

令和 5 年 2 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08680

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎のかゆみにおける消化管ホルモンの役割の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Role of gastrointestinal hormone in itch of atopic dermatitis

研究代表者

富永 光俊（TOMINAGA, MITSUTOSHI）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・先任准教授

研究者番号：50468592

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではかゆみと無関係であると考えられていたコレシストキニン（CCK）に着目し、かゆみにおけるCCKの役割を解明するためにマウスを用いて研究を行った。行動学的及び薬理的解析から、マウス髄腔へのCCK8S投与は、脊髄後角CCK2受容体発現ニューロンを介してアロネーシスを誘発することが明らかとなった。以上より、新たなアロネーシスモデルの開発に成功し、このモデルを用いることで、アロネーシスの発症に関与する分子基盤の解明と治療法の開発に繋がると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
かゆみと搔破の悪循環を引き起こすアロネーシスの本態に迫る研究成果と、それに基づく治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was performed to reveal the role of cholecystokinin (CCK), a gastrointestinal hormone, in itch associated with atopic dermatitis. Pharmacologically, our behavioral analyses showed that intrathecal injection of sulfated CCK8 (CCK8S) induced allodynia via the spinal CCK2 receptor (CCK2R). Thus, we developed a model of allodynia, and these data suggest that the CCK8S/CCK2R system is involved in induction of allodynia in mice.

研究分野：かゆみ科学、神経科学、皮膚科学

キーワード：アロネーシス 脊髄後角 後根神経節 コレシストキニン ドライスキン

## 1. 研究開始当初の背景

かゆみは『掻破したいという欲望を起こさせる不快な感覚』として定義されており、近年では外部異物に対する自己防衛反応や全身の異常を知らせる警告(アラーム)として考えられている。知覚異常としてのかゆみは、痛みと同様に QOL (quality of life) を著しく低下させる。特に、既存治療が無効な難治性のかゆみは不眠、自殺率(願望)の増加、労働・勉強障害等の一因となっており、世界中で難治性かゆみの新規治療法の開発が進められている。

このような背景から、これまで我々は中心的な研究対象として、アトピー性皮膚炎(AD)における難治性かゆみの発症機序の解明を行い、表皮内神経線維の稠密化がその一因であることを明らかにしてきた(Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2007, 46: 199 - 210; Tominaga and Takamori., J Dermatol. 2014, 41: 205-212)。また、神経線維の表皮内侵入には、表皮角化細胞由来の神経反発因子 Sema3A が関与することを世界で初めて報告した(Tominaga et al., Br J Dermatol. 2008, 158: 842-4)。さらに、我々はアセトンによるドライスキンモデルマウスの作製に成功し、ドライスキンが表皮での神経伸長因子の増加と神経反発因子の低下を誘導すること(Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2007, 48: 103-111)、紫外線療法(PUVA (psoralen-ultraviolet A))をAD患者に施行すると、その表皮での神経伸長因子と神経反発因子の異常発現を正常化し、表皮内で増生した神経線維が消退することを発見した(Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2009, 55: 40-6)。さらにSema3A含有軟膏の外用はADモデルマウスのかゆみ行動(掻破行動)を抑制することで、皮膚バリア機能を回復させ、皮膚炎を改善することを明らかにした(Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2012, 66, 37-43)。このように、神経ガイダンス分子に制御された表皮内神経密度が末梢におけるかゆみ過敏とその難治化に寄与することを明らかにしてきた。しかし、かゆみの発現メカニズムは千差万別で、有効なかゆみ抑制法も病態に応じて異なるため、幅広い視点で研究を展開することが必要とされる。

ADのかゆみは末梢で開始され、それに引き続く中枢神経系の生理学及び解剖学的変化が慢性化の引き金になることが推定される。腎及び肝疾患において全身性のかゆみを発症する場合は、疾患発症や治療に付随した生体内の恒常性の破綻が一因であると推定される。ストレスや生活習慣などの環境要因と遺伝的要因もかゆみの慢性化に関与する。現状では、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 (H<sub>1</sub>R) 拮抗薬がかゆみ治療に使用されているが、ADや透析患者などの難治性かゆみには奏効し難い。またかゆみの慢性化は、さらなるかゆみ閾値の低下をもたらし、治療を困難にする。前述したように、かゆみは患者の QOL にも

多大な影響を与える。しかしながら、現在、難治性かゆみの治療薬は我々が開発に携わったオピオイド受容体作動薬「レミッチ」以外に世界的にほとんど開発されていない。このようにADの慢性で難治性のかゆみを治療するためには、末梢と中枢の両方を標的とする薬剤の開発が望まれるが、そのためには末梢と中枢でのかゆみ発症に関わる分子機構を解明することが必要である。

近年では GRP や Nppb などかゆみとは無関係であると考えられていたペプチド類が、後根神経節(DRG)細胞から脊髄後角へのかゆみの神経伝達に関与することが報告されている(Sun and Chen, Nature. 2007, 448: 700-3; Mishra and Hoon, Science. 2013, 340: 968-71)。このような状況の中で、我々はDNAマイクロアレイ解析により、AD様症状を発症していない control-NC/Nga マウスの DRG 細胞と比較して、AD 様症状を発症した NC/Nga (AD-NC/Nga) マウスの DRG 細胞において 2 倍以上の発現増加を示す cholecystokin (CCK) を見出した。

CCK は十二指腸、小腸の I 細胞や空腸の L 細胞で合成される消化管ホルモンでありながら(Dufresne et al., Physiol Rev. 2006, 86: 805-47)、神経系にも存在する(Ma et al., Brain Res. 2006, 1121: 66-75)。中枢神経系において、CCK は鎮痛、鎮静、摂食行動、記憶など様々な神経機能に関与しているが、かゆみにおける CCK の役割は不明である。生体内ではアミノ酸数の異なる CCK58、CCK39、CCK33、CCK8 が産生される。なかでも中枢神経系では CCK8 が広く分布し、神経伝達物質として機能する。また、CCK 受容体は CCK-1R (別名: CCKAR) と CCK-2R (別名: CCKBR) が同定されており、中枢神経系では主に CCK-2R が発現している(Dufresne et al., Physiol Rev. 2006, 86: 805-47)。さらに、生体内において硫酸化修飾を受けた CCK8S は、非修飾の CCK8 よりも強い親和性(10-50 倍)で CCK-2R に結合する(Dufresne et al., Physiol Rev. 2006, 86: 805-47)。以上のことから、本研究では CCK の神経ペプチド機能に着眼し、かゆみ発現における CCK の役割の解明と脊髄を標的とした新規かゆみ治療法の開発を目指し、研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では CCK による DRG 細胞 脊髄後角ニューロン間の新たなかゆみの神経伝達機構の解明と脊髄を標的とした難治性かゆみの治療法の開発を目指し、薬理学・行動学・分子生物学・生化学など多角的な研究手法により、1) CCK のかゆみ行動に対する影響、2) アロネーシスの発症に関与する CCK 受容体の同定、3) DRG 及び脊髄における CCK 及び CCK 受容体の発現分布について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) CCK のかゆみ行動に対する影響

セボフルレン麻酔下において、生理食塩水に溶解した CCK8S 溶液 (1-5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ ) を 33G 歯科用針装着マイクロシリンジで C57BL/6J マウス (雄 10 週齢) の髄腔内に投与した。コントロール群には生理食塩水 (5  $\mu\text{L}$ ) を髄腔内投与した。髄腔内投与後 3 時間の搔破行動をビデオカメラまたは SCLABA-Real で観察し、搔破行動回数をコントロール群と比較検討した。アロネーシスアッセイは、マウス背部皮膚に対して von Frey フィラメント (0.07 g または 0.16 g) による機械刺激を 10 秒ごとに 1 回与え、この操作を 5 セット行い、機械刺激後の搔破行動の有無をスコア化し、コントロール群と比較検討した。マウスに対する実験者の影響を排除するために、マウスに風刺激 (風速  $0.925 \pm 0.1 \text{ m/s}$ ) を与え、髄腔内 CCK8S 投与 3 時間後まで搔破行動をビデオカメラで記録し、搔破行動回数を解析した。

#### (2) アロネーシスの発症に關与する CCK 受容体の同定

Saporin は植物由来の毒素でリボソームを不活性化し、細胞死を誘導する。CCK8S に saporin を結合した CCK8S-saporin をマウス髄腔内に投与することで、脊髄後角の CCK 受容体発現細胞のみを排除したマウス (CCK-saporin マウス) を作製した。コントロールマウスには non-Targeted Peptide の saporin 標識物 (Blank-saporin) を投与した。CCK-saporin マウスの髄腔内に CCK8S を投与後、上記 1)-3 で述べたアロネーシスアッセイを行い、コントロール群と比較検討した。CCK8S 誘発性アロネーシスが CCK-1R 及び CCK-2R のいずれか、あるいは両方を介して生じている可能性が考えられたことから、SR 27897 (CCK-1R antagonist) 及び L-365260 (CCK-2R antagonist) を髄腔内投与し、CCK8S 誘発性アロネーシスに対する影響を評価した。

#### (3) DRG 及び脊髄における CCK 及び CCK 受容体の発現分布

C57BL/6J マウスの DRG 及び脊髄後角における CCK mRNA 及び NeuN mRNA (ニューロンマーカー) の発現分布を *in situ* hybridization 法により検討した。C57BL/6J マウスの脊髄後角における CCK 1R、CCK 2R 及び NeuN mRNA の発現分布を *in situ* hybridization 法により検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) CCK のかゆみ行動に対する影響

マウスの髄腔内に cholecystokinin 8S (CCK8S) を投与することで、搔破行動が惹起されるか否かについて検討した。その結果、コントロール群と比較して、CCK8S を髄腔内投与した C57BL/6J マウスでは搔破行動が増加する傾向を示した。搔破行動を撮影した場所を調査すると、給気口から微風が発生しており、マウスに対してこの微風が機械刺激になっている可能性が考えられた。そこで、給気口から微風が発生しない環境で搔破行動を観察したところ、コントロール群と CCK8S 髄腔内投与群の間に有意な搔破行動回数の違いは認められなかった。次に、小型扇風機から微風を CCK8S 髄腔内投与群に与えたところ、時間経過 (30 分、60 分、90 分後) に伴い、搔破行動回数が有意に増加することが明らかとなった。さらに通常ではかゆみを惹起しない軽微な機械刺激によってかゆみを誘発する現象であるアロネーシスの発症に CCK8S が関与しているのではないかと考えた。CCK8S 髄腔内投与群に von Frey フィラメントを用いたアロネーシスアッセイを行った結果、コントロール群と比較して、CCK8S 髄腔内投与群では投与 30 分、60 分、90 分後のアロネーシスコアが有意に増加した。このことから、脊髄レベルで CCK8S はアロネーシスの誘発に關与することが示唆された。

#### (2) アロネーシスの発症に關与する CCK 受容体の同定

前年度の成果に基づき、H28 年度は CCK8S 誘発性アロネーシスに CCK-1 受容体及び CCK-2 受容体のどちらが關与するのかについて行動学と薬理学的手法を組み合わせ検討を行った。Blank-saporin (コントロール) 群と比較して、CCK-saporin を髄腔内投与し、脊髄表層 CCK 受容体発現細胞を消失させたマウス (CCK-saporin 群) では、CCK8S 誘発性アロネーシスが有意に抑制された。また生理食塩水 + 溶媒投与群 (コントロール群) と比較して、CCK8S + L-365260 (CCK-2R antagonist) のカクテルを C57BL/6J マウスの髄腔内に投与した結果、CCK8S 誘発性アロネーシスが有意に抑制された。この抑制効果は CCK8S + SR 27897 (CCK-1R antagonist) 投与群では認められなかった。以上のことから、CCK8S は脊髄内の CCK-2R 発現細胞を介してアロネーシスを誘発することが示唆された。

#### (3) DRG 及び脊髄における CCK 及び CCK 受容体の発現分布

H29 年度は *in situ* hybridization 法により、C57BL/6J マウスの DRG 及び脊髄における CCK mRNA 及び CCK2R mRNA の発現分布について検討した。DRG において、小型及び中型の DRG 細胞が CCK mRNA を発現していることが確認された。また脊髄においても CCK mRNA の発現が検出され、これら CCK mRNA

発現細胞はニューロンのマーカー遺伝子 *NeuN* を発現していた。さらに脊髄後角に発現する CCK 受容体は主に CCK2R であり、CCK1R の発現量は非常に低く、CCK2R 発現細胞は前述した *NeuN* mRNA を発現していることが明らかとなった。以上の結果から、CCK8S 産生細胞は DRG ニューロンあるいは脊髄後角ニューロンであり、これらのニューロンから遊離された CCK8S は、脊髄 CCK2R 発現ニューロンを介してアロネーシスを誘発していることが明らかとなった。

総じて、本研究ではこれまでかゆみに関して誰も注目していなかった CCK に着目し、CCK8S/CCK2R システムがアロネーシスの発症に参与することを見出した。本研究成果は、脊髄後角に発現する CCK2R を標的とした痒覚過敏の治療法の開発に繋がると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 15 件) 全て査読有

1. Takahashi N, Tominaga M, Kosaka R, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Sakaguchi A, Ogawa H, Takamori K. Involvement of  $\mu$ -opioid Receptors and  $\kappa$ -opioid Receptors in Itch-related Scratching Behaviour of Imiquimod-induced Psoriasis-like Dermatitis in Mice. *Acta Derm Venereol.* 97, 928-933, 2017. doi: 10.2340/00015555-2704.
2. Otsu A, Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Matsuda H, Takahashi N, Nakajima T, Naito H, Baba T, Ogawa H, Tomooka Y, Yamakura F, Takamori K. Accumulation of immunoglobulin G against *Dermatophagoides farinae* tropomyosin in dorsal root ganglia of NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. *Biochem Biophys Res Commun.* 485, 707-712, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.109.
3. Kusube F, Tominaga M, Kawasaki H, Yamakura F, Naito H, Ogawa H, Tomooka Y, Takamori K. Electrophysiological properties of brain-natriuretic peptide- and gastrin-releasing peptide-responsive dorsal horn neurons in spinal itch transmission. *Neurosci Lett.* 627, 51-60, 2016. doi: 10.1016/j.neulet.2016.05.051.
4. Tominaga M\*, Torigoe K\*, Ko KC, Takahashi N, Matsuda H, Hayashi R, Ogawa H, Takamori K. Intrathecal minocycline suppresses itch-related behavior and improves dermatitis in atopic dermatitis model mouse. *J Invest Dermatol.* 136, 879-81, 2016. doi: 10.1016/j.jid.2015.12.037. \* equal contribution.

5. Tominaga M\*, Ko KC\*, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Takahashi N, Kina K, Ogawa M, Ogawa H, Takamori K. Possible anti-pruritic mechanisms of cyclosporine A in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 96, 624-9, 2016. doi: 10.2340/00015555-2318.

\* equal contribution.

〔学会発表〕(計 69 件)

1. Tominaga M, Kusube F, Honda K, Takahashi N, Naito H, Yamakura F, Ogawa H, Tomooka Y, Takamori K. Sulfated CCK8 induces alopecia via spinal CCK2 receptor in mice. 9<sup>th</sup> World Congress on Itch, Wroclaw, Poland, October 15-17, 2017 (Plenary session).
2. Kamata Y, Umehara Y, Sakaguchi A, Suga Y, Tominaga M, Takamori K. Sema3A expression is regulated by calcium/PKC/MAPK/AP-1 signaling axis in normal human epidermal keratinocytes. 9<sup>th</sup> World Congress on Itch, Wroclaw, Poland, October 15-17, 2017 (Concurrent session).
3. Takahashi N, Tominaga M, Kosaka R, Matsuda H, Suga Y, Takamori K. Possible role of satellite glial cell derived lipocalin-2 in the pathogenesis of atopic dermatitis. 9<sup>th</sup> World Congress on Itch, Wroclaw, Poland, October 15-17, 2017 (Concurrent session).
4. Tominaga M, Torigoe K, Ogawa H, Takamori K. A role of spinal glial cells in pruritus of atopic dermatitis model mouse. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR), Munich, Germany, Sep 7-10, 2016.
5. Tominaga M, Ko KC, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Takahashi N, Kina K, Ogawa M, Ogawa H, Takamori K. Pleiotropic action of cyclosporine on pruritus of atopic dermatitis. 8<sup>th</sup> World Congress on Itch, Nara, Japan, September 27-29, 2015.

〔図書〕(計 3 件)

1. 柿木隆介(著), 高森建二(監修). 世界に「かゆい」がなくなる日. ナツメ社サイエンス, 2017.
2. Tominaga M, Takamori K. Atopic dermatitis: Pruritus Second Edition. Springer Science+Business Media; 2016. Chapter 19.
3. Kamata Y, Tominaga M, Takamori K. Itch in atopic dermatitis management. *Curr Probl Dermatol.* Karger; 50, 86-93, 2016. doi: 10.1159/000446048.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: 掻痒性皮膚疾患の予防又は治療薬  
発明者: 楠部史也、畠永光俊、高森建二

権利者：学校法人順天堂  
種類：特許  
番号：PCT/JP2018/005629  
出願年月日：2018年2月20日  
国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等  
順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究  
所・高森建二グループ HP  
[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kankyo\\_igaku/k4\\_takamori.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kankyo_igaku/k4_takamori.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富永 光俊 (TOMINAGA, Mitsutoshi)  
順天堂大学大学院・医学研究科・前任准教授  
研究者番号：50468592

### (2) 研究分担者

鎌田 弥生 (KAMTA, Yayoi)  
順天堂大学大学院・医学研究科・助教  
研究者番号：00410035

高森 建二 (TAKAMORI, Kenji)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：40053144