

令和元年6月20日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09000

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎の痒みにおけるMrgprの役割の解明

研究課題名(英文) Role of Mrgpr in itch associated with atopic dermatitis

研究代表者

藤井 正徳 (Fujii, Masanori)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40434667

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)：アトピー性皮膚炎において、痒みは患者を最も苦しめる症状である。Mas関連Gタンパク質共役受容体(Mrgpr)はヒスタミンとは異なるタイプの痒みを伝達する受容体として注目されているが、アトピー性皮膚炎の痒みとMrgprの関連性は未だ不明である。本研究は、アトピー性皮膚炎と類似した症状を示すマウスを用いて、痒みにおけるMrgprの役割を調べた。Mrgprのサブタイプの一つであるMrgprA3を発現した神経を実験的に消失させたところ、物理的刺激による痒み行動が抑制された。また、アトピー性皮膚炎治療薬のタクロリムスはMrgprA3が発現している神経に作用して痒みを抑えていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、最も一般的な皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎の痒みと新規痒み受容体として近年注目されているMrgprとの関連性について検討した。その結果、Mrgprがアトピー性皮膚炎の痒みの治療標的となる可能性とMrgprが発現した知覚神経の抑制機構の一端を明らかにすることができた。本成果は、ヒトのアトピー性皮膚炎と類似した症状を示すモデルマウスから得られた成果であり、直ちに実際の医療に役立つものではないが、将来的にアトピー性皮膚炎の痒みに対する治療薬の開発につながる意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Itch is the most bothersome symptom of atopic dermatitis, a common chronic skin disease. Mas-related G protein-coupled receptors (Mrgpr) are interesting therapeutic targets for intractable itch because they are reported to mediate non-histaminergic itch; however, the role of Mrgpr in itch in atopic dermatitis remains unknown. In this study, we examined whether Mrgpr are involved in itch responses in mice suffering from atopic dermatitis. The major findings of the present study are as follows: 1) Ablation of MrgprA3-expressing sensory neurons by toxin receptor-mediated cell knockout suppressed mechanically induced scratching in atopic dermatitis mice. 2) Tacrolimus, a therapeutic agent for atopic dermatitis, may act directly on dorsal root ganglion cells expressing MrgprA3 to suppress their neural activation, leading to inhibition of itch sensation.

研究分野：薬理学

キーワード：痒み アトピー性皮膚炎 Mas関連Gタンパク質共役受容体

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

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎において、痒みは主要な症状であり、慢性的な掻破は皮膚炎の増悪・遷延化に深く関係する。しかし、アトピー性皮膚炎の痒みに対して既存の抗ヒスタミン薬は無効である場合が多く、特効薬は未だ存在しない。最近の研究から、Mas 関連 G タンパク質共役受容体 (Mrgpr) がヒスタミン非依存性の痒みを媒介する受容体として機能することが明らかにされ注目されている。しかし、アトピー性皮膚炎の様な慢性病態において Mrgpr が関与するかどうかは未だ不明であり、皮膚中に存在する Mrgpr 内因性リガンドも同定されていない。

これまでに我々は、ヘアレスマウスを用いて飼料誘発性のユニークなアトピー性皮膚炎の病態モデルを開発し、痒みに関する研究を行ってきた。最近では、特殊飼料を長期間摂食させ皮膚バリア機能を低下させた後、コナヒョウヒダニの抽出物を含有する軟膏を反復して塗布することにより、顕著な掻痒行動を示す新規のアトピー性皮膚炎モデルを開発している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アトピー性皮膚炎マウスモデルを用いて、アトピー性皮膚炎の痒みにおける Mrgpr の役割を解明することである。具体的には、1) Mrgpr 発現神経消失の掻痒行動に及ぼす影響、2) 内因性 Mrgpr リガンドの探索、3) 一次知覚神経を用いた Mrgpr 応答性解析について検討した。

3. 研究の方法

(1) アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

本研究では、3つの異なるアトピー性皮膚炎モデルを用いた。1) HR-AD 摂食モデル (Fujii M et al, *Exp Dermatol*, 14, 460-468, 2005): 4週齢の雌性 HR-1 系ヘアレスマウスに HR-AD 用精製飼料 (日本農産) を8週間以上摂食させ、アトピー性皮膚炎様症状を発症させた。2) C57BL/6 (B6) モデル: 4週齢の雌性 C57BL/6N マウスに不飽和脂肪酸およびデンブン成分を欠乏させた特殊飼料 (Research Diets, D03052309) (Fujii M et al, *Exp Dermatol*, 24, 108-113, 2015) を14週間摂食させ、アトピー性皮膚炎様症状を発症させた。3) ドライスキン+ダニ (DM) モデル: 不飽和脂肪酸およびデンブン成分欠乏飼料 (D03052309) を用いて、ドライスキン症状を HR-1 系ヘアレスマウスに発症させた後、コナヒョウヒダニの粗抽出物を含有する軟膏 (300 µg protein/100 mg ointment) をマウスの顔部、耳介部および上背部皮膚に100 mg 宛て1日1回5日間連続で塗布し (1ラウンドとする)、9日間のインターバルを置いて同様の処置を計5回繰り返すことでアトピー性皮膚炎症状を発症させた。

(2) TRECK 法による MrgprA3 発現神経の消失

ジフテリア毒素受容体 (DTR) を利用した標的細胞ノックアウト法 (toxin receptor-mediated cell knockout, TRECK) により、MrgprA3 発現神経を以下の様に消失させた。MrgprA3-Cre マウス (Johns Hopkins 大学 Dong 教授より供与) と Rosa26DTR マウス (Jackson Laboratory, #007900) を交配させることにより、MrgprA3 発現細胞 (主に一次知覚神経の一部に発現) にヒト DTR を発現するマウスを作出した。この交配マウスにジフテリア毒素 (DTX) を5 µg/kg の用量で腹腔内投与し、MrgprA3 発現神経を特異的に消失させた。

(3) 脊髄後根神経節 (DRG) 細胞を用いた Ca²⁺イメージング

マウスより DRG を採取し、collagenase を処置して細胞を単離した。単離した DRG 細胞を、laminine をコーティングしたカバースリップに接着させ、DMEM 培地を用いて一晩インキュベーションした。その後、DRG 細胞に Ca²⁺指示薬 Fluo-4 AM を1時間処置し、洗浄した後、高速カメラが付属した蛍光顕微鏡を用いて Ca²⁺イメージングした。

4. 研究成果

1) Mrgpr 発現神経消失の掻痒行動に及ぼす影響

本検討を行うため、まず、MrgprA3-Cre マウスと Rosa26DTR マウスのバックグラウンドマウスである C57BL/6 (B6) マウスを用いて、ヘアレスマウスと同様にアトピー様の痒みモデルが作製できるか検討した。B6 マウスに不飽和脂肪酸およびデンブン成分の欠乏した飼料を10週以上摂食させると、皮膚バリア機能低下を伴ったドライスキン症状が発症した。また、組織学的解析から、表皮の肥厚および肥満細胞数の増加が認められた。さらに、掻痒行動を解析したところ、特殊飼料を摂食させたマウスは、通常飼料を摂食させた正常マウスに比べて、自発的掻痒行動、機械的刺激による掻痒行動、中枢神経抑制薬による掻痒行動の増強が再現よく認められた。以上より、B6 マウスを用いてアトピー様の慢性痒みモデルを確立することができた。

つづいて、TRECK 法を用いて MrgprA3 発現神経を消失させた際の掻痒行動に及ぼす影響を検討した。DTX を投与したマウスと溶媒を投与したマウスを比較したところ、自発的掻痒行動において差は認められなかったが、機械的刺激による掻痒行動が DTX 投与群で抑制される傾向がみられた。一方、フェノバルビタール誘発掻痒行動は DTX 投与群と溶媒投与群で同等であった。

不飽和脂肪酸/デンブン欠乏飼料の摂食によるモデルでは皮膚炎症の程度が軽度であったことから、皮膚炎症および痒みを増悪させる目的で、ダニ抽出物の塗布を付加したところ、好酸球増加を特徴として皮膚炎症が増悪すること、また、掻痒行動が顕著に増加することを明らか

にした。今後、ダニ塗布を付加した B6 マウスモデルを用いて MrgprA3 発現神経消失の影響をさらに検討する。

(2) 内因性 Mrgpr リガンドの探索

ドライスキンを発症させたヘアレスマウスにダニ抽出物を経皮的に反復塗布したモデルマウス (DM マウス) では著明な搔痒行動が起こることを明らかにしている。そこで、DM マウスから採取した皮膚から痒みの原因成分を回収できるか検討した。DM マウスの皮膚から細胞を単離し、単離した皮膚細胞をダニ抽出液で一定時間インキュベートした後、上清を採取した。回収した試料を別の正常なヘアレスマウスに皮内投与したところ、明らかな搔痒行動が観察された。一方、ダニ抽出液自体および正常マウス由来皮膚細胞から回収した試料の投与では顕著な搔痒行動は観察されなかった。現在、皮膚の単離条件、ダニ抽出液の刺激条件等をさらに検討しているところであるが、アトピー性皮膚炎を発症したマウスの皮膚から痒み活性を有する生体試料を採取することができたと思われる。

また、MrgprA3 もしくは MrgprC11 を強制発現させた細胞を用いた実験系は当該研究期間では確立するに至らなかったが、現在も引き続き検討を行なっているところである。

(3) 一次知覚神経を用いた Mrgpr 応答性解析

MrgprA3 アゴニストであるクロロキンを正常なヘアレスマウスおよび慢性的にドライスキンを発症したマウスに皮内投与したところ、クロロキンによる搔痒行動の程度がドライスキンマウスの方で高いことを明らかにした。

一方、正常マウスおよび DM モデルより DRG 細胞を採取し、Ca²⁺イメージングにより、クロロキン (MrgprA3 アゴニスト) および SLIGRL (MrgprC11 および PAR2 アゴニスト) の反応性を調べたところ、両マウス間で顕著な差は認められなかった。

他方、HR-AD 摂食モデルから採取した DRG 細胞を用いた実験で、種々の痒み誘発物質 (ヒスタミンやクロロキン) と痛み誘発物質 (カプサイシンや AITC) の刺激による細胞内 Ca²⁺増加に及ぼすタクロリムスの影響を検討したところ、タクロリムスがクロロキンによる細胞内 Ca²⁺増加を選択的に抑制することを見出した。さらに検討を重ねたところ、タクロリムスによるクロロキン誘発細胞内 Ca²⁺増加の抑制は、DRG 細胞に直接作用した結果起こる可能性が高いこと、ならびに本抑制作用はカルシニューリン阻害作用によるものでなく、構造の類似するラパマイシンと共通する何らかの薬理作用によることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. **藤井正徳**. 新しい痒み研究のマウスモデル. *アレルギー・免疫* (査読無) 23 (2016) 30-36.
2. **藤井正徳**. ヘアレスマウスにおける食餌誘発アトピー性皮膚炎の発症要因の解明. *YAKUGAKU ZASSHI* (査読有) 137 (2017) 49-54.
3. **藤井正徳**. 飲酒と痒み. *Visual Dermatology* (査読無) 16 (2017) 1089.
4. **Masanori Fujii**, Chie Ohyanagi, Naomi Kawaguchi, Hiroyuki Matsuda, Yoshitaka Miyamoto, Susumu Ohya, Takeshi Nabe. Eicosapentaenoic acid ethyl ester ameliorates atopic dermatitis-like symptoms in special diet-fed hairless mice, partly by restoring covalently bound ceramides in the stratum corneum. *Exp Dermatol* (査読有) 27 (2018) 837-840. DOI: 10.1111/exd.13507
5. Taylor Follansbee, Tasuku Akiyama, **Masanori Fujii**, Auva Davoodi, Masaki Nagamine, Mirela Iodi Carstens, Earl Carstens. Effects of pruritogens and algogens on rostral ventromedial medullary (RVM) ON and OFF cells. *J Neurophysiol* (査読有) 120 (2018) 2156-2163. DOI: 10.1152/jn.00208.2018
6. **Masanori Fujii**, Kaori Takeuchi, Yuna Umehara, Masafumi Takeuchi, Takanori Nakayama, Sayaka Ohgami, Erika Asano, Takeshi Nabe, Susumu Ohya. Barbiturates enhance itch-associated scratching in atopic dermatitis mice: A possible clue to understanding nocturnal pruritus in atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol* (査読有) 836 (2018) 57-66. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.08.018
7. **Masanori Fujii**, Sayaka Ohgami, Erika Asano, Takanori Nakayama, Takahiro Toda, Takeshi Nabe, Susumu Ohya. Brain allopregnanolone induces marked scratching behaviour in diet-induced atopic dermatitis mouse model. *Sci Rep* (査読有) 9 (2019) 2364. DOI: 10.1038/s41598-019-38858-3

[学会発表] (計 2 1 件)

1. 橋本みさき、橋本崇史、大塚悠伽、高見章帆、大矢 進、**藤井正徳**. 新規アトピー性掻痒マウスモデルの開発. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016.6. (東京)
2. 大塚悠伽、高見章帆、橋本みさき、大矢 進、**藤井正徳**. 自動掻痒解析装置を用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスの掻痒様行動の解析. 第 129 回日本薬理学会近畿部会. 2016.6. (広島)
3. 梅原祐奈、竹内雅史、大神彩佳、浅野絵里香、大矢 進、**藤井正徳**. アトピー性皮膚炎モデルマウスのバルビツール酸系薬誘発掻痒様行動の増加における GABA_A 受容体と AMPA 受容体の関与. 第 129 回日本薬理学会近畿部会. 2016.6. (広島)
4. 安井悠真、渡辺保志、大矢 進、**藤井正徳**. C57BL/6 マウスを用いた慢性掻痒モデルの確立. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017. 2017.8. (京都)
5. 小林周平、山田由芽香、松井利江子、大矢 進、**藤井正徳**. アトピー性皮膚炎マウス由来表皮細胞における TSLP 過剰産生機構の解析. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017. 2017.8. (京都)
6. Mirela Iodi Carstens, Taylor Follansbee, Earl Carstens, Tasuku Akiyama, **Masanori Fujii**, A.Davoodi, M. Nagamine. Effects of pruritogens and algogens on rostral ventromedial medullary (RVM) ON and OFF cells. 9th World Congress on Itch. 2017.10. (Wroclaw, Poland)
7. **Masanori Fujii**, Taylor Follansbee, Yuma Yasui, Susumu Ohya, Mirela Iodi Carstens, Earl Carstens. Optogenetic activation of serotonergic (5-HT) neurons in the rostral ventromedial medulla (RVM) facilitates touch-evoked scratching in a diet-induced chronic dry skin mouse model. 9th World Congress on Itch. 2017.10. (Wroclaw, Poland)
8. **藤井正徳**、梅原祐奈、竹内雅史、大矢 進. アトピー性皮膚炎マウスの phenobarbital 誘発掻痒行動における脳内 AMPA 受容体の関与. 第 27 回国際痒みシンポジウム. 2017.11.(東京)
9. **藤井正徳**、浅野絵里香、大神彩佳、美淋都子、渡辺保志、大矢 進. アトピー性皮膚炎モデルマウスの掻痒様行動における allopregnanolone の関与. 第 132 回日本薬理学会近畿部会. 2017.11. (大阪)
10. 安井悠真、渡辺保志、櫻井千浩、中嶋雅幸、大矢 進、**藤井正徳**. C57BL/6 マウスを用いた慢性掻痒モデルの確立. 第 138 回日本薬学会年会. 2018.3. (石川)
11. 小林周平、鬼頭宏彰、大矢 進、**藤井正徳**. アトピー性皮膚炎モデルマウス由来表皮細胞における TSLP 過剰産生機構の解析. 第 138 回日本薬学会年会. 2018.3. (石川)
12. 中嶋雅幸、櫻井千浩、橋本みさき、松本芳樹、大矢 進、**藤井正徳**. 慢性・重度の掻痒様行動を呈するアトピー性皮膚炎マウスモデルの病態解析. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会. 2018.6. (千葉)
13. **Masanori Fujii**, Sayaka Ohgami, Erika Asano, Susumu Ohya. Brain allopregnanolone is involved in itch-associated scratching in atopic dermatitis mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2018.7. (Kyoto, Japan)
14. Shuhei Kobayashi, Rieko Matsui, Yumeka Yamada, Hiroaki Kito, Susumu Ohya, **Masanori Fujii**. STIM/Orai-mediated store operated Ca²⁺ entry may contribute to overproduction of TSLP in epidermal cells isolated from atopic dermatitis mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2018.7. (Kyoto, Japan)
15. Yuma Yasui, Hoshi Watanabe, Chihiro Sakurai, Masayuki Nakashima, Susumu Ohya, **Masanori Fujii**. Dietary induction of pruritic atopic skin in C57BL/6 mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2018.7. (Kyoto, Japan)
16. **藤井正徳**、安井悠真、田中智之. C57BL/6 マウスを用いた飼料誘発慢性掻痒モデル. 第 28 回国際痒みシンポジウム. 2018.9. (東京)
17. **藤井正徳**、今堀翔太、田中智之. タクロリムスによる痒み抑制メカニズム. 第 134 回日本

薬理学会近畿部会. 2018.11. (兵庫)

18. 岡 真純、田中智之、**藤井正徳**. ヘアレスマウスにおける慢性アトピー性皮膚炎に伴う掻痒行動の特性. 第 92 回日本薬理学会年会. 2019.3. (大阪)
19. 宮川亮祐、田中智之、**藤井正徳**. -リノレン酸の塗布はヘアレスマウスにおけるアトピー性皮膚炎を寛解させる. 第 92 回日本薬理学会年会. 2019.3. (大阪)
20. 足立雅浩、田中智之、**藤井正徳**. エイコサペンタエン酸エチルはアトピー性皮膚炎マウスにおける皮膚バリア機能低下を改善する. 日本薬学会第 139 年会. 2019.3. (千葉)
21. 藤井喬子、田中智之、**藤井正徳**. アトピー性皮膚炎マウスにおけるタクロリムスの痒み抑制メカニズム. 日本薬学会第 139 年会. 2019.3. (千葉)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

京都薬科大学 病態薬科学系 薬理学分野 ホームページ

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井正徳 (FUJII, Masanori)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：4043466

(2) 研究分担者

大矢 進 (OHYA, Susumu)

京都薬科大学・薬学部・教授 (現所属：名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授)

研究者番号：70275147