

令和元年6月19日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08986

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎の痒みにおける神経・内分泌・免疫のクロストーク

研究課題名(英文) Cross talk of nerve, endocrine and immunity in itching of atopic dermatitis

研究代表者

天野 博雄 (AMANO, HIROO)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：70302487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：NC/Nga マウスにストレスを加えることで末梢血中のNK細胞数が減少すること、脳中のオピオイド受容体の発現に影響を及ぼすことも確認した。すなわち、脳中のオピオイド $\mu$ 受容体発現を促進させ、オピオイド受容体の発現を低下させた。そしてCRFはこれらの発現変化を調整させる作用をもっていた。ストレス負荷後、血液中のNK細胞数は減少し、血液中のNK細胞数と湿疹病変との相関が見られた。NK細胞の補充により湿疹が改善すること、さらに痒みも改善した。CRF、オピオイド受容体、NK細胞の相互作用の関係がさらに解明できれば将来的にはADに対する治療戦略になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスは経皮感作で生じる免疫反応に影響を及ぼす。急性ストレスでは、放出されたカテコールアミンがT細胞をTh1からTh2へシフトさせることが知られている。慢性ストレスは皮膚オピオイド受容体に影響を及ぼすこと、さらに交感神経や視床下部-下垂体-副腎皮質系に作用しカテコールアミン受容体の発現量を変化させることも報告されている。一方、自然免疫、獲得免疫で重要な役割を担うNK細胞は直接的にADの湿疹病変を改善することも報告されている。本研究では、CRF、ノルエピネフリン、NK細胞がADの痒みに対する作用を検討し、ADをはじめとする痒性皮膚疾患の治療に繋がることを研究の目的とする。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that WAS in NC/Nga mice reduced the number of NK cells in peripheral blood and affected the expression of opioid receptors in the brain: expression of opioid  $\mu$  receptors was promoted and that of opioid  $\kappa$  receptors was reduced. Thus, it appeared that CRF regulated these changes in receptor expression. After WAS, the number of NK cells in the blood decreased, and this was correlated with the appearance of eczematous lesions. These results suggest that CRF may have future therapeutic application for targeting NK cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 かゆみ 神経 内分泌 免疫

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

### 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎 (AD) 患者では、環境因子であるダニ、ほこりが皮膚炎や痒みの症状を増悪させる。環境因子は、遺伝的な要因・皮膚のバリア機能異常とともに AD の主な発症原因とも考えられている。実際に、環境因子が AD 様症状を発症させることも動物実験において証明されている。一方、精神的ストレスが痒みや掻破行動を引き起こし、既存の AD の症状を悪化させることは臨床上良く知られているところである。これまでの研究で、精神的ストレスが表皮のバリア機能を低下させること、また保湿能力のある層板顆粒分泌を低下させること、細菌に対する抗菌ペプチド発現を抑制することも知られている。さらに、ストレスは経皮感作で生じる免疫反応に影響を及ぼす。急性ストレスでは、放出されたカテコールアミンが T 細胞を Th1 から Th2 へシフトさせることが知られている。最近の研究では、慢性ストレスが皮膚オピオイド受容体に影響を及ぼすこと、さらに交感神経や視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA axis) に作用しカテコールアミン受容体の発現量を変化させること、さらにアドレナリン受容体を  $\beta$  型から  $\alpha$  型に変換させることも報告されている。一方、自然免疫、獲得免疫で重要な役割を担う NK 細胞は直接的に AD の湿疹病変を改善することも報告されている。

### 2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎における痒みを神経・内分泌・免疫の観点から研究し、痒みの抑制および皮膚炎の制御・発症抑制に繋がることを目的とする。AD モデルマウスである NC/Nga マウスでは、精神的ストレスを加えることで痒みが生じ湿疹病変の発症・増悪がみられる。私たちは、視床下部から放出される corticotropin-releasing factor (CRF) がストレスによる痒みおよび掻破行動を抑制することを見出している。さらに、ストレス負荷により放出されるノルエピネフリン、さらに自然免疫、獲得免疫で重要な役割を担う NK 細胞の痒みに対する影響を検討する。具体的には、CRF、ノルエピネフリン、NK 細胞による AD の痒みに対する作用を検討し、AD の痒みの抑制と湿疹病変の治療に繋がることを研究の目的とする。本研究により、AD の痒みの抑制と湿疹病変の治療、および AD をはじめとする癢痒性皮膚疾患の治療に繋がることを目指す。

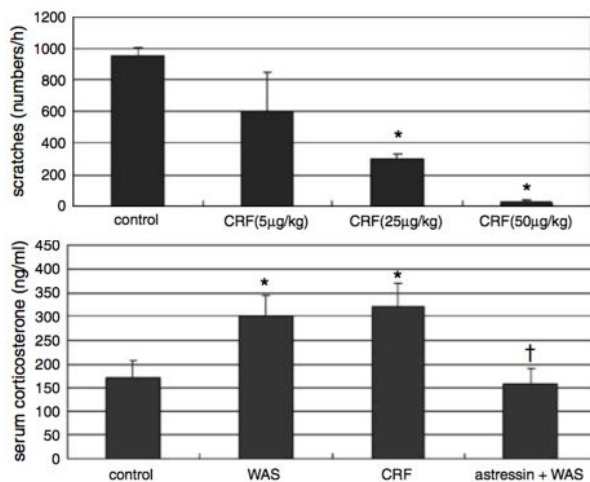
### 3. 研究の方法

AD モデルマウスである NC/Nga に water avoidance stress による精神的ストレスを加える。精神的ストレスが適切に負荷できているかについては血清ステロイド値を ELISA により測定する。加えてストレスで増加すると言われている糞の数量 (fecal pellet output) も測定する。痒みの指標として、ビデオを用いた掻破回数のチェックとともに自動掻破行動測定装置である SCLABA Real を用い掻破行動を測定する。皮膚組織は組織を採取後、マイクロスマッシュあるいはマルチピースショッカーを用いて破碎し mRNA を抽出した後に測定に用いる。また、フローサイトメーターを用いて血清、脾臓・リンパ節中の NK 細胞、T 細胞、B 細胞などのプロファイルの変化を調べる。アドレナリン  $\alpha$ 、 $\beta$  受容体に関してはリアルタイム PCR で検討を行う。作用機序については、オピオイド受容体、カテコールアミン  $\alpha$ 、 $\beta$  受容体の刺激薬あるいは拮抗薬、

シグナル伝達阻害薬を用いて検討する。オピオイド受容体に関しては脳中、皮膚組織中の mRNA 発現を検討し、さらに表皮細胞を用いて蛍光抗体法により行う。

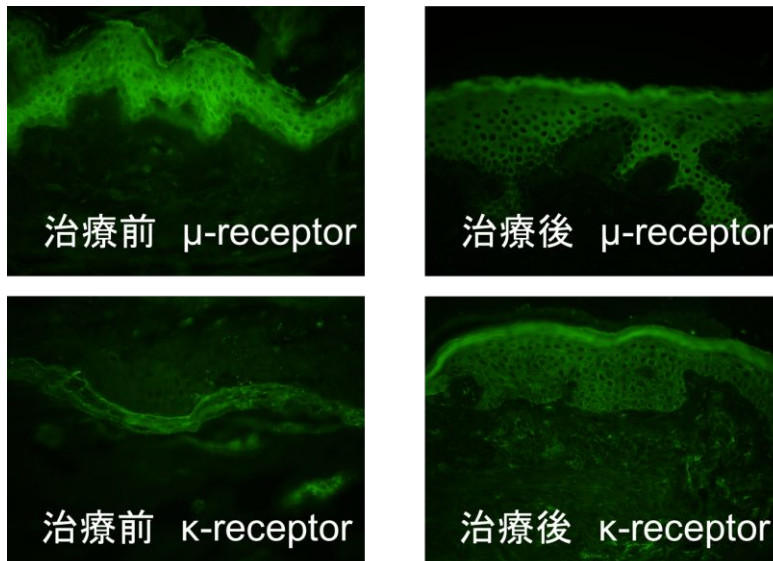
#### 4. 研究成果

AD モデルマウスである NC/Nga マウスを用いて実験を行った。NC/Nga マウスは、ダニのいる環境下では湿疹が生じるが、SPF 環境下では湿疹病変は惹起されない。申請者は、通常では掻破行動が起こらず皮膚炎を発症しない SPF 環境下においても、精神的ストレス (water avoidance stress (WAS)) を与えると掻破行動と AD 様症状が誘導されることを確認した。ストレス負荷時には血清中のコルチコステロンが上昇し、fecal pellet output が増加していた。痒みの指標として、ビデオによる目視および自動掻破行動測定装置である SCLABA Real を用いて掻破行動を測定した。続いて、WAS 負荷前に corticotropin-releasing factor (CRF) を腹腔内投与し、ストレスによる掻破行動あるいは AD 発症に対する影響について検討した。結果として、CRF は WAS による掻破行動を濃度依存性に抑制した (下図)。また、CRF 投与前にステロイド合成阻害剤を投与することにより CRF によるステロイド分泌の影響を除去後、同様のストレス負荷実験を行ったところ、CRF は同様に WAS による掻破行動を抑制した。このことから、CRF はステロイド分泌を介さずに掻破行動を抑えることが判明した。Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) あるいは抗サブスタンス P 抗体の前投与を行った後にストレスを負荷したが CRF は同様に掻破行動を抑制した。

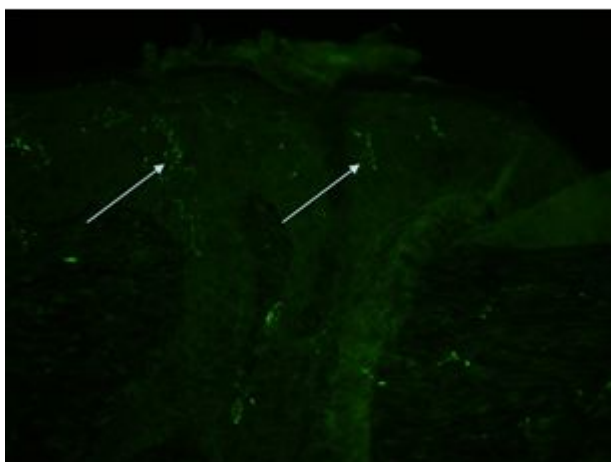


次いで、CRF による掻破行動抑制には脳中オピオイド受容体の発現調整が関与している可能性を明らかにした。すなわち、CRF は濃度依存性に脳中オピオイド受容体発現量を調整した。CRF は脳中のオピオイド受容体発現を減少させ、オピオイド受容体の発現を増加した。AD モデルマウスである NC/Nga マウスにおいては CRF はこれらの発現変化を調整させる作用をもっていた。興味深いことに、NC/Nga マウス以外のマウス (Balb/c, C57BL/6 等) ではストレス負荷により掻破行動は起こらず皮膚炎を生じなかった。脳中のオピオイド受容体発現も影響を受けなかった。このことから、アトピー性皮膚炎モデルマウスは CRF、脳中オピオイド受容体発現において通常のマウスとは異なるプロファイルを持っていると考えられる。このことが、遺伝的に AD の素因があるマウスでのみ精神的なストレスを加えることで痒みおよび掻破行動が惹起され、AD が発症することの理由と考える。この現象は AD

の発症メカニズムにおいて、遺伝的な背景とともに痒みと搔破行動が重要であることも物語っている。免疫学的な検討ではNC/Nga マウスにストレスを加えることで末梢血中のNK細胞数が減少していた。この減少は湿疹病変の重症度と相関しており、湿疹がみられるときはNK細胞数は減少し、改善するとNK細胞数は回復した。NK細胞の補充によりアトピー性皮膚炎の湿疹病変が改善することはすでに発表しているところではあるが(Plasmodium berghei infection ameliorates atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Kishi C, Amano H, Suzue K, Ishikawa O. Allergy 2014;69:1412-9.)、この論文で述べているように、NK細胞はアトピー性皮膚炎の湿疹病変の形成に重要な役割を担っていると考えられる。NK細胞は様々なサイトカインを産生放出するが、このサイトカインの中に痒みを惹起するあるいはオピオイド受容体に影響を及ぼすものがないかを今後検討すべきと考える。なお、オピオイド受容体に関しては、皮膚表皮に関するオピオイド受容体の発現の変化が見られたことも確認している(下図)。下図に示すように、痒みがある状態では表皮のオピオイド受容体の発現が亢進し、オピオイド受容体の発現は低下していた。治療を行い、痒みがコントロールされていると、図の右にあるように、オピオイド受容体の発現が亢進し、オピオイド受容体の発現は低下していた。この結果は脳中のオピオイド受容体の発現と同じ傾向であった。



今回の研究を通して、ストレスとNK細胞数、オピオイド受容体の相互作用の一部を確認することができた。また、湿疹のないマウスでは通常は表皮内への神経線維の侵入はみられないが、湿疹が生じているマウスでは神経線維が表皮内に侵入している所見を観察することができた(下図)。今後はNK細胞、オピオイド受容体発現、搔破行動と神経線維の表皮への侵入についての相互作用についてもさらに検討する必要がある。具体的にはNK細胞数と



脳・皮膚オピオイド受容体発現、さらに表皮内神経線維数の関係である。これらを解明することで痒みと神経、内分泌、免疫の相互関係が分かる可能性がある。なお、NK細胞については、当初考えていた以上にアトピー性皮膚炎の湿疹病変に対する影響がみられた。このことから今後、さらにNK細胞に関する研究を継続していく必要性を感じた。

5．主な発表論文等

6．研究組織

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。