

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19720

研究課題名(和文)末梢神経と免疫細胞のクロストーク 「皮膚掻痒のメカニズム解析を目指して」

研究課題名(英文) Crosstalk between peripheral nerves and immune cells "To analyze the mechanism of skin pruritus"

研究代表者

中嶋 千紗 (Chisa, Nakashima)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50733573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚アレルギー疾患、例えばアトピー性皮膚炎患者の多くはかゆみを有しているが、そのメカニズムの詳細についてはまだ不明な部分が多い。また近年の報告で、アトピー性皮膚炎患者では、症状の増悪時に皮膚常在細菌叢の菌の種類が著しく減少し、黄色ブドウ球菌が過半数を占めると報告されている。そこで、我々は黄色ブドウ球菌の死菌をマウス耳介に塗布し慢性皮膚炎を誘発し、皮膚末梢神経と免疫細胞の役割について検証した。その中で、皮膚末梢神経と好塩基球が協調して黄色ブドウ球菌誘発皮膚炎の形成に寄与していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎をはじめとする多くの皮膚疾患は難治のかゆみを有するが、かゆみを制御する有効な治療法は未だ確立されているとは言えない。黄色ブドウ球菌誘発マウスモデルを利用し、末梢神経や免疫細胞の役割を解明することで、かゆみ制御につながる基盤研究となりうる。

研究成果の概要(英文)：Many patients with allergic skin diseases, such as atopic dermatitis (AD), have itching, but the details of the mechanism have still unknown. Recent studies have revealed that microbial dysbiosis, Staphylococcus aureus (S. aureus) colonization in particular, is correlated with disease severity in AD. Therefore, to evaluate the role of S. aureus in skin inflammation, we applied heat-killed S. aureus to the mice ears, and examined the role of skin peripheral nerves and immune cells. In it, it was proven that skin peripheral nerves and basophils cooperated and contributed to the formation of S. aureus-induced dermatitis.

研究分野：皮膚

キーワード：末梢神経 好塩基球

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

健康人の皮膚では知覚神経線維は主として、表皮直下および真皮内に分布している。一方で、アトピー性皮膚炎（AD）患者や乾皮症患者では多数の知覚神経線維が表皮内に侵入し、増生する。表皮内に増生した神経線維は、外的刺激に容易に反応しやすくなりかゆみ増悪の要因となることが報告されている（Tominaga M., et al. J Dermatol Sci. 40-46. 2009）。また、AD患者の増生した末梢神経の周りには、多数の好酸球が浸潤していることも知られている（EL Foster, et al. Plos One. 2011）。

近年注目されている起痒に重要な物質として**インターロイキン（IL）-31**や**Thymic stromal lymphopoietin（TSLP）**がある。IL-31は主にTh2細胞から分泌されるIL-6サイトカインファミリーの一員であり、ADや気管支炎・肺炎、寄生虫腸炎などTh2型免疫応答や発症に重要である。IL-31は肥満細胞からも分泌されるが、好酸球や好塩基球が分泌するかどうかはわかっていない。また、TSLPは主に上皮細胞によって産生されるIL-7様サイトカインで、AD患者の皮膚や気管支喘息患者の気道上皮で発現が上昇しており、アレルギー反応におけるマスタースイッチとして作用することが示唆されている。IL-31、TSLPいずれのサイトカインも末梢神経に受容体が発現しており、投与により著明な搔破行動の増加を認める（SR Wilson, et al. Cell. 285-95. 2013）。

またそれ以外の既知の起痒物質であっても、末梢での搔痒の伝達経路について新しい知見の報告が相次いでいる。たとえば、ヒスタミンでは、末梢神経のヒスタミン1（H1）受容体に結合した後に熱感受性一過性受容体電位パニロイド1（TRPV1）イオンチャネルを活性化するなど、搔痒の伝達経路の詳細な解明がすすんでいる（DM Bautista, et al. Nature Neuroscience. 175-182.2015）。しかしながら、このような起痒物質と神経伸長および免疫担当細胞との関係性は依然として不明である。

我々はこれまで、好酸球や好塩基球を特異的に除去できる遺伝子改変マウスを用いて刺激性接触皮膚炎の研究を行ってきた。その中で**好塩基球が好酸球の浸潤を調節する**ことを見出した。好塩基球と好酸球が共存するヒト皮膚疾患として、AD、痒疹、水疱性類天疱瘡、疥癬、好酸球性毛包炎などが知られており、**好酸球と好塩基球の共存するいずれの疾患も搔痒が著明である**という共通点に着目した。これら疾患では真皮および表皮内に多くの免疫担当細胞が浸潤していることから、**皮膚搔痒時における好酸球や好塩基球を中心とした免疫担当細胞と末梢神経とのクロストーク**を解き明かしたいと考えた（図1）。

バリア破壊、アレルゲン

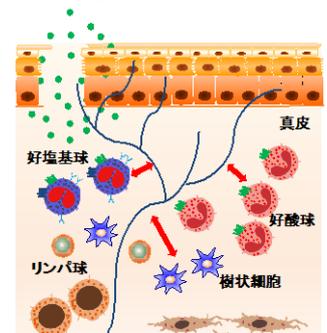


図1 末梢神経の可視化を行い、免疫担当細胞とのクロストークを解明する

2. 研究の目的

そう痒は生活の質（quality of life, QOL）を低下させる身体症状の一つである。特に難治性のそう痒はQOLを著しく低下させ、既存の治療では効果が不十分な事から新規治療法の開発は緊要の課題である。そう痒を伴う皮膚疾患では、好酸球や好塩基球の著明な細胞浸潤が観察されるが、これら免疫細胞と末梢神経のクロストークについてはほとんど解っていない。そこで我々は、**皮膚そう痒時の末梢神経の動態と好酸球や好塩基球を始めとする免疫細胞との関係性**に着目することとした。

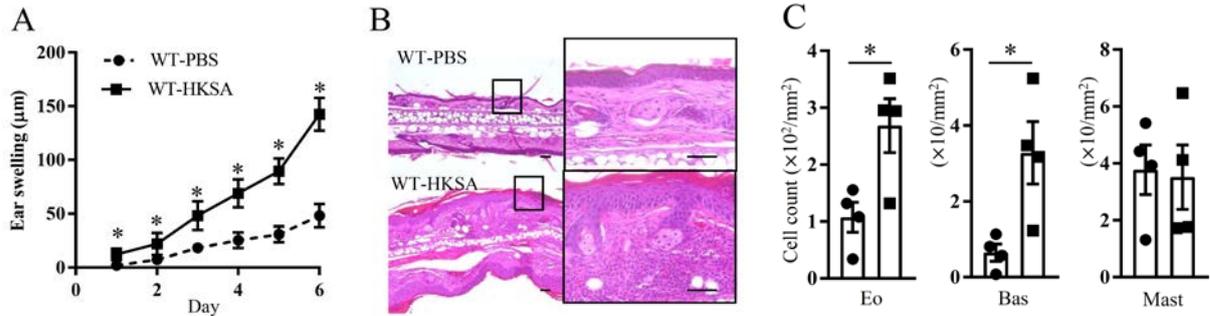
また、ADの増悪時、皮膚常在細菌叢の菌の種類が著しく減少し、黄色ブドウ球菌が過半数を占めると近年報告されている。また、皮膚常在細菌の一つであるカンジダ菌による皮膚炎では皮膚末梢神経が直接カンジダ菌を認識し、ある種の神経ペプチドを介し、真皮樹状細胞に働き感染防御に働くと報告された。しかしADで浸潤する好塩基球と末梢神経

の関係については明らかになっていない。そこで、我々は黄色ブドウ球菌を塗布し慢性皮膚炎を誘発し、末梢神経と好塩基球の役割について主に検証した。

3. 研究の方法

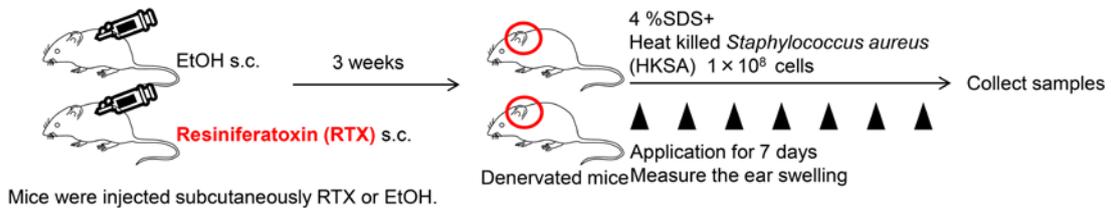
①黄色ブドウ球菌誘発皮膚炎モデルの作成

まず、黄色ブドウ球菌の死菌（Heat killed *S. aureus*: HKSA）と界面活性剤である SDS をマウス耳介に 7 日間連続で塗布することで下図 A-C に示すような耳介腫脹と皮膚局所への好酸球や好塩基球の浸潤を認めた。



②好塩基球除去マウス、薬剂的除神経モデル

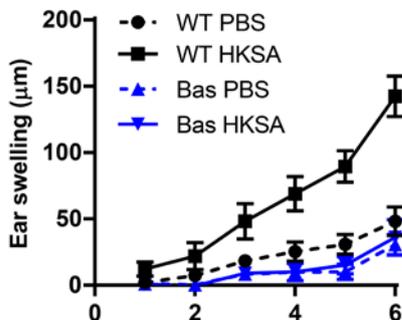
好塩基球の役割を検討するために、ヒトジフテリアトキシン受容体(DT-R)を挿入した好塩基球特異的 DT-R Tg マウス(BasTRECK Tg マウス)を用いた。また末梢神経の役割を検討するために、ルシニフェラトキシンを用いた薬剂的除神経モデル(下図)を実施した。



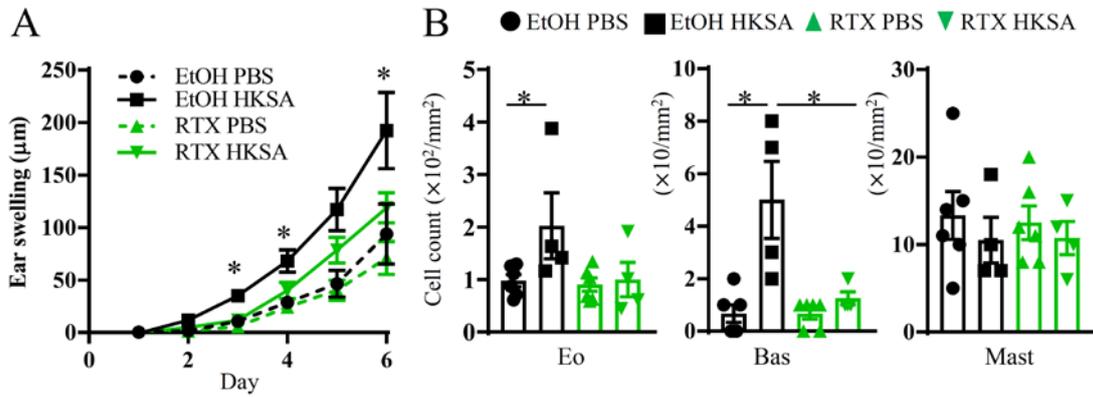
4. 研究成果

①好塩基球除去マウスや薬剂的除神経モデルにおける黄色ブドウ球菌誘発皮膚炎

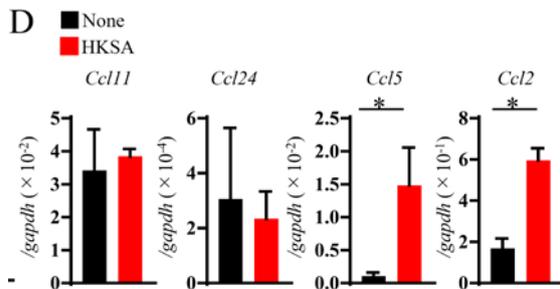
好塩基球除去マウスを用いると、黄色ブドウ球菌誘発皮膚炎における耳介腫脹の減弱を認めた。



続いて、薬剂的除神経モデルにおいて、同様の皮膚炎を誘発すると耳介腫脹が減弱し、好塩基球の皮膚への浸潤も低下していることが分かった。さらに、薬剂的除神経モデルの皮膚局所におけるケモカイン産生を測定したところ、好塩基球の遊走にかかわると知られている CCL5/RANTES や CCL2/MCP-1 の産生が低下していることがわかった。



また、脊髄後根神経節 (DRG) を採取し培養したのちに、黄色ブドウ球菌の死菌や、黄色ブドウ球菌の壁構成成分であるリポテイコ酸で刺激すると、DRG からの CCL5 や CCL2 の産生が濃度依存性に増加することが分かった。またリポテイコ酸で刺激した DRG の培養上清を用いることで *in vitro* において好塩基球の走化性が増加することがわかった。以上より好塩基球と末梢神経が黄色ブドウ球菌誘発皮膚炎の形成に関わっていると考えられた。



5. 主な発表論文等

- Iga N, Otsuka A, Yamamoto Y, Nakashima C, Honda T, Kitoh A, Nakajima S, Egawa G, Nomura T, Dainichi T, Matsushita S, Tanizaki H, Yamamoto Y, Funakoshi T, Fujisawa Y, Fujimura T, Hata H, Ishida Y, Kabashima K. Accumulation of exhausted CD8⁺ T cells in extramammary Paget's disease. *PLoS One* 2019; 14:e0211135.
- Nakashima C, Otsuka A, Seidel JA, Kabashima K. The effect of oral royal jelly administration on skin barrier function: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Eur J Dermatol* 2018; 28:563-4.
- Ishida Y, Nakashima C (Equally contributed 1st author), Kojima H, Tanaka H, Fujimura T, Matsushita S, Yamamoto Y, Yoshino K, Fujisawa Y, Otsuka A, Kabashima K. Killer immunoglobulin-like receptor genotype did not correlate with response to anti-PD-1 antibody treatment in a Japanese cohort. *Sci Rep* 2018; 8:15962.
- Ueharaguchi Y, Honda T, Kusuba N, Hanakawa S, Adachi A, Sawada Y, Otsuka A, Kitoh A, Dainichi T, Egawa G, Nakashima C, Nakajima S, Murata T, Ono S, Arita M, Narumiya S, Miyachi Y, Kabashima K. Thromboxane A2 facilitates IL-17A production from Vg4⁺ gd T cells and promotes psoriatic dermatitis in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142:680-3. e2.
- Wong LS, Otsuka A, Yamamoto Y, Nonomura Y, Nakashima C, Kitayama N, Usui K, Honda T, Kabashima K et al. TRPA1 channel participates in tacrolimus-induced pruritus in a chronic contact hypersensitivity murine model. *J Dermatol Sci* 2018; 89:207-9.

6. Nakashima C, Otsuka A, and Kabashima K. Basophils and M2 macrophages infiltrate the lesional skin of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: A case report. *Eur J Dermatol.* 2017; 1;27(5) :552-553
7. Rerknimitr P, Tanizaki H, Yamamoto Y, Amano W, Nakajima S, Nakashima C, Nonomura Y, Wititsuwannakul J, Miyachi Y, Otsuka A, Kabashima K. Decreased Filaggrin Level May Lead to Sweat Duct Obstruction in Filaggrin Mutant Mice. *J. Invest. Dermatol.* 2017; 137:248-51.

〔雑誌論文〕（計 7 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

〔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 なし

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 なし

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。