

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14867

研究課題名(和文) イオンチャネル型受容体TRPが繋ぐ痒みとアレルギー性炎症のクロストーク

研究課題名(英文) Roles of transient receptor potentials in itch and inflammation in allergic status

研究代表者

田中 あかね (Tanaka, Akane)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80418673

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)：痛覚や痒覚などの末梢知覚は外部からの障害を認知し危険から逃れるための宿主防御反応であるが、時として過剰あるいは異常な反応が起こることがある。アトピー性皮膚炎などの皮膚アレルギーにおいて痒みは最も不快な臨床症状のひとつであるが、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究では、末梢知覚に關与することが示唆されるTRPチャネルに着目し、TRPを欠損するアトピー性皮膚炎マウスモデルを用いることで、解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Peripheral perception, including sensations of pain and itch, functions as host protection from external stimuli. However, over or abnormal activation of peripheral neuronal systems sometimes induce unpleasant sensation to hosts. Although itch sensation is one of the most unbearable clinical symptoms in patients with atopic dermatitis, the exact mechanism that maintains chronic itch in allergic status has not been fully understood. Recent studies have suggested the role of TRP channels in itch sensation appeared in allergic skin diseases. Therefore, in the present study, we attempted to investigate association of TRP channels in pathogenesis of atopic dermatitis by using TRP channels deficient NC/Tnd mice.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：臨床病理 アトピー性皮膚炎

## 1. 研究開始当初の背景

痛覚や痒覚、あるいは温感や冷感といった末梢の知覚は、知覚受容器によって受け取られた刺激が、C線維などに代表される末梢知覚神経を経由して伝達、中枢でその信号が変換されて効果器である筋肉の運動を誘発する。元来末梢知覚は、外部からの障害を認知し危険から逃れるための宿主防御反応であるが、時として過剰あるいは異常な反応が起こることがある。臨床的知見から、炎症と痒みは独立した事象であると考えられているが、免疫系の暴走であるアレルギー性炎症と知覚異常との因果関係の分子メカニズムは明らかになっていない。Transient receptor potential (TRP)チャネルは、神経細胞などに発現するイオンチャネルで、6種のサブファミリーを構成する。生理的なセンサーとして機能しており、温度、浸透圧、化学刺激、レドックス変化、pH、あるいはサイトカインなどの生理活性物質の受容体刺激などに応答してカルシウム流入を起こし、イオン透過に関与するのみならず細胞骨格の足場としても機能する。TRPチャネルについては、阻害剤または作動剤を用いた研究から、炎症やかゆみ、あるいは痛みの惹起への関連が示唆されている。しかしながら、アレルギー性炎症やかゆみを誘発するスイッチとしてどのように機能しているかは不明であった。

## 2. 研究の目的

痛覚や痒覚などの末梢知覚は、宿主を生涯から回避させる機能である。一方炎症も、病原体による侵襲を防ぎ、外敵を処理しようとする宿主の防御反応である。様々な病態において、炎症と痛みあるいはかゆみは連動することもあるが、連動せず、独立した事象として観察されることもある。また末梢の知覚と炎症との分子生物学的関連性は必ずしも明らかにはなっていない。申請者はこれまで、疾患モデルマウスを用いてアトピー性皮膚炎の病態研究において、分子・細胞レベルから生体レベルまで幅広い解析を実施してきた業績がある。特に、実験小動物の痒みや痛みを画像解析・定量化する技術を有し、創薬につながる研究業績を上げている。またアトピー性皮膚炎自然発症モデル NC/Tnd マウスの維持、繁殖、遺伝子改変マウスとの戻し交配などに関する、実験動物学的知識と経験を有している。このような研究実績を基盤に、本研究では、末梢知覚異常と炎症を2つの異なる事象に分離し、それぞれを制御することで相互影響を解析、どのような知覚異常の中で炎症は惹起され悪化するのか、すなわちアトピー性皮膚炎における末梢知覚異常と炎症発現とのクロストークを、TRPチャネルに着目して解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)TRP 欠損 NC/Tnd マウスの作成

アトピー性皮膚炎自然発症モデルとして汎用される NC/Tnd マウスにおける、TRP 遺伝子欠損マウスを作出するために、京都大学より TRPA1 欠損 C57BL/6 マウスを、ジャクソンラボラトリーズより TRPV1 欠損 C57BL/6 マウスを導入し、スピードコンジェニック法により TRPA1 欠損 NC/Tnd マウス及び TRPV1 欠損 NC/Tnd マウスを作出した。

### (2)発痒剤による発痒試験

特定病原体のいない環境 (SPF) で飼育し、皮膚炎を発症していない野生型 NC/Tnd マウスに対して、アセトン・エーテル法を用いて皮膚の脂質バリアを軽度破壊したのち、TRP 作動剤や様々な発痒剤を塗布し、引っ掻き行動数を定量化した。引っ掻き行動数の定量化には、次世代型擦過行動自動解析装置 SCLABA-Real を使用した。皮膚局所の炎症病態の発現は、皮膚組織サンプルを回収したのちに病理組織学的手法を用いて調べた。

### (3)後根神経節細胞培養法の確立

実体顕微鏡下にて、野生型及び遺伝子改変 NC/Tnd マウスの脊髄後根神経節を分離し、シングルセルとしたのちに、細胞外マトリクスをコーティングしたプレートにて培養、末梢知覚神経マーカーである PGP9.5 に対する抗体を用いた免疫細胞染色にて神経樹状突起の伸展を可視化する系を確立した。この系を用いて、様々な薬剤の神経樹状突起伸展に対する作用を検討した。

### (4)TRP 欠損マスト細胞の反応性の検討

TRP チャネルはマスト細胞やマクロファージにも発現し、様々な反応を媒介していることが知られている。そこで野生型及び TRP 欠損マウスの骨髄から、IL-3 を用いて 5-6 週間培養することで、骨髄由来培養マスト細胞を作出した。得られたマスト細胞を用いて、様々な刺激による反応性の違いを調べた。またフローサイトメトリー法や免疫細胞染色法を用いて、骨髄由来培養マスト細胞における TRP チャネルの発現を確認した。

## 4. 研究成果

### (1)TRP 欠損 NC/Tnd マウスの作成

SPF 環境で飼育しながら、野生型 NC/Tnd マウスに対して、TRPA1 欠損 C57BL/6 マウス、あるいは TRPV1 欠損 C57BL/6 マウスを戻し交配した。生まれた仔マウスについては、PCR 法を用いて遺伝子型を確認しながら、さらに戻し交配を続け、TRP 遺伝子欠損 NC/Tnd マウスを得た。マウスの生産は概ね順調で、

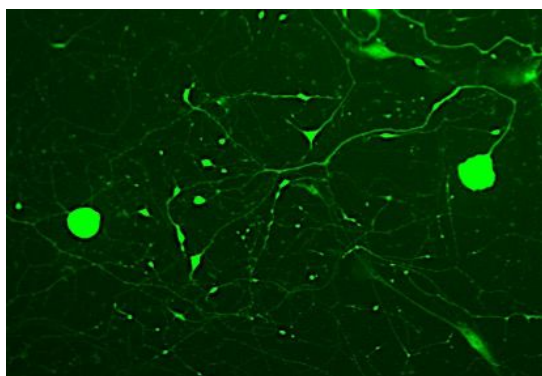
TRP 遺伝子の欠損による繁殖の異常は認められなかった。ただ、TRPV1 欠損 NC/Tnd マウスにおいて、野生型と比べて 10%程度の体重の減少が認められたが、この原因は今の所不明である。

#### (2)発痒剤による発痒試験

野生型及び TRP 遺伝子欠損 NC/Tnd マウスの皮膚バリアをアセトン・エーテル法で軽度破壊し、様々な発痒因子や TRP 刺激剤を塗布して、炎症やかゆみの発現を調べたところ、野生型 C57BL/6 マウスにおいてはヒスタミンによってかゆみが誘導され、セロトニンによっては強い炎症とかゆみが誘導されたが、野生型 NC/Tnd マウスではいずれに対する反応性も軽度であった。これは TRP 遺伝子欠損 NC/Tnd マウスでも同様で、野生型と比べて反応性の違いは認められなかった。しかしながらコンベンショナル環境下で飼育され、皮膚炎を発症している野生型 NC/Tnd マウスに対して TRPV1 の作動役であるカプサイシンを塗布すると、引っ掻き行動が減弱した。カプサイシンには、一時的に TRPV1 を活性化したのちに不応化する働きがあることから、TRPV1 がかゆみの発生に関与している可能性が示唆された。一方で、皮膚炎の病理組織学的病勢には、短期的にはあまり変化がなかったことから、かゆみと炎症が異なった経路で制御されている可能性が考えられた。

#### (3)後根神経節細胞培養法の確立

脊髄後根神経節を分離し、シングルセルとしたのちに、ラミニンをコートしたプレートにて、F12 培地を用いて神経細胞を3日間培養し、神経樹状突起の伸展を誘導する試験系を確立した(下図)。



培養したのちに上清を捨て、4%パラフォルムアルデヒドを用いて固定したのちに、抗 PGP9.5 抗体で染色し、Alexa-Fluor-488 を結合した抗体を反応させ、蛍光顕微鏡下で可視化することができた。この試験系を用いて、様々な薬剤に対する反応性を調べることができた

が、野生型 NC/Tnd マウスの神経細胞において、カプサイシン刺激に対する反応性が低下していることが明らかとなった。このことは、TRPV1 の働きの違いがかゆみの惹起や病態形成に関与している可能性を示すものである。

#### (4)TRP 欠損マスト細胞の反応性の検討

TRP 欠損マウスの骨髄から培養したマスト細胞の反応性を、野生型のマウスのもものと比較したところ、TRPA1 欠損マウス由来の骨髄培養マスト細胞で、酸素濃度の変化による脱顆粒反応が減弱していることが明らかとなった。野生型マウス由来の骨髄培養マスト細胞に対して TRPA1 の阻害剤を作用させると、酸素濃度変化による脱顆粒反応が抑制されたことから、TRPA1 がマスト細胞活性化における酸素濃度のセンサーとして働いてい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7件)

1.Oida K, Einhorn L, Herrman I, Panakova L, Resch Y, Vrtala S, Hofstetter G, Tanaka A, Matsuda H, Jensen-Jarolim E. Innate function of house dust mite allergens: robust enzymatic degradation of extracellular matrix at elevated pH. WAO J., In press.

査読あり

2.Jang H, Matsuda A, Jung K, Karasawa K, Matsuda K, Oida K, Ishizaka S, Ahn G, Amagai Y, Moon C, Kin, SH, Arkwright P, Takamori K, Matsuda H, Tanaka A. Skin pH is the master switch of kallikrein 5-mediated skin barrier destruction in a murine atopic dermatitis model. J. Invest. Dermatol., 136:127-135, 2016.

査読あり

3.Jang H, Makita Y, Jung K, Ishizaka S, Karasawa K, Oida K, Takai M, Matsuda H, Tanaka A. Linoleic acid salt with ultrapure soft water as an antibacterial combination against dermato-pathogenic Staphylococcus spp. J. Appl. Microbiol., 120:280-288, 2016.

査読あり

4.Ahn G, Amagai Y, Matsuda A, Kang SM, Lee WW, Jung K, Oida K, Ishizaka S, Matsuda K, Jeon YJ, Jee Y, Matsuda H, Tanaka A. Dieckol, a phlorotannin of Ecklonia cava, suppresses IgE-mediated mast cell activation and passive cutaneous

anaphylactic reaction. Exp. Dermatol., 24:968-970. 2015. 査読あり

5. Amagai Y, Oida K, Matsuda A, Jung K, Kakutani S, Tanaka T, Matsuda K, Jang H, Ahn G, Xia Y, Kawashima H, Shibata H, Matsuda H, Tanaka A. Dihomo-gamma-linolenic acid prevents the development of atopic dermatitis through prostaglandin D1 production in NC/Tnd mice. J. Dermatol. Sci., 79:30-37, 2015. 査読あり

6. Tanaka A, Matsuda A, Jung K, Jang H, Ahn G, Ishizaka S, Amagai Y, Oida K, Arkwright PD, Matsuda H. Ultra-pure soft water ameliorates atopic skin disease by preventing metallic soap deposition in NC/Tnd mice and reduces skin dryness in humans. Acta Derm. Venereol. 95:787-791, 2015. 査読あり

7. Amagai Y, Matsuda A, Jung K, Oida K, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H, Tanaka A. A point mutation in the extracellular domain of KIT promotes tumorigenesis of mast cells via ligand-independent auto-dimerization. Sci. Rep., 12:5:9775, 2015. 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1. 田中あかね、張孝善、松田浩珍、Filaggrin-independent development of allergic skin lesions in the mouse model for human atopic dermatitis. 欧州アレルギー臨床免疫学会 2016、オーストリア・ウィーン、平成 28 年 6 月 14 日

2. 松田浩珍、田中あかね、アトピーと皮膚バリア、第 79 回日本皮膚科学会 東京・東部支部合同学術集会、京王プラザホテル (東京都新宿区)、平成 28 年 2 月 21 日

3. 田中あかね、様々な動物のアレルギーから発するトランスレーション研究、公益社団法人日本実験動物学会：実験動物科学シンポジウム、岡山理科大学(岡山県岡山市) 平成 27 年 12 月 11 日

4. 田中あかね、皮膚バリアとかゆみの関係ーアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた研究からー、獣医生命科学会、日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市) 平成 27 年 11 月 7 日

5. 田中あかね、張孝善、松田浩珍、Ultra-pure soft water ameliorates skin condition of adult and child patients with atopic dermatitis. 欧州小児アレルギー

ー学会 PAAM2015、ドイツ・ベルリン、平成 27 年 10 月 17 日

6. 田中あかね、皮膚バリアとかゆみの関係ーアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた研究からー、順天堂大学戦略的基盤形成事業公開シンポジウム、順天堂大学(東京都文京区)、平成 27 年 10 月 10 日

7. 張孝善、松田浩珍、田中あかね、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける皮膚 pH 調節因子の解析、第 158 回日本獣医学会学術集会、北里大学(青森県十和田市)、平成 27 年 9 月 7 日

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ  
[http://web.tuat.ac.jp/~mol\\_path/](http://web.tuat.ac.jp/~mol_path/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中あかね (TANAKA, Akane)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：80418673

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )