

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08355

研究課題名(和文) 抗かゆみ薬の探索を目的とする新規アッセイ法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of assay systems for searching antipruritic drug.

研究代表者

奥 尚枝 (Oku, Hisae)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：90281518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の様な重篤かつ難治性のかゆみに用いる治療薬の開発を目的として、かゆみの悪化因子として知られるストレスや血流の滞りに関連したモデルマウスにおけるかゆみの増悪化メカニズムの解析を行った。本かゆみにはセロトニンおよびオピオイド μ レセプターが関与していることを明らかにした。また、かゆみ過敏を示したマウスの胸腺で特異的に発現している機能性タンパク質を同定し、これらが新たな治療標的因子となる可能性を示した。さらに、抑制物質探索のためのシーズとなる植物の探索および活性物質の単離を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、難治性のかゆみへの新たな治療標的分子の発見に繋がる。さらに、itchy skinでの複雑な痒みを直接指標とした in vivo アッセイ法による天然資源からの痒み抑制物質の探索は、強い痒みを伴う皮膚疾患の治療に不可欠な新しい抗かゆみ薬の開発を可能にする。また、本成果は、難治性かゆみのメカニズムを解明し、高齢化や生活習慣の欧米化に伴い増加する老人性掻痒症、糖尿病による透析、高脂血症やストレスにより多発する全身掻痒症の治療にも発展可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the precipitating mechanisms of itches with respect to blood stasis and stress, which are known as the exacerbating factors of itch, in originally mouse model to develop a therapeutic drug for treating severe and intractable itching such as that because of atopic dermatitis. Serotonin and the opioid μ receptor are involved in this pruritus. In addition, we identified the functional proteins present in the thymus of mice having itch-sensitive skin and proved that these functional proteins could be the new therapeutic target factors. Furthermore, we screened the antipruritic activity of several natural sources and found new seeds and isolated the successively active flavones.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗かゆみ物質 天然資源 アッセイ法 淤血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「痒み(かゆみ)」はアレルギーやアトピー性皮膚炎はもとより、高齢化や生活習慣の欧米化に伴い増加する老人性掻痒症、糖尿病性腎症による透析や高脂血症、ストレスによる全身掻痒症などの多くの疾患において、重大かつ深刻な症状である。昼夜を問わない痒みは患者にとって耐え難い苦しみであるだけでなく、患者自身が患部を繰り返し掻き破る(掻破)ことで病態の悪化や難治化がおこることから、抑制薬の開発は極めて重要な課題である。抗ヒスタミン薬が効かない難治性のかゆみ患者の皮膚では、かゆみ過敏が生じ、健常な皮膚とは異なる起痒メカニズムがあることが指摘されている。^{1,2)}しかし、末梢および中枢での複数の病態や因子が相互に複雑に関連して生じる重篤なかゆみのメカニズムは未だ明らかでないことから、有効な治療薬は無い。^{1,2)}そして、これらの重篤で難治性の痒みへの抑制物質を天然資源から探索するには、作用を評価するための優れた病態モデルと、かゆみを総合的に評価するための *in vivo* アッセイ法の開発が不可欠である。申請者らは、これまでの科研費補助金により、一過性および慢性痒みモデルマウスと、それらマウスの後ろ足による皮膚への引っ掻き動作(=かゆみ応答反応)³⁾を指標にした *in vivo* アッセイ法を確立し、起痒メカニズムの解析および天然資源からの抑制物質の探索を行ってきた。⁴⁻¹¹⁾さらに、前回では、独自に開発した(漢方で種々の病因とされる)瘀血(末梢血液循環不全)モデルマウス¹²⁾に誘導する慢性痒みと健常皮膚マウスに誘導する一過性かゆみへのストレス負荷の影響を比較検討した。その結果、「瘀血病態の慢性かゆみモデルマウス」のみに、ヒトの itchy skin と同様の「ストレスによるかゆみの増悪化現象」が起きることを見出し、本モデルを応用した「瘀血とストレスの併発による難治性の痒みモデル」と、その引っ掻き動作を指標としたアッセイ法の作製に着手した。

ストレスが血液循環を妨げ、身体に様々な影響を及ぼすことは知られている。さらに、漢方では、瘀血(古い血の滞り)が難治性痒みの一因と考えられている。しかし、かゆみの難治化と瘀血およびストレスとの関連、そのメカニズムを科学的に実証あるいは解明した例はまだ無い。そこで、今回は、本瘀血モデルマウスを駆使し、「かゆみの難治化-瘀血-ストレス」の関連に着目して、itchy skin におけるかゆみの増悪・難治化メカニズムの解析を行うことで、独創的な治療標的分子の探索および天然資源からの抑制物質の探索を目指す。

2. 研究の目的

- (1) 瘀血とストレスを併発した難治性かゆみモデルを用いた関連因子の解析、および本モデルで探索可能な活性物質の位置づけ。
- (2) アジュバントの種類による瘀血病態と起痒作用の違いと、そのメカニズム。
- (3) かゆみ刺激への反応性の違いに着目したかゆみ増悪化因子の解析、および新たな治療標的因子の探索。
- (4) 構築したアッセイ法を用いた天然資源からのかゆみ抑制物質の探索。

3. 研究の方法

- (1) 瘀血とストレスを併発した難治性かゆみモデルを用いた関連因子の解析、および本モデルで探索可能な活性物質の位置づけ。

先の本補助金により確立した「瘀血とストレスを併発した難治性かゆみモデル」に下記の阻害剤を適用し、本モデルにおけるかゆみ関連因子を解析した。

難治性かゆみモデルの作製:5週齢の ddY 雄性マウスに、卵白リゾチーム(HEL) 12.5 μg を 50% フロインドコンプリートアジュバント溶液 50 μL に懸濁して調製した溶液を 50 μL/head 腹腔内

投与して感作する(0日目)。感作後、図2のスケジュールに従い、空気穴を開けた50mLの遠心チューブ(内径2.8cm×長さ11.2cm)内にマウスを1日90分間拘束してストレスを負荷した。痒み惹起と測定方法:8日目に、肥満細胞の脱顆粒惹起剤のcompound 48/80 (COM, 2 mg/kg, s.c.)を投与し、マウスが後ろ足で注射部位を引っ掻く回数を30分間計測した。引っ掻き動作の計測は無人下で撮影したビデオ(FULL HD, Panasonic)動画の再生,または次世代型擦過行動定量化システム(SCLABA^R-Real, NOVELTEC)を用いて行った。

試験物質と投与方法:血液凝固改善薬のアスピリン(5 mg/kg, p.o.)を図2aのスケジュールで、オピオイド拮抗薬であるナロキソン(5 mg/kg, i.p.),セロトニン拮抗薬であるケタンセリン(10 mg/kg, i.p.),および神経型一酸化窒素の選択的阻害薬である7-ニトロインダール(7-NI, 5 mg/kg, i.p.)を投与し、抑制効果を評価した。

図2a

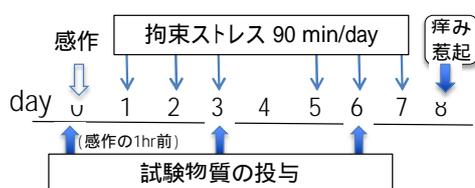


図2b



(2) アジュバントの種類による瘀血病態と起痒作用の違いと、そのメカニズム

下記2種類のHEL感作液を用いてマウスを感作(50μL/head, i.p.)し、①~③を行った。

- ・HEL50 μgを50%フロイドコンプリートアジュバント(CFA)溶液50 μLに懸濁
- ・HEL50 μgを50%フロイドインコンプリートアジュバント(IFA)溶液に懸濁

かゆみの測定:9日目にCOM(2 mg/kg, i.p.)を投与し、引っ掻き動作を20分間計測した。

末梢血流量の測定:前報⁷⁾と同様に、マウスの尻尾の静脈微小循環系の血流量を、接触型レーザー血流計を用いて9日間モニターした。

無処置および感作から1,3,6,9日目のマウスの全血をイソフルラン麻酔下で眼底静脈叢より採血して得た血清中のTNF- α およびIL-5をコスモバイオ社のELISA kitを用いて測定した。

(3) かゆみ刺激への反応性の違いに着目したかゆみ増悪化因子の解析、および新たな治療標的因子の探索

同じかゆみ刺激に対し、激しい引っ掻き動作を示す「かゆみに過敏なマウス」と、逆に引っ掻き動作をほとんど示さない「かゆみに鈍感なマウス」の胸腺での発現タンパク質の差異を解析することで、新たな治療標的因子の探索を行った。

かゆみ刺激への反応性の違いによるマウスの選別: ddY系雄性マウスにCOM(2 mg/kg)を皮下投与し、各マウスの掻動作回数を30分間測定した。同じマウスを用いて10-14日間隔で3回のかゆみ実験を繰り返し、かゆみ刺激に対し、3回とも他に比べて過剰な掻動作回数を示す鋭敏なマウスと、あまり掻かない鈍感なマウスをそれぞれ3匹ずつ選別した。

かゆみ過敏に関連する肥満細胞内のタンパク質分子の解析: かゆみ刺激に対し鋭敏または鈍感なマウスからそれぞれ胸腺を摘出後、常法により可溶性タンパク質画分を調製し、ショットガン解析(一般財団法人化学物質評価機構に依頼)を行った。

(4) 構築したアッセイ法を用いた天然資源からのかゆみ抑制物質の探索

最初に、民間あるいは漢方で関連疾患への適用が伝承されている天然資源の調査を行った。次に、入手できた下記の植物について、一過性のかゆみ試験法を用いて活性を評価した。さらに、活性を示した資源については、活性を指標に分画およびシリカゲル, Sephadex LH-20 および ODS などの各種カラムクロマトによる精製を繰り返し、化合物の単離および各種スペクトルデータ (IR, MS, NMR など) による構造解析を行った。

一過性のかゆみ試験法：前報¹⁾と同様に ddY 系雄性マウスに、COM (3 mg/kg, s.c.) で惹起した引っ掻き動作回数を 30 分間測定し、コントロールとする。これに対し、COM 投与の 1 時間前にエキス (200 mg/kg) を経口投与した場合を比較した。

試料の調製：アケビ (*Akebia quinata*) の花部, ジンチョウゲ (*Daphne odora*) の花部, イヌタデ (*Polygonum longisetum*) の地上部, ヘデラヘリックス (*Hedera helix*) の葉部, ハゼノキ (*Rhus succedanea*) の地上部からメタノールエキスを作製して試験に用いた。

4. 研究成果

(1) 瘀血とストレスを併発した難治性かゆみモデルを用いた関連因子の解析, および本法で探索

可能な活性物質の位置づけ

図 3 に示す様に、瘀血とストレスを併発した難治性痒みに対し、ケタンセリンが最も強い抑制効果を示した。また、ナロキソンおよびアスピリンも抑制効果を示したが、7-NI は本モデルでの引っ掻き回数および引っ掻き時間ともに抑制しなかった。従って、本モデルのかゆみにはセロトニン受容体の関与が大きいこと、さらに μ 受容体も関与すること、その一方で、神経由来の NO は関与しないことが示唆された。今後は、本モデルの瘀血病態に関する eNOS および iNOS 由来の NO⁸⁾ とかゆみの関連についても検討する予定である。

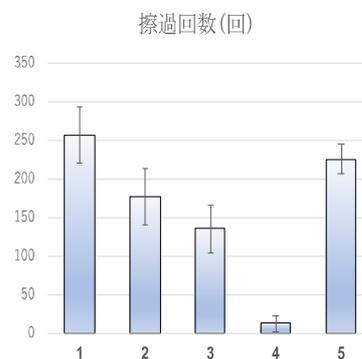


図 3 各種阻害剤の抗痒み効果

1: コントロール, 2: アスピリン, 3: ナロキソン, 4: ケタンセリン, 5: 7-NI

(2) アジュバントの種類による瘀血病態と起痒作用の違いと、そのメカニズム

アジュバントの違いによる末梢血流量の低下作用においては、CFA および IFA とともに、無処置群と比べて有意な血流量低下を示したが、CFA と IFA による差はみられなかった。一方、起痒作用については、図 4 に示す様に、CFA および IFA とともに感作により COM の起痒作用を強めること、さらに IFA の方がより増強効果があることが明らかとなった。

CFA および IFA の違いによる感作後の免疫細胞の活性化を検討したところ、CFA の場合、感作の 24hr 後に Th1 細胞の活性化を示す IFN- γ の濃度が有意に低下し、その後は平常値に回復したが、IFA の場合は目立った変化は見られなかった。また、CFA の場合、Th2 細胞の活性化を示す IL-5 の濃度が 24hr 後に増加し、9 日目まで高い値を示したが、IFA の場合は感作後緩やかに増加した。一般的に、CFA は Th1 細胞を活性化するアジュバントとされているが、本モデルにおいては Th1 細胞ではなく、むしろ Th2 細胞を活性化することが示唆される。また、本モデ

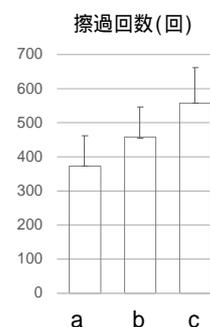


図 4 アジュバントの違いによる起痒作用の違い
a: 無処置, b: CFA, c: IFA

ルにおけるかゆみの増強への免疫細胞の関与は少ない可能性も示唆された。

(3) かゆみ刺激への反応性の違いに着目したかゆみ増悪化因子の解析、および新たな治療標的因子の探索。

同じマウスに痒みの惹起試験を 3 回繰り返した結果、激しい搔動作回数（全マウスの平均搔動作回数の 2~3 倍の高い値）を示した鋭敏なマウスと、平均値の 30%未滿の搔動作回数を示した鈍感なマウスがそれぞれ 3%程度存在した。そこで、鋭敏および鈍感なマウスを各 3 匹選別し、前報の肥満細胞に引き続いて、両マウスの胸腺での発現タンパク質の差異を解析した。その結果、過敏なマウスでは alpha 1-antitrypsin-1, serine protease inhibitor A3N, ketatin, type II, T-complex protein-1 subunit eta, および plastin-1 など 50 種のタンパク質の特徴的な発現を認めた。一方、鈍感なマウスでは、先の肥満細胞と同様の coronin や annexin を含む alpha 1-antiproteinase, profilin-1, carbonic anhydrase 3 および malate dehydrogenase, mitochondrial など 23 種の特徴的な発現を認めた。現在、これらのタンパク質について治療標的分子としての可能性を検討中である。

(4) 構築したアッセイ法を用いた天然資源からのかゆみ抑制物質の探索

民間あるいは漢方で痒み関連疾患への適用が伝承されている天然資源について活性の評価を行った結果、民間で虫刺されや炎症に用いられるイヌタデの地上部、中薬で根や根皮が喘息に用いられるハゼノキの地上部、民間で皮膚病や喘息の治療に用いられるヘデラヘリックスの葉部が有意な抗かゆみ活性を見出した。一方で、中薬で鎮痛、消炎に用いられるジンチョウゲの花や、日局で茎や果実は利尿や消炎に使用されるアケビの花部については抗かゆみ活性がなかった。また、中薬で感冒や発熱に用いられるヤハズソウの抗かゆみ活性は弱かったが、強い駆瘀血活性を示した。

イヌタデからは quercetin 3-O-β-D-xylopyraosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranoside を、また、ヤハズソウからは apigenin, luteolin, soviteixin, 8-C-p-hydroxy-benzylisoviteixin, vicenin-3, vicenin-1, apigenin 6-C-β-D-xyloside-8-C-β-L-arabinoside および rhoifolin を単離精製し、構造解析を行った。現在、瘀血とストレスを併発した難治性かゆみモデルでのかゆみ抑制活性を評価中である。一方、ハゼノキおよびヘデラヘリックスについてはトリテルペン誘導體と推定される活性物質の単離を継続中である。

【引用文献】

- (1) Inagaki N. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1227 (2013).
- (2) Ikoma et al., *Pain*, **126**, 16 (2006).
- (3) Kuraishi Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **275**, 229 (1995).
- (4) Ishiguro K., *FFI Journal*, **209**, 13 (2004).
- (5) Oku H. et al., *Phytothera. Res.*, **11**, 343 (1997).
- (6) Oku H. et al., *Phytothera. Res.*, **15**, 506 (2001).
- (7) Ishiguro K. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1490 (2005).
- (8) Oku H. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1324 (2007).
- (9) Ishiguro K. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1655 (2002).
- (10) Oku H. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1031 (2003).
- (11) Oku H. et al., *Planta Med.*, **74**, 973 (2008).
- (12) Iwaoka E., *J. Trad. Med.*, **26**, 97 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Chao Ma, Naoko Higashi, Kyoko Ishiguro, Ying Zhao, Linkui Zhang, Chenwen Zhao, Maosheng Cheng, Hisae Oku	4. 巻 72
2. 論文標題 Allergy-preventive Effects of Linarinic Acid and Its Tetrahydropyrrolo[2,1-b]quinazoline Derivatives Isolated from <i>Linaria vulgaris</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 582-587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-018-1187-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hisae Oku, Fumika Kitagawa, Nyui Aoki, Kana Shimomura, Kyoko Ishiguro.	4. 巻 85
2. 論文標題 Antipruritic effects of the aerial part of <i>Oxalis corniculata</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Planta Medica	6. 最初と最後の頁 1515-1515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0039-3399963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hisae Oku, Emiko Iwaoka, Megumi Shinga, Erika Yamamoto, Munekazu Iinuma, Kyoko Ishiguro	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of the Dried Flowers of <i>Campsis grandiflora</i> on Stagnant Blood Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X19873445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hisae Oku, Maki Maeda, Fumika Kitagawa and Kyoko Ishiguro	4. 巻 67
2. 論文標題 Effect of polyphenols from <i>Syringa vulgaris</i> on blood stasis syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 田近 椋, 小西茉由, 青木朱衣, 下村花奈1 山本依理加, 石黒京子, 重松 了, 奥 尚枝
2. 発表標題 薬用資源の超高压処理を応用した新機能探索 キンシバイ (<i>Hypericum patulum</i>) 花弁について(第2報) -
3. 学会等名 68回日本薬学会近畿支部総会・大会.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisae Oku, Chao Ma, Naoko Higashi, Ying Zhao, Linkui Zhang, Chenwen Zhao, Maosheng Cheng, Kyoko Ishiguro
2. 発表標題 Allergy-preventive Effects of Linarinic Acid and Its Tetrahydropyrrolo[2,1-b]quinazoline Derivatives Isolated from <i>Linaria vulgaris</i>
3. 学会等名 2018 China-Japan Symposium on Molecular Drug Design and Development (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisae Oku, Toru Shigematsu, Kyoko Ishiguro
2. 発表標題 Effect of high hydrostatic pressure treatment on medicinal resources - petals of <i>Hypericum patulum</i> -
3. 学会等名 66th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) jointly with the 11th Shanghai TCM conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥尚枝、東奈生子、北川史夏、横山麻利子、石黒京子
2. 発表標題 マウスマスト細胞における痒み過敏因子の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東奈生子, 奥尚枝, 重松亨, 石黒京子
2. 発表標題 薬用資源の超高压処理を応用した新機能探索 - キンシバイ (<i>Hypericum patulum</i>) の花卉 -
3. 学会等名 日本生薬学会第64回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北川史夏、下村花奈、東奈生子、奥尚枝
2. 発表標題 抗かゆみ物質の探索を目的としたアッセイ法の開発と応用ー増悪化因子についてー
3. 学会等名 第65回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木朱衣、牧野優里、佐々木千波、北川史夏、奥尚枝
2. 発表標題 ヤハズソウ (<i>Kummerowia striata</i>) 地上部の末梢血流改善効果の評価および活性成分の探索
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisae Oku, Fumika Kitagawa, Nyui Aoki, Kana Shimomura, Kyoko Ishiguro.
2. 発表標題 Antipruritic effects of the aerial part of <i>Oxalis corniculata</i>
3. 学会等名 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oku, H., Maeda, M., Kitagawa, F. and Ishiguro K
2. 発表標題 Effect of Polyphenols obtained from the Flowers of Syringa vulgaris on the Stagnant Blood Syndrome
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (ICP H2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木朱衣、牧野優里、佐々木千波、北川史夏、奥尚枝
2. 発表標題 ヤハズソウ(Kummerowia striata)地上部の末梢血流改善効果(2)
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗アレルギー作用を有する温州みかんエキスおよびその製造方法	発明者 宮下知也, 原正臣, 山田静雄, 奥尚枝	権利者 日研フード株式 会社, 静岡県公 立大学法人, 学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-066392	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	本田 千恵 (Honda Chie) (90411983)	武庫川女子大学・薬学部・助教 (34517)	