

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15337

研究課題名(和文)透析患者の臨床試料を用いた痒み因子の同定と臨床治療への応用

研究課題名(英文) Identification of itch mediators using clinical samples of dialysis patients and application to clinical treatment

研究代表者

安東 嗣修 (ANDOH, Tsugunobu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：50333498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎不全による血液透析患者の痒みの発生機序の解明を試みた。透析患者の血清中の2マイクログロブリン(2-MG)が増加していた。マウスを用いた実験から2-MGが、痒み因子であることに加え、TRPV1陽性一次感覚神経を直接活性化することで痒みを誘発することも明らかにした。慢性腎不全誘発掻痒マウスモデルの開発に成功し、2-MG、IL-31、並びにアラキドン酸代謝物はその痒みに関与することを見出した。更に、慢性腎不全患者の皮膚では、IL-31等の痒み因子が表皮で発現していることも見出した。以上の結果から、これら痒み因子が、慢性腎不全の痒みの新たな治療ターゲットになることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎不全による透析患者は、皮膚の乾燥並びに非常に激しい痒み訴える。このことは、透析自体による生活の質の低下に加え、痒みによる苦痛並びに不眠症に悩まされる。従って、痒み抑制は、患者にとって非常に重要である。しかし、このような痒みは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、新規治療薬の開発や治療ターゲットの発見が重要である。本研究において、透析患者の臨床試料並びに新たに開発した病態動物モデルを用いて痒みの新規治療ターゲットとしてヒスタミン以外に2 microglobulin、IL-31及びアラキドン酸代謝物を見出したことは学術的にも社会的にも非常に意義のある成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The elucidation of the mechanism of itching in hemodialysis patients with chronic renal failure was investigated. 2 microglobulin (2-MG) in the serum of dialysis patients was increased. In addition to the finding that 2-MG was an itch mediator, it was demonstrated that 2-MG elicited itching through direct activation of TRPV1-expressed primary afferents. We succeeded in developing a mouse model with a chronic renal failure-related itching, and found that 2-MG, IL-31, and arachidonic acid metabolites were involved in itching. Furthermore, in the skin of hemodialysis patients with chronic renal failure, it was also found that itch mediators, such as IL-31, were expressed in the epidermis. These results suggest that these itch mediators may be new therapeutic targets for chronic renal failure-related itching

研究分野：薬理学

キーワード：痒み 慢性腎不全 2マイクログロブリン ヒスタミン ロイコトリエンB4 トロンボキサンA2 インターロイキン-31

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

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全による透析患者数は、2013年の統計では全国で約32万人である(日本透析医学会調査)。慢性腎不全の発症年齢が約66歳となっている(日本透析医学会調査)。高齢化人口の増加に加え、透析患者の若年層の割合も増加している為、更に透析患者数の増加が予測される。透析患者の約75%に激しい「痒み」があり、また、その内半数に痒みによる睡眠障害が認められるという報告がある(大森ら、透析会誌、2001)。「痒み」は、非常に不快な感覚であり、上述の様に睡眠障害を招くなど患者の生活の質(Quality of Life)の低下にもつながる為、そのコントロールは非常に重要である。これまで、透析患者の痒みは、透析用血液濾過器の影響が大きいと考えられてきたが、実際には透析前に既に痒みが生じていること、また、透析用血液濾過器の変更では痒みはコントロールできないことが明らかになっている。透析患者の痒みの薬物治療においては、痒みの第一選択薬の抗ヒスタミン薬や抗アレルギー薬では、透析患者の痒みはコントロールが難しい。平成21年に日本で開発されたオピオイド作動薬ナルフラフィンが透析患者の痒み治療薬として承認され、使用されてきたが、不眠など高頻度の副作用に加え、平成25年度第8回国際痒み会議や透析専門医の臨床報告において、その有効性に否定的な報告が多数あった。そのため、透析患者の痒みに対し他の治療薬選択に有用な情報や新規治療薬が無いのが現状である。この原因に、透析患者の痒みの発生機序が不明であることが挙げられる。

2. 研究の目的

慢性腎不全患者及び慢性腎不全が原因で透析を受けている患者の痒みの発生機序を臨床試料の活用並びに慢性腎不全の動物モデルの作出とその活用を通して解明し、臨床における痒み治療への情報を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

〔実験動物〕

雄性ICR系マウスを使用した。富山大学実験動物委員会の承認の下、実験を行った。

〔臨床試料の解析〕(百瀬医師：寿泉堂クリニック)

透析患者の血清、皮膚病理解析は、連携研究者である百瀬医師による倫理委員会の承認の下行った。

〔慢性腎不全マウスモデルの作出〕

麻酔下マウスの右腎臓の2/3を切除し、縫合1週間後に左腎臓を全摘出した(Wei et al., 2013)。その1週間後より行動観察を開始した。偽手術群は、左右背部皮膚を切開し、縫合するのみの処置を行った。

〔マウスの血液検査〕

マウスの血液検査は、株式会社モノリスに依頼した。

〔角質水分量の測定〕

皮膚角質水分量は、Corneometer® CM825 (Courage & Khazawa, Germany)を用いて測定した。

〔行動実験〕

マウスを観察用アクリルケージ(13×9×35 cm/cell)に入れ、1時間以上観察環境に馴化した。その後、無人環境下にデジタルビデオカメラで行動を撮影した。撮影後、ビデオカメラの再生により、後肢による全身の掻き動作をカウントした。一部の実験では、皮内注射部位およびその近傍への掻き動作をカウントした。マウスは、1秒間に数回掻くので足を挙げて降ろす一連の掻き動作を掻き動作の1回としてカウントした(Kuraishi et al., 1995)。

〔免疫染色〕

皮膚切片及び後根神経節ニューロンの免疫組織学的解析は、常法により行った。

〔インターロイキン-31及びトロンボキサンB₂の測定〕

皮膚中のインターロイキン-31及びトロンボキサンB₂の測定は、酵素結合免疫吸着法(ELISA法)により、キット(Abnova Co., TaiwanあるいはCayman Chem., USA)を用いて行った。

〔マウス後根神経節ニューロン及びケラチノサイトの初代培養〕

マウス後根神経節を摘出し、コラゲナーゼ並びにトリプシン処理を行い、ポリリジンコーテ

イングされたガラスボトムディッシュに播種し、培養した (Andoh et al., 2009)。ケラチノサイトに関して、新生児マウス皮膚をコラゲナーゼ処理し、コラーゲンコートディッシュあるいはガラスボトムディッシュに播種し、培養した (Andoh et al., 2009)。

〔 2-マイクログロブリン、Erk 及びリン酸化 Erk の検出〕

皮膚中の 2-マイクログロブリンや Erk 及びリン酸化 Erk の検出は、ウエスタンブロッティングにより行った。

4. 研究成果

〔慢性腎不全掻痒マウスモデルの作出と痒みの発生機序〕

マウスの腎臓左右合わせて 5/6 切除により、切除後、皮膚の乾燥及び血清中の血清尿素窒素やクレアチニンの増加が認められ、慢性腎不全となっていることが確認された。また、ヒトでは、血清あるいは血漿中の 2-マイクログロブリンやインターロイキン-31 の濃度が増加することが知られている。本マウスモデルの皮膚において、これら因子の増加が認められた。さらに、本マウスモデルにおいて、5/6 切除 4 週間後をピークとして自発的掻き動作が増加することを見出した。この自発的掻き動作の増加は、 μ オピオイド受容体拮抗薬により抑制されたことから、痒みに起因した動作であることが示唆される (慢性腎不全掻痒マウスモデルとしての確立)。

慢性腎不全掻痒マウスモデル皮膚切片を用いたトルイジンブルー染色による検討により、皮膚マスト細胞数をカウントしたが、偽手術群と比較して皮膚マスト細胞数に変化はなかった。さらに、H1 ヒスタミン受容体拮抗薬は、本マウスモデルの自発的掻き動作を抑制しなかった。以上の結果は、慢性腎不全掻痒マウスモデルの自発的掻き動作の誘発に、マスト細胞 ヒスタミン系の関与が、臨床と同様に小さいことが示唆される。

さらに、慢性腎不全掻痒マウスモデルの自発的掻き動作への様々な薬物の効果を検討した。オピオイド受容体拮抗薬、PAR2 プロテアーゼ受容体中和抗体及び 5-HT₃ 受容体拮抗薬は、本マウスモデルの自発的掻き動作を抑制しなかった。一方、抗アレルギー薬、BLT ロイコトリエン B₄ 受容体拮抗薬及び TP トロンボキサン A₂ 受容体拮抗薬によって、自発的掻き動作が抑制された。

以上の結果より、慢性腎不全掻痒マウスモデルの自発的掻き動作に、2-マイクログロブリン (本研究で痒み因子であることを明らかにした: 次項参照) やインターロイキン-31 に加え、ロイコトリエン B₄ 及びトロンボキサン A₂ が関与することが示唆される。

〔 2-マイクログロブリンと痒み〕

2-マイクログロブリンは、アミノ酸 99 個からなる低分子タンパク質であり、腎機能の低下で糸球体濾過量が低下するため、慢性腎不全患者では 2-マイクログロブリン血清中濃度が上昇する。本研究においても透析患者血清中や慢性腎不全掻痒マウスモデルの皮膚中では、2-マイクログロブリンが増加していた。マウス吻側背部への 2-マイクログロブリンの皮内注射により注射部位への掻き動作が増加した。また、この動作は、 μ オピオイド受容体拮抗薬により抑制され、更に、頬への 2-マイクログロブリンの皮内注射により後肢による掻き動作が生じたが、前肢による擦り動作は生じなかった。このことは、2-マイクログロブリンによって誘発される掻き動作が痒みに起因した動作であること、さらにこの因子が痒み因子であることを示唆する。

2-マイクログロブリンによる掻き動作は、H₁ ヒスタミン受容体拮抗薬、BLT ロイコトリエン B₄ 受容体拮抗薬、TP トロンボキサン A₂ 受容体拮抗薬及び PAR2 プロテアーゼ受容体中和抗体により抑制されなかった。一方、TRPV1 カプサイシン受容体拮抗薬やカプサイシン処置により TRPV1 受容体発現一次感覚神経の脱感作処置は、2-マイクログロブリン誘発の掻き動作を抑制した。そこで、2-マイクログロブリンが直接一次感覚神経を刺激して掻き動作を誘発した可能性を調べるべく、一次感覚神経の細胞体である後根神経節ニューロンの初代培養を用いて検討した。後根神経節ニューロンの初代培養に 2-マイクログロブリンを作用させると、興奮したニューロンのマーカーである転写因子 Erk のリン酸化が認められた。この Erk のリン酸化を示したニューロンの大部分が TRPV1 発現陽性ニューロンであった。さらに、Erk のリン酸化レベルも 2-マイクログロブリンにより増加することも認められた。

以上の結果より、2-マイクログロブリンは、直接、TRPV1 受容体発現陽性一次感覚神経をして掻き動作を誘発することが示唆される。

〔インターロイキン-31 誘発痒み関連動作とトロンボキサン A₂〕

インターロイキン-31 は、痒み因子として知られており、また、慢性腎不全患者やマウスモデルにおいてもその増加が認められている。我々は、これまでにインターロイキン-31 誘発痒み関連動作にロイコトリエン B₄ が関与することを明らかにしてきた (Andoh et al., 2017)。本研究では、同じアラキドン酸代謝物であり、痒み因子の一つであるトロンボキサン A₂ のインターロイキン-31 誘発痒み関連動作への関与に関して検討した。マウスへのインターロイキン

-31 の皮内注射により掻き動作が誘発され、この動作は TP トロンボキサン A₂ 受容体拮抗薬によって抑制された。皮膚におけるインターロイキン-31 受容体及びトロンボキサン合成酵素は、主に表皮ケラチノサイトに発現していた。インターロイキン-31 のマウスへの皮内注射及びケラチノサイト初代培養への作用により、トロンボキサン A₂ 産生が増加した(トロンボキサン A₂ はすぐにトロンボキサン B₂ へとすぐに代謝される為、実際にはトロンボキサン B₂ を測定)。以上の結果から、マウスにおけるインターロイキン-31 誘発痒み関連動作にはロイコトリエン B₄ に加え、トロンボキサン A₂ も関与することが示唆される。

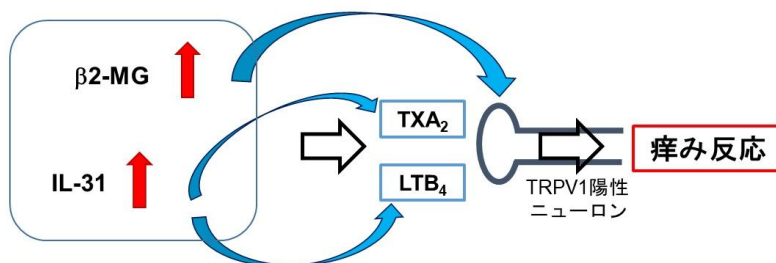
〔透析患者皮膚の免疫組織学的解析〕

慢性腎不全による透析患者の皮膚組織学的解析では、痒みに関連するインターロイキン-31、腫瘍壊死因子-1 及びエンドセリン-1 の表皮での発現が認められたが、セロトニンの発現は認められなかった。今後さらに臨床試料の解析を進める予定である。

〔まとめ〕

本研究では、慢性腎不全掻痒マウスモデルを作出し、慢性腎不全による透析患者から得られて情報を基に、痒みの発生機序の解明を行い、2-マイクログロブリンが新たな痒み因子の一つであることを明らかにした。さらに、慢性腎不全の痒みのメカニズムとして、2-マイクログロブリンによる TRPV1 発現陽性一次感覚神経への直接作用、インターロイキン-31 によるケラチノサイトへの作用によるロイコトリエン B₄ 産生に加え、トロンボキサン A₂ 産生を介した系が関与することを見出した(下図)。臨床試料の収集は着実に増えてきているが、その解析は本研究期間では全てできなかったため、今後さらに臨床医と共に解析を継続し、痒みの治療や新薬開発のターゲット分子の同定にその情報を活用する予定である。

慢性腎不全掻痒マウスモデルにおける痒みの発生機序
(本研究のまとめ)



β2-MG: β2-マイクログロブリン
IL-31: インターロイキン-31
TXA₂: トロンボキサンA₂
LTB₄: ロイコトリエンB₄
TRPV1: カプサイシン受容体

< 引用文献 >

Andoh T, Harada A, Kuraishi Y. Involvement of Leukotriene B₄ Released from Keratinocytes in Itch-associated Response to Intradermal Interleukin-31 in Mice. *Acta Derm Venereol.*, 97: 922-927 (2017).

Andoh T, Saito A, Kuraishi Y. Leukotriene B₄ mediates sphingosylphosphorylcholine-induced itch-associated responses in mouse skin. *J Invest Dermatol.*, 129: 2854-60 (2009).

Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesciogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol.*, 275: 229-33 (1995).

Wei FN, Chen ZL, Yang HF, Han L, Ding HM, Deng SG, Ou RM, Ou AH, Liang YF, Hu ZH, Wang J, Yang XH, Yang NZ. Effect of Sanqi Oral Liquid on the expressions of CD4⁺, CD8⁺ and CD68⁺ cells in 5/6 nephrectomized rats with chronic renal failure. *Chin J Integr Med.*, 19: 589-95 (2013).

大森健太郎ら、透析皮膚そよう症の実態 新潟県内 41 施設 2474 名の調査報告、日本透析医学会雑誌、34 : 1469-1477 (2001)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sikai Li, Tsugunobu Andoh, Qun Zhang, Daisuke Uta, Yasushi Kuraishi、2-Microglobulin,

interleukin-31, and arachidonic acid metabolites (leukotriene B₄ and thromboxane A₂) are involved in chronic renal failure-associated itch-associated responses in mice, *European Journal of Pharmacology*, 査読有、Vol. 847、2019、19-25
DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.01.017
Tsugunobu Andoh, Sikai Li, Daisuke Uta, Involvement of thromboxane A₂ in interleukin-31-induced itch-associated response in mice, *Pharmacological Report*, 査読有、Vol. 70、2019、251-257
DOI: 10.1016/j.pharep.2017.10.001
Tsugunobu Andoh, Yuta Asakawa, Yasushi Kuraishi, Non-myelinated C-fibers, but not myelinated A-fibers, elongate into the epidermis in dry skin with itch, *Neuroscience Letters*, 査読有、vol. 672、2018、84-89
DOI: 10.1016/j.neulet.2018.02.034
Tasusku Akiyama, Tsugunobu Andoh, Eiji Ohtsuka, Hiroshi Nojima, Hidekazu Ouchi, Hiroki Takahata, Yasushi Kuraishi, Peripheral gabapentin regulates mosquito allergy-induced itch in mice, *European Journal of Pharmacology*, 査読有、vol. 833、2018、44-49
DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.05.037
Tsugunobu Andoh, Takahito Maki, Sikai Li, Daisuke Uta, 2-Microglobulin elicits itch-related responses in mice through the direct activation of primary afferent neurons expressing transient receptor potential vanilloid 1, *European Journal of Pharmacology*, 査読有、Vol. 810、2017、134-140
DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.07.007

〔学会発表〕(計 10 件)

安東嗣修、「かゆみ(痒み)」のいろいろ、県民カレッジ連携講座 放送大学富山学習センター「冬のオープンセミナー」、2019(招待講演)
安東嗣修、皮膚の痒み発症メカニズムについて、ルパフィン学術集会、2018(招待講演)
Tsugunobu Andoh, Yuta Asakawa, Yasushi Kuraishi, Characteristics of primary afferent nerve fibers elongated into the epidermis in dry skin with itch, The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2018)、USA、2018
Tsugunobu Andoh, Sikai Li, Takahito Maki, Daisuke Uta, Yasushi Kuraishi, Pharmacological and histochemical characterization of a mouse model of chronic renal failure-associated pruritus, 9th World Congress on Itch, Poland、2017
Tsugunobu Andoh, Takahito Maki, Sikai Li, Daisuke Uta, Involvement of beta2-microglobulin and transient receptor potential vanilloid 1-expressed primary afferent neurons in uremic pruritus, The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, USA、2017
安東嗣修、痒みのメカニズム：動物モデルを用いた最新の痒み研究第116回日本皮膚科学会総会、2017(招待講演)
牧 俊人、李 嗣凱、歌 大介、安東嗣修、新規痒み因子 2 マイクログロブリンの発見と痒み発生機序、日本薬学会北陸支部第129回例会、2017(優秀発表賞)
安東嗣修、シャンプーや台所洗剤等に含まれる界面活性剤によって起こる痒みの発生メカニズム 痒み研究最前線、平成29年度富山大学サテライト講座、2017
安東嗣修、アレルギー性皮膚炎による掻痒と創薬ターゲット、生体機能と創薬シンポジウム2016、2016
安東嗣修、皮膚における痒みの発生機序、池田模範堂株式会社講演会、2016(招待講演)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：透析による痒みのバイオマーカー
発明者：安東嗣修，牧 俊人
権利者：富山大学
種類：特許
番号：特願 2017-039135
出願年：平成 29 年
国内外の別：国内

(1)研究協力者

研究協力者氏名：百瀬 昭志
ローマ字氏名：MOMOSE Akishi

研究協力者氏名：牧 俊人
ローマ字氏名：MAKI Takahito

研究協力者氏名：李 嗣凱
ローマ字氏名：LI Sikai

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。