

平成 22 年 2 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591304

研究課題名（和文） 皮膚における artemin の発現機構とその分子生理学的役割の検討

研究課題名（英文） Study of expression and physiological function of ARTEMIN, a family of glial cell line derived neurotrophic factor family, in skin.

研究代表者

室田 浩之 (MURATA HIROYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90363499

研究成果の概要（和文）：本研究では真皮線維芽細胞から神経栄養因子 artemin がサブスタンス P によって誘導されることに着目し、その機能を検証した。Artemin はアトピー性皮膚炎病変部真皮に蓄積しており、皮膚末梢神経伸長に関与するとともに末梢神経の TRPV1 発現増加に貢献することを確認した。TRPV1 はヒスタミン誘導性の痒みに関与するとされるが、実際 artemin の受容体 (GFR α 3) のノックアウトマウスでは compound 48/80 による搔破行動が生じなかった。Artemin はアレルギー炎症と温度知覚過敏性そう痒に関与する分子と考えられ、新しい痒み治療戦略の標的分子としても期待がよせられる。

研究成果の概要（英文）：We focused on de novo synthesis of artemin (ARTN), which is a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor related family, gene transcription in dermal fibroblast after substance P (SP)-stimulation. ARTN was accumulated in dermis of AD skin lesions, while not in that of psoriasis and healthy controls. SP-treated dermal fibroblast-derived artemin can be assumed to contribute to peripheral nerve sprouting. Furthermore, we found that ARTN contributed to development of SP-induced thermal hyperalgesia and compound 48/80-induced itch. From these results, we placed more expectations on ARTN for therapeutic target of intractable itch.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

「痒み」は様々な皮膚疾患で認められる一般的な自覚症状であるにも関わらず、その治療的介入における制御は未だ困難を極める。その理由の一つとして痒みの成因に多種多様な因子が関与することが挙げられる。痒みには大きく中枢神経系が危険信号として感じさせる経路と、皮膚炎にともない中枢神経に痒みを感じさせる経路の二つに分けられる。この2つの経路の発動には様々な起痒物質の関与が知られており、代表的なものとしてヒスタミンが知られる。ヒスタミンは直接H1受容体を介して神経に作用することで痒みを生じさせるが、すべての痒みがヒスタミンで説明できるわけではない。神経終末に由来する神経ペプチド、サブスタンス P(SP)もまた肥満細胞の脱顆粒を生じさせる事や知覚神経過敏を誘発する事で痒みに関与していると考えられているが生体における起痒物質としての確証は未だ得られていない。SP受容体であるNK1受容体は真皮線維芽細胞をはじめとする皮膚を構成する様々な細胞に発現している。SPが線維芽細胞に与える影響を網羅的に解析するためにマイクロアレイによる検討を行ったところGDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) familyの一つarteminがSPによって発現誘導される事を確認した。Arteminは発生段階での交感神経伸長において重要な役割を担うことが知られている神経栄養因子であるが、皮膚での発現を検討した報告はなかった。そこで私たちは皮膚に於けるarteminの発現パターンと、その役割について検討を行うことと

した。

2. 研究の目的

ARTNの皮膚における機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)arteminの皮膚における発現パターン

(2)arteminの生理学的機能

①神経支配に対する影響

②温度痛覚過敏に対する影響

③痒みに対する影響

(3)artemin受容体(GFRa3)ノックアウトマウスの生理的機能検査

①神経支配に対する影響

②温度痛覚過敏に対する影響

③痒みに対する影響

4. 研究成果

(1)arteminは定常状態の皮膚表皮細胞、真皮線維芽細胞、血管内皮細胞では発現せず、サブスタンスP処理した初代培養ヒト真皮線維芽細胞より発現することが明らかになった。この発現は蛋白レベルでも免疫ブロット法で明らかにされた。初代培養ヒト角化細胞では定常状態でもarteminのmRNAの発現がreverse-transcriptase PCR法によって確認されたが、蛋白レベルでの発現は確認することができなかった。表皮角化細胞では転写後の発現制御が行われている可能性が示唆された。

(2)arteminの生理学的機能

①神経支配に対する影響

野生型マウスの足底にarteminあるいはサブスタンスPを1週間に3回、2週間投与し、皮膚における神経支配をPGP9.5およびサブスタンスPの免疫染色で検証した。予想され

た通り、野生型マウスでは **artemin** を投与した結果、真皮末梢神経の **sprouting** が確認され表皮内への神経伸長が認められた。

②温度痛覚過敏に対する影響

サブスタンス P を **foot pad** に投与したマウスでは **hargreaves test** にて投与 1 2 時間後には温度痛覚過敏が生じている事を確認した。

In vitro において培養線維芽細胞にサブスタンス P を処理した 1 2 時間後に **artemin** の蛋白レベルの発現が認められることから、サブスタンス P 誘導性温度痛覚過敏のメカニズムに **artemin** が関与しているのではないかと考えた。そこでサブスタンス P と **artemin** 中和抗体を同時にマウス足底に投与したところ、このような温度痛覚過敏は生じなかった。興味深いことに **artemin** をマウス足底に投与した場合にも同様の温度痛覚過敏を生じたことから **artemin** は末梢で誘導される温度痛覚過敏に関与する分子であり、サブスタンス P によって誘導される温度痛覚過敏は **artemin** を介して生じている可能性が示唆された。小次に、このような末梢での温度痛覚過敏が温度受容体として機能する **TRP** ファミリーの発現に影響を与えた結果ではないかと推察した。実際に過去に表皮特異的に **artemin** を強制発現させたマウスでは **TRPV1** の発現が皮膚末梢神経において免疫組織学的に増加していたとする報告があったため (Elitt CM et al. J Neurosci 2006, 26:8578-8587.) 私たちは **TRPV1** の発現に着目した。野生型マウスから得られた脊髄後根神経節細胞に **in vitro** で **artemin** を処理すると **TRPV1** の発現が亢進することを確認した。Artemin は **TRPV1** を発現誘導することによって温度痛覚過敏に貢献していると考えられた。

③痒みに対する影響

Compound48/80 を皮内注射し生じる搔破行

動が **artemin** 中和抗体で抑制できるかどうかをビデオ撮影による搔破行動の解析を用いて検証した。**Compound 48/80** あるいは **artemin** 中和抗体を各々あるいは同時に肩甲骨の中央に皮内注射した直後からビデオ撮影を開始、20 分間記録を行い搔破行動の数を数えた。その結果、**artemin** 中和抗体は **compound48/80** による搔破行動を抑制することはなかった。つまり、Artemin は肥満細胞の急速な脱顆粒に伴う痒み誘発には貢献していないと考えられた。

(3)**artemin** 受容体 (GFRa3) ノックアウトマウスの生理的機能検査

①神経支配に対する影響

GFRa3KO マウスの足底に **artemin** あるいはサブスタンス P を 1 週間に 3 回、2 週間投与し、皮膚における神経支配を検証した。**GFRa3KO** に **artemin** を投与したところ、真皮での支配神経の数は野生型に比し減少しており、**sprouting** が生じていないものと考えられた。さらに **KO** マウスでは表皮への神経伸長が認められなかった。表皮への神経伸長を生じさせる背景として様々な軸索ガイダンス分子などの関与が考えられている。その中でも私たちは表皮細胞が発現しているとして知られる神経反撥因子、**semaphorin 3A** の関与に注目した。野生型、**GFRa3KO** マウスに由来する初代培養表皮細胞を使った **in vitro** の検証で Artemin は表皮細胞に作用し軸索ガイダンス分子 **semaphorin3A** の発現に影響を与えていることを見いだした。当初、私たちは野生型マウス由来表皮細胞では **artemin** によって定常状態で発現している **semaphorin3A** が発現低下するのではないかと想像していた。しかし野生型の表皮細胞は定常状態で **semaphorin3A mRNA** を、**real-time** および **reverse transcriptase PCR** 法において、発現していなかった。Artemin

を負荷してもその発現に影響は及ばなかった。ところが、GFRa3KO の表皮細胞では、定常状態での semaphorin3A の発現はやはりみとめなかつたものの、artemin 刺激によって semaphorin3A が発現することが分かった。このことから表皮細胞は GFRa3 を介さない全くことなるメカニズムで表皮細胞からの semaphorin3A 発現に影響を与えている可能性が示唆された。

②温度痛覚過敏に対する影響

圧感覚を dynamic planter test で、温度痛覚過敏を tail-flick test, hargreaves test を用いて検討した。GFRa3KO マウスでは dynamic planter test において圧感覚の異常を認めなかったが、tail-flick test および hargreaves test のいずれにおいても 4 5 度以上の侵害温度刺激に対して温度痛覚鈍麻を認めた。このことから artemin が温度痛覚過敏に関与していることの傍証が得られた。

③痒みに対する影響

GFRa3KO マウスに compound48/80 を投与した際に出現する搔破行動を 20 分間ビデオ撮影し、搔破行動の数を数えた。驚いた事に GFRa3KO では搔破行動が有意に抑制されていた。このメカニズムを皮膚における肥満細胞の有無をトルイジンブルー染色によるメタクロマジーで検証した。しかし GFRa3KO マウスは野生型と同様の数と分布を示した。ヒスタミン皮内注射における痒痒の誘発試験では、野生型と GFRa3KO マウスの間に搔破行動の差は認められなかった。以上のことから GFRa3KO はヒスタミンとは異なる起痒因子、あるいは受容体を介したメカニズムで compound48/80 による痒痒誘発に関与していると考えられた。

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 4 件)

①室田浩之、TRP チャンネルと痒みの関連. アレルギーの臨床 2009, 29 : 777-781. 査読無

②室田浩之、痒みの新しいメカニズム/温度から痒みを考える. J Environ Dermatol Cutan Allergol. 2009, 3:146-152. 査読有

③室田浩之、【アトピー性皮膚炎の新たな病態解明】痒みの新しいメカニズム 温度と痒みの接点 臨床免疫・アレルギー科. 2009, 51 : 628-631. 査読無

④室田浩之、【痒みをめぐる最近の話題】痒みはからだを暖まるとどうして増強するのですか? Q&A でわかるアレルギー疾患. 2009, 5:61-63. 査読無

[学会発表] (計 2 件)

①室田浩之 「温まると痒いのはなぜ？」第 20 回国際痒みシンポジウム 東京 2009, 10. 31.

②Hiroyuki Murota. Artemin expressed in substance P-treated fibroblast and accumulate in atopic dermatitis skin lesion. International Workshop for the itch. Tokyo, 2009, 10. 25~28.

6. 研究組織

(1)研究代表者

室田 浩之 (MUROTA HIROYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 90363499

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :