

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19193

研究課題名(和文)ドライスキンの痒みにおける表皮内浸透圧の役割

研究課題名(英文)Role of epidermal osmotic pressure in dry skin induced itch

研究代表者

加茂 敦子(Kamo, Atsuko)

順天堂大学・医療看護学部・准教授

研究者番号：50614088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、皮膚バリア機能が低下した皮膚において経皮水分蒸散量が増加することに着目し、表皮内浸透圧環境の変化と痒み発生機序の関連を検討した。ドライスキンモデルマウスを用いた解析により、皮膚バリア機能が低下した皮膚では浸透圧関連分子TRPV4等の発現の増加が認められた。また培養表皮角化細胞に対する浸透圧調整培地を用いた検討から、浸透圧刺激は痒み関連遺伝子の発現を誘導することが示唆された。以上より、皮膚バリア機能の低下が表皮内の浸透圧環境に変動をもたらす、痒みを誘導することが推察された。これらの成果は、皮膚バリア機能の低下を伴う皮膚症状や疾患に対する新たな治療戦略の提示につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚は身体の表面を覆い、身体の中と外の水分移動などを制御する皮膚バリア機能をもつ。健常な皮膚と比較して、ドライスキンでは皮膚バリア機能が低下するため、皮膚を介して蒸散する水分量が増加し、その結果、表皮内の浸透圧環境が変動すると考えられる。本研究では、表皮内浸透圧環境とドライスキンの痒み発生メカニズムの関連を検討した。その結果、皮膚に分布する表皮角化細胞が皮膚バリア機能の低下に伴う水分量の減少を感知し、痒みに関連する物質の産生を行うことが示唆された。この成果は、ドライスキンの痒みやドライスキンを伴う様々な疾患に対する新たな治療戦略につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Increase of transepidermal water loss is observed in the skin with impaired barrier function, which represents the disturbance of osmotic homeostasis in the epidermis. To examine the correlation between osmotic change in the epidermis and dry skin induced itch, animal model of dry skin was utilized in this study. The epidermal expression of TRPV4 which is activated by hypoosmotic stress, increased 24 h after barrier disruption. Furthermore, itch related mediators expression was induced in keratinocytes cultured in hypo- and hyperosmotic medium. Taken together, skin barrier function affects osmotic homeostasis in the epidermis, possibly leading to itch sensation.

研究分野：痒み科学、解剖生理学、皮膚科学

キーワード：痒み ドライスキン 浸透圧 皮膚バリア機能 表皮角化細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

痒みは「掻破したいという欲望を起こさせる不快な感覚」と定義され、外部からの有害刺激により発生する生体警告系の役割を有するとされる。古くから知られる起痒物質であるヒスタミンは、抗原刺激により肥満細胞から遊離され、末梢神経終末のヒスタミン H1 受容体 (H1R) に結合することで、痒みを引き起こす。したがって現在、痒みに対する治療には、H1R 拮抗薬が用いられている。しかしながら、アトピー性皮膚炎 (AD) などの慢性で難治性の掻痒性皮膚疾患などに対して、H1R 拮抗薬は奏効し難いことが知られている。このことは、痒み発生経路にヒスタミンの遊離につながる抗原刺激以外の起痒因子が関与することを示唆している。

生体の内部環境 (ホメオスタシス) を規定する因子には、酸塩基平衡 (pH) 体温、浸透圧などがあり、ホメオスタシスの破綻は生命を脅かす様々な疾患の引き金となる。近年、皮膚におけるこれら因子と痒みとの関連が明らかになりつつある。例えば pH に関しては、AD や足白癬等では、角層 pH がアルカリ側に傾いている (Chikakane K et al., Clin Dermatol. 1995; Knor T et al., Acta Dermato Venerol Croat. 2011)。角層 pH の上昇は、アルカリ側に至適 pH を有するセリンプロテアーゼの活性化を誘導し、一次感覚神経やケラチノサイトなどに発現する Protease-Activated Receptor 2 (PAR-2) を介して痒みを誘導する (Steinhoff M et al., J Neurosci 2003)。これらのことから、角層 pH が痒みの発生に関与することが明らかになり、最近、AD モデルマウスへの酸性クリーム塗布が、角層 pH の上昇を抑え、病態を改善することが報告された (Lee et al., Exp Dermatol. 2014)。

生体には、半透膜である細胞膜を挟み、細胞内外に存在する電解質とタンパク質の濃度勾配と電氣的勾配が存在する。この勾配は細胞の静止電位に重要であり、神経や筋の情報伝達に必須である。したがって、細胞外に電解質やタンパク質の濃度変化 (浸透圧変化) が起こると、まず細胞内外への電解質輸送が誘導される。電解質の移動は水の移動を伴うため、結果として細胞膨化や細胞縮小といった細胞容積への影響が認められる。しかしながら、持続した細胞容積の変化は細胞死につながるため、このような浸透圧負荷に対して細胞は、「容積調節」という制御機構をもち生存を保っている。(Okada Y et al., Cell Biochem Biophys. 2004)。

培養ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) に対して高浸透圧刺激を行った研究では、NHEK 細胞内にカルシウム流入が確認された (Dascalu A et al., J Invest Dermatol. 2000)。また、容積調節に関与するタウリントランスポーター (TAUT) やアクアポリン 3 (AQP3) の発現が増加することも明らかにされている (Sugiyama Y et al., Biochim Biophys Acta. 2001; Janeke et al., J Invest Dermatol. 2003)。健全皮膚を用いた組織学的解析では、TAUT や AQP3 はケラチノサイトの分化に伴って発現の増加が認められた。以上の結果から、健全皮膚の表皮において、基底層細胞の存在する表皮基底層よりも分化の進んだ顆粒層細胞の存在する表皮上層において浸透圧が増加し、この浸透圧勾配がケラチノサイトの分化と関連していることが示唆される (Dascalu A et al., J Invest Dermatol. 2000)。健全者の表皮にはカルシウム濃度勾配が認められ、ケラチノサイトの分化誘導を制御することが知られている。表皮内の浸透圧勾配はカルシウム濃度だけでは説明できないが、乾燥の認められる AD 患者や透析患者の表皮において、表皮カルシウム濃度勾配が破綻していることが報告され (Forslind B et al., Acta Derm Venereol. 1999; Momose A., Nephrol Dial Transplant. 2004) 表皮内浸透圧の変化が推察される。AD 患者の皮膚全層を用いた解析では、AQP3 遺伝子発現の増加が認められる一方で、免疫組織学的解析では AD 病変部皮膚は非病変部皮膚と比較して AQP3 発現が低下していた (Olsson M et al., Allergy 2006; Nakahigashi K et al., J Invest Dermatol. 2011)。このような AD 皮膚における AQP3 発現解析結果のばらつきは、AD における表皮内浸透圧のばらつきを表しているかもしれない。我々は、予備的検討において AD 患者の表皮において TRPV4 発現が部分的に増加することを免疫染色法により観察した (図 2)。このような部分

では、ケラチノサイトに細胞膨化が認められた。TRPV4 はポリモーダルレセプターであり、その活性刺激の 1 つとして低浸透圧が知られている (Strotmann R et al., 2000; Liedtke W et al., 2000)。これらのことから我々は、ドライスキンで表皮内浸透圧が部分的に高浸透圧や低浸透圧になり、ケラチノサイトがその変化に応答することが痒み発生因子であると考えた。皮膚バリア機能評価の指標として経皮水分蒸散量 (TEWL) がある。健全者

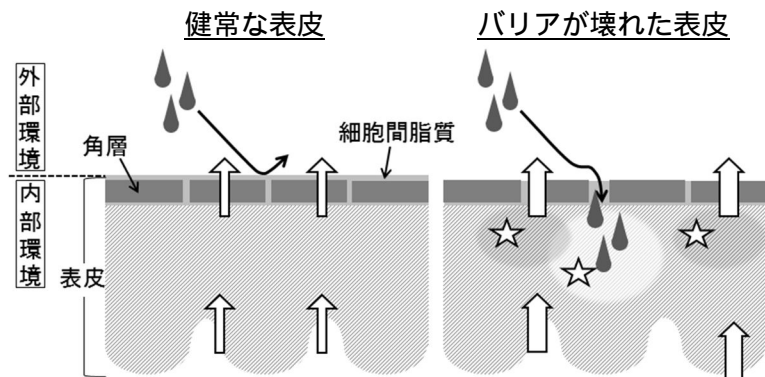


図 1 . 皮膚バリアの破綻による表皮内浸透圧の変化 (仮説). 健全な表皮では、表皮最外層に構成される皮膚バリアにより、内部環境からの水分の流出と外部環境からの水分の流入が最低限に抑えられている。一方、皮膚バリアが壊れると、内部環境からの水分蒸散の増加だけでなく、入浴、発汗など外部環境からの水分の流入が増加する。これにより、表皮内浸透圧に変化 ( ) が認められると推定される。↑ : 内部環境の水分、● : 外部環境の水分

の TEWL は約 10 g/h/m<sup>2</sup> であるが、AD では 2~5 倍に増加する (Elias P et al., Skin Barrier 2006)。このことは、皮膚バリアが破綻している表皮では、体の内部→外部、外部→内部の水分移動が容易に起こり、表皮内の浸透圧に変化が起こる可能性を示唆する。Miyamoto らは、アセトンとジエチルエーテルによる皮膚バリア破壊後、同部位に水処理を行うことで、痒みを伴うドライスキンモデルマウスを報告している (Miyamoto et al., Jpn J Pharmacol. 2002)。このモデルにおける痒み発生機序は明らかにされていないが、表皮内浸透圧変化の可能性が推察される。本研究では、ドライスキンモデルマウスと NHEK を用いて、ドライスキンの痒み発生機序における表皮内浸透圧の関与を明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の目的

本研究では、痒み発生機序における表皮内浸透圧の関与を明らかにするために、(1) ドライスキンモデルマウスを用いて、皮膚バリア破壊処置とその後の表皮内浸透圧変化について検討し、(2) NHEK を用いて、浸透圧刺激が痒み関連遺伝子発現に与える影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 皮膚バリア破壊処置とその後の表皮内浸透圧変化

ドライスキンモデルマウスを用いて、皮膚バリア破壊処置後の皮膚における浸透圧と痒み関連タンパク発現を解析することにより、皮膚バリアの破綻と表皮内浸透圧変化の関連を検討した。

ICR マウスもしくは Hos:HR-1 マウスの背部皮膚を、アセトン・ジエチルエーテル混合溶液 (AE; 混合割合 1:1) をしみ込ませたコットン (2×2 cm) で 15 秒間覆い、その後直ぐに滅菌水 (W) をしみ込ませたコットンを同部位に 30 秒間塗布した。この操作を朝 9 時と夕方 5 時の 2 回、5 日間連続で行い、モデルマウスを作成した。無処置、水処理のみ、AE 処理のみ実施した群を対照群とした。掻破行動は、掻破行動自動解析装置 (MicroAct) を用いて計測した。背部皮膚を採取し、凍結切片を作成し、浸透圧関連タンパクもしくは痒み関連タンパク (transient receptor potential vanilloid 4; TRPV4, Taurine transporter; TAUT, aquaporin3; AQP3, Nerve growth factor; NGF, semaphorin 3A; Sema3A 等) に対する抗体を用いた免疫染色を行うことによりその発現を検討した。

次に、バリア破壊後の皮膚における浸透圧関連タンパクの経時的な発現変化を検討するため、急性ドライスキンモデルマウスを用いた実験を行った。ICR マウスの背側部を剃毛し、剃毛 3 日後にアセトンをしみ込ませたコットン (2 × 2 cm) を剃毛した皮膚に 5 分間塗布し作製した。本モデルでは、アセトン処理 1 時間後に角質水分量の低下と TEWL の増加がそれぞれピークとなり、その後回復する。そこでアセトン処理前、アセトン処理後 24、48、72、96 時間の皮膚を採取し、TRPV4 抗体を用いて免疫染色を行った。発現の変化は蛍光強度を計測することで半定量解析を行った。

### (2) 浸透圧刺激が痒み関連遺伝子発現に与える影響

ドライスキンモデルマウスの実験を踏まえ、表皮内浸透圧環境の変化は主に分化が進んだ表皮角化細胞に影響を与えると推察された。そこで、分化した NHEK に対して浸透圧調整培地による刺激を行い、分化マーカーや痒み関連因子発現に与える影響を検討した。

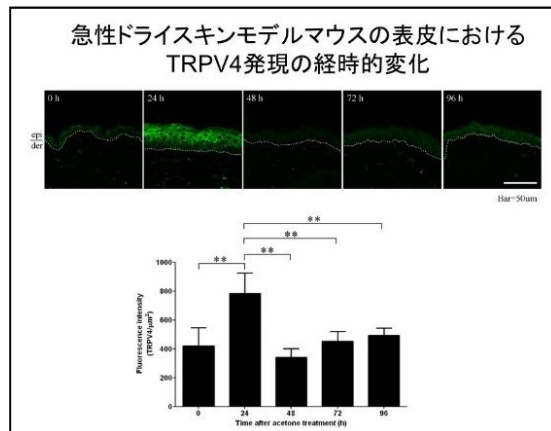
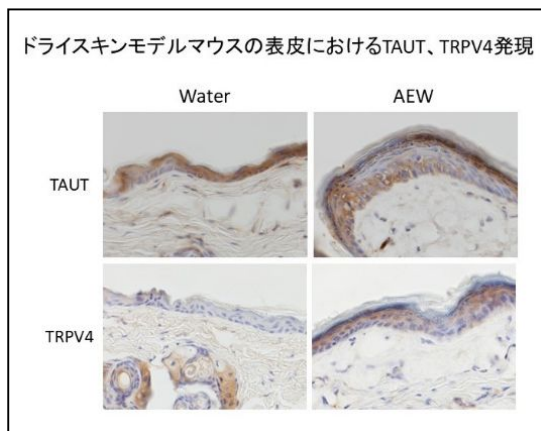
NHEK を 1.4 mM カルシウム含有培地で培養し分化を誘導する。浸透圧調整培地 (200、300、400 mOsm) を用いて分化 NHEK を 12 時間もしくは 24 時間培養する。RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により浸透圧関連遺伝子もしくは痒み関連遺伝子 (TAUT, AQP3, TRPV4, NGF, Sema3A 等) の mRNA 発現を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 皮膚バリア機能が浸透圧関連タンパク発現に与える影響

アセトン・ジエチルエーテル混合溶液による皮膚バリア破壊と水処理の反復によって作製した AEW ドライスキンモデルマウスを用いて、皮膚バリアの破綻と表皮内浸透圧環境の関連を解析した。W 処理群と比較して、AEW 処理群では、肉眼的に乾燥や細かい鱗屑が認められ、また角質水分量の減少、TEWL の増加とともに掻破行動の増加を認めた。免疫染色の結果、W のみ処理群と比較して、AEW 処理群では、皮膚バリアに関連するフィラグリン、E-カドヘリンの発現増加とともに、浸透圧の変化に関連する TAUT、TRPV4、AQP3 の発現変化を認め、皮膚バリアと表皮の浸透圧が関連していることが示唆された。

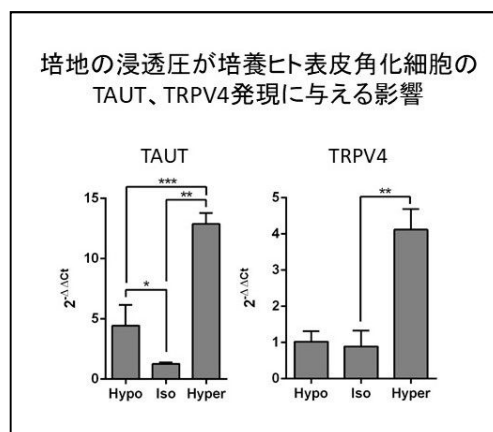
バリア破壊後の浸透圧関連タンパク発現の経時的変化を検討するために、単回のアセトン処理によって皮膚の乾燥状態を誘導する急性ドライスキンモデルマウスを用いて、TRPV4 発現の変化を検討した。その結果、TRPV4 発現は 24 時間後に有意に増加していることが明らかになり、皮膚バリアの破壊が TRPV4 発現を誘導していることが強く示唆された。



## (2) 細胞外浸透圧の変化がNHEKの遺伝子発現に与える影響

分化NHEKを用いて、浸透圧調整培地にて培養することによる遺伝子発現変動を解析した。TAUTは低浸透圧(Hypo)と高浸透圧(Hyper)ともに等浸透圧(Iso)と比較して有意な発現増加が認められた。また、高浸透圧培地による培地24時間後のNHEKにおいて、TRPV4mRNA発現が有意に増加していた。これは、急性ドライスキンモデルマウスの結果を支持するものと考えられた。

本研究の結果、皮膚バリア機能の低下が表皮内の浸透圧環境に変動をもたらすこと、そして表皮角化細胞の遺伝子発現を誘導する可能性が明らかになった。これらの成果は、皮膚バリア機能の低下を伴う皮膚症状や疾患の治療戦略の根拠や治療法の開発につながると考えられる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

Kamo A, Tominaga M, Matsuda H, Kina K, Kamata Y, Umehara Y, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin suppresses itch-related behavior in NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. *J Dermatol Sci*. 81: 212-215, 2015. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.11.014.

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori K (2017) Mechanisms and Treatments of Dry Skin-Induced Itch. *J Clin Cosmet Dermatol* 1(1): doi <http://dx.doi.org/10.16966/jccd.114>

Kamata Y, Kimura U, Matsuda H, Tengara S, Kamo A, Umehara Y, Iizumi K, Kawasaki H, Suga Y, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Relationships among plasma granzyme B level, pruritus and dermatitis in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 84: 266-271, 2016. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.09.009.

〔学会発表〕(計3件)

Kamo A, Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin, an analgesic agent, suppresses itch in NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. 46th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting, September 7-10, Munich, Germany, 2016.

加茂敦子、富永光俊、高森建二. アトピー性皮膚炎モデルマウスの痒みに対するノイロトロピンの有効性の検討. 第4回基礎科学をもとにしたCo-Medical研究会, 山形, 2016年11月12日

飯泉恭一、川崎広明、富永光俊、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を指標としたアトピー性皮膚炎の早期検出. 第37回日本トリプトファン研究会, 東京, 2016年10-11日

## 6. 研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 高森 建二

ローマ字氏名: (TAKAMORI, kenji)

研究協力者氏名：富永 光俊  
ローマ字氏名：( TOMINAGA, mitsutoshi )

研究協力者氏名：鎌田 弥生  
ローマ字氏名：( KAMATA, yayoi )