

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 辻井 謙一郎 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

中林 数馬 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 これまでに自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）の自発的な痒み反応に好塩基球、セリンプロテアーゼ及びプロテアーゼ活性化受容体 2（PAR₂）が関与することを見出してきた。セリンプロテアーゼの一つである kallikrein 5（KLK5）は、角質の剥離に寄与しており皮膚バリア破壊への関与が報告されている。そこで、本研究では、本マウスモデルの痒み反応への KLK5 の関与について検討した。健常マウスへの KLK5 の皮内注射により痒み反応が認められ、PAR₂拮抗薬で抑制された。健常 NC マウスと比べ、皮膚炎の発症した NC マウス皮膚において、KLK5 mRNA の発現及び酵素活性の増加が認められた。一方、内因性 KLK5 の阻害因子 Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor（LEKTI）の発現は、皮膚炎マウス皮膚で減少していた。KLK5 は、主にケラチノサイトに分布し、一部、好塩基球にも発現している可能性が免疫組織化学染色により見いだされた。以上の結果から、本病態の痒み反応に KLK5 一部関与することが示唆される。

A．研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性痒痒性皮膚疾患の 1 つであり、その痒みの発生機序は未だ解明されていない。これまで、我々は、アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応に好塩基球が関与すること、プロテアーゼ活性化受容体 2（PAR₂）や好塩基球から遊離されるセリンプロテアーゼ mMCP-11 が関与していることを見出してきた。アトピー性皮膚炎の症状の一つに皮膚バリア破壊が認められるが、その機序の 1 つにセリンプロテアーゼの kallikrein 5（KLK5）の関与が知られており、さらに KLK5 は PAR₂を活性化することも知られている。そこで、本研究では、本マウスモデルの痒み反応への KLK5 の関与について検討し

た。

B．研究方法

実験には、雄性 NC 系マウス（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）を用いた。

行動実験は、無人環境下にマウスの行動をビデオカメラで撮影し、ビデオの再生により後肢による掻き動作回数をカウントした。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。

皮膚内の KLK5 mRNA の発現はリアルタイム PCR 法により、KLK5 の発現分布は免疫染色法により解析した。Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI) の発現は、ウエスタンブロットイングにより解析した。また、皮膚における KLK5 の酵素活性は、特異的基質である、Bz-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilide を用い、切断され遊離した p-nitroanilide を 420nm の吸光度を測定することで評価した。

C . 研究結果

1) 健常 NC マウスへの KLK5 皮内注射による掻き動作と PAR2 拮抗薬の効果

健常 NC マウスへの KLK5 皮内注射により用量依存的に後肢による注射部位への掻き動作が観察された。この痒み反応は、KLK5 皮内注射後の最初の 10 分間をピークとして起こった。KLK5 誘発掻き動作は、PAR₂ 拮抗薬 FSLLRY-NH₂ により抑制された。

2) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 mRNA の発現と酵素活性

皮膚炎マウス皮膚において、健常マウス皮膚に比べ KLK5 mRNA の発現は有意に増加し、また、酵素活性も増加していた。KLK5 の酵素活性は、セリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩で抑制された。

3) 皮膚炎マウス皮膚における LEKTI の発現

皮膚炎マウス皮膚において、健常マウス皮膚に比べ LEKTI の発現は減少していた。

4) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 の発現分布

皮膚炎マウス皮膚において、KLK5 の免疫活性は、主に表皮ケラチノサイトに認められ、さらに、皮膚内浸潤細胞にも求められた。KLK5 免疫活性細胞の一部が TUG8 免疫活性を示す好塩基球であった。

D . 考察

本研究では、KLK5 の皮内注射により痒み反応が誘発され、PAR₂ 拮抗薬により抑制された。また、皮膚炎マウスの皮膚で KLK5 mRNA の発現の増加並びに酵素活性の増加が認められた。KLK5 を選択的に阻害する薬物はないが、KLK5 の活性は、皮膚炎マウスの自発的な痒み反応を抑制する用量のセリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩で抑制された。これらの知見を勘案すると、皮膚炎マウスの自発的な痒み反応に KLK5 が関与することが示唆される。

皮膚における KLK5 の活性化の詳細は不明であるが、KLK5 の内因性阻害因子の LEKTI の発現の減少が一部関与している可能性が示唆される。

KLK5 の発現は、表皮に主に認められた。KLK5 の作用の 1 つとして PAR₂ を活性化することが知られている。PAR₂ は主にケラチノサイトに発現しており、KLK5 がオートクラインおよびパラクライン的にケラチノサイト上の PAR₂ に作用して leukotriene B4 などの痒み因子を産生遊離して痒みを発生していることが示唆される。また、PAR₂ は、一次感覚神経にも発現しており、皮膚炎マウス皮膚では一次感覚神経が表皮内まで伸展していることからケラチノサイトから遊離された KLK5 の一部は直接一次感覚神経に作用する可能性も考えられる。興味あることに、KLK5 は皮膚内浸潤細胞にも発現しており、今後詳細な解析が必要であるが、KLK5 免疫活性を示す細胞の一つが好塩基球である可能性を見出したことから、好塩基球から産生遊離される KLK5 も痒みの発生に関与しているかもしれない。

E . 結論

アトピー様皮膚炎マウスの自発的な痒み反応には、主にケラチノサイト（一部好塩基球）から産生される KLK5 が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, Kuraishi Y. Topical E6005, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates spontaneous itch-related responses in mice with chronic atopy-like dermatitis. *Exp Dermatol.* 23: 359-361, 2014.
- 2) Andoh T, Takayama Y, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B4 in dermatophyte-related itch in mice. *Pharmacol Rep.* 66: 699-703 (2014).
- 3) Inami Y, Sasaki A, Andoh T, Kuraishi Y. Surfactant-induced chronic pruritus: Role of L-histidine decarboxylase expression and histamine production in epidermis. *Acta Derm Venereol.* 94: 645-650 (2014).
- 4) Andoh T, Kuraishi Y. Antipruritic mechanisms of topical E6005, a phosphodiesterase 4 inhibitor: Inhibition of responses to proteinase-activated receptor 2 stimulation mediated by increase in intracellular cyclic AMP. *J Dermatol Sci.* 76: 206-213 (2014).
- 5) 安東嗣修 . かゆみ解析の動物モデル . *MB. Derma .* 214 : 6-11 (2014)

2.学会発表

- 1) Shimizu K, Andoh T, Yoshihisa Y, Shimizu T. The histamine release from epidermal keratinocytes is involved in α -melanocyte-stimulating hormone-induced itching in mice. The 44th Annual ESDR (European Society for Dermatological Research) meeting; 2014 Sep 10-13; Copenhagen, Denmark.
- 2) Yoshihisa Y, Andoh T, Matsunaga K,

Shimizu T. Efficacy of astaxanthin in a murine model of atopic dermatitis. The 44th Annual ESDR (European Society for Dermatological Research) meeting; 2014 Sep 10-13; Copenhagen, Denmark.

- 3) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. Firing pattern of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan ; 2014 Mar 16-18 ; Kagoshima.
- 4) Andoh T. Proteases and itch. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21 ; Sendai .
- 5) Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y. Involvement of epidermal histamine in itch-associated responses induced by repeated sodium dodecyl sulfate in murine skin. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21 ; Sendai .
- 6) 井浪義博, 安東嗣修, 倉石 泰 . アニオン性界面活性剤誘発の急性そう痒には水溶液のアルカリ性よりも皮膚表面 pH のアルカリ化が関与 . 日本薬学会第 134 年会 . 2014 Mar 27-30 ; 熊本 .
- 7) 安東嗣修, 高橋遼平, 倉石 泰 . マウスにおける乾皮症の痒みへの proteinase-activated receptor 2 の関与 . 第 10 回加齢皮膚医学研究会; 2014 Sep 6-7; 富山 .
- 8) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. Electrophysiological analysis of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord. The 37rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society; 2014 Sep

- 11-13; Kanagawa.
- 2014 Dec 12-14; Osaka.
- 9) 中村まり,安東嗣修,佐々木 淳,倉石 泰.
マウスにおけるリゾホスファチジン酸の痒み関連動作誘発作用へのマスト細胞の関与.
第 65 回日本薬理学会北部会; 2014 Sep 26-27; 福島.
- 10) Andoh T, Tsujii, Kuraishi Y. Involvement of kallikrein 5 in spontaneous itch-related responses in mice with atopy-like dermatitis. The 24th International Symposium of Itch; 2014 Oct 18; Tokyo.
- 11) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. In vivo spinal excitatory synaptic responses and scratching behaviors evoked by cutaneous 5-HT application. The 24th International Symposium of Itch; 2014 Oct 18; Tokyo.
- 12) 安東嗣修.痒みの発生機序の最近の知見と鍼治療.(公社)全日本鍼灸学会 第 32 回中部支部学術集会; 2014 Nov 9; 富山.
- 13) 白鳥(林)美穂,長谷川あゆみ,豊永穂奈美,安東嗣修,倉石 泰,井上和秀,津田 誠.
痒み発症における一次求心性神経 P2X3 受容体の関与.第 67 回日本薬理学会西南部会; 2014 Nov 23; 北九州.
- 14) Yoshihisa Y, Andoh T, Matsunaga K, Shimizu T. Therapeutic effect of astaxanthin on atopy-like dermatitis in NC/Nga mice. The 39th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology; 2014 Dec 12-14; Osaka.
- 15) Shimizu K, Andoh T, Yoshihisa Y, Shimizu T. The histamine release from epidermal keratinocytes is involved in α -melanocyte-stimulating hormone-induced itching in mice. The 39th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology;
- H.知的財産権の出願・登録状況
特許出願
(発明の名称)
スルホニルを有するフィトスフィンゴシン誘導體
(発明者)
安東嗣修、矢倉隆之、南部寿則、藤原朋也、金田英亨
(出願人)
国立大学法人富山大学
(出願番号)
特願 2014-225684 (2014.11.6)