

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390020

研究課題名 (和文) 膜リン脂質代謝物リポキシン A4 のアレルギー性の痒みにおける役割

研究課題名 (英文) The role of the membrane phospholipid metabolite lipoxin A4 in allergic itch

研究代表者

倉石 泰 (KURAIISHI YASUSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号：80111970

研究成果の概要 (和文)：皮膚アレルギーである蚊アレルギーの痒みに膜リン脂質代謝物リポキシン A₄ (LXA₄) が関与することを明らかにした。LXA₄ が感作マウスにのみ痒み様反応を引き起こすことから、感作状態での LXA₄ の作用機序を解析し、LXA₄ 受容体 (LXR) の発現している CD4 陽性 T 細胞に作用し、プロテアーゼの遊離を増加し、これがプロテアーゼ活性化受容体 2 を刺激してアレルギー性の痒みが生じるものと推論した。

研究成果の概要 (英文)：The present study demonstrated that lipoxin A₄ (LXA₄), a mediator derived from membrane phospholipid was involved in the itch of mosquito allergy. Since LXA₄ elicits itch-related response in only sensitized mice, we investigated mechanisms in which LXA₄ causes itch in the sensitized conditions. It was also shown that in sensitized conditions, LXA₄ acted on LXA₄ receptor-expressing CD4⁺ T cells, which may cause the release protease(s) acting on proteinase-activated receptor-2 (PAR2) to cause allergic itch.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：痒み、リポキシン A4、リポキシン A4 受容体、CD4 陽性 T 細胞、5-リポキシゲナーゼ、セリンプロテアーゼ、ランゲルハンス細胞、蚊アレルギー

1. 研究開始当初の背景

(1)厚生労働省の調査によると、平成 15 年度において日本人の約 35%が何らかのアレルギー性の症状を示しており、アレルギーは現代病の一つである。アレルギーで通院する患者

の約 50%は皮膚アレルギーが原因である。難治性のそう痒性皮膚疾患の代表であるアトピー性皮膚炎も、皮膚アレルギーがその基盤にある。皮膚アレルギーの主な症状は紅斑(毛細血管の拡張)、膨疹(毛細血管の透過

性亢進)と痒みである。特に、痒みは、主訴の1つであり、痒みによる搔破が皮膚症状を悪化させる一因となる。したがって、そう痒性皮膚疾患では、痒み(および搔破)の抑制が重要な治療目的の一つとなる。アレルギー性の痒みに対しては、通常、抗ヒスタミン薬(H_1 ヒスタミン受容体遮断薬)が処方されるが、十分な治療効果の得られないことも多い。したがって、新たな鎮痒薬の開発が望まれ、そのためにはアレルギー性の痒みの発生機序の解明が重要である。

(2)痒み研究は、主にヒトで行なわれてきたが、ヒトでは実験的研究は困難を伴うことが多く、痒みの発生機序は不明な点が多い。我々は、1995年に、動物の行動を指標として痒みの評価が可能であることを明確に示し[Kuraishi et al., Eur J Pharmacol, 1995]、様々な痒みの動物モデルの作出と、その利用による痒みの発生機序の研究を行ってきた。その過程で、花粉アレルギーによる粘膜(眼瞼結膜)の痒みには古典的な痒み因子histamineが重要な役割を果たすが、蚊刺しによる皮膚の痒みは、即時型アレルギーの痒みであってもマスト細胞-histamine以外の系が重要であることを明らかにした。

(3)蚊刺を繰り返し受け感作状態にあるマウスでは、蚊刺部位でhistamineを介した血管透過性亢進が観察されるが、痒み様反応は H_1 ヒスタミン受容体拮抗薬で抑制されない[Ohtsuka et al., Jpn J Pharmacol, 2001]。この痒み様反応は、ヒスタミン拮抗薬、セロトニン拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、ロイコトリエン B_4 拮抗薬、システイニル・ロイコトリエン拮抗薬、シクロオキシゲナーゼ阻害薬などでは抑制されないが、5-リポキシゲナーゼ阻害薬と5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質阻害薬で抑制される。これらの結果から、leukotriene B_4 およびシステイニル・ロイコトリエン以外の5-リポキシゲナーゼ代謝物が、蚊アレルギーの痒みに関与する可能性を推測した(図1)。

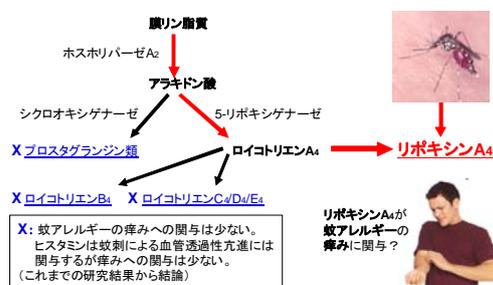


図1. 蚊アレルギーの痒みとアラキドン酸代謝物

2. 研究の目的

(1)アラキドン酸の5-リポキシゲナーゼ代謝物として、leukotriene B_4 、 C_4 、 D_4 、 E_4 以外に lipoxin A_4 (LXA₄) が報告されている[Serhan et al., BBRC, 1984]。LXA₄は、抗炎症作用を有すること以外には、その機能がほとんど知られていない膜リン脂質代謝物である。本研究の第一の目的は、皮膚の即時型アレルギーの痒みのモデルとして、蚊アレルギーの痒みのマウスモデルを用い、LXA₄の痒みへの関与を明らかにすることである(図1)。

(2)次に、皮膚の即時型アレルギーの痒みに関与するLXA₄の産生細胞を明らかにする。

(3)また、LXA₄を介した痒みの発生機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)実験動物: 雄性 ICR 系マウスを用いた。一部の試験では、transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 受容体を発現する一次感覚神経を変性させるために、マウスの生後2日および5日目に capsaicin を投与した。

(2)蚊唾液腺抽出物(ESGM)の作製と感作: 雌性成虫ヒトスジシマカ(*Aedes albopictus*)を凍死させ、顕微鏡下に、胸部のみを単離した。蒸留水中で摘出組織をホモジナイズし、遠心後、上清をフィルターに通した。抽出物は凍結乾燥して保存し、用時生理食塩水に溶解した。感作の目的で、ESGMを10 μ g/50 μ lでマウス尾側背部に週2回、計8回皮内注射した。

(3)行動実験: マウス吻側背部の毛を実験前日に除毛した。実験当日、行動観察1時間前にマウスを行動観察用ケージ(13 \times 9 \times 40 cm)に1時間入れ、撮影環境に馴れさせた。前日に除毛しておいた吻側背部にアレルギーESGMを皮内注射し、直ちに観察用ケージにマウスを戻し行動をビデオ撮影した。行動の撮影は無人環境下に行い、ビデオの再生により、後肢による注射部位近傍への搔き動作(痒み関連動作)の回数をカウントした。搔き動作回数は、マウスが後肢を挙げて、降ろすまでの一連の動作を搔き動作の1回としてカウントした。

(4)Enzyme immunoassay (EIA)法: 実験前日に除毛しておいたマウス吻側背部皮膚にESGMを皮内注射し、5分後に注射部皮膚を摘出した。エタノール中でホモジナイズし、遠心後、上清を採取した。定法に従い Sep-Pack[®] C18 カラムを用い脂質画分を抽出した。LXA₄は、EIA kit (Oxford Biomedical Research)

を用いて測定した。

(5)免疫組織化学染色：麻酔下にマウスをリン酸緩衝液 (PBS) で脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) で灌流固定した。皮膚あるいは脊髄を摘出後、凍結切片を作製した。一部の実験では、単離した細胞を PFA で固定したものを用いた。試料は、ブロッキング後、標的タンパクの1次抗体と4°Cで一晩反応させた。PBST (0.2%Tween20 含有 PBS) で洗浄後、2次抗体である Cy3 標識抗ラット IgG ポリクローナル抗体 (Chemicon) と反応させ、洗浄後、封入した。一部の実験では1次抗体とともにビオチン化 isolectin B4 と反応させ、蛍光標識した2次抗体とともに fluorescein avidin D を同時に作用させた。標本は、共焦点/多光子レーザー走査顕微鏡 (Radiance 2100 MP) を用いて観察した。

(6)ウエスタンブロッティング：麻酔下にマウスを PBS で脱血し、組織、主に皮膚と後根神経節 (DRG) を摘出した。実験に用いるまで-80°Cで保存した。摘出した組織に溶解緩衝液を加えてホモジナイズした。ホモジナイズした試料を遠心分離後、上清を採取した。上清中のタンパク量はタンパク分析緩衝液 (Bio-Rad) を用いて定量した。その後、試料緩衝液を加えて95°Cで5分間処理した。試料を sodium dodecylsulfate ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて分離し、Immuno BlotTM PVDF 膜 (Bio-rad) に転写した。スキムミルク溶液でブロッキングを行い、一次抗体と4°Cで1晩反応させた。0.1% Tween 20 含有 Tris-buffered saline (TBS-T) で洗浄後、horseradish peroxidase 結合二次抗体と反応させ、洗浄後、ECLTM 検出試薬 (Amersham Bioscience) と反応させ、X線フィルムへの感光によってシグナルを検出した。定量には NIH Image を用い、データは各試料の β -actin 量で補正した。

(7)CD4 陽性 T 細胞単離：麻酔下にマウスを PBS で脱血し、皮膚を摘出した。摘出した皮膚は、0.25% collagenase および EDTA で処理し細胞を単離した。リンパ球を Lympholyte[®]-M (CEDERLANE) を用いて分離し、続いて、CD4 カラムキット (RD system) で CD4 陽性 T 細胞を単離した。細胞は、2-mercaptethanol 含有 RPMI-1640 培地で培養した。

(8)樹状細胞の単離：上記と同様に皮膚から単離した細胞を40 μ m メッシュに通し、遠心分離した。その後、コラーゲンコーティングディッシュで培養した。非接着細胞を採取し、Ficoll-Paque (AmershamBioscience) で分離し、中間層の細胞を、2-mercaptethanol 含有 RPMI-1640 培地で培養した。

(9)mRNA の測定：一定数の細胞を proteionase K と DNase I で処理し、逆転写酵素 reverse transcriptase (RT) reverscript III および dNTP を加え、逆転写反応を行なった。この RT 産物に標的遺伝子に対する一対のプライマーおよび Taq DNA polymerase を含む反応液を加え polymerase chain reaction (PCR) を行なった。使用したプライマーは次の通りである。

GAPDH (sense) :

5'-ccaaggtcatccatgacaac-3' ;

GAPDH (anti-sense) ;

5'-ttactccttgaggccacgt-3' ;

LXA₄ 受容体 (sense) :

5'-ctccatcactttctctcttg -3' ;

LXA₄ 受容体 (anti-sense) :

5'-tcccctctagcatctctaac-3'

(9) LXA₄ 受容体 (LXR) のノックダウン : Invitrogen (Carlsbad) で設計及び合成された LXR に対する small interfering RNA (siRNA) を使用した。コントロールとして scrambled siRNA (Invitrogen) を用いた。導入試薬である GenomeOneR-Neo (石原産業) を説明書に従って使用し、実験開始前日に細胞へ作用させた。

(10)セリンプロテアーゼ活性測定：マウス吻側背部の皮膚に刺入した透析チューブの灌流により回収した試料、およびマウスの皮膚をホモジナイズして作製した試料を、酵素基質 N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide acetate salt と反応させ、その代謝産物の量を420 nm における吸光度で測定することによってセリンプロテアーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1)蚊アレルギーの痒み様反応：各週2回ESGMを注射する処置を4週間行い感作したマウスに ESGM を吻側背部に皮内注射すると、明らかな掻き動作 (痒み様反応) を引き起こした (図2)。この掻き動作は、注射後10分以内が最大であり、50分後にはほぼ消失した (図2)。非感作マウスでは ESGM 注射による明らかな掻き動作は引き起こされなかった (図2)。

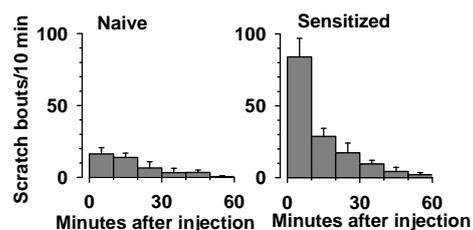


図2. 感作マウスへの蚊唾液腺抽出物注射による痒み様反応

(2)蚊アレルギーの痒みへの LXA₄ の関与：感作マウスへの ESGM 注射で誘発される掻き動作が、5-lipoxygenase 阻害薬 zileuton 及び LXR 拮抗薬 N-t-butoxycarbonyl-Met-Leu-Phe (Boc-1) の腹腔内注射により抑制された。また、ESGM 注射部位局所への Boc-1 注射によっても抑制された (図 3)。

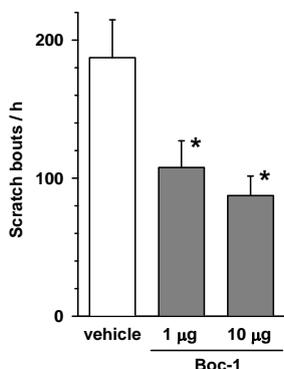


図 3. 蚊アレルギーによる痒み様反応の LXA₄ 受容体拮抗薬 Boc-1 による抑制

非感作マウスに LXA₄ を皮内注射しても掻き動作増加することはないが、感作マウスに LXA₄ を皮内注射することにより掻き動作が引き起こされた (図 4)。その用量反応関係は 100pmol/site で最大となるベル型を示した。

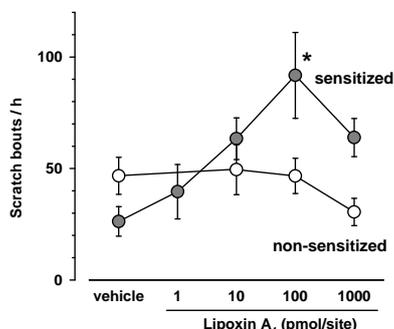


図 4. LXA₄ の皮内注射による掻き動作

非感作マウスに ESGM を皮内注射しても皮膚内の LXA₄ 濃度に変化はなかったが、感作マウスに ESGM を皮内注射すると、注射部位とその周辺の皮膚で LXA₄ の濃度が増加した。この増加は、5-lipoxygenase 阻害薬 zileuton によって抑制された。

LXR タンパクは、感作マウスの皮膚で発現が認められたが、非感作マウスでは認められなかった。後根神経節 (一次感覚神経の細胞体が存在) では、感作および非感作マウスのいずれでも LXR の発現は殆ど認められなかった。

以上の結果から、蚊アレルギーの痒みにアラキドン酸に 5-lipoxygenase が作用して産

生される脂質性メディエーターの 1 つである LXA₄ が関与することが明らかになった。LXA₄ の皮内注射は、感作マウスでは掻き動作を誘発したが非感作マウスでは誘発しなかった。また、LXR の発現が感作マウス皮膚でのみ認められた。以上の結果から、痒み発生に関与する LXA₄ の作用点 (LXR) が感作状態の皮膚で発現誘導されるか、あるいは LXR を発現した細胞が感作状態の皮膚に浸潤している可能性が推測された。

(3)CD4 陽性 T 細胞の関与：マスト細胞と histamine は蕁麻疹の痒みへの関与が古くから知られている。しかしながら、感作マウスにおける ESGM 誘発の掻き動作は、H₁ ヒスタミン受容体遮断薬およびマスト細胞の欠損で抑制されないことを既に報告した。本研究においても、感作および非感作マウスの皮膚でマスト細胞の分布と数に差異は認められなかった。そこで、LXA₄ が作用する免疫細胞の 1 つである T 細胞に着目して LXA₄ を介した痒みへの関与を解析した。

非感作マウスの皮膚では CD4 陽性 T 細胞は殆ど認められなかったが、ESGM による感作マウスの皮膚では真皮 (特に表皮に近い真皮表層部) に多くの CD4 陽性 T 細胞が観察された。また、皮膚での CD4 タンパク質の発現量は、非感作マウスではほとんど認められなかったが、感作マウスでは顕著な発現の増加が認められた。一方、皮膚における CD8 タンパク質の発現量は感作マウスと非感作マウスでほとんど差異がなかった。

感作マウスの皮膚より単離した CD4 陽性 T 細胞に LXR mRNA が発現していた。感作マウスの皮膚より単離した CD4 陽性 T 細胞を非感作マウスの皮膚に養子移入した後に LXA₄ を皮内注射すると痒み反応 (掻き動作) の増加が認められた。予め LXR の siRNA で処置した CD4 陽性 T 細胞の養子移入では、LXA₄ による掻き動作が認められなかった。また、培養液を投与した対照マウスでは LXA₄ の皮内注射が掻き動作を引き起こさなかった。

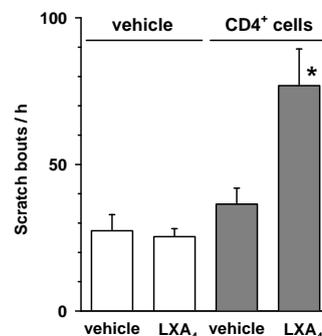


図 5. 感作マウス由来の CD4 陽性 T 細胞の養子移入による LXA₄ 誘発掻き動作発現

以上の結果から、蚊アレルギーによる皮膚の痒みに CD4 陽性 T 細胞が関与し、皮膚で産生された LXA₄ が CD4 陽性 T 細胞に作用して痒み反応を誘発すると示唆される。

(4) セリンプロテアーゼの関与：プロテアーゼが痒みを起こすことは古くから知られていたが、一般にマスト細胞からの histamine 遊離を介して痒みを生じると考えられている。そこで、histamine の皮内注射で掻き動作を示さない系統のマウスにセリンプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) の 4 つのサブタイプ (PAR₁₋₄) に選択的な活性化ペプチドを皮内注射して掻き動作を調べた。その結果、PAR₂ の刺激によってのみ掻き動作が引き起こされることが明らかになった。そこで、LXA₄ が関与する蚊アレルギーの痒みにもセリンプロテアーゼと PAR₂ が介在するか調べた。感作マウスに ESGM を皮内注射して誘発される掻き動作を 2 つのセリンプロテアーゼ阻害薬 nafamostat mesilate と 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride hydrochloride が抑制した。また、感作マウスに ESGM を皮内注射すると皮膚内でのセリンプロテアーゼの遊離が認められた。感作マウスの皮膚では、非感作マウスの皮膚と比べてセリンプロテアーゼの活性が増加していた。

感作マウスに ESGM を皮内注射して誘発される掻き動作が、PAR₂ 拮抗薬 FSLLY-NH₂ および PAR₂ 中和抗体によって抑制された。また、LXA₄ 誘発掻痒反応も PAR₂ 拮抗薬 FSLLY-NH₂ によって抑制された。

以上の結果から、蚊アレルギーの痒みにセリンプロテアーゼと PAR₂ が関与していることが明らかとなった。LXA₄ 誘発痒み様反応が PAR₂ 拮抗薬で抑制されたことと、LXR が CD4 陽性 T 細胞に発現していたことを勘案し、LXA₄ が CD4 陽性 T 細胞に作用してセリンプロテアーゼを遊離することにより痒み反応が起ると示唆される。

(4) 蚊アレルギーの痒みに関与する一次感覚神経：新生仔期に capsaicin を投与して TRPV1 を発現した一次感覚神経を変性させると、感作後に ESGM を皮内注射して引き起こされる掻き動作 (痒み様反応) がほぼ消失した。また、PAR₂ 活性化ペプチドの皮内注射による掻き動作もほぼ消失した。一方、histamine の皮内注射による掻き動作は約 40%抑制された。

感作マウスへの ESGM の皮内注射および健康マウスへの PAR₂ 活性化ペプチドと histamine の皮内注射による脊髄後角での Fos 発現 (活性化神経の指標) の分布を免疫染色法で調べた。ESGM および PAR₂ 活性化ペプチドの皮内注射では脊髄後角の主に第 I 層と第 II 層の外層に Fos 発現が認められたが、

histamine の皮内注射では第 II 層の内層 (isolectin B4 が結合) に主に発現が認められた (図 6)。この結果から、蚊アレルギーと PAR₂ 刺激による感覚情報は共通した一次感覚神経で運ばれ、H₁ ヒスタミン受容体刺激による感覚情報は異なった一次感覚神経により運ばれることを示唆する。

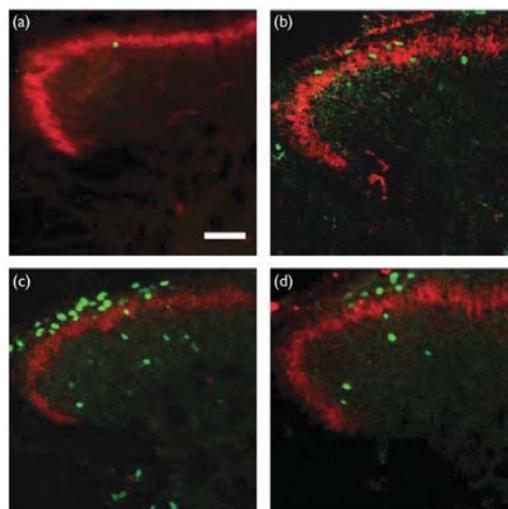


図 6. 皮膚の痒み刺激による脊髄後角における Fos の発現誘導。(a)生理食塩水、(b)RAP2 受容体アゴニスト SLIGRL-NH₂、(c)蚊唾液腺抽出物 (感作マウス)、(d)histamine。赤色は isolectin B4 の結合で第 II 層の内側を示す。

以上の結果から、蚊アレルギーの痒みは皮膚内に遊離したセリンプロテアーゼが TRPV1 受容体を発現した一次求心線維の PAR₂ 受容体を刺激することにより発生し、LXA₄ はセリンプロテアーゼの遊離を増加することにより痒み発生の過程に関与すると結論される。なお、LXA₄ により遊離されるセリンプロテアーゼは特定されていないが、T 細胞はグランザイムなどのプロテアーゼを含有していることからこれらのプロテアーゼが関与するものと推測される。

(5) まとめ

これまで、蚊アレルギーによる痒み反応はマスト細胞—histamine 系が主と考えられてきたが、本研究により、CD4 陽性 T 細胞、LXA₄ および PAR₂ の関与が初めて明らかにした。特に LXA₄ は抗炎症作用を有することが報告されてきたが、今回新たに痒み誘発作用があること、特にアレルギー性の痒みの増強因子としての役割を担っていることを初めて示した。本研究の結果は、LXA₄ が、アレルギー性掻痒に特異的な鎮痒薬 (産生抑制および機能制御) 開発の重要なターゲット分子になり得る可能性を示唆するものである。

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9件)

- ① 安東嗣修、痒みにおけるケラチノサイトの役割、アレルギーの臨床、査読無、Vol. 29、2009、773-776
- ② 安東嗣修、皮膚における痒みのメカニズム、化学と生物、査読無、Vol. 46、2008、753-758
- ③ Tasuku Nakano, Tsugunobu Andoh, Jung-Bum Lee, Yasushi Kuraishi, Different dorsal horn neurons responding to histamine and allergic itch stimuli、Neuroreport、査読有、Vol. 19、2008、723-726
- ④ Tasuku Nakano, Tsugunobu Andoh, Atsushi Sasaki, Hiroshi Nojima, Yasushi Kuraishi, Different roles of capsaicin-sensitive and H1 histamine receptor-expressing sensory neurons in itch of mosquito allergy in mice、Acta Dermato-Venereologica、査読有、Vol. 88、2008、449-454
- ⑤ Kenichiro Tsujii, Tsugunobu Andoh, Haruna Ui, Jung-Bum Lee, Yasushi Kuraishi, Involvement of tryptase and proteinase-activated receptor-2 in spontaneous itch-associated response in mice with atopy-like dermatitis、J Pharmacol Sci、査読有、Vol. 109、2009、388-395

[学会発表] (計17件)

- ① Tsugunobu Andoh、Animal models and lipid itch mediators、2008 International of Investigative Dermatology、2008年5月13-15日、京都
- ② 中野 祐、皮膚の即時型アレルギーの痒みに関する新規脂質性メディエーター Lipoxin A4、第81回日本薬理学学会年会、2008年3月17-19日、横浜
- ③ 中野 祐、マウスの蚊アレルギー性痒み関連行動における5-リポキシゲナーゼ代謝物の関与、第17回国際痒みシンポジウム、2007年9月15日、大阪
- ④ Tasuku Nakano、Possible involvement of lipoxin A4 in itch-associated response of mosquito allergy in mice、4th International workshop for the study of itch、2007年9月9-11日、サンフランシスコ、米国

[図書] (計1件)

- ① 安東嗣修、他、朝倉出版、炎症・再生医学

事典、2009、pp. 338-340

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

(1)
名称：アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用
発明者：安東 嗣修，倉石 泰，中野 祐
権利者：富山大学 (代表者 西頭 徳三)
種類：特願
番号：2007-330025
出願年月日：2007年12月12日
国内外の別：国内

(2)
名称：アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用
発明者：安東 嗣修，倉石 泰，中野 祐
権利者：富山大学 (代表者 西頭 徳三)
種類：特願
番号：PCT/JP2008/73175
出願年月日：2008年12月21日
国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉石 泰 (KURAIISHI YASUSHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
応用薬理学
研究者番号：80111970

(2) 研究分担者

安東 嗣修 (ANDOH TSUGUNOBU)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
応用薬理学
研究者番号：50333498

(3) 協力研究者

中野 祐 (NAKANO TASUKU)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
応用薬理学