

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08302

研究課題名(和文)新規治療ターゲットとしての汗中ヒスタミンの産生機序と病的意義の解析

研究課題名(英文) Analysis of histamine production in sweat glands and its pathogenic roles in skin allergic disease

研究代表者

高萩 俊輔 (Takahagi, Shunsuke)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：40448246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト、マウスの皮膚では汗腺にヒスタミン産生酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)蛋白が発現した。単離マウス汗腺でもHDC遺伝子が発現し、細胞外マトリクス内で培養すると、培養上清と細胞外マトリクス内でヒスタミン上昇が検出され、汗腺のヒスタミン産生能が示された。また、マウス汗腺ではヒスタミンの代謝や輸送に関わる遺伝子が発現し、あるサイトカイン刺激でHDC発現が増強した。一方、汗中の代表的な炎症性サイトカインIL-1もマウス汗腺で産生され、ある受容体刺激により発現量は増加した。マウス汗腺は、ヒスタミンやIL-1の炎症性メディエータを産生して、皮膚アレルギー疾患の病態に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで皮膚アレルギー領域において、ヒスタミン産生細胞として好塩基球と肥満細胞が広く知られてきたが、本研究ではこれらの細胞以外に皮膚に備わる付属器からもヒスタミンが産生されうることを示した。また、汗腺がヒスタミンやIL-1の炎症性メディエータを産生することは、これらのメディエータの産生抑制や阻害は、発汗と関連する皮膚アレルギー疾患の新しい治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Histidine decarboxylase (HDC) protein, a histamine-producing enzyme, was detected in human and mouse skin sweat glands. Mouse sweat glands also expressed the HDC gene in in-vitro experiments. Culture of sweat glands in extracellular matrix induced histamine production in the culture supernatant and extracellular matrix, indicating that sweat glands have histamine-producing capacity. In addition, genes involved in histamine metabolism and transport were detected in mouse sweat glands, and HDC expression was enhanced by cytokine stimulation. IL-1, a proinflammatory cytokine in sweat, was also produced in mouse sweat glands and its expression was increased via a receptor signaling. This study suggests that mouse sweat glands produce proinflammatory mediators such as histamine and IL-1, and may be associated with the pathogenesis of sweat-related cutaneous allergic diseases.

研究分野：皮膚アレルギー疾患

キーワード：汗腺 ヒスタミン IL-1 コリン性蕁麻疹 アトピー性皮膚炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

汗は、皮膚アレルギー疾患の誘因・悪化因子としてその病態形成に関与する。アトピー性皮膚炎では発汗の多い夏季に汗貯留部位に一致して皮疹が悪化し、コリン性蕁麻疹では入浴や運動、精神的緊張などの発汗刺激に伴って点状の膨疹が惹起される。これまでアトピー性皮膚炎やコリン性蕁麻疹の患者皮膚組織では汗が汗腺から真皮内に漏出していること(Yamaga K et al. J Invest Dermatol 2018; 138: 1279-87.)、ヒト汗中には高濃度のヒスタミンや炎症性サイトカインが含まれていること(Takahagi S et al. Allergol Int 2020; 69: 307-09.)が報告されている。これら起炎症性物質を含む汗が真皮内に漏出することで、アトピー性皮膚炎やコリン性蕁麻疹における皮疹の形成に関与する可能性が示唆される。しかし、起炎症性物質がどのようにして汗中に混入するかは解明されていない。

また、ヒト汗中に含まれるヒスタミンは、コリン性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎などの皮膚アレルギー疾患のみならず、一部の健常人においても検出されうることから、汗中ヒスタミンには生理的役割と病的意義の両面が想定される。汗中に混入したヒスタミンが皮膚表面へ排出される過程でなんらかの異常をきたすことにより、汗中ヒスタミンの産生過剰や、真皮へのヒスタミンを含む汗の漏出が生じて、皮膚アレルギー疾患の皮疹形成につながると推測される。現時点では、ヒスタミンなどの汗中炎症性ヒスタミンの表皮ケラチノサイトや真皮線維芽細胞への影響は不明である。

そこで、本研究では、汗中ヒスタミンの産生源と、産生されたヒスタミンの汗中への分泌機構を解析し、どのようにして病態形成に寄与しうるかを検討することを目的として開始した。

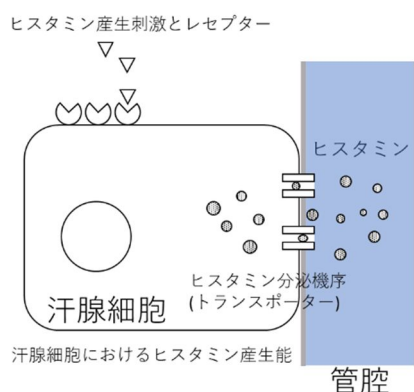
2. 研究の目的

本研究では、汗中ヒスタミンの産生源として汗腺細胞に着目し、汗腺細胞におけるヒスタミン産生と、汗中への分泌機構を解析することを目的とした。また、汗腺細胞におけるヒスタミン産生・分泌機構を促進あるいは抑制する物質を探索した。まず、ヒト、マウス皮膚組織において、ヒスタミン産生酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)の発現を確認した。その後、ヒスタミン産生・分泌機構の解析や、それらの反応を増強する物質の探索を行うため、マウス汗腺組織を用いた in-vitro あるいは in-vivo 実験系を用いた解析を行った。一方、汗中にはヒスタミン以外にも多数の炎症性メディエータが含まれており、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 の汗腺における産生についても、ヒスタミンの解析系を利用して解析した。

また、発汗刺激によりコリン性蕁麻疹、皮膚の疼痛や全身の無汗症をさまざまな程度で有する患者がいる。このような患者群の詳細は不明であり、臨床データや汗中ヒスタミンなどの臨床的特徴を明らかにした。

3. 研究の方法

(図1)



・発汗時痛を呈する患者における汗中、血中ヒスタミンの解析：発汗刺激時に皮膚の疼痛を訴える患者の臨床データ、汗中・血中ヒスタミンを解析した。

・ヒト、マウス汗腺における HDC 発現：パラフィン包埋した切片を用いて免疫染色で解析した。

・汗腺の分離と培養：C57BL/6 マウスから足底皮膚を採取して、酵素処理することで汗腺組織を一塊にして採取した。得られた汗腺の構造を維持したまま、培養液あるいは細胞外マトリックス内で三次元培養し、以下の実験に供した。

・ヒスタミン産生の解析：汗腺から mRNA、蛋白を抽出して、HDC 発現を real-time PCR、ウエスタンブロット法で解析した。また、細胞外マトリックス内で三次元培養を行い、汗腺細胞内、上清中のヒスタミンを HPLC で測定した。

・ヒスタミン代謝の解析・分泌機序の解析：汗腺から mRNA、蛋白を抽出して、ヒスタミンの代謝に関与する蛋白の発現、ヒスタミントランスポーターの発現を解析した。

・ヒスタミン産生増強因子の同定：汗腺細胞のヒスタミン産生を増強する機序を検討するため、汗腺培養系に種々の刺激因子、サイトカインを添加して誘導される HDC mRNA 発現を解析した。

・汗腺細胞による炎症性サイトカインの産生の解析：ヒスタミン産生機序の解析に用いた系を利用して、汗腺組織におけるヒスタミン以外の炎症性サイトカインの産生を解析した。

4. 研究成果

(1) 発汗時痛を呈する患者における汗中、血中ヒスタミンの解析

発汗刺激時に皮膚の疼痛を訴える患者の臨床データを解析した。発汗刺激で生じる皮膚の疼痛は、若年男性に好発し、持続時間は短時間で、多くはコリン性蕁麻疹様の皮疹や無汗を伴って生じるが、疼痛のみを呈する患者もいることを明らかにした。疼痛には汗中あるいは血清中のヒスタミンが関与する可能性が考えられた。

(2) ヒト、マウス皮膚組織における HDC 発現 (図 2)

ヒト皮膚、C57BL/6 マウス足底皮膚から得たパラフィン包埋切片を免疫染色し、ヒト・マウスともに汗腺組織で HDC 蛋白が発現していることが観察された。以降、マウス足底皮膚の汗腺組織を用いて解析を進めることとした。

(3) 汗腺の分離と培養方法の確立

C57BL/6 マウスの足底から得た皮膚を酵素処理することで汗腺組織を一塊として単離する方法を確立した。単離した汗腺を培養液中で浮遊培養あるいはマトリゲル中に包埋することによる培養方法を確立した。浮遊培養では培養する時間が長くなるにつれて汗腺細胞に形態変化を来したが、マトリゲル内に包埋して培養することで比較的長い期間細胞の維持を可能とした。

(4) 汗腺における HDC 発現とヒスタミン産生能 (図 2)

C57BL/6 マウスから単離した汗腺における HDC 遺伝子発現を PCR で解析し、単離したマウス汗腺でも HDC 遺伝子が発現していることを確認した。次に、実際に産生されたヒスタミンを測定するために、採取したマウス汗腺および表皮をマトリゲル内に配置して培養し、上清中のヒスタミン濃度と、マトリゲル内の汗腺をホモジナイズした抽出液中のヒスタミン濃度を測定した。結果、培養汗腺の抽出物中には著明なヒスタミン産生が検出され、また汗腺を培養した上清においてもヒスタミン濃度の上昇を認めた。

(5) 汗腺におけるヒスタミン代謝の解析・分泌機序 (図 2)

マウス汗腺から抽出した mRNA を用いて、細胞内で産生されたヒスタミンの代謝や輸送に関わる遺伝子が発現することを PCR で検出した。

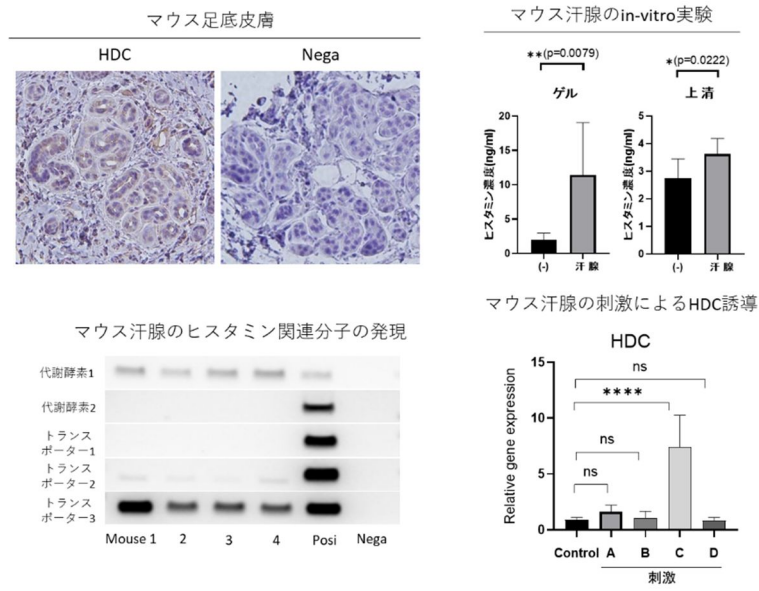
(6) 汗腺におけるヒスタミン産生増強因子の同定 (図 2)

In-vitro の汗腺培養系に種々の神経ペプチドやサイトカインを添加して、誘導される HDC 遺伝子の発現量を測定したところ、一部のサイトカイン刺激で HDC 発現が増強した。ウエスタンブロット法による HDC 蛋白半定量は実現できなかったが、汗腺に当該サイトカイン刺激を加え培養し、汗腺細胞内、培養上清のヒスタミン濃度を測定したところ、刺激によりヒスタミン濃度が上昇した。

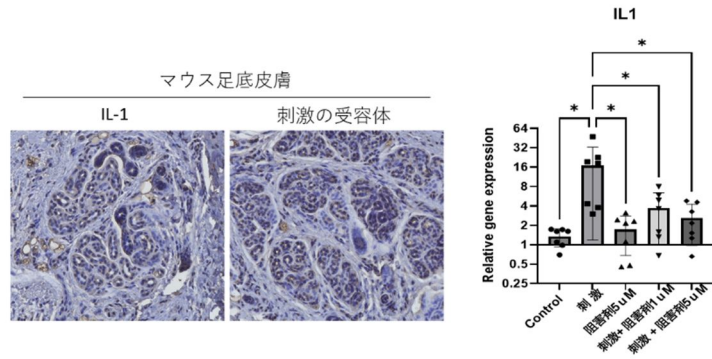
(7) 汗腺における炎症性サイトカインの産生

汗中にはヒスタミン以外にも多数の炎症性メディエータが含まれており、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 の汗腺における産生についても検討した。Real-time PCR とウエスタンブロット法により、マウス汗腺は IL-1 を産生すること、一部の受容体刺激により発現量は増加し、その阻害剤を添加することにより抑制されることを明らかにした。また、免疫染色によりマウス汗腺組織において IL-1 および当該受容体が発現することを確認した。

(2)



(3)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yanagida N, Takahagi S, Tanaka A, Hide M	4. 巻 102
2. 論文標題 Propylthiouracil-induced Alopecia Accompanying Hypohidrosis and Onychomadesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Derm Venereol	6. 最初と最後の頁 adv00763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2340/actadv.v102.2690	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 Numata T, Takahagi S, Ishii K, Morioko S, Kan T, Mizuno H, Yanase Y, Kawaguchi T, Tanaka A, Hide M	4. 巻 13
2. 論文標題 Immunological Changes of Basophil Hyperreactivity to Sweat in Patients With Well-Controlled Atopic Dermatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 883605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.883605	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 Saito R, Takahagi S, Nakano F, Furutani K, Mihara S, Numata T, Kameyoshi Y, Tanaka T, Shindo H, Niimi N, Iwamoto K, Hiragun T, Hiragun M, Tanaka A, Hide M	4. 巻 49
2. 論文標題 A survey on subtypes and clinical characteristics of 1061 patients with urticaria in the primary care institutes in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 1255-1262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16562	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 -
1. 著者名 Takahagi S, Okamoto M, Ishii K, Tanaka A, Mizuno H, Harada N, Yanagida N, Hide M.	4. 巻 71
2. 論文標題 Clinical and histological characterization of transient dermal pain triggered by sweating stimuli.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 362-372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yanagida N, Takahagi S, Aoyama Y, Tanaka A, Hide M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Anhidrosis accompanied with cholinergic urticaria-like rash and dermal pain in a patient with Sjogren 's syndrome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 666-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 水野隼登, 高萩俊輔, 岡本真由美, 秀 道広.	4. 巻 28
2. 論文標題 無汗部位と異なる範囲に疼痛を生じた特発性後天性全身性無汗症の1例.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 発汗学	6. 最初と最後の頁 31-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 沼田智史, 高萩俊輔, 秀 道広.	4. 巻 4
2. 論文標題 【アトピー性皮膚炎のスキンケア】アトピー性皮膚炎では汗の減少と感染症はどのように関連しているのか?.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 美容皮膚科	6. 最初と最後の頁 33-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takahagi Shunsuke, Hide Michihiro, Aoyama Yumi, Fukunaga Atsushi, Murota Hiroyuki	4. 巻 102
2. 論文標題 A single-blind, randomized, crossover study on the efficacy of icatibant for sweating-induced dermal pain (icatibant for sweating-induced dermal pain)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e33971 ~ e33971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/md.00000000000033971	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shunsuke Takahagi
2. 発表標題 Recent progress in understanding and managing urticaria
3. 学会等名 The 12th Asian Dermatological Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高萩俊輔、柳田のぞみ、田中暁生、秀 道広
2. 発表標題 全身性の乏汗と爪甲脱落症を伴った薬剤性円形脱毛症の1例
3. 学会等名 第30回日本発汗学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高萩俊輔
2. 発表標題 蕁麻疹の診断と治療
3. 学会等名 第5回日本アレルギー学会中国・四国地方会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takahagi S
2. 発表標題 Review and perspective of allergic skin diseases associated with sweating
3. 学会等名 2021 GA2LEN UCARE Urticaria Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田智子, 玉理紗帆, 柳田のぞみ, 高萩俊輔, 亀頭晶子
2. 発表標題 特発性分節性無汗症の1例
3. 学会等名 第149回日本皮膚科学会広島地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高萩俊輔
2. 発表標題 イントロダクション「発汗障害と皮膚の疼痛」
3. 学会等名 第29回日本発汗学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳田のぞみ, 高萩俊輔, 田中暁生, 秀 道広
2. 発表標題 発汗刺激時にコリン性蕁麻疹様皮疹と皮膚の疼痛を呈したシェーグレン症候群の1例
3. 学会等名 第29回日本発汗学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高萩俊輔
2. 発表標題 蕁麻疹の診断、検査、治療
3. 学会等名 第10回総合アレルギー講習会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川本一陽, 坂本拓海, 高萩俊輔, 新津佳恵
2. 発表標題 トピラマートによる薬剤性無汗症の1例
3. 学会等名 第152回日本皮膚科学会広島地方会
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------