

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17817

研究課題名(和文)免疫細胞と神経細胞の相互作用を標的とした難治性痒みの新規治療法の開発

研究課題名(英文)Possible roles of eosinophil-sensory nerve communication in itch

研究代表者

外山 扇雅 (Toyama, Sumika)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：50805893

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、感覚神経細胞と好酸球の共培養系を立ち上げた。感覚神経細胞と好酸球を共培養して経時的に観察した結果、感覚神経が有意に退縮しており、好酸球は有意に細胞死が誘導されていた。また、活性化好酸球ではケモカイン及び接着因子の発現増加が認められた。Migration assayでは感覚神経細胞により好酸球の走化性が減弱した。以上の結果から、好酸球は感覚神経に向かって遊走するが感覚神経由来成分により走化性が減弱し、その場で感覚神経に接着した後に細胞死を起こし、神経線維を傷害したことにより、神経線維が退縮したと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで感覚神経と好酸球がAD炎症局所にそれぞれ存在していることは報告されていた。しかしながらこれらが近接している報告はなく、本研究結果により、両者が近接していることを確認した点で新規性及び独自性が高い。また共培養系の結果から、感覚神経線維に接着した好酸球は、その場で細胞死を起こし、神経線維を傷害することで感覚神経線維を退縮させると示唆された。本研究成果は、好酸球と感覚神経線維の相互作用を標的としたADの新規治療法に向け、将来的に本研究成果は社会貢献に繋がる発展性の高い研究といえる。

研究成果の概要(英文)：We set up a co-culture system of sensory neurons and eosinophils in this study. As a result of co-culture sensory nerve cells and eosinophils using this system, the sensory nerves regressed. In addition, then eosinophils promoted cell death. Moreover, activated eosinophils increased expression of chemokine and cell adhesion factors. In migration assay, sensory nerves attenuated the migration of eosinophils. From the above results, eosinophils migrate to lesion, but their motility is attenuated by the sensory nerve-derived components, and after adhering to the sensory nerves, cell death occurs and nerve fibers are damaged.

研究分野：免疫アレルギー学

キーワード：好酸球 感覚神経 アトピー性皮膚炎 痒み

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)は、増悪と寛解を繰り返し、強い痒みのある湿疹を主病変とする慢性炎症性皮膚疾患である。なかでも痒みは、様々な因子が複雑に絡み合って起こることから、抗ヒスタミン薬等の既存薬が奏功し難い『**難治性痒み**』であり、患者のQOL(Quality of Life)を著しく低下させる。難治性痒みを制御する方法は、申請者らのグループが開発に携わった - オピオイド受容体アゴニスト(ナルフラフィン)以外にはほとんど開発されておらず、疾患横断的な難治性痒みの新たな予防及び治療法の開発が切望されている。またADをはじめとするアレルギー性疾患の罹患率は年々増加傾向にあり、その病態解明と治療法の確立は世界的急務である。

このような背景の中で、申請者らはこれまでにADにおける難治性痒みの発症機序の解明を目指した研究を行ってきた。その過程で皮膚バリア機能が破綻した乾皮症やAD患者、またはそれらのモデルマウスにおいて神経伸長因子(NGF, アンフィレギュリン:AREG)の発現亢進ならびに神経を退縮させる神経反発因子(Sema3A, anosmin-1)の発現低下を見出し(Tominaga M & Takamori K, *Biol Pharm Bull.* 2013.) 多数の感覚神経線維が表皮内に侵入・増生していることを明らかにしてきた(Tominaga M & Takamori K, *J Dermatol.* 2014.)。皮膚バリア破綻による表皮内への神経線維の侵入・伸長は、神経伸長因子と神経反発因子のバランスの乱れによるものと考えられ、この感覚神経線維の稠密化が外部からの痒み刺激や免疫細胞が産生する起痒物質への受容を増加させ、痒み過敏や増強を引き起こすことが推定され、難治性痒みの一因と言われる。

ADの発症メカニズムについても不明点が多いが、その原因因子の一つとしてInterleukin(IL)-33が注目されている。IL-33は様々なアレルギー性疾患や自己免疫疾患に関与するIL-1ファミリーサイトカインの一つであり、ネクロシスに伴い活性を持つ全長のまま細胞外へ放出されることから、アラミン(警戒音)とも言われる。AD病態では、ケラチノサイトから放出されたIL-33が2型自然リンパ球(ILC2)に作用し、好酸球活性化サイトカインのIL-5やIL-13の産生を誘導する。これらのサイトカインにより、ADの炎症局所に好酸球が浸潤することから、好酸球やILC2がAD病態形成に関与することが示唆されているが(Imai Y et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013.) ADの痒みにおけるこれら免疫細胞の役割は不明である。また、好酸球は神経伸長因子であるNGFやAREGを産生することから(Kobayashi H et al. *Blood.* 2002., Matsumoto K et al. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009.) AD皮膚における神経線維の増生にも関与することが推定される。マスト細胞由来プロテアーゼであるトリプターゼは起痒因子であることが知られており(Ui H et al. *Eur J Pharmacol.* 2006.) 神経線維に発現するプロテアーゼ活性化受容体-2(PAR-2)を介して作用して痒みを誘発することが推定されるが、感覚神経線維とその他の免疫細胞の相互作用の詳細は未解明である。申請者らは、IL-33によって活性化されたマスト細胞が制御性T細胞(Treg)を選択的に増殖させるというTregの新規誘導機構も見出してきた。増殖したTregは抑制性サイトカインであるIL-10を産生し、ILC2の分化・増殖を制御することで、好酸球性炎症を抑制する(Morita H & Toyama S et al. *Immunity.* 2015.) また、申請者のこれまでの予備検討により、ADモデルマウス及び患者皮膚において、好酸球と感覚神経線維が近接していることを確認しており、また、ADモデルマウス皮膚にはコントロールマウスと比べてTregが減少していることも見出して出している。以上のことから、ADのような好酸球性炎症に対し、好酸球及びILC2を標的にIL-10による治療も考えられるが、その効果は未知である。

このように、これまでADにおける感覚神経線維あるいは免疫細胞各々に着目した研究は数多く行われてきた。しかしながら、AD病変部における免疫細胞の相互の関係性や神経細胞等の非免疫細胞への作用等、詳細な役割に関する報告は断片的であり、特に痒みにおける役割は不明瞭である。以上の背景から、感覚神経線維と好酸球等の免疫細胞はAD炎症局所で接触し、相互に作用している可能性が高いと仮説を立てた。好酸球をはじめとする免疫細胞が神経細胞の興奮及び起痒に関与する可能性が考えられ、免疫細胞及びその分化・増殖を制御するサイトカインを制御することが新たな治療法に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

これまで、AD局所における感覚神経の増生及び好酸球やILC2をはじめとする免疫細胞の浸潤が明らかとなっている。ここから、**感覚神経線維と免疫細胞は炎症局所で接触し、相互に作用している可能性が高い**と仮説を立てた。

そこで本研究では、免疫細胞、特に好酸球及びその分化・活性化を制御するILC2に着眼し、共培養系による**免疫細胞と感覚神経線維の接触による相互作用**の解析により、ADにおける痒み発現発症メカニズムの解明と、新規治療法及び予防法の開発を目指し、研究を行った。

3. 研究の方法

(1)-1 マウスの後根神経節 (DRG) 細胞と骨髄由来好酸球 (BMEos) の共培養

マウスからDRG細胞を摘出し、酵素及びコラゲナーゼ (Type2) 処置を行った後、DRG細胞を分散培養した。

好酸球は、骨髄をマウス大腿骨から採取し、リコンビナント (r) SCF及びFlt3-Ligand存在下で4日間、IL-5存在下で6日以上培養することで誘導した (BMEos)。BMEosはrIL-33存在下で15分培養することで炎症部位に遊走した活性化好酸球を模倣した。

誘導したBMEosをPBSでよく洗浄し、分散培養したDRG細胞と共培養を行い、72時間まで経時的に観察を行った。

(1)-2 ヒトiPS細胞由来末梢神経細胞とヒト末梢血由来好酸球の共培養

理研 BRC より提供を受けた 201B7 株を用い、iPS 細胞 (hiPS) を培養した。

申請者が確立した方法により (Umehara Y & Toyama S et al. *Sci rep.* 2020.) 神経堤 (Neural Crest:NC) 細胞を誘導し、さらに hiPS-derived NC 細胞から末梢神経細胞を誘導した。

好酸球は末梢血から比重遠心及び免疫磁気ビーズを用いて分離し、蛍光色素 (CFSE) にて標識した後、rIL-5 存在下で 15 分培養し、活性化させた。

分離した好酸球をよく洗浄した後、誘導した末梢神経細胞と共培養を行い、72 時間まで経時的に観察を行った。

共培養 72 時間後に上清を取り除き、PBS にてよく洗浄した後、PI にて染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

(2) BMEos 及びヒト末梢血由来好酸球の遺伝子発現変化

BMEos 及びヒト末梢血由来好酸球を上記同様に分離し、rIL-33 及び IL-5 にて 15 分間インキュベートした。

細胞を回収しよく洗浄した後に、ISOGEN を加えて RNA を抽出し、その後 cDNA を合成した。各種プライマーを用いて qPCR を行い、遺伝子発現変化を検討した。

(3) 感覚神経に対する好酸球の遊走能の検討

ヒト iPS 細胞由来末梢神経細胞を (1) -2 同様に誘導し、ヒト末梢血由来好酸球は (1) -2 同様に分離・活性化した。

ヒト iPS 細胞由来末梢感覚神経細胞を播種したプレートにトランスウェルを設置し、分離した好酸球をトランスウェルに加え、37 °C で 2 時間培養した。コントロールとして感覚神経細胞の代わりに Eotaxin-1 を添加した培地を入れた。

トランスウェルを外し、プレートを遠心し、上清を除去した後に、Lysis Buffer にて細胞を溶解した。

好酸球ペルオキシダーゼの基質である o-フェニレンジアミン二塩酸塩 (OPD) を加え、490nm の吸光度を測定し、遊走した好酸球を定量した。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) 神経線維と好酸球の共培養

DRG細胞とBMEosを共培養し、経時的に観察した結果、神経線維が共培養後72時間後に有意に短くなっており、好酸球成分により退縮することが示唆された。そこで、ヒトiPS細胞由来感覚神経細胞と末梢血由来好酸球を同様に共培養し、72時間タイムラプス動画撮影を行った。その結果、好酸球の標識として使用したCFSEが共培養後数時間で検出できなくなった。CFSEは蛍光色素として細胞内に長時間留まることから、細胞分裂追跡に使用されるが、末梢血中好酸球が細胞分裂することは考えにくく、本研究では好酸球の標識として使用した。しかしながらCFSEの蛍光が検出できなくなることから、好酸球の細胞死が促進されたのではないかと考えた。そこで、共培養後に上清を取り除き、よく洗浄した後にPIにて染色を行った。その結果、活性化好酸球は、未処置好酸球と比べて有意に細胞死が誘導されていた。

(2) BMEos及びヒト末梢血由来好酸球の遺伝子発現変化

実験 (1) の結果から、活性化好酸球が神経線維と接触すると好酸球の細胞死が誘導され、好酸球成分が放出されることにより神経線維が退縮したことが推測された。そこで、好酸球活性化による遺伝子発現変化を調べ、神経線維との作用点を予測することにした。その結果、活性化BMEosではCCL2、ヒト末梢血由来活性化好酸球ではCCR3の発現が増加した。また、接着因子であるVLA-4及びL-selectinの発現も増加傾向が認められた。一方で神経伸長因子であるAREGやNGFの発現は活性化により変化はなく、好酸球において神経退縮因子であるSema3Aの発現は認められ

なかった。

以上の結果から、好酸球は感覚神経に向かって遊走し、接着した後に細胞死を起こし、神経線維を傷害したことにより、神経線維が退縮したと示唆された。

(3) 感覚神経に対する好酸球の遊走能の検討

実験(2)の結果から、好酸球の活性化により走化性が高まり、接着因子によって神経線維に好酸球が接着し、作用する可能性が考えられた。そこで感覚神経に対する好酸球の遊走能を調べるため、トランスウェルを用いた Migration assay を行った。Lower well に培地のみを入れた場合、未処置好酸球に比べ、活性化好酸球は有意に Upper well から Lower well に遊走する。Lower well に感覚神経細胞を入れた場合も同様の結果が得られたが、培地のみと比較すると全体的に遊走した好酸球数は減少した。

以上のことから、好酸球は活性化に伴い感覚神経に向かって遊走するが、感覚神経は好酸球の遊走を減弱させる因子を産生していることが考えられた。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまで感覚神経と好酸球がAD炎症局所にそれぞれ存在していることは報告されていた(Imai Y et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013., Tominaga M & Takamori K, *J Dermatol*. 2014.)。しかしながらこれらが近接している報告はなく、本研究結果により、両者が近接していることを確認した点で新規性及び独自性が高い。

また、好酸球は神経伸長因子を恒常的に発現していることがこれまでに報告されており(Kobayashi H et al. *Blood*. 2002., Matsumoto K et al. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009.)。好酸球が感覚神経線維の伸長及び増生に関与していることが予想された。しかしながら、共培養系により、好酸球と共培養した感覚神経線維は退縮していることが確認された。そこで、好酸球における神経反発因子の発現を調べたが、その発現は認められず、好酸球活性化に伴った神経伸長因子の発現増加も認められなかった。以上のことから、好酸球は感覚神経線維の伸長及び退縮に直接的には関与していない可能性が示唆された。一方で、活性化好酸球はケモカインや接着因子の発現増加が認められたことから、炎症局所において、好酸球は感覚神経線維に向かって遊走し、接着することで作用すると考えられた。また、共培養時に活性化好酸球は細胞死が促進していることから、感覚神経線維に接着した好酸球は、その場で細胞死を起こし、神経線維を傷害することで、感覚神経線維を退縮されたと推測された。通常活性化好酸球は、生存延長することにより長い期間局所に留まり炎症を増悪させるが、本研究結果では、好酸球の寿命が縮まっており、以上の結果は、炎症局所での好酸球と感覚神経線維の相互作用の詳細を明らかにする糸口となり得る。

本研究成果は、好酸球と感覚神経線維の相互作用を標的としたADの新規治療法に向け、将来的に本研究成果は社会貢献に繋がる発展性の高い研究といえる。

今後の展望

感覚神経線維と好酸球を共培養することで、好酸球の細胞死が促進されていた。そこで、Hoechst及びエチジウムホモダイマー-1、Caspase 3 / 7にて染色を行った好酸球を感覚神経細胞と共培養を行い、経時的撮影をする。画像解析により、半定量を行い、好酸球の細胞死の種類を特定する。

また、好酸球の遊走能は感覚神経線維によって減弱することが示唆されていた。そこで、好酸球の遊走を減弱させる因子を同定する。具体的方法は、感覚神経線維の培養上清を回収し、熱処理を行う。熱処理を行った培養上清及び未処理培養上清をトランスウェルのLower wellに入れ、好酸球のMigration Assayを行うことで、好酸球に作用する因子がタンパク質であるかどうかを判断する。その後、感覚神経線維の培養上清をサイトカイン、プロテアーゼアレイにかけ、好酸球の遊走阻害因子を同定する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Umehara Yoshie, Toyama Sumika, Tominaga Mitsutoshi, Matsuda Hironori, Takahashi Nobuaki, Kamata Yayoi, Francois Niyonsaba, Ogawa Hideoki, Takamori Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Robust induction of neural crest cells to derive peripheral sensory neurons from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60036-z	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 Kamata Yayoi, Tominaga Mitsutoshi, Umehara Yoshie, Honda Kotaro, Kamo Atsuko, Moniaga Catharina Sagita, Komiya Eriko, Toyama Sumika, Suga Yasushi, Ogawa Hideoki, Takamori Kenji	4. 巻 S0022-202X(20)
2. 論文標題 Calcium-inducible MAPK/AP-1 signaling drives semaphorin 3A expression in normal human epidermal keratinocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 30004-X
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.01.001	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 Unno Hirotooshi, Arae Ken, Matsuda Akira, Ikutani Masashi, Tamari Masato, Motomura Kenichiro, Toyama Sumika, Suto Hajime, Okumura Ko, Matsuda Akio, Morita Hideaki, Sudo Katsuko, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Nakae Susumu	4. 巻 533
2. 論文標題 Critical role of IL-33, but not IL-25 or TSLP, in silica crystal-mediated exacerbation of allergic airway eosinophilia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 493 ~ 500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.09.046	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11件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Toyama S, Ogawa H, Suga Y, Tominaga M, Takamori K.
2. 発表標題 ossible roles of eosinophil-sensory nerve communication in atopic dermatitis.
3. 学会等名 第15回 Tokyo Scientific Forum for Atopic Dermatitis and Psoriasis (TAP) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Komiya E, Hatano R, Itoh T, Otsuka H, Kamata Y, Honda K, Toyama S, C, Ohnuma K, Tominaga M, Morimoto C, Takamori K.
2 . 発表標題 Possible regulation of mechanical itch by CD26/DPPIV.
3 . 学会等名 The 10th World Congress on Itch, Sydney (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Honda K, Kamo A, Moniaga C, Komiya E, Toyama S, Suga Y, Takamori K.
2 . 発表標題 Calcium/MEK1/2/AP-1 signaling axis induces semaphorin 3A expression in normal human epidermal keratinocytes.
3 . 学会等名 The 10th World Congress on Itch, Sydney (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Komiya-Suyama E, Hatano R, Itoh T, Otsuka H, Kamata Y, Honda K, Toyama S, Moniaga C, Ohnuma K, Tominaga M, Morimoto C, Takamori K.
2 . 発表標題 Possible role for CD26/DPPIV in regulating mechanical itch (Alloknesis)
3 . 学会等名 28th European Academy of Dermatology and Venereology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Honda K, Kamo A, Toyama S, Suga Y, Takamori K.
2 . 発表標題 Elucidation of the signaling pathway involved in Sema3A gene expression in normal human epidermal keratinocytes.
3 . 学会等名 28th European Academy of Dermatology and Venereology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 古宮栄利子、波多野良、富永光俊、伊藤匠、鎌田弥生、本田耕太郎、外山扇雅、カタリナ サギタ モニアガ、大沼圭、森本幾夫、高森建二
2. 発表標題 CD26/ dipeptidyl-peptidase IVは機械的かゆみの抑制因子である
3. 学会等名 日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyama S, Sato-Fukami R, Ogawa H, Suga Y, Tominaga M, Takamori M.
2. 発表標題 Possible roles of eosinophil-sensory nerve communication in atopic dermatitis.
3. 学会等名 第118回 日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyama S, Moniaga C, Tominaga M, Ogawa H, Takamori K.
2. 発表標題 Kinetic analysis of regulatory T cells in skin barrier disruption.
3. 学会等名 第45回 日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Komiya E, Hatano R, Itoh T, Honda K, Kamata Y, Toyama S, Moniaga C, Otsuka H, Ohnuma K, Tominaga M, Morimoto C, Takamori K.
2. 発表標題 Endomorphin preferentially induces mechanical allodynia under the enzymatic control of DPPIV.
3. 学会等名 第45回 日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田弥生、富永光俊、本田耕太郎、Catharina Sagita Moniaga、古宮栄利子、外山扇雅、高森建二
2. 発表標題 カルシウムイオン濃度は正常ヒト表皮におけるセマフォリン3A遺伝子の発現制御に関与する
3. 学会等名 第38回サイトプロテクション研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toyama S, Moniaga C, Tominaga M, Takamori K.
2. 発表標題 Regulatory T cells (Tregs) modulate skin homeostasis to release inhibitory cytokines.
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 富永光俊、外山扇雅、古宮栄利子、鎌田弥生、高森建二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨床皮膚科医会雑誌	5. 総ページ数 7
3. 書名 痒みのメカニズム～皮膚から脊髄まで～	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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