

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860428

研究課題名(和文) 脊髄におけるかゆみの神経伝達物質受容体の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of spinal itch transmitters and development of antipruritic therapy

研究代表者

富永 光俊 (Tominaga, Mitsutoshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50468592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性かゆみの治療法の開発を目指し、*in vivo* 細胞外記録法と薬理学・行動学的手法を駆使して、脊髄におけるかゆみの神経伝達物質受容体システムを解明することを目的とした。その結果、脊髄におけるヒスタミン依存性のかゆみ伝達にはグルタミン酸が最も重要であること、ヒスタミン非依存性のかゆみ伝達にはSP、GRP、グルタミン酸といった複数の神経伝達物質・受容体が関与することが明らかとなった。現在、慢性掻痒の治療法の開発に向けて、アトピー性皮膚炎モデルマウスに対する同定された神経伝達物質受容体ブロッカーの止痒効果を検討中である。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to reveal mechanisms of spinal itch transmission using *in vivo* electrophysiological, pharmacological and behavior methods. We found that SP, GRP, and glutamate each partially contribute to histamine-independent itch, whereas histamine-evoked itch is mediated primarily by glutamate. Co-application of NK-1, GRP, and AMPA receptor antagonists may prove beneficial in treating chronic and intractable itch such as atopic dermatitis. We are currently trying to investigate antipruritic therapeutic effects in chronic itch models such as dry skin and atopic dermatitis.

研究分野：かゆみ科学、皮膚科学、神経科学

キーワード：難治性かゆみ アトピー性皮膚炎 脊髄 神経伝達物質

1. 研究開始当初の背景

かゆみは『掻破したいという欲望を起こさせる不快な感覚』として定義され、外部異物に対する自己防衛反応や全身の異常を知らせるシグナルであると考えられている。

知覚異常としてのかゆみは、痛みと同様に QOL (quality of life) を低下させる。特に、既存治療が無効な『難治性のかゆみ』は、不眠、自殺率(願望)の増加、労働・勉学障害などの一因となっている。しかし、かゆみの発症メカニズムは病態によって千差万別で、有効なかゆみ抑制法も個々に応じて異なる。そのため、疾患横断的な難治性かゆみの新規治療法の開発が切望されており、近年では、『QOL 向上』を最終目標に、世界各国でかゆみ研究を重点化する動きも出始めている。

このような背景から、これまで我々は中心的な研究対象として、アトピー性皮膚炎(AD)における難治性かゆみの発生機序の解明を行い、表皮内神経の稠密化がその一因であることを明らかにした (Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2007, 46: 199-210)。さらに、神経線維の表皮内侵入には、表皮角化細胞由来の神経反発因子が関与することを世界で初めて報告した (Tominaga et al., Br J Dermatol. 2008, 158: 842-4)。また、我々はアセトンによるドライスキンモデルマウスの作製に成功し、ドライスキンが表皮での神経伸長因子の増加と神経反発因子の低下を誘導することを明らかにした (Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2007, 48: 103-111)。最近では、紫外線療法(PUVA (psoralen-ultraviolet A)) を AD 患者に施行すると、その表皮での神経伸長因子と神経反発因子の異常発現を正常化し、表皮内で増殖した神経線維が消退することを発見した (Tominaga et al., J Dermatol Sci. 2009, 55: 40-6)。このように、神経ガイダンス分子に制御された表皮内神経密度がかゆみの難治化に寄与することを明らかにした。

さらに、かゆみ発生における表皮内神経線維の関与をより明確にするために、皮膚に分布するかゆみ神経を組織学的手法で観察する必要があった。この問題に対する突破口が gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) であり、そのノックアウトマウスを用いた研究から、GRPR が脊髄後角におけるかゆみの伝達に關与することが報告された (Sun and Chen, Nature. 2007, 448: 700-3)。

ペプチド作動性後根神経節 (DRG) 細胞は、GRPR のリガンドである GRP を産生する。DRG 細胞の神経線維は、皮膚の表皮 真皮境界部まで投射され、知覚神経として機能する。また、GRP をマウスの脊髄に投与するとかゆみが誘発される。さらに、我々は抗 GRP 抗体を用いた免疫染色法により、マウスの皮膚で GRP 含有神経が存在すること、AD を発症した NC/Nga マウスで表皮内 GRP 含有神経の密度が増加することを発見した (Tominaga et al., J Invest Dermatol. 2009,

129: 2901-5)。これらの研究は、皮膚に分布する GRP 含有神経が AD のかゆみ発生に關与することを示唆するものであるが、『生体内で GRP がかゆみ情報を伝達する神経伝達物質として働いているのか』については不明である。

一方、先行研究により、サブスタンス P (SP) の受容体である NK1 receptor (NK1R) がかゆみの脊髄伝達に關与すること (Carstens et al., Neuroreport. 2010, 21: 303-8)、一部の AD 及び透析患者において NK1R 拮抗薬 (aprepitant) の経口投与が難治性かゆみを抑制すること (Ständer et al., PLoS One. 2010; 5(6):e10968) が報告されている。また、*in vitro* パッチクランプ法を用いた研究では、1 次求心性神経から脊髄後角へのかゆみ情報の伝達にグルタミン酸が關与することが示唆されている (Koga et al., Mol Pain. 2011;7: 47)。このように近年では、難治性かゆみの治療法開発に向け、脊髄を標的としたかゆみ研究が盛んに行われ始めている。このような状況の中、*in vivo* 細胞外記録法 (Akiyama et al., Eur J Neurosci. 2012, 36: 2311-6) と薬理学的手法を組み合わせることで、脊髄におけるかゆみ情報の伝達様式を解明することで難治性かゆみの治療法開発に寄与することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、難治性かゆみの治療法開発を目指し、*in vivo* 細胞外記録法と薬理学・行動学的手法を駆使して、

- 1) 脊髄におけるかゆみの神経伝達物質受容体システムを解明すること、
- 2) 慢性掻痒モデルマウスを用いてかゆみの神経伝達物質受容体を標的とした難治性かゆみの治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 脊髄におけるかゆみの神経伝達物質・受容体システムを明らかにするために、*in vivo* 細胞外記録法により、マウス(麻酔下)の脊髄から神経発火の長時間記録を行った。

かゆみ刺激には代表的な起痒物質であるヒスタミンに加え、ヒスタミン非依存性のかゆみを惹起する chloroquine (CQ) を用いた。脊髄後角浅層 (I - II 層) の神経細胞はかゆみ伝達に關与する (Akiyama et al., J Neurosci. 2009, 29: 6691-9)。

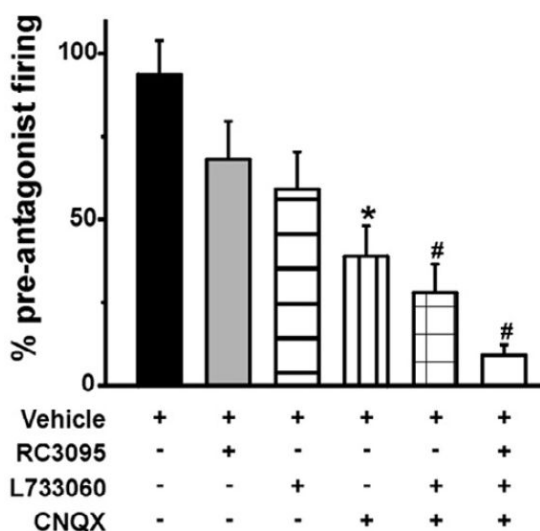
そこで、脊髄後角浅層を標的にタングステン電極を刺し、マウスの足底皮内にかゆみ刺激を与え、神経発火を記録した。かゆみ刺激に応答した場合、神経発火中に神経伝達物質受容体候補 (GRPR, NK1R, AMPAR) のアンタゴニスト (RC-3095, L-733060, CNQX) を脊髄表面に添加し、神経発火に対する抑制効果を検討した。

- 2) コナヒョウヒダニ虫体成分含有軟膏の

反復塗布により作製した AD モデル NC/Nga (Yamamoto et al., Allergol Int. 2007, 56:139-48) のかゆみ行動 (scratching) に対する神経伝達物質受容体アンタゴニストの影響について検討した。

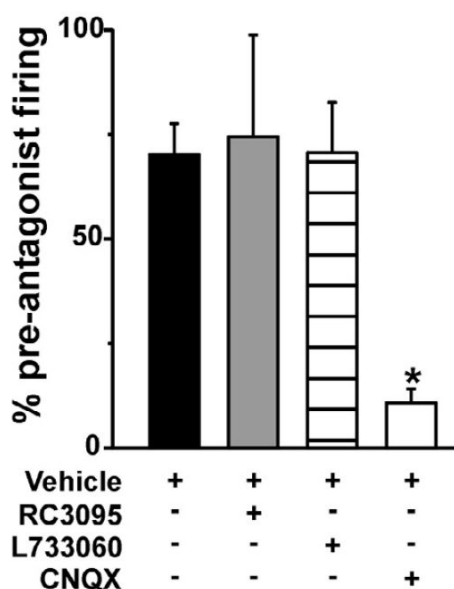
3. 研究成果

ヒスタミン非依存性のかゆみ刺激である CQ をマウスの足底部に投与することで生じる脊髄後角神経の発火は、substance P(SP) 受容体である NK1R アンタゴニスト (L733060)、グルタミン酸受容体の一つである AMPAR アンタゴニスト (CNQX)、ガストリン放出ペプチド受容体 (GRPR) アンタゴニスト (RC3095) のコンビネーション脊髄投与で完全に抑制された(図 1)。



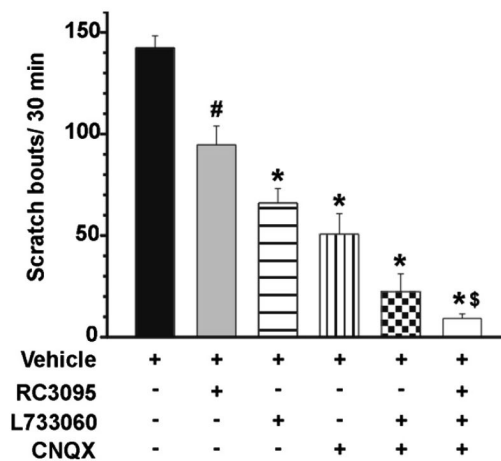
(図 1. CQ 応答性細胞に対する神経伝達物質受容体に対するアンタゴニストの影響)

一方、ヒスタミン刺激で惹起された脊髄後角神経の発火は CNQX の脊髄投与で完全に抑制された(図 2)。



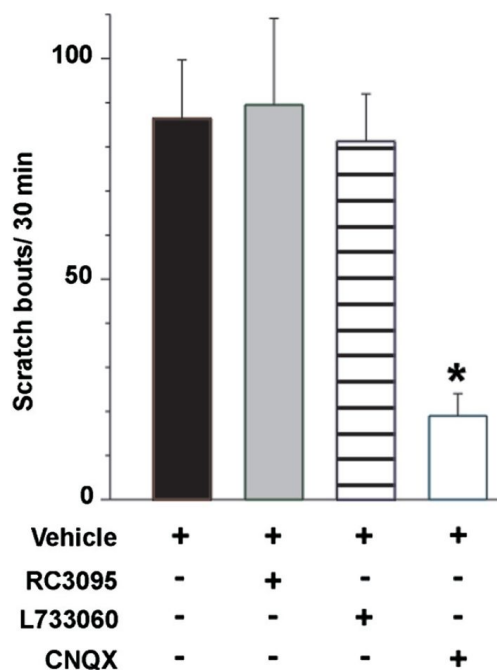
(図 2. ヒスタミン応答性細胞に対する神経伝達物質受容体に対するアンタゴニストの影響)

上記 3 種類のアンタゴニストを髄腔内投与することで CQ 誘発性の搔破行動は有意に抑制された(図 3)。



(図 3. CQ 誘発性かゆみ行動に対する神経伝達物質受容体アンタゴニストの影響)

その一方で、CNQX の髄腔内投与はヒスタミン誘発性の搔破行動を有意に抑制した(図 4)。



(図 4. ヒスタミン誘発性かゆみ行動に対する神経伝達物質受容体アンタゴニストの影響)

従って、脊髄におけるヒスタミン依存性のかゆみ伝達にはグルタミン酸が最も関与す

ること、ヒスタミン非依存性のかゆみ伝達には SP、GRP、グルタミン酸といった複数の神経伝達物質・受容体が関与することが明らかとなった。

これらの成果を受けて、慢性掻痒モデルマウスに対する同定された神経伝達物質受容体ブロッカーの止痒効果の検討を行っている。アトピー性皮膚炎モデルマウスである NC/Nga マウスに L733060、CNQX、RC3095 を併用し、髄腔内投与することで、掻破行動及び皮膚炎に対する影響について検討中である。

今後は、慢性掻痒モデルマウスに対する神経伝達物質受容体阻害剤の止痒効果の検討を引き続き行い、投与量や投与期間などの投薬条件を設定することで臨床応用に繋がる成果を目指す。

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 19 件)

Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Negi O, Ogawa H, Takamori K. Retinoid-related orphan receptor α is involved in semaphorin 3A expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 79, 84–6, 2015. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.03.015. 査読有

Akiyama T, Tominaga M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E. Role of spinal bombesin-responsive neurons in non-histaminergic itch. *J Neurophysi*. 112, 2283–9, 2014. DOI: 10.1152/jn.00409.2014. 査読有

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Kaneda K, Ko KC, Matsuda H, Kimura U, Ogawa H, Takamori K. The excimer lamp induces cutaneous nerve degeneration and reduces scratching in a dry-skin mouse model. *J Invest Dermatol*. 134, 2977–2984, 2014. DOI: 10.1038/jid.2014.256. 査読有

Tominaga M*, Kawasaki H*, Sigenaga A, Kamo A, Kamata Y, Iizumi K, Kimura U, Ogawa H, Takamori K, Yamakura F. Importance of tryptophan nitration of carbonic anhydrase III for morbidity of atopic dermatitis. *Free Radic Biol Med*. 73:75–83, 2014 *equally to this work. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.034. 査読有

Tominaga M, Takamori K. Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: therapeutic implications. *J Dermatol*. 41, 205–212, 2014. DOI: 10.1111/1346-8138.12317. 査読有

Akiyama T, Tominaga M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E. Roles of glutamate, substance P and gastrin releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and

non-histaminergic itch. *Pain*. 155, 80–92, 2014. DOI: 10.1016/j.pain.2013.09.011. 査読有

〔学会発表〕(計 32 件)

Kamata Y, Sakaguchi A, Umehara Y, Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Effects of H₁-antihistamines on expression of axon guidance molecules in normal human epidermal keratinocytes. 2015 SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY (SID) annual meeting, Atlanta, Georgia, USA, May 6-9, 2015 (ポスター発表)

Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. The antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 induces semaphorin 3A production in normal human epidermal keratinocytes. 2015 SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY (SID) annual meeting, Atlanta, Georgia, USA, May 6-9, 2015 (ポスター発表)

Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Takamori K. The retinoid-related orphan receptor ROR α promote semaphorin 3A expression in human keratinocytes. 2014 SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY (SID) annual meeting, Albuquerque, New Mexico, USA, May 7-10, 2014 (ポスター発表)

Akiyama T, Tominaga M, Davoodi A, Nagamine M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E. Spinal antinociceptive effect of gastrin releasing peptide (GRP) via GABAergic inhibitory interneurons expressing the GRP receptor (GRPR). Neuroscience 2014, Washington DC, USA, November 15-19, 2014 (ポスター発表)

Tominaga M, Akiyama T, Carstens MI, Carstens E, Takamori K. Analysis of spinal neurotransmitters in histaminergic and non-histaminergic itch. 第 39 回日本研究皮

膚科学会, 大阪, 2014 年 12 月 (口頭発表)

〔図書〕(計 1 件)

Tominaga M, Takamori K. Sensitization of Itch Signaling: Itch Sensitization—Nerve Growth Factor, Semaphorins. In: Carstens E, Akiyama T, editors. Itch: Mechanisms and Treatment. Boca Raton (FL): CRC Press; 2014. 441 (Chapter 17; 293-303).

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: セマフォリン 3A 遺伝子発現増強剤、及びセマフォリン 3A タンパク産生亢進剤
発明者: 吉岡康子、鎌田弥生、冨永光俊、高森建二

権利者: 小林製薬株式会社、学校法人順天堂

種類: 特許

番号: 特願 2015-074574 号

出願年月日: 2015 年 3 月 31 日

国内外の別: 国内

名称: 掻痒性皮膚疾患の治療又は予防

発明者: 梅原芳恵、鎌田弥生、冨永光俊、ニヨンサバ・フランソワ、高森建二

権利者: 学校法人順天堂

種類: 特許

番号: 特願 2014-177778 号

出願年月日: 2014 年 9 月 2 日

国内外の別: 国内

名称: セマフォリン 3A の発現調節法

発明者: 鎌田弥生、冨永光俊、高森建二

権利者: 学校法人順天堂

種類: 特許

番号: 特願 2013-097100 号、
PCT/JP2014/062073

出願年月日: 2013 年 5 月 2 日

国内外の別: 国内、国外

〔その他〕

ホームページ等

順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所・高森建二グループ URL

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kankyo_igaku/k4_takamori.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

冨永 光俊 (TOMINAGA Mitsutoshi)

順天堂大学・大学院医学研究科・環境医学研究所・准教授

研究者番号: 50468592