

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07324

研究課題名(和文) 痒み情報伝達にPACAP-PAC1受容体シグナルは関与するのか？

研究課題名(英文) Dose PACAP-PAC1 receptor signaling contribute to itch transmission ?

研究代表者

栗原 崇 (Kurihara, Takashi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：60282745

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)：PACAP(下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド)は小型一次感覚神経に含まれる神経ペプチドである。我々のこれまでの検討結果から、同シグナルは脊髄アストロサイトの活性化を介し、疼痛慢性化に関与することが示唆されているが、痒みの伝達に関係するか否かに関しては不明であった。本研究で行った各種痒み惹起物質および搔痒モデルマウスを用いた検討から、PACAPは脊髄PAC1受容体を介して、各種痒みモデルマウスの搔痒(擦過)行動に関与するばかりか、ヒト搔痒疾患にも関与する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

痒みは日常的に経験する皮膚感覚の一つであるが、近年のアレルギー疾患患者の増大、さらには先進国においては人口の高齢化が著しいことから、ドライスキンに伴う痒み、腎疾患や肝疾患などの全身疾患に伴う痒み等、様々な搔痒疾患が増加することが予想される。従来抗ヒスタミン薬、ステロイド、免疫抑制薬に加え、バイオ医薬品など重症度の高い痒み患者の一部に有効な新薬も登場しているが、高額であることに加え、依然十分な効果が得られない患者も存在している。現行の薬物とは異なる作用機序を探求する本研究は、低価格で利用可能な新しい搔痒治療薬の開発応用に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored possible involvement of itch-like components in the intrathecal (i.t.) PACAP-induced aversive responses and evaluated the importance of PACAP signaling in several mouse models of itch.

The PACAP (i.t.)-evoked aversive behaviors were significantly inhibited by subcutaneous pretreatment with the μ -opioid receptor antagonist naltrexone and i.t. pretreatment of bombesin-saporin. We also found that i.t. pretreatment of PA-8, a novel small-molecule PAC1 receptor antagonist, attenuated 5-HT-induced scratching behaviors. Furthermore, single oral administration of PA-8 suppressed itch-associated behaviors in both dry skin and DNFB-induced atopic dermatitis models. In addition, the development of 5-HT and DNFB-induced itch-like behaviors was depressed in PACAP deficient mice. These results suggest that spinal PACAP/PAC1 receptor signaling is involved in an important mechanism underlying the itch-like behaviors.

研究分野：神経薬理学

キーワード：PACAP PAC1受容体 PAC1受容体拮抗薬 非ペプチド性拮抗薬 脊髄痒み伝達 PACAP欠損マウス PAC1受容体欠損マウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痒みは日常的に経験する皮膚感覚の一つであるが、近年のアレルギー疾患患者の増大、さらには先進国においては人口の高齢化が著しいことから、ドライスキンに伴う痒み、腎疾患や肝疾患などの全身疾患に伴う痒み等、様々な掻痒疾患の増加が予想される。従来の抗ヒスタミン薬、ステロイド、免疫抑制薬に加え、バイオ医薬品など重症度の高い痒み患者の一部に有効な新薬も登場しているが、高額であることに加え、依然十分な効果が得られない患者も存在している。このような難治性掻痒は、痒みと搔破の悪循環を生み、睡眠障害をもたらすなど、患者のQOLを著しく低下させることから、現行の薬物とは異なる作用機序を有し、低価格で利用可能な新しい掻痒治療薬の開発が求められている。

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) は、研究協力者の宮田篤郎教授らが1989年にヒツジ視床下部から見出した多機能神経ペプチドである。PACAP およびその受容体は、1次感覚神経や脊髄後角など疼痛伝達経路に発現していることなどから、疼痛伝達に重要な分子であると考えられていたが、作用する受容体 (PACAP 受容体には、特異的受容体 PAC1 と PACAP 関連ペプチドである VIP も同程度の親和性で作用する VPAC1 および VPAC2 が存在)、シグナル伝達経路、グリア細胞の関与など、疼痛発症にどのように関与するか、多くの不明点が残っていた。しかし、申請者らの近年の研究結果から、PACAP は PAC1 受容体を介して脊髄後角神経細胞の protein kinase A - extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナルを活性化し、マウスに自発性嫌悪行動 (下半身を舐める・噛むなどの行動) を引き起こすが、平行して脊髄アストロサイト活性化を急速 (30分程度) に誘導し、何らかの介在因子を介して後角神経細胞内の ERK 活性化を持続させることで、嫌悪行動を維持することが示唆された (Ohnou, Kurihara et al. J Pharmacol Sci 2016)。さらにその後、自発性嫌悪行動は半日程度で終了するが、アストロサイトの活性化と触刺激誘発疼痛行動 (機械的アロディニア現象) はその後3ヶ月以上に渡って持続することを見出した (Yokai, Kurihara et al. Mol Pain 2016)。

以上の結果から、マウス脊髄 PACAP-PAC1 受容体シグナルは疼痛慢性化に重要な役割を持つことが示唆されたが、痒みの伝達に関係するか否かに関してはこれまでほとんど報告はなく、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

研究代表者らは、上記の脊髄 PAC1 受容体誘発嫌悪行動は下半身を舐めたり噛んだりする行動を行うことから、痒みの成分を含んでいるのではないかと考え、脊髄痒み情報伝達システムの中心的役割を担うとされる GRP (gastrin-releasing peptide) - GRP 受容体経路を遮断する目的で、ボンベシン - サポリン髄腔内投与による GRP 受容体発現ニューロン脱落の効果を検討した (ボンベシンは GRP 受容体作動薬。GRP 受容体をインターナリゼーションさせることで細胞毒サポリンを取り込ませる)。その結果、PACAP 誘発機械的アロディニア発症には影響しないが、嫌悪行動発症は顕著に抑制されることが判明した。同様の効果は、痒みにおける内因性オピオイドの関与の検討に使用されるオピオイド受容体拮抗薬 (ナルトレキソン) の髄腔内投与によっても示された。また、PACAP をマウスに皮内投与すると、用量依存的に痒み行動を引き起こすことも示された。以上の予備的検討結果からマウス脊髄 PACAP - PAC1 受容体シグナルはどのような種類の痒み伝達に関与するのか、また痛み伝達とどのように区別されているのか、ヒトにおいても痒み伝達に関与するのか、そして現在鎮痛薬として開発中の新規低分子 PAC1 受容体拮抗薬 (Takasaki, Kurihara et al. J Pharmacol Exp Ther 2018、および出願中化合物: 特願 2017-186447、PCT/JP2018/35831) は鎮痒薬としても効果を示すのか、を目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究では、PACAP - PAC1 受容体シグナルがどのような痒み伝達に関与しているかをまず明らかにするため、以下の研究計画を立案し、検討を行った。

(1) PACAP - PAC1 受容体システムはどのような痒み伝達に関与するのか? - PACAP 受容体拮抗薬、PACAP 欠損マウスを用いた検討 (鹿児島大学承認番号: MD19064)

既存のペプチド性 PACAP 受容体拮抗薬 (PACAP₆₋₃₈)、および申請者らが開発した非ペプチド性有機低分子 PAC1 受容体拮抗薬の効果をマウス痒みモデルで検討を行う。マウスモデルとしては、各種痒み誘発物質 (ヒスタミン、5-HT、クロロキン等) および PACAP の吻側背部皮内投与、およびドライスキンモデル (アセトン・ジエチルエーテル/水 (AEW) を用いたドライスキンモデル)、接触皮膚炎モデル (ハプテンである 2,4-ジニトロフルオロベンゼンの短期塗布)、乾癬モデル (イミキモドクリームの日1回7日間塗布)、アトピー性皮膚炎モデル (2,4-ジニトロフルオロベンゼンの長期あるいは2週間間隔回数塗布) の利用を検討した。PACAP 受容体拮抗薬は、局所皮内、脊髄くも膜下、腹腔内あるいは経口投与し、自発性痒み行動、患部皮膚の組織学的検討を行った。同様の痒みモデルを PACAP 欠損マウスにも適用する。

(2) PACAP - PAC1 受容体はヒト痒み疾患発症と関連するか?

アトピー性皮膚炎等痒みを伴う皮膚疾患患者の皮膚生検組織における PACAP の発現動態、および PACAP 血中濃度 (治療前と治療後3ヶ月前後の採血時) を測定することで、PACAP と痒み発現の関連性、および PACAP の痒みバイオマーカーとしての可能性を検討する (鹿児島大学承認番号: 180125 疫)。

4. 研究成果

(1) 掻痒誘発物質皮内投与により誘発される自発性痒み行動に対する新規 PAC1 受容体拮抗薬の効果 (図 1)

セロトニン (5-HT)、compound48/80 (C48/80)、クロロキン (CQ) を皮内投与することによって誘発される自発性痒み行動に対して、新規 PAC1 受容体拮抗薬 (PA-8) の予防的脊髄クモ膜下腔投与の効果を検討したところ、いずれの痒み行動も PA-8 は効果的に抑制した。

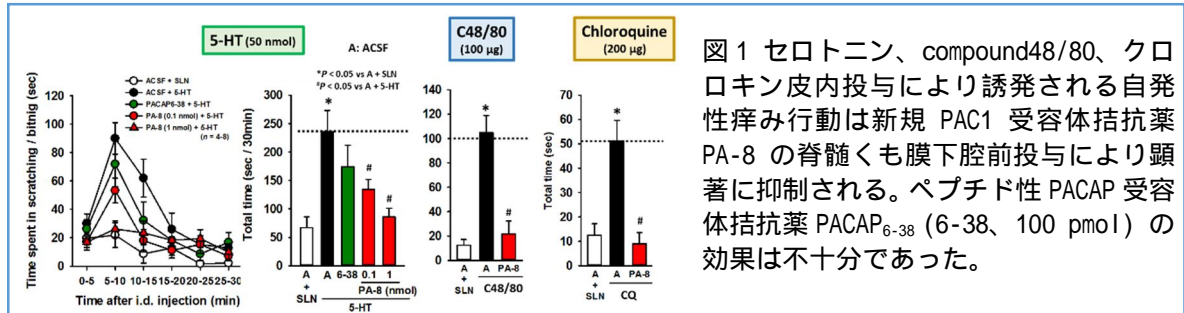


図 1 セロトニン、compound48/80、クロロキン皮内投与により誘発される自発性痒み行動は新規 PAC1 受容体拮抗薬 PA-8 の脊髄クモ膜下腔前投与により顕著に抑制される。ペプチド性 PACAP 受容体拮抗薬 PACAP₆₋₃₈ (6-38、100 pmol) の効果は不十分であった。

(2) PACAP 皮内投与は痒み行動を引き起こすか？

PACAP 末梢(皮内)投与が痒み行動を引き起こすかどうか、これまで十分な検討がなされていないため、PACAP の用量依存的皮内投与の効果、および上記掻痒物質皮内投与で誘発される痒み行動に、末梢における PACAP の関与の可能性はあるか、検討を行った。

PACAP をマウスに皮内投与すると、用量依存的 (1 ~ 1,000 pmol) に痒み様行動を引き起こしたが、PACAP 関連ペプチドである VIP (1,000 pmol) の皮内投与はそのような行動を引き起こさなかった。また、PACAP 誘発痒み様行動は、ナルトレキソン (1 mg/kg, s.c.) の前投与 (15 分前) により、完全に抑制された (図 2)。

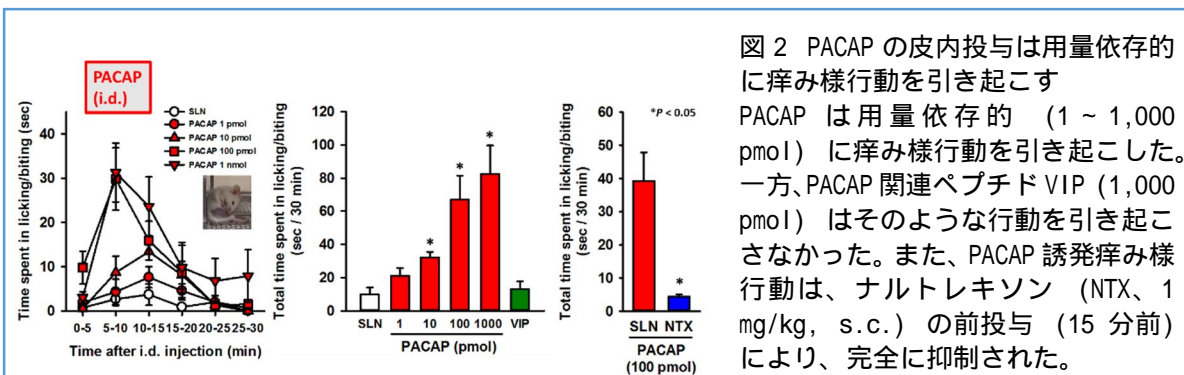


図 2 PACAP の皮内投与は用量依存的に痒み様行動を引き起こす。PACAP は用量依存的 (1 ~ 1,000 pmol) に痒み様行動を引き起こした。一方、PACAP 関連ペプチド VIP (1,000 pmol) はそのような行動を引き起こさなかった。また、PACAP 誘発痒み様行動は、ナルトレキソン (NTX、1 mg/kg, s.c.) の前投与 (15 分前) により、完全に抑制された。

VIP が痒み様行動を引き起こさないことから、PACAP 皮内投与で誘発される痒み様行動は、PAC1 受容体を介して誘発されていることが示唆されるが、PA-8 および出願中の新規 PAC1 受容体拮抗薬 (誘導体 B) の同時投与による顕著に抑制されることから、PAC1 受容体を介した反応であることが示唆される (図 3 左)。しかし、5-HT、C48/80、あるいはクロロキン皮内投与誘発痒み行動に対しては、PA-8 を同時皮内投与しても有意な抑制効果は認められなかった (図 3 右)。

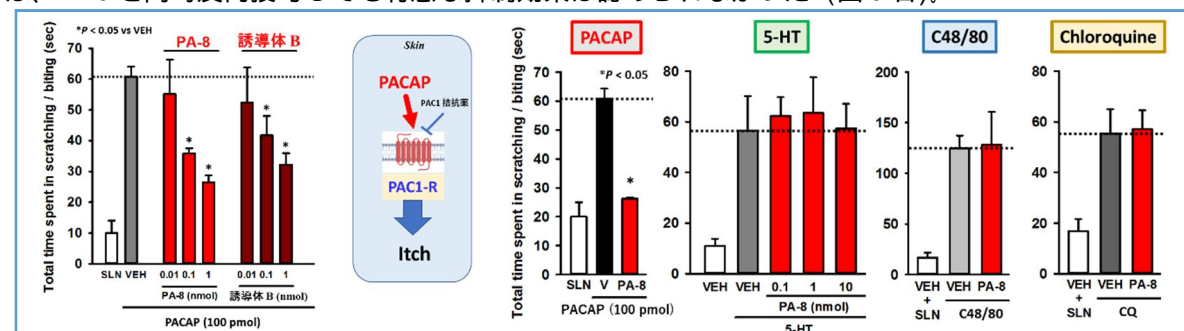


図 3 PACAP 皮内投与誘発痒み様行動

は皮内 PAC1 受容体を介して誘発されるが、5-HT、C48/80、クロロキン皮内投与誘発痒み行動には皮内 PACAP-PAC1 受容体シグナルは関与しない

PACAP (100 pmol) 皮内投与で誘発される痒み様行動は PA-8 あるいは出願中の新規 PAC1 受容体拮抗薬 (誘導体 B) の同時投与により、用量依存的に抑制される。一方、5-HT、C48/80、あるいはクロロキン皮内投与誘発痒み行動に対して、PA-8 の同時皮内投与は有意な影響を与えなかった。

以上の結果から、PACAP-PAC1 受容体シグナルは中枢（脊髄）および末梢（皮内）で痒み様行動誘発に關与することが示唆されたが、5-HT、C48/80、クロロキン皮内投与で誘発される痒み行動には、皮内 PACAP-PAC1 受容体シグナルの關与はほとんどないことが示唆された(図 4)。

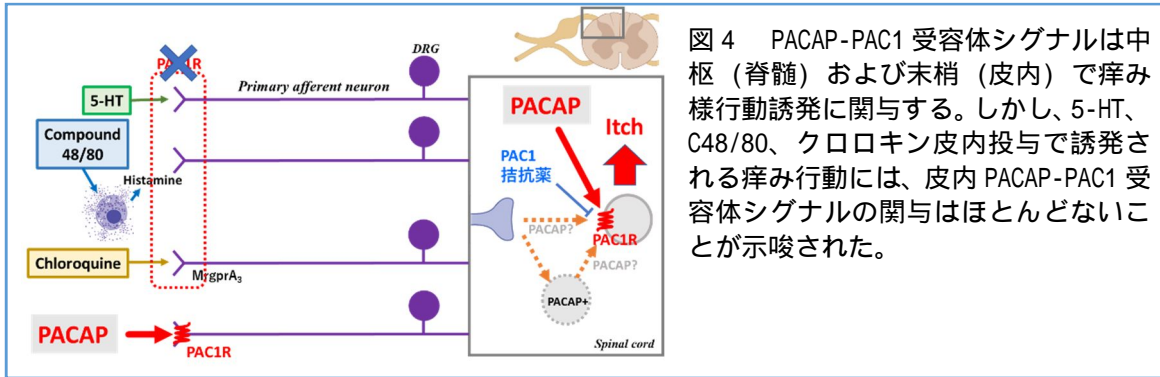


図 4 PACAP-PAC1 受容体シグナルは中枢（脊髄）および末梢（皮内）で痒み様行動誘発に關与する。しかし、5-HT、C48/80、クロロキン皮内投与で誘発される痒み行動には、皮内 PACAP-PAC1 受容体シグナルの關与はほとんどないことが示唆された。

(3) マウス搔痒モデルにおける検討

そこで、マウス搔痒モデルとして、ドライスキンモデル、アトピー性皮膚炎モデル (2,4-ジニトロフルオロベンゼンの 2 回塗布)、乾癬モデルを用い、さらに PAC1 受容体拮抗薬経口投与の効果を検討した (図 5)。各図左側に示すプロトコルで搔痒モデルを作製し、その後 PA-8 および出願中新規 PAC1 受容体拮抗薬 (誘導体 B) の経口投与の効果を検討したところ、いずれも有意な搔痒行動の抑制が認められた。

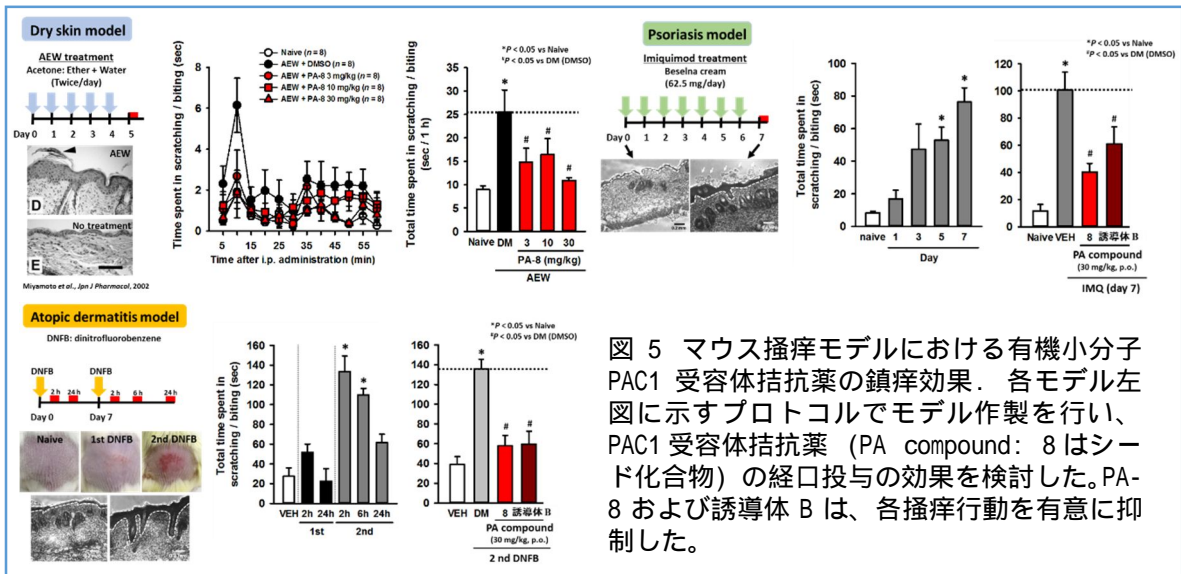


図 5 マウス搔痒モデルにおける有機小分子 PAC1 受容体拮抗薬の鎮痒効果. 各モデル左図に示すプロトコルでモデル作製を行い、PAC1 受容体拮抗薬 (PA compound: 8 はリード化合物) の経口投与の効果を検討した。PA-8 および誘導体 B は、各搔痒行動を有意に抑制した。

(4) PACAP 遺伝子欠損マウスを用いた検討

さらに、PACAP 遺伝子欠損マウスを用い、5-HT の皮内投与および DNFB2 回塗布 (アトピー性皮膚炎モデル) による搔痒行動を検討したところ、PACAP 欠損マウスにおいては、いずれの処置においても搔痒行動が顕著に抑制された (図 6)。以上の結果から、PACAP-PAC1 受容体シグナルは、多くの搔痒疾患に關与する可能性が示唆された。

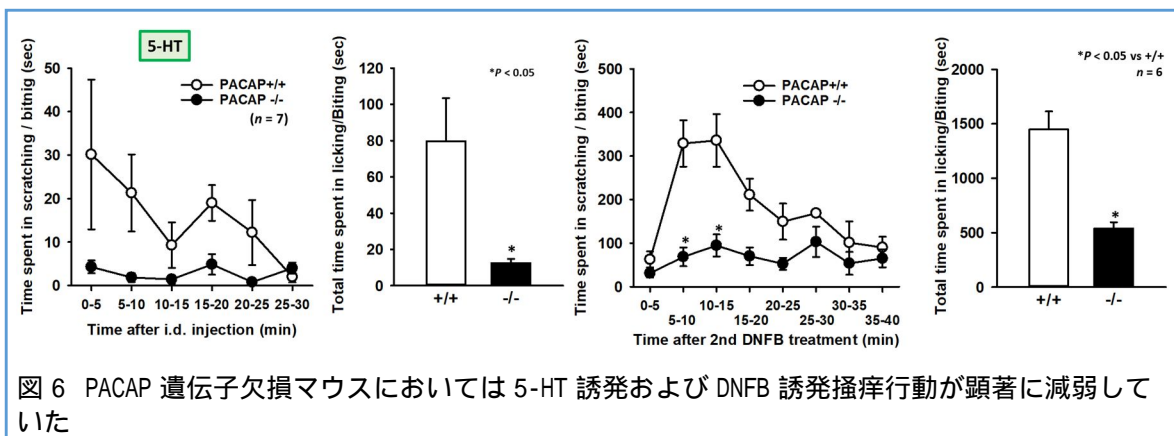


図 6 PACAP 遺伝子欠損マウスにおいては 5-HT 誘発および DNFB 誘発搔痒行動が顕著に減弱していた

(5) 患者皮膚生検および PACAP 血中濃度測定を試み

PACAP の免疫組織学的検討を行うため、PACAP 欠損マウスを用い、市販の PACAP 抗体をスクリーニングしたところ、極めて特異性の高い PACAP 抗体入手に成功している。そこでこの抗体を用い、ヒト皮膚生検組織を免疫染色したところ、表皮基底層、汗腺、毛包に比較的強い PACAP 免疫活性が既報通り認められることを確認した。

また市販の複数の ELISA キットを用い、マウス血中 PACAP 濃度測定の予備的検討を行った。各種搔痒マウスモデル動脈血（腹部大動脈から採血）と静脈血（右心室からの採血）を用いて測定結果を比較したが、データの不一致、PACAP 欠損マウス血液が擬陽性となるなど、信頼できる ELISA キットを選択中である（あるいは構築する必要がある）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takasaki I, Watanabe A, Okada T, Kanayama D, Nagashima R, Shudo M, Shimodaira A, Nunomura K, Lin B, Watanabe Y, Gouda H, Miyata A, Kurihara T, Toyooka N.	4. 巻 231
2. 論文標題 Design and synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives for a novel PAC1 receptor antagonist.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 114160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejmech.2022.114160	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 Kambe Y, Nguyen TT, Hashiguchi K, Sameshima Y, Yamashita A, Kurihara T and Miyata A.	4. 巻 148
2. 論文標題 The dorsal hippocampal protein targeting to glycogen maintains ionotropic glutamate receptor subunits expression and contributes to working and short-term memories in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 108-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.10.008	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 Kambe Y, Yamauchi Y, Nguyen T T, Nguyen T T, Ago Y, Shintani N, Hashimoto H, Yoshitake S, Yoshitake T, Kehr J, Kawamura N, Katsuura G, Kurihara T, Miyata A.	4. 巻 73
2. 論文標題 The pivotal role of PACAP for lactate production and release in astrocytes for fear memory.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacological Report	6. 最初と最後の頁 1109-1121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43440-021-00222-6	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 Nguyen TT, Kambe Y, Kurihara T, Nakamachi T, Shintani N, Hashimoto H, Miyata A.	4. 巻 57
2. 論文標題 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the ventromedial hypothalamus is responsible for food-intake behavior by modulating the expression of agouti-related peptide in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 2101-2114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-019-01864-7.	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 Takasaki I, Ogashi H, Okada T, Shimodaira A, Hayakawa D, Watanabe A, Miyata A, Kurihara T, Gouda H, Toyooka N.	4. 巻 186
2. 論文標題 Synthesis of a novel and potent small-molecule antagonist of PAC1 receptor for the treatment of neuropathic pain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 111902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmech.2019.111902	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9件(うち招待講演 4件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 栗原 崇
2. 発表標題 PACAP受容体特異的有機低分子拮抗薬のイン・シリコ創薬 - 難治性疼痛・掻痒治療に向けて -
3. 学会等名 感覚研究コンソーシアム第1回ピッチイベント(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原 崇、宮田篤郎、高崎一朗
2. 発表標題 PACAP受容体特異的有機低分子拮抗薬のイン・シリコ創薬 - 難治性疼痛・掻痒治療に向けて -
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高崎一朗、加藤 翔、池田竜太、村田万祐子、斎藤弘樹、神戸悠輝、合田浩明、岡田卓哉、豊岡尚樹、宮田篤郎、栗原 崇
2. 発表標題 痒み伝達におけるPACAP-PAC1受容体情報伝達系の関与の可能性
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 崇、池田 竜太、斎藤 弘樹、村田 万佑子、神戸 悠輝、加藤 翔、岡田 卓也、豊岡 尚樹、合田 浩明、宮田 篤郎、高崎 一朗
2. 発表標題 PACAP誘発嫌悪行動は一種の搔痒反応を表しているのか？ - 脊髄痒み伝達におけるPACAP情報伝達系の関与の可能性 - Do intrathecal PACAP-evoked aversive behaviors represent itch-like behaviors? - Possible involvement of PACAP signaling system in spinal itch transmission in mice.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高崎 一朗、池田 竜太、村田 万佑子、加藤 翔、岡田 卓哉、豊岡 尚樹、合田 浩明、宮田 篤郎、栗原 崇
2. 発表標題 そう痒における新規PACAP type 1受容体小分子拮抗薬の効果. Effects of newly developed small-molecule PACAP type 1 receptor antagonists on itch-like behaviors in mice.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Kurihara, Ryuta Ikeda, Hiroki Saito, Mayuko Murata, Yuki Kambe, Sho Kato, Takuya Okada, Naoki Toyooka, Hiroaki Gouda, Atsuro Miyata, and Ichiro Takasaki
2. 発表標題 Possible Contribution of PACAP-PAC1 Receptor Signaling System to Itch Sensation in Mice
3. 学会等名 14th Asia Pacific Federation of Pharmacologists (APFP2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原 崇
2. 発表標題 PACAP受容体を標的とした新規難治性疼痛・搔痒・精神疾患治療薬の開発
3. 学会等名 第1回『ONLINE CONF』を用いた産学間シーズ・ニーズ マッチング(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原 崇
2. 発表標題 PACAP受容体特異的有機低分子拮抗薬のイン・シリコ創薬 - 難治性疼痛・掻痒・精神疾患治療に向けて -
3. 学会等名 第9回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山智祐、池田竜太、加藤 翔、岡田卓哉、豊岡尚樹、宮田篤郎、栗原 崇、高崎一朗
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスの掻痒反応における末梢PACAP-PAC1受容体情報伝達系の関与
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PAC1受容体拮抗薬を用いた鎮痒薬	発明者 栗原 崇、高崎一朗、 豊岡尚樹、合田浩明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/005283	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生体情報薬理学分野 http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~pharmaco/</p>

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	高崎 一郎 (Takasaki Ichiro) (00397176)	富山大学・学術研究部工学系・准教授 (13201)	
研究分担者	内田 洋平 (Uchida Yohei) (30571856)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	藤井 一恭 (Fujii Kazuyasu) (70452571)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関