

令和元年6月18日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08666

研究課題名(和文) 乾癬性掻痒症の新規マウス評価系の確立とヒスタミンH4受容体を標的とする治療戦略

研究課題名(英文) Expression of precipitating factors of pruritus found in humans in an imiquimod-induced psoriasis mouse model

研究代表者

山浦 克典 (Yamaura, Katsunori)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：10543069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、IMQ誘発乾癬モデルマウスの掻痒評価時の至適条件を決定した。掻痒に関与する因子として病変組織のマスト細胞数およびMCP-6、掻痒伝達神経の伸長因子としてNGFやNT3、起痒ペプチド前駆体のPPEなどのmRNA発現が掻痒と相関性を示すことを明らかにした。IMQ誘発乾癬モデルマウスの皮膚病変形成に対し、選択的ヒスタミンH4受容体拮抗薬が有効性を示したことから、H4受容体が掻痒においても標的になり得ると考えたが、掻痒に対する同拮抗薬およびH4受容体欠損マウスを用いた検討から、H4受容体を乾癬性掻痒症治療の標的とすることは困難であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

掻痒を伴う乾癬患者において発現が亢進していることが報告されている複数の因子が、我々が用いたIMQ誘発乾癬モデルマウスにおいても同様に増加していた。さらに、これらの因子とマウスの掻痒反応の間に相関性が示されたことから、本モデルマウスは掻痒を伴う乾癬患者を忠実に模倣していると考えられた。今後、乾癬性掻痒症治療薬の薬効評価および掻痒の病態解明に応用し、医療に貢献出来ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Topical application of imiquimod increased the Psoriasis Area and Severity Index score as well as the frequency and duration of self-scratching. Regarding internal factors, increases in mast cells number and mRNA expression of nerve growth factor (NGF) and endogenous pruritogenic peptide precursor were confirmed. Self-scratching behavior is accompanied by increased number of mast cells and expression of NGF and endogenous pruritogenic peptides in our imiquimod-induced psoriasis model.

Furthermore, we confirmed that histamine H4 receptor doesn't have an important role on the pruritus of an imiquimod-induced psoriasis model by the investigation using specific H4 receptor antagonists and H4 receptor knockout mice.

研究分野：薬学

キーワード：イミキモド(IMQ) 誘発乾癬モデルマウス 掻痒 SCLABA-Real マスト細胞 Mast cell protease-6 Nerve growth factor Neurotrophin 3 (NT3) Preproenkephalin (PPE)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 乾癬は紅斑、鱗屑および表皮の肥厚を主徴とする慢性難治性皮膚疾患である。欧米においては罹患率が2~3%と高く、皮膚病と言ったら乾癬がまず頭に浮かぶほど代表的な皮膚疾患である。我が国においては、乾癬はこれまでは罹患率が0.02%と低く、欧米に比べて稀な疾患であった。ところが、この23年間で乾癬の患者数は約8倍に急増し、2009年の統計では登録患者数がついに40,000人を越えた。掻痒は「皮膚や粘膜を掻破したくなるような不快な感覚」と定義され、強く掻破行動を引き起すが、尋常性乾癬患者の約85%が掻痒症状を呈するとされる。乾癬において掻痒が掻破行動を誘発すると、新たな乾癬病変の新生(ケブネル現象)をもたらす為、乾癬治療において掻痒のコントロールは最も重要な要素の一つである。現在、ヒスタミンH<sub>1</sub>受容体拮抗薬のエピナスチンおよびオロパタジンの2剤が乾癬の掻痒症状に適応を有するが、その有効性は十分ではなく、抗掻痒薬の新薬開発が求められている。

(2) 新薬の開発には、ターゲットとなる病態を模倣し、有効性を評価できる動物モデルが不可欠であるが、乾癬の掻痒を評価できるモデルマウスは未だ存在せず、乾癬性掻痒の評価法確立は喫緊の課題となっている。

### 2. 研究の目的

(1) 疼痛に比べ、掻痒の研究は著しく遅れをとってきたが、1995年に倉石らがマウスを用いた痒みの優れた評価法を報告してから、掻痒の研究は急速に前進した<sup>1)</sup>。上記評価法を用いたアトピー性皮膚炎や接触性皮膚炎の掻痒評価系は確立されているが、乾癬に伴う掻痒の評価系は未だ存在しない。そこで本研究では、マウスによる掻痒評価法を応用した乾癬性掻痒のマウス評価系を確立する。

(2) 近年、アトピー性皮膚炎に生じる掻痒については研究が進展しているものの、乾癬に生じる掻痒病態の詳しい機構については今なお不明な点が多く、ヒスタミンをはじめとする多くの因子の関与が考えられるが明らかではない。そこで本研究では、(1)で確立した乾癬性掻痒のマウス評価系を用い、乾癬の起痒に関連する因子を検討する。

(3) 乾癬に生じる掻痒の原因の一つとして、病変部でのマスト細胞の増加が関与していると考えられている<sup>2)</sup>。しかし、ヒスタミンH<sub>1</sub>受容体拮抗薬に抵抗性の乾癬症例が多いことから、他のヒスタミン受容体サブタイプの関与が示唆される。そこで、乾癬性掻痒症治療の標的分子の候補としてヒスタミンH<sub>4</sub>受容体に着目し、選択的拮抗薬の有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乾癬性掻痒症のマウス評価系の確立

イミキモド(IMQ)誘発乾癬モデルの作成: van der Fitsらの方法に従い<sup>3)</sup>、BALB/c系雌性マウスの両耳介にIMQ製剤ベセルナクリーム(持田製薬株より供与)を反復塗布し、乾癬モデルマウスを作製した。

掻痒評価系の確立: 掻痒評価の至適測定条件を検討するため、IMQ塗布直後からの掻破行動をSCLABA®-Realにて測定し<sup>4)</sup>、掻破行動の日内変動を検討するため、測定時間は24時間とした。測定に用いるSCLABA®-Realは、動物の目に見えない近赤外線を使用し画像を記録する装置であり、通常掻痒評価に用いるビデオ撮影では測定できない、暗期の掻破行動の測定も可能である(図1)。



図1. 掻破行動解析装置SCLABA®-Real

#### (2) 掻痒に関連する因子の解析

起痒関連因子: IMQ塗布部位の皮膚組織よりmRNAを抽出し、各種候補起痒因子のmRNA発現量を定量的に解析する。起痒因子として、アミン類(ヒスタミン)、神経ペプチド(NGF、NT3)、内因性起痒ペプチドBAM8-22の前駆体preproenkephalin(PPE)、サイトカイン(IL-4、IL-31、TSLP)を測定した。

マスト細胞数: IMQ誘発乾癬モデルマウスの耳介組織を採取し、トルイジンブルー染色標本を作製後、マスト細胞数をカウントした。また、同マウスの耳介組織を用い、マスト細胞顆粒因子であるトリプターゼ(MCP-6)のmRNA発現量をマスト細胞数の指標として併せて解析した。

掻痒と相関性の高い因子を割り出すため、IMQ誘発乾癬モデルの掻破行動と病変組織中の上記因子の相関性を解析した。

#### (3) 掻痒治療の標的分子の検討

選択的ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体拮抗薬(JNJ28307474, 100mg/kg, ヤンセンファーマ株より供与)のIMQ誘発乾癬モデルマウスの皮膚病変形成に対する、H<sub>4</sub>受容体の関与を検討した。

H<sub>4</sub>受容体の関与を確認したうえで、H<sub>4</sub>受容体ノックアウトマウスを用いて、IMQ誘発乾

癬モデルマウスの作成を試み、乾癬性掻痒症の治療標的分子としての H<sub>4</sub> 受容体の可能性を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) IMQ 誘発乾癬モデルを用いた乾癬性掻痒症評価系の確立：IMQ 製剤を反復塗布したマウス耳介では、耳介腫脹が経日的に増加し、乾癬様皮膚反応の惹起を確認した(図2)。IMQ 誘発乾癬モデルマウスの掻痒を乾癬性掻痒症の新規評価系として確立すべく、SCLABA®-Real (Noveltec) を用いて掻破回数の定量を24時間にわたり実施した。IMQ 誘発乾癬モデルマウスの掻破回数は正常マウスに比較して、日中に当たるIMQ塗布後2時間、夜間に当たる塗布後9および14時間で有意に亢進する事を見出した。さらに、夜間の方が、日中に比較して掻破行動の定量値が安定していたこと、IMQ塗布に伴う手技的影響が少ないこと、マウスにとって活動期に当たることから、当該モデルマウスの掻破回数の測定点として、夜間に当たる塗布後9~21時間の12時間を掻痒評価時間の至適条件として決定した(図3)。

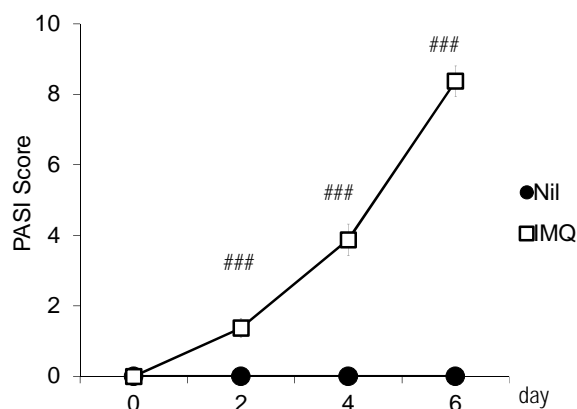


図2. 重症度PASIスコアの経日的変化

Values represent the mean ± S.E.

###  $p < 0.001$  (Mann-Whitney  $U$  test,  $n=4$ ), v.s. Nil.

(2) IMQ 誘発乾癬モデルマウスの掻痒に関与する因子を解析し、病変組織のマスト細胞数およびマスト細胞顆粒因子MCP-6、掻痒伝達神経の伸長因子としてNGFおよびNT3、起痒ペプチド前駆体PPEのmRNA発現が掻痒と相関性を示すことを明らかにした。これらの因子は、乾癬患者においても増加することが知られており、掻痒を伴う乾癬患者において発現が亢進している因子が、我々が用いたIMQ誘発乾癬モデルマウスにおいても同様に増加していたこと、さらにIMQ誘発乾癬モデルマウスの掻痒反応と相関性が示されたことから、本モデルマウスは掻痒を伴う乾癬患者を忠実に模倣していると考えられ、乾癬性掻痒症治療薬の新薬候補化合物の薬効評価および掻痒の病態解明に応用し得ること、さらに評価に際し解析すべき因子を示すことが出来た。

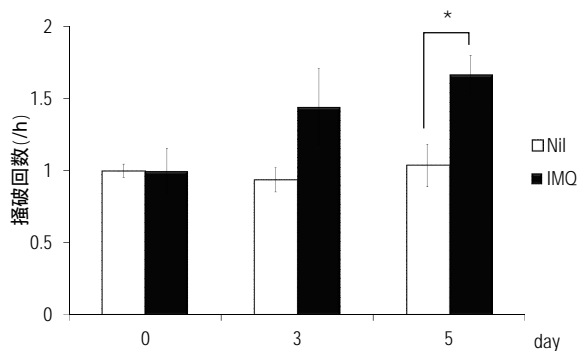


図3. 掻破回数の経日的変化(塗布後9~21時間)

Values represent the mean ± S.E. \* $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test,  $n=4$ ) v.s. Nil

掻破回数(/h)は初日の平均値を1として変化率を計算

(3) 選択的H<sub>4</sub>受容体拮抗薬(JNJ28307474)は耳介腫脹及び肥厚スコアを有意に抑制し、紅斑及び合計スコアを抑制する傾向を示した。一方でH<sub>1</sub>受容体拮抗薬(fexofenadine)は作用を示さなかった。さらにIMQマウスで顕著に亢進したIL-36 mRNA発現を、H<sub>4</sub>受容体拮抗薬は顕著に抑制した( $p < 0.05$ )。以上の結果から、IMQ誘発乾癬モデルマウスの皮膚病態形成に対し、H<sub>4</sub>受容体拮抗薬はIL-36産生誘導を介して有効性を示す可能性が考えられた。IMQ誘発乾癬モデルマウスの皮膚病変形成に対し、選択的ヒスタミンH<sub>4</sub>受容体拮抗薬が有効性を示したことから、H<sub>4</sub>受容体が掻痒においても標的になり得ると考えた。そこで、H<sub>4</sub>受容体拮抗薬の掻痒に対する作用を検討したところ、掻破回数およびNGF mRNA発現量に対し抑制傾向を示したが、有意なものではなかった。そこで、乾癬性掻痒におけるH<sub>4</sub>受容体の関与をより明確に判断するため、H<sub>4</sub>受容体ノックアウト(KO)マウスを用い、IMQ誘発乾癬モデルマウスを作成し掻破回数を野生型(WT)マウスと比較したところ、KOマウスにおいてもWT同様に掻痒が惹起され、掻破回数においてWTとKOマウスの違いもみられなかった。病変組織のNGF mRNA発現が正常マウスに比較してIMQ誘発乾癬モデルマウスで増加する現象も、WT同様KOマウスにおいても変わらず確認された。以上の検討結果から、H<sub>4</sub>受容体を乾癬性掻痒症治療の標的とすることは困難であると考えられた。

#### <引用文献>

- 1) Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algescogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol.* 1995; 275:229-233.
- 2) Schubert C, Christophers E. Mast cells and macrophages in early relapsing psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 1985; 277:352-358.
- 3) van der Fits L1, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F,

Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. J Immunol. 2009;182:5836-5845.

- 4) Tanaka A, Amagai Y, Oida K, Matsuda H. Recent findings in mouse models for human atopic dermatitis. Exp Anim. 2012;61:77-84. Review.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nobuo Oishi, Hiroki Iwata, Naotomo Kambe, Noriko Kobayashi, Kazuko Fujimoto, Hiromi Sato, Akihiro Hisaka, Koichi Ueno, Katsunori Yamaura, Expression of precipitating factors of pruritus found in humans in an imiquimod-induced psoriasis mouse model, Heliyon, 査読有、accepted.

山浦克典, かゆみの不思議「長期ステロイド外用でかゆみが強くなることがある?」, Visual Dermatology, 査読無、Vol.16、No.11、2017、pp.1057

〔学会発表〕(計 4 件)

里 和也, 大石信雄, 岩田紘樹, 小林典子, 藤本和子, 山浦克典: 自記式質問紙方式による乾癬患者の幹部所見と掻痒との相関性の検討, 日本社会薬学会第 37 年会, 千葉 (2018.10.7-8)

山浦克典: 慢性掻痒性皮膚疾患に関わる皮膚免疫の免疫毒性学的解析, 第 24 回日本免疫毒性学会学術年会, 青森 (2017.9.4-5)

大石信雄, 岩田紘樹, 小林典子, 藤本和子, 佐藤洋美, 樋坂章博, 山浦克典: イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける搔破行動解析および掻痒誘発関連因子の探索, 第 24 回日本免疫毒性学会学術年会, 青森 (2017.9.4-5)

Misako Takei, Nobuo Oishi, Katsunori Yamaura, Seiji Onuma, K Naotomo ambe, Hiromi Sato, Akihiro Hisaka: Role of histamine H4 receptor in pruritus; investigations by imiquimod-induced psoriatic mouse model, 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜 (2016.3.9-11)

〔図書〕(計 1 件)

山浦克典: 廣川書店、掻痒. 薬学生のための新臨床医学 症候および疾患とその治療 (市田公美, 細山田真編) 2015、121-122

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 樋坂章博

ローマ字氏名: (HISAKA, akihiro)

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院薬学研究院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 80420206

研究分担者氏名: 佐藤洋美

ローマ字氏名: (SATO, hiromi)

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院薬学研究院

職名: 講師

研究者番号(8桁): 30506887

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 大石信雄

ローマ字氏名: (OISHI, nobuo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。