

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24年 5月15日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010~2011

課題番号：22659208

研究課題名（和文）コレシストキニン塗布によるかゆみの制御と新規治療薬への応用

研究課題名（英文）Control of itch by topical application of cholecystokinin and its use for novel therapy

研究代表者

戸倉 新樹 (TOKURA YOSHIKI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00172156

研究成果の概要(和文)：かゆみは中枢性と末梢性に分けられる。末梢性のかゆみ機序は、①肥満細胞と知覚神経C線維との相互作用、②表皮角化細胞や真皮線維芽細胞により産生される因子によるC線維の伸長と反撥、③炎症に伴うT細胞や好酸球の産生物質による。特に①は直接かゆみに関わり、肥満細胞が放出するヒスタミン、トリプターゼはこれらの受容体(H1R、PAR-2)を介してC線維を刺激し活性化C線維は神経ペプチド(サブスタンスP[SP]など)を放出してこの受容体(NK1)を持つ肥満細胞をさらに刺激する。加えて、温熱刺激などを知覚するTRP受容体もかゆみ知覚にバリエーションを与えている(Steinhoff M et al: J Invest Dermatol 126: 1705-18, 2006)。近年中枢性のかゆみはオピオイド受容体のアンタゴニスト、アゴニストにより新薬が導入された。しかし末梢性のかゆみは抗ヒスタミン薬以降、TRP受容体のアンタゴニストが開発されつつあるが、新規薬に乏しい。我々は、表皮培養角化細胞をSPで刺激後、RNAを抽出しマイクロアレイ解析した結果、SP刺激でCCK2Rが最も強く発現することをセレンディピティ的に見いだした。かゆみ惹起神経ペプチドであるサブスタンスP(SP)刺激によってコレシストキニン受容体であるCCK2発現亢進がみられたことは、CCKがCCK2Rシグナリングを介して、負の制御としてかゆみ抑制作用を示す可能性を示唆した。ICRマウスの背部を剃毛し、そこにSP(100nm/部分)を皮下注射し、マウスの後肢搔破行動を誘導した。SP皮下投与10分前に剃毛部に種々のCCKペプチドを塗布し、溶液のみのコントロールと比べたところ、搔破回数がとくにCCK8Sで減弱した。CCK皮下投与でも同様の効果をもたらすか、SPと同時にCCK8Sを皮下投与したところ搔破回数が減弱した。皮下投与でもかゆみ抑制効果を示すのであれば、角化細胞以外に肥満細胞も標的細胞となることが示唆された。マウス胎仔由来肥満細胞をcompound 48/80で脱顆粒刺激する系で、CCK8Sを添加したところ脱顆粒は抑制された。以上のことから、CCKはかゆみを抑制する能力をもち、少なくとも肥満細胞の機能を抑制して効果を示すのではないかと考えられた。加えて、ヒトケラチノサイトのインターフェロン- γ 刺激によるIL-8産生系においてCCK8Sは抑制作用を有した。さらにヒト血管内皮細胞においてインターフェロン- γ 刺激によるICAM-1発現をも抑制した。以上のことからCCK-CCR2R系によるかゆみ抑制は、肥満細胞のみならず、ケラチノサイトや血管内皮細胞における炎症抑制効果によってもたらされることが明らかとなった。CCKのかゆみ治療薬としての可能性について特許申請しており、創薬への端緒となった。実際の薬剤としてはCCK2Rに結合できる単純化学物質が望まれるが、今後その探索が重要となる。

研究成果の概要(英文)：Cholecystokinin (CCK) serves as a gastrointestinal hormone and also functions as a neuropeptide in central nervous system (CNS). CCK may be a downregulator in CNS as represented by its anti-opioid properties. The existence of CCK in peripheral nervous system has also been reported. We investigated the suppressive effects of various CCKs on the peripheral pruritus in mice. ICR mice were painted with CCK synthetic peptides on the clipped back and injected intradermally with substance P (SP) on the same site. The frequency of SP-induced scratch was reduced significantly by topical application of sulfated CCK8 (CCK8S) and CCK7 (CCK7S), but not by non-sulfated CCK8, CCK7 or CCK6. Dermal injection of CCK8S also depressed the scratch frequency,

suggesting that dermal cells as well as epidermal keratinocytes are the targets of CCKs. By real-time PCR, mRNA for CCK2R, one of the two types of CCK receptors, was expressed highly in mouse fetal skin-derived mast cells (FSMCs) and moderately ICR mouse keratinocytes. CCK8S decreased *in vitro* compound 48/80-promoted degranulation of FSMCs with a transient elevation of the intracellular calcium concentration. These findings suggest that CCK exerts an anti-pruritic effect mainly *via* mast cells, and topical CCK may be clinically useful for pruritic skin disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：コレシストキニン、かゆみ、神経ペプチド、肥満細胞、角化細胞、血管内皮細胞、サブスタンス P、CCK2R

1. 研究開始当初の背景

かゆみは中枢性と末梢性に分けられる。末梢性のかゆみ機序は、①肥満細胞と知覚神経 C 線維との相互作用、②表皮角化細胞や真皮線維芽細胞により産生される因子による C 線維の伸長と反撥、③炎症に伴う T 細胞や好酸球の産生物質による。特に①は直接かゆみに関わり、肥満細胞が放出するヒスタミン、トリプターゼはこれらの受容体 (H1R、PAR-2) を介して C 線維を刺激し活性化 C 線維は神経ペプチド (サブスタンス P [SP] など) を放出してこの受容体 (NK1) を持つ肥満細胞をさらに刺激する。加えて、温熱刺激などを知覚する TRP 受容体もかゆみ知覚にバリエーションを与えている。近年中枢性のかゆみはオピオイド受容体のアンタゴニスト、アゴニストにより新薬が導入された。しかし末梢性のかゆみは抗ヒスタミン薬以降、TRP 受容体のアンタゴニストが開発されつつあるが、新規薬に乏しい。

2. 研究の目的

我々は予備実験において、コレシストキニン (cholecystokinin, CCK) が抗搔痒効果をもつことを、サブスタンス P (SP) で刺激した表皮角化細胞が CCK 受容体を高発現することを契機として見出した。マウスの SP 誘導性かゆみモデルでは、CCK を塗布することによりかゆみを抑制することができ、従来にない治療薬としての期待が高まる。本研究は、こ

の CCK の新規かゆみ抑制作用を検証し、CCK によるかゆみ制御のメカニズムに迫り、CCK の搔痒性皮膚疾患の新しい塗布薬としての可能性を探った。

3. 研究の方法

1) マウスかゆみ関連搔破行動モデルを用いての CCK の外用効果：ICR マウスの背部を剃毛し、そこに SP (100 nm / 部分) を皮下注射した。これによりマウスは後肢で搔破行動を開始した。これをデジタルビデオで撮影し、最初の 20 分間の搔破回数をカウントした。この実験系において、SP 皮下投与 10 分前に剃毛部に CCK (20 ml in acetone:olive oil = 3:1, 0.5 nmol / 部分) を塗布し、溶液のみのコントロールと比べ、搔破回数が増減するか確認した。CCK の種類として、硫酸化 (S) を付加あるいは付加しない長さの異なる以下の 5 種類の合成 CCK 調べた。CK 皮下投与でも同様の効果をもたらすか、SP と同時に CCK を皮下投与 (0.5 nmol/部位 in 20・1 生食) することによる搔破回数の減少も確認した。

2) 培養細胞 (角化細胞、肥満細胞、神経細胞) を用いての標的細胞の同定：CCK の標的細胞としては、角化細胞、肥満細胞、神経細胞が候補となる。その培養細胞として、それぞれヒト表皮角化細胞 (NHEK)、マウス胎児皮膚由来肥満細胞 (FSMC)、およびラット褐色細胞腫由来株細胞 (PC12) を用いた。NHEK、FSMC、PC12 での CCK2R 発現 Real-time PCR 解析を以下のプライマーを用いて行い、

CCK2R 発現の程度を SP 受容体である NK1R の発現と比較し評価した。3) NHEK のインターロイキン(IL)-8 産生に対する CCK の影響: NHEK を Ca 濃度 0.15 mM または 0.6 mM で、CCK とともに 10⁻⁹、10⁻⁸、あるいは 10⁻⁷ M で 24 時間培養し、培養上清中の IL-8 の濃度を CBA で測定した

4) FSMC の脱顆粒に対する CCK の影響: FSMC は compound 48/80 で脱顆粒するが、CCK を 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ M で加え脱顆粒への影響をみた。FSMC を 2x10⁴ /well に調整、compound 48/80 (50 mg/ml) と CCK で 15 分 incubation 後、Tyrode's buffer (含 0.5% Triton X-100) で処理し

p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-galactosaminide で 90 分処理した。b-hexosaminidase の放出により脱顆粒の程度とした。

5) Ca influx による CCK/CCK2R を介するシグナリングの検討: Confocal imaging 解析を Zeiss LSM510 を用いて行った。NHEK、FSMC、PC12 の各細胞に Fluo-4-AM を loading し、肥満細胞は Alexa Fluor 700-conjugated 抗マウス CD117 抗体で染色した。LSM5 multi-track configuration を用いて細胞内 Ca を測定した。像は 300 s で 512 x 512 pixels で解析した。SP あるいは CCK (10⁻⁶ M) で投与した。

4. 研究成果

かゆみ惹起神経ペプチドであるサブスタンス P (SP) 刺激によってコレシストキニン受容体である CCK2 発現亢進がみられたことは、CCK が CCK2R シグナリングを介して、負の制御としてかゆみ抑制作用を示す可能性を示唆した。ICR マウスの背部を剃毛し、そこに SP (100 nm / 部分) を皮下注射し、マウスの後肢搔破行動を誘導した。SP 皮下投与 10 分前に剃毛部に種々の CCK ペプチドを塗布し、溶液のみのコントロールと比べたところ、搔破回数がとくに CCK8S で減弱した。CCK 皮下投与でも同様の効果をもたらすか、SP と同時に CCK8S を皮下投与したところ搔破回数が減弱した。皮下投与でもかゆみ抑制効果を示すのであれば、角化細胞以外に肥満細胞も標的細胞となることが示唆された。マウス胎仔由来肥満細胞を compound 48/80 で脱顆粒刺激する系で、CCK8S を添加したところ脱顆粒は抑制された。以上のことから、CCK はかゆみを抑制する能力をもち、少なくとも肥満細胞を機能を抑制して効果を示すのではないかと考えられ、創薬への端緒となった。

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 22 件)

1. Sugita K, Kabashima K, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y: Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration and Survival. *J Invest Dermatol*, 査読有, 130, 2010, 464-471
2. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y: Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 査読有, 162, 2010, 83-90
3. Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y: Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. *Am J Pathol*, 査読有, 176, 2010, 721-732
4. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Matsuoka H, Kubo A, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K*: Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssimus* extract. *Am J Pathol*, 査読有, 176, 2010, 2385-2393
5. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J-I, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y: The mandatory role of IL-10-producing and OX40L-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. *J Immunol*, 査読有, 84, 2010, 5670-5677
6. Bito T, Sumita N, Masaki T, Shirakawa T, Ueda T, Yoshiki R, Tokura Y, Nishigori C: Ultraviolet light induces Stat3 activation in human keratinocytes and fibroblasts through reactive oxygen species and DNA damage. *Exp Dermatol*, 査読有, 19, 2010, 654-660
7. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyach

- i Y, Kanagawa O, Kabashima K*: Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest*, 査読有, 120, 2010, 883-893
8. Sawada Y, Nakamura M, Bito T, Fukamachi S, Kabashima R, Sugita K, Hino R, Tokura Y*: Cholinergic urticaria: Studies on the muscarinic cholinergic receptor M3 in the anhidrotic and hypohidrotic skin. *J Invest Dermatol*, 査読有, 130, 2010, 2683-2686
 9. Sugita K, Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tanizaki H, Tokura Y: FTY720 regulates bone marrow egress of eosinophils and modulates late phase skin reaction in mice. *Am J Pathol*, 査読有, 177, 2010, 1881-1887
 10. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 査読有, 58, 2010, 1-7
 11. Fukamachi S, Mori T, Sakabe J-I, Shiraiishi N, Kuroda E, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Topical cholecystokinin depresses itch-associated scratching behavior in mice. *J Invest Dermatol*, 査読有, 131, 2011, 956-961
 12. Fukamachi S, Bito T, Shiraishi N, Kobayashi M, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Modulation of semaphorin 3A expression by calcium concentration and histamine in human keratinocytes and fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 査読有, 62, 2011, 118-123
 13. Kobayashi M, Nakagawa T, Fukamachi K, Nakamura M, Tokura Y: Efficacy of combined topical treatment of acne vulgaris with adapalene and nadifloxacin: A randomized study. *J Dermatol*, 査読有, 38, 2011, 1163-1166
 14. Kobayashi M, Tokura Y: Downmodulatory effects of cetirizine and levocetirizine on cytokine/chemokine production and CD54 expression in keratinocytes. *J Dermatol*, 査読有, 38, 2011, 717-719
 15. Sugita K, Kabashima K, Tokura Y: Characterization of Peripheral Natural Killer Cells and their Reduction in Drug-induced Hypersensitivity Syndrome. *Acta Derm Venereol*, 査読有, 92, 2011, 83-84
 16. Park K, Mori T, Nakamura M, Tokura Y: Increased expression of mRNAs for IL-4, IL-17, IL-22 and IL-31 in skin lesions of subacute and chronic forms of prurigo. *Eur J Dermatol*, 査読有, 21, 2011, 135-136
 17. Ohmori S, Nakamura M, Hino R, Kobayashi M, Tokura Y: Inflammatory cytokine expression in the skin lesions of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Rheumatology*, 査読有, 51, 2011, 196-199
 18. Nakajima S, Watanabe H, Tohyama M, Sugita K, Iijima M, Hashimoto K, Tokura Y, Nishimura Y, Doi H, Tanioka M, Miyachi Y, Kabashima K: High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) as a Novel Diagnostic Tool for Toxic Epidermal Necrolysis and Stevens-Johnson Syndrome. *Arch Dermatol*, 査読有, 147, 2011, 1110-1112
 19. Kito Y, Hashizume H, Tokura Y: Rosacea-like demodicosis mimicking cutaneous lymphoma. *Acta Derm Venereol*, 査読有, in press
 20. Kasuya A, Hashizume H, Tokura Y: Haemodialysis-induced pseudoporphyria successfully treated with glutathione. *Eur J Dermatol*, 査読有, in press
 21. Sawada Y, Bito T, Kabashima R, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y: Epileptic seizures and cholinergic urticaria with generalized hypohidrosis and anhidrosis. *Eur J Dermatol*, 査読有, 21, 2011, 99-100
 22. Nakamizo S, Kurosawa M, Sawada Y, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K: A case of cholinergic urticaria associated with acquired generalized hypohidrosis and reduced acetylcholine receptors: cause and effect? *Clin Exp Dermatol*, 査読有, 36, 2011, 559-560

[学会発表] (計 9 件)

1. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. The 35th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010.12.4, Wakayama Prefectural Cultural Hall, Wakayama
2. Tokura Y: Atopic dermatitis and skin barrier in the extrinsic and intrinsic types. The 37th Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association. 2011.11.26. Taipei, Taiwan.
3. Tokura Y: Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. Ancillary Meeting on Atopic Dermatitis. 22nd World Congress of Dermatology 2011 2011.5.24. Seoul, Korea.
4. Tokura Y: Recent concept on the role of cutaneous dendritic cells in UVB-induced immunosuppression. 22nd World Congress of Dermatology 2011 2011.5.24. Seoul, Korea.
5. Tokura Y: Skin barrier impairment is heterogeneous in atopic dermatitis. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2011.12.10. Kyoto, Japan.
6. 戸倉新樹: 外因性・内因性という分別はアトピー性皮膚炎に必要か. 第16回アトピー性皮膚炎治療研究会シンポジウム (招待講演) 2011. 2. 5. 小倉市
7. 戸倉新樹: Th17細胞と皮膚疾患. 第39回日本臨床免疫学会総会 (招待講演) 2011. 9. 15-17 東京都
8. 戸倉新樹: 外来性物質に対する皮膚アレルギー反応機構. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 (招待講演) 2011. 11. 11. 東京都
9. 戸倉新樹: 内因性アトピー性皮膚炎. 第62回日本皮膚科学会中部支部学術大会 (招待講演) 2011. 11. 20. 四日市

[図書] (計 5 件)

1. Tokura Y, MEDRANG, Hypersensitivity to mosquito bites and EBV, 2011, 6 (423-428)
2. 戸倉新樹, 中山書店、皮膚科臨床アセッ

ト 1. アトピー性皮膚炎、2011、6 (130-135)

3. 戸倉新樹, 南江堂、皮膚疾患最新の治療 2011-2012、2011、1 (117)
4. 戸倉新樹, 講談社、皮膚科診療カラーアトラス大系、2011、4 (58, 86-88)
5. 戸倉新樹, 診断と治療社、臨床医必携-全身とかゆみ、2011、3 (124-126)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 皮膚疾患治療薬
 発明者: 戸倉新樹・深町晶子
 権利者: 産業医科大学・浜松医科大学
 種類: 特許
 番号: 2009-244528
 出願年月日: 2009年10月23日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸倉 新樹 (TOKURA YOSHIKI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00172156

(2) 研究分担者

森 智子 (MORI TOMOKO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80399203

(3) 連携研究者

なし