

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460138

研究課題名(和文) 抗かゆみ薬の探索を目的とする新規アッセイ法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of assay systems for searching antipruritic drug.

研究代表者

奥 尚枝 (Oku, Hisae)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：90281518

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)：アトピー性皮膚炎などの重篤な痒みを伴う疾患ではストレスや漢方の淤血病態が痒みの悪化や難治化の一因になると考えられる。そこで、先に独自に開発した淤血モデルマウスを駆使し、「かゆみの難治化と淤血およびストレス」の関連を科学的に実証し、淤血とストレスの併発による難治性の痒みを指標としたアッセイ法を作製した。さらに本病態モデルを含む複数の痒みモデルを応用し、痒み過敏皮膚(itchy skin)での新たな治療標的因子となる可能性があるタンパク質分子を同定すると共に、抑制物質探索のためのシース植物を見出した。

研究成果の概要(英文)：By the disease with serious itches such as atopic dermatitis, stress and blood stasis are a trigger to turn the worse and intractable. Therefore, we demonstrated the relationship blood stasis, stress and worse of itch by making full use of the blood stasis model mice which developed originally. Furthermore, we identified the proteins which may be new treatment target factor for a patient with the itch sensitive skin (itchy skin), and found the seeds plant for searching antipruritic compounds.

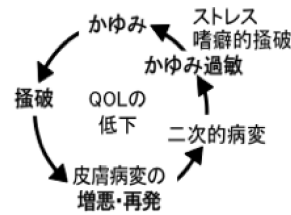
研究分野：天然物機能化学

キーワード：抗かゆみ物質 天然資源 アッセイ法 淤血 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

「痒み」はアレルギーやアトピー性皮膚炎はもとより、老人性掻痒症、透析などの全身掻痒症などの疾患において、重大かつ深刻な症状である。昼夜を問わない痒みは患者にとって耐え難い苦しみであるだけでなく、患者自身が患部を繰り返し掻き破る（掻破）ことで病態の悪化や難治化がおこる(図1)ことから、抑制薬の開発は極めて重要な課題である。

図1 痒みと掻破の悪循環



難治性のかゆみ患者の皮膚では、

「かゆみ過敏」が生じ、健常な皮膚とは異なるかゆみのメカニズムがあることが指摘されている。<sup>1,2)</sup> しかし、末梢および中枢での複数の病態や因子が相互に複雑に関連して生じる重篤なかゆみのメカニズムは未だ明らかでないことから、有効な治療薬は無い。<sup>1,2)</sup>

これらの難治性かゆみの治療物質を天然資源から探索するには、優れた病態モデルおよびかゆみを総合的に評価できる *in vivo* アッセイ法の開発が不可欠である。申請者は、これまでの科研費補助金により、一過性および慢性かゆみモデルマウスと、それらマウスの後ろ足による皮膚への引っ掻き動作（=かゆみ回避反応）を指標にした *in vivo* アッセイ法を用いて起痒メカニズムの解析や天然資源からの抑制物質の探索を行ってきた。<sup>3-10)</sup> さらに、前回では、独自に開発した漢方の瘀血（おけつ/末梢血液循環不全）病態を反映したモデルマウス<sup>11)</sup>に誘導する強い慢性のかゆみと健常皮膚マウスに誘導する一過性のかゆみへのストレスの影響を比較検討した。その結果、瘀血マウスでの慢性かゆみモデルのみに、ヒトの痒み過敏の皮膚で見られるような「ストレスによるかゆみの増悪化」が起きることを確認した。ストレスが血液循環を妨げ、身体に様々な影響を及ぼすことはよく知られ

ている。さらに、漢方では瘀血(古い血の滞り)がかゆみの難治化の一因と考えられている。一方、「かゆみの難治化と瘀血およびストレス」の関連やそのメカニズムを科学的に実証あるいは解明した例はまだ無い。

## 2. 研究の目的

本研究では、瘀血モデルマウスを駆使し、「かゆみの難治化と瘀血およびストレス」の関連を科学的に実証し、瘀血とストレスの併発による難治性のかゆみを指標としたアッセイ法を作製する。さらに本瘀血-ストレスモデルを含む数種のかゆみモデルの応用から itchy skin における痒みの増悪・難治化メカニズムの解析を行い、新たな治療標的分子の探索および天然資源からの抑制物質の探索を行う。これにより、itchy skin での難治性かゆみに有効な治療薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 瘀血とストレスを併発した難治性かゆみモデルを用いた *in vivo* アッセイ法の構築

瘀血モデルマウスの作製:5 週齢の ddY 雄性マウスに卵白リゾチーム (HEL) 感作溶液 50 $\mu$ L/head を腹腔内投与する。(感作溶液: HEL12.5  $\mu$ g/ 50%フロインドコンプリートアジュバント溶液 50  $\mu$ L)

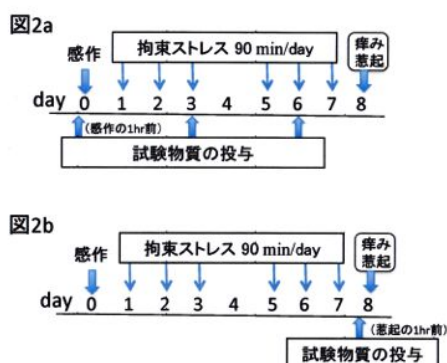
ストレス負荷: 空気穴を開けた50mLの遠心チューブ(内径2.8 cm×長さ11.2 cm)内にマウスを1日90分間拘束した。

かゆみの測定: かゆみの惹起物質として肥満細胞の脱顆粒惹起剤のcompound

48/80(COM)を投与した後、マウスが後ろ足で注射部位を引っ掻く(痒み回避行動)回数を20または30分間計測した。引っ掻き動作の計測は無人下で撮影したビデオ(FULL HD/Panasonic)動画の再生、または次世代型擦過行動定量化システム(SCLABA<sup>R</sup>-Real, NOVELTEC)を用いて行った。

既存薬の適用による位置づけ：本モデルにジアゼパムを図2bの、さらにボタンピ、トウニン、トウキ、シャクヤク、コウボク、ケイヒ、サンシシ、サイコ、ブクリヨウなどの各種生薬の30%エタノールエキス(200 mg/kg)を図2aのスケジュールで投与し、有効性を評価した。

実験スケジュールの概略



## (2) 新たな治療標的分子の探索

痒み刺激への反応性の違いによるマウスの選別：ddY 系雄性マウスに COM (2 mg/kg) を皮下投与し、各マウスの搔動作回数を 30 分間測定した。同じマウスを用いて 10-14 日間で 3 回の痒み実験を繰り返し、痒み刺激に対し、3 回とも他に比べて過剰な搔動作回数を示す鋭敏なマウスと、あまり搔かない鈍感なマウスを各 3 匹選別した。

痒み過敏に関連する肥満細胞内のタンパク質分子の解析：痒み刺激に対し鋭敏または鈍感なマウスからそれぞれ肥満細胞を摘出後、常法により可溶性タンパク質画分を調製し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) により両者の発言タンパク質の差を解析した。また別に、同様に選別したマウスから肥満細胞の可溶性タンパク質画分を調製後ショットガン解析(一般財団法人化学物質評価機構)を行った。

## (3) 天然資源からかゆみ抑制物質の探索

瘀血-ストレス併発の増悪化痒みモデルでの評価：民間あるいは漢方で痒み関連疾患へ

の適用が伝承されている以下の天然資源に関し、図 2a または 2b のスケジュールを用いて活性を評価した。なお、ヒナタノイノコズチ (*Achyranthes bidentata* var. *fauriei*) 地上部のメタノールエキスは 2a を、金銀花 (*Lonicera japonica*) 花蕾 35% エタノールエキス、ムクゲ (*Hibiscus syriacus*) 蕾のメタノールエキス、ライラック (*Syringa vulgaris*) の花のメタノールエキスは 2b のスケジュールを用いて、いずれも 200 mg/kg を経口投与した。

活性物質の探索：活性を見出した資源については、活性を指標に分画および各種カラムクロマトによる精製を繰り返し、数種の化合物を単離した。さらに、構造決定を目的に各種スペクトルデータの測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 瘀血とストレスを併発した難治性かゆみを指標とする *in vivo* アッセイ法の構築

引き続き、再現性、簡便性等を考慮した検討を繰り返し、図 2a および 2b の実験スケジュールを確定した(痒みの惹起は COM 2 mg/kg)。次に、本法の位置付けを行う目的で、まず抗不安薬のジアゼパムを適用した。その結果、マウスの自発運動は抑制されたが、引っ掻き動作は抑制しなかった。また、生薬類のうち、抗精神不安や鎮静などを目標に用いられ(活血は目標としない)ケイヒ、サンシシ、オンジ、コウボクは抑制効果を示さなかったが、駆瘀血生薬であるトウキが有意な抑制効果を示した。したがって、ストレスによるかゆみの増悪化の一因として、ストレスにより引き起こされる末梢の血液循環不全(瘀血病態)が関与することが示唆された。

### (2) 新たな治療標的分子の探索

同じマウスに痒みの惹起試験を 3 回繰り返した結果、激しい搔動作回数(全マウスの平均搔動作回数の 2~3 倍の高い値)を示した鋭敏なマ

ウスと、平均値の 30%未満の搔動作回数を示した鈍感なマウスがそれぞれ 3%程度存在した。そこで、鋭敏および鈍感なマウスを各 3 匹選別し、両マウスの肥満細胞を摘出し、その可溶性タンパク質画分を 2D-DIGE で解析するための条件の検討や改変を順次試みたが解析には至らなかった。そこで、最終的にショットガン解析を行った。その結果、鋭敏なマウスの肥満細胞で特徴的に発現していたタンパク質 22 種、鋭敏なマウスで特徴的に発現していたタンパク質 20 種の同定に成功した。これらは、いずれも難治性の痒みの新たな治療標的因子になる可能性があると考えられることから、現在、詳細を検討中である。

### (3)天然資源からかゆみ抑制物質の探索

民間あるいは漢方で痒み関連疾患への適用が伝承されている天然資源や先に一過性痒みモデルにおいて抑制効果を示した数種の天然資源について活性の評価を行った結果、先に駆瘀血作用を明らかにした金銀花およびアカカタバミの地上部に有意な抑制効果があることが明らかとなった。現在、両資源から活性を指標に活性物質の単離を継続中である。

【引用文献】(1) Inagaki N. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1227 (2013). (2) Ikoma et al., *Pain*, **126**, 16 (2006). (3) Ishiguro K., *FFI Journal*, **209**, 13 (2004). (4) Oku H. et al., *Phytothera. Res.*, **11**, 343 (1997). (5) Oku H. et al., *Phytothera. Res.*, **15**, 506 (2001). (6) Ishiguro K. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1490 (2005). (7) Oku H. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1324 (2008). (8) Ishiguro K. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1655 (2002). (9) Oku H. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1031 (2003). (10) Oku H. et al., *Planta Medica*, **74**, 973 (2008). (11) Iwaoka E. et al., *J. Trad. Med.*, **26**, 97 (2009).

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Oku, H., Kanaya, R., Ishiguro, K., Development of an assay method to search for compounds inhibiting stress-enhanced allergy., *Biol. Pharm. Bull.*(査読有), **39**, 874-878 (2016).

Higashiuchi, K., Hisano, M., Nakano, K., Uno, Y., Kuroki, S., Ishiguro, K., Oku, H., Itoh, H., Development of environmental control method for production of high quality *Hedyotis diffusa.*, *Proceeding of the International Conference on Plant Factory* (査読無), **A19**, 1-8 (2014).

Ishiguro, K., Okumura, M., Miyawaki, M., Oku, H., Development of an assay method to search for compounds inhibiting stress-enhanced allergy., *Planta Med.*(査読有), **80**, 2020 (2014).

中野かおり, 伊藤博通, 宇野雄一, 黒木信一郎, 久野正貴, 石黒京子, 奥尚枝, 白花蛇舌草の栽培環境制御技術の開発, 農業機械学会関西支部報(査読無), **116**, 34 (2014).

〔学会発表〕(計 10 件)

Ishiguro, K., Okumura, M., Miyawaki, M., Oku, H., Development of an assay method to search for compounds inhibiting stress-enhanced allergy, THE International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, USA) 2015年12月15-20 日.

張涛, 荒井哲也, 山崎寛生, 奥尚枝, 石黒京子, 「女性薬命の母ホワイト」の精神神経症状に対する効果, 日本生薬学会第62回年会(長良川国際会議場, 岐阜県岐阜市) 2015年9月 11-12日.

廣住育美, 奥尚枝, 安藤舞, 吉竹彩, 石黒京子, キンシバイ(*Hypericum patulum*) 花弁

の抗アレルギー予防効果, 日本薬学会第135  
年会 (神戸学院大学・兵庫医療大学, 兵庫県神  
戸市) 2015年3月25-28日 (優秀発表賞を受賞)

奥尚枝, 奥村翠, 宮脇恵, 石黒京子, スト  
レス性アレルギーを抑制する物質の探索を目的  
としたアッセイ法の開発と応用, 第20回  
天然薬物の開発と応用シンポジウム (東京大  
学弥生講堂, 東京都, 2014.11.5-6.)

Higashiuchi, K., Hisano, M., Nakano, K.,  
Uno, Y., Kuroki, S., Ishiguro, K., Oku, H.,  
Itoh, H. Development of Environmental C  
ontrol Method for Production of High  
Quality *Hedyotis diffusa*, International  
Conference on Plant Factory (ICPF)  
2014 (Kyoto, Japan) 2014年11月10-12日

Oku, H., Kuwahara E., Ueko M. and Ishiguro  
K. Antipruritic compounds from the colored  
buds of *Hibiscus syriacus* L. International  
Conference on Food for Health in Niigata  
2014 (Niigata, Japan) 2014年10月30-31日

Ishiguro K., Oku, H., Nakahara Y., Satomi  
A., Shigematsu T., Effect of high  
hydrostatic pressure treatment on medical  
resources- *Swertia japonica* (Senburi)  
International Conference on Food for  
Health in Niigata 2014 (Niigata, Japan)  
2014年10月30-31日

Ishiguro, K., Okumura, M., Miyawaki, M.,  
Oku, H., Development of an assay method to  
search for compounds inhibiting stress-  
enhanced allergy, 62nd International  
Congress and Annual Meeting of the Society  
for Medicinal Plant and Natural Product  
Research-GA2014 (Guimaraes, Portugal)  
2014年8月31日-9月4日

⑨ 久野正貴, 伊藤博通, 宇野雄一, 黒木信一  
郎, 中野かおり, 石黒京子, 奥尚枝, 高品質  
白花蛇舌草生産のための環境調節, 日本生物  
環境工業会2014年東京大会 (明治大学駿河台  
キャンパス, 東京都), 2014年9月8-11日.

⑩ 伊藤博通, 宇野雄一, 黒木信一郎, 久野正貴,  
中野かおり, 石黒京子, 奥尚枝, 植物工場に  
おける白花蛇舌草の栽培環境制御技術の開発,  
第73回農業食料工学会年次大会 (琉球大学農  
学部, 沖縄県那覇市2014年5月16-19日

〔その他〕

ホームページ

武庫川女子大学薬学部生薬学研究室  
([http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~shouyaku/sheng\\_yao\\_xue\\_yan\\_jiu\\_shi/homu.html](http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~shouyaku/sheng_yao_xue_yan_jiu_shi/homu.html))

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥尚枝 (Oku Hisae)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90281518

### (2) 研究分担者 (H26-27年度)

石黒京子 (Ishiguro Kyoko)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号: 70151363