

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860424

研究課題名(和文) エンドセリン変換酵素の掻痒に対する作用とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of endothelin converting enzyme -1 on pruritus

## 研究代表者

中原 真希子 (Nakahara, Makiko)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80530120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エンドセリン変換酵素(ECE-1)によるエンドセリン(ET-1)の痒みに対する影響を検討した。ET-1とその受容体、ECE-1はマウス後根神経節(DRG)細胞やヒトの皮膚末梢神経に発現していた。ET-1の皮内投与によるマウスの掻破行動はECE-1阻害薬投与により増強した。また、ET-1刺激によるDRG細胞のERK1/2のリン酸化は、ECE-1阻害薬により持続延長した。さらにERK1/2シグナルを阻害するとET-1皮内注射後の掻破行動は有意に減弱した。以上より、我々は、ECE-1がET-1による掻破行動を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Endothelin-1 (ET-1) evokes histamine-independent pruritus in mammals by activating its G protein-coupled receptor, Endothelin A receptor (ETAR). We identified neural endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) as a key regulator of ET-1-induced pruritus and neural signaling of itch. ETAR, ET-1 and ECE-1 are expressed and co-localize in murine DRG neurons and human skin nerves. In neurons of murine dorsal root ganglia neurons, ECE-1 inhibition prolonged ET-1-induced activation of extracellular signal regulated kinase1/2 (ERK1/2). ET-1-induced scratching behavior in mice was significantly augmented by ECE-1 inhibition and abrogated by ERK1/2 inhibition in vivo. Our results for the first time indicate that a neural peptidase, ECE-1, directly regulates endothelin-induced, histamine-independent pruritus in mice, and implicate the ET-1/ECE-1/ERK1/2 pathway as an important target to treat pruritus.

研究分野：アレルギー

キーワード：エンドセリン変換酵素 かゆみ エンドセリン

## 1. 研究開始当初の背景

痒みは、多くの皮膚・全身疾患における主要な症状であり、搔破行動を誘発し皮膚炎を悪化させQOLの低下を招く。しかし、治療薬として抗ヒスタミン薬があるものの、多くの疾患において抗ヒスタミン薬は著効せず、痒みのメカニズムの解明や治療薬の開発が待たれている。このような背景のもと、申請者はこれまで慢性皮膚炎における痒みの程度が、どのような因子とより強い関連性があるのかなど、慢性皮膚炎モデルマウスやアトピー性皮膚炎の患者を対象に研究を行ってきた。

今回、痒みを制御する重要な因子の一つとして注目したのは、エンドセリン変換酵素-1(ECE-1)である。ECEは、不活型のビッグエンドセリン-1を切断して活性型のエンドセリン-1(ET-1)へと変換させる膜結合性メタロプロテアーゼであるが、近年、このECE-1が、細胞内の初期エンドゾームに発現し、そこで受容体と結合した状態で存在する神経ペプチドを分解することで、ある種のG蛋白共役受容体のリサイクリング(リガンドによる受容体刺激後にいったんエンドゾーム内など細胞内に取り込まれた受容体が、再び細胞膜上に戻り、再利用されること)や細胞内シグナルの制御に関与していることが明らかにされた。

哺乳類の皮内投与にてかゆみを起こすET-1の受容体(エンドセリン受容体A:ETAR)はG蛋白共役受容体である。そのため、申請者はECE-1が活性型ET-1の生成だけでなく、ET-1のG蛋白共役受容体の細胞内動態や細胞内シグナルの制御に関与し、さらにそのためにET-1による痒みに影響を及ぼすのではないかと考えた。その仮説を明らかにするために、本研究ではマウス搔破モデルやマウス慢性皮膚炎モデル、マウス後根神経節細胞を用いて、ECE-1がET-1の痒みを制御するのか、またそのメカニズムの解明を試みた。

## 2. 研究の目的

1) ECE-1が、ET-1によるマウスの搔破行動やマウス皮膚炎モデルでの皮膚の炎症・搔破行動に、関与しているかを明らかにする。  
2) 上記のメカニズムの解明への一つのアプローチとして、後根神経節細胞に注目し、ECE-1が、後根神経節細胞への起痒物質刺激による細胞内シグナルや受容体のリサイクリングに、影響を及ぼすか解析する。

## 3. 研究の方法

1. ET-1やETAR、ECE-1がマウスの末梢神経、後根神経節細胞において発現していることをRT-PCR、ウエスタンブロット、免疫染色などを用いて確認する。

ET-1をマウスの皮膚に皮内注射し、ECE-1阻害薬の前投与の有無により搔破行動が有意な変化を示すかを、マウス搔破行動モデルを用いて検討する。

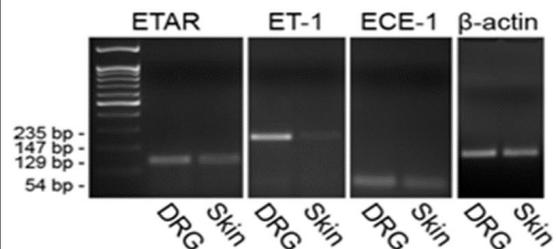
ECE-1がマウス後根神経節細胞にてETARの細胞内動態(受容体リサイクリング)に関与するかを免疫染色法にて検討する。

ET-1刺激後の細胞内シグナルへのECE-1素阻害薬の影響を、培養マウス後根神経節細胞を用いたウエスタンブロット法にて解析する。

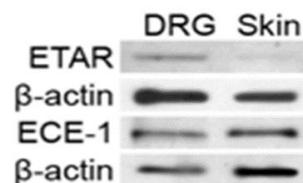
## 4. 研究成果

1) ETAR, ET-1, ECE-1のmRNAやタンパクはマウス後根神経節や皮膚において発現している。

まず、マウス後根神経節細胞や皮膚の末梢神経におけるETAR, ET-1, ECE-1発現を検討した。RT-PCRにて、ETAR, ET-1, ECE-1はいずれもマウス後根神経節細胞、マウス皮膚に発現していた(図1A)。また、ウエスタンブロットにてETAR, ECE-1のタンパクがマウス後根神経節とマウスの皮膚に発現していた(図1B)。免疫染色では、ETAR, ET-1, ECE-1がマウスの小型の後根神経節細胞やマウス皮膚の末梢神経に発現していた。



(図1A)

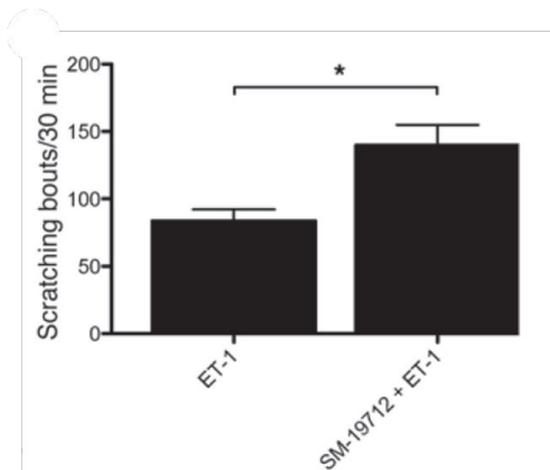


(図1B)

2) ECE-1阻害薬はET-1によるかゆみを有意に増強させる。

マウスの頬部皮内にET-1を投与すると、マウスの搔破行動が生じるが、ECE-1阻害薬を前投与すると、ET-1皮内投与による搔破行動は有意に増強された(図2)。ECE-1はET-1

の搔破行動になんらかの作用を及ぼすことが推測された。



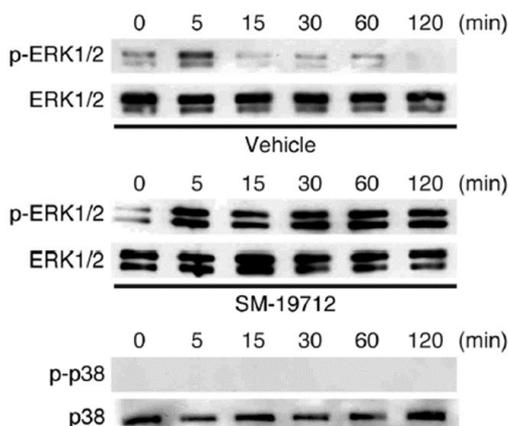
(図2)

3) ECE-1 阻害薬はマウス後根神経節細胞での ETAR 受容体リサイクリングを阻害する

ETAR の受容体リサイクリングに対する ECE-1 の影響を検討した。マウス後根神経節細胞の無刺激の条件では、ETAR は細胞膜表面に存在し、ECE-1 は細胞内に顆粒状に存在していた。またこの ECE-1 が存在しているのは早期エンドゾームであった。この細胞を ET-1 にて刺激すると、細胞表面に存在していた ETAR は細胞内に移動し ECE-1 とエンドゾーム内で共存していた。ET-1 を洗浄し、刺激を除去すると、いったん細胞内に移動した ETAR は再度細胞膜表面に移動し、ETAR の受容体リサイクリングが生じた。これらの実験を ECE-1 阻害薬下で行うと、ETAR の受容体リサイクリングは阻害された。

4) ECE-1 抑制剤は マウス後根神経節細胞での ET-1 による ERK1/2 のリン酸化を持続・増強させる

次に、ET-1 による細胞内シグナルに対する ECE-1 の影響を検討した。マウスの後根神経節細胞を ET-1 で刺激すると、ERK1/2 シグナルは刺激後 5 分をピークにリン酸化しその後そのリン酸化は消退した。これを ECE-1 阻害薬の存在下にて行うと ERK1/2 のリン酸化は増強持続した(図3)。



(図3)

5) ERK1/2 シグナルの抑制により ET-1 によるマウスのかゆみが抑制される

ECE-1 の阻害薬によって ERK1/2 のシグナルが持続・増強したが、この ERK1/2 増強が、ECE-1 の阻害薬の前投与による ET-1 の搔破行動の増強に影響を及ぼすかを検討した。ERK1/2 の前投与後に ET-1 をマウスの頬部皮内に投与すると、その搔破行動は、ERK1/2 阻害薬の前投与のない群と比較して、有意に減弱した。

以上より、ECE-1 が ET-1 によるかゆみを制御することが明らかにされた。ET-1/ECE-1/ERK1/2 pathway がかゆみ治療の新しいターゲットになりうる可能性が示唆された

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 1 件)

— **Kido-Nakahara M**, Buddenkotte J, Kempkes C, Ikoma A, Cevikbas F, Akiyama T, Nunes F, Seeliger S, Hasdemir B, Mess C, Buhl T, Sulk M, Müller FU, Metze D, Bunnett NW, Bhargava A, Carstens E, Furue M, Steinhoff M. Neural peptidase endothelin-converting enzyme 1 regulates endothelin 1-induced pruritus. J Clin Invest. 124(6):2683-95, 2014.

[学会発表](計 2 件)

**Kido-Nakahara M**, Buddenkotte J, Kempkes C, Ikoma A, Cevikbas F, Akiyama T, Nunes F, Seeliger S, Hasdemir B, Mess C, Buhl T, Sulk M, Müller FU, Metze D, Bunnett NW, Bhargava A, Carstens E, Furue M, Steinhoff M. エンドセリン変換酵素 1 はエンドセリン-1 による痒みを制御する 第 24 回国際痒みシンポジウム 平成 26 年 10 月 18 日 東京都千代田区

**中原真希子** かゆみ研究の進歩 第 16 3 回福岡アレルギー研究会 平成 26 年 10 月 31 日 福岡県福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中原 真希子 (NAKAHARA Makiko )  
九州大学大学院医学研究院皮膚科学・助教  
研究者番号：80530120

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし