

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08514

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎に対する抗感覚受容チャネル分子療法の効果の検討

研究課題名(英文) Examination of the effect of ion channel therapy for atopic dermatitis

研究代表者

海藤 俊行 (KAIDOH, Toshiyuki)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：70268837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎(AD)モデルマウスに慢性的皮膚炎を作製して免疫組織化学的に検討したところ、耳介毛包の感覚神経に感覚受容チャネル分子TRPA1の陽性反応を確認できた。次にADの治療薬やTRPA1阻害剤を投与したところ、ステロイドと抗ヒスタミン薬が有効だったが、TRPA1阻害剤にもある程度の炎症改善効果が認められた。このTRPA1阻害剤投与例ではTRPA1の陽性反応が検出できなかった。さらに、TRPA1阻害剤の軟膏と軟膏基剤の投与を比較したところ、ADの治癒率はTRPA1阻害剤の方が高い傾向が認められた。以上より、TRPA1阻害剤はADモデルマウスの慢性皮膚炎に有効な可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎は難治性の皮膚疾患で、有効な治療薬はあるものの完治させるには至っておらず、更なる新薬の開発も期待されている。感覚受容チャネル分子TRPA1は痛み、痒み、冷感などに関与している。本研究はアトピー性皮膚炎モデルマウスで、TRPA1阻害剤の効果を確認したところ、ある程度の治療効果が認められた。今後ヒトのアトピー性皮膚炎への有効性が確認できれば、新規治療薬として活用できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of sensory receptor channel molecule TRPA1 in atopic dermatitis model mice using immunohistochemistry. A positive reaction for TRPA1 was detected in the sensory nerves of the auricular hair follicles. Subsequent topical administration of several therapeutic agents for atopic dermatitis or TRPA1 inhibitors showed that steroids and antihistamines were effective, but TRPA1 inhibitors also showed some improvement in inflammation. In the TRPA1 inhibitor-administered cases, a positive TRPA1 reaction could not be detected. Furthermore, we compared the administration of TRPA1 inhibitor ointment or ointment base. The cure rate for atopic dermatitis was higher in the TRPA1 inhibitor ointment group than in the ointment base group. These results suggest that the TRPA1 inhibitor may be effective for chronic dermatitis in atopic dermatitis model mice.

研究分野：微細形態、解剖学

キーワード：アトピー性皮膚炎 免疫組織化学法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はトランスジェニックマウス(文献)を使用して、アトピー性皮膚炎が進行すると、実際に毛の柵状神経終末で TRPA1 等のチャネル分子が発現してくることを発見した(文献)。アトピー性皮膚炎はアレルゲンへの暴露で掻痒が始まり、その後次第に炎症が増強して著明な皮膚炎を生じて慢性化するが、この進行過程へのチャネル分子の関与を検討することは、アトピー性皮膚炎の慢性的掻痒の分子病態を解明する上で意義がある。

(2) 難治性疾患のアトピー性皮膚炎に対する治療薬としては、本邦ではステロイド系抗炎症薬、タクロリムス免疫抑制薬、抗ヒスタミン薬が単独または併用で使用されている。一般にステロイド薬とタクロリムス薬は免疫反応の抑制によって皮膚炎を改善する作用があり、抗ヒスタミン薬はかゆみの抑制により患部の掻把を防止して皮膚炎の悪化を防ぐのが主要な作用と考えられている。一方、チャネル分子拮抗剤が開発され、感覚刺激によるカルシウムイオンの流入を阻害するが、アトピー性皮膚炎への応用研究は少ない。作用の違うこれらの薬物のうち、どれが本モデルマウスに有効で、チャネル分子に影響があるかを判定することは、アトピー性皮膚炎の慢性的過敏状態に対する薬剤選択・開発に有用な情報になると考えた。

2. 研究の目的

(1) アトピー性皮膚炎は難治性の皮膚疾患で、有効な治療薬はあるものの治りにくい場合も多く、更なる新薬の開発も期待されている。感覚受容チャネル分子 TRPA1 は痛み、痒み、冷感などに関与しており(文献)、本研究はアトピー性皮膚炎モデルマウスで、TRPA1 阻害剤の効果を確認することを目的とした。

(2) また、アトピー性皮膚炎の一般的治療薬(ステロイド系抗炎症薬、タクロリムス免疫抑制薬等)(文献)やチャネル分子阻害剤について治療効果とチャネル分子への抑制効果を検討し、抗感覚受容チャネル分子療法の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アトピー性皮膚炎モデルマウス(雄性 NC ヘアレス)の耳介および背部にジニトロフルオロベンゼンを週に1回、5-6週間塗布して、慢性的な皮膚炎マウスを作製した(文献)。このマウスの耳介毛包に分布する感覚神経(柵状神経終末)で感覚受容チャネル分子 TRPA1 の発現を免疫組織化学的に検討した。マウスは4%ホルムアルデヒド緩衝液による灌流固定を行ったあと、耳介の皮膚を採取して、凍結切片を作製した。毛包と柵状神経終末の横断面が観察できるように、切片は表皮と平行に薄切した。1次抗体としては、TRPA1 に特異的な家兎ポリクロナール抗体を使用し、2次抗体としては、標識ポリマーを利用して高感度・低バックグラウンドに陽性反応を検出した。染色切片の観察は、当初は免疫電子顕微鏡法の併用も考えたが、光学顕微鏡の1000倍観察で十分と判断した。

(2) 次に、このマウスを利用してアトピー性皮膚炎の一般的治療薬やチャネル分子阻害剤の有効性について検討した。投与した薬剤は、ステロイド系抗炎症薬(群ミディアムのプレドニゾロン吉草酸エステル酢酸エステルが無効であったので群ストロンゲストのプロピオン酸クロベタゾールを使用)、タクロリムス免疫抑制薬(TCS5861528)、抗ヒスタミン薬(ジフェンヒドラミン塩酸塩)、TRPA1 チャネル阻害剤(A-967079)である。それぞれの成分を含む軟膏(基剤:ワセリンと流動パラフィン)を皮膚炎部位に1日1回、10日~14日間塗布して、有効性を比較した。上記と同様に耳介皮膚の凍結切片を作製して、免疫組織化学法により TRPA1 の発現の変化を検討した。

(3) さらに、動物数を増やして TRPA1 阻害剤に絞ってアトピー性皮膚炎への治療効果を検討した。方法としては、上記と同様に慢性的な皮膚炎マウスを作製したあと、TRPA1 阻害剤を含む軟膏または軟膏基剤のみの外用投与を1日1回、3週間継続し、皮膚炎に対する治療効果を肉眼的に確認するとともに、免疫組織化学法により TRPA1 の発現を比較検討した。

4. 研究成果

(1) アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚にジニトロフルオロベンゼンを塗布したところ、予定通り慢性的な皮膚炎マウスを作製できた。マウスの耳介毛包に分布する柵状神経終末において、感覚受容チャネル分子の発現を免疫組織化学的に検討した結果、TRPA1 の陽性反応を確認できた。

(2) この実験系を利用してアトピー性皮膚炎の一般的治療薬やチャネル分子阻害剤の有効性について検討した。その結果、ステロイド系抗炎症薬と抗ヒスタミン薬が最も有効であったが、ステロイドには著明な副作用(るい瘦と衰弱)が認められた。TRPA1 阻害剤にはある程度の炎症改善効果があったが、若干の皮膚炎が残っていた。タクロリムスには予想したほどの効果は認めら

れず、有効性は限定的であった。

(3) 次に、TRPA1 の発現の変化を検討したところ、TRPA1 阻害剤を投与したマウスにおいては、検討した範囲では毛包周囲に陽性像が検出できなかった (図 1a)。一方、ステロイド系抗炎症薬では TRPA1 の陽性反応が認められた (図 1b)。タクロリムスおよび抗ヒスタミン薬では、陽性反応はやや減少傾向を呈した。

(4) さらに、TRPA1 阻害剤を含む軟膏または軟膏基剤のみの投与による皮膚炎の治療効果を比較した。その結果、治癒率は TRPA1 阻害剤を加えた方が 80% で、軟膏基剤のみの 50% に比べてアトピー性皮膚炎への治療効果が高い傾向が認められた (図 2a,b)。

(5) 以上の研究結果から、感覚受容チャネル分子 TRPA1 に対する阻害剤は、アトピー性皮膚炎モデルマウスの慢性皮膚炎に対して有効である可能性が示唆された。

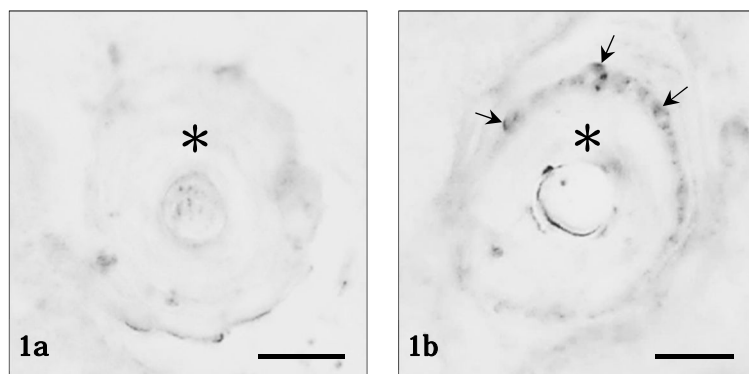


図 1: (a) TRPA1 阻害剤投与後の耳介皮膚では、毛包 (*) の周囲に TRPA1 の陽性像が観察できなかった。(b) ステロイド系抗炎症薬投与後の耳介皮膚では、毛包 (*) の周囲の柵状神経終末に TRPA1 の陽性像が観察された (矢印)。(スケールバー 10 μ m)

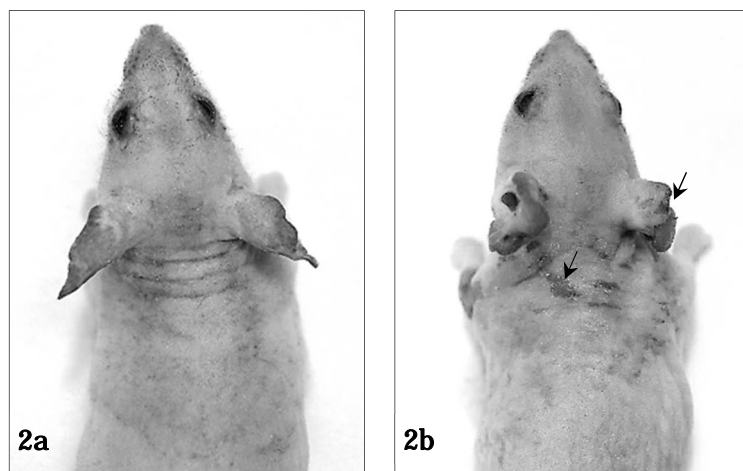


図 2: (a) TRPA1 阻害剤投与で掻痒が改善したマウス。耳介や背部には掻破の痕が認められない。(b) 軟膏基剤のみを投与したマウス。掻痒が十分には改善せず、耳介や背部に掻破の痕が認められる (矢印)。

<引用文献>

Takada T et al. Novel hairless mouse model on an atopic dermatitis-prone genetic background generated by receptor-mediated transgenesis. *Transgenic Res* 2008; 17:1155-62.

Kaidoh T, Kameie T. Expression of ion-channel proteins in the cutaneous mechanoreceptors of mice model of atopic dermatitis. *J Physiol Sci* 2015; 65:S120.

Moore C et al. Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neurosci Bull* 2018; 34:120-142.

アトピー性皮膚炎-よりよい治療のための Evidence-Based Medicine (EBM) とデータ集; 2010 年改訂版

Kim SY et al. Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1477-85.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 海藤俊行
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎の皮膚感覚神経に発現する感覚受容イオンチャネル分子
3. 学会等名 日本顕微鏡学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 海藤俊行
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎の感覚受容イオンチャネル分子と治療薬の効果に関する検討
3. 学会等名 日本解剖学科
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	椋田 崇生 (MUKUDA Takao)	鳥取大学・医学部・准教授 (15101)	
研究協力者	小山 友香 (KOYAMA Yuka)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	