

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月25日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510241

研究課題名（和文）抗かゆみ薬の探索を目的とする新規アッセイ法の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of assay systems for searching antipruritic drug.

研究代表者

奥 尚枝（OKU HISAE）

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：90281518

研究成果の概要（和文）：

アトピー性皮膚炎などの重篤なかゆみの治療薬の開発に有用な治療薬の開発を目的に、ストレスによるかゆみの増悪化現象を示す慢性かゆみモデルマウスと、それを用いたアッセイ法の構築を行った。本法は ddY 系マウスを卵白リゾチーム（HEL）で感作して作製する慢性かゆみモデルマウスに拘束ストレスを負荷した際の引っ掻き動作（＝かゆみ回避動作）回数の増悪化を指標にしたものである。さらに、本法の応用として、プロテオーム解析によるかゆみ関連タンパク質分子の探索、抗かゆみ活性を有する新たなシーズ植物と活性物質の探索を行った。

研究成果の概要（英文）：

We established the efficient a model mouse and assay system for searching antipruritic substances from natural source for the therapeutic drug of serious itches such as atopic dermatitis. This method monitors the frequency of scratching behavior of the hen egg-white lysozyme (HEL)-sensitized mouse (= chronic itching model) which exposed restraint stress. HEL-sensitized ddY mouse, in contrast to ddY mouse, have shown worsened the itchiness by stress like humans' atopic dermatitis case. For the search of the protein itch-related factor, we performed proteome analysis. We screened the antipruritic activity of several natural sources and found new seeds and isolated the successively active substance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2011年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
2012年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
総計	3,400,000円	1,020,000円	4,420,000円

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：かゆみ治療薬、アッセイ法、天然資源

1. 研究開始当初の背景

「痒み」はアトピー性皮膚炎患者などの多くの搔痒性疾患において重大かつ深刻な症状である。しかし、現状では満足な止痒薬が無く、開発が急がれる。

痒みの研究が痛みに比べて遅れている原因の一つとして、痒みが感覚的なもので、客

観的評価が難しく、有用な病態モデル動物がいなかったことが考えられる。しかし、1995年に倉石ら(参考文献1)により、マウスが後ろ足で皮膚を引っ掻く動作が痒み回避行動であることが科学的に立証された後、動物モデルを用いた痒みの研究が本格化し、数種の痒みモデルの確立と共に、痒みに関与するメ

ディエーター、受容体、神経伝達機構が徐々に明らかにされつつある(参考文献 2)。しかし、多数の因子が複雑に関与する重篤な痒みの本態の解明はまだ遠い。

申請者も、これまでに、先の本補助金により、一過性および慢性のかゆみモデルの確立とその応用からかゆみの因子やメカニズムに関する検討と、天然資源からのかゆみ抑制物質の探索を行ってきた。

アトピー性皮膚炎などの強いかゆみを伴うかゆみ過敏皮膚 (itchy skin) ではアレルギー、炎症細菌感染、神経線維異常伸長などの複数の病態が併発して生じる末梢(皮膚)での多様な起痒因子、さらにはストレスや嗜癩的引っ掻き(痒くないのに掻く)のような中枢性の因子が相互に複雑にからみあって、痒みの増悪や難治化が生じる可能性が推察されている。しかし、このような複数の病態や要因の併発した深刻なかゆみのメカニズムはまだ解明されておらず、それゆえ、有効な治療薬も無い。

そこで、本申請では、先の成果をもとに itchy skinの病態を反映する画期的な難治性痒みモデルとアッセイ法の構築と応用から、痒みの増悪や難治化メカニズムを解析し、独創的メカニズムの痒み抑制薬の開発を目指す。

[参考文献]

- 1) Kuraishi Y. et al., Eur. J. Pharmacol., 275, 229 (1995).
- 2) Abstracts of "5th International Workshop for the Study of itch" (2009).

2. 研究の目的

本申請では、以下の手順で、主として「ストレスによる痒みの増悪化、あるいは嗜癩的引っ掻き動作(痒くないのに掻く)の増悪化現象を示す病態モデルマウス」と、それを用いた *in vivo* アッセイ法の構築を目指した。さらに、その応用から、痒みの増悪・難治化メカニズムを解析し、独創的メカニズムの抗かゆみ物質を天然資源より探索し、抗かゆみ薬の開発に繋げる。

- (1) ストレスによる痒み増悪化の病態モデルマウスの作製およびアッセイ法の構築を行う。
- (2) プロテオーム解析により痒みの増悪化に関与する生体内因子の網羅的解析を行う。
- (3) *in vivo* アッセイ法を用いて、天然資源からかゆみ抑制物質の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) ストレスによる痒み増悪化の病態モデルの作製およびアッセイ法の構築

- ① 一過性および慢性かゆみ病態モデルマウスへの直接床電撃刺激法によるストレス負荷の影響

下記の一過性および慢性かゆみモデルマウスに直接床電撃刺激法によるストレスを負荷後、かゆみを惹起し、ストレス負荷の影響を検討した。

・一過性かゆみモデル:

前報(参考文献3)と同様に、無処置(健常皮膚)のddYマウスの首の後ろに脱顆粒惹起剤である compound 48/80 (COM) 3 mg/kgを皮下注射した後、マウスが後ろ足で注射部位を引っ掻く回数を20分間計測する。

・慢性かゆみモデル)

前報(参考文献3)と同様に、マウスを卵白リゾチーム (HEL) で感作する(0日目)。9日後に、マウスの首の後ろにCOM (2 mg/kg)を皮下注射し、マウスが後ろ足で注射部位を引っ掻く回数を20分間計測する。本モデルはHEL感作によるアレルギーの開始段階(induction phase)での様々な免疫応答の活性化病態を反映するほか(参考文献4)、末梢では瘀血に類似した微小循環障害を伴うことから、健常皮膚とは異なる起痒および持続メカニズムを評価できる。

[参考文献]

- 3) Ueda Y et al., Biol. Pharm. Bull., 28, 1786 (2005).
- 4) Ishiguro K. et al., FFF Journal, 202, 13 (2004).

② ストレス負荷法の検討

前述の直接床電撃刺激法にくらべ、比較的緩和なストレス負荷方法とされる下記のストレスを負荷したのち、同様にCOMを注射し、引っ掻き動作回数を測定した。ストレス未処置の場合と比較し、有意な増悪化が見られるか否か、再現性、操作の簡便さなどを検討した。

- ・ コミュニケーションボックスを用いた精神的ストレス
- ・ はさみでひげを短く切る
- ・ 過密飼育(10匹用ケージで20匹飼育)
- ・ 空気穴をあけたビニールチューブに拘束する。

③ 感作時のHEL濃度の検討

マウスにアレルギーの前段階を誘導するために行う感作のHEL濃度を、以下の3種類に変更して、慢性かゆみモデルを誘導した。これに拘束ストレスを負荷し、最も緩やかなアレルギー病態でストレスによる増悪化が観察できる濃度を検討した。

- ・ HEL 50 µg/50% CFA 50 µl (参考文献3と同じ)
- ・ HEL 25 µg/50% CFA 50 µl
- ・ HEL 12.5 µg/50% CFA 50 µl

④ 一過性および慢性かゆみモデルマウスへの拘束ストレスの影響

一過性およびHEL 12.5 µg/1匹で作製した慢性かゆみモデルマウスに、90分/dayまたは60分/dayの拘束ストレスを7または10日間負荷した後、COM 2mg/kgの皮下注射で、かゆみを惹起し、引っ掻き動作回数を計測した。

⑤ ストレスで増悪化する慢性かゆみモデルマウスをもちいたアッセイ法の確立

①から④を総合して、操作の簡便さ、短期間化、再現性、さらには動物への苦痛の最小化を考慮しアッセイ法を確立した。

(2) かゆみの増悪化に関する生体内因子の探索

増悪化の前後で増減する機能性タンパク質分子をプロテオーム解析で網羅的に解析する目的で、以下の検討を行った。

① 腸粘膜組織の解析

十分なタンパク質画分が得られるマウスの腸粘膜組織を用いて、可溶性タンパク質の抽出、精製、二次元電気泳動、タンパク質スポットの検出法などの条件の確立と解析を行った。

② 血液の解析

マウスより全血採血した血液を3000gで15分遠心分離して得た血清をサンプルとして、①と同様に解析した。

(3) 新規アッセイ法を用いた痒み抑制物質の探索

① 新しいシーズ植物の探索

民間あるいは漢方で、痒み関連疾患への適用が伝承されている天然資源の調査を行い、それらの植物について、*in vivo*アッセイ法による一次スクリーニングを行い、新しいシーズ植物を探索した。

② 活性物質の探索

見出したシーズから活性を指標に分画および各種カラムクロマトによる精製を繰り返して、活性物質の単離と構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) ストレスによるかゆみの増悪化病態モデルの作製とアッセイ法の構築

① 一過性および慢性かゆみ病態モデルマウスへの直接床電撃刺激法によるストレス負荷の影響

一過性かゆみモデルでは直接床電撃刺

激法によるストレス負荷で、引っ掻き動作が増加する傾向を示したが、有意差はなかった。一方、慢性かゆみモデルにおいてはストレス負荷で有意な増加が観られ、ヒトのアトピー性皮膚炎と同様に、慢性かゆみにおいてストレスが悪化要因となることを明らかにした。

② ストレス負荷法の検討

各種のストレス負荷方法を検討した結果、空気穴を開けたビニールチューブ中に拘束する方法で、慢性のかゆみモデルの引っ掻き動作が有意に、再現性良く増悪化することを見出した。これにより直接床電撃刺激法のようにマウスに身体的刺激を行うことなく、比較的緩和な条件でのモデルの作製（苦痛の軽減化）が可能となった。

③ 感作時のHEL濃度の検討

感作に用いるHEL濃度を検討した結果、当初のHEL 50から12.5 µgに減じた緩和なアレルギー病態でもストレスによるかゆみの増悪化が観られることが明らかとなった。

④ 一過性および慢性かゆみモデルマウスへの拘束ストレスの影響

図1に示すように、一過性かゆみモデルでは拘束ストレス負荷（90分/dayを10日間）により、引っ掻き動作の増加傾向が見られたが、有意差はなかった。一方、慢性かゆみモデルにおいてはストレス負荷で有意な増加が観られ、ヒトのアトピー性皮膚炎と同様に、慢性のかゆみにおいてストレスが悪化要因となることを明らかにした。一方、60分/day10~14日間連続の拘束ストレスにおいては、一過性および慢性かゆみモデル共に増悪化が観察されなかった。そこで、拘束時間は90分/dayとし、日数の短縮化を検討したところ、7

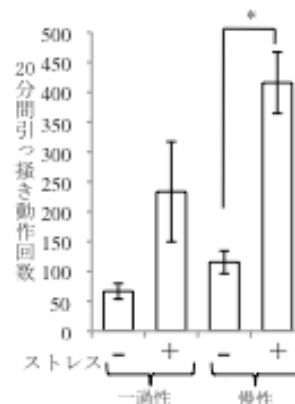


図1：ストレス負荷によるかゆみモデルマウスへの影響 *p<0.05 (Student's t-test)

日間に 6 日負荷 (4 日目は無)で有意な増悪化が見られることが明らかになった。

- ⑤ ストレスで増悪化する慢性かゆみモデルマウスを用いたアッセイ法の確立
前述の①から④の結果を総合して、操作の簡便さ、短期間化および再現性、さらには動物への苦痛の最小化を考慮し、アッセイ法を以下の様に確立した。

ストレス性で増悪化するかゆみへの抑制効果の *in vivo* アッセイ法

ddY マウスを HEL 12.5 μ g で感作する。感作の 1 時間前および感作の翌日より 90 分/day の拘束ストレスを 7 日間に 6 日負荷する。7 日目に 2 mg/kg の COM を皮下注射し、かゆみを惹起し、惹起後 20 分間の引っ掻き動作回数をカウントしコントロールとする。これに対し、評価物質を投与した場合を比較する。

(2) かゆみの増悪化に関与する生体内因子の探索

① 腸粘膜組織の解析

免疫への関与が注目される腸粘膜組織を用いて可溶性タンパク質の抽出法、精製法、一次元および二次元電気泳動法を順次検討し、以下に示す条件を確立した。また、ゲル上のタンパク質スポットの検出方法では、当初用いた銀染色法による解析では、ゲル間のゆがみによる誤差で発現量の少ないタンパク質の解析が困難であることが判明した。そこで、次に CyDye DIGE Fluors Minimal Dyes (GE Healthcare) を用いる蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) 法による解析に変更し、銀染色法では見出せなかった差異タンパク質スポットの検出に成功した。現在、一過性かゆみと慢性かゆみ病態モデルマウスでの差異を検討中である。

可溶性タンパク質試料調製の概略：臓器を等量のサンプル調製液 {7 M urea、2 M thiourea、4% [(cholamidopropyl) dimethyl ammonio] -1-propanesulfonate (CHAPS) を含む 30 mM Tris-HCl バッファー、pH 8.5} 中で、ホモジナイザー (GE 50, WARNING) を用いて破碎し、得られたホモジネートを 4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm で 15 分遠心分離し、上清をさらに、4 $^{\circ}$ C、100,000 rpm で 1 時間超遠心分離し、得られた可溶性画分をアセトン沈殿および 2-D Clean up

kit (GE Healthcare) により精製する。
二次元電気泳動 (2-DE) 法の概略：試料溶液は等量のサンプルバッファー [7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、1% immobilized pH gradient buffer、2% dithiothreitol (DTT)] を加えて 95 $^{\circ}$ C で 5 分加熱した後、膨潤液 (7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、0.5% immobilized pH gradient buffer、2% DTT) を加えて総タンパク質量 99 μ g/ 340 μ L に調製後、固定化 pH3~10 勾配ゲル (18 cm, GE Healthcare) を装着したストリップホルダーにアプライし、Ettan IPGphor II (GE Healthcare) を用いて一次元目の等電点電気泳動を行う。泳動したゲルは、DTT またはヨードアセトアミドを含む 6 M urea、30% glycerol、2% SDS を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.8) を用いて各々 15 分平衡化後、10-20% SDS グラジエントゲル (20 \times 20 cm, Bio Improve) および泳動バッファー (192 mM グリシン、0.1% SDS を含む 25 mM Tris-HCl バッファー、pH 8.4) を用いて二次元目電気泳動を行う。

② 血液の解析

血中タンパク質に関して①の成果を元に、2D-DIGE 法による解析を行ったが、主要な (発現量の多い) スポットには差異が見られなかった。今後は、より微量な血中タンパク質、さらには皮膚のタンパク質についての解析が必要であると考えられる。

(3) *In vivo* アッセイ法を用いたかゆみ抑制物質の探索

① 新しいシーズ植物の探索

マウスの引っ掻き動作を指標とした *in vivo* アッセイ法を用い *Trifolium repens*、*Sophora japonica*、*Arachis hypogaea*、*Hypericum patulum*、*Camellia nitidissima* など数種の天然資源について抗かゆみ活性を一次スクリーニングした。その結果、*H. patulum* の花卉および *C. nitidissima* の葉に新たに有意な活性を見出し、シーズとしての有用性を示した。

② 活性物質の探索

見いだしたシーズより、活性を指標に数種のトリテルペン類およびカテキン類を単離、構造解析した。さらに、単離化合物の活性評価を行い、新規抗かゆみ物質を見出した。現在、作用機序についても検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Oku Hisae, Ogawa Yuko, Iwaoka Emiko, Yamaguchi Y., Kagota Satomi, Shinozuka Kazumasa, Kunitomo Masaru and Ishiguro Kyoko, Preventive effects of the extract of Kinka-cha, a folk tea, on a rat model of metabolic syndrome, *J. Nat. Med.* 査読有, 65 卷, 2011, 610-616.
- ② Oku Hisae, Ogawa Yuko, Iwaoka Emiko and Ishiguro Kyoko, Allergy-preventive effects of Chlorogenic acid and Iridoid Derivatives from Flower Buds of *Lonicera japonica*, *Biol. Pharm. Bull.* 査読有, 34 卷, 2011, 1330-1333.
- ③ Ishiguro Kyoko and Oku Hisae, Allergy-preventive effects of flowers of *Campsis grandiflora*, *Plant. Med.* 査読有, 76 卷, 2010, 1345-1345.
- ④ Iwaoka Emiko, Oku Hisae, Inuma Munekazu and Ishiguro Kyoko, Allergy-preventive effects of the flowers of *Impatiens textori*, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 33 卷, 2010, 714-716.

〔学会発表〕(計9件)

- ① 奥尚枝、中原優華、里見彩、重松亨、石黒京子、薬用資源の超高压処理を応用した新機能探索(第2報)・センブリについて、日本薬学会第133年会、2013年3月27~30日、パシフィコ横浜会議センター、横浜市
- ② 奥尚枝、石黒京子、抗かゆみ物質の探索を目的としたアッセイ法の開発と応用、第19回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2012年11月1~2日、大阪大学、大阪市
- ③ 里見彩、奥尚枝、重松亨、石黒京子、薬用資源の超高压処理を応用した新機能探索(第1報)、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012年10月20日、武庫川女子大学、西宮市
- ④ 石黒京子、奥尚枝、Antipruritic and allergy-preventive effects of the petals of *Hypericum patulum*、第9回薬物の分子設計と開発に関する日中合同シンポジウム、2012年9月21~24日、桂林市、中華人民共和国
- ⑤ Oku Hisae and Ishiguro Kyoko, Antipruritic effects of the petals of *Hypericum patulum*, 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology, 2012年9月2~6日、クラーツ、オーストリア
- ⑥ 坂本真理子、奥尚枝、石黒京子、

キンシバイ (*Hypericum patulum*) 花卉の抗かゆみ活性、日本薬学会第132年会、2012年3月28~31日、北海道大学、北海道

- ⑦ Oku Hisae, and Ishiguro Kyoko, Antipruritic effects of polyphenols from the petals of *Hibiscus syriacus* L., 5th International Conference on Polyphenols and Health, 2011年10月17~20日、Hotel Meli Sitges、バルセロナ、スペイン
- ⑧ Ishiguro Kyoko, Oku Hisae, Ogawa Yuko and Iwaoka Emiko, Allergy-preventive effects of Chlorogenic acid and Iridoid Derivatives from Flower Buds of *Lonicera japonica*, 4th Symposium Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, 2011年6月15~17日、Pierre et Marie Curie 大学、パリ、フランス
- ⑨ Ishiguro Kyoko, Oku Hisae, Iwaoka Emiko and Inuma Munekazu, Allergy-preventive effects of flowers of *Campsis grandiflora*, 7th Tannin Conference and 58th International Congress of GA, 2010年8月29日~9月2日、ベルリン、ドイツ

〔図書〕(計1件)

- ① 石黒京子、奥尚枝、シーエムシー出版、「薬用食品の開発 II」ホウセンカの多様な生物活性と成分 - 抗かゆみ作用、抗アレルギー作用、抗リユーマチ作用、駆瘀血作用 - 、2012、287 (193-204)

〔その他〕

ホームページ等

- ① 武庫川女子大学薬学部 生薬学研究室ホームページ
http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~shouyaku/sheng_yao_xue_yan_jiu_shi/homu.html
- ② 第19回天然薬物の開発と応用シンポジウムホームページの優秀発表賞
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/tennen19/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥尚枝 (OKU HISAE)
武庫川女子大学・薬学部・助教
研究者番号：90281518

(2) 研究分担者

石黒京子 (ISHIGURO KYOKO)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号：70151363