

# 神経ペプチドおよびストレスによる皮膚バリア機能障害のメカニズム解析

大分大学医学部皮膚科学<sup>1</sup>、獨協医科大学越谷病院皮膚科<sup>2</sup>

片桐 一元<sup>1,2</sup>、波多野 豊<sup>1</sup>、倉橋 理絵子<sup>1</sup>

Chronic stress inhibits the recovery of permeability barrier function via induction of glucocorticoids as an end-product of hypothalamic - Pituitary - Adrenal axis. In this study, we examined an effect of acute stress on the barrier function in mice. Acute stress, which was induced by transfer of mice to a new cage and keeping them with a crowded condition for 12 hours, inhibited the recovery of barrier function after acute disruption by tape stripping. Chemical denervation by capsaicin abolished the inhibitory effect of the stress. Intradermal administration of substance P, which is a candidate of stress mediator in this system, inhibited the barrier recovery. These results suggest that acute stress inhibits the barrier recovery as well as chronic stress via activation of peripheral nerve.

## 1. 緒言

ストレスがアトピー性皮膚炎に悪影響を与えることをしばしば経験する。実験的にもストレスが炎症反応を増強し<sup>1)</sup>、皮膚バリア機能障害を助長することなどが報告され<sup>2,3)</sup>、臨床経験を裏付けている。ストレスには、慢性ストレスと急性ストレスがあり、慢性ストレスではHPA axisにより誘導される glucocorticoids が最終メディエーターとして作用し、バリア機能を障害するとされている<sup>4)</sup>。一方、急性ストレスのメディエーターとしては、末梢神経由来因子の役割が重要視されている<sup>5,6)</sup>。

近年、我々は、Th2 サイトカインが皮膚バリア機能の回復を阻害すること<sup>7)</sup>、さらに、ヒスタミンの外用が末梢神経機能を介して、Th2 サイトカインを誘導し、皮膚バリア機能回復障害性に作用することを見いだしている。

今回、我々は、急性ストレスが皮膚バリア機能に及ぼす影響と末梢神経関連因子の関与について検討し、そのメカニズムの一部を明らかにしたので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 マウス

6-10週齢、雌のC57BL/6マウス、肥満細胞欠損マウス(WBB6F1-W/W<sup>v</sup>)を用いた。

### 2.2 皮膚バリア機能回復能の検証

5日前に剃毛した腹部皮膚に4-5回のテープストリッピングを行い、皮膚バリア機能を破壊し、その回復過程を

経表皮水分喪失 (TEWL) を指標に皮膚バリア機能回復率として評価した。TEWLはTewameter<sup>®</sup> TM210, Courage & Khazawa, Germany)を用いて測定した。バリア破壊はTEWL 50-70 g/m<sup>2</sup>/hを目安に調節し、バリア破壊前、破壊直後、3時間後、6時間後のTEWLを測定した。回復率を以下の方法で計算し、Barrier recovery (%)として表記した:  $1 - (\text{バリア破壊3時間後もしくは6時間後のTEWL} - \text{バリア破壊直前のTEWL}) / (\text{バリア破壊直後のTEWL} - \text{バリア破壊直前のTEWL})$ 。

### 2.3 ストレス負荷

既に確立されている方法である新しいケージへの移入と過密飼育環境によるストレス負荷を行った<sup>2)</sup>。通常4匹/ケージで飼育するが、新しいケージに8匹ずつ入れ、皮膚バリア機能回復能の評価直前12時間の過密環境負荷を行った。対照群は5日前に新しいケージに移し、4匹/ケージで飼育しているマウスを用いた。

### 2.4 機能的除神経

ストレス負荷をかける2週間前にカプサイシン (50 mg/kg, 2日間) を皮下投与した。実験終了後に、マウス耳介にカプサイシンを外用し、耳介腫脹の有無により除神経を確認した。

### 2.5 Th2 サイトカイン中和抗体の投与

皮膚バリア破壊30分前に、IL-4, IL-13の中和抗体 (各833 ng in 50 μl/site, R&D Systems) を皮内注射した。

### 2.6 ストレスメディエーターの投与

ストレスメディエーターとして知られている、サブスタンスP (100 nmol/site, ペプチド研究所) と corticotropin-releasing factor (CRF: 0.05 ml of 10 μM, Sigma) を皮膚バリア破壊直後に皮内注射し、皮膚バリア機能の回復過程への影響を観察した。CRFの機能評価のために、Evan blue



\* Effect of psychological stress and neuropeptides on cutaneous permeability barrier function

Kazumoto Katagiri<sup>\*1,2</sup>, Yutaka Hatano<sup>1</sup>, Rieko Kurahashi<sup>1</sup>

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Oita University<sup>1</sup>

Department of Dermatology, Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital<sup>2</sup>

を静脈内投与し、CRFを耳介皮内に投与し、30分後の耳介皮膚へのEvans blueの漏出を吸光度計で測定した。

### 3. 結果

#### 3.1 急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害

ストレス負荷により、3時間後 (Fig. 1) および6時間後の皮膚バリア機能の回復が障害された。

#### 3.2 機能的除神経による急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害の阻止

機能的除神経を誘導されたマウスでは、急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害が観察されなかった。また、正常マウスと比べて、皮膚バリア機能回復が促進されていた (Fig. 1)。

#### 3.3 Th2 サイトカイン中和抗体の影響

Th2サイトカイン中和抗体のバリア破壊30分前の投与により、急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害作用

はわずかに阻害される傾向にあったが、有意な阻害効果ではなかった (Fig. 2)。

#### 3.4 ストレスメディエーターによる皮膚バリア機能回復障害

サブスタンスPの皮内投与により、3時間後、6時間後の皮膚バリア機能回復障害が誘導され、Th2サイトカインの中和抗体の前投与で、その効果は阻止されたが (Fig. 3)、CRFの投与は皮膚バリア機能回復に影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。CRFの機能を評価するために行ったEvans blueの漏出実験では、CRF投与により有意な色素の漏出があり、CRFは機能的に作用し、肥満細胞の脱顆粒などを誘導し、血管透過性を亢進していることが確認された。

#### 3.5 肥満細胞欠損マウスでのサブスタンスPによる皮膚バリア機能回復への影響

肥満細胞欠損マウスではサブスタンスPによる皮膚バリア機能回復阻害効果が観察されなかった。

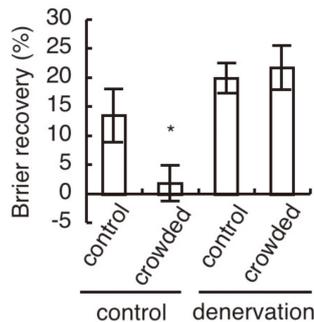


Fig. 1 Acute stress inhibits the recovery of barrier function via activation of peripheral nerves.

Stress was induced by transfer of mice to a new cage and keeping them with a crowded condition for 12 h. Denervation was achieved by systemic administration of capsaicin 14 days before barrier disruption and abolished the inhibitory effect of the stress on barrier recovery. Data was subjected to analysis by Student's *t*-test. \* $P < 0.05$

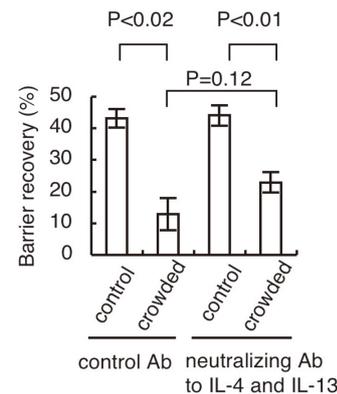


Fig. 2 Pretreatment with neutralizing antibodies to Th2 cytokine did not fully abolish the inhibitory effect of the stress on barrier recovery.

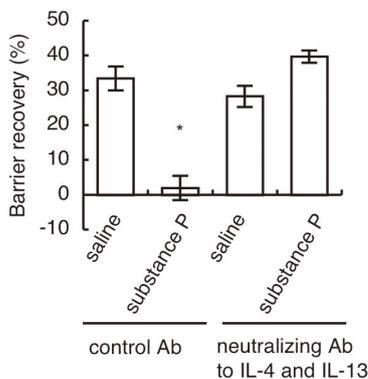


Fig. 3 Intradermal administration of substance P inhibited the recovery of barrier function via induction of Th2 cytokine.

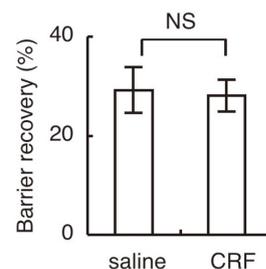


Fig. 4 Intradermal administration of corticotropin-releasing factor (CRF) did not affect the recovery of barrier function. NS: not significant

#### 4. 考 察

ストレスによる皮膚バリア機能回復障害は、マウスやラットだけでなく、ヒトでも確認されている<sup>8)</sup>。その際に対象となるストレスは、慢性ストレスであり、glucocorticoidsの受容体 antagonistを用いた実験から、HPA axisの最終メディエーターである glucocorticoidsが表皮細胞、脂質代謝に影響を及ぼし、皮膚バリア機能の回復障害を誘導すると考えられている<sup>4)</sup>。今回の研究では、我々の見いだした「末梢神経を介したTh2サイトカイン誘導による皮膚バリア機能回復障害作用」が、ストレスによる皮膚バリア機能回復障害のメカニズムである可能性について検討した。

除神経を施したマウスではストレスによる皮膚バリア機能回復障害効果が消失したことから、急性ストレス負荷時には、末梢神経由来因子により皮膚バリア機能回復障害が誘導されることが明らかになった。ヒスタミン外用により末梢神経由来因子を介して誘導されるTh2サイトカインがストレス負荷時の最終メディエーターであることを想定していたが、Th2サイトカインの中和抗体を用いた今回の実験結果からは、その影響は部分的なものであると思われる。但し、今回の研究では、12時間のストレス負荷直後に中和抗体を投与しており、ストレス負荷におけるTh2サイトカインの役割を正確に検証するには、量的、時間的条件を再設定する必要があるものと思われる。

一方、ストレスメディエーターの直接的影響を検討したところ、サブスタンスPにはバリア機能回復障害効果があるが、CRFにはその効果が無いことが明らかとなった。サブスタンスPの効果は肥満細胞に依存し、Th2サイトカインの中和抗体で阻止された。CRFが肥満細胞の脱顆粒を誘導することが知られており、Evans blueを用いてCRFの機能を検証したところ、CRFが有効に機能していることが明らかとなった。これらは、ストレスメディエーターの種類によって肥満細胞への作用が異なることを示唆する非常に興味深い結果である。

我々が用いた12時間の環境変化によるストレスは、従来、皮膚バリア機能回復障害を誘導するために用いられた方法(24時間から14日間)<sup>2,3,9)</sup>と比較すると時間的には短いものの、拘束ストレスなどのような数時間で誘導される急性ストレスとは異なり、慢性ストレスの要素も含まれている。しかし、逆に、慢性ストレスによる glucocorticoidsを介した表皮細胞を標的とした影響が十分発揮されるには不十分な時間とも言える。急性ストレスでは末梢神経からサブスタンスPが放出され、hair cycleなどに影響を及ぼすことが報告されているが<sup>6)</sup>、皮膚バリア機能へ及ぼす影響は不明であった。今後は、慢性ストレスにおける皮膚バリア機能障害における末梢神経由来因子の役割などを明らかにしていく必要がある。サブスタンスPは炎症や搔痒を

増強させることも知られており、皮膚バリア機能回復障害の誘導能を考え合わせると、アトピー性皮膚炎治療の重要な標的分子であると思われる。

#### (References)

- 1) Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S et al, : Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo, *J. Immunol.*, 171, 4073-4080, 2003.
- 2) Denda M, Tsuchiya T, Elias PM et al, : Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 278, R367-372, 2000.
- 3) Choi EH, Brown BE, Crumrine D et al, : Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity, *J. Invest. Dermatol.*, 124, 587-595, 2005.
- 4) Choi EH, Demerjian M, Crumrine D et al, : Glucocorticoid blockade reverses psychological stress-induced abnormalities in epidermal structure and function, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291, R1657-1662, 2006.
- 5) Kawana S, Liang Z, Nagano M et al, : Role of substance P in stress-derived degranulation of dermal mast cells in mice, *J. Dermatol. Sci.*, 42, 47-54, 2006.
- 6) Katayama M, Aoki E, Suzuki H et al, : Foot shock stress prolongs the telogen stage of the spontaneous hair cycle in a non-depilated mouse model, *Exp. Dermatol.*, 16, 553-560, 2007.
- 7) Kurahashi R, Hatano Y, and Katagiri K, : IL-4 suppresses the recovery of cutaneous permeability barrier functions in vivo, *J. Invest. Dermatol.*, 128, 1329-1331, 2008.
- 8) Garg A, Chren MM, Sands LP et al, : Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders, *Arch. Dermatol.*, 137, 53-59, 2001.
- 9) Denda M, Tsuchiya T, Hosoi J et al, : Immobilization-induced and crowded environment-induced stress delay barrier recovery in murine skin, *Br. J. Dermatol.*, 138, 780-785, 1998.