

アトピー性皮膚炎モデルNC/Ngaマウスにおける一酸化窒素および活性窒素種の関与に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: IgE, 酵素遺伝子発現調節, 疾患モデル(動物), 皮膚炎-アトピー性(実験的), 免疫組織化学, Nitric Oxide Synthase, Thiobarbituric Acid Reactive Substances, 一酸化窒素, アイソフォーム, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, 活性窒素3-Nitrotyrosine, マウス, 動物 作成者: 久保, 正幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4489

アトピー性皮膚炎モデルNC/Ngaマウスにおける一酸化窒素および活性窒素種の関与に関する研究

金沢大学大学院医学系研究科環境医科学専攻環境生態医学
(旧講座名：公衆衛生学)
(主任：荻野景規教授)

久 保 正 幸

一酸化窒素 (NO) あるいはNOより生じる活性窒素種 (reactive nitrogen species, RNS) は種々の炎症性疾患に関与することが示唆されている。アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) においてもそれらの関与が挙げられるものの、不明瞭な点も多い。本研究では、ヒトADモデルであるNC/Ngaマウスを用い、AD様皮膚病変部でのNOやRNSの関与について検討した。コンベンショナル環境下で飼育した場合にはADの発症が認められたが、SPF (specific pathogen-free) 環境下では認められなかった。皮膚病変部におけるNO合成酵素 (NO synthase, NOS) アイソフォームの発現について検討した結果、誘導型NOS (inducible NOS, iNOS) および内皮型NOS (endothelial NOS, eNOS) の発現が上昇していた。しかし、神経型NOS (neuronal NOS, nNOS) の発現は減少していた。血清中の亜硝酸イオン (NO_2^-) および硝酸イオン (NO_3^-) 濃度はAD発症に伴って有意に上昇したが、皮膚中での濃度は低下していた。一方、皮膚病変部でのS-ニトロソチオールおよびニトロチロシンの増加が認められた点からRNSの産生が示唆された。また、ニトロチロシン産生に関与する細胞の大部分は好酸球であった。酸化ストレスの指標であるTBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) や8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) の生成においては、AD発症に伴う有意な変化はみられなかった。以上の結果より、NC/NgaマウスのAD様皮膚病変部におけるNOSアイソフォームの発現の変化、NOxの減少やRNS産生の増加といったNO代謝のバランスの変化がその病態と関連していると推察された。

Key words nitric oxide, reactive nitrogen species, nitric oxide synthase, atopic dermatitis, NC/Nga mice

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) は、掻痒性を伴う炎症性疾患であり、増悪寛解を繰り返す。AD患者の多くは、家族歴、既往歴に喘息やアレルギー性鼻炎などのアトピー素因を有する。また、末梢血中での好酸球数の増加や血清IgE値の上昇といった臨床症状が認められる。ADの発症ならびにその病態には、免疫学的異常、遺伝的背景、皮膚バリアの機能障害、環境的および心理的な要因など多くの因子が関与していると考えられている¹⁾。

NC/Ngaマウスは、ヒトADのモデルマウスとして利用されている²⁾³⁾。このマウスはコンベンショナル環境下で飼育すると、掻痒性皮膚炎を自然発症する。皮膚病変部での出血や紅斑といった肉眼所見、ならびに、真皮層への好酸球やマスト細胞の浸潤、表皮肥厚といった病理組織学的所見がヒトADに酷似することが報告されている。一方、清潔なSPF (specific pathogen-free) 環境下ではそうした症状は認められない²⁾³⁾。

一酸化窒素 (NO) は、生体の恒常性の維持および病態において種々の機能を果たしている⁴⁾。NOはNO合成酵素 (NO synthase, NOS) により、L-アルギニンを基質として合成される。NOSには、構成型NOSである神経型NOS (neuronal NOS, nNOS) と内皮型NOS (endothelial NOS, eNOS)、ならびに誘導型NOS (inducible NOS, iNOS) の3つのアイソフォームがある⁴⁾。iNOSの発現はサイトカインやエンドトキシンによって増強され、過剰なNO産生をもたらす。生体で生成されたNOの大部分は種々の酸化反応を介して、亜硝酸イオン (NO_2^-) や硝酸イオン (NO_3^-) に変換される。さらに、NOはスーパーオキシド (O_2^-) などの活性酸素種や金属と反応し、より組織傷害性の高い活性窒素種 (reactive nitrogen species, RNS) をも産生する⁴⁾⁵⁾。

RNSは、タンパク質のチロシンのニトロ化やシステインのS-ニトロソ化といった翻訳後修飾を引き起こす⁶⁾。ニトロ化反応では、NOと O_2^- から生じるペルオキシナイトライト (ONOO^-),

平成16年10月21日受付, 平成16年11月30日受理

Abbreviations : AD, atopic dermatitis; ECD, electrochemical detector; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; HPLC, high performance liquid chromatography; HRP, horseradish peroxidase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NOS, nitric oxide synthase; 8-OHdG, 8-hydroxydeoxyguanosine; PVDF, polyvinylidene difluoride; RNS, reactive nitrogen species; SPF, specific pathogen-free; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; TBS, Tris buffered saline; TBS-T, TBS/0.05 % Tween20

あるいは、過酸化水素 (H_2O_2) とペルオキシダーゼによる NO_2^- の酵素的酸化で生じる二酸化窒素 (NO_2) が、チロシンの3位に付加反応することでニトロチロシンを生じる^{5)~7)}。一方、S-ニトロ化反応においては、ニトロソニウムイオン (NO^+) とシステインのチオール (SH) 基とが反応し、S-ニトロチオール形成が起こる⁸⁾⁹⁾。ニトロチロシンやS-ニトロチオールの生成は、虚血再灌流障害や動脈硬化、神経変性疾患、代謝性疾患、炎症性疾患や敗血症などの多種多様な疾患で報告されており、病態との関与が注目されている⁸⁾⁹⁾。

皮膚において、NOは血管拡張、メラニン形成、細菌の感染防御などの様々な役割を担っている¹⁰⁾。また、ADの病態に対してもNOが関与するとの報告がなされている。AD患者の皮膚組織¹¹⁾、および、ハブテン塗布により誘導されるNC/Ngaマウスの皮膚病変部¹²⁾において、iNOSの誘導が免疫組織化学的に検出されている。しかしながら、AD患者において血清中の NO_2^- レベルが高い¹³⁾一方で、尿中の NO_2^- と NO_3^- レベルは低い¹⁴⁾といった報告があり、NOの関与については不明瞭な点が多い。また、病態におけるNO代謝バランスの変化をnitrosative ストレスとよぶ¹⁵⁾が、これに関する報告はない。そこで、本研究では、AD動物モデルであるNC/Ngaマウスを用いて、NOやRNSとAD病態との関係について検討した。

対象および方法

I. 実験動物

動物実験については、金沢大学宝町地区動物実験委員会の承認を受けた(承認日:平成15年7月1日, 承認番号: 031562号, 課題名: モデルマウスを用いたアトピー性皮膚炎発現機構とその制御に関する解析)。実験動物として、4週齢のNC/Ngaマウス(日本SLC社, 静岡)を用い、16週間、コンベンショナル及びSPF環境下で飼育し、それぞれをコンベンショナル群、SPF群とした。実験動物の使用は金沢大学宝町地区実験指針に従った。水と餌は自由に摂取できるようにした。

II. 血清中IgEの測定

マウス眼窩静脈から採血して血清を分離後、使用するまで -30°C で凍結保存した。血清中IgEは、IgE ELISA kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を用いて測定した。

III. 病理組織学

摘出した皮膚は10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定した。常法に従って、パラフィン切片作製後、HE染色して病理組織像を観察した。

IV. 免疫組織化学

既報¹⁶⁾に従い、免疫染色を行った。キシレンを用いて脱パラフィン後、0.3% H_2O_2 を含むメタノール溶液中で内因性ペルオキシダーゼを失活させた。Tris緩衝生理食塩水 (Tris buffered saline, TBS) で洗浄後、5%正常ヤギ血清 (和光, 大阪) と室温で20分反応させ、非特異的な反応を除去した。一次抗体として、抗iNOS, eNOS, およびnNOSウサギポリクローナル抗体 (各1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 抗ニトロチロシンウサギポリクローナル抗体 (1:800) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) を使用し、 4°C にて一晩反応させた。TBSを用いて洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 結合ヤギ抗ウサギIgG抗体ポリマー (ENVISION+, Dako, Carpinteria, USA) と室温で1時間反応

させた。TBSを用いて洗浄後、3,3'-ジアミノベンジジン4塩酸塩 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) にて発色させ、ヘマトキシリンにより核を染色し封入した。ある場合には、好酸球顆粒を染色するルキソールファーストブルー染色を行った¹⁶⁾¹⁷⁾。陰性対照実験として、ウサギ正常イムノグロブリンを一次抗体として用いた。また、ニトロチロシンに関しては、あらかじめニトロチロシン (10 mM) と室温で1時間反応させたニトロチロシン抗体を一次抗体として用いる、あるいは100 mM ジチオナイト処理によって、ニトロチロシンをアミノチロシンに還元した標本を抗ニトロチロシン抗体により染色する別の陰性対照実験も行った。

V. 皮膚サンプルの調製

頸背部の皮膚を摘出し、5倍量のホモジナイズ溶液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5) /150 mM NaCl/1 mM EDTA/protease inhibitor complete (Roche, Mannheim, Germany)] を加えホモジナイズ後、遠心分離 (4°C , 1,000 \times g, 10分) して可溶性画分を得た。さらに、ニトロチロシン測定のために、沈殿をホモジナイズ溶液を用いて3回洗浄した。引き続き1% Triton X-100を含むホモジナイズ溶液中でホモジナイズ後、遠心分離 (4°C , 1,000 \times g, 10分) してTriton X-100可溶性画分を得た。S-ニトロチオール測定においては、人工的生成を防ぐためにホモジナイズ溶液にN-エチルマレイミド (終濃度10 mM) を添加した。タンパク質定量は、ウシ血清アルブミンをスタンダードとして、BCA protein assay reagent kit (PIERCE, Rockford, USA) を用いて行った。

VI. NO_2^- および NO_3^- の測定

血清および皮膚の可溶性画分のタンパク質成分を除去するためにUltrafree-MC Centrifugal Filter Devices (10 kDa cutoff, Millipore, Bedford, USA) を用いて限外濾過した。濾液中の NO_2^- および NO_3^- を高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC)-Griess system を用いて測定した¹⁸⁾。 NO_2^- および NO_3^- を分析カラム (NO-PAK, Eicom, 京都) で分離後、 NO_3^- を還元カラム (NO-REP, Eicom) を用いて NO_2^- に還元した。Griess反応により生成するアゾ色素の540 nmにおける吸光度をUV-VIS検出器で測定し、 NO_2^- 濃度を求めた。

VII. ウエスタンブロット

可溶性画分タンパク質70 μg 相当量を5-20%ポリアクリルアミドゲルを用いSDS-PAGEに供した後、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore) に転写した。5%スキムミルクを含むTBS/0.05% Tween20 (TBS-T) にて室温で1時間ブロッキング反応させた。一次抗体として、抗iNOS, eNOS, およびnNOSウサギポリクローナル抗体 (各1:500) (Santa Cruz Biotechnology) を使用し、 4°C にて一晩反応させた。TBS-Tを用いて洗浄後、HRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (1:4000) (Dako) と室温で1時間反応させた。さらに、TBS-Tを用いて洗浄後、enhanced chemiluminescence Western blot detection system (PerkinElmer, Boston, USA) を用いて、X線フィルムへ露光し検出した。また、特異的なバンドはNIH Image 1.63 (NIH, Rockville, USA) を用いて定量した。

VIII. ニトロチロシンの定量

皮膚の可溶性画分およびTriton X-100可溶性画分に含まれるタンパク質中のニトロチロシン含量を測定した。可溶性画分およびTriton X-100可溶性画分から得た0.5 mlのタンパク質溶液

(6 mg/ml) に、アセトニトリル 0.8 ml を加え、遠心分離 (4℃, 2,000×g, 5分) 後、上清を除いた。沈澱を 0.5 ml の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、同様にアセトニトリルを加え操作した。この操作は、遊離のニトロチロシン、および NO₂⁻ や NO₃⁻ を除くために行った。最終的に、沈澱は 0.4 ml の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) にて再溶解し、既報¹⁹⁾に従い pronase 酵素消化を行った。すなわち 0.1 ml の pronase 溶液 (9 mg/ml, Roche) を加えた後、50℃ にて 16 時間反応させた。反応終了後、遠心分離し、上清を限外濾過した。濾液中のニトロチロシンは、電気化学検出器 (electrochemical detector, ECD) を接続した HPLC (HPLC-ECD) を用いて分析した²⁰⁾。50 μl の濾液を SC-50DS カラム (3×150 mm, 5 μm, Eicom) にて分離した。ニトロチロシンを電気化学的にアミノチロシンに還元 (-900 mV) 後、ECD (+300 mV) を用いて特異的かつ高感度に検出した。移動相として、0.2 M リン酸二水素ナトリウム/2% アセトニトリル/0.5 mg/l EDTA 溶液を用いた。一方、チロシンは、Spherisorb ODS-2RP-18 カラム (4.6×150 mm, 5 μm, Waters, Milford, USA) を用い、50 mM リン酸カリウム (pH 3.0)/7% メタノール溶液を移動相とした HPLC により 274 nm の紫外吸収を利用して検出した¹⁷⁾²¹⁾。結果は、タンパク量に対してのチロシンあたりのニトロチロシンのモル比で示した。

K. S-ニトロソチオールの測定

既報²²⁾に従い、S-ニトロソチオールを Saville-Griess 法にて測定した。可溶性画分を 4℃ において 10,000×g で 10 分間遠心後、その上清を以下の操作に用いた。ホモジナイズ溶液 0.4 ml 中に 0.3 mg のタンパク質を含むように調製後、等量の 0.1% HgCl₂ を含む Griess 試薬 (1% スルファニルアミド/0.1% N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩/2% リン酸) と混合した。37℃ にて 20 分間反応後、540 nm の吸光度を測定した。S-ニトロソチオール濃度は、S-ニトロソグルタチオンをスタンダードとして、0.1% HgCl₂ を含まない Griess 試薬との反応から得た吸光度を差し引いた値から求めた。

X. TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) の測定

可溶性画分中の TBARS を測定した²³⁾。0.5 ml の可溶性画分を 1 ml の 10% トリクロロ酢酸と混合し、10 分間静置した。4℃ にて 10,000×g で 10 分間遠心後、その上清 1 ml を同容量の 0.8% チオバルビツール酸/0.022% ブチルヒドロキシルエン/50% 酢酸溶液と混合し、沸騰水浴中で 15 分間加熱した。冷却後、535 nm の吸光値を測定し、モル吸光係数 ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いて TBARS 値を求めた。結果は、タンパク量あたりの TBARS 値として示した。

XI. 8-ヒドロキシデオキシグアノシン

(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) の測定

マウスから採尿し、-30℃ で凍結保存し実験に供した。尿中の 8-OHdG は 8-OHdG Check ELISA kit (日本老化制御研究所, 静岡) を用いて測定した。また、尿中のクレアチニンはクレアチニン-テストワコー (和光) を用いて測定した。結果は、クレアチニン量あたりの 8-OHdG 値として示した。

XII. 統計学的処理

繰り返し行われた実験の観察データは、平均±標準偏差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) で表した。対照との差及び群間の差の統計学的有意性は、一元配置分散分析の後、Bonferroni の方法で多重比較を行い、いずれも危険率 5% 未満を統計学的有意差ありとした。

成 績

I. NC/Nga マウスの AD 症状

コンベンショナル群では、8 週齢頃から顔や首の搔把行動が始まり、出血および紅斑などの皮膚炎症状が観察され加齢に伴って悪化した。また、病理組織学的には表皮が肥厚し、真皮における著しい細胞浸潤が認められた。血清 IgE も 8 週齢から上昇し始め、20 週齢でピークに達した。一方で、SPF 群ではそれらの症状は認められなかった。

II. 皮膚における NOS アイソフォームの発現および局在

1. NOS アイソフォームのウェスタンブロット
ウェスタンブロットにより、皮膚での NOS アイソフォームの発現について検討した結果を図 1A に示した。図 1B に示すように定量解析にて発現強度を両群間で比較すると、コンベンショナル群で iNOS および eNOS の発現が有意に高かった (iNOS: P<0.05, eNOS: P<0.01)。一方、nNOS の発現は減少傾向を示した (P=0.21)。

2. NOS アイソフォームの免疫染色
免疫組織化学的に NOS アイソフォームの局在について検討した。iNOS の発現は、コンベンショナル群における真皮に浸潤した炎症性細胞に認められた (図 2A)。一方、SPF 群ではその発現は認められなかった (図 2B)。また、コンベンショナル群の血管内皮細胞では、SPF 群と比較して eNOS の染色強度が増大していた (図 2C, D)。表皮のケラチノサイトでの eNOS 染色については、両群間で差は認められなかった。さらに、nNOS 染色はケラチノサイトと皮脂腺細胞で認められたが、コンベンショナル群では肥厚した表皮の基底膜での染色が抑制されていた (図 2E, F)。陰性対照実験においては、いずれの染色も観察されなかった。

III. 血清および皮膚中の NO₂⁻ および NO₃⁻ 濃度

血清ならびに皮膚中における NO₂⁻ および NO₃⁻ 濃度を測定した結果を表 1 に示した。血清中 NO₂⁻ および NO₃⁻ 濃度は SPF 群よりもコンベンショナル群において有意に高かった (NO₂⁻: P<0.01, NO₃⁻: P<0.001)。一方、皮膚中 NO₂⁻ および NO₃⁻ 濃度は SPF 群よりもコンベンショナル群において有意に低かった (NO₂⁻: P<0.05, NO₃⁻: P<0.001)。

IV. 皮膚におけるニトロチロシンの産生および局在

1. 皮膚中のニトロチロシン量

RNS 産生の有無について検討するために、皮膚組織中のニトロチロシン量を測定した。表 2 に示したように皮膚組織の Triton X-100 可溶性画分では、コンベンショナル群においてニトロチロシン量が有意に高かった (P<0.05)。皮膚組織の可溶性画分では両群間で有意な差は認められなかった (P=0.16)。

2. ニトロチロシンの免疫染色

ニトロチロシンの検出を免疫組織化学的に行った。SPF 群では、ニトロチロシンの染色はほとんど観察されなかった (図 3A)。一方、コンベンショナル群では表皮に弱い染色がみられ、真皮層に局在する顆粒球内に強い染色が認められた (図 3B)。また、ほとんどすべてのニトロチロシン陽性細胞は、ルキソールファーストブルー陽性となる好酸球と一致していた (図 3C)。一方、すべての陰性対照実験において染色は認められず、特異性が確認された。

V. 皮膚中の S-ニトロソチオール量

皮膚組織中の S-ニトロソチオール量を測定した (図 4)。SPF

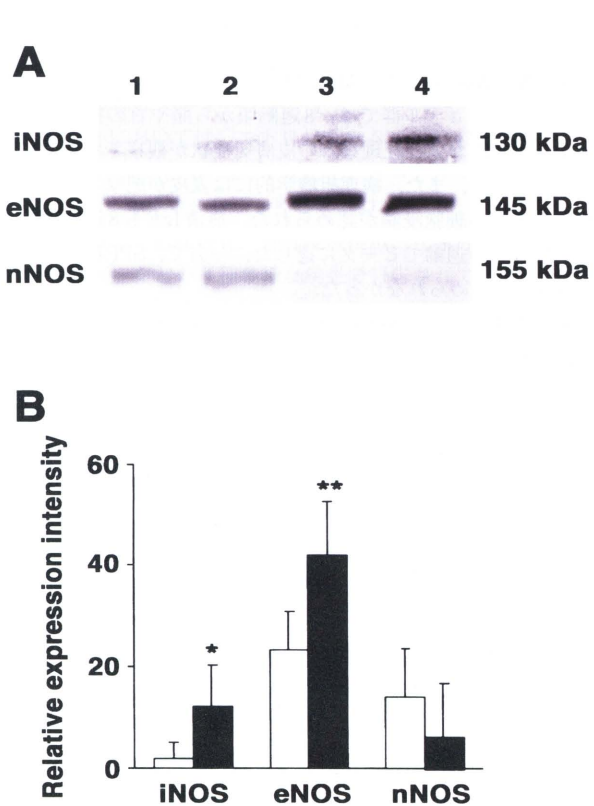


Fig. 1. Western blot analysis for NOS isoforms in the skin of NC/Nga mice maintained under SPF and conventional conditions. (A) Protein expression of NOS isoforms by Western blot analysis. The dorsal skin was removed from NC/Nga mice, and homogenized and centrifuged. Proteins in the supernatant fractions were loaded to SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane, and detected by anti-iNOS, eNOS, and nNOS antibody. Lane 1 and 2, SPF; Lane 3 and 4, conventional. (B) Relative expression intensity of NOS isoforms. The specific band densities were quantified by NIH image shareware. □, SPF; ■, conventional. Results are shown as the $\bar{x} \pm SD$ of six animals/group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with SPF.

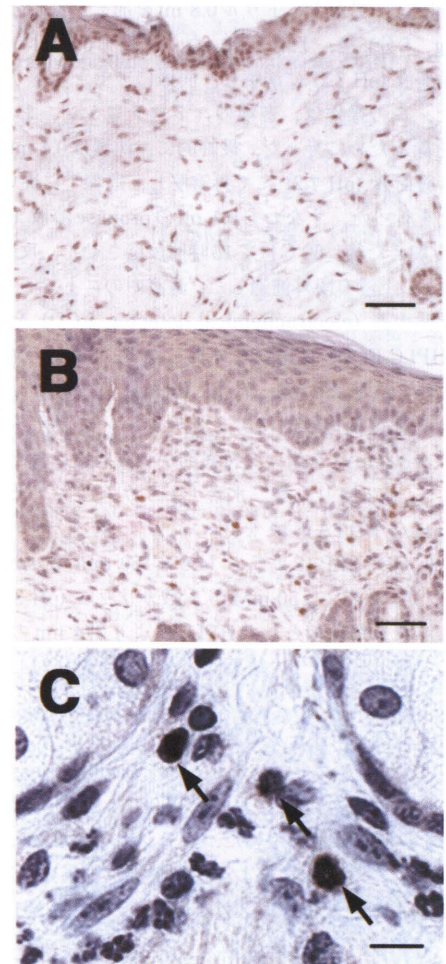


Fig. 3. Immunohistochemical staining of nitrotyrosine in the skin of NC/Nga mice maintained under SPF (A) and conventional (B and C) conditions. Immunostaining cells of nitrotyrosine were detected in the dermis of the lesional skin (B, C), but were not detected in the normal skin (A). Immunostaining cells of nitrotyrosine were co-stained with Luxol-fast-blue (C, arrows). Bars indicate 50 μm (A and B) and 10 μm (C).

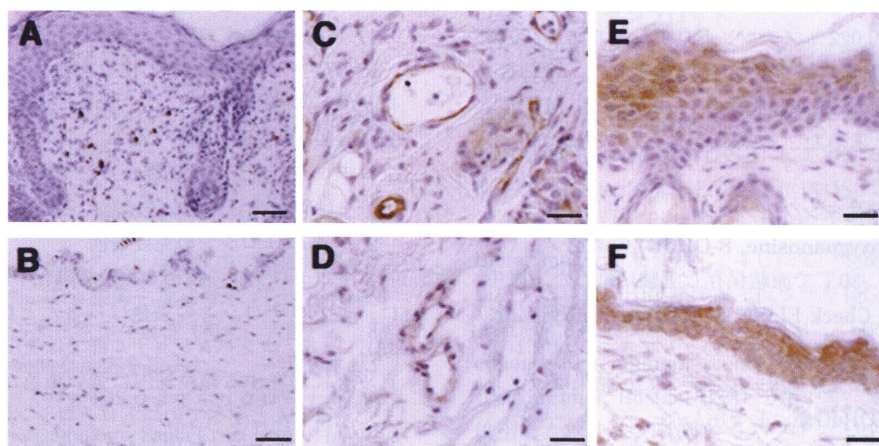


Fig. 2. Immunohistochemical staining of NOS isoforms in the skin of NC/Nga mice maintained under conventional (A, C and E) and SPF (B, D and F) conditions. Many immunoreactive cells exhibiting iNOS were observed in the dermis of the lesional skin (A) compared with fewer stained cells in normal skin (B). Increased staining of eNOS was observed in vascular endothelial cells of dermis of the lesional skin (C) compared with its normostaining in normal skin (D). Less immunostaining of nNOS was detected in the basal layer of the hyperplastic epidermis of the lesional skin (E) compared with normal skin (F). Bars indicate 100 μm (A and B) and 50 μm (C, D, E and F).

Table 1. The concentrations of NO₂⁻ and NO₃⁻ in the serum and skin of NC/Nga mice maintained under SPF and conventional conditions

Group	Serum (μM)		Skin (nmol/mg protein)	
	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
SPF	0.634 ± 0.142	6.94 ± 2.14	0.120 ± 0.087	1.41 ± 0.679
Conventional	1.18 ± 0.506**	13.28 ± 3.21***	0.084 ± 0.070*	0.511 ± 0.150***

Serum and supernatant fractions of the skin were filtrated with a 10 kDa molecular cutoff filter device. The concentrations of NO₂⁻ and NO₃⁻ in filtrates were analyzed using an HPLC-Griess system. Results are shown as the $\bar{x} \pm SD$ of seven to nine animals/group. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, compared with SPF.

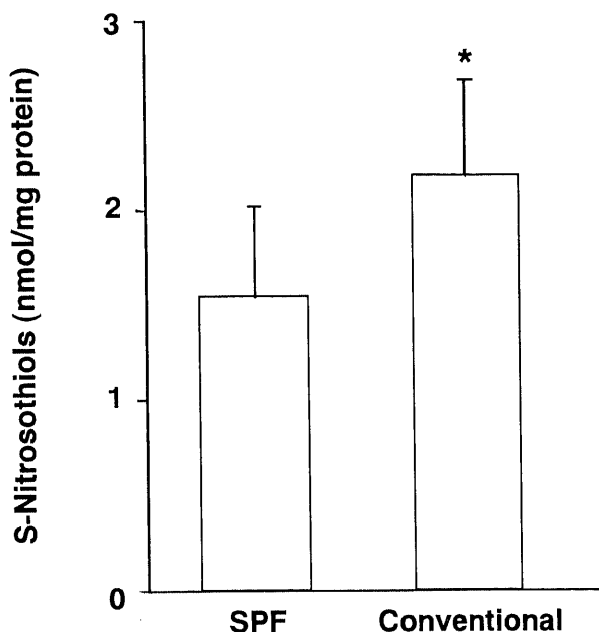


Fig. 4. S-Nitrosothiols content in the skin of NC/Nga mice maintained under SPF and conventional conditions. S-Nitrosothiols were measured by Saville-Griess assay. Results are shown as the $\bar{x} \pm SD$ of seven to eight animals/group. *P < 0.05, compared with SPF.

Table 2. Nitrotyrosine content in the skin of NC/Nga mice maintained under SPF and conventional conditions

Group	Nitrotyrosine (pmol/μmol tyrosine/mg protein)	
	Supernatant fractions	Triton X-100-solubilized fractions
SPF	6.94 ± 4.18	11.00 ± 1.85
Conventional	4.47 ± 1.05	15.82 ± 4.68*

Protein-bound nitrotyrosine in the supernatant fractions and the Triton X-100-solubilized fractions of the skin was measured by HPLC-ECD after pronase digestion. Results are shown as the $\bar{x} \pm SD$ of seven animals/group. *P < 0.05, compared with SPF.

Table 3. Oxidative stress markers in NC/Nga mice maintained under SPF and conventional conditions

Group	Oxidative stress markers	
	TBARS (pmol/mg protein)	8-OHdG (ng/mg creatinine)
SPF	319.38 ± 55.27	50.67 ± 41.97
Conventional	308.97 ± 35.97	27.44 ± 20.29

Cutaneous TBARS were measured after Dillon et al²³⁾. Urinary 8-OHdG was determined using the 8-OHdG Check ELISA kit. Results are shown as the $\bar{x} \pm SD$ of seven to twelve animals/group.

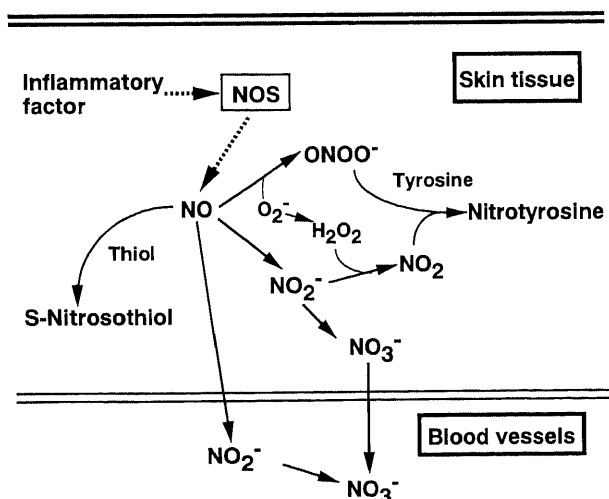


Fig. 5. Schematic representation of metabolic pathways of NO in AD-like skin lesions. NOx concentrations increased in the serum according to upregulation of NOS, but decreased in the lesional skin. On the contrary, NO contributed to the formation of RNS, resulting in the detection of nitrotyrosine and S-nitrosothiols.

群は 1.54 ± 0.48 nmol/mg protein, コンベンショナル群では 2.18 ± 0.51 nmol/mg protein であり, コンベンショナル群において有意な増加が認められた (P < 0.05).

VI. 酸化ストレスの評価

酸化ストレスの指標として, TBARSおよび8-OHdGを測定した. 表3に示すように, 皮膚中のTBARS値は両群間で有意な差は認められなかった (P=0.67). また, 尿中の8-OHdG値については両群間で有意な差は認められなかったが, コンベンショナル群で減少傾向がみられた (P=0.11).

考 察

本研究では, 動物モデルを用いた実験からAD様病態にNOやNOより生じるRNSが関連することを明らかとした(図5).

構成型NOSであるeNOSやnNOSは恒常性維持に不可欠な低レベルのNOを産生するが, iNOSは炎症や病的状況で高レベルのNOを産生すると考えられている⁴⁾⁵⁾. 本研究では, iNOSおよびeNOSの発現上昇が, それぞれ真皮層の炎症性細胞あるいは血管内皮細胞にて観察された. 真皮層でのNOSの発現上昇は, コンベンショナル群での血清中NOx (NO₂⁻およびNO₃⁻)

濃度の増加に反映されていると考えられる。血清中NOx濃度の増加はAD患者でも示されている¹³⁾。また、iNOSの発現はAD患者¹¹⁾およびハプテン塗布により誘導されるNC/Ngaマウスの皮膚病変部¹²⁾においても報告されている。一方、構成型NOSは表皮のケラチノサイトに局在し、創傷や感染防御に重要な役割を果たすことが知られている¹⁰⁾。本研究では、AD発症に伴ってnNOSの発現が低下傾向を示すことを明らかとした。免疫組織化学的な点から、肥厚した表皮における基底膜のケラチノサイトにおけるnNOSの発現低下が認められた。このことからAD¹²⁴⁾患者やNC/Ngaマウス²⁵⁾の皮膚病変部でみられる皮膚バリアの機能障害に対して、nNOS発現低下が関連する可能性が考えられる。

皮膚病変部におけるタンパク質中のチロシンニトロ化を2つの方法で確認出来た。この結果から、NOとO₂の反応から生じるONOO⁻、あるいはNO₂のペルオキシダーゼ依存的酸化で生じるNO₂などのRNSの産生が示唆された。また、ニトロチロシンは真皮層に浸潤した好酸球の大部分に局在することが分かった。好酸球の一部はiNOSの発現も示していた。好酸球はNADPHオキシダーゼの活性化によりO₂産生することが知られている²⁶⁾。また、NOSはL-アルギニンが欠乏した状況下ではNOとO₂の両方を産生し、さらにはONOO⁻を生成する²⁷⁾。さらに、好酸球はペルオキシダーゼを含んでおり、H₂O₂存在下においてNO₂の酸化反応を介してチロシンをニトロ化することが報告されている²⁸⁾。好酸球では、H₂O₂はO₂の不均化反応(O₂+O₂+2H⁺→H₂O₂+O₂)によって生成される²⁹⁾。このように、好酸球でのニトロチロシンの産生には真皮層での活性化が必要と考えられる。これまでに好酸球由来のニトロチロシン産生は、喘息患者の肺組織や痰にて報告されている²⁹⁾³⁰⁾。しかしながら、ADの皮膚病変部の好酸球中にニトロチロシンが産生することは報告されていない。好酸球はADのみならず、喘息においてもその病態に対して重要な因子であり、慢性アレルギー疾患の組織損傷に関与している³¹⁾。好酸球でのRNSおよびニトロチロシンの産生がADの病態と関連することが示唆された。今後、この関連性をより明確に示す知見を得る必要がある。

コンベンショナル群において、タンパク質のS-ニトロソチオール量が増加していた。ニトロチロシンと同様に、RNS産生の増加を示す証拠であると考えられる。ただし、S-ニトロソチオールの測定に関しては問題が指摘されており³²⁾³³⁾、今回の実験においてS-ニトロソチオール量が高く見積もられているかもしれない。S-ニトロソチオールは肺や血液中においてNO貯蔵の役割をもつと考えられており、気管拡張因子や血管拡張因子としての生物学的活性をもつことが報告されている³⁴⁾³⁵⁾。しかしながら、皮膚病変部でのS-ニトロソチオールの病態生理学的な意義は明らかではない。

コンベンショナル群におけるNOSの発現上昇から考えると、皮膚病変部でのNOx濃度の増加が予測された。しかしながら、実際の皮膚病変部でのNOx濃度はSPF群のレベルよりも減少していた。こうしたNOx濃度の減少は、ニトロチロシンやS-ニトロソチオール量の増加から明らかなようにRNS産生の増加がその要因の1つと考えられた。また、NOはヘム鉄との結合やアミン類との反応も起こす³⁶⁾。この点もNOx濃度の減少の原因と考えられ、今後の検討が必要である。さらに、NO自身がAD症状を和らげるために消費された可能性も挙げられる。NOの有益な効果として、皮膚での創傷治癒に重要な役割

を果たすといった報告がある³⁷⁾³⁸⁾。また、感染症や自己免疫性疾患において、iNOS由来のNOが防御的あるいは抗炎症作用を有することも報告されている³⁹⁾⁴⁰⁾。こうした作用によって、皮膚病変部でのNOx濃度の低下がもたらされたと推察される。

本研究では、AD病態にnitrosativeストレスが関与することを明らかとした。また、nitrosativeストレスは酸化ストレスと関連するとも考えられている。そこで、脂質過酸化の指標であるTBARS⁴¹⁾およびDNAの酸化損傷物質である8-OHdG⁴²⁾を測定することで、酸化ストレスの評価を行った。しかしながら、皮膚病変部でのTBARS値は高くはなく、尿中での8-OHdG値も低下傾向を示した。従って、ADの病態においては酸化ストレスよりもnitrosativeストレスの関与が重要であると考えられた。

現在、一般的にAD治療の主体はステロイド薬によるものである。AD病態に対するNOやRNSの関与に焦点を当てた基礎研究は、あらたな治療法につながるかもしれない。今後の課題として、NC/Ngaマウスを用い、ステロイド薬塗布によるAD寛解時のNOやRNSの動態変化、あるいはNOS阻害剤投与によるAD病態の変化を解析することが挙げられる。また、NOやRNSによって修飾される標的タンパク質の同定も有用だと考えられる。さらなる検討により、AD病態メカニズムの解明に新たな知見を与えることが期待される。

結 論

NC/Ngaマウスを用い、NOおよびRNSがAD病態に関与する可能性について検討し、以下の結論を得た。

1. AD様皮膚病変部において、iNOSおよびeNOSの発現は顕著に増加していた。一方で、nNOSの発現は減少傾向を示した。
2. 血清中のNOx濃度は有意に増加したが、AD様皮膚病変部でのNOx濃度は有意に減少していた。
3. AD様皮膚病変部では、ニトロチロシンやS-ニトロソチオール量は共に有意に増加していた。また、ニトロチロシンの産生は好酸球に認められた。
4. AD発症によって、酸化ストレスの指標であるTBARSや8-OHdGに有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、NC/NgaマウスのAD様皮膚病変部でのNOSアイソフォームの発現変化、NOxの減少およびRNS産生の増加が病態に関与していると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導をいただきました金沢大学大学院医学系研究科環境生態医学講座萩野景規教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に際し終始、御指導、御助言を頂きました神林康弘講師をはじめとする同教室の皆様から感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は、The 3rd International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (Nara, 2004)において発表した。

文 献

- 1) Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 361: 151-160, 2003
- 2) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9: 461-466, 1997
- 3) Vestergaard C, Yoneyama H, Matsushima K. The NC/Nga

- mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol Med Today* 6: 209-210, 2000
- 4) Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 343: 1199-1206, 1994
- 5) Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 7: 801-819, 2001
- 6) Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30: 463-488, 2001
- 7) Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusic AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 277: 17415-17427, 2002
- 8) Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 9: 160-168, 2003
- 9) Greenacre SA, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34: 541-581, 2001
- 10) Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease—a review. *Arch Dermatol Res* 290: 643-651, 1998
- 11) Rowe A, Farrell AM, Bunker CB. Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 136: 18-23, 1997
- 12) Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol* 3: 1313-1324, 2003
- 13) Taniuchi S, Kojima T, Hara Mt K, Yamamoto A, Sasai M, Takahashi H, Kobayashi Y. Increased serum nitrate levels in infants with atopic dermatitis. *Allergy* 56: 693-695, 2001
- 14) Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69: 223-228, 2001
- 15) Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, Stamler JS. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 86: 719-729, 1996
- 16) Ogino K, Nakajima M, Kodama N, Kubo M, Kimura S, Nagase H, Nakamura H. Immunohistochemical artifact for nitrotyrosine in eosinophils or eosinophil containing tissue. *Free Radic Res* 36: 1163-1170, 2002
- 17) Kodama N, Kambayashi Y, Kubo M, Nobukuni Y, Kimura S, Nakamura H, Ogino K. Induction of myeloperoxidase and nitrotyrosine formation in a human eosinophilic leukemia cell line, EoL-1. *Cell Biochem Funct* 22: 105-112, 2004
- 18) Ishibashi T, Himeno M, Imaizumi N, Maejima K, Nakano S, Uchida K, Yoshida J, Nishio M. NOx contamination in laboratory ware and effect of countermeasures. *Nitric Oxide* 4: 516-525, 2000
- 19) Shigenaga MK, Lee HH, Blount BC, Christen S, Shigeno ET, Yip H, Ames BN. Inflammation and NOx-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3211-3216, 1997
- 20) Ishida N, Hasegawa T, Mukai K, Watanabe M, Nishino H. Determination of nitrotyrosine by HPLC-ECD and its application. *J Vet Med Sci* 64: 401-404, 2002
- 21) Ogino K, Kodama N, Nakajima M, Yamada A, Nakamura H, Nagase H, Sadamitsu D, Maekawa T. Catalase catalyzes nitrotyrosine formation from sodium azide and hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 35: 735-747, 2001
- 22) Hoffmann J, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. TNFalpha and oxLDL reduce protein S-nitrosylation in endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 41383-41387, 2001
- 23) Dillon SA, Burmi RS, Lowe GM, Billington D, Rahman K. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sci* 72: 1583-1594, 2003
- 24) Chamlin SL, Kao J, Frieden IJ, Sheu MY, Fowler AJ, Fluhr JW, Williams ML, Elias PM. Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J Am Acad Dermatol* 47: 198-208, 2002
- 25) Aioi A, Tonogaito H, Suto H, Hamada K, Ra CR, Ogawa H, Maibach H, Matsuda H. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 144: 12-18, 2001
- 26) Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 35: 213-225, 2003
- 27) Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 273: 25804-25808, 1998
- 28) Wu W, Chen Y, Hazen SL. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem* 274: 25933-25944, 1999
- 29) Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 701-706, 2000
- 30) MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, Samoszuk MK, Hazen SL. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol* 166: 5763-5772, 2001
- 31) Simon D, Braathen LR, Simon HU. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy* 59: 561-570, 2004
- 32) Tyurin VA, Tyurina YY, Liu SX, Bayir H, Hubel CA, Kagan VE. Quantitation of S-nitrosothiols in cells and biological fluids.

- Meth Enzymol 352: 347-360, 2002
- 33) Stamler JS. S-nitrosothiols in the blood: roles, amounts, and methods of analysis. *Circ Res* 94: 414-417, 2004
- 34) Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnelo D, Mullins ME, Sugarbaker DJ, Chee C, Singel DJ, Loscalzo J, Stamler JS. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10957-10961, 1993
- 35) McMahon TJ, Moon RE, Luschinger BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* 8: 711-717, 2002
- 36) Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, Feelisch M. Cellular targets and mechanisms of nitrosylation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4308-4313, 2004
- 37) Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F. Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation. *Neurosci Lett* 200: 17-20, 1995
- 38) Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovsdi I, Steed DL, Billiar TR. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 101: 967-971, 1998
- 39) McInnes IB, Leung B, Wei XQ, Gemmell CC, Liew FY. Septic arthritis following *Staphylococcus aureus* infection in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 160: 308-315, 1998
- 40) Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, Weidner JR, Shen F, Shelton BA, Mudgett JS. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *J Immunol* 160: 2940-2946, 1998
- 41) Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 28: 1745-1750, 2000
- 42) Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. *Clin Chim Acta* 339: 1-9, 2004

Involvement of Nitric Oxide and Reactive Nitrogen Species in Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice
 Masayuki Kubo, Department of Environmental and Preventive Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **113**, 109 — 116 (2004)

Key words nitric oxide, reactive nitrogen species, nitric oxide synthase, atopic dermatitis, NC/Nga mice

Abstract

Nitric oxide (NO) and reactive nitrogen species (RNS) are believed to play a pivotal role in the pathogenesis of inflammatory diseases. However, the involvement of NO and RNS in atopic dermatitis (AD) is still unknown. The aim of this study was to evaluate the contribution of NO and RNS to AD-like skin lesions in NC/Nga mice, an animal model for human AD. AD-like skin lesions were developed in NC/Nga mice kept under conventional conditions but not in specific pathogen-free (SPF) conditions. In the lesional skin, inducible NO synthase (iNOS) and endothelial NOS (eNOS) were upregulated and neuronal NOS (nNOS) was downregulated. The concentrations of NO₂⁻ and NO₃⁻ (NO_x) were significantly higher in serum, but lower in lesional skin than in normal skin. On the contrary, protein-bound S-nitrosothiols and nitrotyrosine were significantly increased in AD-like skin lesions. Moreover, nitrotyrosine immunostaining cells were mainly confined to eosinophils. No significant differences were shown in the marker of oxidative stress, such as cutaneous thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG). Thus, these findings suggest that changes in expression of NOS isoforms, decrease in NO_x and subsequent increase in RNS formation are involved in the pathogenesis of AD-like skin lesions in NC/Nga mice.