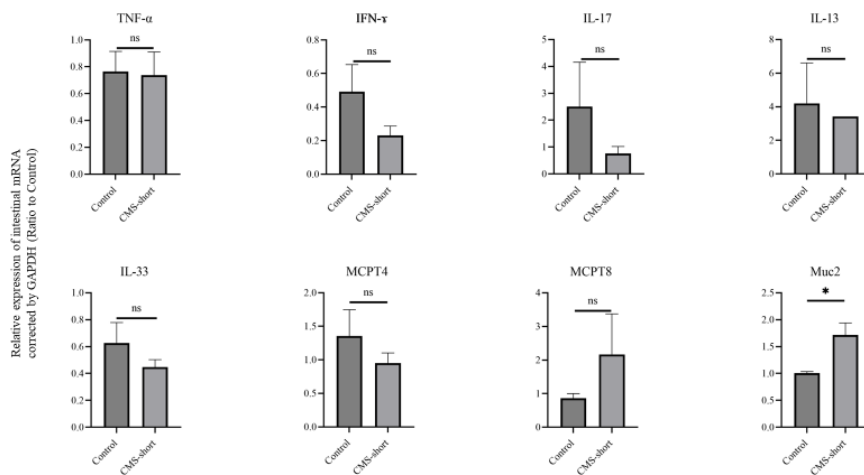
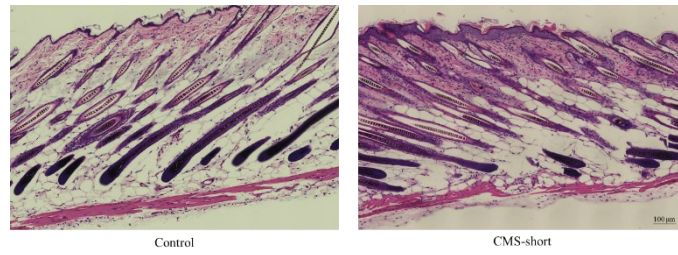


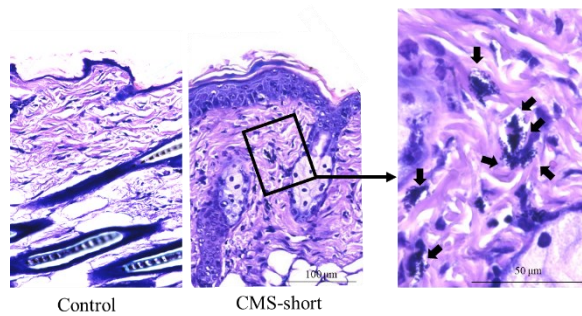
Figure 9. 慢性機械的皮膚傷害(短期)モデル(CMS-short) の小腸の mRNA 発現結果

A. Jejunum の mRNA 発現結果、IL-17、MCPT 8 は両群とも発現がなかった。B. Ileum の mRNA 発現結果、IL-25 は両群とも発現がなかった。統計はすべて Wilcoxon 検定を用い、両群ともに n=6 で実施し、数値は平均 ± 標準誤差で表記し、有意差(*p<0.05)、ns (not significant)で示す。

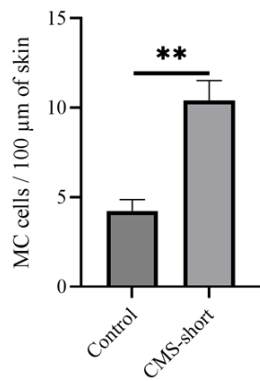
A



B



C



D

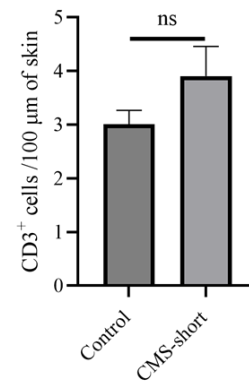


Figure 10. 慢性機械的傷害(短期)モデル(CMS-short) の皮膚病理

A. HE 染色、B. ギムザ染色、矢印は肥満細胞、C. 皮膚の肥満細胞数、D. 皮膚の CD3 陽性細胞数、統計はすべて Wilcoxon 検定を用い、両群ともに n=6 で実施し、数値は平均 ± 標準誤差で表記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(**p<0.01)、ns (not significant) で示す。

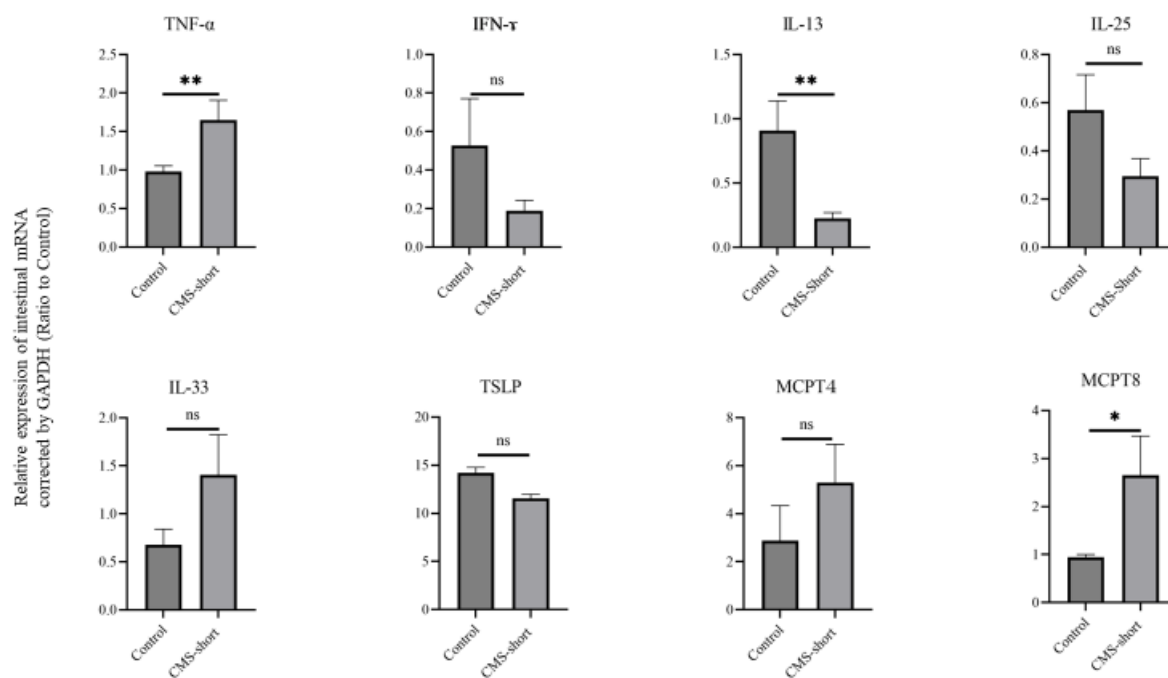


Figure 11. 慢性機械的傷害(短期)モデル(CMS-short) の皮膚における mRNA 発現結果

統計はすべて Wilcoxon 検定を用い、両群ともに n=6 で実施し、数値は平均 ± 標準誤差で表記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(*p<0.05、** p<0.01)、ns (not significant) で示す。

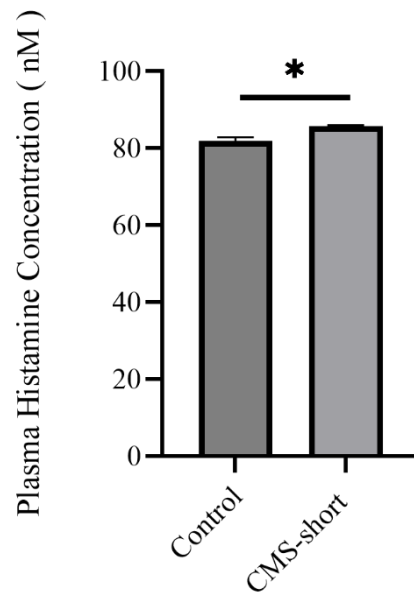


Figure 12. 慢性機械的皮膚傷害(短期)モデル(CMS-short)の血漿ヒスタミン濃度、統計は Wilcoxon 検定を用い、両群ともに n=6 で実施、数値は平均 ± 標準誤差で表記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(* $p < 0.05$) で示す。

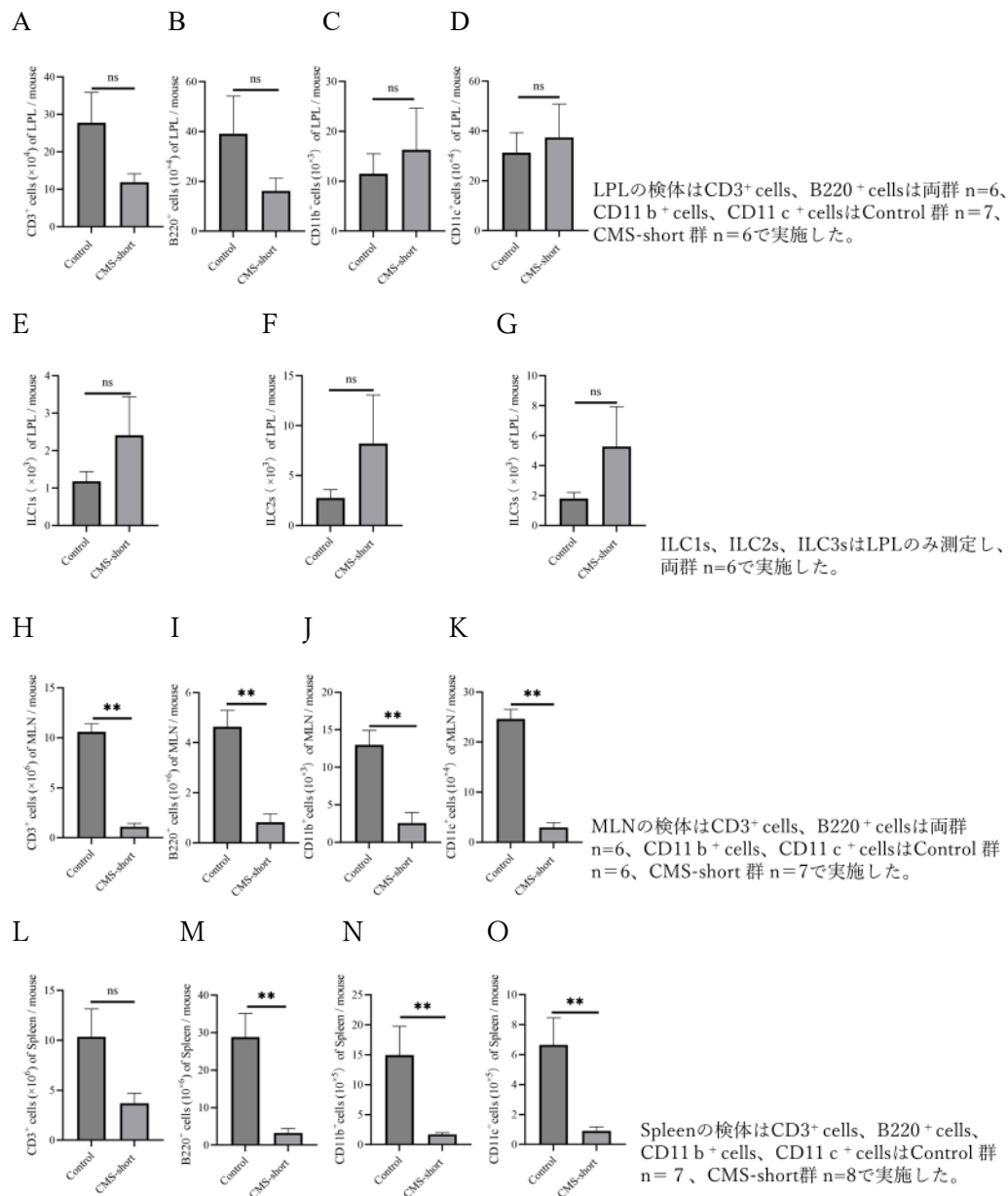


Figure 13. 慢性機械的皮膚傷害(短期)モデル(CMS-short) のフローサイトメトリーによる検討結果

A-G は LPL (lamina propria lymphocyte)、H-K は MLN (mesenteric lymph node)、L-O は spleen の結果であり、CD3、B220、CD11 b、CD11 c 陽性細胞を検討した。LPL では ILCs のサブセットの検討も行った。統計は Wilcoxon 検定を用い、数値は平均 ± 標準誤差で記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(**p<0.01)、ns (not significant) で示す。

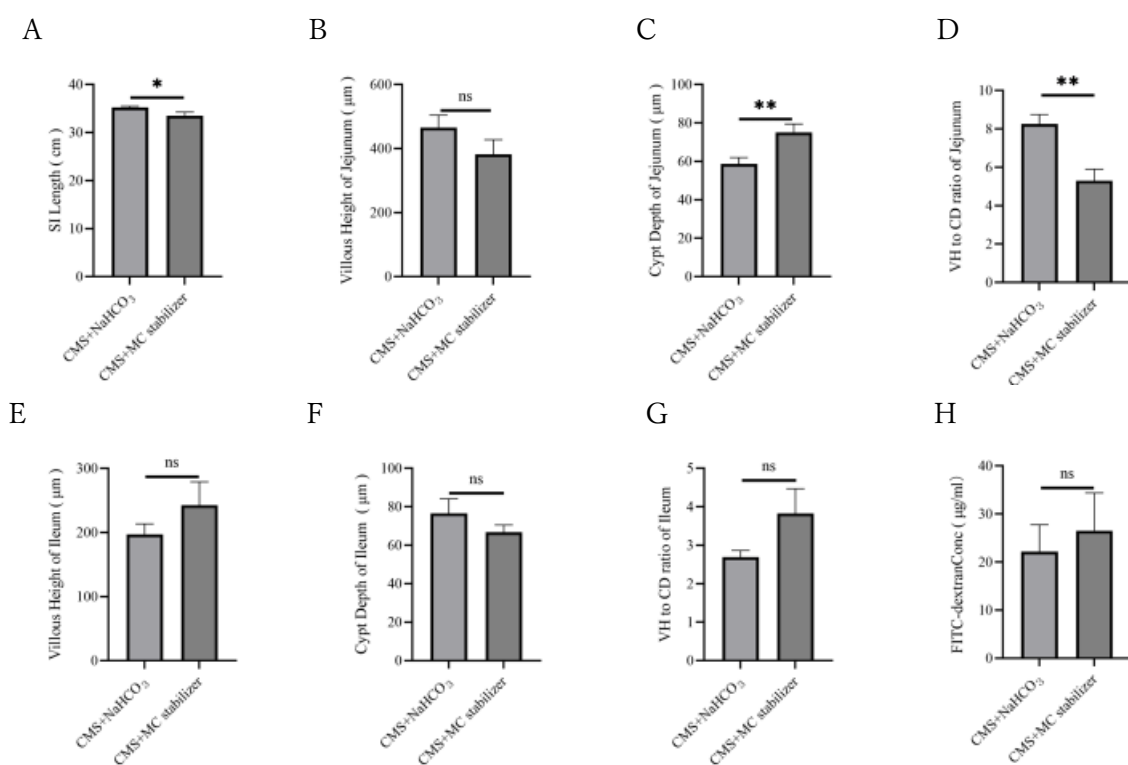
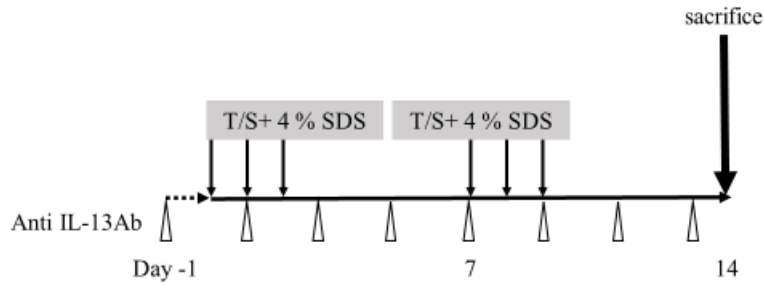


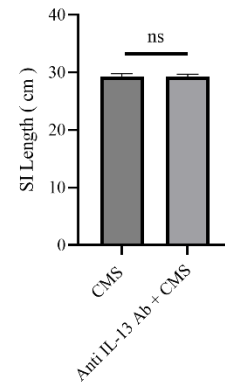
Figure 14. 肥満細胞阻害剤投与モデルの結果

A.小腸長結果、B. Jejunum 絨毛長(Villous Height: VH) 結果、C. Jejunum 陰窩長 (CD: crypt depth) 結果、D. Jejunum 絨毛陰窩比(Villous Height to Crypt depth ratio) 結果、E. Ileum 絨毛長結果、F. Ileum 陰窩長結果、G. Ileum 絨毛陰窩比結果、H. 腸管透過性試験結果、統計は Wilcoxon 検定を用い、A-G の検討は CMS+NaHCO₃ 群 n=5、CMS+MC stabilizer 群 n=6、Hの検討は両群ともに n=6、数値は平均 ± 標準誤差で記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(*p<0.05、**p<0.01)、ns (not significant) で示す。

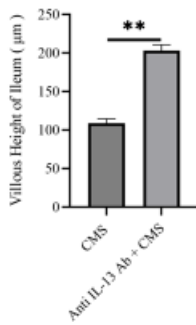
A



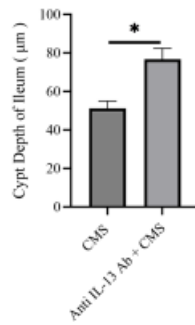
B



C



D



E

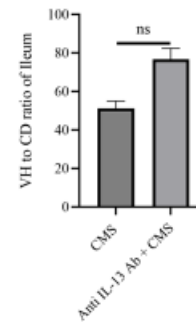


Figure 15. 抗 IL-13 抗体投与モデルの各種結果

A. 抗 IL-13 抗体投与モデルのプロトコル。△は抗 IL-13 抗体投与のタイミングを意味し、皮膚処置の前日より投与開始し 2 日毎、計 8 回投与した。T/S: tape-stripping、B. 小腸長結果、C. 絨毛長 (Villous Height: VH) 結果、D. 陰窩長 (CD: crypt depth) 結果、E. 絨毛陰窩比 (Villous Height to Crypt depth ratio) 結果。統計は Wilcoxon 検定を用い、両群とも n=6、数値は平均 ± 標準誤差で記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差 (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)、ns (not significant) で示す。

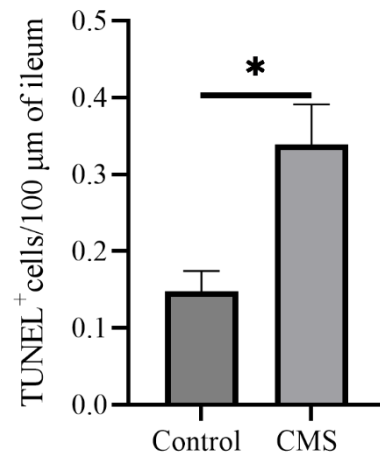


Figure 16. 慢性機械的皮膚傷害モデル(CMS) の回腸の TUNEL 染色の結果

統計は Wilcoxon 検定を用い、Control 群 n=5、CMS 群 n=6、数値は平均 ± 標準誤差で記し、対象群に対して比較した場合の結果を有意差(* $p < 0.05$) で示す。