

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870729

研究課題名(和文)エキシマランプ照射の神経変性作用の解明と痒み治療への応用

研究課題名(英文) Investigation of the effect of excimer lamp on intraepidermal nerve fibers and its application to intractable pruritus

研究代表者

加茂 敦子 (Kamo, Atsuko)

東海大学・健康科学部・講師

研究者番号：50614088

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、エキシマランプ照射の表皮内神経線維に対する直接作用と痒みに対する作用の解明を目指した。ラット後根神経節細胞の神経線維のみに対するエキシマランプ照射では、神経線維の退縮を示すブレップ数の増加やNmnat2発現の減少を誘導することが明らかとなった。さらに、アトピー性皮膚炎モデルマウスに対する照射では、痒みに対する速効性が明らかとなり、その後の病態改善につながる事が推察された。本研究成果は、表皮内神経が関与する難治性痒みに対し、エキシマランプ照射が有効な治療戦略の一つであることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate the effects of excimer lamp on intraepidermal nerve fibers directly and on pruritus of atopic dermatitis (AD) model mice. Irradiation to nerve fibers in cultured dorsal root ganglion neurons increased bleb formation and decreased nerve fiber expression of nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase 2, suggesting degenerative changes in these fibers. A single irradiation to AD model mice significantly inhibited itch-related behavior one day later, following improvement in the dermatitis score. These results suggested that excimer lamp is one of effective therapies against intractable pruritus involving intraepidermal nerve fibers.

研究分野：痒み科学、

キーワード：難治性痒み 表皮内神経線維 エキシマランプ アトピー性皮膚炎 ドライスキン

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎 (AD) は、激しい痒みを伴う慢性・反復性皮膚炎であり、痒みと搔破の悪循環が難治化を誘導する。したがって、ADの治療において痒みのコントロールは最重要課題である。痒み治療には抗ヒスタミン薬 (ヒスタミンH1受容体拮抗薬) が広く使用されているが、ADの痒みには抗ヒスタミン薬が奏功し難い。このような抗ヒスタミン薬抵抗性の難治性痒みの原因の1つに、起痒刺激の受け手である知覚神経線維の表皮内への侵入・増生が挙げられる。表皮内神経線維は、しばしば角層直下にまで伸展し、外界の痒みシグナルを直接脳に伝達する。これにより、痒み閾値の低下が誘導され、難治化を招くと考えられている。これまで我々の研究グループでは、このような表皮内神経線維の侵入・増生の制御に表皮ケラチノサイトの産生する神経伸長因子や神経反発因子などの軸索ガイダンス分子発現のバランス異常の関与を報告してきた。

申請者らは、先行研究において各種治療法 (保湿剤、ステロイド軟膏、紫外線療法) の表皮内神経線維に対する治療効果を検討した。その結果、これらの治療法の多くでは、軸索ガイダンス分子発現のバランス異常の正常化とともに表皮内神経線維の増生抑制効果が認められることが明らかになった。しかしながら、エキシマランプは最も高い表皮内神経線維の増生抑制効果を示したものの、軸索ガイダンス分子のバランス異常への影響は認められなかった。これらの結果から、エキシマランプ照射は表皮ケラチノサイトではなく、表皮内神経線維に直接作用することが推察された。

2. 研究の目的

本研究では、エキシマランプ照射の表皮内神経線維に対する直接作用と痒みに対する作用を解明するために、(1) ラット後根神経節 (DRG) 細胞の神経線維に対するエキシマランプ照射の影響を検討した。また、(2) 動物モデルを用いて、エキシマランプ照射の表皮内神経増生抑制効果と表皮ケラチノサイトに対する DNA 損傷作用の評価を行った。さらに、(3) 痒みを伴う AD モデルマウスに対しエキシマランプ照射を行うことで、痒み抑制効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) DRG 細胞の神経線維に対するエキシマランプ照射の影響

Axon investigation system (AXIS)を用いた DRG 神経線維のみへのエキシマランプ照射が可能な培養系の構築

皮膚に分布する神経線維の細胞体は脊髄後根神経節に局在する。したがって、表皮内

神経線維に対するエキシマランプ照射の影響を検討するため、神経線維にだけエキシマランプ照射が可能な DRG 細胞の培養系を構築した。AXIS は、微小溝により、神経細胞の細胞体と軸索を空間的に分離できる培養システムである。紫外線透過性がある石英スライドガラスを Poly-D-Lysine と laminin でコートしその上に AXIS を接着させた。AXIS 接着後、DRG 細胞を片側に播き、20 ng/ml NGF を添加した DMEM/F2 培地で約 10 日間培養した。反対側への十分な神経線維の伸長を確認し、細胞体側をアルミホイルで遮蔽後、スライドガラス下側からエキシマランプ照射を行った。

培養 DRG の神経線維に対するエキシマランプ照射の影響

エキシマランプは 308 nm に放射波長のピークがあるが、290 nm 前後の細胞毒性の強い短波長が含まれる。本研究では、この部分の波長をカットするフィルターを用いて、細胞毒性の強い短波長を除いたエキシマランプ照射が神経線維に対する作用を検討した。神経線維に対するエキシマランプ照射の影響は、以下の項目により評価した。

変性神経線維に認められる形態学的変化 (ブレップ) の経時的変化: フィルター装着もしくは非装着の条件で 100, 250 mJ/cm² のエキシマランプ照射を行った。照射前、照射 2, 6, 24, 48 時間後の神経線維あたりのブレップ数を計測し、非照射群、また各照射群間で比較検討した。

Nmnat2 (Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 2) 発現の経時的変化: 神経線維の生存に重要な NAD⁺合成系の酵素である Nmnat2 は、神経線維の変性により発現が低下することが知られている。したがって、エキシマランプ照射を行い、Nmnat2 発現に与える影響を免疫染色法にて検討した。

(2) エキシマランプ照射の表皮内神経増生抑制効果と表皮ケラチノサイトに対する DNA 損傷作用の検討

ドライスキンモデルマウスの作製

ICR マウスの背側部を剃毛し、剃毛 3 日後にアセトンをしみ込ませたコットン (2 × 2 cm) を剃毛した皮膚に 5 分間塗布し作製した。本モデルでは、アセトン処理 48 時間後をピークに表皮内神経線維の増生が認められるため、アセトン処理 24 時間後の表皮内神経線維の増生途中にエキシマランプ照射を行い、その後の増生に与える影響を検討した。

表皮内神経数の計測

アセトン処理 48 時間後の皮膚を採取し、Protein gene product 9.5 (PGP9.5) 陽性神経線維の表皮における分布を解析した。

表皮ケラチノサイトに対する DNA 損傷の評価

UVB 照射による代表的な DNA 損傷の指標

Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) に対する抗体を用いて免疫染色を行い検討した。

(3) ADモデルマウスの掻破行動に対するエキシマランプ照射の影響

ADモデルマウスの作製

NC/Nga マウスの背部を除毛し、4% SDS によるバリア破壊後、同部位にコナヒョウヒダニの虫体成分含有軟膏（ピオスタ AD; 100 mg/site）を週 2 回、3 週間連続塗布することで AD モデルマウスを作製した。発症は皮膚炎の程度（発赤、乾燥、擦創、浮腫、各 3 点満点、計 12 点）、経皮水分蒸散量（TEWL）、掻破行動回数にて確認した。

エキシマランプ治療による病態改善効果の評価

モデルマウスの病変部に 50, 100, 150, 200, 250 mJ/cm² のエキシマランプ照射を行い、皮膚炎スコア、TEWL、掻破行動回数を検討した。また、照射 9 日後の皮膚を採取し、組織学的手法により表皮内神経線維数を検討した。

4. 研究成果

(1) 培養 DRG の神経線維に対するエキシマランプ照射の影響

エキシマランプ照射（100, 250 mJ/cm²）後、神経線維におけるプレップ数は、経過時間依存的、また、照射線量依存的に増加した。フィルター非装着群と比較して、フィルター装着群のプレップ数は低値であったが、照射前と比較して照射 120 時間後で統計学的な有意差をもって増加していた。さらに、神経線維の生存に必要なタンパク質である Nmnat2 の発現を検討した結果、フィルター装着 250 mJ/cm² 照射群において、照射 24 時間後の神経線維における Nmnat2 発現が低下した。以上の結果から、エキシマランプ照射に神経線維の退縮誘導作用があることが示唆された。

(2) エキシマランプ照射の表皮内神経増生抑制効果と表皮ケラチノサイト DNA 損傷作用の検討

表皮内神経の増生が認められるドライスキンモデルマウスにおいて、単回のエキシマランプ照射は照射線量依存性（100, 250 mJ/cm²）に表皮内神経の増生を抑制した。この際、フィルター装着による差は認められなかった。光発癌作用の指標となる光産物 CPD 産生もまた、エキシマランプの照射線量依存的な増加が認められ、フィルター非装着 250 mJ/cm² 照射群で顕著に増加した。その一方で、この CPD 産生はフィルター装着により効果的に抑制された。したがって、本フィルターは表皮内神経増生抑制効果を保持したまま安全な照射を可能にすることが明らかになった。

(3) ADモデルマウスの掻破行動に対するエキシマランプ照射の影響

AD モデルマウスでは、痒みの行動である掻破行動の増加が認められるが、単回のエキ

シマランプ照射（250 mJ/cm²）は、照射 24 時間後の掻破行動回数を有意に抑制した。一方、皮膚炎スコアや TEWL に対する効果は、照射 5 日目以降に改善傾向を認めた。このことから、エキシマランプの痒みに対する速効性が示唆された。

以上の結果からエキシマランプ照射は、表皮内神経が関与する難治性痒みに対し、有効かつ安全な治療戦略の一つであることが示された。

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 4 件）

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Kaneda K, Chan Ko K, 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*, 査読有, 134: 2977-84, 2014, doi: 10.1038/jid.2014.256.

Kawasaki H, Tominaga M, 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 Radical Biology & Medicine*, 査読有, 73C: 75-83, 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.034.

Kamo A, Negi O, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Histamine H₄ Receptor Antagonists Ineffective against Itch and Skin Inflammation in Atopic Dermatitis Mouse Model. *J Invest Dermatol*, 査読有, 134: 546-8, 2013 doi: 10.1038/jid.2013.351.

Kamo A, Tominaga M, Taneda K, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin inhibits the increase in intraepidermal nerve density in the acetone-treated dry-skin mouse model. *Clin Exp Dermatol*, 査読有, 38: 665-668, 2013, doi: 10.1111/ced.12100.

〔学会発表〕（計 12 件）

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Kaneda Y, Ko KC, Matsuda H, Kimura U, Takamori K. Irradiation by excimer lamp induces intraepidermal nerve degeneration and inhibits itch-related behavior in a dry-skin model. The 39th Annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology, December 12-14, ホテル阪急エキスポパーク（大阪府、吹田市）, Japan, 2014.

加茂敦子、富永光俊、高森建二. 表皮内神経線維に対するエキシマランプ照射の影響 - 難治性痒み治療としての有用性の検

討 - . 第 4 回基礎科学をもとにした
Co-Medical 研究会, 山形大学(山形県、山
形市) 2014 年 11 月 8 日

加茂敦子、富永光俊、鎌田弥生、高森建二 .
エキシマランプによる痒みの抑制メカニ
ズム . 第 113 回日本皮膚科学会総会, 国立
京都国際会館(京都府、京都市) 2014 年
6 月 1 日

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori
K. Excimer lamp directly induces cutaneous
nerve degeneration in animal models of
pruritus. 22nd Congress of the European
Academy of Dermatology and Venereology,
October 2-6, Istanbul, Turkey, 2013.

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Noguchi A,
Kimura U, Negi O, Taneda K, Takamori K.
Anti-pruritic effects of neurotrophin in NC/Nga
mice with atopic dermatitis-like symptoms.
7th World Congress on Itch 2013, September
21-23, Boston, USA, 2013.

Tominaga M, Kamo A, Negi O, Tengara S,
Kamata Y, Noguchi A, Takamori K.
Histamine H4 receptor antagonists ineffective
against itch and skin inflammation in atopic
dermatitis mouse model. 7th World Congress
on Itch 2013, September 21-23, Boston, USA,
2013.

Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Kamo
A, Takamori K. Transcriptional regulation of
the human semaphorin 3A gene in normal
epidermal keratinocytes: implication of
application to intractable itch in atopic
dermatitis. 7th World Congress on Itch 2013,
September 21-23, Boston, USA, 2013.

加茂敦子、富永光俊、鎌田弥生、野口篤、
木村有太子、根本治、種田研一、高森建二 .
皮膚の乾燥を伴う痒みに対するノイロト
ロピンの有効性の検討 . 第 9 回日本加齢皮
膚医学研究会、山口大学(山口県、山口市)
2013 年 7 月 6 日 7 月 7 日

加茂敦子、富永光俊、鎌田弥生、高森建二 .
乾燥皮膚で誘発される表皮内神経の増生
に対する保湿性オリゴマーエステル D/DC
の効果 . 第 112 回日本皮膚科学会、パシフ
ィコ横浜(神奈川県、横浜市) 2013 年 6
月 14-16 日

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori
K. Effects of excimer lamp radiation on rat
dorsal root ganglion nerve fibers: implications
for possible application to intractable pruritus.
International Investigative Dermatology,
Edinburgh, UK, May 8-11, 2013

Tominaga M, Kamo A, Negi O, Tengara S,
Kamata Y, Noguchi A, Takamori K. Histamine
H₄ receptor antagonists exhibit insufficient
anti-pruritic and anti-inflammatory effects on
mite extract ointment-induced atopic
dermatitis model mouse. International
Investigative Dermatology, Edinburgh, UK,
May 8-11, 2013

Kamata Y, Tominaga M, Kamo A, Takamori
K. Molecular mechanisms of Sema3A gene
regulation in human epidermal keratinocytes.
International Investigative Dermatology,
Edinburgh, UK, May 8-11, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

加茂 敦子 (KAMO, Atsuko)
東海大学・健康科学部・講師
研究者番号 : 50614088

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高森 建二 (TAKAMORI, Kenji)
富永 光俊 (TOMINAGA, Mitsutoshi)
鎌田 弥生 (KAMATA, Yayoi)