

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06237

研究課題名(和文)慢性掻痒時の脊髄後角における新規痒み伝達物質の探索

研究課題名(英文) Identification of new itch transmitter in spinal cord under chronic itch conditions

研究代表者

白鳥 美穂(林)(Shiratori-Hayashi, Miho)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：20735641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎などに伴う慢性的な痒み(慢性掻痒)は既存の治療薬が奏功せず、メカニズム解明は重要な課題である。これまでの研究から、慢性掻痒時の脊髄における痒み伝達にはGRPRシグナルが関わるということがわかっている。しかしながら、GRPR欠損マウスを用いた検討から、進行維持期のGRPRの関与は部分的で、初期に至ってはほとんど関わらないことが示唆された。そこで、GRPRシグナル非依存的な痒み伝達メカニズムについて種々の検討を行った。その結果、GRPRシグナル非依存的な痒み伝達を担う候補としてX陽性神経細胞を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性掻痒の初期から進行・維持期にわたって関与する脊髄における痒み伝達メカニズムの発見に繋がり、慢性掻痒メカニズムの全容解明に大きく貢献し、有効な新規治療標的の創出につながる。さらに新たな脊髄痒みシグナル及び神経回路の解明にもつながるため、「慢性的な痒み」のみならず、「痒み」さらには「感覚」研究全般において、日本が世界をリードすることにも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic itch is a debilitating symptom of skin diseases including atopic dermatitis; however, antihistamines are mostly ineffective and underlying mechanisms are poorly understood. Previous studies have suggested that spinal GRPR signaling plays an important role in development and maintenance of chronic itch. However, using GRPR mutant mice, we have shown that GRPR signaling makes a partial contribution to the development and maintenance of chronic itch and little contribution to initiation of it. In this study, we focused on GRPR-independent mechanisms of itch transmission in the spinal cord under chronic itch conditions and found that X-positive neurons as candidates for mediating GRPR-independent itch.

研究分野：神経薬理学

キーワード：痒み 脊髄

1. 研究開始当初の背景

痒みは皮膚や粘膜を引っ掻きたくなるような不快な感覚である。通常の痒みは一過性であるが、アトピー性皮膚炎などに伴う「慢性的な痒み(慢性掻痒)」は、痒みによる不快感や長期的な引っ掻き行動により、患者に過度の肉体疲労や精神的ストレスをもたらすことで QOL を著しく低下させる。また、それだけでなく、長期的な引っ掻き行動によって皮膚のバリア機能が著しく低下することで各種感染症にかかるリスクが高まることも問題視されている。現在、国民の約 1 割がアトピー性皮膚炎を発症していると推定されていることから、痒みのコントロールは临床上極めて重要な課題である。しかしながら、抗ヒスタミン薬など既存の治療薬が十分に奏功しないため、慢性的な痒みのメカニズム解明及び新規治療薬開発が強く求められている。痒みは、皮膚に存在する一次求心性神経 C 線維の自由終末が痒み刺激を受け、脊髄後角へと伝わり、脳に伝達され認識される。従来、痒みは痛みの弱い感覚であると考えられてきたが、最近の研究により、通常時の痒みシグナル伝達に特異的な分子として、脊髄後角における GRP とその受容体である GRP 受容体 (GRPR) が発見され (Nature 2007; 448: 700-703) 痒みが痛みとは異なる独立した感覚であることがわかった。しかし、病態時における痒み慢性化メカニズムは依然不明であり、また、これまでの慢性的な痒みに関する研究は皮膚を中心に行われており、脊髄をはじめとする中枢神経系の関与は全く分かっていなかった。

そのような中、最近、申請者らは慢性掻痒時の進行・維持期の脊髄後角において、活性化アストロサイト由来因子を介して痒み特異的シグナルである GRPR シグナルが増強され、慢性掻痒に関与することを見出し、慢性掻痒に対する脊髄レベルでの変化の関与を世界に先駆けて発見した (Shiratori-Hayashi et al., Nature Medicine 2015)。この成果から、通常時の生理的な痒みだけでなく、病態時の慢性的な痒みにも GRPR シグナルが関与することが示唆された。そこで、慢性掻痒時の GRPR シグナルの関与をより明確に示すため、GRP 欠損マウスで慢性掻痒モデルを作成した。その結果、GRP 欠損マウスでは、進行・維持期の増加した痒み行動は有意に抑制されたものの、その抑制は部分的 (約 40% の抑制) であり、初期の痒み行動に至ってはほとんど抑制されなかった。また、慢性掻痒モデルマウスの脊髄で DNA マイクロアレイを行ったところ、GRP 以外のペプチド性神経伝達物質が複数発現増加していた。

2. 研究の目的

慢性的な痒み発症時の脊髄後角における GRPR シグナル非依存的な新規痒み伝達物質及び痒みシグナルの存在を明らかにすることで、有効な新規治療標的創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 候補物質の脊髄腔内投与

投与前日までにマウスに対し脊髄腔内カテーテル留置手術を行い、候補物質 (因子 X) を投与した。投与後痒み行動をビデオ撮影し回数を計測した。

(2) 慢性掻痒モデル作成と慢性的な痒み行動測定

皮膚への塗布により接触性皮膚炎及び強い痒みを誘発するジフェニルシクロプロペノン (DCP) を用いた。DCP をアセトンに溶解させ、マウスの上背部皮膚を剃毛後塗布した。1 回目の塗布後 7 日目に再び同じ部位に 1 回目と同様の DCP 溶液を塗布した。

慢性的な痒み行動の測定は MicroAct (ニューロサイエンス) を用いて行った。最初の測定前日までに麻酔下でテフロンコーティングされた小型マグネット (直径 1 mm × 長さ 3 mm, ニューロサイエンス) をマウスの後肢皮下に埋め込んだ。測定当日は飼料と水を自由に摂取できる測定用チャンバー (直径 11 cm × 高さ 18 cm) にマウスを 1 匹ずつ入れ、24 時間の後肢の動きをコイルで検出することにより痒み行動を測定した。解析は MicroAct version 2.15A (ニューロサイエンス) を用いて行った。

(3) 免疫組織染色法

マウスを 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、頸部脊髄を取り出した後包埋し凍結保存した。その後切片を作製し免疫組織染色を行った。

(4) X 陽性細胞除去

X-Cre; Rosa-DTR マウスを作成し、脊髄腔内カテーテル留置手術を行い、ジフテリア毒素 (DTX) を頸部脊髄腔内投与した。1 回目の投与の 72 時間後に再び 1 回目と同様の DTX 溶液を投与した。最後の投与から 2 週間後以降に実験を行った。

4 . 研究成果

(1) 候補物質 X の脊髄腔内投与による痒み行動

慢性搔痒モデルマウスの脊髄で発現増加していた GRP 以外のペプチド性神経伝達物質である因子 X をマウスの脊髄腔内に投与したところ、痒み行動である引っ掻き行動の増加が認められた。また、GRPR 欠損マウスにおいても野生型と同程度の引っ掻き行動が X 投与後に認められた。これらの結果から、因子 X は脊髄における起痒物質であり、GRPR に依存せずに痒みを惹起できることが示唆される。

(2) X の慢性搔痒における役割

X 欠損マウスを用いて慢性搔痒モデルを作成し、慢性的な痒み行動を評価したところ、野生型マウスと比較して有意な変化は認められなかった。この結果から、因子 X は GRPR 非依存的な脊髄における起痒物質ではあるものの、慢性搔痒にはあまり寄与しないことが示唆される。

(3) X 陽性細胞の局在

因子 X そのものの慢性搔痒への寄与は小さいことが示唆されたため、次に因子 X を発現する神経細胞 (X 陽性細胞) の寄与を検討した。まず、X 陽性細胞の脊髄における局在を確かめるため、X-Cre; Rosa-tdTomato マウスを作成し、脊髄の免疫組織染色を行った。その結果、脊髄の中でも感覚伝達を担うとされる後角に X 陽性細胞が存在していることが分かった。

(4) X 陽性細胞の慢性搔痒における役割

脊髄後角に存在する X 陽性細胞の慢性搔痒における役割を明らかにするため、X-Cre; Rosa-DTR マウスを作成し、DTX を頸部脊髄腔内に投与することで脊髄後角 X 陽性細胞のみを除去し、その後慢性搔痒モデルを作成した。その結果、X 陽性細胞除去マウスにおいて、慢性的な痒み行動が有意に抑制された。慢性的な痒み行動の抑制は進行・維持期だけでなく、GRPR 欠損マウスではほとんど抑制されなかった初期においても認められた。以上の結果から、脊髄後角 X 陽性神経細胞は GRPR シグナルに依存せずに慢性搔痒に関与することが示唆される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Miho Shiratori-Hayashi, Ayumi Hasegawa, Honami Toyonaga, Tsugunobu Andoh, Takeshi Nakahara, Makiko Kido-Nakahara, Masutaka Furue, Yasushi Kuraishi, Kazuhide Inoue, Xinzhong Dong & Makoto Tsuda ' Role of P2X3 receptors in scratching behavior in mouse models ' Journal of Allergy and Clinical Immunology, 143(3): 1252-1254.e8 (2019)
2. Kensho Kanehisa, Miho Shiratori-Hayashi, Keisuke Koga, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Yuta Kohro, Kenji Takamori & Makoto Tsuda ' Specific activation of inhibitory interneurons in the spinal dorsal horn suppresses repetitive scratching in mouse models of chronic itch ' Journal of Dermatological Science, 88(2), 251-254 (2017)
3. Keisuke Koga, Kensho Kanehisa, Yuta Kohro, Miho Shiratori-Hayashi, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue, Hidemasa Furue & Makoto Tsuda ' Chemogenetic silencing of GABAergic dorsal horn interneurons induces morphine-resistant spontaneous nociceptive behaviours ' Scientific Reports, 5;7(1):4739 (2017)
4. Ryoichi Tashima, Satsuki Mikuriya, Daisuke Tomiyama, Miho Shiratori-Hayashi, Tomohiro Yamashita, Yuta Kohro, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue & Makoto Tsuda ' Bone marrow-derived cells in the population of spinal microglia after peripheral nerve injury ' Scientific Reports, 23;6:23701 (2016)
5. 「慢性化した痒みのメカニズム」白鳥美穂・津田誠: Visual Dermatology, 16(11): 1100-1102 (2017)
6. 「アトピー性皮膚炎に伴う慢性的な痒み」白鳥美穂: ファルマシア, Vol.52 No.8, 769-773 (2016)
7. 「慢性的なかゆみの新しい神経系メカニズム」津田誠・白鳥美穂: 生化学, 第 88 巻第 5 号, pp. 654-656 (2016)
8. 「慢性的な痒みにおける STAT3 依存的な活性化アストロサイトの役割」白鳥美穂・津田誠: 臨床免疫・アレルギー科, 65(5): 458-462 (2016)

[学会発表] (計 12 件)

< 国内招待講演 >

1. 痒みの慢性化と脊髄アストロサイト: 白鳥美穂, 第 10 回 Symphony (2017.9.17, 東京)
- #### < 国際学会 >
2. Purinergic receptor P2X3 in MrgprA3-positive sensory neurons mediates the itch

sensation through a pathway involving GRP receptors : Miho Shiratori-Hayashi, Ayumi Hasegawa, Honami Toyonaga, Tsugunobu Andoh, Yasushi Kuraishi, Kazuhide Inoue, Xinzhong Dong, Makoto Tsuda, Society for Neuroscience 2016 (2016.11.15, San Diego)

< 国内学会 >

3. 一次求心性神経由来 LGALS3 の神経傷害性疼痛および慢性掻痒病態への関与 : 鷲頭加歩, 河野敬太, 白鳥美穂, 津田誠, 第 35 回日本薬学会九州支部大会 (2018.11.18, 福岡)

4. 脊髄後角 GRPR 陽性神経活動と慢性掻痒におけるアストロサイトの役割: 山方涼, 古賀啓祐, 白鳥美穂, 津田誠, 第 71 回日本薬理学会西南部会 (2018.11.17, 福岡)

5. 慢性掻痒に関与する脊髄後角神経伝達シグナル : 遠山かほり, 白鳥美穂, 津田誠, 第 34 回日本薬学会九州支部大会 (2017.11.25, 熊本)

6. 頸部脊髄後角抑制性介在ニューロンの活性化による慢性的なかゆみの改善 : 兼久賢章, 白鳥美穂, 古賀啓祐, 高露雄太, 津田誠, 第 70 回日本薬理学会西南部会 (2017.11.18, 鹿児島)

7. Specific activation of GABAergic interneurons in the cervical spinal dorsal horn suppresses chronic itch: 兼久賢章, 白鳥美穂, 古賀啓祐, 高露雄太, 津田誠, 第 60 回日本神経化学学会大会 (2017.9.7-9, 仙台)

8. Mechanism of STAT3 activation in astrocytes under chronic itch condition: Chiharu Yamaguchi, Miho Shiratori-Hayashi, Honami Toyonaga, Makoto Tsuda, 第 90 回日本薬理学会年会 (2017.3.15, 長崎)

9. Activation of ATP-gated P2X3 receptor in MrgprA3-positive sensory neurons causes itch sensation through a GRPR-dependent pathway: Miho Shiratori-Hayashi, Ayumi Hasegawa, Honami Toyonaga, Tsugunobu Andoh, Yasushi Kuraishi, Kazuhide Inoue, Xinzhong Dong, Makoto Tsuda, 第 90 回日本薬理学会年会 (2017.3.15, 長崎)

10. 慢性掻痒に関与するアストロサイト STAT3 活性化メカニズム : 白鳥美穂, 山口千春, 豊永穂奈美, 津田誠, 痛み研究会 2016 (2017.1.31, 岡崎)

11. 慢性掻痒におけるアストロサイト STAT3 活性化メカニズムの解明 : 山口千春, 白鳥美穂, 豊永穂奈美, 津田誠, 第 33 回日本薬学会九州支部大会 (2016.12.3, 鹿児島)

12. 一次求心性神経 P2X3 受容体は痒み発症に関与する : 白鳥美穂, 長谷川あゆみ, 豊永穂奈美, 安東嗣修, 倉石泰, 井上和秀, Xinzhong Dong, 津田誠, 20th Japan Purine Club Meeting (2016.10.26, 東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。