

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07818

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎の痒み過敏に関する神経エピジェネティクスの解明

研究課題名(英文)Elucidation of neuroepigenetic mechanism underlying itch hypersensitivity in atopic dermatitis

研究代表者

内田 仁司(Uchida, Hitoshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：30549621

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)：本研究では、アトピー性皮膚炎の特徴である痒み過敏(些細な刺激で痒みが生じる現象)に関する脳神経細胞を同定するために必要となる、蛍光保持可能な組織透明化手法を概ね完成させることができた。さらに、痒みあるいは痛みを惹起する刺激に応答する脳神経細胞を、網羅的に同定するための実験を継続して実施した。加えて、慢性の痒みモデル動物では、中枢神経系における免疫担当細胞(ミクログリア)の活性化が生じることを、組織透明化手法を用いて明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、アトピー性皮膚炎の特徴である痒み過敏(些細な刺激で痒みが生じる現象)が生じるメカニズム解明を目的とする、学術的に意義深いものである。本研究では、組織全体を網羅的に評価することができる「組織透明化/3次元イメージング技術」を駆使・開発し、痒み時に活性化した脳神経細胞を網羅的に同定する解析を実施するとともに、慢性の痒みでは脳の免疫細胞「ミクログリア」が活性化することを見出すことができた。これらは、新たな治療戦略の開発の基礎となるものであり、社会的に意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：The present study was aimed to identify the brain neuronal cells that mediate itch hypersensitivity in atopic dermatitis. To this end, the principal investigator developed a new tissue clearing method that can preserve the fluorescence signal. Also, we repeatedly conducted tissue clearing and 3D imaging analysis to comprehensively identify the brain neuronal cells that respond to itch or pain stimuli. In addition, the present study found that chronic itch was accompanied by activation of CNS-resident immune cells, microglia, in spinal cord and brain, by using tissue clearing and 3D imaging analysis.

研究分野：分子神経科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 組織透明化 エピジェネティクス 全脳イメージング 中枢性感作

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

痒みは、掻きたいとの衝動を引き起こす不快な感覚である。アトピー性皮膚炎では、些細な刺激で痒みが生じる「痒み過敏」に加えて、痒みによる掻破（皮膚の引っ掻き）が炎症を悪化させ、さらに痒みが増強する「痒みと掻破の悪循環」が生じることから、長期的に生活の質が低下する。また、この慢性の痒みには既存の治療薬が奏功し難いことから、新たな治療戦略の確立が強く望まれている。これまでの脳機能イメージング研究から、アトピー性皮膚炎患者では、痒み刺激に対する過剰な脳活動が観察されており (Ishiuji et al., Br J Dermatol, 2009)、中枢神経における痒み伝達の増強 (中枢性感作) の関与が示唆されていることから、神経可塑性を制御する神経エピジェネティクスが関与する可能性が大いに考えられる。これに関連して、本研究代表者は慢性の痛みにおける神経エピジェネティクスの関与を先駆的に証明してきた (Uchida et al., 2010, J Neurosci; Uchida et al., 2017, FASEB J)。

加えて、本研究開始当初において、本研究代表者は以下のことを進めていた。第一に、全脳イメージング・解析技術「CUBIC」を用いて、中枢神経系における免疫担当細胞ミクログリアの可視化に成功し、本研究の基礎として、皮膚炎症性の痛みにおける脊髄と視床のミクログリア活性化を見出していた (内田ら, 第40回日本疼痛学会, 2018)。第二に、研究分担者である理化学研究所の岡田 峰陽チームリーダーとともに、ヒトとよく似た経過にてアトピー性皮膚炎を自然発症する「多段階進行性アトピー性皮膚炎マウス (Spade マウス; Yasuda et al., J Clin Invest, 2016)」を用いた共同研究に着手していた。第三に、薬剤誘発性のアトピー性皮膚炎モデルとして、ビタミン D3 誘導体 MC903 の反復塗布モデル (Li et al., Proc Natl Acad Sci U SA, 2006) を作製することに成功していた。

### 2. 研究の目的

本研究課題の研究目的は、アトピー性皮膚炎の痒み過敏に関与する脳神経細胞を特定し、その細胞における神経エピジェネティクス異常を明らかにし、中枢性感作機構を解明することである。具体的な研究項目は、1) 痒み過敏にตอบสนองする脳神経細胞の可視化同定、2) ミクログリアと関連する脳神経細胞の同定、3) 痒み過敏に関与する脳神経細胞の同定、4) 痒み過敏に関与する神経エピジェネティクス異常の解明、5) 末梢機構と中枢性感作機構の相互作用の解明、である。

### 3. 研究の方法

(1) アトピー性皮膚炎を自然発症する Spade マウスを、研究分担者である理化学研究所の岡田 峰陽チームリーダーから譲り受け、繁殖させた。その一方で、痒み過敏の評価系を確立するために、野生型 (C57BL/6) の雄性マウスを用いて、起痒物質及び発痛物質を頬あるいは背中に投与し、それにより惹起される引っ掻き行動等の用量依存性を検討した。さらに、実験計画の通りに、活性化した神経細胞を標識する「Arc-dVenus マウス; Eguchi & Yamaguchi, Neuroimage, 2009」を用いて、起痒物質や発痛物質等により活性化する神経細胞を同定するための CUBIC 解析を実施した。

(2) 神経活動にตอบสนองする最初期遺伝子 (Fos など) のプロモーターを利用し、活性化した神経細胞を蛍光標識化するアデノ随伴ウイルスベクターを複数構築するとともに、これらを中枢神経系に高効率に感染させるために、PHP.eB セロタイプの組換え AAV を作製した。また、緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する PHP.eB 型 AAV 等を用いて、蛍光保持に適した透明化処理条件を開発するとともに、得られた三次元画像データの解析手法の構築を進めた。その一方では、三次元免疫染色を用いて、活性化した神経を蛍光標識する手法の開発にも着手した。

(3) ミクログリアを標識する「Iba1(iCre/+);CAG-flxed STOP tdTomato マウス」と CUBIC 法を駆使し、慢性の痒み病態モデルの脊髄と脳におけるミクログリア活性化を可視化解析した。

### 4. 研究成果

(1) 野生型 (C57BL/6) の雄性マウスを用いて、起痒物質 (クロロキンやヒスタミン) 及び発痛物質 (カプサイシン) を頬あるいは背中に投与し、用量依存的に引っ掻き行動等を惹起することを確認した。また、痒み刺激にตอบสนองする脳神経細胞を同定するために、Arc-dVenus マウスに起痒物質 (クロロキン) を投与し、そのマウス脳を CUBIC 解析した。関連する解析として、同マウスに、発痛物質 (カプサイシン) あるいは footshock 刺激を与え、同様の実験を行った。得られた結果を定量化評価するために、下記 (2) にあるように、研究協力者である新潟大学脳研究所の田井中一貴教授と共同して、得られた蛍光シグナルをアトラス脳にマッピングするパイプラインを構築した。そして、Footshock 刺激にตอบสนองする脳神経細胞を、扁桃体をはじめとする、様々な脳領域において網羅的に同定することに成功した。現在、クロロキン以外の起痒物質についても同様の解析を進め、痒み刺激にตอบสนองする脳神経細胞を同定するための実験を進めている。さらに、アトピー性皮膚炎に対して低用量の起痒物質投与を行い、同様の解析を実施することを計画中である。ここでは、下記 (2) にて記述している、新たに開発した「蛍光保持可能な透明化手法」を利用する予定である。

(2) 活性化した神経細胞の蛍光標識と人為的操作を可能にするために、最初期遺伝子 (Fos など) のプロモーターとアデノ随伴ウイルスベクターを利用した TRAP 法の確立を目指した。また、GFP を発現する PHP.eB セロタイプを静脈内投与することにより、組換え AAV が中枢神経系に高効率に感染することも確認した。さらに、これらのツールおよび CUBIC による透明化イメージング解析を利用して、起痒物質の投与に反応する神経細胞の同定を試みた。しかしながら、陽性シグナルを捉えることができなかった。そこで、二つのアプローチを試みることにした。第一は、現存する透明化手法は、その処理過程において蛍光減弱する問題点があるために、微弱な蛍光シグナルでも捉えることができる「蛍光保持可能な透明化手法」を確立することである。第二は、cFos の全脳三次元免疫染色法を確立し、活性化神経細胞を蛍光標識する手法を確立することである。これらは、研究協力者である新潟大学脳研究所の田井中一貴教授と共同して進めており、両者とも概ね完成することができ、さらに、得られた蛍光シグナルをアトラス脳にマッピングするパイプラインを構築することも終えることもできた。これらのことを受けて、痒み刺激あるいはアトピー性皮膚炎モデルにおける活性化神経細胞の同定実験を進める予定である。

(3) まず、無処置の Iba1(iCre/+);CAG-floxed STOP tdTomato マウスの脳を CUBIC 解析し、本マウスが脳に分布する常在性マクロファージ(ミクログリア、髄膜性マクロファージ、脈絡叢マクロファージ、血管周囲マクロファージ)を標識する系統であることを確認した。また、脳切片の免疫組織化学的解析を通じて、脳実質に位置する Iba1 陽性のミクログリアのほぼ全てが、tdTomato 陽性であることも確認した。次いで、本マウスを用いて作製した、薬剤塗布により誘発される慢性痒みモデルについて、脊髄と脳内におけるミクログリアを CUBIC 解析した。その結果、広範囲なミクログリア細胞数の増加が観察され、本細胞が活性化している様子を見出すことに成功した。加えて、ミクログリア以外の脳内常在性マクロファージの活性化の有無についても明らかにすることができた。また、慢性痒みモデルにおける脳内常在性マクロファージの活性化変化は、リポ多糖投与による全身性炎症モデルとは異なるものであった。現在、アトピー性皮膚炎モデルについても、同様の解析を進めている。さらに、透明化した組織からのオミクス解析を可能にするパイプラインを構築中であり、これらに反応するマクロファージ/ミクログリアの性格づけを行うことを計画している。

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 内田仁司
2. 発表標題 Whole brain imaging of Iba1-positive CNS macrophage
3. 学会等名 第10回生理研-霊長研-新潟脳研合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田仁司
2. 発表標題 Three-dimensional imaging of brain macrophages
3. 学会等名 第11回生理研-霊長研-新潟脳研合同シンポジウム
4. 発表年 2022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
研究分担者	岡田 峰陽  (Okada Takaharu)  (50452272)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ チームリーダー   (82401)	

	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	田井中 一貴  (Tainaka Kazuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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	三國 貴康  (Mikuni Takayasu)		
研究協力者	片貝 智哉  (Katakai Tomoya)		

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