

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20686

研究課題名（和文）iPS細胞由来ヒト感覚神経を用いたアトピー性皮膚炎における痒みのメカニズムの探求

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of itch in atopic dermatitis by the peripheral sensory nervous system derived from human iPS cells

研究代表者

山村 和彦（Yamamura, Kazuhiko）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80936427

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、そう痒惹起物質に対するヒト感覚神経の反応を検証し、アトピー性皮膚炎における痒みのメカニズムを探求するものである。

ヒト神経細胞株（SH-SY5Y）を複数のそう痒惹起物質と疼痛惹起物質で刺激し、MAPKのリン酸化を調べたが大きな差はなかった。同細胞株をそう痒惹起物質と疼痛惹起物質で刺激したところ、疼痛惹起物質とは異なり、そう痒惹起物質では比較的なだらかな神経興奮が長時間続くことがわかった。iPSより作成された感覚神経をそう痒惹起物質と疼痛惹起物質で刺激しRNA-seqで解析したところ、そう痒惹起物質で特徴的な遺伝子群の発現が認められた。現在論文投稿に向けてデータ解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって初めてヒト感覚神経細胞をそう痒惹起物質で刺激した際の反応、神経興奮、遺伝子発現が規定された。このことはアトピー性皮膚炎を含む疾患での痒みのメカニズムを理解する上で非常に重要なことだと考えられる。特に痒みに対してヒト感覚神経は特徴的な神経興奮パターンをとり、特徴的な遺伝子発現があることが明らかとなったため、今後、今回の研究で得られた知見を活かして痒みの神経興奮や特定の遺伝子・タンパクをターゲットとした痒みの治療法が開発される可能性があり、今回の研究は学術的にも社会的にも非常に有意義なものであったと考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study aims to characterize the response of human sensory nerves to pruritogens and explore the mechanism of itch in atopic dermatitis.

MAPK phosphorylation checked in A human neuronal cell line (SH-SY5Y) in the presence of several pruritogenic and pain mediators. However, no significant changes were observed between those mediators. Calcium influx experiments showed specific neuronal excitation induced by pruritogenic mediators. RNA-sequencing in human sensory neurons derived from iPS cells showed specific gene expressions when the cells were cultured with pruritogens. We are currently analyzing the data for submission.

研究分野：皮膚科学分野

キーワード：アトピー性皮膚炎 痒み 感覚神経 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

難治性アトピー性皮膚炎に対する治療は、T細胞由来のサイトカインである IL-4, IL-13, IL-31 を標的とした分子生物学的製剤、内服薬により長足の進歩を遂げた。しかしながら、これらの治療をもってしても痒みの改善率はおよそ6-7割にとどまっていたため、痒みに対する研究・治療法の開発は喫緊の課題であると考えられた。アトピー性皮膚炎の本質ともいえる激しい痒みに対する研究は、ヒト感覚神経を用いた機能的な実験が確立されてないこともあり、大部分が未知であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来の末梢感覚神経細胞、およびヒト神経細胞株を用いてヒト感覚神経のそう痒惹起物質に対する反応を特徴づけ、機能的な実験系を確立することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト iPS 細胞由来の感覚神経細胞、およびヒト神経細胞株を用いてヒト感覚神経のそう痒惹起物質に対する反応、及び神経細胞の変化を解析した。

### < MAPK のリン酸化による痒みの評価 >

脊髄後根神経節(DRG)様ヒト神経細胞株 (SH-SY5Y)を複数のそう痒惹起物質: ヒスタミン, IL-31, SLIGRL-NH2 (PAR2 agonist)と疼痛惹起物質: プラジキニン、セロトニンで刺激し、これまで痒みでリン酸化が亢進していると報告のあった ERK 等のリン酸化をウエスタンブロット法で確認した。

### < Ca 流入による痒みの評価 >

SH-SY5Y 細胞株をそう痒惹起物質と疼痛惹起物質で刺激し、Ca 流入を測定することで痒み刺激に対する特徴的な神経興奮がみられるかを検証した。Ca 流入は蛍光指示薬を用いて蛍光強度で測定した。

### < ヒト感覚神経の遺伝子発現変化 >

iPS 細胞より作成されたヒト末梢感覚神経をそう痒惹起物質と疼痛惹起物質で刺激し、時間別(6, 24, 72 時間)で回収し、RNA-sequencing で解析、痒み刺激で特徴的な遺伝子発現が見られるかを検証した。

## 4. 研究成果

研究は概ね順調に進み、現在論文投稿に向けてデータを解析、検証実験を行っているところである。

### < MAPK のリン酸化による痒みの評価 >

脊髄後根神経節(DRG)様ヒト神経細胞株 (SH-SY5Y)を複数のそう痒惹起物質: Compound48/80, IL-31, SLIGRL-NH2 (PAR2 agonist)と疼痛惹起物質: プラジキニン、セロトニンで刺激し、これまで痒みでリン酸化が亢進していると報告のあった ERK のリン酸化をウエスタンブロット法で確認した。そう痒惹起物質でリン酸化は亢進したものの、疼痛惹起物質でも同様のリン酸化を認め、痒みへの特異性は確認できなかった。同様にして他の MAPK である p-38 と JNK のリン酸化を調べたところ、p-38 は刺激によってより鋭敏にリン酸化を示すことがわかったが、痛みと痒みに対する反応の差異は確認できなかった。JNK の発現は低く、評価は困難であった。

### < Ca 流入による痒みの評価 >

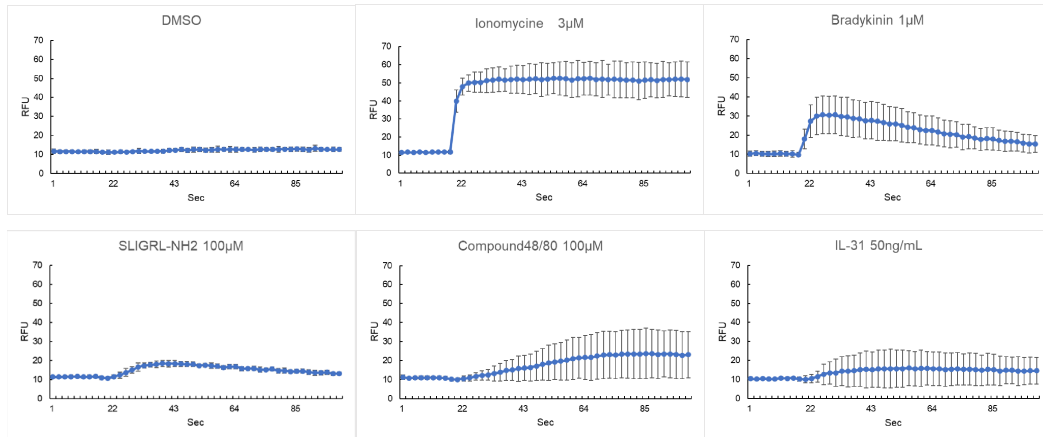
SH-SY5Y 細胞株をそう痒惹起物質と疼痛惹起物質で刺激したところ、疼痛惹起物質(プラジキニン)とは異なり、SLIGRL-NH2, Compound48/80, IL-31 といったそう痒惹起物質では比較的なだらかな神経興奮が長時間続くことがわかった(図1)。

### < ヒト感覚神経の遺伝子発現変化 >

iPS 細胞より作成された感覚神経をそう痒惹起物質と疼痛惹起物質で刺激し、時間別(6, 24, 72 時間)で回収した。回収した細胞を RNA-sequencing で解析したところ、特に6時間、72時間で痒みに特徴的な遺伝子群の発現が認められた。そう痒惹起物質刺激のみに共通して上昇する遺伝子について調べてみると、コードされるタンパク質は比較的分子量の小さいものであり、1次感覚神経と介在ニューロン、中枢神経を媒介するそう痒に特異的な伝達物質である可能性が考えられた。アライメントを調べてみたところ、ヒトとマウスの相同性は8割以上であった。このことから、申請者が同定した候補物質は哺乳動物で保存された痒みを伝達する物質である可能性があり、現在 *in vivo* の実験でこれらの遺伝子群に関連するタンパクが実際の痒みに影響するかどうかの摂動実験についてマウスを用いて進めている。

<今後の方針>

今回の研究で同定された、そう痒に関連すると思われる候補物質について評価・解析を進める。確立されつつある Ca 流入実験で候補物質の Ca 流入パターンを解析し、マウスへの候補物質の髄腔内投与で搔破行動が誘発されるかを評価する。現在、マウスへの髄腔内投与の予備実験を行っており、NMDA を用いた髄腔内投与は徐々に成功率が上がってきている。近日、実際の候補物質を投与し、摂動実験を行う。



**SHSY5Y細胞を刺激したときの蛍光強度の変化によるカルシウム流入解析**

陰性コントロール (DMSO), 陽性コントロール (Ionomycine), 疼痛惹起物質 (Bradykinin),  
そう痒惹起物質 (SLIGRL-NH2, Compound48/80, IL-31), 4回分の実験の平均, エラーバー: SD

図1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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