

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 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
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
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
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）を用い、自発的な痒み反応への好塩基球の関与と痒み発生機序に関して検討した。皮膚炎マウスの皮膚では、好塩基球数の増加が観察され、さらに、好塩基球除去抗体 Ba103 の投与により、皮膚炎マウスの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搔き動作に好塩基球が関与することが明らかとなった。好塩基球からは、セリンプロテアーゼの mMCP-11 が遊離されることが知られている。mMCP-11 のマウスへの皮内注射に痒み反応が生じ、この行動はプロテアーゼ活性化受容体 2（PAR₂）の中和抗体により抑制された。また、皮膚炎マウスでは、表皮の剥離に関与しているセリンプロテアーゼ kallikrein 5（KLK5）の発現と酵素活性が増加していた。KLK5 のマウスへの皮内注射により痒み反応が誘発され、さらに、PAR₂ 拮抗薬で抑制された。KLK5 の免疫活性は、表皮ケラチノサイトに加え、好塩基球にも認められた。皮膚炎マウス皮膚において、内因性 KLK5 の阻害因子 Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI)の発現が減少していた。以上の結果より、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応には、好塩基球が一部関与しており、好塩基球より遊離されるセリンプロテアーゼ（mMCP-11 など）が PAR₂ を介して痒み反応を起こしていることが示唆される。

A．研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性の癢痒（「痒み」）を伴う慢性癢痒皮膚疾患である。本疾患における痒みには、従来痒みの第一選択薬である抗ヒスタミン薬が無効である場合が多く、有用な治療薬が無い為そのコントロールは困難を極めている。

新規鎮痒薬の開発や治療戦略を立てる上で、アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序を理解する必要があるが、未だ、その発生機序の詳細は明らかに

されていない。

ところで、近年、好塩基球が様々なアレルギー疾患の発生に関与していること、また、アトピー性皮膚炎患者皮膚で増加していることが報告されてきた。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と好塩基球を介した痒みの発生機序に関して、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルを用いて検討した。

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全状態を維持する。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) 行動実験

マウスを行動撮影ケージ (13×9×40 cm/セル) に少なくとも 1 時間放置し、馴化した。その後、無人環境下に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、後肢による全身或いは一部の実験では吻側背部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。

3) 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) mMCP-7 抗体 (マスト細胞検出用抗体) 及び KLK5 抗体を用い、2 次抗体として蛍光標識した抗体を用いて染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光シグナルを観察した。

4) リアルタイム PCR

除毛したマウス皮膚より TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出し、DNase I 処理を行った。この total RNA を用い、KLK5 に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。

5) ウエスタンブロッティング

除毛した吻側背部皮膚よりタンパク質を抽出し、抗 Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI) 抗体を用い、ウエスタンブロッティング

を行った。

6) KLK5 の活性

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) 皮膚炎マウス皮膚におけるマスト細胞及び好塩基球数

皮膚炎マウス皮膚では、健全マウス皮膚と比べ、マスト細胞は約 3 倍、好塩基球は約 60 倍増加していた。

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

Ba103 及びコントロール抗体の尾静脈単回注射により、皮膚炎マウスの自発的掻き動作が減少した。Ba103 抗体処置マウス皮膚では、マスト細胞数に影響することなく好塩基球数を減少していた。

3) 健全マウスへの mMCP-11 皮内注射による掻き動作

予め除毛しておいた健全マウスへ mMCP-11 を皮内注射すると掻き動作が惹起され、熱処理した mMCP-11 の皮内注射では掻き動作は溶媒注射群と同程度であった。また、mMCP-11 誘発痒み反応は、プロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR2) の中和抗体の処置により抑制された。

4) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 mRNA の発現と酵素活性

KLK5mRNA の発現は、皮膚炎マウス皮膚において、健全マウス皮膚に比べ有意に増加していた。また、皮膚炎マウスの皮膚において、KLK5 の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。

5) 皮膚炎マウス皮膚における LEKTI の発現

LEKTI 発現は、皮膚炎マウス皮膚において、健康マウス皮膚に比べ減少していた。

6) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 の発現分布

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。真皮に認められた 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

自然発症アトピー性皮膚炎マウスでは、健康マウスと比べ、皮膚でのマスト細胞数の増加に加え、好塩基球も増加していた。皮膚炎マウス皮膚での好塩基球数は、健康マウスの皮膚と比べ 60 倍多かった。さらに、皮膚炎マウスへの好塩基球除去抗体の処置により皮膚でのマスト細胞数に影響することなく、好塩基球数を減少させ、痒み反応も減少させた。これらの結果より、皮膚炎マウスの痒み反応に好塩基球が関与することが示唆される。

好塩基球からは、IL-4、IL-13 等のサイトカイン、ヒスタミン、mMCP-11 等のプロテアーゼ等が産生遊離される。今回使用したマウスは、ヒスタミンの皮内注射により痒み反応は惹起されない。また、皮膚炎マウスの自発的痒み反応においても抗ヒスタミン薬が無効である。これまでの研究から IL-4、IL-13 の皮内注射では痒み反応は認められない。そこで、皮膚炎マウスの自発的掻き動作が PAR2 の中和抗体やセリンプロテアーゼによって抑制されることから、好塩基球から遊離される mMCP-11 に着目した。mMCP-11 の皮内注射により痒み反応が惹起され、この反応は PAR₂ の中和抗体によって抑制された。したがって、mMCP-11 が好塩基球を介した皮膚炎マウスの自発的痒み反応に一部関与することが示唆される。

皮膚炎マウス皮膚では、表皮のバリア破壊が認

められる。皮膚の角質の剥離には、KLK5 が関与することが報告され、KLK5 のトンスジェックマウスではアトピー様の皮膚炎が惹起されることが知られている。KLK5 もセリンプロテアーゼであるため、KLK5 が皮膚炎マウスの痒み反応に関与しているか調べた。皮膚炎マウス皮膚で KLK5 の発現や酵素活性の増加が認められ、KLK5 自身の皮内注射により痒み反応が惹起された。この行動は PAR₂ 拮抗薬で抑制された。KLK5 は、これまでに PAR₂ を活性化することが報告されている。以上のことから、KLK5 が皮膚炎マウスの痒み反応に関与し、PAR₂ を介した反応系で痒みが発生することが示唆される。ところで、KLK5 の活性は、内因性の阻害因子である LEKTI によって制御されている。皮膚炎マウス皮膚では、LEKTI の発現は、健康マウスと比べ減少していた。したがって、皮膚炎マウスの KLK5 の活性化機構の一部に LEKTI の発現減少が関係しているかもしれない。また、KLK5 は表皮での発現が知られているが、皮膚炎マウス皮膚での免疫組織学染色により、好塩基球にも KLK5 の免疫活性が認められた。今後詳細な検討は必要であるが、好塩基球も KLK5 の発生源であるかもしれない。

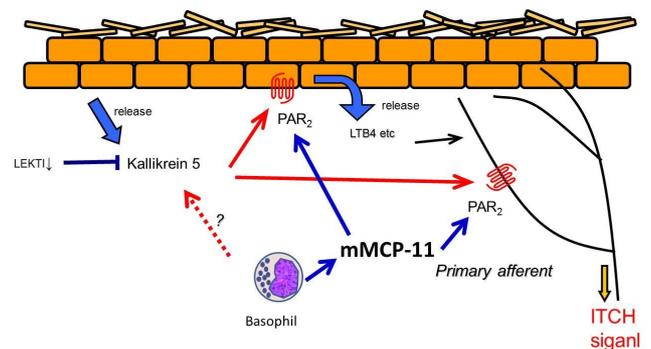


図 本研究成果から想定される好塩基球を介したアトピー性皮膚炎の痒みの発生機序

E . 結論

アトピー様皮膚炎マウスの自発的痒み反応は、好塩基球が一部関与し、好塩基球から遊離される

mMCP-11 等のセリンプロテアーゼを介して痒みが発生している可能性が示唆される。したがって、セリンプロテアーゼ阻害薬或いは PAR₂ 拮抗薬が新たな痒みの治療薬になりうるかもしれない。

G . 研究発表

1.論文発表

- 1) **Andoh T**, Yoshida T, Lee JB, 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 JB, 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 .
- 4) 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 .
- 5) 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: 242-245, 2013.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) **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.
- 9) **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.
- 10) 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.
- 11) **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.
- 12) **Andoh T**, Takayama Y, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B₄ in dermatophyte-related itch in mice. **Pharmacol. Rep.** 66: 699-703, 2014.
- 13) 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.
- 14) **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.
- 15) **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) **安東嗣修**, 桑園 崇, 倉石泰: マウスにおける
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.
- 11) **安東嗣修**, 高山祐輔, 倉石 泰: 皮膚糸状菌
抽出物誘発掻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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) **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.
- 15) 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.
- 16) 高橋遼平, **安東嗣修**, 宮本隆行, 倉石 泰:
乾燥性皮膚掻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.

- 17) 真野陽介, **安東剛修**, 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.
- 18) **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.
- 19) 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.
- 20) **安東剛修**, 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マスト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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) **Andoh T**. Proteases and itch. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21; Sendai.
- 25) 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.
- 26) 井浪義博, **安東剛修**, 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.
- 27) **安東剛修**, 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.
- 28) 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.
- 29) 中村まり, **安東剛修**, 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.
- 30) **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.
- 31) 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.
- 32) **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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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; 2014 Dec 12-14; Osaka.

H.知的財産権の出願・登録状況

特許登録：

(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)

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体

(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 (平成 26.11.6)