

## 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 4 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790063

研究課題名（和文） セリンプロテアーゼ グランザイムのアトピー性皮膚炎の痒み発生への役割

研究課題名（英文） The role of serine protease granzyme on the induction of itch in atopic dermatitis

研究代表者

安東 嗣修（ANDOH TSUGUNOBU）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）

研究者番号：50333498

研究成果の概要（和文）：

アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序は、未だ不明である。そこで、アトピー性皮膚炎皮膚に T 細胞が浸潤していること、また、その痒みにプロテアーゼが関与していることから、T 細胞が産生するグランザイムに着目し、グランザイムの痒みへの関与に関して検討した。その結果、11 種のグランザイムサブタイプの内、特にグランザイム A がプロテイナーゼ活性化受容体 2 を介して痒み反応を起こすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The precious mechanisms of itch in atopic dermatitis are unclear. Since T cells infiltrate into the skin with atopic dermatitis and the proteases are also involved in the severe itch, we focused proteases produced by T cells for demonstrating the itch mechanisms in the dermatitis. It was demonstrated that granzyme A, which is one of 11 subtypes of granzymes, elicited itch through the activation of proteinase-activated receptor 2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学，薬理学

キーワード：痒み，アトピー性皮膚炎，プロテアーゼ，グランザイム，皮膚，NC マウス

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚科領域において、アトピー性皮膚炎は難治性の慢性掻痒性皮膚疾患として位置づけられている。日本皮膚科学会では、2009 年にも「アトピー性皮膚炎診療ガイドライン」を提示しているが、この内容は頻繁に更新されており、年々アトピー性皮膚炎の罹患率が増加し、その症状が多様化していることによるものと推察される。アトピー性皮膚炎の症状には、皮膚炎、乾皮症と痒みが特徴的

である。特に、痒みを伴う患者の多くがかなりのストレスを抱え社会生活に支障をきたしていることが報告されている。事実、患者の多くが皮膚炎の治療より痒みの抑制を最優先に望む。痒みは、ストレスを誘発するだけでなく、痒みによる皮膚及び眼への搔破は、皮膚症状の更なる悪化及び白内障へと導く。アトピー性皮膚炎患者に対し、手腕の物理的拘束による搔破行動の抑制が皮膚症状を改善し、さらには痒みも抑制することが臨床的

に確認され、痒みの抑制（コントロール）が皮膚炎の治療に有効であると考えられる。しかしながら、アトピー性皮膚炎の痒みの抑制に第一選択薬として従来痒みのメディエーターとして知られているヒスタミンの受容体拮抗薬を処方するが、このような慢性的な痒みを抑制することが治療困難である場合が多い。そこで、皮膚科医の多くが新規鎮痒薬を求めているが、痒みの発生機序に関する詳細な研究は、ほとんど進んでおらず、有用な治療薬はほとんどないのが現状である。従って、痒みの発生機序の解明並びに新規鎮痒薬のターゲット分子を同定することは急務であり、また非常に重要である。

古くからプロテアーゼ（トリプシン、キマーゼ、パパイン、カリクレイン）のヒトへの皮内注射により痒みを誘発することが報告されている。その後 30 年以上、プロテアーゼと痒みに関する研究はなされていなかった。最近、プロテアーゼ活性化受容体（PAR）の発見に伴い、ヒトでの実験で PAR2 の合成ペプチドアゴニストの投与により痒みを誘発し、健康人よりアトピー性皮膚炎患者の方がその作用が強いこと、PAR2 を活性化する酵素の一つであるトリプターゼの遊離がアトピー性皮膚炎患者の皮膚で顕著であることを報告した。従って、内因性のプロテアーゼが痒みの発生に関与する可能性が示唆されるが詳細な検討はなされていない。そこで、我々はアトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）を用いて、その搔痒へのプロテアーゼの関与を検討し【科学研究費若手（B）：19790051（H19-H21）】、セリンプロテアーゼ並びに PAR2 がアトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み関与することを明らかにした。さらに、プロテアーゼに関する皮疹部皮膚の解析により従来 PAR2 を活性化する酵素として知られているマスト細胞由来トリプターゼのほかに、セリンプロテアーゼのグランザイム A の発現が増加していることを新たに突き止めた。グランザイムは、主に T 細胞や NK 細胞などに発現しており、細胞死に関与するプロテアーゼとしてヒトでは 5 種、マウスでは 11 種報告されている以外は、それ以外の機能はほとんど報告されていない。そこで、アトピー性皮膚炎の痒みにおけるグランザイムの役割を解析し、アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序の一端を解明するために本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒みの発生機序の解析により得られた研究成果を基盤に、その機能がこれまで殆ど解明されていないグランザイムのアトピー性搔痒における役割をアトピー性皮膚炎マウスモデル

（NC マウス）を用いて、以下の点を中心に解析する。

- (1) 11 種類のグランザイムの皮膚での発現の比較（健常マウスと皮膚炎マウス）。
- (2) 発現の増加が認められたグランザイムの皮膚内発現分布と発現細胞の同定。
- (3) 発現増加が認められたグランザイムの搔痒への関与。
- (4) 搔痒関連グランザイムの搔痒発生機序の解析。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

雄性の NC 系マウスを用いた。NC マウスは、微生物等制御された SPF 環境下での飼育ではアトピー様皮膚炎及び痒みは発症しない（健常マウス）が、微生物等制御されていないコンベンショナル環境下での飼育により皮膚炎及び痒みが発症する特徴的な自然発症型のアトピー性皮膚炎・搔痒モデルマウスである。

### (2) Reverse Transcriptase and polymerase chain reaction (RT-PCR)

マウス吻側背部皮膚より常法に従って total RNA を抽出し、11 種のマウスのグランザイムに特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。

### (3) 行動実験

マウスを 1 時間行動観察用のアクリル板で作製した観察用ケージに放置し、馴化させた。その後、マウスの行動を無人環境下にビデオ撮影した。撮影後、後肢による搔き動作（痒み関連度ぬさ）をカウントした。自発の搔き動作を評価する場合は後肢による全身の搔き動作回数を、痒み物質を皮内注射し痒み反応を惹起する場合は皮内注射部位及びその近傍への後肢による搔き動作回数をカウントした。マウスは一秒間に数回搔くので、足を挙げて降ろすまでの一連の動作を搔き動作の 1 回としてカウントした。

### (4) 免疫染色

マウスを麻酔下、リン酸緩衝生理食塩水で脱血死させ、その後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、常法に従い凍

結切片を作製した。後固定後、ブロッッキング処理を行い、各種抗体 (PAR2、CD3、CD4、CD8、グランザイム A) 並びに蛍光標識した 2 次抗体で凍結と反応させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光シグナルを検出した。

- (5) グランザイム A 活性測定  
マウス皮膚より抽出したタンパク質、グランザイム A 特異的抗体、基質 N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Arg-p-Nitroanilide を反応させ、その活性を 405nm の吸光度で測定した。

#### 4. 研究成果

- (1) アトピー性皮膚炎マウスモデルの書き動作と薬物効果

健常マウスと比べると皮膚炎マウスは、明らかに自発的搔き動作の増加が認められた。(1 時間の搔き動作回数 (25 週齢各 16 匹: 健常マウス、約 10 回; 皮膚炎マウス、約 100 回))

皮膚炎マウスの自発的搔き動作は、H1 ヒスタミン受容体拮抗薬テルフェナジンでは抑制されなかったが、セリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩並びに PAR2 受容体中和抗体によって抑制された。

以上の結果から、皮膚炎マウスの自発的搔き動作にセリンプロテアーゼ及び PAR2 受容体に関与していることが示唆される。

- (2) アトピー性皮膚炎マウスモデル皮膚でのグランザイムサブタイプ mRNA の発現

マウスのグランザイムは 11 種ある。そこで、マウス皮膚でのグランザイム mRNA の発現を調べた。健常マウス皮膚では、グランザイム A、C 及び M mRNA の発現が認められた。皮膚炎マウス皮膚では、グランザイム A、B、C 及び M mRNA の発現が認められ、特にグランザイム A、B、及び C の発現が健常皮膚での発現と比べると有意に増加していた。したがって、グランザイム A、B、及び C が痒みの発生に関与しているかもしれない。

- (3) グランザイムによる搔き動作

健常マウスにグランザイム A、B、D 及び K を吻側背部に皮内注射し、後肢による注射部位及びその近傍への搔き動作回数をカウントした。今回使用したグランザイムの中では、グランザイム A のみ用

量に応じて搔き動作回数の増加が認められた。この結果より、グランザイム A が起痒物質の 1 つとして考えられる。今回皮膚炎マウスで発現の増加が認められたグランザイム C は入手ができなかったため本実験では検討できなかった。今後の課題である。

- (4) グランザイム A 誘発搔き動作と各種薬物効果

グランザイム A 誘発の搔き動作は、 $\mu$  オピオイド拮抗薬ナルトレキソンによって抑制された。このことは、グランザイム A 誘発の搔き動作が痒みに関連した動作であることを示唆する。

グランザイム A 誘発の搔き動作は、さらに、セリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩や PAR2 中和抗体によって抑制された。したがって、グランザイム A によって誘発される搔き動作が PAR2 受容体を介して起こっていることが示唆される。PAR2 の発現が、主に表皮ケラチノサイトや一次感覚神経に認められることから、グランザイム A 誘発の搔き動作が、ケラチノサイト介する経路と直接一次感覚神経に作用する経路によって起っている可能性がある。

- (5) 皮膚でのグランザイム A の活性

皮膚におけるグランザイム A の活性に関して調べた。健常マウスに比べ、皮膚炎マウス皮膚から抽出したタンパク質中のグランザイム A の活性が増加していた。この活性の増加は、皮膚炎皮膚でグランザイム A の発現増加によるかもしれない。

- (6) PAR2 受容体及びグランザイム A の皮膚内発現と T 細胞の皮膚内分布

健常マウスと皮膚炎マウス皮膚での PAR2 受容体及びグランザイム A の皮膚内発現と T 細胞の皮膚内分布を免疫組織学的に調べた。PAR2 受容体は、両マウス皮膚の特に表皮ケラチノサイトに発現が認められた。以前の我々の報告において後根神経節レベルでは PAR2 受容体の mRNA の発現が認められているが皮膚内での神経線維には免疫組織学的にその発現は検出できなかった。ヒトでは、一部の報告では、皮膚内の神経線維での発現が検出されている。この違いは、抗体によるかもしれない。したがって、グランザイム A は、表皮ケラチノサイト並びに一次感覚神経に作用するかもしれない。

い。

グランザイム A の皮膚では、おもに真皮内の細胞でその発現が認められた。発現細胞は、健常マウス皮膚ではほとんど認められないが、皮膚炎マウス皮膚でその増加が顕著であった。

T 細胞に関しては、CD3、CD4 及び CD8 それぞれの抗体を用いて調べたところ、健常マウス皮膚に比べ皮膚炎マウスの皮膚で発現細胞の増加が観察された。

グランザイム A 発現細胞に関しては、T 細胞である可能性は高いが、現在のサブセットの T 細胞で発現しているか解析中である。

本研究では、11 種のグランザイムサブタイプの内特にグランザイム A がアトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応に関与することを明らかにした。現在、痒みとグランザイムに関する報告はなく、今回の研究成果が最初の報告となる。本研究では、グランザイム A が特に痒みに関係しており、PAR2 受容体を介して痒みが起こっている可能性を示した。アトピー性皮膚炎では、一般的に痒みの第一選択薬である H1 ヒスタミン受容体拮抗薬が無効である場合が多く臨床では、痒みの制御に新たなアプローチの治療薬を求めている。今回の結果から、グランザイム A の活性抑制に加え、PAR2 受容体拮抗薬が今後の鎮痒薬の開発のターゲット分子となることが示唆される。また、グランザイム A は、酵素であることから、PAR2 受容体の活性化以外にも痒み因子の前駆体タンパクの活性化を誘導して痒みを起こす可能性も考えられることから、今後研究を更に進めていく予定である。

## 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 8 件)

- ① Tsugunobu Andoh, Yusuke Takayama, Takako Yamakoshi、他 4 名、Involvement of serine protease and proteinase-activated receptor 2 in dermatophyte-associated itch in mice、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、査読有、343 巻、2012、91-96  
DOI: 10.1124/jpet.112.195222.
- ② Tsugunobu Andoh、Takashi Kuwazono、他 2 名、Gastrin-releasing peptide induces itch-related responses through mast cell degranulation in mice、Peptides、査読有、32 巻、2011、2098-20103  
DOI: 10.1016/j.peptides.2011.09.003

- ③ Tsugunobu Andoh、Satomi Haza、他 2 名、Involvement of leukotriene B4 in spontaneous itch-related behavior in NC mice with atopic dermatitis-like skin lesions、Experimental Dermatology、査読有、20 巻、2011、894-898  
DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01346.x

- ④ Tsugunobu Andoh、Qun Zhang、他 5 名、Inhibitory effects of methanol extract of Ganoderma lucidum on mosquito allergy-induced itch-associated responses in mice、Journal of Pharmacological Sciences、査読有、114 巻、2010、292-297  
DOI:  
<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.10180FP>

[学会発表] (計 13 件)

- ① 安東嗣修、どうしても止めたい「かゆみ」。でも「かゆみ」ってどうやって起こるの?、平成 24 年度富山駅前サテライト公開講座「知の探求～豊かな暮らしのために～」、2012 年 5 月 19 日、富山
- ② Tsugunobu Andoh、Mechanisms of itch in atopic dermatitis and the therapy using Traditional Kampo Medicine、Symposium in Research Institute of Korean Oriental Medicine in Suncheon National University、2011 年 11 月 22 日、Suncheon、Korea
- ③ Tsugunobu Andoh、他、Proteases and itch、21st International Symposium of Itch、2011 年 10 月 29 日、大阪
- ④ Tsugunobu Andoh、Regulation of itch in atopic dermatitis using traditional medicine、13th International Symposium on Traditional Medicine、2011 年 10 月 13-14 日、富山
- ⑤ 安東嗣修、アレルギー性掻痒と新規疾患分子マーカー、富山大学コラボフェスタ 2011、2011 年 9 月 28 日、富山
- ⑥ Tsugunobu Andoh、他、Granzyme A and proteinase-activated receptor 2 are involved in the induction of itch-associated responses to mosquito allergy in mice、the 6th World Congress on Itch、International Workshop for the Study of Itch、2011 年 9 月 4-6 日、Brest、

France

- ⑦ 安東嗣修、他、蚊アレルギー性掻痒へのプロテアーゼ活性化受容体 2 と CD4 陽性 T 細胞由来 グランザイム A の関与、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 22-24 日、横浜
- ⑧ 羽座沙都美、他、アトピー性皮膚炎のマウスモデルの自発的掻き動作におけるロイコトリエン B4 の関与、日本薬学会北陸支部第 122 回例会、2010 年 11 月 21 日、金沢
- ⑨ Tsugunobu Andoh、Peripheral mechanisms of the induction of itch、Neuro2010、2010 年 9 月 3 日、神戸
- ⑩ 安東嗣修、アレルギー疾患の新規バイオマーカー グランザイム A、2010 バイオアカデミーフォーラム、2010 年 6 月 30 日、東京
- ⑪ 安東嗣修、動物モデルと痒みの評価法、第 109 回日本皮膚科学会総会、2010 年 4 月 16 日、大阪

〔図書〕（計 1 件）

- ① 安東嗣修、他、診断と治療社、オピオイドと痒み：臨床医必須—全身とかゆみ、宮地良樹編、2011、191（110-111）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用  
発明者：安東嗣修、中野 祐、倉石 泰  
権利者：富山大学  
種類：特許  
番号：特願 PCT/JP2008/73245  
出願年月日：2010 年 6 月  
国内外の別：アメリカへの移行出願

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安東 嗣修 (ANDOH TSUGUNOBU)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・准教授  
研究者番号：50333498

### (2) 研究協力者

木村 優祐 (KIMURA YUSUKE)  
富山大学・薬学部薬学科・学生