

バリア機能破綻に起因するアトピー性皮膚炎の痒みのメカニズムの解明と制御 知覚神経と表皮ケラチノサイトの相互作用の観点から

研究分担者 高森 建二 (順天堂大学医学部附属浦安病院)

研究協力者 富永 光俊 (順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所)
鎌田 弥生 (順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所)

研究要旨

アトピー性皮膚炎の難治性の痒みは、不眠や就労障害の原因となり、患者のquality of lifeを著しく障害する。AD病変部では神経反発因子の発現減少に伴う表皮内神経の稠密化により、起痒刺激の受容増加が認められ、抗ヒスタミン薬が奏功しない難治性の痒みを発症する。本研究は、神経反発因子セマフォリン3A (Sema3A) に着眼し、正常ヒト表皮角化細胞における内在性Sema3Aの発現制御機構の解明を目指した。その結果、内在性Sema3Aの発現調節に重要な役割を果たす転写因子として、レチノイド関連オープン受容体 (ROR) が同定された。そこで、ROR 作動薬であるSR1078やコレステロール硫酸などを含む条件で正常ヒト表皮角化細胞を培養した結果、いずれのROR 作動薬でもSema3A発現が促進されることが明らかとなった。一方、ROR 逆作動薬SR1001は有意にSema3A発現を抑制した。したがって、ROR を標的とした内在性Sema3Aの発現促進剤はADの新規止痒薬に応用できる可能性が示唆された。

A . 研究目的

既存治療が無効な難治性の痒みは、患者のQOL (quality of life) を低下させる深刻な問題である。皮膚バリア機能の破綻を伴うアトピー性皮膚炎 (AD) 患者では表皮内神経線維が稠密化し、抗ヒスタミン薬が奏功しない難治性の痒みを発症する。バリア機能の破綻は神経線維の伸長と退縮に関わる分子の発現バランスを乱すが、その発現制御機構は全く不明である。本研究は痒みの難治化の鍵となる神経反発因子セマフォリン3A (Sema3A) に着眼し、表皮角化細胞におけるSema3Aの発現制御機構を分子レベルで解明することで、内在性Sema3Aの発現を誘導するADの新規止痒薬の開発を目指した。

B . 研究方法

ヒトSema3A遺伝子の発現制御に関わる領域 (以後、プロモーター領域とする) をクローニング後、PCR法で5'末端欠失変異体を作成し、ルシフェラーゼ発現ベクターに挿入して、簡易的にSema3A転写量を評価可能なプロモーターアッセイ系を構築した。構築したベクターは正常ヒト表皮角化細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイで遺伝子発現に重要な領域を同定した。転写因子結合配列は、塩基配列解析後にBIODASE P-Match publicで検索した。Sema3A遺伝子発現量は定量的RT-PCR法で解析した。

C . 研究結果

ヒトSema3Aプロモーター領域を5'末端側から数百塩基ずつ欠失させた変異体のルシフェラーゼアッセイにより、Sema3A発現の促進に関わるPositive領域を同定した。データベース検索の結果、Positive領域 (-134~-44) にはレチノイド関連オープン受容体 (ROR)、Sox、GA結合タンパク質 (GABP) 等の転写因子結合配列が存在した。候補転写因子の遺伝子発現をRNA干渉 (siRNA) によって抑制した結果、いずれの候補転写因子の発現を抑制した際にも、Sema3A発現が50%以下まで減少した。さらに、候補転写因子の結合配列を部位特異的に欠失させた変異体を用いてプロモーターアッセイを行ったところ、ROR結合部位を欠失させた変異体でSema3Aの転写活性が劇的に減少した。そこで、ROR作動薬であるSR1078やコレステロール硫酸を含む条件で正常ヒト表皮角化細胞を培養した結果、いずれのROR作動薬でも有意にSema3A発現が促進された。一方、ROR逆作動薬SR1001は有意にSema3A発現を抑制した。

D . 考察・結論

内在性Sema3Aの発現に重要な役割を果たす転写因子としてRORを同定した。このことから、RORを標的とした内在性Sema3Aの発現促進剤は新規止痒薬の開発に繋がることが示唆された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

(英文原著、総説)

Kamo A, Negi O, Tenggara S, Kamata Y, Noguchi A, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Histamine H4 Receptor Antagonists Ineffective against Itch and Skin Inflammation in Atopic Dermatitis Mouse Model. *J Invest Dermatol*. 2013, in press.

Tominaga M, Takamori K. An update on peripheral mechanisms and treatments of itch. *Biol Pharm Bull.* , 36(8): 1241-7, 2013.

Kamo A, Tominaga M, Taneda K, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin inhibits the increase in intraepidermal nerve density in the acetone-treated dry-skin mouse model. *Clin Exp Dermatol*. 38(6): 665-8, 2013.

Akiyama T, Tominaga M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E. Roles of glutamate, substance P, and gastrin-releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and nonhistaminergic itch. *Pain*, 2013, in press.

Shibata A, Sugiura K, Kimura U, Takamori K, Akiyama M. A novel ATP2C1 early truncation mutation suggests haploinsufficiency as a pathogenic mechanism in a patient with Hailey-Hailey disease. *Acta Derm Venereol.*, 93(6): 719-20, 2013.

Furue M, Ebata T, Ikoma A, Takeuchi S, Kataoka Y, Takamori K, Satoh T, Saeki H, Augustin M, Reich A, Szepietowski J, Fleischer A, Blome C, Phan NQ, Weisshaar E, Yosipovitch G, Ständer S. Verbalizing extremes of the visual analogue scale for pruritus: a consensus statement. *Acta Derm Venereol*. 93(2): 214-5, 2013.

Yanagida M, Kawasaki M, Fujishiro M, Miura M, Ikeda K, Nozawa K, Kaneko H, Morimoto S, Takasaki Y, Ogawa H, Takamori K, Sekigawa I. Serum proteome analysis in patients with rheumatoid arthritis receiving therapy with tocilizumab: an anti-interleukin-6 receptor antibody. *Biomed Res*

Int. 2013: 607137, 2013.

Araki Y, Nonaka D, Hamamura K, Yanagida M, Ishikawa H, Banzai M, Maruyama M, Endo S, Tajima A, Lee LJ, Nojima M, Takamori K, Yoshida K, Takeda S, Tanaka K. Clinical peptidomic analysis by a one-step direct transfer technology: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in female reproductive system disorders. *J Obstet Gynaecol Res.*, 39(10): 1440-8, 2013.

Nakayama H, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K. GSL-enriched membrane microdomains in innate immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* , 61(3): 217-28, 2013.

Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Yamaguchi A, Ikeda K, Morimoto S, Iwabuchi K, Yanagida M, Ichinose S, Morioka M, Ogawa H, Takamori K, Takasaki Y, Sekigawa I. Inhibition of connective tissue growth factor ameliorates disease in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 65(6):1477-86, 2013.

Yamaguchi A, Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Suzuki F, Takamori K, Ogawa H, Takasaki Y, Sekigawa I. CC motif chemokine ligand 13 is associated with rheumatoid arthritis pathogenesis. *Mod Rheumatol.* , 23(5): 856-63, 2013.

(和文原著、総説、著書)

高森建二. 全身性皮膚痒症. *JIM*. Vol.23, No.2 , 132-134 , 2013.

高森建二, 富永光俊. アトピー性皮膚炎の痒みのメカニズムと新たなる治療戦略. *臨床免疫・アレルギー科*, 59(2), 191-197, 2013.

高森建二. STIとかゆみ. *日本性感染症学会誌*, Vol.24, No.1, 28-34, 2013.

根木 治, 須賀 康, 高森建二, 高原久嗣, 林野久紀, 鈴木敏江, 矢萩理恵. 透析患者のかゆみに対するツバキ油スプレーの有用性および安全性の検討. *皮膚の科学*, Vol.11, No 6, 538-547, 2012.

富永光俊, 高森建二. バリア機能の痒み. *アレルギーの臨床*, No440, 39-43, 2013.

根木 治, 富永光俊, 高森建二. かゆみとスキンケア. Monthly Book Derma. No. 210, 23-30, 2013.

富永光俊, 加茂敦子, 高森建二. 老人性乾皮症の痒み発生機序の解明と治療法開発. 加齢皮膚医学セミナー. Vol. 8, 23-28, 2013.

富永光俊, 高森建二. バリア機能と痒み. アレルギーの臨床. Vol. 33, No. 2, 39-43, 2013.

大泉亜美, 春名邦隆, 寒竹正人, 大日方薫, 高森建二, 須賀 康. 単純型先天性表皮水疱症の2例の臨床経験. 日本小児皮膚科学会雑誌Vol.32, No.1, 35-40, 2013.

木下綾子, 高森建二, 須賀 康. 順天堂大学浦安病院を受診した新規HIV感染者における皮膚症状の検討. 日本性感染症学会誌, Vol. 24, No.1, 140-147, 2013.

木村有太子, 竹内かおり, 木下綾子, 高森建二, 比留間政太郎, 須賀 康. 爪白癬に対するロングパルスNd:YAGレーザー治療. 日本美容皮膚科学会雑誌Vol.23 No.4, 280-288, 25, Dec, 2013

2. 学会発表 (国際学会)

Takamori K: Mechanism of itch in Atopic Dermatitis, The first Annual Scientific Meeting of Cambodia Dermatological Society (1st ASMCDS), Cambodia, Jan11, 2013

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori K. Excimer lamp induces directly cutaneous nerve degeneration in animal models for pruritus. 22nd Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), Istanbul, Turkey, October 2-6, 2013.

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Noguchi A, Kimura U, Osamu N, Taneda K, Takamori K. Anti-pruritic effects of Neurotrophin in NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013.

Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Kamo A, Takamori K. Transcriptional regulation of human semaphorin 3A gene in normal epidermal keratinocytes: implication of application to intractable itch in

atopic dermatitis. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013.

Tominaga M, Kamo A, Osamu N, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Takamori K. Histamine H4 receptor antagonists ineffective against itch and skin inflammation in atopic dermatitis mouse model. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori K. Excimer lamp irradiation induces reduction of intraepidermal nerve fibre: implications for possible application to intractable pruritus International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

Kamata Y, Tominaga M, Kamo A, Takamori K. Molecular mechanisms of Semaphorin 3A gene regulation in human epidermal keratinocytes. International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

Tominaga M, Kamo A, Negi O, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Takamori K. Histamine H4 receptor antagonists exhibit insufficient anti-pruritic and anti-inflammatory effects on mite extract ointment-induced mouse model of atopic dermatitis. International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

(国内学会)

高森建二. 透析に伴うかゆみをコントロールする, 第4回沖縄県腎不全看護研究会 with かゆみフォーラム, 沖縄, 2013年2月.

高森建二. 透析そう痒症の病態と治療, 滋賀県皮膚科医会学術講演会, 草津, 2013年4月.

高森建二. かゆみのメカニズムと制御 保湿剤の有効性, 第112回日本皮膚科学会総会教育講演30, 横浜, 2013年6月.

高森建二. 皮膚研究の最前線~皮膚のバリア機能の解明は皮膚所見の見方をどう変えたか~, 日本透析学会, 福岡, 2013年6月.

高森建二. 透析そ痒症はなぜ痒い, 透析患者のかゆみを考える夕べ, 山形, 2013年7月.

高森建二. 透析のかゆみを科学する メカニズムと対策, 練馬区皮膚科医会講演会, 東京, 2013年7月.

高森建二. 小児アトピー性皮膚炎における積極的な治療介入の有用性, 第37回日本小児皮膚科学会学術大会モーニングセミナー, 東京, 2013年7月.

高森建二. かゆみの病態と治療の最近の話題 特にアトピー性皮膚炎のかゆみのメカニズムと対策について, 第63回関東耳鼻咽喉科アレルギー懇話会, 東京, 2013年9月.

高森建二. 透析そ痒症はなぜ痒い メカニズムと対策, 青森レミッチ講演会, 青森, 2013年9月.

高森建二. かゆみの病態と治療の最近の話題 特にアトピー性皮膚炎のかゆみのメカニズムと対策について, 日本臓器製薬東京第一・横浜支店社内研修会, 千代田区, 2013年10月.

富永光俊. かゆみと皮膚 セマフォリン他について, 第112回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013年6月.

加茂敦子, 富永光俊, 鎌田弥生, 高森建二. 乾燥皮膚で誘発される表皮内神経の増生に対する保湿性オリゴマーエステルD/DCの影響. 第112回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013年6月.

加茂敦子, 富永光俊, 鎌田弥生, 野口篤, 木村有太子, 根木 治, 種田研一, 高森建二. 皮膚の乾燥を伴う痒みに対するノイロトロピンの有効性の検討. 第9回加齢皮膚医学研究会, 山口, 2013年7月.

飯泉恭一, 富永光俊, 川崎広明, 重永綾子, 加茂敦子, 鎌田弥生, 高森建二, 山倉文幸. 6-ニトロトリプトファンはアトピー性皮膚炎患者の血漿バイオマーカーとなり得るか? 第35回日本トリプトファン研究会, 京都, 2013年9月.

鎌田弥生, 富永光俊, 梅原芳恵, 加茂敦子, 高森建二. 正常ヒト表皮角化細胞におけるセマフォリン3Aの発現制御機構. 第23回国際かゆみシンポジウム, 大阪, 2013年10月.

富永光俊. アトピー性皮膚炎 かゆみのメカニズム. 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会ラUNCHONセミナー, 金沢, 2013年12月.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

セマフォリン3Aの発現調節方法(平成25年5月2日出願)特願2013-097100, 鎌田弥生, 富永光俊, 高森建二(順天堂大学)

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし