

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07111

研究課題名(和文)慢性掻痒の神経伝達機構における炎症性因子の役割解明

研究課題名(英文) Investigation on the role of the inflammatory factors in the neuro transduction of chronic pruritus

研究代表者

深澤 洋滋 (Fukazawa, Yohji)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70336882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、慢性掻痒モデルマウスの引っ掻き行動の発現には、雌雄の区別なく脊髄後角でのGRP-GRPRシステムが重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、痒み情報の中枢への伝達にはGRPR陽性ニューロンの活性化が中心的な役割を果たし、その活性化にはGRPとグルタミン酸の協調的な遊離が関与することが示唆された。さらに、GRP産生ニューロンの局在を化学遺伝学的手法であるDREADDシステムにより検討したところ、GRP産生ニューロンは脊髄後角と脳の顔面神経核に局在し、そのニューロンの活性化が引っ掻き行動の発現に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GRPの生理的条件下での痒みへの役割が報告されて以降、痒みに関する神経科学研究では種々の神経ペプチドの役割の解明に焦点が当てられてきた。本研究ではげっ歯類においてGRPおよびグルタミン酸がGRPR陽性ニューロンの興奮に関与すること、脊髄後角での介在ニューロンからのGRPの遊離によるGRPR陽性ニューロンの興奮が、痒み伝達に重要であることを明らかにした。本研究が目指すGRPR陽性ニューロンは、げっ歯類から霊長類まで普遍的にその生理的機能が保存されていることから、本研究結果はヒトの慢性掻痒の病態分子基盤の解明に基礎的な知見を提供するとともに、新規治療法の確立に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that the GRP-GRPR system in the spinal dorsal horn played a crucial role in the expression of scratching behavior in chronic pruritus animal models, regardless of their sex. Furthermore, the activation of GRPR-positive neurons was found to play a central role in the transmission of itch sensation to the central nervous system, and it suggests that the coordinated release of GRP and glutamate is involved in this activation. Additionally, the localization of GRP-producing neurons was investigated using the chemogenetic technique known as the DREADD system. We discovered that GRP-producing neurons were localized in the spinal dorsal horn and the facial nucleus in the brain, and the activation of these neurons was shown to be critical for the expression of scratching behavior.

研究分野：神経薬理学

キーワード：掻痒 ガストリン放出ペプチド DREADD 脊髄 乾癬 接触性皮膚炎 性差 AMPA

1. 研究開始当初の背景

痒みは“掻きたい”という衝動を伴う不快な感覚であり、皮膚表面の有害成分を排除するための警告信号と考えられている。その一方で、アトピー性皮膚炎などの慢性皮膚疾患における病的な痒みは耐え難い苦痛であり、患者の生活の質を著しく低下させるため、臨床において大きな問題となっている。2010年に報告された世界の疾病負担研究によると、負担の大きい50種類の一般的な症状の中に痒みが含まれており、慢性掻痒は総人口の約1/5に影響を及ぼすとも言われている。しかし、従来用いられてきた抗ヒスタミン薬やステロイドでは十分な治療効果が得られない痒みが数多く存在し、新しい着眼点に基づく新規抗掻痒薬の開発が求められている。

約15年前にガストリン放出ペプチド (gastrin releasing peptide: GRP) が脊髄における痒み伝達を特異的に制御することが報告され、痒みの神経科学的研究が飛躍的に進展してきた。我々のグループも脊髄内での痒み伝達における GRP の役割について研究を重ねているが、慢性掻痒における GRP-GRPR システムの役割についてのエビデンスが極めて少ないのが現状である。そこで、本研究はこれまでの研究結果を踏まえ、慢性掻痒において脊髄における GRP-GRPR 神経系の関与およびその調節について検討するものである。

2. 研究の目的

本研究では、慢性掻痒における GRP-GRPR システムの役割について各種慢性掻痒病態モデル動物を用いて明らかにするとともに、その機能変化を担う新規脊髄内調節因子を同定することを目的とする。GRP が脳や脊髄において痒みを惹起することは以前より知られているが、生理的条件下におけるその発現細胞やその機能については見解が分かっている。我々はこれまで十分に理解されていなかった GRP-GRPR システムの機能的意義を精査することにより、GRPR 陽性ニューロンが種々の痒みを統合する責任ニューロンであることを証明した。さらに GRP-GRPR システムがげっ歯類のみならず霊長類においても普遍的に痒み伝達を制御することを既に報告しており、世界をリードする最先端の痒み研究を進めている。そこで、本研究では、新しい遺伝子改変マウスを用いることにより、接触性皮膚炎および乾癬の慢性掻痒病態モデルにおける GRP-GRPR システムの機能ならびに痒みに係わる因子を評価することにより、慢性掻痒における病態分子基盤の解明を試みるものであり、社会的・経済的な波及効果も大きく期待できるものである。

3. 研究の方法

1) 接触性皮膚炎モデルマウスでの痒み伝達における脊髄内 GRP-GRPR システムの関与

マウスにジフェニルシクロプロペノン (DCP) を14日間にわたり反復塗布し、皮膚の紅斑・腫脹とともに長期的な痒みを生じる接触性皮膚炎モデルを作成した。痒みの指標として引っ掻き行動を DCP の投与後40分間にわたり計測した。頸髄における GRP, GRPR および AMPA 受容体のサブタイプである GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 の mRNA の発現を RT-qPCR にて評価した。また、DCP 反復塗布14日目の頸髄における GRP および GRPR に発現を免疫組織化学的に可視化した。さらに GRP-Cre マウスを ROSA26-STOPflox-hM4Di マウスと交配させ、GRP 産生ニューロンにおいて Cre 依存的に変異型ヒトムスカリン受容体を発現するマウスを作製した。DCP 投与30分前に GRP-Gi-DREADD マウスに Clozapine-N-Oxide (CNO) を0.3 mg/kg を腹腔内投与し、GRP 陽性細胞の活動抑制の影響を引っ掻き行動を指標として計測した。また、Bombesin-saporin ターゲットトキシンを実験の7日前に250 ng を脊髄クモ膜下腔内投与し、DCP 誘発掻痒に及ぼす影響についても検討を行った。

2) 乾癬モデルマウスでの痒み伝達における脊髄内 GRP-GRPR システムの関与

5%のイミキモドを含有するベルセナクリームを7日間にわたり GRP-Gi-DREADD マウスに反復塗布することにより乾癬モデルマウスを作成し、乾癬面積および重症度インデックスにより乾癬の程度を評価した。GRP-Gi-DREADD 乾癬モデルマウスに CNO を0.3 mg/kg を腹腔内投与および3 nmol を脊髄くも膜下腔内に投与し、GRP 陽性細胞の活動抑制の影響を引っ掻き行動を指標として計測した。さらに、Bombesin-saporin ターゲットトキシンを実験の14日前に250 ng を GRP-

Gi-DREADD 乾癬モデルマウスの脊髄クモ膜下腔内投与し、乾癬モデル誘発搔痒に及ぼす影響について検討を行った。

3) 脊髄内 GRP 産生細胞の慢性搔痒への関与

DREADD システムを活用し GRP 産生細胞にヒト Gq 共役型ムスカリン 3 受容体(hm3Dq)を発現する雄性および雌性マウスを作成した。雌雄 GRP-Gq-DREADD マウスの GRP 産生細胞の中樞神経での局在を HA-tag 染色により検討した。また、雌雄 GRP-Gq-DREADD マウスに CNO を腹腔内 (0.1-3 mg/kg)、脊髄くも膜下腔内 (3 nmol)、脳室内 (3 nmol) 投与を行い、GRP 陽性細胞の活動活性化の影響を引っ掻き行動を指標として計測した。また、カプサイシン類似物質であるレシニフィラトキシン(RTX)を3日間にわたり 30, 70, 100 μ g/kg と増加させ腹腔内に投与することにより TRPV1 陽性 C 線維を不活性化した GRP-Gq-DREADD マウスを作成し、このマウスへの CNO の腹腔内投与 (1 mg/kg) の影響についても検討を行った。

4. 研究成果

1) 接触性皮膚炎モデルマウスでの痒み伝達における脊髄内 GRP-GRPR システムの関与

接触性皮膚炎モデルマウスにおける経時的な引っ掻き行動の増加に伴い、脊髄での GRP mRNA および GRPR mRNA の有意な発現の増加が認められた。また、免疫組織学的検討においても、モデルマウスの引っ掻き行動に伴い、アセトン処置を行ったコントロールと比べて GRP 陽性細胞および GRPR 陽性細胞の増加が認められた。接触性皮膚炎モデルマウスにおける引っ掻き行動の増加に伴う脊髄でのグルタミン酸受容体の関与について、AMPA 型グルタミン酸受容体のサブユニットの遺伝子発現の変化を検討したところ、GluR1 および GluR2 mRNA 発現の増加が観察された。Gi-DREADD 系を用いた GRP 陽性ニューロンの抑制は、有意にマウスの引っ掻き行動を抑制し、GRPR のリガンドであるボンベシンにサポリン毒素を結合させたターゲットトキシンを用いた検討でも有意にマウスの引っ掻き行動を抑制した。これらの結果から、接触性皮膚炎モデルマウスでは引っ掻き行動の増加に伴い脊髄内の GRP-GRPR システムおよび AMPA 受容体の活性化が引き起こされること、GRP 産生細胞の抑制は引っ掻き行動を有意に減弱するが完全でなく、さらに GRPR 陽性細胞の枯渇は引っ掻き行動をほぼ消失させることから、脊髄における痒み伝達には GRP およびグルタミン酸の双方が情報伝達に重要であり、GRPR 陽性細胞の活性化がその中心にあることが明らかとなった。

2) 乾癬モデルマウスでの痒み伝達における脊髄内 GRP-GRPR システムの関与

マウスにイミキモドの反復投与を行ったところ、4日目から10日目には乾癬様皮膚炎がみられ、激しい引っ掻き行動が認められるようになった。また、これらのマウスにおける GRP および GRPR の mRNA の発現を確認したところ、日数が経過するに従って有意な発現の増強が共に認められた。乾癬モデルマウスの難治性搔痒に対する脊髄内 GRP-GRPR システムの役割を解析するため、GRP-Gi-DREADD マウスにおける GRP 陽性細胞の抑制操作および GRPR のターゲットトキシンである Bombesin-saporin をマウスの脊髄くも膜下腔内に投与し GRPR を発現するニューロンを枯渇させた。すると、GRP ニューロンの抑制では有意に引っ掻き行動が抑制され、ターゲットトキシンの事前投与では乾癬様皮膚炎は発症するものの、引っ掻き行動は有意に抑制された。これらの結果から乾癬様モデルマウスにおいてもマウスの引っ掻き行動の発現には脊髄での GRP-GRPR システムが重要であることが明らかとなった。

3) 脊髄内 GRP 産生細胞の慢性搔痒への関与

脊髄後角での痒み情報伝達に重要な神経伝達物質である GRP の産生細胞の局在を特定するため、DREADD システムを活用し GRP 産生細胞にヒト Gq 共役型ムスカリン 3 受容体(hm3Dq)を発現させ、GRP 産生細胞を HA-tag 染色により可視化したところ、マウスにおいて雌雄の区別なく共に脊髄後角に局在することが明らかとなった。また、hm3Dq の特異的リガンドである CNO を投与することにより GRP 産生細胞の活性化を図り、中樞神経での GRP 遊離が引き起こす影響についての検討では、雌雄のマウスにおいて CNO の用量依存的な引っ掻き行動を引き起こすことが明らかとなった。さらに、神経活動の指標となる c-fos 染色においても、脊髄後角での有意な活動

が確認されたことから、脊髄における GRP 産生細胞は脊髄後角に局在することが明らかとなった。CNO の投与ルートの違いによるマウスの引っ掻き行動の発現の違いを検討するため、CNO の脊髄クモ膜下腔内投与および脳室内投与を行った。その結果、腹腔内投与時と同様に、脊髄クモ膜下腔内投与および脳室内投与を行った雌雄のマウスに経時的な引っ掻き行動の増加を確認することができた。これらのことから、脊髄および脳内に GRP 産生細胞が存在し、共にマウスの引っ掻き行動に関与することが明らかとなった。さらに、脳内における hM3Dq 発現 GRP 産生細胞の分布を確認するために HA-tag 染色を行ったところ、顔面神経核に強い陽性反応が認められた。一方、三叉神経に関連する領域では弱い陽性反応しか認められなかった。さらに、RTX の投与により TRPV1 陽性 C 線維を不活性化することにより末梢からの入力を排除した状態の GRP-Gq-DREDD マウスにおいて、脊髄での GRP の遊離による引っ掻き行動の発現を検討したところ、TRPV1 陽性 C 線維を不活性化していないコントロールマウスと同様、TRPV1 陽性 C 線維を不活性化した GRP-Gq-DREDD マウスへの CNO の腹腔内投与は、明らかな引っ掻き行動を引き起こすことが観察された。これらの結果により、中枢神経には GRP 産生介在ニューロンが存在し、その活性化により引っ掻き行動が引き起こされることが示唆された。

本研究により、慢性掻痒モデルマウスの引っ掻き行動の発現には、雌雄の区別なく脊髄後角における GRP-GRPR システムが重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、痒み情報の中枢への伝達には GRPR 陽性細胞が責任ニューロンであり、その活性化には GRP とグルタミン酸の協調的な遊離が関与することが示唆された。さらに、GRP 産生細胞の局在については現在も活発な議論が交わされているが、化学遺伝学的手法である DREDD システムによる検討では、GRP 産生細胞は脊髄後角と脳の顔面神経角に局在し、その細胞の活性化が引っ掻き行動の発現に重要であることが明らかとなった。これらの成果は、慢性掻痒の病態分子基盤の解明に基礎的な知見を提供するとともに、新規治療法の開発に寄与することが期待できるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kiguchi Norikazu, Fukazawa Yohji, Saika Ayano, Uta Daisuke, Saika Fumihiro, Nakamura Tomoe Y., Ko Mei Chuan, Kishioka Shiroh	4. 巻 9
2. 論文標題 Chemogenetic activation of central gastrin releasing peptide expressing neurons elicits itch related scratching behavior in male and female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiguchi Norikazu, Saika Fumihiro, Fukazawa Yohji, Matsuzaki Shinsuke, Kishioka Shiroh	4. 巻 40
2. 論文標題 Critical role of GRP receptor?expressing neurons in the spinal transmission of imiquimod induced psoriatic itch	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 287 ~ 290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi Norikazu, Uta Daisuke, Ding Huiping, Uchida Hitoshi, Saika Fumihiro, Matsuzaki Shinsuke, Fukazawa Yohji, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Ko Mei-Chuan, Kishioka Shiroh	4. 巻 170
2. 論文標題 GRP receptor and AMPA receptor cooperatively regulate itch-responsive neurons in the spinal dorsal horn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108025 ~ 108025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2020.108025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	木口 倫一 (Kiguchi Norikazu) (90433341)	和歌山県立医科大学・薬学部・准教授 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------