

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460717

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎の痒み発生への皮膚アスパラギン酸プロテアーゼSASPaseの役割

研究課題名(英文) Role of skin aspartic protease SASPase 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)・准教授

研究者番号：50333498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎マウスモデル皮膚のプロテオーム解析により見出されたアスパラギン酸プロテアーゼSASPaseのアトピー性皮膚炎における痒みへの役割を検討した。SASPaseは、アトピー性皮膚炎マウスモデル皮膚においてその発現が増加しており、それ自身が痒み因子であることを見出した。SASPaseの発現が主に表皮であり、さらに末梢神経の終末が、表皮内まで伸展していた。我々は、SASPaseが、神経反発因子を切断することを見出した。以上の結果から、SASPaseは、アトピー性皮膚炎における痒み因子の一つであり、さらに皮膚感受性増大に關与する神経伸展に重要な役割を担っていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Aspartic protease SASPase in the skin of mice with atopy-like dermatitis (dermatitis mice) has been found using proteome analysis in our previous study. In this study, we examined whether SASPase was involved in itching in mice with atopic dermatitis. The expression of SASPase was increased in the skin of dermatitis mice, compared with healthy mice. An intradermal SASPase, but not heat-inactivated SASPase, elicited itch-related responses. SASPase was distributed in epidermis, especially granular layer and stratum spinosum. In the skin of dermatitis mice, the peripheral nerves were elongated into the epidermis. Interestingly, SASPase digested nerve repellent factor expressed in epidermis. These findings suggest that SASPase is one of itch mediators and also may play an important role on the elongation of peripheral sensory nerves.

研究分野：薬理学

キーワード：痒み アトピー性皮膚炎 SASPase プロテアーゼ

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掻痒性皮膚疾患として位置づけられている。アトピー性皮膚炎患者の症状は、主に掻痒、皮膚炎及び皮膚の乾燥が挙げられる。この中で、特に痒みのコントロールが患者の希望する最優先治療となっている。近年、特に小児アトピー性皮膚炎患者が多くなり、痒みによる掻破行動を抑制することは難しく、成人においても夜間の掻破行動のコントロールは困難を極めている。痒みはストレスを誘発するだけでなく、皮膚及び眼への掻破は、皮膚症状の更なる悪化及び白内障へと導く。したがって、痒みの抑制は非常に重要な位置を占めており、治療の最重要課題となっている。事実、アトピー性皮膚炎患者に対し、手腕の物理的拘束による掻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、痒みのコントロールが皮膚炎の治療に有効であることが報告されている。しかしながら、痒みの治療の第一選択薬である抗ヒスタミン薬はこのようなアトピー性皮膚炎の痒みに対して無効である場合が多い。このことは、ヒスタミン以外の痒みのメディエーターの存在を示唆する。これまでアトピー性皮膚炎に関しては、皮膚炎発症の機序の解明やその治療に焦点がおかれ、痒み自身の発生機序に関する研究はほとんど進んでいない。その為、治療に有用な鎮痒薬が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、非常に重要である。

我々は、アトピー性皮膚炎マウスモデルの皮疹部皮膚のプロテーム解析並びにプロテアーゼ解析により、アスパラギン酸プロテアーゼの一つである SASPase の活性並びに発現の増加を新たに見出した。SASPase は、ヒトやマウスによって表皮顆粒層から発見された。現在までに、SASPase は、皮膚において保湿に関係していること以外は、その機能は知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、アトピー性皮膚炎マウスモデル皮膚のプロテーム解析並びにプロテアーゼ解析により見出されたアスパラギン酸プロテアーゼ SASPase のアトピー性皮膚炎の痒みへの関与とその発生機序に関して検討した。

3. 研究の方法

実験動物：

実験には、雄性の NC 系マウスを用いた。NC 系マウスは、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反応は発症しない(健常マウス: 図1)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・掻痒モデルマウス(皮膚炎マウス: 図2)である。

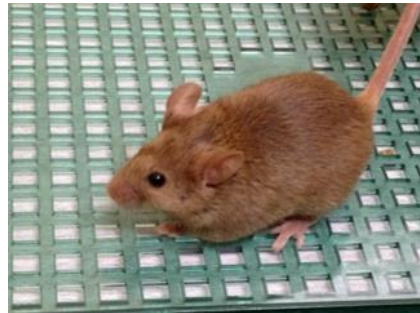


図1 健常 NC マウス



図2 皮膚炎 NC マウス

組換え SASPase の作製：

組換え SASPase の作製には、mouse SASPase cDNA の一部に変異を導入(大腸菌内で自己分解できないように)し、pGEX ベクターに組みこんだものを使用(株式会社カン研究所より供与)。その後、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST : Glutathione S-transferase) との融合タンパクを大腸菌にて作製し、グルタチオンセファロースカラムで精製し、実験に使用した。SASPase の精製は、ポリアクリルアミドゲルにより確認した。

行動実験：

行動観察の1時間前にマウスを4つに区画した行動観察用ケージ(13×9×40 cm/区画)に入れ、撮影環境にマウスを馴化させた。処置後、無人環境下にマウスの行動をデジタルビデオカメラで撮影した。ビデオの再生により、後肢による、SASPase の注射部位およびその近傍への掻き動作回数をカウントした。一部の実験では、全身への掻き動作回数をカウントした。マウスは、1秒間に数回掻くので後肢をあげて降ろすまでの一連の動作を掻き動作の1回としてカウントした。

(*) SASPase を皮内注射する場合は、行動実験の少なくとも前日までに、マウス吻側背部の毛をバリカンで除毛しておいた。

電気生理学的解析：

ウレタン深麻酔下に雄性 NC マウス背部皮膚を切開し椎弓切除を施し、固定具にマウスを固定し、脊髄表面に酸素飽和し37°Cに加熱した人工脳脊髄液(組成(mM); NaCl 117, KCl 3.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glucose 11)を灌流した。実体顕微鏡下に硬膜、くも膜、軟膜を処理し、タングステン電極を脊髄表層より挿入し皮膚を刺激しながら受容野の確認を行い、単一細胞から記録を行った。

免疫組織化学染色：

マウスは、ペントバルビタール麻酔下、開胸後、右心房を切開し、左心室よりリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を灌流し、脱血死させた。その後、4%パラホルムアルデヒドを灌流し、組織を固定した。皮膚を摘出後、4%パラホルムアルデヒドにて後固定を行った。続いて30%スクロース溶液で置換し、OCTコンパウンドで包埋後凍結し、常法に従い、凍結切片を作製した。0.2%Triton X-100 含有 PBS (PBS-T) で洗浄後、ブロッッキングを行い、一次抗体としてマウス SASPase ポリクローナル抗体あるいは、抗 PGP9.5 抗体を用いて、4°C 一晚反応させた。洗浄後、蛍光標識した抗ウサギ抗体あるいは抗モルモット抗体と室温で1時間反応させた。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ウエスタンブロッティング：

マウスは、ペントバルビタール麻酔下、開胸後、右心房を切開し、左心室よりリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を灌流し、脱血死させた。吻側背部皮膚の毛をバリカンにて除毛、シェーバーにて剃毛し、皮膚を摘出した。直ちに液体窒素にて凍結し、実験に用いるまで-80°C で保管した。皮膚は細切され、抽出液内にてホモジナイズされ、タンパク質が抽出された。タンパク質は、定量後、SDS ポリアクリルアミドゲルにて分子量に応じて分離し、PDEF メンブランに転写した。その後、ブロッッキングを行い、一次抗体としてマウス SASPase ポリクローナル抗体を用いて、4°C 一晚反応させた。洗浄後、西洋ワサビ酸化酵素が結合した抗ウサギ抗体と室温で1時間反応させた。その後、ECL (Enhanced Chemi Luminescence) 溶液と反応させ生じた発光を X 線フィルムで検出した。

4. 研究成果

(1) 皮膚炎 NC マウスの自発的搔き動作へのアスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬の効果：

皮膚炎 NC マウスは、健常 NC マウスより有意に自発的搔き動作が増加していた(図3)。皮膚炎 NC マウスにおける自発的搔き動作は、レトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬インジナビルにより、溶媒投与群

と比べて有意に減少した。一方、その他のアスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬ペプスタチン A では、皮膚炎 NC マウスの自発的搔き動作は抑制されなかった。

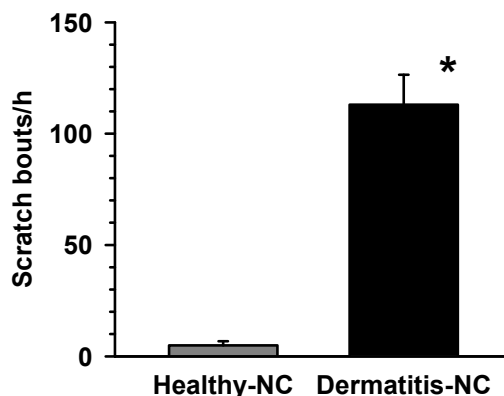


図3 健常 NC マウス (Healthy-NC) と皮膚炎 NC マウス (Dermatitis-NC) の搔き動作回数 * $P < 0.05$ vs Healthy-NC ($n = 8$)

(2) 皮膚炎 NC マウス及び健常 NC マウスの脊髄後角ニューロンの神経活動に関する電気生理学的解析とインジナビルの効果：

健常 NC マウス脊髄表層から記録を行うと自発的発火は全く観察されなかった。一方、皮膚炎 NC マウス脊髄表層から記録を行うと一部の細胞で自発的発火が観察された。この自発発火は、受容野への引っ掻き刺激により有意に抑制され、brush 刺激では抑制されなかった。このような自発発火が見られた細胞に対し、インジナビルを投与すると、投与10分後あたりから自発発火が顕著に抑制された。この抑制効果は長時間にわたり続いた。一方、溶媒(生理食塩水)の投与は、自発発火に対して影響を与えなかった。

(3) 皮膚炎 NC マウス及び健常 NC マウス皮膚における SASPase の発現と末梢神経伸展：

健常 NC マウス吻側背部皮膚と比べ、皮膚炎 NC マウス皮膚では、SASPase の発現が有意に増加していた。また、皮膚炎 NC マウス皮膚では、健常 NC マウス皮膚ではほとんど認められない表皮内への末梢神経の伸展が認められた。

(4) 皮膚炎 NC マウス及び健常 NC マウス皮膚における SASPase の分布：

健常 NC マウス皮膚において、表皮顆粒層の SG1 領域に SASPase の強い免疫活性が認められた。皮膚炎 NC マウスでは、表皮顆粒層全体に加え、有棘層にも SASPase の強い免疫活性が認められた。

(5) 組換え SASPase の自己活性化：

組換え SASPase は、自己切断により活性化型 SASPase となる。本実験では、精製した SASPase が自己活性化するかどうか検討した。組換え SASPase を活性化用の緩衝液に入れ、

37°Cでインキュベートし、経時間的にサンプルを採取し、SDS-ポリアクリルアミドゲルでタンパク質を分離した。その結果、37°Cでインキュベート開始1時間以内で組換えSASPaseのほとんどが自己活性化していた(図4)。

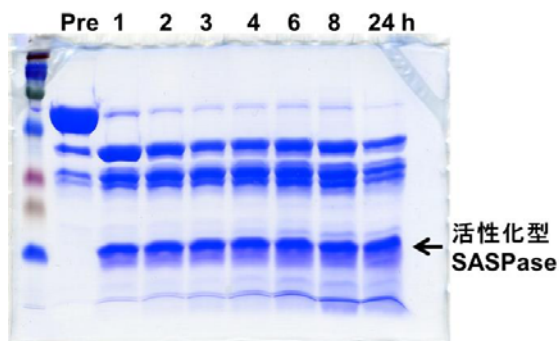


図4 SASPaseの自己活性化

(6) 皮膚炎 NC マウス及び健常 NC マウス皮膚への SASPase の皮内注射への影響:

健常マウス吻側背部へのSASPaseの皮内注射により用量に依存して掻き動作回数の増加が認められた。皮膚炎 NC マウスの中程度の掻き動作を示すマウスにおいては、SASPaseの皮内注射により、より顕著な掻き動作回数の増加が認められた。その増加は、SASPase皮内注射後10分後から増加していった。一方、セリンプロテアーゼであり表皮ケラチノサイトから産生される kallikrein 5 (KLK5)の健常 NC マウスへの皮内注射により顕著に掻き動作の増加が認められた、特に注射後10分以内に掻き動作回数のピークが認められた。

SASPaseの活性が重要かどうか判定するため、SASPaseを熱処理した。その結果、熱処理したSASPaseでは、掻き動作の増加は認められなかった。

また、皮膚炎 NC マウスへのSASPaseの皮内注射により増加した掻き動作は、 μ オピオイド受容体拮抗薬ナルトレキソンにより抑制された。

(7) SASPaseによる神経反発因子の切断活性:

SASPaseに神経反発因子タンパク質を作用させたところ、SASPaseは神経反発因子を切断した。

(8) まとめと考察

SASPaseは、健常では表皮顆粒層のSG1領域に発現分布するレトロウイルス様アスパラギン酸プロテアーゼであり、前駆体SASPaseが自己分解により活性化型SASPaseへとなり、皮膚のバリア機能に重要な役割を担っていると考えられている。これまでに我々は自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルNCマウス表皮のプロテオーム解析により、

SASPaseを見出した。本研究では、皮膚炎 NC マウスの自発的掻き動作がレトロウイルス様アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤である indinavir の投与により皮膚炎発症 NC マウスの自発的掻き動作が抑制された。一方、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤ペプスタチン A では抑制されなかった。このことは、他研究室の既報の *in vitro* の実験結果と同様であった。興味あることに、皮膚炎 NC マウスの脊髄後角ニューロンにおいて自発発火が増加していることが見出され、この自発発火がインジナビルによって行動実験と同様に抑制されたことも明らかとなった。従って、常にSASPaseを介した痒み信号が入力していることが示唆される。また、健常 NC マウスに比べ皮膚炎発症 NC マウス皮膚で、活性化型SASPaseの増加が認められた。さらに、皮膚炎発症 NC マウス皮膚における免疫組織学的解析で SAPase の発現分布が表皮顆粒層だけでなく有棘層にまで広がっていることも明らかとなった。これらの結果を勘案すると、皮膚炎発症 NC マウスの自発的掻き動作にSASPaseが関与している可能性が示唆される。

本研究では、SASPaseが起痒因子かどうか検討した。健常 NC マウスへのSASPaseの皮内注射は用量依存的に掻き動作が増加したが、非常に少ない回数であった。皮膚炎が発生している皮膚では、皮膚内環境が異なっていることが想定される。そこで、皮膚炎 NC マウスで中程度の掻き動作を示すマウスを選定し、そのマウスへのSASPaseの皮内注射を行ったところ、掻き動作回数の増加が顕著に認められた。この増加が痒みに起因した反応であるかどうか、これまでその判定のツールとして用いられてきた μ オピオイド受容体拮抗薬の効果を検討したところ、SASPaseによる掻き動作が μ オピオイド受容体拮抗薬により抑制された。この結果から、SASPaseは、痒み因子であり、皮膚炎が発症している皮膚(特に表皮内)に存在する因子あるいは細胞に作用して掻き動作が増加している可能性がある。

SASPaseによる痒みの発生機序に関しては、本研究では明らかにできなかった。健常 NC マウスへの痒みの古典的なメディエーターとして知られているヒスタミンを皮内注射しても掻き動作は惹起されない。また、皮膚炎 NC マウスへ抗ヒスタミン薬を投与しても自発的掻き動作は抑制されない。これらの結果から少なくともSASPaseの掻き動作へのヒスタミンの関与は小さいと考えられる。SASPaseの皮内注射では、注射後10分以上たってから掻き動作の増加が観察された。SASPase自身の活性化に加え、皮膚内で産生された因子の活性や健常皮膚ではほとんど存在しないT細胞等の免疫系の細胞に作用して痒み反応が増加している可能性がある。今後詳細に解析をする予定である。一方、比較として実験したセリンプロテアーゼのKLK5による掻き動作は、健常 NC マウスで認めら

れ、更に注射後 10 分以内に搔き動作回数のピークが認められたことから SASPase と異なり少なくとも一部直接神経に作用して搔き動作を惹起していると示唆される。

皮膚炎 NC マウス皮膚では、表皮内に末梢神経が伸展していることが見出された。このような末梢神経の表皮内伸展は健常マウス皮膚では認められない。現在、このような末梢神経の表皮内伸展が皮膚感受性増大や痒みの発症に寄与していることが示唆されている。表皮内末梢神経伸展の機序に一部神経反発因子の減少が示唆されているが、その詳細は不明である。神経反発因子と SASPase による切断アミノ酸の関係を調べたところ、SASPase が神経反発因子を切断する可能性が見出された。そこで、SASPase を神経反発因子に作用させたところ、SASPase は神経反発因子を切断した。In vivo での検証実験は現在行っているが、非常に興味深い知見である。したがって、SASPase が神経反発因子を切断し、不活化することで末梢神経が表皮内に伸展する可能性が示唆される。

以上本研究結果からアトピー性皮膚炎において SASPase は痒み因子であり、また、その発現の増加は末梢神経の伸展にも関与することで皮膚感受性増大に寄与している可能性がある。

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 1 件)

- ① Tsugunobu Andoh, Kenichiro Tsujii, Yasushi Kuraishi. Increase in pruritogenic kallikrein 5 in the skin of NC mice with chronic dermatitis. *Experimental Dermatology*. 査読有. Vol. 24, 2015, pp. 978-980
DOI 10.1111/exd.12828.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Tsugunobu Andoh, Kazuma Nakabayashi, Satomi Haza, Kazushige Obata-Ninomiya, Hajime Karasuyama, Yasushi Kuraishi. Involvement of basophils in spontaneous itch-related responses in mice with atopy-like dermatitis. 8th World Congress on Itch. 2015 年 9 月 27 日～29 日. 奈良春日野国際フォーラム 薨, 奈良
- ② 安東嗣修, 辻井 謙一郎, 倉石 泰. アトピー性皮膚炎モデルマウスの自発的痒み反応へのセリンプロテアーゼ kallikrein 5-PAR2 系の関与. フォーラム創薬富山第 41 回研究会. 2015 年 5 月 28 日. カナルパークホテル富山, 富山
- ③ 安東嗣修. 表皮ケラチノサイトと痒み関連脂質メディエーター. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18 日～2015 年 3 月

- 20 日. 名古屋国際会議場, 名古屋
- ④ 安東嗣修. 痒みの発生機序の最近の知見と鍼治療. 公社) 全日本鍼灸学会 第 32 回中部支部学術集会. 2014 年 11 月 9 日. 富山県鍼灸マッサージ師会館, 富山
- ⑤ 安東嗣修, 辻井謙一郎, 倉石 泰. アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的痒み反応への kallikrein 5 の関与. 第 24 回国際痒みシンポジウム. 2014 年 10 月 18 日. ベルサール神保町, 東京
- ⑥ 安東嗣修, 高橋遼平, 倉石 泰. マウスにおける乾皮症の痒みへの proteinase-activated receptor 2 の関与. 第 10 回加齢皮膚医学研究会. 2014 年 9 月 6 日～9 月 7 日. ホテルグランテラス富山, 富山

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

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) 研究分担者

松井 毅 (MATSUI, Takeshi)
独立行政法人理化学研究所・
統合生命医科学研究センター
・上級研究員
研究者番号 : 10452442

(3) 連携研究者

該当なし