

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に關与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚 搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製

所 属 日本オルガノン株式会社 研究開発本部
研 究 者 廣田直美

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 天 野 博 夫
(2) 富山医科薬科大学薬学部 倉 石 泰

要旨

NC マウスのそう痒反応に対するNO の関与を検討し、産生されるNO が痒みの増悪因子である可能性及びnNOS 選択的阻害剤が治療薬として有望である事を明らかにした。更に、NC マウスの表皮においてそう痒反応に応答し変化する遺伝子の同定も試みた。

1. 研究目的

そう痒はアトピー性皮膚炎(AD)において重要な臨床的問題であるがその発症機序に関しては不明である。臨床的には抗ヒスタミン剤、抗アレルギー剤、ステロイド外用剤等が適用されるが、顕著な有効性を示すとは言い難く、そう痒症の克服(新規治療薬の開発)は遷延化・難治化するAD にとって極めて重要な研究課題である。しかし、適切なそう痒症の動物モデルが存在しなかったため、本分野における研究はこれまで困難を極めた。

我々は、自然発症ADモデルマウス(NC マウス)における皮膚炎発症に伴う搔き動作が皮膚そう痒症の適切な動物モデルとなることを、初めて明らかにした。本研究の目的は、同モデルを用いて薬理的、免疫学的、細胞生物学的手法で多面的に研究することにより、そう痒症発症機序の解明(関与するメディエーター、細胞、分子、遺伝子等の同定)を目指すことにある。更に、明らかとなった発症メカニズムをターゲットとする新規な治療薬の創製も並行して実施する。本治療薬はAD 皮膚そう痒症の根本的治療薬となることが期待される。

2. 研究方法

1)NC マウスにおける薬理学的研究

①NC マウスのそう痒関連動作と背部皮膚神経活性の関連性

雄性のNC/Jic マウスを用いた。NC マウスは、SPF 環境下で繁殖・飼育した。4 週齢で離乳後、SPF 環境下で飼育を継続する群(SPF NC マウス)と、飼育条件を通常環境(皮膚炎が見られるマウスを飼育している環境)に変更する群(conventional NC マウス)とに分けた。

- (1) そう痒関連動作の評価: 無人環境下にマウスの行動をビデオカメラで2 時間撮影した。その再生により、吻側背部に対する搔き動作と尾側背部に対する噛み動作に限定してその回数を数えた。
- (2) 背部皮膚神経枝活動電位の測定: (1)で使用したマウスを、撮影後2-3 日以内に再び使用した。ウレタン(1.5 g/kg, i.p.)で麻酔した後、37℃の保温板の上で腹位にして、四肢を粘着テープで固定した。吻側背部の皮膚を切開して捲り、背部2ヶ所の皮膚枝神経(吻側背部を支配する頭部側の神経枝と尾側背部を支配する尾部側の神経枝)をそれぞれ別の双極の銀電極にのせた。2 束の皮膚神経枝の電気活動は、同時に細胞外記録法により測定し、前置増幅器を介して増幅した。60分経過した後、High cut (1 kHz) およびLow cut (150 Hz) の filter を通して2 時間記録し、活動電位の発生数を計測した。

②NC マウスのそう痒反応に対するステロイド剤の連続投与による効果

- (1) 搔き動作の測定: 薬物投与前日と投与後1、6、10、17、20 日目に無人環境下でマウスの行動をビデオカメラで60 分間撮影した。その再生により、後肢によるすべての搔き動作の回数を数えた。

- (2) 薬物投与: Beta は 0.5% methylcellulose (MC) に懸濁し、1 mg/kg の用量を 3 週間、毎日午前 10:00 に経口投与した。対照群には 0.5% MC を投与した。
- (3) 皮膚病変のスコア化(4 段階): スコア 0、毛並みがよく正常の皮膚; スコア 1、顔面と吻側背部に軽度の毛並みの悪化、耳や顔面に若干の出血と掻き傷; スコア 2、毛並みの悪化と脱毛、耳や顔面の出血や傷に加え吻側背部にも数個の傷や出血; スコア 3、重度の脱毛や出血で耳の喪失。
- (4) 背部皮膚神経枝活動電位の測定: 薬物投与を終了して 2 日以内に実験した。麻酔下で、マウス吻側背部の皮膚枝神経活動を 60 分間記録し、活動電位の発生数を計測した。

③NC マウスのそう痒反応に対する神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 選択的阻害薬の評価

- (1) 動物: 実験には NC/Nga マウス(雄性、入荷時 4 週齢; 日本チャールス・リバー)を用いた。NC/Nga マウスは通常環境(conventional 環境)下にて 11 週以上飼育し、皮膚炎症状を確認した後で実験に供した(体重 25 - 30 g)。
- (2) 被検物質: AR-R17477 (*N*-(4-(2-((3-chlorophenylmethyl)amino)-ethyl)phenyl)-2-thiophenecarboxoxamidine ; No.11614、日本オルガノン医薬研究所)は 10mg/kg、No.11615 (*N*-(3-(aminomethyl) phenyl) acetoamideine、日本オルガノン医薬研)は 3mg/kg の用量で投与した。薬剤は生理食塩液に溶解し、0.05 ml/10 g・body weight の容量にて尾静脈内投与した。
- (3) 掻き動作の測定: 痒みの感覚は、マウスは行動観察用アクリルケージ(13×9×30cm/cell)の中に入れ 1 時間馴化した。馴化後、無人環境下にマウスの行動をビデオカメラ(TRV-10、SONY)で 120 分間撮影した。掻破数はビデオの再生により行い、後肢による連続した掻き動作のみを掻破とみなし 10 分ごとの掻破数を累積して計測した。被検薬は、撮影開始後 60 分に所定濃度で静脈内投与し、投与前 60 分を投与前値、投与後 60 分を投与後値として計測した。
- (4) 電気生理学的解析: マウスはウレタン(1.5 g/kg/10ml 生食液; キシダ化学) i.p.により麻酔後、体温コントローラー(日本光電、ATB-1100、36.5 度)上にセロテープで固定した。マウスの背部皮膚を切開し、皮膚から脊髄に向かう神経束を結合組織から剥離した。神経束は塩化銀でコートした銀双電極(0.4 φ ; インターメディカル)に掛け、ミネラルオイル(ICN Biomedicals)を滴下した。遠心性神経活動の記録を防ぐため、神経束は脊髄に入る直前部分、即ち中枢側で切断した。増幅器(日本光電、VC-10 及び AVB-10)で増幅された活動電位はデータ解析用ソフト Power Lab(AD Instruments)上に記録保存した。神経活動を确认后、1 時間以上安定期間において試験を開始した。神経活動を 1 時間記録後、尾静脈より各薬剤を投与し、さらに 1 時間記録した。統計学的解析は溶媒投与群のスパイク数の変化率と各薬剤投与群のスパイク数の変化率との間で t 検定を実施した。

2) NC マウス皮膚構成細胞を用いた細胞生物学的検討

①細胞増殖に対する諸種サイトカインの作用

NC マウスケラチノサイトの増殖に対する諸種サイトカインの作用は、細胞播種時にサイトカインを培地中に添加し 72 時間培養後の細胞数を、対照群と処置群とで比較して検討した。細胞数を直接計数する方法と、クリスタルバイオレット染色の比色定量を細胞数の指標とする方法(CV 染色法)の両者を用いた。

②NC マウスケラチノサイトにおける iNOS 誘導の検討

NC マウスケラチノサイトサブクローンを 0.25ng/ml の IFN- γ 存在下に 72 時間培養し、iNOS 誘導効果を ICC 法を用いて検討した。

3) NC マウスを用いた新たなそう痒メディエーターの探索

①表皮ケラチノサイトを用いたディファレンシャルディスプレイ(DD)法による検討

- (1) NC マウスの掻き動作回数による群分け: 通常環境下で飼育して顕著な掻き動作を示すマウスが現れてきたとき、全てのマウスの行動を 3 日間、1 日に 20 分間ずつ観察して、掻き動作を数えた。3 日間連続して掻き動作

回数が多い群 (high responder: 43.7~83.3 回/20 分間、66.8±4.6 回、8 匹の平均掻き動作回数と標準誤差) と少ない群 (low responder: 4.3~14.7 回/20 分間、10.6±1.1 回、9 匹の平均回数と標準誤差) の 2 群にわけて実験した。

(2) DD 法: 2 群の NC マウス (high responder と low responder) を麻酔、断頭後に、背部の皮膚を切り取り、EDTA 法により表皮を剥離した。3 種類の down stream primer (5'-AAgCT11A-3'、5'-AAgCT11C-3'、5'-AAgCT11g-3') と 23 種類の up stream primer (10-mer primer) を用い、全部で 65 パターンの組み合わせで DD を行い、表皮ケラチノサイトでそう痒反応の増悪に伴って変化する遺伝子を同定した。

3. 研究成果

1) NC マウス皮膚そう痒症モデルにおける薬理的検討

① NC マウスのそう痒関連動作と背部皮膚神経活性の関連性

NC マウスの行動を撮影した後に、麻酔下で *in vivo* 皮膚枝神経標本を作製し、各々吻側背部と尾側背部を支配する神経の活動電位を計測した。同じマウスの 2 種類のそう痒関連動作 (掻き動作と噛み動作) の回数と自発する神経発火の頻度との間の相関を調べた (Fig. 1)。Conventional NC マウスでは、吻側背部の掻き動作回数 (49±5 回、n = 10) だけではなく、尾側背部の噛み動作回数 (23±3 回) も、SPF NC マウス (掻き動作、3±1 回; 噛み動作、7±1 回、n = 10) に比べて顕著に増加していた。皮膚枝神経の自発発火頻度も、conventional NC マウスでは、吻側背部を支配する皮膚枝神経の発火頻度 (6,693±1,055、n = 10) のみならず、尾側背部を支配する神経の発火頻度 (4,183±618) も、SPF NC マウス (吻側背部、782±235 回; 尾側背部、778±244 回、n = 10) に比べて顕著に増加していた。個々の NC マウスの掻き動作回数と吻側背部皮膚枝神経の発火頻度、および、噛み動作回数と尾側背部皮膚枝神経の発火頻度をプロットすると、明らかな正の相関が得られた。

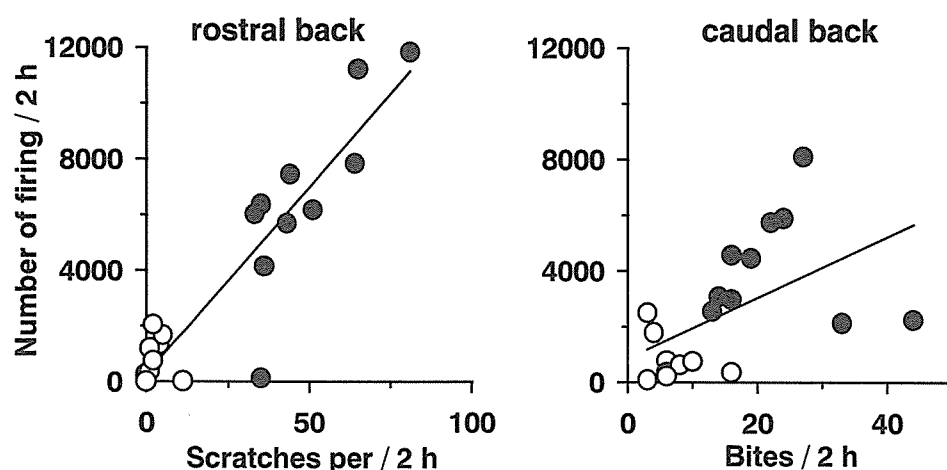


Fig. 1. Relationships between itch-related behavioral responses and cutaneous nerve firing at rostral and caudal back of NC mice. Each data from SPF (○, n = 10) and conventional NC mice (●, n = 10), and each regression line were shown. (Left) The correlation coefficient between the frequencies of scratching and nerve firing, of rostral part of the back was 0.92. (Right) The correlation coefficient between the frequencies of biting and nerve firing, of caudal part of the back was 0.53.

② NC マウスのそう痒反応に対するステロイド剤の連続投与による効果

Conventional NC マウスでは、8 週令頃から毛並みの悪化や顔と耳に掻破痕などが観察され、16 週令になると特に吻側背部の皮膚症状が悪化した。SPF NC マウスでは毛並みの悪化や掻破痕は見られなかった。実験開始時の conventional NC マウスの掻き動作回数は SPF NC マウスに比べて顕著に多かった。対照群の NC マウスの掻き動作回数は、実験期間中で若干の減少はあるものの、投与前と差が無かった (投与前 267±58 回、3 週間後

218±31 回)。Beta 投与群のマウスは投与 1-3 週間後において、投与前に比べて有意な掻き動作回数減少を示した (Fig. 2)。対照群のマウスの皮膚症状は実験期間中、スコア 2 前後で一定していたのに対して、Beta 投与群では重度の脱毛が観察されるなど、むしろ悪化の傾向にあった。また、対照群の NC マウス皮膚枝神経の自発発火頻度は、SPF NC マウスに比べて著明に増加していた (SPF NC マウス 642±223、対照群の conventional NC マウス 10,137±2,033)。Beta の投与群マウスの神経発火頻度は、対照群に比べて明らかに減少していた (3,379±829)。

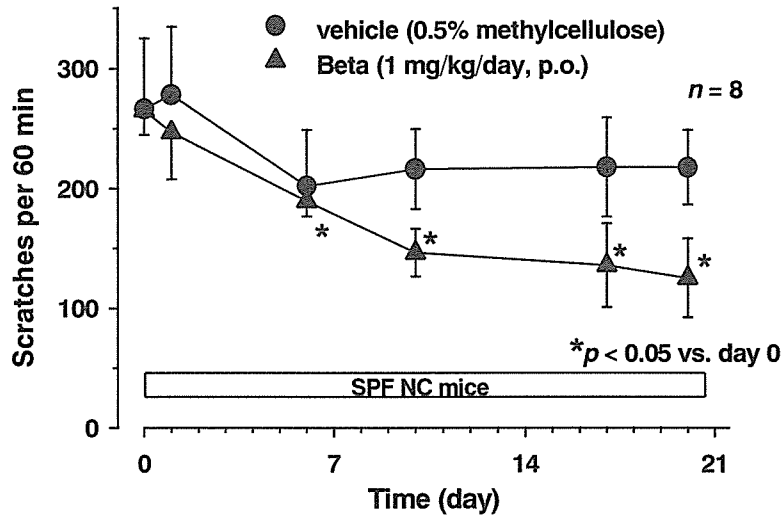


Fig. 2. Effect of betamethasone 17-valerate (Beta) on spontaneous scratching of conventional NC mice.

③NC マウスのそう痒反応に対する nNOS 選択的阻害薬の評価

nNOS 選択的阻害薬;ARR-17477 および No.11615 の NC/Nga マウスにおけるそう痒行動ならびに背部皮膚枝神経活動に対する効果を Fig.3 A)-D) に示した。NC/Nga マウスにおけるそう痒行動に対して、ARR-17477 (0.1-10 mg/kg、i.v.)、No.11615 (1-10 mg/kg、i.v.)は、いずれも用量依存的な抑制効果を示した (n=5-7)。投与前後の搔破数を較べると、ARR-17477 の 1 および 10 mg/kg、No.11615 の 3 および 10 mg/kg において有意な減少がみられた。

背部皮膚枝神経活動に対する検討においては、いずれの阻害薬も投与前値に対して弱いながら抑制傾向を示した。投与前後の発火頻度の変化率は、それぞれ生食液投与群;122.1±18.7%(投与前6968±1824回、投与後7098±913回、n=5)、AR-R17477(10mg/kg)投与群;81.7±15.5%(投与前6848±1254回、投与後5975±1689回、n=6)、No.11615(3mg/kg)投与群;85.4±21.4%(投与前5334±1761回、投与後3973±1137回;Mean±S.E.、n=5)であった。

2)NC マウス皮膚構成細胞を用いた細胞生物学的検討

①NCマウスケラチノサイトの増殖に対するサイトカイン類の作用

NCK-SGサブクローンに対して、4種類のサイトカインのうちIFN- γ のみが増殖抑制作用を示し、TNF- α 、IL1- β 、IL-6、はいずれもこの作用を示さなかった (Fig. 4)。

②NCマウスケラチノサイトサブクローンのIFN- γ 感受性

NCK-SGサブクローンに対するIFN- γ の細胞増殖抑制作用には濃度依存性が認められた (Fig. 5)。NCK-SGの細胞増殖自体は培地中のEGFの有無により大きな影響を受けなかったが、IFN- γ の増殖抑制作用に対する感受性においては明らかな違いが認められ、EGF非存在下ではより低濃度からIFN- γ 効果が認められた (Fig. 5)。

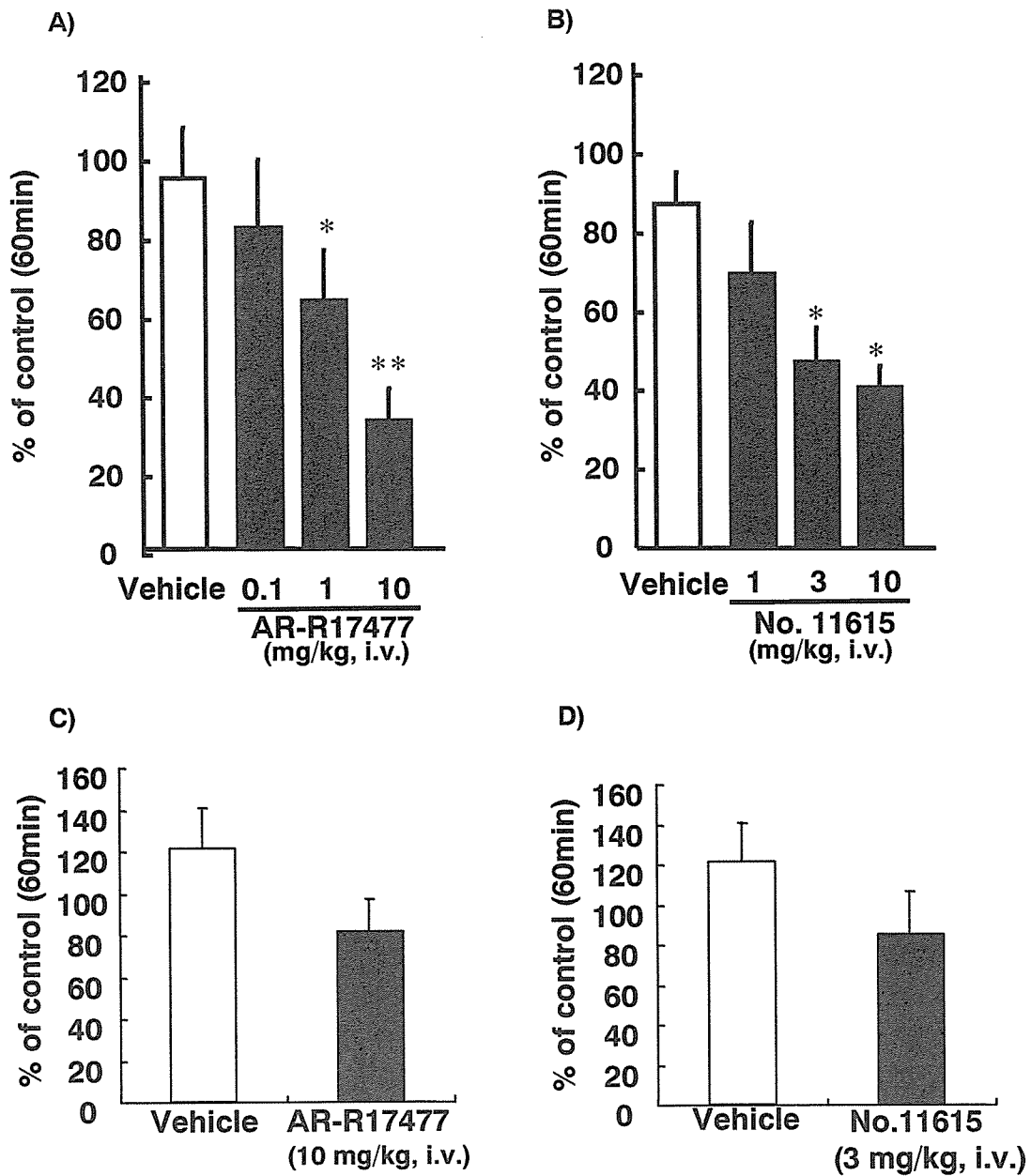


Fig. 3. Effect of nNOS-selective inhibitor ; AR-R17477 and No.11615 on spontaneous scratching and firing of the skin afferent nerve in NC/Nga mouse. Each value presents the mean of pre-drug scratching number / post-drug scratching or firing number for 60 min x 100 as % of control (n = 5-7). A) Effect of AR-R17477 and B) No.11615 on the scratching in the mouse. * ; p<0.05, ** ; p<0.01 by paired t-test. C) Effect of AR-R17477 and D) No.11615 on spontaneous firing of the skin afferent nerve in the mouse.

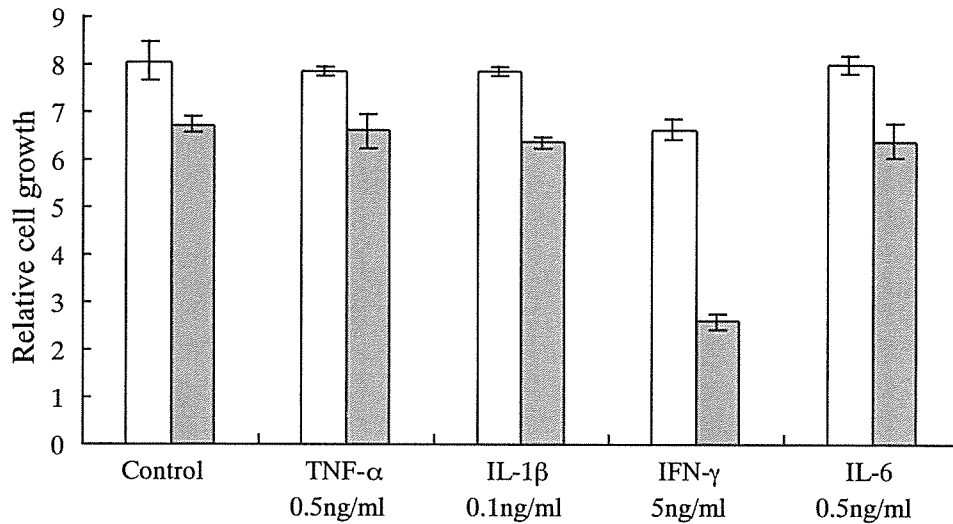


Fig. 4 Effects of several cytokines on the cell growth of NC mouse keratinocyte subclone NCK-SG in the presence (open columns) or absence (hatched columns) of EGF (5ng/ml). The ordinate indicates the relative cell growth calculated according to the equation: (relative cell growth) = (cell number after 3 days of culture)/(cell number plated). Values are means and standard errors of data from experiments performed in sextuplicate.

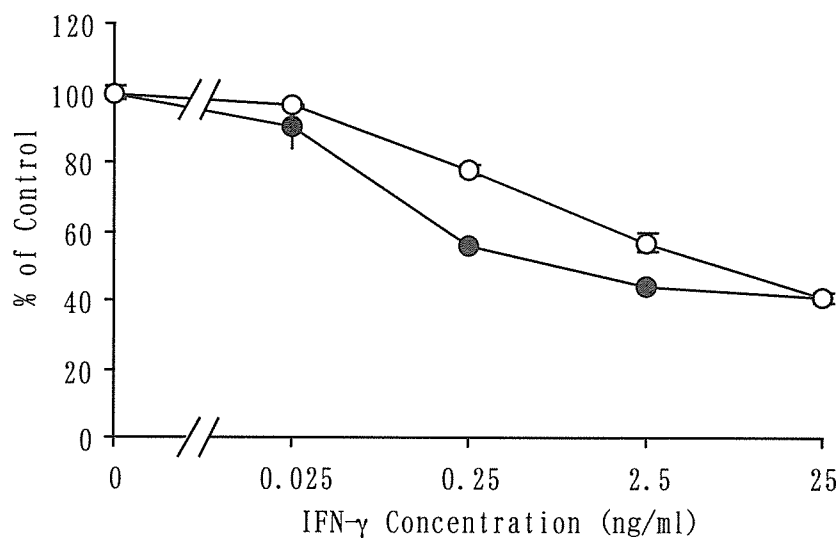


Fig. 5. Concentration dependent cell growth inhibition by IFN- γ on the NC mouse keratinocyte subclone NCK-SG in the presence (open circle) or absence (solid circle) of EGF (2.5ng/ml). Values are expressed as means and standard errors of percentages relative to control (without IFN- γ) of each condition on day 4 of culture.

3) NCマウスを用いた新たなそう痒メディエーターの探索

①表皮ケラチノサイトを用いたディファレンシャルディスプレイ(DD)法による検討

High responder と low responder 群のNCマウス間で、表皮ケラチノサイトにおける遺伝子発現量に差のある cDNA断片が47個見出された。この47個を再増幅した後、シーケンスを行ったところ、以下のような結果を得た。

1. シーケンスをおこなってDDとほぼ同じ長さ(bp)の配列が解読できたもの…18個
2. 再増幅やシーケンスでDDとバンドの長さが異なったもの…12個
3. 再増幅不可…17個

DDとほぼ同じ長さの配列が解読できた18個について、BLAST Searchにてホモロジー検索をした結果をTable 1に示す。

Table 1. Homology search result (BLAST search)

No. ^a	Low ^b	High ^c	Name	AC No. ^e	bit 数 ^f
ホモロジーが高く、シークエンスで得られた配列がほぼ完全に一致したもの					9 個
1	++	+++	Homo sapiens HSPC292 mRNA	AF161410	172
			Homo sapiens chromosome 17, clone hRPC.1073_F_15	AC004686	172
14	++	-	Mus musculus GATA-binding protein 3 (Gata3), mRNA	NM008091	371
			Mouse mRNA for GATA-3 transcription factor	X55123	371
15	++	+	R.norvegicus mRNA for ribosomal protein S21	X79059	170
67	+	++	Mus musculus lamin A (Lmna), mRNA	NM019390	575
			Mouse mRNA for germ cell specific lamin C2, complete cds	D14850	575
68	+	+++	Mus musculus gene for keratin 6 alpha, exon9 and complete cds	AB012025	279
73	+	+++	Homo sapiens high-glucose-regulated protein 8 (HGRG8), mRNA	NM016258	374
			Homo sapiens NY-REN-2 antigen mRNA, complete cds	AF155095	374
			Homo sapiens high-glucose-regulated protein 8 (HGRG8) mRNA	AF192968	374
			Mouse chromosome X BAC B178A13	AC002406	324
75	+	++	Mus musculus glutathione-S-transferase like (Gsttl-pending)	NM 010362	240
			Mus musculus glutathione-S-transferase homolog mRNA	MMU80819	240
81	++	+++	Mus musculus capping protein beta 1 (Cappb1), mRNA	NM009798	317
			Mus musculus capping protein beta-subunit isoform 2 mRNA,	U10407	317
84	-	+	Mus musculus Ring3 mRNA, partial cds, clone:TRC5	AB010248	478
			Mus musculus Ring3 mRNA, partial cds, clone:TRC8	AB010247	478
			Mus musculus Ring3 mRNA, partial cds, clone:TRC3	AB010246	478
			Mus musculus bromodomain-containing 2 (Brd2), mRNA	NM010238	470
			Mus musculus female sterile homeotic-related protein Frg-1	AF045462	470
			Mus musculus major histocompatibility locus class II region	AF100956	410
シークエンスで得られた配列の一部(連続して 100 bp 以上)でホモロジー高かったもの					1 個
8	++	+	Rattus norvegicus nonmuscle myosin heavy chain-B mRNA	AF139055	196
			Human nonmuscle myosin heavy chain-B (MYH10) mRNA	M69181	133
シークエンスで得られた配列の一部(連続して 50 bp ほど)でホモロジー高かったもの					1 個
12	++	-	Human DNA(aminotransferase;serine palmitoyltransferase)	AL109983	108
			Mus musculus serine palmitoyltransferase, SPtlc2		49
			Mus musculus serine palmitoyltransferase LCB2 subunit	U27455	49
			M.musculus mRNA for serine palmitoyltransferase subunit B	X95642	49
シークエンスで得られた配列が BLAST のデータベースとホモロジー低いもの fragment No. 10, 24, 63, 74, 86, 87, 93					7 個

^a Fragment number

^b Low responder

^c high responder

^d 発現レベル:- (検出されず) < + < ++ < +++

^e Gene bank の accession number

^f cDNA 配列の相同性の高さを示す値

4. 考察

昨年度、初めて作製した *in vivo* 背部皮膚枝神経標本を用いた電気生理学的アプローチにより、皮膚炎を伴ってそう痒を発症した NC マウスにおいて、一次求心線維の活動が異常に高まっていることが判明し、本実験系が痒みの定量化の新しい測定法になり得る可能性を示した。そこで、痒み研究におけるこの測定法の有用性を明確にするため、さらに詳細な検討を行った。発症 NC マウスは吻側背部を後肢により頻繁に搔くが、後肢の届かない尾側背部に対しては噛み動作を現わすので、これら 2 種類のそう痒関連動作の回数を、同じマウスの吻側背部と尾側背部を支配する皮膚枝の神経活性と比較して、その相関を調べた。その結果、conventional NC マウスでは、2 種類の動作と 2 束の神経発火頻度が、SPF NC マウスに比べて明らかに増加しており、NC マウスの搔き動作回数と吻側背部皮膚枝神経活性、および、噛み動作回数と尾側背部皮膚枝神経活性が密接に連関することを見出した。以上の結果は、NC マウスにおいては搔き動作だけではなく、噛み動作もそう痒反応の指標になることを意味し、皮膚枝神経の発火頻度が皮膚で発生する痒み刺激の強さと並行する可能性を強く示唆する。

さらに、重要なことは、外観では皮膚病変がみられない尾側背部の皮膚を支配する神経活性が明らかに亢進していることが判明したことである。皮膚病変を生じている吻側背部皮膚では一酸化窒素(NO)濃度が増加しており、その NO がそう痒反応の増強因子として働く可能性を我々は指摘してきたが、皮膚内 NO 濃度が健常皮膚と同程度である尾側背部の皮膚においても、皮膚支配神経の自発神経活性の亢進が観察されたことは、NO 以外の新たなそう痒反応増強因子の存在を推測させる。これは、今後の重要な研究課題であり、皮膚バリア機能の低下との関連性の観点からの検討が必要である。

Conventional NC マウスの搔き動作回数は SPF NC マウスに比べて著明に増加していた。その搔き動作数が Beta の 3 週間の投与により減少したことは、この薬物がそう痒反応を抑制する可能性を示唆する。しかし、皮膚症状は対照群のマウスに比べてむしろ悪化の傾向にあった。Beta 投与群マウスの投与期間中の体重増加の度合いが、対照群と比べて若干抑制されていたので、過量の可能性も含めて、皮膚症状の悪化の原因については更なる検討が必要である。吻側背部皮膚を支配する皮膚枝神経の自発発火頻度は対照群の NC マウスにおいて著明な増加を示していたが、その頻度の減少が Beta 投与群において認められた。このことは、NC マウスにおいて皮膚枝神経活性を亢進する(痒み反応惹起)因子が皮膚症状の悪化に伴って変化する因子とは異なることを推測させる。NC マウスの皮膚枝神経の活動が亢進していることは、皮膚組織側で産生される因子が、常時、自由神経終末の興奮を惹起していることを意味するので、この神経活動を抑制した Beta によるそう痒反応の抑制作用部位は末梢の皮膚レベルであると考えられる。その抑制作用機序については、現時点では不明であるが、conventional NC マウスでは、背部皮膚内で産生される過剰の NO がそう痒反応に関与する可能性が高いので、Beta によるそう痒反応の抑制機序に NO 系が関与するか否かを、まず、検討する必要がある。

NC マウスの自発そう痒行動については、前年度の本研究において AR-R17477 が抑制作用を示すことを報告したが、今回、AR-R17477 とは化学構造の異なる nNOS 選択的阻害薬 No.11615 が、最少有効量 3mg/kg (i.v.) で抑制効果を示したことから、これらの化合物に見られた効果は非特異的作用ではなく、nNOS 阻害に基づく抑制であることが示唆された。分担研究者の倉石らが確立した手法により、高頻度の搔き動作を示す conventional 環境下飼育 NC/Nga マウスの背部皮膚枝 afferent 神経活性が SPF 環境下飼育でのそれよりも有意に亢進していることが示され、本神経活性は痒みの発生の指標となり得ることが示唆されている。今回、NC マウスの自発そう痒行動に有効であった、AR-R17477 10mg/kg、i.v. および No.11615 3mg/kg、i.v. 投与群が、本神経の発火頻度について vehicle 群に比べ、いずれも抑制傾向を示した。本電気生理学的手法においては、末梢皮膚神経枝からの afferent な神経活動のみを記録しているので、この抑制の作用点は末梢レベルであることが示唆された。しかしその抑制率は、それぞれ 33 および 30% と、同投与量でのそう痒反応の抑制率 (AR-R17477: 54%、No.11615: 40%) に比し低いものであった。このことは、nNOS 阻害薬が、末梢のみならず、中枢においても作用している可能性を示唆しているのかもしれない。また、NO 以外の新たなそう痒メディエーターが関与している可能性も否定はできず、このようなメディエーターの同定も、今後の重要な研究課題と考えられる。

いずれにしても、以上の知見から、nNOS は全く新しい抗そう痒剤のターゲット分子になり得ると考えられた。このことは現在、リウマチ・脳循環改善・パーキンソン病・鎮痛などを対象疾患として開発が進められている、選択的

nNOS 阻害剤のユニークな適応の可能性を見出したことをも意味する。

また、選択的 NOS 阻害剤の創薬を目指すにあたっては、実際的な *in vitro* のスクリーニングシステムの構築が必要である。我々は iNOS、血管内皮型 NOS (eNOS) および nNOS の各粗精製酵素標品を用いて、簡便かつ非 RI の *in vitro* 活性測定系を開発した。NOS 阻害剤として報告されている種々の化合物(L-NAME、1400W、AR-R17477、No.11614)は本評価系での測定において、報告されているものと同様の阻害活性強度及び isozyme 選択性プロファイルを示したことから、本評価系は、各 NOS-isozyme に対する阻害活性の *in vitro* スクリーニングシステムとして確立できたと考えられる。

今回確立した NO₂⁻ 測定系は、非 RI で測定するため、大量の検体をスクリーニングするのに有用である。一般に非 RI 法の問題として、RI 測定法に比較して酵素量が大量に必要となることが挙げられることが多いが、我々は Baculovirus 蛋白発現システムおよび昆虫細胞大量培養システムを確立することにより、この問題を解決した。これらの実験手法は、isozyme 選択的 NOS 阻害剤の *in vitro* スクリーニングシステム構築上極めて有用とである。一方、今回評価したそれぞれの薬物について、3種の NOS isozyme に対する抑制プロファイルを比較すると、いずれの化合物もすべての isozyme に対して抑制効果を示し、各薬剤の IC₅₀ 値は 1 ~200 μM の範囲内であった。この結果は、各薬物の阻害酵素選択性および potency が治療薬とするには充分でないことを示唆しており、特に末梢 nNOS-isozyme 選択性が高く、阻害活性に優れた、新たな化合物を目指した今後のスクリーニングが必要であると考えられた。

NC 由来の KC を用いた細胞生物学的研究においては、前年度の本研究において、NC/Jic、BALB/c、C57BL/6 各系統マウス新生児表皮由来のケラチノサイトのうち、NC/Jic マウス由来の細胞においてのみ IFN-γ 適用に反応した iNOS の誘導が認められた知見より、NC マウスの皮膚そう痒症に表皮ケラチノサイトにおける IFN-γ による iNOS の誘導が関与している可能性が示唆された。

本年度の研究においては、NC マウスケラチノサイトに対して IFN-γ が iNOS 誘導以外に、細胞増殖抑制作用を示すことが明らかになり、さらに、この作用が TNF-α、IL1-β 等他の炎症性サイトカインには認められず、現段階では IFN-γ 固有の作用と考えられることを示した。最近、AD 等の湿疹性皮膚炎において多数のサイトカイン類のうち、IFN-γ のみが病因として重要な役割を果たしているとの報告もあり、IFN-γ が NC マウスケラチノサイトに及ぼす効果を AD の *in vitro* モデル系のひとつとして応用しうる可能性を示唆している。NC マウスは、高 IgE 血症と持続的そう痒を伴う皮膚炎を発症することから、AD のモデル動物としての有用性が提唱されているが、本研究の成績により発症組織の構成細胞であるケラチノサイトにおいて NC マウスと AD との間に類似点が示された。今後、NC マウスケラチノサイトを用いて、AD の発症機序の根幹部分に関与する遺伝的要因の研究が進み、根本的な病因解明と治療薬の開発に大きく貢献するものと期待される。

NC マウスのそう痒反応の増悪・進展に関与する可能性のある遺伝子の DD 法を用いた探索の結果、表皮ケラチノサイトより 18 個の cDNA 断片の塩基配列を決定した。BLAST search のデータベースとホモロジーが高い 9 個の遺伝子のうち、Fr. No. 67 (lamin A) と Fr. No. 68 (keratin 6) は細胞骨格の中間径フィラメント(IF: Intermediate filament)である。両者とも痒みや AD との関連は報告されていない。また、keratin 6 については、皮膚の損傷治癒の過程で増加することが知られている。Fr. No. 75 (GST-like protein) は、近年クローニングされたストレス応答タンパクであり、glutathione 結合部位を有するが、GST 活性はない。Mouse PGE₂ 合成酵素は human の GST-like protein との homology が高いということが、最近、明らかになったことから、Fr. No. 75 のタンパクも何らかの酵素活性を有する可能性はある。Fr. No. 81 (capping protein beta 1) は、actin に結合するタンパクで、filament の構築や分解を阻害することにより actin filament の動的作用を抑制すると考えられる。Fr. No. 84 (Ring3) は、当初、ショウジョウバエの繁殖に関与する遺伝子として同定され、精子形成に重要な役割をしている可能性が指摘されたが、近年、MHC の class II の領域であることや核で他のタンパクと結合して kinase 活性(セリン-スレオニンが主)を示すことも明らかにされたことから、リウマチなどの自己免疫疾患の発症への関与の可能性もある。今後、これらの既知遺伝子やそれらとのホモロジーの低い遺伝子のそう痒発症における関与を明らかにする必要がある。

5. 結論

- 1) NC マウスでの *in vivo* 背部皮膚枝神経標本を用いた電気生理学的手法に関し詳細な解析を加え、本法が痒みの定量化の新しい測定法になり得る可能性を明らかにした。また、本モデルを用い、吉草酸ベタメサゾンの NC マウスそう痒反応抑制作用は、その主な作用部位末梢の皮膚レベルであることを明らかにした。
- 2) NC マウスにおけるそう痒反応には末梢におけるnNOSが重要な役割を果たしていることを明らかにし、nNOS 選択的阻害薬が有望なそう痒症の治療薬となり得ることを改めて確認した。更に、創薬スクリーニングに有効な特異的・非 RI *in vitro* NOS 阻害活性測定スクリーニングシステムの確立に成功した。
- 3) NC マウス由来 KC が特異的に IFN- γ に応答した iNOS 誘導及び細胞増殖抑制作用を示すことを明らかにし、NC マウス由来 KC を用いた細胞生物学的研究が、そう痒症発生病機構解明の有効な手法であることを明らかにした。
- 4) NC マウスにおいてはそう痒反応に応答して表皮 KC 発現量が増加する遺伝子群が存在することを見出した。これら DD 法で変化の認められた cDNA の内 18 個の塩基配列を決定しホモロジーサーチを行なった。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 和田幸久、真継航、横田耕一:「そう痒治療薬」特願 2000-332335 (出願中)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社