

令和元年6月7日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08997

研究課題名(和文) 後根神経節に着目した末梢性かゆみ過敏のメカニズムの解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of peripheral itch hypersensitivity focusing on dorsal root ganglia and development for its therapeutic application

研究代表者

高森 建二 (TAKAMORI, KENJI)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：40053144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではsatellite glial cell (SGC)が産生するリポカリン2 (LCN2)に着眼し、アトピー性皮膚炎(AD)における末梢性かゆみ過敏のメカニズムの解明と治療法の開発を目指した。行動学及び薬理学的解析から、SGC由来LCN2のかゆみ過敏の発症への関与は低く、その一方で皮膚炎の増悪に関与することが示唆された。本成果は、LCN2を標的としたADの抗炎症薬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

近年、世界的にアトピー性皮膚炎(AD)の有病率は上昇しており、本研究領域への国民の関心も非常に高い。このような背景において、後根神経節(DRG)とsatellite glial cell (SGC)の相互作用に着眼した本研究成果は体性感覚分野の発展に役立つとともに、将来、『難治性かゆみの克服』と『QOL向上』に向けたADの新規治療法の開発に結び付くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to reveal the roles of satellite glial cells (SGC) derived lipocalin-2 (LCN2) in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD) using an AD model NC/Nga mouse. AD-like symptoms were induced by application of Dermatophagoides farinae body (Dfb) twice a week for 3 weeks. LCN2 mRNA and protein expressions in dorsal root ganglion (DRG) were higher in AD-NC/Nga- than control NC/Nga-mice. Immunohistochemically, LCN2 was co-localized with GLAST, a marker of SGC, in DRG. The number of LCN2-immunoreactive SGC was increased in the DRG of AD-NC/Nga mice. Expression level of LCN2 mRNA was increased faster in the DRG than the spinal cord during induction of dermatitis in NC/Nga mice. Intrathecal administration of anti-LCN2 antibody twice a week for 3 weeks reduced dermatitis score in AD-NC/Nga mice, but did not affect scratching behavior. Thus, SGC derived lipocalin-2 may be involved in the pathogenesis of dermatitis in AD-NC/Nga mice.

研究分野：皮膚科学、生化学、かゆみ科学

キーワード：かゆみ過敏 サテライトグリア アトピー性皮膚炎 感覚神経 リポカリン2

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

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』として定義される。近年では、かゆみは病原体、昆虫、植物等の外部異物に対する自己防衛系であると共に、皮膚を含む全身の異常を知らせるサインであると考えられている。なかでも、従来の治療法では解決できない難治性のかゆみは、痛みと同様に患者の quality of life (QOL) を著しく低下させる深刻な社会問題となっており、世界的に難治性かゆみの発症メカニズムの解明と新規治療法の開発に向けて研究が進められている。

難治性かゆみを伴う代表的な皮膚疾患としてアトピー性皮膚炎 (AD) がある。AD のかゆみの特徴として、1) かゆみ過敏状態 (alloknesis, hyperknesis)、2) 痛み刺激によるかゆみの惹起、3) 抗ヒスタミン薬 (H1R 拮抗薬) に抵抗性を示すことが知られている。しかしながら、AD におけるかゆみ過敏や難治化の発症機序は現在においても尚、未解明のままである。

このような背景から、これまで我々は難治性かゆみを伴う AD や乾皮症などドライスキンをベースとする皮膚疾患において、知覚神経線維 (主に C-線維) が表皮内に侵入し、増生することを見出してきた (Tominaga and Takamori, J Dermatol. 2014, 41: 205-212)。この増生した表皮内神経線維は外部刺激により容易に興奮し、その興奮はかゆみ情報として脊髄-視床経路を介して脳に伝達され、かゆみ感覚を引き起こす。注目すべきことに、本経路は代表的な起痒物質であるヒスタミンが関与していないために、かゆみ治療の第一選択薬であるヒスタミン H1 受容体 (H1R) 拮抗薬が奏効しない。さらに我々は表皮内神経線維の増生が表皮角化細胞で産生される神経伸長因子 (NGF, amphiregulin, artemin など) と神経反発因子 (Sema3A, anosmin-1) の発現バランスによって制御されていること、紫外線療法の PUVA (psoralen-ultraviolet A) が AD 表皮における神経伸長因子と神経反発因子の発現バランスの異常を正常化し、表皮内神経線維を消退させ、かゆみを抑制することを明らかにした (Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2009, 55: 40-6; Kamo et al., J Dermatol Sci. 2011, 62: 91-97)。これらの成果に基づき、我々は神経線維を退縮させる神経反発因子 Sema3A に着眼し、AD の難治性かゆみに対するリコンビナント Sema3A 含有軟膏の有効性を動物実験において明らかにした (Negi et al., J Dermatol Sci. 2012, 66: 37-43)。最近では、ヒト表皮角化細胞における内在性 Sema3A 遺伝子の発現誘導因子として、転写因子 ROR α 及び抗菌ペプチド LL-37 を見出し、これら Sema3A 誘導因子は AD やドライスキンのかゆみに対する新規外用治療薬の候補として期待される (Kamata et al., J Dermatol Sci. 2015, 79, 84-6; Umehara et al., J Invest Dermatol. 2015, 135, 2887-2890)。

このように、これまで我々は神経ガイダンス分子に制御された表皮内神経線維の密度がかゆみの難治化に寄与することを明らかにしてきた。しかし、AD では末梢で開始された持続的なかゆみ刺激が中枢神経系の生理学的・解剖学的変化を引き起こし、それがかゆみの慢性化の引き金になると推定される。したがって、慢性のかゆみを治療するためには末梢と中枢の両方に作用する薬剤が必要であり、その開発のためには末梢だけではなく、中枢での知覚異常に基づくかゆみ発生の分子機構を解明することが必要である。

そこで近年、我々は後根神経節 (DRG) 及び脊髄後角に着目した研究を展開し、ヒスタミン非依存性のかゆみ情報は少なくともグルタミン酸、サブスタンス P (SP)、gastrin-releasing peptide (GRP) によって脊髄後角に伝達されることを *in vivo* 細胞外記録法を用いて明らかにした (Akiyama et al., Pain. 2014, 155, 80-92)。本研究結果から、グルタミン酸、SP、GRP の各受容体の拮抗薬を併用することは、脊髄レベルでの難治性かゆみの治療法の開発に繋がると考えられる。さらに我々は、脊髄ミクログリアが AD の難治性かゆみの治療標的に成り得ることを発見した (Torigoe et al., J Invest Dermatol. 2016, 136, 879-881)。このように、我々は DRG - 脊髄後角を標的とした難治性かゆみの治療法開発にも着手しており、その標的分子や細胞を見出しつつある。

これらの研究過程において、我々はコントロール NC/Nga マウス (Ctrl-NC/Nga) と比較して、AD を発症した NC/Nga マウス (AD-NC/Nga) の DRG において発現増加するかゆみ関連受容体 (IL-31R α , NK1R) を発見した (Ko et al., Acta Derm Venereol. 2016, 96, 624-629)。

先行研究により、DRG や三叉神経節 (TG) では 1 次感覚ニューロンの周囲に satellite glial cell (SGC) と呼ばれるグリア細胞が存在しており、両者間にはギャップ・ジャンクションや液性因子を介したシグナル授受機構による密接な連絡が痛覚過敏の発生に関与していることが明らかにされている (Ji et al., Pain. 2013, 154 Suppl 1, S10-28)。

さらに我々は予備実験により、Ctrl-NC/Nga マウスと比較して、AD-NC/Nga マウスの DRG における GFAP (SGC マーカー) mRNA の発現が増加すること、また GFAP 陽性細胞数が増加することを見出した。この結果から、SGC 由来の何らかの因子は DRG 細胞のかゆみ刺激に対する応答性を変化させることにより、AD におけるかゆみ過敏を誘発している可能性が考えられた。

以上のことから、本研究では DRG 細胞 (ニューロン) とその周囲に存在する SGC との相互作用に着目し、AD における末梢性かゆみ過敏のメカニズムの解明と難治性かゆみの新たな治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では DRG 細胞と SGC の相互作用に着目し、AD におけるかゆみ過敏のメカニズムの解明と難治性かゆみの治療法開発に向けて、1) AD 発症 NC/Nga マウスの DRG で発現が増加

するかゆみ増強因子の探索、2) リポカリン 2 (LCN2) を標的とした AD 発症 NC/Nga マウスにおける鎮痒及び抗炎症効果、3) LCN2 による皮膚炎増悪メカニズムの解明について検討した。

3. 研究の方法

(1) AD 発症 NC/Nga マウスの DRG で発現が増加するかゆみ増強因子の探索

ダニ虫体成分(Dfb)含有軟膏を用いて、AD 様症状を NC/Nga マウスの特定部位に短期間(3週間)で誘発するモデルを採用した(Yamamoto et al., Allergol Int 2007; 56:139-148)。4% SDS 溶液で NC/Nga マウスの背部皮膚のバリアを破壊後、ピオスタ AD 軟膏を週 2 回 100 mg/site で塗布し、この操作を 3 週間行うことで AD 発症マウス(AD-NC/Nga)を作製した。また 4% SDS 溶液を週 2 回、3 週間反復塗布した NC/Nga マウスは、AD 未発症のコントロールマウス(Ctrl-NC/Nga)として本研究に用いた。

AD-NC/Nga マウスの DRG におけるかゆみ関連受容体 (IL-31R α , NK1R) 及び SGC マーカー (GLAST, GFAP)の発現量を定量的 RT-PCR 法で解析し、コントロール群と比較検討した。

Ctrl-NC/Nga 及び AD-NC/Nga マウスの DRG からタンパク質抽出液を調製し、AD-NC/Nga マウスの DRG で発現増加するかゆみ増強候補因子をサイトカインアレイ法により探索した。また、この候補因子の DRG における発現量及び発現分布は、定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロットティング及び免疫染色法により解析した。

上記、で発現量が増加した分子に着目し、Dfb 含有軟膏反復塗布による AD 誘発時の DRG におけるかゆみ関連受容体と SGC マーカー遺伝子・タンパク質の経時的な発現変動について定量的 RT-PCR 法及びウェスタンブロットティングにより解析した。

(2) LCN2 を標的とした AD 発症 NC/Nga マウスにおける鎮痒及び抗炎症効果

抗 LCN2 中和抗体 (1 μ g/5 μ L) を Dfb 軟膏塗布の開始とともに週 2 回の頻度で 3 週間、NC/Nga マウスの髄腔内に投与した。

投与 3 週間後の NC/Nga マウスにおける搔破行動を SCLABA-Real で観察し、搔破行動回数を control IgG 群と比較検討した。

抗 LCN2 中和抗体群の皮膚炎をスコア化し、control IgG 群と比較検討した。

(3) LCN2 による皮膚炎増悪メカニズムの解明

NC/Nga マウスから DRG を採取後、器官培養し、LCN2 を添加した。LCN2 添加後、DRG から mRNA 及びタンパク質を調製し、かゆみ関連受容体 (IL-31RA, NK1R) 及び LCN2 と複合体を形成する MMP-9 (matrix metalloprotenase-9)の発現変動を定量的 RT-PCR 法及びウェスタンブロットティングにより解析した。

Ctrl-NC/Nga 及び AD-NC/Nga マウスの DRG から mRNA 及びタンパク質を調製し、LCN2 及び MMP-9 の発現変動を定量的 RT-PCR 法及びウェスタンブロットティングにより解析した。

ラット初代 DRG 細胞に LCN2 (0.3 μ g/well)を添加し、DRG 細胞の神経突起伸長に対する影響を溶媒コントロール群と比較検討した。

AD 患者 (16 名) から血液を採取し、血清に分離、調製後、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)にて、血清中における LCN2、MMP-9 及び LCN2-MMP-9 複合体量を測定し、健常者 (15 名)と比較検討した。

4. 研究成果

(1) AD 発症 NC/Nga マウスの DRG で発現が増加するかゆみ増強因子の探索

定量的 RT-PCR 解析により、Ctrl-NC/Nga マウスと比較し、AD 様病態を発症させた NC/Nga マウス (AD-NC/Nga) の DRG ではかゆみ関連受容体 (IL-31RA 及び NK1R) 及び SGC マーカーである GFAP 及び GLAST 遺伝子の発現量が有意に増加することが明らかとなった。

次に、AD の DRG においてかゆみに関与する新規分子を同定することを目的に、Ctrl-NC/Nga 及び AD-NC/Nga マウスの DRG から抽出したタンパク質溶液をサイトカインアレイに供した。その結果、分泌性糖タンパク質であり、自然免疫に関与するリポカリン 2 (LCN2) が AD-NC/Nga マウスの DRG において増加していることを見出した。

免疫組織学化学法により DRG における LCN2 の発現部位を検討した結果、LCN2 は主に GLAST (SGC マーカー) と共局在しており、SGC に発現していることが明らかとなった。また Ctrl-NC/Nga マウスと比較して、AD-NC/Nga マウスの DRG では LCN2 陽性 SGC 数が有意に増加していた。さらに、AD-NC/Nga マウスの DRG 細胞は、LCN2 受容体である 24p3R を発現していた。

近年、LCN2 は脊髄レベルで AD におけるかゆみの増強に関与していることが報告されている。このことから、SGC 由来の LCN2 は、AD におけるかゆみの増強に関与している可能性が考えられた。

(2) LCN2 を標的とした AD 発症 NC/Nga マウスにおける鎮痒及び抗炎症効果

H29 年度は前年度に同定した LCN2 に着目し、AD-NC/Nga マウスの皮膚炎及びかゆみ行動に

に対する抗 LCN2 中和抗体の髄腔内投与の影響について検討した。

Ctrl-NC/Nga マウスと比較して、ダニ虫体成分(Dfb)含有軟膏の反復塗布により AD 様病態を発症させた AD-NC/Nga マウスの DRG では、AD 誘発 1 週目から LCN2 mRNA の発現量が増加した。このため、抗 LCN2 中和抗体を AD 病態誘発と同時に髄腔内投与したところ、AD 誘発 3 週目の皮膚炎スコアが control IgG 投与群と比較して有意に低下することが明らかとなった。

一方、搔破行動回数はいずれの投与時においても、抗 LCN2 中和抗体投与群及び control IgG 投与群の間において有意差は認められなかった。

加えて、LCN2 を AD 未発症の NC/Nga マウスの髄腔内に投与しても NC/Nga マウスの搔破行動及びアロネーシス行動は誘発されなかった。以上のことから、かゆみ感覚の変調に対する LCN2 の関与性は低い一方、皮膚炎の増悪に關与することが示唆された。

(3) LCN2 による皮膚炎増悪メカニズムの解明

前年度の成果に基づき、H30 年度は LCN2 による皮膚炎増悪メカニズムの解明に向けて研究を展開した。

その結果、1) 器官培養したマウス DRG に LCN2 を添加したところ、かゆみ関連受容体である IL-31RA 及び NK1R の発現量は変化せずに、matrix metalloproteinase (MMP)-9 の発現量が有意に増加した。2) Ctrl-NC/Nga マウスと比較して、AD-NC/Nga マウスの DRG では、AD 誘発 2 週目から LCN2 及び MMP-9 タンパク質の発現量が有意に増加した。In vitro DRG 培養系を用いた検討から、3) LCN2 は培養 DRG 細胞の神経突起伸長を有意に促進した。

さらに、4) AD 患者の血清中の LCN2、MMP-9 及び LCN2-MMP-9 複合体量は、健常人と比較して有意に高かった。AD 皮膚における神経線維の増加は神経を介した炎症、すなわち神経原性炎症を引き起こす。したがって、SGC から分泌された LCN2 は、DRG 細胞の MMP-9 発現を増加させ、神経線維の伸長を促すことで AD における皮膚炎の増悪に關与していることが示唆された。

総じて、本研究では DRG における LCN2 のかゆみへの関与は低く、その一方で皮膚炎の増悪に關与している可能性を世界で初めて明らかにした。今後は、LCN2 及びその受容体を標的とする AD の新規治療法の開発に向けて研究展開していく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 45 件)

1. Aizawa N, Ishiuj Y, Tominaga M, Sakata S, Takahashi N, Yanaba K, Umezawa Y, Asahina A, Kimura U, Suga Y, Takamori K, Nakagawa H. Relationship between the degrees of itch and serum lipocalin-2 levels in patients with psoriasis. *J Immunol Res.* 2019;8171373, 2019. doi: 10.1155/2019/8171373.
2. Iwanaga T, Tominaga M, Hirata Y, Matsuda H, Shimanuki T, Ogawa H, Takamori K. Effects of film dressings on itch hypersensitivity using murine dry skin models. *Acta Derm Venereol.* 98: 902-903, 2018. doi: 10.2340/00015555-2998.
3. Kamata Y, Sakaguchi A, Umehara Y, Suga Y, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Bepotastine besilate downregulates the expression of nerve elongation factors in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 91: 219-222, 2018. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.04.012.
4. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Antimicrobial peptides human β -defensin-3 and LL-37 regulate the expression of axon guidance molecules in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 88, 365-367, 2017. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.07.010.
5. Torigoe K, Tominaga M, 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.

[学会発表](計 86 件)

1. 高橋伸明、富永光俊、鎌田弥生、松田浩則、原田達広、須賀康、小川秀興、高森建二。イミキモド誘発乾癬様病態モデルマウスの痒み行動における μ オピオイド受容体及び κ オピオイド受容体の関与。第 33 回日本乾癬学会学術大会、松山全日空ホテル、愛媛、2018 年 9 月 7 日 ~ 9 月 8 日
2. Takahashi N, Tominaga M, Kosaka R, Matsuda H, Suga Y, Ogawa H, Takamori K. Involvement of satellite glial cell derived lipocalin-2 in the pathogenesis of NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. 第 42 回日本研究皮膚科学会、高知市文化プラザかるぼーと、高知、2017 年 12 月 15 日 ~ 17 日
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. 9th World Congress on Itch, Wroclaw, Poland, October 15-17, 2017
4. Kosaka R, Tominaga M, Takahashi N, Toyama S, Ogawa H, Nishiyama C, Takamori K.

Involvement of spinal microglia in the pathogenesis of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis model mice. 9th World Congress on Itch, Wroclaw, Poland, October 15-17, 2017

5. Tominaga M, Takahashi N, Kimura U, Kamata Y, Umehara Y, Suga Y, Ogawa H, Takamori K. Serum lipocalin-2 is a potential biomarker for pruritus in patients with psoriasis. 第41回日本研究皮膚科学会, 仙台国際センター, 仙台, 2016年12月9日~11日

〔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. Kamata Y, Tominaga M, Takamori K. Itch in atopic dermatitis management. Curr Probl Dermatol. Karger; 50, 86-93, 2016. doi: 10.1159/000446048.
3. Tominaga M, Takamori K. Atopic dermatitis: Pruritus Second Edition. Springer Science+Business Media; 2016. Chapter 19.

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: アトピー性皮膚炎治療薬

発明者: 富永光俊、幸坂涼平、高森建二.

権利者: 学校法人順天堂

種類: 特許

番号: 特願 2017-114978 号

出願年: 2017年6月12日

国内外の別: 国内

名称: 掻痒性皮膚疾患の予防又は治療薬

発明者: 楠部史也、富永光俊、高森建二.

権利者: 学校法人順天堂

種類: 特許

番号: 特願 2017-028908 号

出願年: 2017年2月20日

国内外の別: 国外

○取得状況(計1件)

名称: セマフォリン3Aの発現調節法

発明者: 鎌田弥生、富永光俊、高森建二.

権利者: 学校法人順天堂、東レ株式会社

種類: 特許

番号: 特許番号: 特許第 6385341 号

取得年: 2018年8月17日

国内外の別: 国内

〔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

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kankyo_igaku/k4_takamori.html

かゆみと真剣勝負、かゆみの克服を目指して!

https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kankyo_igaku/kayumi/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 富永 光俊

ローマ字氏名: (TOMINAGA, mitsutoshi)

所属研究機関名: 順天堂大学

部局名：大学院医学研究科
職名：先任准教授
研究者番号（8桁）：50468592

研究分担者氏名：鎌田 弥生
ローマ字氏名：(KAMATA, yayoi)
所属研究機関名：順天堂大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：00410035

研究分担者氏名：梅原 芳恵
ローマ字氏名：(UMEHARA, yoshie)
所属研究機関名：順天堂大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：40707072

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。