

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15203

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎の慢性掻痒メカニズムの解明を目指した新しい研究アプローチ

研究課題名(英文) A new approach for investigating the mechanism underlying chronic itch associated with atopic dermatitis

研究代表者

津田 誠 (Tsuda, Makoto)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40373394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎などに伴う慢性的な痒みにおける神経系メカニズムは依然不明である。本研究では、アトピー性皮膚炎モデルマウス等を用いて、脊髄後角において転写因子STAT3依存的に長期活性化するアストロサイトと、同細胞から産生放出されるLCN2が痒みの慢性化に重要な役割を担っていることを世界で初めて明らかにした。この成果は、痒みの慢性化メカニズムの理解、そして将来的に神経系をターゲットとした慢性掻痒治療薬の開発へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms by which itch turns into a pathological chronic state are poorly understood. This study revealed that in a model of atopic dermatitis, reactive astrocytes were persistently observed in the spinal dorsal horn (SDH) segments that corresponded to lesioned, itchy skin. A pharmacological blockade or a genetic conditional knockout of STAT3 suppressed the reactive state of SDH astrocytes and chronic itch. Furthermore, atopic dermatitis mice exhibited sensitization of itch signaling in the SDH, and, interestingly, the sensitization was normalized by suppressing reactive astrocytes. Moreover, we identified lipocalin-2 (LCN2) as an astrocytic STAT3-dependent upregulated factor that was crucial for chronic itch. These findings indicate a pivotal role of STAT3-dependent reactive astrocytes in chronic itch.

研究分野：神経薬理学

キーワード：慢性掻痒 アトピー性皮膚炎 脊髄後角 アストロサイト STAT3

1. 研究開始当初の背景

痒みは、掻きたいという欲望を起こさせる不快な感覚である。生理学的には、引掻き行動によって皮膚などに付着、侵入する外敵を除去する生体防御機構と考えられている。従来、痒みは単なる弱い痛みと考えられ、その基礎研究は非常に遅れていた。しかし、2007年にガストリン放出ペプチド (GRP) が脊髄レベルで痒みを選択的に誘発すること (引用文献) その受容体 GRPR を発現する脊髄後角ニューロンも痒み情報を選択的に伝達することが報告され (引用文献) 世界に大きな衝撃を与えた。それ以降、痒み信号を伝達するニューロンが次々と報告され、現在痒みの情報伝達機構の解明に向けた世界的な研究潮流が生まれている。

その大きな進捗の一方で、痒みの慢性化メカニズムは依然として不明のままである。アトピー性皮膚炎などの皮膚炎症で生じる痒みは、強く慢性的であり、過剰な引掻き行動を誘発する。その結果、皮膚炎症が悪化、さらに周囲の皮膚にも炎症が広がり、それらが更なる強い痒みを生むという「痒みと掻破の悪循環」が形成される。このような慢性化した堪え難い痒みは、不眠や日常生活への多大な悪影響を起こし、患者の生活の質を著しく低下させる。また、皮膚バリアの破壊から新たな感染へのリスクも増大する。現在、国民の約1割がアトピー性皮膚炎を発症すると推定されているが、抗ヒスタミン薬など既存の治療薬が十分に奏功しないため、慢性掻痒のメカニズムの解明とそのコントロールは極めて重要な課題となっている。

2. 研究の目的

前項で述べたように、痒みの神経伝達機構が徐々に明らかにされ、同機構の慢性掻痒での変化と役割が注目されている。さらに、中枢神経系ではニューロンに加え、多くのグリア細胞が存在し、神経活動に大きな影響力を有する事例が報告されている。研究代表者らは、アトピー性皮膚炎モデルマウスの脊髄後角でグリア細胞の一つであるアストロサイトが活性化していることを、本研究の事前実験結果として有していた (後述)。そこで本研究では、脊髄後角アストロサイトの変化に注目し、その役割を分子・細胞・個体レベルに至る包括的な研究から明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

アトピー性皮膚炎モデルとして雄性 NC/Nga マウス (日本 SLC) を使用した。本マウスは我が国で樹立された近交系マウスで、SPF (specific pathogen free) 環境下では正常だが、コンベンショナル環境下で飼育すると徐々に痒みと皮膚炎を発症する自然発症アトピー性皮膚炎モデルである。本研究では、SPF 飼育マウス (SPF-NC/Nga) をコントロー

ル、コンベンショナル飼育マウス (CV-NC/Nga) をアトピー性皮膚炎モデルとして用いた。また、*Gfap-Cre* マウス (Jackson Lab)、*Stat3^{fl/fl}* マウスも使用した。接触性皮膚炎モデルとして、雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールズリバー) の背部皮膚を剃毛し、ジフェニルシクロプロペノン (DCP) 溶液を塗布した。1回目の塗布後7日目に再び同じ部位に1回目と同様の DCP 溶液を塗布した。

(2) 痒み行動測定

慢性的な痒み行動の測定は、掻痒測定装置 MicroAct (ニューロサイエンス) を用いて行った。測定前日までに小型マグネットをマウス後肢皮下に埋め込み、24時間の後肢の動きをコイルで検出することで痒み行動を測定した。急性の痒み行動の測定は、マウスの頬あるいは髄腔内への薬物投与後30分間の痒み行動をビデオ撮影し、回数を計測した。

(3) 皮膚炎症の評価

皮膚炎症の重症度は、顔面、耳介及び上背部の皮膚の状態を発赤・出血、浮腫、擦創・びらん、痂皮形成・乾燥の4項目について、0(無症状)~3(重度)の4段階に分類及びスコア化し、その合計を皮膚炎スコアとした。

(4) 免疫組織染色法

氷冷した4%パラホルムアルデヒド溶液を灌流することにより全身組織を固定し、頸部脊髄及びDRG(後根神経節)を摘出し、浸漬固定、スクロース置換を行い、包埋した。包埋組織から切片を作製し、ブロッキング後1次抗体反応を行った。その後、洗浄し、2次抗体反応を行い、洗浄、乾燥後封入し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察した。

(5) 引掻き行動による皮膚損傷の抑制

引掻き行動による皮膚損傷を抑制するために、マウスの後肢の爪を2日に1回切り、皮膚に傷を与えないような形に整えた。

(6) 頸部脊髄くも膜下腔内への薬物投与

頭蓋骨-第一脊椎骨間から挿入留置した32Gカテーテルを介して頸部髄腔内へ薬物(5 µL)を投与した。

(7) 一次求心性C線維の除去

麻酔下、マウスに10、20、40、80、160 µg/kgのレシニフェラトキシンを1日1回、漸増的に5日間にわたって皮下投与し、160 µg/kg投与後5日目に200 µg/kgを皮下投与した。

(8) 遺伝子発現解析

麻酔下、氷冷PBS溶液20 mLを灌流して脱血し、頸部(C3~5)の脊髄およびDRGを摘出し、定法に従い全RNAを抽出後、定量的リアルタイムPCR法により解析した。

(9) 初代培養アストロサイト細胞の調製

生後マウス新生児全脳から定法に従い作製した。

4. 研究成果

コンベンショナル環境下で飼育した15週齢のCV-NC/Ngaマウスで、顕著な引掻き行動と上背部の皮膚における皮膚炎が観察され

た。上背部皮膚に対応する脊髄（頸部脊髄）後角におけるアストロサイトを免疫組織染色で観察したところ、同細胞マーカーであるGFAP (glial fibrillary acidic protein) の染色性がコントロールに比べて著明に増強していた。このGFAP強陽性アストロサイトは、活性化型の形態と一致していた。さらに、DCP塗布により慢性的な引掻き行動を呈している接触性皮膚炎モデルマウスの脊髄後角においてもアストロサイトの活性化が認められた。

そこで、アストロサイトの活性化と皮膚炎との関連性を検討した。モデルマウスの爪を切り揃え、引掻き行動による皮膚への物理的な損傷を回避した結果、脊髄後角アストロサイトの活性化と皮膚炎が緩解した。炎症皮膚では一次求心性神経C線維が表皮内へ侵入することが知られている。そこで、TRPV1の強力な作動薬レシニフェラトキシンでC線維を破壊した結果、アストロサイトの活性化が抑制された。したがって、炎症皮膚における何らかのシグナルがTRPV1陽性C線維を介して脊髄後角アストロサイトを活性化している可能性が示唆された。

慢性掻痒における活性化アストロサイトの因果性を検討すべく、アストロサイトに発現しその活性化プロセスに関与する転写因子STAT3 (signal transducers and activator of transcription) に注目した。C3~5脊髄後角におけるSTAT3の発現及び局在を免疫組織染色法により検討したところ、8および15週齢CV-NC/Ngaマウスにおいてアストロサイトに限局するSTAT3の活性化が認められた。そこで、STAT3の活性化を阻害するJAK阻害薬AG490をCV-NC/Ngaマウスの頸部脊髄くも膜下腔内へ投与したところ、C3~5脊髄後角におけるGFAPの染色強度が有意に減弱し、同マウスが呈していた引掻き行動回数も有意に減少した。さらに、アストロサイト特異的にSTAT3を不活性化したコンディショナルノックアウトマウス (*GFAP-Cre; Stat3^{fl/fl}* マウス) を用いた検討においても、DCP塗布による慢性的な痒みの進行および脊髄後角アストロサイトの活性化が共に抑制された。この結果から、STAT3依存性の脊髄後角アストロサイト活性化が慢性掻痒に必要なことが明らかになった。

活性化アストロサイトから分泌される因子を特定するため、CV-NC/Ngaマウスの脊髄における発現変動遺伝子を網羅的に解析し、発現増加する因子としてリポカリン2 (LCN2) を見出した。LCN2はアトピー性及び接触性皮膚炎モデルマウスの頸部脊髄において、mRNAおよびタンパク質レベルで共に発現増加し、その発現細胞種はアストロサイトであった。さらにLCN2の発現増加は*GFAP-Cre; Stat3^{fl/fl}* マウスで有意に抑制された。また、初代培養アストロサイトの培養上清でもLCN2が検出でき、それはJAK阻害剤で抑制された。このことから、LCN2が慢性掻痒時の活性化アスト

ロサイト由来因子であり、STAT3により発現制御されることが示唆された。

アストロサイト由来LCN2の慢性掻痒における役割を検討するため、頸部脊髄後角アストロサイト特異的にLCN2をノックダウンしたところ、CV-NC/Ngaマウスの痒み行動が有意に減少した。この表現型はLCN2欠損マウスやLCN2 siRNA処置マウスでも確認できた。以上より、アトピー性皮膚炎に伴って脊髄後角でSTAT3依存的に活性化するアストロサイトと、同細胞から産生されるLCN2が痒みの慢性化に重要であることを、世界で初めて明らかにした。

アストロサイトで発現増加するSTAT3の活性化とLCN2産生放出メカニズムを明らかにするため、同細胞の活動に重要な細胞内カルシウムに注目し、その制御分子であるIP3受容体とtransient receptor potential channel (TRP) チャネルの関与を検討した。

マウス初代培養アストロサイトを調製し、インターロイキン-6 (IL-6) 刺激後のSTAT3のリン酸化をウエスタンブロッティング法、LCN2の産生放出をELISA法により解析した。IL-6刺激によって即時的で一過性のSTAT3のリン酸化と遅発性で持続的なリン酸化が認められ、LCN2の産生放出は後者と時間的に相関した。遅発性のSTAT3リン酸化とLCN2産生放出は、IP3R阻害薬により抑制された。培養アストロサイトに発現しているIP3Rサブタイプ (IP3R1とIP3R2) のうち、IP3R1 siRNAによるノックダウンによってSTAT3のリン酸化が抑制され、LCN2産生放出も抑制された。また、TRPチャネルについても同様に検討し、TRPチャネルサブタイプがアストロサイトに発現し、その阻害薬およびsiRNAでIL-6誘発のLCN2産生放出が強く抑制された。以上より、アストロサイトのSTAT3の活性とLCN2の産生放出に同細胞に発現するIP3R1とTRPチャネルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

アトピー性皮膚炎などに伴う慢性的な痒みはこれまで主に皮膚を中心に研究がなれてきたが、今回、研究の視点を中枢神経系に向けたことで、脊髄後角でSTAT3依存的に長期活性化するアストロサイトと、そこから産生放出されるLCN2が痒みの慢性化に重要であるという、全く新しいメカニズムを明らかにした。本研究成果は、Nature Medicine誌に掲載され (引用文献)、同誌のNews & Viewsでも紹介され、世界の注目を集めた。このアストロサイトによる痒みシグナルの増強は、臨床でアトピー性皮膚炎患者の痒みの治療で問題となっている「痒みと掻破の悪循環」と類似しているようにも思える。アトピー性皮膚炎の治療には、皮膚炎の抑制と皮膚の保湿、そして痒みそのものの抑制が重要であるが、現時点で後者に著効する治療薬は存在しない。したがって、脊髄後角のアストロサイトは慢性掻痒治療薬開発において新しい標的となることが考えられ、それが実現

できれば、従来の炎症皮膚に対する治療薬との併用により、非常に効果的な治療法を確立できる可能性が期待できる。

<引用文献>

- Sun and Chen, Nature 488: 700-703 (2007)
Sun et al., Science 325, 1531-1534 (2009)
Shiratori-Hayashi et al., Nat Med 21: 927-931 (2015)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Tsuda M, Modulation of pain and itch by spinal glia, Neurosci Bull、査読有、2017、in press
DOI:10.1007/s12264-017-0129-y

Tsuda M、Spinal dorsal horn astrocytes: new players in chronic itch、Allergol Int、査読有、66巻、2017、31-35
DOI:10.1016/j.alit.2016.07.007

白鳥美穂、津田誠、慢性的な痒みにおけるSTAT3依存的な活性化アストロサイトの役割、臨床免疫・アレルギー科、65巻、2016、458-462
<http://www.kahyo.com/item/M201605-655>

津田誠、痒みの伝達とその慢性化の神経系メカニズム、感染 炎症 免疫、46巻、2016、8-12
<http://www.torii.co.jp/iyakuDB/data/publish/3i461.html>

津田誠、アトピー性皮膚炎に伴う慢性的な痒みと脊髄後角アストロサイト、生体の科学、66巻、2015、571-574
DOI:<http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425200352>

Shiratori-Hayashi M、(12人) Tsuda M、STAT3-dependent reactive astrogliosis in the spinal dorsal horn underlies chronic itch、Nat Med、査読有、21巻、2015、927-931
DOI:10.1038/nm.3912

[学会発表](計11件)

津田誠、アトピー性皮膚炎等の慢性掻痒に対する中枢神経系を標的にした創薬戦略、日本薬学会第137年会、2017年3月26日、東北大学川内キャンパス(宮城・仙台市)

山口千春、慢性掻痒におけるアストロサイト STAT3 の活性化メカニズム、第90回日本薬理学会年会、2017年3月16日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

白鳥美穂、脊髄後角におけるSTAT3依存的なアストロサイト活性化は痒みの慢性化に關与する、日本薬学会第136年会、2016年3月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Tsuda M、A crucial role of spinal astrocytes in chronic itch、第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Shiratori-Hayashi M、STAT3-dependent reactive astrocytes in the spinal dorsal horn contribute to the maintenance of chronic itch in mice、45th Annual Meeting Society for Neuroscience、2015年10月21日、シカゴ(アメリカ)

Tsuda M、Dorsal horn astrocytes: new player in chronic itch、8th World Congress on Itch (WCI) 2015、2015年9月28日、春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)

Shiratori-Hayashi M、Astrocytic lipocalin-2 in the spinal dorsal horn is required for chronic itch、8th World Congress on Itch (WCI) 2015、2015年9月28-29日、春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)

津田誠、体性感覚系疾患におけるグリア細胞の役割、第45回日本神経精神薬理学会、2015年9月24日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

津田誠、アトピー性皮膚炎モデルマウスの慢性的な痒みにおける脊髄後角アストロサイトの関与、第45回日本神経精神薬理学会、2015年9月24日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Shiratori-Hayashi M、Essential role for STAT3-dependent reactive astrocytes in maintenance of chronic itch、第58回日本神経化学会大会、2015年9月12日、大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)

Shiratori-Hayashi M、Role of STAT3-dependent reactive astrocytes in the spinal dorsal horn in chronic itch、XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease、2015年

7月15-16日、ビルバオ（スペイン）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

<http://life-innov.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 誠 (TSUDA, Makoto)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40373394