

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07333

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎マウスにおける痒み行動増悪の脳内メカニズムの解明

研究課題名(英文)Brain mechanism of itch exacerbation in atopic dermatitis mice

研究代表者

藤井 正徳(Fujii, Masanori)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40434667

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)：本研究の目的は、アトピー性皮膚炎における痒み行動増悪の脳内メカニズムを解明することである。1)アトピー性皮膚炎モデルマウスにフェノバルビタールや神経ステロイドであるアロプレグナノロンを大槽内投与(脳全体に薬液が作用)すると搔痒行動が増加した。痒み増強反応に関わる脳部位を特定するため、これらの薬物を脳局所に微量投与したが、搔痒行動の増加は認められず、痒み増強に関わる脳部位は特定できなかった。2)アロプレグナノロン以外の神経ステロイドのアトピー性皮膚炎マウスの搔痒行動に及ぼす影響を調べたところ、プレグナノロンおよびテトラデオキシコルチコステロンが搔痒行動を増加させることを新たに明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痒みはアトピー性皮膚炎の主要な症状であり、患者を最も苦しめる要因となる。アトピー性皮膚炎では、アルコール摂取や睡眠時に痒みが増強することから何らかの中樞神経系の機能異常の関与が示唆されるが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では、ヒトのアトピー性皮膚炎と類似した症状を呈するモデルマウスを用いて、痒み行動増悪の脳内メカニズムを解析した。搔痒行動増加に関与する脳部位の特定には至らなかったが、アロプレグナノロン以外の神経ステロイドが痒み行動の増悪に関与する可能性を新たに見出した。本知見は、アトピー性皮膚炎の痒みの発症メカニズムのさらなる理解および治療薬の開発の一助になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the brain mechanism of itch exacerbation in atopic dermatitis. 1) Intracisternal injection (i.e., drugs acting on the entire brain) of phenobarbital or allopregnanolone increased itch-related scratching behavior in atopic dermatitis model mice. Next, these drugs were microinjected into several brain regions; however, increased scratching behavior was not observed. Thus, the specific brain regions involved in the itch exacerbation could not be identified. 2) We examined the effects of neurosteroids other than allopregnanolone on scratching behavior in mice with atopic dermatitis. We found that both pregnanolone and tetrahydrocorticosterone increased scratching behavior.

研究分野：薬理学

キーワード：痒み アトピー性皮膚炎 神経ステロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痒みはアトピー性皮膚炎の主要な症状であり、患者の quality of life を低下させる最も大きな原因となる。アトピー性皮膚炎では、健常者に比べて様々な要因により痒みが生じやすく、アルコール摂取や夜間・睡眠時に痒み・掻破行動が増強することが臨床的に知られている。したがって、アトピー性皮膚炎では何らかの中枢神経系の機能調節異常が痒み行動の増悪に関与する可能性があるが、そのメカニズムは明らかになっていない。

我々はこれまでに、エタノールやバルビツール酸系薬などの催眠作用のある薬物をアトピー性皮膚炎モデルマウスに全身もしくは脳内投与すると掻痒行動が顕著に増強すること、また、神経ステロイドの一種でありエタノールやバルビツール酸系薬と類似した薬理作用を示す生体内物質であるアロプレグナノロンが脳内に作用した場合にも掻痒行動が増加することを明らかにした。しかし、エタノール、バルビツール酸系薬やアロプレグナノロンが脳のどこの部位に作用した結果、掻痒行動が増強するのは未だ明らかではない。また、アロプレグナノロン以外の神経ステロイドも痒みと関連するかは未検討であり不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アトピー性皮膚炎における痒み行動増悪の脳内メカニズムを解明することである。具体的には、検討1) 掻痒行動増悪に関与する脳部位を特定するため、微量のフェノバルビタールもしくはアロプレグナノロンをアトピー性皮膚炎モデルマウスの脳内に局所投与して掻痒行動が発現するか否かを検討した。検討2) アロプレグナノロン以外の神経ステロイドと痒みとの関連を明らかにするため、アロプレグナノロン以外の神経ステロイドをアトピー性皮膚炎モデルマウスに投与して掻痒行動を観察した。

3. 研究の方法

1) アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

既報 (Fujii et al., Exp. Dermatol., 24, 108-113, 2015) に従って、4週齢の雌性 HR-1 系ヘアレスマウスに不飽和脂肪酸およびデンプン成分を欠乏させた特殊飼料 (Research Diets, D03052309) を8週間以上摂食させアトピー性皮膚炎様症状を発症させた。なお、検討2) では長期間の特殊飼料の摂食による動物の衰弱を予防するため、不飽和脂肪酸のみ欠乏した飼料 (Research Diets, D0305204C) も適宜摂食させた。

2) 薬物の大槽内投与、髄腔内投与、脳室内投与および脳内の局所部位への微量注入

大槽内 (intracisternal, i.ci.) 投与は Ueda らの方法 (Eur. J. Pharmacol., 56, 265-268, 1979) を一部改変して行った。すなわち、27ゲージの注射針を先端から 3.5 mm の位置で J 字型に 40° 折り曲げ、薬物を充填したマイクロシリンジに接続し、注射針をマウスの後頭部と第一頸椎の間に差し込み大槽内へ薬物を投与した。

髄腔内 (intrathecal, i.t.) 投与は、2% イソフルラン麻酔下で、Hylden らの方法 (Eur. J. Pharmacol., 67, 313-316, 1980) に従って行った。

薬物の脳内微量注入は以下のとおり行った。2% イソフルラン麻酔下で、マウスを脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨を露出させた。Allen Brain Atlas に基づいて、中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal gray, PAG)、吻側延髄腹内側部 (rostral ventromedial medulla, RVM) もしくは青斑核 (locus coeruleus, LC) にガイドカニューレを留置した。1週間の回復期間を置いた後、種々薬物をガイドカニューレ内に挿入したマイクロインジェクションカニューレを通して微量投与 (1 μ L/site) した。

脳室内 (intracerebroventricular, i.cv.) 投与は、上記と同様に側脳室にカニューレーションすることにより行った。

3) 掻痒行動の測定

薬物投与直後より、マウス後肢による掻破行動を、目視もしくは自動測定装置 MicroAct を用いて測定することにより解析した。

4. 研究成果

検討1)

アトピー性皮膚炎マウスにおける中枢性の痒み増悪反応に関与する脳部位を特定するため、フェノバルビタールもしくはアロプレグナノロンを、痛みの下行性抑制系として知られる PAG、RVM もしくは LC に微量投与 (フェノバルビタール 4 μ g/1 μ L/site およびアロプレグナノロン 5 μ g/1 μ L/site) し、掻痒行動の増加が再現されるか検討したが、いずれの部位への投与においても掻痒行動の増加は認められなかった。なお、同じ個体にフェノバルビタールを腹腔内投与 (40

mg/kg) したところ、掻痒行動の増加が確認されたため、カニューレーション自体の影響は少ないと考えられた。

次に、フェノバルビタールを異なる投与経路(i.c.i., i.t.またはi.cv.)から種々の容量で投与し掻痒行動を測定した。また、青色色素 Evan's blue を同様に投与し、それぞれの投与の場合の薬液の分布を確認した。その結果、フェノバルビタールが脳血管内に存在し、脳内で広範囲に作用している場合に掻痒行動が増加していることが明らかとなった。

検討 2)

アロプレグナロン以外の神経ステロイドとして、アロプレグナロンと類似した中枢神経抑制性の作用 ($GABA_A$ 受容体に対する正の調節作用) を有するプレグナロンやテトラヒドロコルチコステロン (THDOC) がよく知られている。また、アロプレグナロンとは相反する中枢神経興奮性の作用 ($GABA_A$ 受容体に対する負の調節作用やグルタミン酸受容体に対する正の調節作用) を有する神経ステロイドとしては、プレグナロン硫酸エステル (PREGS)、デヒドロエピアンドロステロン硫酸エステル (DHEAS) やアロプレグナロンの異性体であるイソプレグナロンやエピプレグナロンが知られている。

アトピー性皮膚炎マウスにアロプレグナロンを脳内投与 ($5 \mu\text{g}/\text{site}$, i.c.i.) すると掻痒行動が有意に増加する (Fujii et al., Sci. Rep., 9, 2364, 2019) ことから、中枢神経抑制性の神経ステロイドは掻痒行動を増加させ、中枢神経興奮性の神経ステロイドは掻痒行動を抑制するのではないかと推測した。

アトピー性皮膚炎マウスを用いて、プレグナロンおよび THDOC を $5 \mu\text{g}/\text{site}$ の用量で i.c.i. 投与したところ、掻痒行動が増加する傾向が認められた。一方、中枢神経興奮性作用を示す PREGS、DHEAS、イソプレグナロンおよびエピプレグナロンを $5 \mu\text{g}/\text{site}$ の用量で i.c.i. 投与した際のアトピー性皮膚炎マウスの自発的掻痒行動に及ぼす影響を検討したが、明らかな影響はみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 藤井 正徳	4. 巻 56
2. 論文標題 脳内物質によるかゆみの増悪機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 840～842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.56.9_840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Masanori	4. 巻 43
2. 論文標題 Current Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Atopic Dermatitis: Interactions among Skin Barrier Dysfunction, Immune Abnormalities and Pruritus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 12～19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00088	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 Fujii Masanori, Shimazaki Yuki, Nabe Takeshi	4. 巻 2223
2. 論文標題 Diet-Induced Mouse Model of Atopic Dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 79～86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1001-5_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Masanori	4. 巻 137
2. 論文標題 Pathogenesis of Diet-induced Atopic Dermatitis in Hairless Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 49～54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.16-00200	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 Fujii Masanori	4. 巻 10
2. 論文標題 The pathogenic and therapeutic implications of ceramide abnormalities in atopic dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10092386	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 藤井正徳	4. 巻 47
2. 論文標題 かゆみの科学：痒みメカニズムに関する最近の話題	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 7~10
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤井正徳	4. 巻 132
2. 論文標題 アルコール摂取や睡眠時における痒み増悪メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 633~637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14924/dermatol.132.633	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Masanori, Imahori Shota, Nakayama Misao, Nabe Takeshi, Ohya Susumu	4. 巻 7
2. 論文標題 Tacrolimus suppresses itch-related response in diet-induced atopic dermatitis model mice by reducing chloroquine-sensitive sensory neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Itch	6. 最初と最後の頁 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/itx.0000000000000062	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15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤井正徳, 大塚崇人, 榎本大誠, 安井悠真, 田中智之
2. 発表標題 C57BL/6マウスを用いたアトピー性皮膚炎の慢性痒みモデル
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井正徳
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた痒みメカニズムの解明
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Fujii
2. 発表標題 Brain allopregnanolone causes marked scratching in atopic dermatitis mice
3. 学会等名 10th World Congress on Itch（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井正徳, 中嶋雅幸, 櫻井千浩, 田中智之
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚細胞から遊離される起痒物質の探索
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 延田聖太, 田中智之, 藤井正徳
2. 発表標題 リノレン酸塗布によるマウスアトピー性皮膚炎の抑制効果
3. 学会等名 第140回日本薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井正徳, 中嶋雅幸, 櫻井千浩, 田中智之
2. 発表標題 Search of itch-producing substance(s) released from skin cells of atopic dermatitis model 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 藤井正徳
2. 発表標題 アルコール摂取や睡眠時における痒み増悪メカニズム
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井喬子, 宮川亮祐, 田中智之, 藤井正徳
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスの痒み行動におけるMrgprA3発現神経の役割
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井正徳
2. 発表標題 中枢におけるかゆみ増強メカニズム
3. 学会等名 環境医学研究所・順天堂かゆみ研究センター第6回学術シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井正徳
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎における中枢性かゆみ増悪機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井正徳
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた痒みのメカニズムの解析
3. 学会等名 第2回かゆみカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井正徳、藤井喬子、宮川亮祐、田中智之
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスの痒み反応におけるMrgprA3発現神経の役割
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 田中里奈、田中智之、藤井正徳
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎マウスの掻痒行動におけるアロプレグナノロンおよびテトラヒドロデオキシコルチコステロンの関与
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井正徳、中嶋雅幸、櫻井千浩、田中里奈、田中智之
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスの痒みの原因物質の探索
3. 学会等名 第23回ヒスタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 正徳、榎本大誠、大塚崇人、田中里奈、安井悠真、田中智之
2. 発表標題 C57BL/6マウスを用いた新しいアトピー性皮膚炎マウスモデルの確立
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

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都薬科大学 薬理学分野 webページ
<https://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuri/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------