

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860389

研究課題名(和文) 慢性的なかゆみにおける中枢神経の可塑性を制御する分子機構、神経機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular and neuronal mechanisms for chronic itch in the central nervous system

研究代表者

井上 明俊 (INOUE, Akitoshi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50709152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎などにより引き起こされる慢性的な痒みは深刻な症状として認められており、痒みの発生、維持機構を理解し、痒みをコントロールすることが重要である。本研究において申請者は、NMDA受容体のNR2Bサブユニットのリン酸化部位を消失させたマウス(Y1472F-KIマウス)を用いて、NR2Bのリン酸化が三叉神経脊髄路核などの中枢における痒みの伝達に重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、様々な阻害剤や作動薬の大槽内投与により、NMDA受容体の活性化はGRP-GRP受容体を介したシグナル経路の上流で働くことを明らかにした。本研究は痒みの治療法や創薬の新たな開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：A variety of neurological disorders such as atopic dermatitis induce severe chronic itch, although it is currently not known what the underlying cellular and molecular mechanisms are. By using mice with a knock-in mutation of the Tyr1472 site of NR2B (Y1472F-KI mice), we demonstrated that phosphorylation of NR2B at Y1472 is important for trigeminal transmission of itch. In addition, intracisternal injection of various inhibitors and agonists revealed that NMDA receptor activation occurs upstream of the gastrin-releasing peptide (GRP)-GRP receptor pathway. Our finding open new avenues for the development of itch therapies and novel anti-itch drugs.

研究分野：疼痛学

キーワード：痒み NMDA受容体 GRP c-fos NR2B 大槽内投与 三叉神経 脊髄

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎、老人性乾皮症、慢性腎不全、胆汁うっ滞性肝疾患などの病態に伴うドライスキンは患者に執拗な痒みを引き起こす。痒みを抑えるための掻く行動はさらなる皮膚へのダメージを引き起こし、痒みを増長させ(痒みと掻破の悪循環)ますます痒みを耐え難いものとする。現在、ドライスキンに伴う慢性的な痒みは慢性疼痛と同様に治療を必要とする深刻な症状として認められており、慢性的な痒みの発生、維持機構の理解が重要なテーマとなっている。

痒みの研究はこれまで末梢を中心に行われ、様々な痒み物質とその受容体が明らかにされてきた。一方、脊髄においては近年の Gastrin-releasing peptide (GRP) といった痒み伝達特異的な神経ペプチドの発見と共に、痒み特異的な神経伝達回路の存在が注目されている。マウスにおいて GRP の髄腔内投与は激しい掻破行動を引き起こす。逆に GRP 受容体 (GRPR) のノックアウトは痒み刺激への掻破行動を抑制することから、GRP は痒みの主要な伝達物質であると考えられている (1)。

申請者は慢性的な痒みの発生および維持に慢性疼痛と同様の分子が関わるのかを解析するために、まず慢性疼痛のモデルにおいて異常を示す NMDA 受容体の NR2B サブユニットの 1472 番目の Tyr 残基をフェニルアラニンに置換したノックインマウス (NR2B Y1472F-KI) (2-4) を用いてドライスキン誘発後のかゆみ行動に変化が表れるかを解析した。その結果、野生型のマウスにおいて見られるドライスキン誘発による自発的な掻破行動が Y1472F-KI マウスでは殆ど見られなくなっていることが明らかになった。この原因を明らかにするために Y1472F-KI マウスにおける急性の痒みに対する応答を測定した所、このマウスでは様々な痒み物質に対する応答が低下していることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では痒み伝達において NMDA 受容体、特に NR2B サブユニット Y1472 のリン酸化がどのような役割を果たすのか、Y1472F-KI マウスを用いた解析により明らかにすることを目的とした。さらに、痒み伝達において NMDA 受容体の活性化と GRP-GRP 受容体を介したシグナル伝達がどのように制御されているのか、その相互関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの頬に痒みや痛みを引き起こす物質を皮内注射した場合、痒み物質に対しては後

ろ足で頬を掻くスクラッチング行動が、痛み物質に対しては前足で頬を撫でるワイピング行動が引き起こされることが報告されている (5)。そこで、本研究においては野生型と Y1472F-KI マウスの左頬に様々な痒み物質や痛み物質を投与し、スクラッチング行動やワイピング行動を指標に痒みや痛みに対する行動測定を行った。

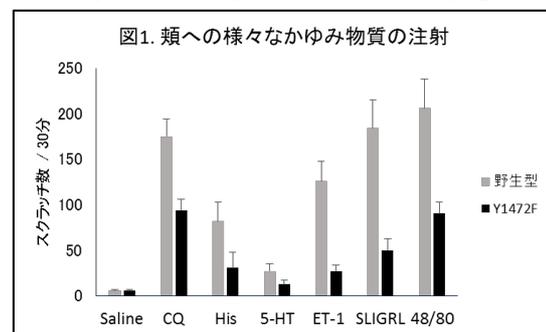
頬への痒み刺激は三叉神経を介して延髄の三叉神経脊髄路核に投射される (6)。そこで、野生型と Y1472F-KI マウスの三叉神経脊髄路核における神経活動を、神経活動マーカーである c-fos の発現により解析した。痒み刺激により活動することが明らかになったニューロンは免疫染色により GRP や GRP 受容体を発現しているか解析した。

痒み刺激により NR2B サブユニットのリン酸化が変化するかを明らかにするために、NR2B-Y1472 リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い痒み刺激前後の三叉神経脊髄路核の NR2B-Y1472 のリン酸化を測定した。測定には野生型と Y1472-KI マウスの三叉神経脊髄路核の後角シナプス画分を精製して使用した。

三叉神経脊髄路核における神経活動は大槽内に阻害剤や作動薬を直接投与する大槽内投与法により制御することが可能である (7)。そこで、野生型と Y1472F-KI マウスにおいて、NMDA 受容体の阻害剤や作動薬、GRP 受容体の阻害剤や作動薬の大槽内投与により痒み行動がどう変化するか解析し、三叉神経脊髄路核における痒みのシグナル伝達経路を明らかにした。

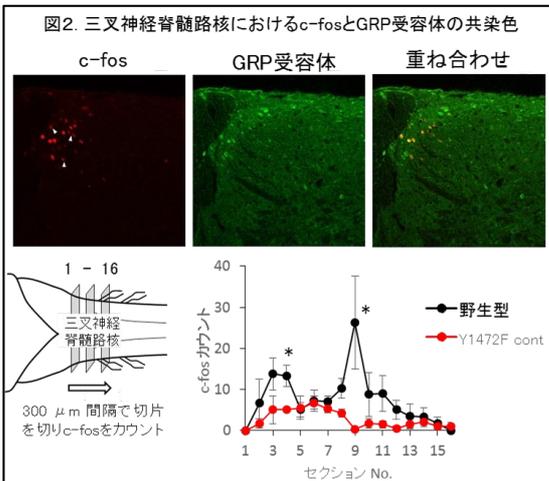
4. 研究成果

様々な起痒物質を頬に注射して野生型マウスと Y1472F-KI マウスのスクラッチ行動を比較したところ Y1472F-KI マウスはヒスタミン依存性の痒み刺激 (ヒスタミン、Compound 48/80) やヒスタミン非依存性の痒み物質 (クロロキン、エンドセリン、PAR-2 受容体アゴニスト) など様々な痒み物質に対する掻破行動が野生型マウスに比べて優位に低下することが明らかになった (図 1)。一方、カプサイシンに対する痛み行動は野生型と同様であった。このことから、NR2B のリン酸化は痒



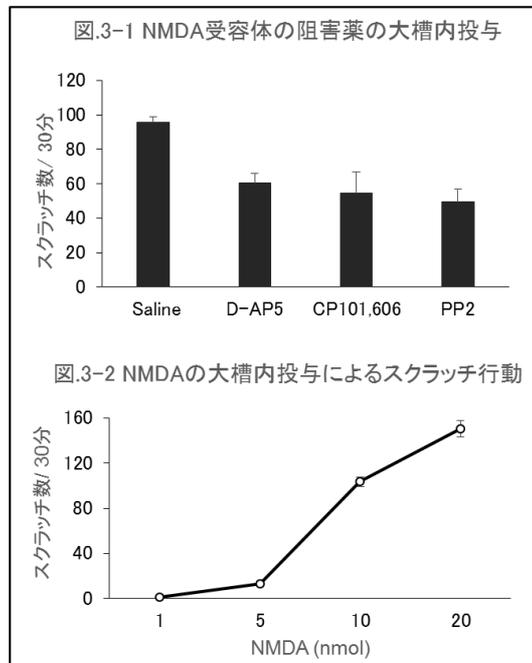
み行動に重要であることが示唆された。

Y1472F-KI マウスにおける痒み行動の低下の原因を明らかにするために、かゆみ刺激にตอบสนองする神経活動を c-fos の発現により解析した。野生型マウスでは三叉神経脊髄路核の後角内側の浅い層にクロロキン刺激にตอบสนองする c-fos の発現が見られ、これらのニューロンの多くは痒み伝達に重要な GRP 受容体を発現していた(図2上)。一方、Y1472F-KI マウスにおいては c-fos の発現細胞数は野生型マウスと比較して有意に低下していた。これより、Y1472F-KI マウスにおける痒み行動の低下はこの痒み刺激に対する神経活動の低下が原因であることが示唆された。

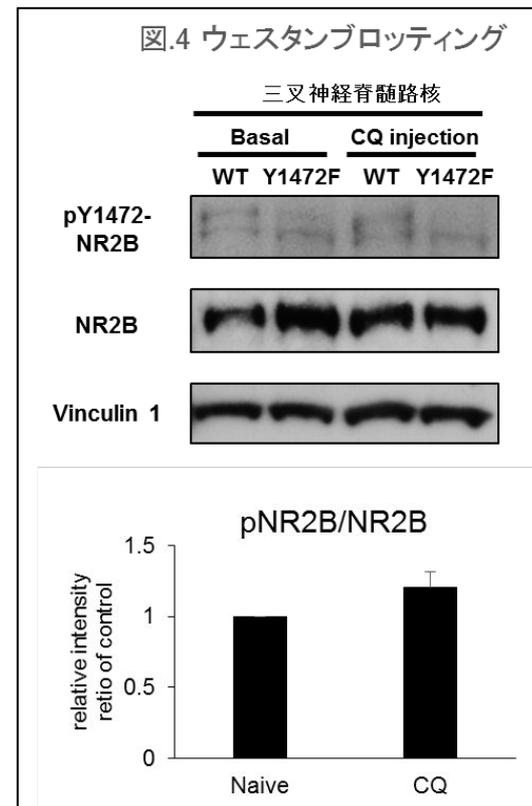


NMDA 受容体の NR2B のリン酸化が痒みの神経伝達に重要であるのか明らかにするために、野生型マウスの大槽内へ NMDA 受容体の阻害剤を投与し、痒み行動が抑制されるか解析した。NMDA 受容体の阻害剤である D-AP5、NR2B サブユニットの選択的阻害剤である CP101.606、NR2B-Y1472 のリン酸化キナーゼ Fyn を含む Src ファミリー阻害剤である PP2 の大槽内投与は、いずれもクロロキンの類への注射によるスクラッチ行動を有意に低下させた(図3-1)。このことから Fyn による NR2B-Y1472 のリン酸化が痒み伝達に重要であることが示唆された。次に、三叉神経脊髄路核において、大槽内への NMDA 受容体の作動薬投与により NMDA 受容体を人為的に活性化させると、痒みを誘発させることができるか解析した。NMDA の大槽内投与(5~40 nmol)により、まず痙攣が引き起こされた(~5分)。40 nmol 以上の投与では痙攣の間にマウスは死亡した。5~20 nmol 投与では、痙攣からの回復後に NMDA の量依存的な全身への激しいスクラッチ行動が見られた(5分~30分)(図3-2)。これらのことから NR2B サブユニットを含む NMDA 受容体の活性化は痒み伝達に重要であることが明らかになった。

次に痒み刺激により NMDA 受容体のリン酸化がどう変化するのかを NR2B-Y1472 リン酸化

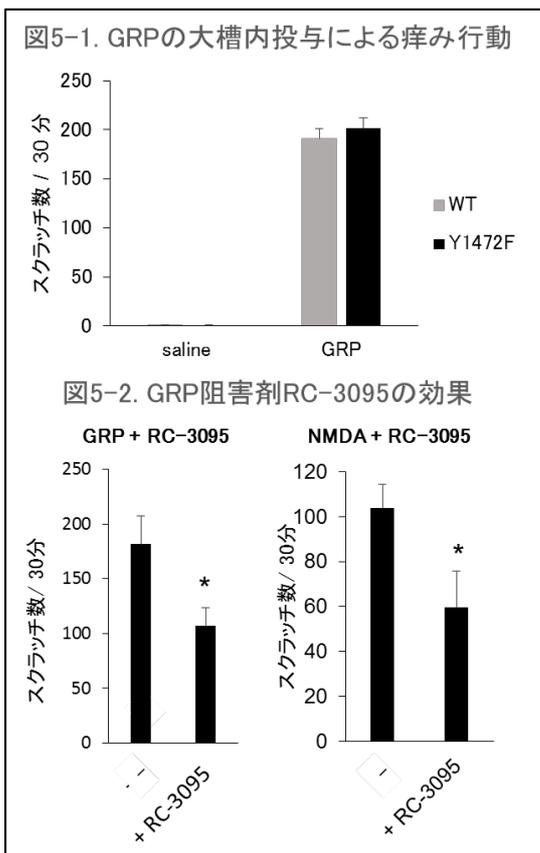


抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。クロロキン未投与の三叉神経脊髄路核の後角において野生型では2本のバンドが見られたが、Y1472F マウスでは下のバンド1本しか見られなかった(図4上)。このことから上のバンドがY1472のリン酸化バンドであり、下のバンドはノンспецифичなバンドであることが明らかになった。類へのクロロキン投与後には野生型のマウスにおいて Y1472F リン酸化バンドの僅かな増加が見られたが有意な変化ではなかった(図4下)。このことから、NR2B は通常からある



程度リン酸化されており、そのことが痒みの伝達に必要であることが示唆された。NR2B のリン酸化は NMDA 受容体のシナプスにおける局在を変化させるため(2)、Y1472 マウスでは NR2B サブユニットを含む NMDA 受容体の異常な局在が痒み伝達の低下を引き起こしていると推察された。しかし、c-fos 発現解析の結果から、三叉神経脊髄路核において痒み伝達に関わるニューロンは少なくウェスタンブロットングではその変化を捉えることが難しかった可能性も排除できない。

最後に NMDA 受容体の活性化と GRP-GRP 受容体経路の痒み伝達における相互関係を解析した。野生型、Y1472F-KI 変異体において大槽内に GRP を投与したところ、どちらのマウスも全身への激しいスクラッチ行動を引き起こし(5-30分)、その数に差は見られなかった(図5)。野生型マウスにおいて GRP 投与によるスクラッチ行動は GRP 受容体の阻害剤 RC-3095 を大槽内投与により抑制された。さらに、この RC-3095 による痒み行動の抑制は NMDA の大槽内投与に対しても有効であった。これらのことから痒み伝達において GRP-GRP 受容体経路は NMDA 受容体の活性化の下流で働くことが示唆された。



これらの成果は *Eur. J. Neurosci.* に投稿中である

参考文献

1. Sun & Chen, *Nature*, 2007
2. Nakazawa *et al.* *EMBO J.*, 2006.
3. Matsumura *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, 2010
4. Katano *et al.*, *Neuropharmacology*, 2011
5. Shimada & LaMotte, *Pain*, 2008
6. Bautista *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2014
7. Ueda *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 1979

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 明俊 (INOUE, Akitoshi)
 研究者番号: 50709152
 関西医科大学・医学部・助教

(2)研究分担者 なし

()

(3)連携研究者 なし

()