

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 自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）は、皮膚炎と自発的な痒み反応が認められる。これまでに本マウスモデルの炎症部位皮膚には、多数の好塩基球の浸潤が観察されることを明らかにしてきた。本研究では、痒み反応への好塩基球の関与を検討した。健常マウスの皮膚に比べ、皮膚炎マウスの皮膚ではマスト細胞数は約3倍の増加に対し、好塩基球は60倍も増加していた。また、皮膚炎マウスへの好塩基球除去抗体の処置により皮膚内好塩基球の減少と共に、自発的痒み反応が抑制された。これらのことから、皮膚炎マウスの自発的痒み反応に好塩基球が関与していることが示唆される。好塩基球より遊離される因子の1つにセリンプロテアーゼの一つである mMCP-11 がある。健常マウスへの mMCP-11 の皮内注射により痒み反応は誘発され、熱処理し不活化した mMCP-11 では、痒み反応は認められなかった。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おり、好塩基球から遊離される mMCP-11 が起痒因子の一つであることが示唆される。

A．研究目的

アトピー性皮膚炎の痒みは、非常に耐え難く、QOLの低下や、社会生産性の低下に繋がっている。また、痒みによる搔破行動により、皮膚炎の更なる悪化に加え、皮膚炎治療を妨げているのも事実である。このようにアトピー性皮膚炎の痒みの制御は臨床的に非常に重要な位置を占めている。しかし、痒みの第一選択としての H₁ 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。

アトピー性皮膚炎の皮膚内には、様々な炎症性細胞の浸潤が認められており、多くの研究がなされている。最近、あまり機能がよく知られていなかった好塩基球がアレルギー疾患の病態に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。これまで、我々は、アトピー性皮膚炎マウスの皮膚炎部位で好塩基球が増加していることを明らかにしてきた。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 NC 系マウスを用いた。NC マウスは、NC マウスは、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した場合は健常状態を維持するが、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な痒み反応（掻き動作）を示すようになる。

2) 実験試薬

好塩基球除去抗体として Ba103 抗体を、コントロール抗体として rat IgG2b κ を用いた。これら抗体は尾静脈注射した。mMCP-11 (R&D 社) は、マウス吻側背部に注射した。

3) 行動実験

行動撮影ケージ (13×9×35cm/セル) にマウスを1時間放置し、馴化した。その後、無人環境下にデジタル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。mMCP-11 を皮内注射した実験では、注射部位及びその近傍の後肢による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

マウス皮膚凍結切片を作製し、1 次抗体として TUG8 抗体（好塩基球検出抗体）及び mMCP-7 抗体（マスト細胞検出用抗体）を用い、2 次抗体として蛍光標識した 2 次抗体を用いて染色した。

C. 研究結果

1) 皮膚炎マウスにおけるマスト細胞と好塩基球

マスト細胞数は、健常マウス皮膚に比べ、皮膚炎マウス皮膚では、約 3 倍増加していた。好塩基球に関しては、健常マウス皮膚では、ほとんど観察されなかったが、皮膚炎マウス皮膚では明らかに観察された。特に、皮膚炎マウス皮膚では、健常マウス皮膚と比べ、皮膚内の好塩基球数が約 60 倍増加していた（図 1）。

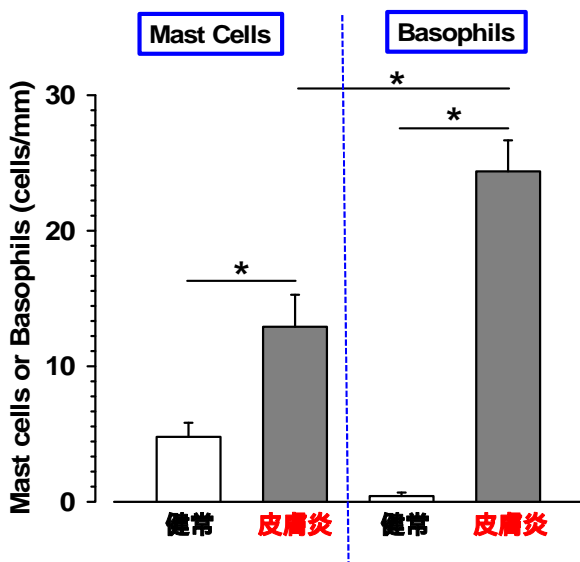


図 1 健常マウス及び皮膚炎マウス皮膚でのマスト細胞並びに好塩基球数

2) 皮膚炎マウスの自発的掻き動作に対する好塩基球除去抗体 Ba103 の効果

皮膚炎マウスへの好塩基球除去抗体の投与により、投与後 2 日目より自発的掻き動作が減少していた。除去抗体投与後 4 日目に皮膚免疫染色を行い、好塩基球数を数えたところ、コントロール抗体投与マウ

スに比べ除去抗体投与マウスで有意に減少していた。
3) 健常マウスにおける mMCP-11 皮内注射による掻き動作

健常マウス吻側背部への mMCP-11 の皮内注射は、溶媒注射より明らかに後肢による注射部位及びその近傍への掻き動作回数の増加を認めた。一方、熱処理した mMCP-11 の皮内注射による掻き動作回数は、溶媒注射群と同程度であった。

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の自発的掻き動作反応に、好塩基球が重要な役割を担っていることを明らかにした。好塩基球からは、マスト細胞と同様に、痒み因子の一つとされるヒスタミンが遊離されることが知られている。しかし、本マウスモデルの自発的掻き動作反応には、H1 ヒスタミン受容体拮抗薬が無効であり、更に本マウスと同系の健常マウスにヒスタミンを皮内注射しても痒み反応は誘発されない。これらのことは、本皮膚炎モデルの痒み反応へのヒスタミンの関与は小さいと考えられる。

これまでに本皮膚炎マウスの皮膚ではセリンプロテアーゼ活性が増加していること、またセリンプロテアーゼ阻害薬により痒み反応が抑制されることを報告してきた。そこで、好塩基球より産生遊離される因子の一つでセリンプロテアーゼである mMCP-11 に着目した。mMCP-11 の皮内注射により痒み反応が認められたこと、また、熱処理した mMCP-11 では痒み反応は認められなかったことから mMCP-11 の酵素活性が痒みの発生に重要であることを示唆する。

E. 結論

アトピー様皮膚炎マウスでは、好塩基球-mMCP-11 系が痒みの発生重要な役割を担っていることが示唆される。したがって、プロテアーゼ阻害薬が痒みに抑制に有用であるかもしれない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamakoshi T., Andoh T., Makino T., Kuraishi Y., Shimizu T. Clinical and histopathological features of

- itch in alopecia areata patients. *Acta Derma. Venereol.* 93,: 575-576 (2013)
- 2) Inami Y, Andoh T, Kuraishi Y. Prevention of topical surfactant-induced itch-related responses by chlorogenic Acid through the inhibition of increased histamine production in the epidermis. *J. Pharmacol. Sci.* 121:242-5 (2013).
 - 3) Yamakoshi T., Andoh T., Makino T., Kuraishi Y., Shimizu T. Clinical and histopathological features of itch in alopecia areata patients. *Acta Derma. Venereol.* 93,: 575-576 (2013)
 - 4) Sasaki A., Adhikari S., Andoh T., Kuraishi Y. BB2 receptor-expressing spinal neurons transmit herpes-associated itch by BB2 receptor-independent signaling. *Neuroreport* 24:652-656 (2013)
 - 5) Andoh T., Gotoh Y., Kuraishi Y. Milnacipran inhibits itch-related responses in mice through the enhancement of noradrenergic transmission in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 123: 199-202 (2013)
 - 6) 安東嗣修：内因性起痒物質と発痛物質．**ペインクリニック** 34: 467-473 (2013).
 - 7) 井浪義博，安東嗣修，佐々木淳，倉石泰：界面活性剤によって誘発される痒みとクロロゲン酸の鎮痒効果．**アレルギーの臨床** 446:754-756 (2013)
2. 学会発表
- 1) 安東嗣修，高山祐輔，倉石 泰：皮膚糸状菌抽出物誘発搔痒反応へのアラキドン酸代謝産物 leukotriene B₄ の関与．第 86 回日本薬理学会年会，2013，3，21-23，福岡
 - 2) Bahar MA, Andoh T, Kuraishi Y. Mechanisms of Breast Cancer-Induced Itch. The 3rd International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences, 2013, 6, 18-19, Yogyakarta, Indonesia
 - 3) 歌 大介，安東嗣修，倉石泰，井本敬二，古江秀昌：痒み求心性入力を受けるラット脊髄後角細胞の in vivo 発火パターン解析．第 36 回日本神経科学大会，2013，6，20-23，京都
 - 4) 安東嗣修：動物を用いた痒み研究と和漢薬．第 18 回和漢医薬学総合研究所夏季セミナー，2013，8，22，富山
 - 5) 井浪義博，安東嗣修，佐々木淳，倉石泰：アニオン性界面活性剤ラウリン酸ナトリウム誘発の急性痒み反応に対するクロロゲン酸の効果．第 30 回和漢医薬学会学術大会，2013，8，31-9，1，金沢
 - 6) 高橋遼平，安東嗣修，宮本隆行，倉石 泰：乾燥性皮膚搔痒症マウスの表皮ケラチノサイトにおける choline acetyltransferase の発現誘導．第 64 回日本薬理学会北部会，2013，9，13，旭川
 - 7) 真野陽介，安東嗣修，二宮（小畑）一茂，烏山一，倉石 泰：蚊アレルギーの痒みにおける好塩基球の関与とプロテアーゼを介した痒みの発生機序．第 64 回日本薬理学会北部会，2013，9，13，旭川
 - 8) Andoh T, Suzuki K, Kuraishi Y. Pharmacological characterization of a surgically induced mouse model of cholestatic pruritus. 7th World Congress on Itch. 2013, 9, 21-23, Boston, USA.
 - 9) Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y. Involvement of keratinocyte-produced histamine in acute and chronic itch-related behaviors induced by topical application of anionic surfactants in mice. 7th World Congress on Itch. 2013, 9, 21-23, Boston, USA.
 - 10) 安東嗣修，本間あずさ，近藤詠子，倉石 泰：マウスにおける眼アレルギーによる痒み反応への mast 細胞由来セリンプロテアーゼの関与．第 23 回国際痒みシンポジウム，2013，10，26，大阪．
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
登録：(発明の名称)アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用
(発明者)安東嗣修，倉石 泰，中野 祐
(出願人)国立大学法人富山大学
(登録番号)5297389(平 25.6.21)

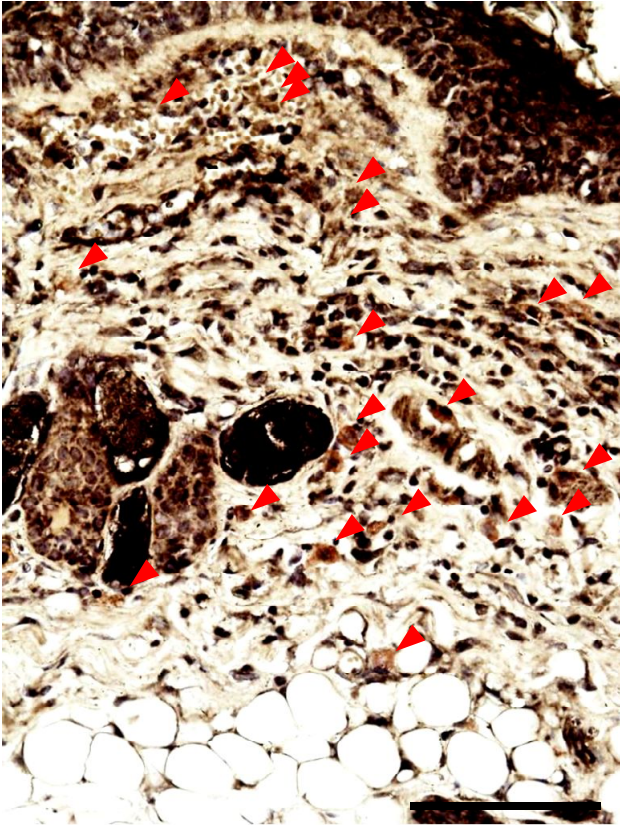


Fig. 1. 皮膚炎発症マウス皮膚における好塩基球
皮膚炎発症マウスの炎症部位における好塩基球（矢
頭）の分布。Scale bar: 100 μ m