

アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与に関する研究

研究分担者 安東嗣修 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 准教授

研究協力者 羽座沙都美 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 教授

烏山 一 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫アレルギー分野 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎患者の皮膚には、多くの炎症性細胞の浸潤が観察される。これら炎症性細胞は、コントロールが非常に難しい痒みの発生に重要な役割を担っていることが推測される。これまでその役割が殆ど知られていなかった好塩基球が、アレルギー反応に重要な役割を担っていることが明らかにされてきている。そこで、本研究では、アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与に関して検討した。自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）の炎症部位皮膚には、多数の好塩基球の浸潤が観察された。一方、皮膚炎の発症していない健常マウスでは、皮膚内に好塩基球はほとんど観察されなかった。好塩基除去抗体 Ba103 の投与は、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的掻き動作（痒み関連動作）をコントロール抗体投与群と比較して有意に抑制した。以上の結果より、アトピー性皮膚炎の痒みに好塩基球が関与している可能性が示唆される。

A．研究目的

アトピー性皮膚炎などの多くの皮膚疾患の主な症状の一つとして「痒み」がある。痒みは、非常に不快な感覚であり、また、痒みによる皮膚の掻爬は、皮膚症状の更なる悪化に加え、皮膚炎治療の妨げにもなっている。アトピー性皮膚炎の痒みに対して、痒みの第一選択としての H_1 histamine 受容体拮抗薬が無効である場合が多く、有効な治療薬がないのが現状である。そこで、新規鎮痒薬開発には、痒みの発生機序を十分理解する必要があるが、未だその機序に関しては明らかになっていない。

好塩基球は、その役割はほとんど知られていなかったが、近年、アレルギー疾患に重要な役割を担っていることが明らかになってきている。また、アトピー性皮膚炎患者の皮膚において、好塩基球の増加が観察されている。そこで、本研究では、アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与を検討した。

B．研究方法

1) 実験動物

実験には、雄性自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）を用いた。NC マウスは、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した場合は、皮膚炎の発症は認められない健常状態を維持する。一方、微生物等制御されていない conventional 環境下で飼育した場合は、アトピー様の皮膚炎と自発的掻き動作を示すようになる。

2) 実験試薬

好塩基球の除去は Ba103 抗体（東京医歯大・烏山教授、二宮（小畑）先生より提供）あるいは、コントロール抗体（rat IgG2b κ ）を尾静脈注射した。

3) 行動実験

Ba103 抗体あるいは、コントロール抗体尾静脈注射後 3 及び 4 日目にマウスの行動を観察した。

マウスを行動撮影ケージ (13×9×40 cm/セル) に 1 時間放置し、馴化した。その後、無人環境下に 8mm ビデオカメラでその後の行動を撮影した。行動評価は、ビデオの再生により、後肢による全身への掻き動作数をカウントした。マウスは、1 秒間に数回掻くので、足を挙げてから降ろすまでの一連の動作を掻き動作の 1 回としてカウントした。

4) 免疫組織化学染色

マウス皮膚パラフィン切片を作製し、1 次抗体として好塩基球特異的抗体 (TUG8) と、続いて 2 次抗体として horseradish peroxidase-conjugated IgG と反応させた。発色は、diaminobenzidine を用いて行い、対比染色としてヘマトキシリンを用いた。

C . 研究結果

1) NC マウス

同週齢の SPF 環境下健常マウスと比べて conventional 環境下飼育マウスでは、後肢による全身 (主に、後肢のとどく頭部並びに吻側背部) への掻き動作数の有意な増加が観察された。また、conventional 環境下飼育マウスにおいて、吻側背部皮膚では、皮膚炎の発症、表皮の肥厚、並びに炎症性細胞浸潤が観察された。

2) アトピー性皮膚炎マウスモデル皮膚における好塩基球浸潤

後肢で掻くことのできる吻側背部皮膚での好塩基球数は、SPF 環境下健常マウスと比べて有意に conventional 環境下飼育皮膚炎発症マウスで増加していた (Fig. 1)。また、掻くことのできない尾側背部皮膚では、SPF 及び conventional 環境下飼育マウスで、好塩基球数は、殆ど観察されなかった。

3) 皮膚炎発症マウスモデルの自発的掻き動作に対する好塩基球除去抗体 Ba103 の効果

Conventional 環境下飼育皮膚炎発症マウスは、個体間に掻き動作数にバラツキがあるため、群分けを行って実験に使用した。

Ba103 投与マウスは、コントロール抗体マウス

投与群と比べて、投与後 3 並び 4 日目での掻き動作数評価において有意に自発的掻き動作数の減少が観察された。

D . 考察

本研究では、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルにおいて、炎症部位皮膚において好塩基球の増加が観察された。また、好塩基球除去抗体の処置により自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的掻き動作が抑制された。本抗体による好塩基球除去に関しては、Obata らの報告 (Blood, 2007) の方法に加え、抗体濃度を約 1.7 倍に増加させたことでより確実に好塩基球を減少させたと考えられる。したがって、本モデルの痒み反応への好塩基球の関与が示唆される。

好塩基球は、IL-4 や IL-13 などのサイトカイン類やヒスタミン、プロスタグランジン E₂、セリンプロテアーゼ (mMCP-11、カテプシン G) などを産生・遊離する。本実験に使用した NC マウスは、ヒスタミンに対する感受性は低く、また H₁ histamine 受容体拮抗薬では自発的掻き動作は抑制されないため、ヒスタミンの関与は小さいと考えられる。プロスタグランジン E₂ は、それ自身ほとんど掻き動作を誘発しないが、痒み物質による反応を増強する増強因子として知られている。したがって、好塩基球から遊離されるプロスタグランジン E₂ が痒みの増強に関与しているかもしれない。これまでに NC マウスの自発的掻き動作にセリンプロテアーゼと proteinase-activated receptor 2 (PAR₂) が関与していることを明らかにしてきた。また、トリプターゼ、コンパウンド 8/80 並びにガストリン遊離ペプチド誘発の掻痒反応や蚊アレルギー性掻痒反応、最近ではアトピー性皮膚炎との関連性も指摘されている皮膚系状菌誘発掻痒反応においても PAR₂ が関与していること (Andoh et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2012) を明らかにしてきた。好塩基球から遊離される mMCP-11 は、セリンプロテアーゼの一つであり、Arg の隣を切断する。PAR₂ の活性化には、受容体 N 末端の-Arg-Ser-間が切断される必要がある。したがって、mMCP-11 は、

PAR₂ を活性化する可能性があり、PAR₂ を介して痒みを誘発するかもしれないことが示唆される。更に、カテプシン G もまた、セリンプロテアーゼであり、痒みへの関与は報告されてないが PAR₂ を活性化することが知れていることから、PAR₂ を介して痒みを誘発する可能性がある。プロテアーゼによる痒み反応は、全て PAR₂ を介しているわけではなく、近年、アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン E が PAR₂ を介さないでエンドセリン-1 前駆体のプロセッシングを行い、エンドセリン-1 を介して痒み反応を誘発することが明らかにされた (Andoh et al., Eur. J Pharmacol., 2012)。好塩基球から遊離されるプロテアーゼ類には、PAR₂ 活性化以外に、痒み関連因子前駆体のプロセッシングを介して痒みを誘発する可能性が示唆される。今後、好塩基球から遊離される因子と痒みとの関係ならびに好塩基球活性化に関して検討していく予定である。

E . 結論

健常皮膚ではほとんど認められない好塩基球のアトピー性皮膚炎皮膚で増加が難治性の痒みの発生に関与していることが示唆される。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) **Andoh T.**, Yoshida T., Lee J.B., Kuraishi Y. Cathepsin E induces itch-related response through the production of endothelin-1 in mice. Eur. J. Pharmacol. 686: 16-21, 2012.
- 2) **Andoh T.**, Takayama Y., Yamakoshi T., Lee J.B., Sano A., Shimizu T., Kuraishi Y. Involvement of serine protease and proteinase-activated receptor 2 in dermatophyte-associated itch in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 343: 91-96 (2012)
- 3) **安東嗣修**, 倉石 泰 : 温清飲による痒みの抑制機序 . phil 漢方 40: 26-28, 2012 .

2 . 学会発表

- 1) **安東嗣修**, 桑園 崇, 倉石泰 : マウスおける

ガストリン遊離ペプチド誘発の痒みへのマスト細胞の関与 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都 .

- 2) 吉田哲郎, **安東嗣修**, 倉石泰 : マウスにおいてカテプシン E がエンドセリン-1 を介して痒み関連反応を誘発する . 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都 .
- 3) 歌 大介, 後藤義一, **安東嗣修**, 倉石 泰, 井本敬二, 古江秀昌 : In vivo パッチクランプ記録法を用いた成熟ラット脊髄後角ニューロンにおける興奮性シナプス伝達 . 第 89 回日本生理学会大会 . 2012, 3, 29-31, 長野 .
- 4) **安東嗣修** : どうしても止めたい「かゆみ」。でも「かゆみ」ってどうやって起こるの? 平成 24 年度富山大学 富山駅前サテライト公開講座 . 2012, 5, 19, 富山 .
- 5) **Andoh T.**, Harada A., Kuraishi Y. Interleukin-31-induced pruritus: involvement of leukotriene B₄ released from epidermal keratinocytes in mice. 42nd Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, 2012, 9, 19-22, Venice, Italy.
- 6) 高山祐輔, **安東嗣修**, 倉石 泰 : Keratin 分解酵素 keratinase の proteinase-activated receptor-2 を介した痒み誘発機序 . 第 63 回日本薬理学会北部会, 2012, 9, 14, 新潟 .
- 7) **安東嗣修**, 倉石 泰 : ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 E6005 はマウスの痒み関連反応を抑制する 第 22 回国際痒みシンポジウム 2012, 10, 6, 東京 .
- 8) 佐々木淳, アディカリスバース, **安東嗣修**, 倉石泰 : マウス帯状疱疹性掻痒の薬理学的特徴 . 第 22 回国際痒みシンポジウム, 2012, 10, 6, 東京 .
- 9) **Andoh T.**, Kuraishi Y. Inhibitory effects of a phosphodiesterase 4 inhibitor (E6005) on itch-related behavior and cutaneous nerve activity in mice. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012, 10, 13-17, New Orleans, USA.

10) Uta D., **Andoh T.**, Imoto K., Furue H. In vivo puritic synaptic responses elicited by cutaneous 5-HT application in the superficial spinal dorsal horn of adult rats. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012, 10, 13-17, New Orleans, USA.

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

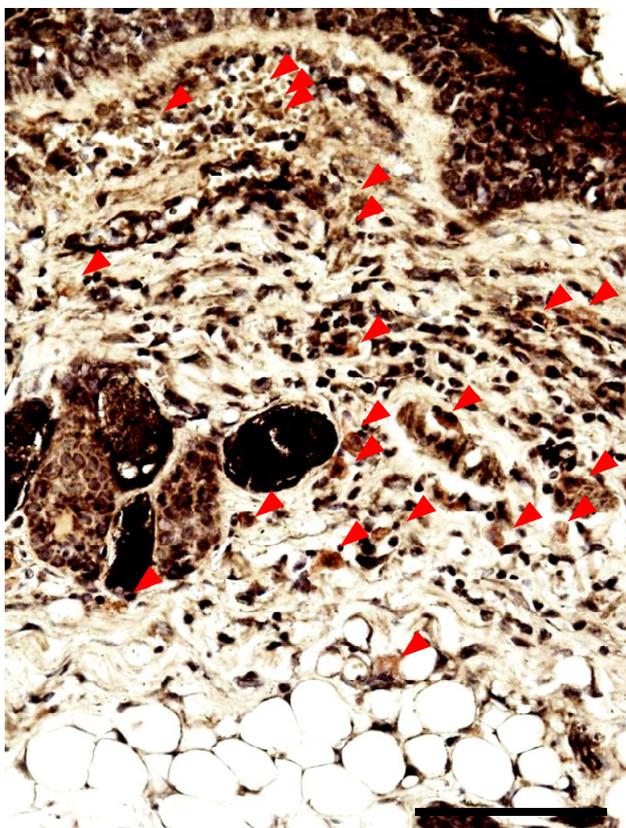


Fig. 1. 皮膚炎発症マウス皮膚における好塩基球
皮膚炎発症マウスの炎症部位における好塩基球
(矢頭)の分布。Scale bar: 100 μ m