

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07081

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎における好塩基球を介した痒み発生機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of itching mediated by basophils in atopic dermatitis and application to clinical treatment

研究代表者

安東 嗣修 (ANDOH, Tsugunobu)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：50333498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の痒みの発生に好塩基球並びにそこから遊離される因子に関与するか、アトピー性皮膚炎マウスモデルを用いて検討した。アトピー性皮膚炎マウスモデル皮膚では、健康皮膚と比べて好塩基球が増加していた。アトピー性皮膚炎マウスモデルへの好塩基球除去抗体の投与により自発的搔き動作が減少した。好塩基球から遊離されるセリンプロテアーゼなど痒み反応を誘発したが、レチノイン酸などは痒み反応を誘発しなかった。さらに、線維芽細胞から遊離されるエオタキシンが、好塩基球の遊走に寄与する可能性を見出した。以上のことから、アトピー性皮膚炎皮膚において増加した好塩基球がその痒み寄与することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎は、慢性の炎症性皮膚疾患であり、その症状に非常に耐え難い「痒み」がある。痒みによる搔爬は、皮膚炎のさらなる悪化に加え、不眠やそれに伴う労働生産性の低下などが問題となっている。したがって、痒みの抑制は非常に重要であるが、古くから痒みの発生に関与するとされるマスト細胞からのヒスタミンに対する抗ヒスタミン薬はアトピー性皮膚炎の痒みに無効である場合が多く、新規の痒み因子の探索が望まれている。本研究により、アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序に新たに好塩基球が重要であること、そこから遊離される因子が痒みの発生に寄与することを見出したことは、学術的にも社会的にも意義あるものである。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of atopic dermatitis, we investigated whether basophils and factors released from them are involved in the development of itching in atopic dermatitis. When compared with that of the skin in healthy mice, the number of basophils was significantly increased in the skin of mice with atopy-like dermatitis. An antibody for the depletion of basophils attenuated the spontaneous itch-related responses in mice with atopy-like dermatitis. Serine proteases released from basophils induced itching, but retinoic acid did not. Furthermore, we found the possibility that eotaxin released from fibroblasts contributes to the migration of basophils. Taken together, it is suggested that increased basophils and their mediators contribute to itching in atopic dermatitis.

研究分野：薬理学

キーワード：アトピー性皮膚炎 痒み 好塩基球 セリンプロテアーゼ エオタキシン レチノイン酸 ヒスタミン セロトニン

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、皮膚科領域において難治性掻痒性皮膚疾患として位置づけられている。厚生労働省の2014年調査によると全国で約46万人のアトピー性皮膚炎患者が通院治療を受けており、通院していない患者も含めればそれ以上に多いと推定される。アトピー性皮膚炎患者の症状は、主に痒みと皮膚炎、皮膚の乾燥が挙げられる。この中で、特に痒みに関しては、60%以上の患者が非常に激しい痒みを訴え、睡眠障害、重度のストレスを与え、社会生活に支障(労働生産性の低下)をきたしている。さらに、痒みはストレスを誘発するだけでなく、皮膚への搔爬(搔は: 掻くこと)は、皮膚症状の更なる悪化を導く。したがって、痒みの抑制は、アトピー性皮膚炎の治療の最優先課題となっている。しかしながら、痒み治療の第一選択薬である抗ヒスタミン薬は、アトピー性皮膚炎の痒みに対して抵抗性を示す場合が多く、マスト細胞-ヒスタミン系以外の新たな痒みの発生機序並びに鎮痒薬開発のための標的因子の探索が急務となっている。

好塩基球は、健常の血液中に0~2%しか存在しないが、最近の研究ではアレルギー疾患に関して重要な役割を担っていることが報告されている。その一方で、好塩基球のアトピー性皮膚炎の痒みへの関与に関しては、ほとんど知られていない。

## 2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎マウスモデルの皮膚病理解析により、健常マウス皮膚と比べ、好塩基球が増加していることをこれまで見出してきた。そこで、アトピー性皮膚炎の痒みへの役割が殆ど解明されていない好塩基球の役割と痒みの発生機序の詳細をアトピー性皮膚炎マウスモデルを用いて解明し、臨床における痒み治療への情報を提供することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 〔実験動物〕

実験には、雄性のNC系マウスを用いた。NC系マウスは、微生物等制御された specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育すると健常状態を保つ(健常NCマウス)が、微生物等制御されていない conventional 環境下でダニを寄生させることで、アトピー様皮膚炎と激しいかゆみ反応を示すようになる(皮膚炎NCマウス)。本実験動物を用いた実験は、富山大学並びに金城学院大学動物実験委員会による承認を得て行った。



### 〔行動実験〕

薬物を吻側背部に皮内注射する場合は、実験の前日までに健常NCマウスの吻側背部の毛を除毛した。実験当日には、マウスを4つに区画された観察用アクリルケージ(13X9X35cm/区画:1区画あたりマウス1匹)に入れ、30分以上撮影環境に馴化させた。その後、吻側背部に薬物を皮内注射し、観察用アクリルケージに入れ、無人環境下にマウスの行動をデジタルビデオカメラで撮影した。ビデオの再生により、後肢による薬物注射部位への搔き動作をカウントした。皮膚炎NCマウスを用いた実験では、馴化をすることなくマウスを観察用アクリルケージにいれ、デジタルビデオカメラで撮影した。ビデオの再生により、後肢による全身への搔き動作をカウントした。マウスは、1秒間に数回搔くので足を挙げて降ろすまでの一連の搔き動作を搔き動作の1回としてカウントした。

### 〔皮膚組織の摘出〕

マウスは、麻酔下、開胸後、右心房(右心葉)を切開し、左心室よりリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で灌流し、脱血死させた。その後、吻側背部を除毛し、皮膚を摘出し、一部は4%パラホルムアルデヒドに浸した。その他の皮膚は、-80℃で保管した。

### 〔組織染色〕

4%パラホルムアルデヒドに浸した皮膚組織は、30%スクロース溶液に数日浸した。その後、OCTコンパウンドで包埋し、-80℃で保管した。続いて、クリアオスタットを用いて、切片を製作した。その後、常法に従って、蛍光免疫組織化学染色並びにトルイジンブルー染色を行った。

#### 〔線維芽細胞初代培養〕

マウスは、麻酔下、開胸後、右心房（右心葉）を切開し、左心室より PBS で灌流し、脱血死させ、除毛後、皮膚を摘出した。皮膚は、常法に従って、ディスパーゼ並びにコラゲナーゼで処理し、細胞を取得した。細胞は、10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地を用いて培養した。

#### 〔ウエスタンブロッティング〕

-80 に保管していた皮膚並びに線維芽細胞初代培養より、各種プロテアーゼ阻害薬含有タンパク質抽出液にて、タンパク質を抽出し、定量後、SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。その後、タンパク質を PDEF メンブランに転写後、常法に従って、1 次抗体並びに horseradish peroxidase が結合した 2 次抗体と反応させ、Enhanced Chemiluminescence 溶液と反応させ、生じた発光を検出した。

#### 〔リアルタイム PCR〕

スフィンゴシルホスホリルコリンで刺激した線維芽細胞初代培養より、常法に従って RNA を TRIzol reagent（インビトロジェン）並びに NucleoSpin RNA（タカラバイオ株式会社）を用いて抽出した。NanoDrop を用いて定量後、Primer Script RT Master Mix（タカラバイオ株式会社）にて cDNA を作製した。その後、SYBR Premix Ex Taq（タカラバイオ株式会社）を用いて、Mx3000P Real-Time QPCR System を用いてリアルタイム PCR を行った。使用したプライマーは、以下のとおりである：

Eotaxin: (sense) CCAAGGACTTGGCTTCATGTAG  
(anti-sense) ATTCTGGCTTGGCATGGTAGC  
GAPDH: (sense) CCAAGGTCATCCATGACAAC  
(anti-sense) TTACTCCTTGGAGGCCATGT

## 4. 研究成果

#### 〔皮膚炎 NC マウスの痒みへの好塩基球の関与〕

健常 NC マウスと比べ、皮膚炎マウスの皮膚において、マスト細胞数は 3 倍の増加に対して、好塩基球は 60 倍増加していた。また、好塩基球のマーカータンパク質の発現も、健常 NC マウス皮膚では検出されなかったが、皮膚炎 NC マウス皮膚において明らかな発現の増加が認められた。さらに、皮膚炎 NC マウスにおいて、好塩基球除去抗体の投与により、皮膚内の好塩基球の減少に加え、自発的掻き動作が減少した。一方、好塩基球除去抗体は、マスト細胞数には影響しなかった。以上の結果から、アトピー様皮膚炎を誘発する皮膚炎 NC マウスの自発的掻き動作に、好塩基球が関与することが示唆される。

#### 〔好塩基球から遊離される因子と痒み反応〕

塩基球から遊離が想定される因子を健常 NC マウスの吻側背部に皮内注射することで、痒み反応（掻き動作）が惹起されるか検討した。セリンプロテアーゼやセロトニンの健常マウスへの皮内注射は、健常 NC マウスに痒み反応を惹起した。その一方で、ヒスタミン、レチノイン酸（及びその関連代謝物）、ストローマ細胞由来因子は惹起しなかった。ヒスタミンは、代表的な痒み因子として知られているが、健常 NC マウスでは掻き動作は惹起しなかった。また、皮膚炎 NC マウスにおいても、抗ヒスタミン薬であるテルフェナジンは、自発的掻き動作を抑制しなかった。このことは、本マウスの種では、痒み発生への重要な役割を担っていないと考えられる。これまでに我々は、皮膚炎 NC マウスの自発的痒み反応にプロテアーゼ活性化受容体 2 が関与していることを報告してきた。本受容体は、セリンプロテアーゼによって活性化される。したがって、好塩基球から遊離されたセリンプロテアーゼがプロテアーゼ活性化受容体 2 を活性化して痒み反応を誘発した可能性がある。以上の結果から、セリンプロテアーゼ及びセロトニンが、少なくともアトピー性皮膚炎の痒みの発生に寄与している可能性が示唆される。

#### 〔皮膚炎 NC マウスの痒みへのセロトニンの関与〕

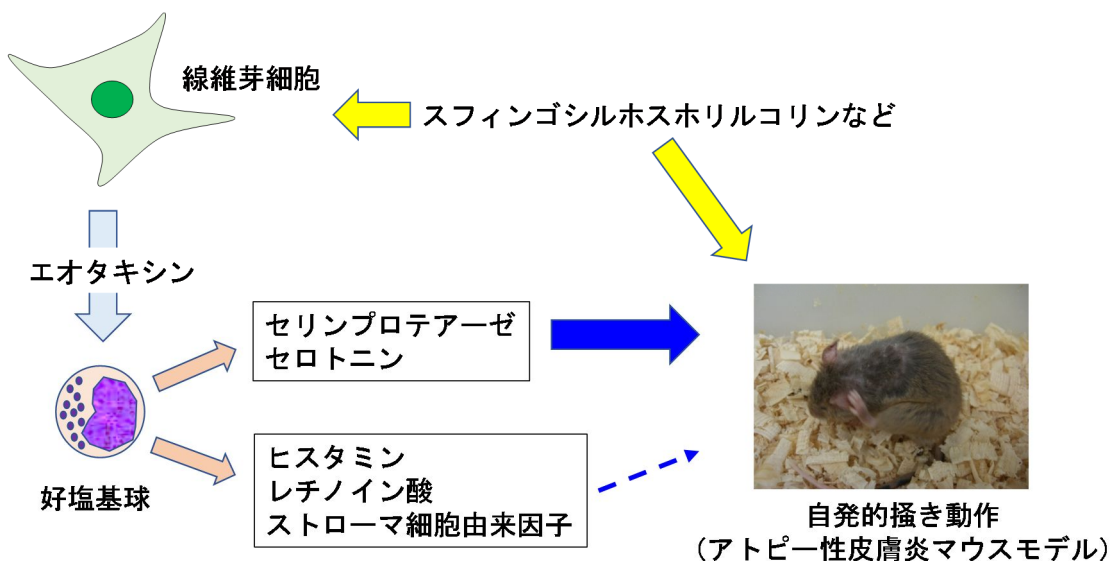
健常 NC マウスへのセロトニンの皮内注射は、掻き動作を誘発した。また、皮膚炎 NC マウスの自発的引っ掻きはメチセルジド（5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬）によって抑制されたが、シプロヘプタジン（5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬）やオンダンセトロン（5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬）では抑制されなかった。 $\alpha$ -メチル-5-HT（5-HT<sub>2</sub> 受容体アゴニスト）または BW723 C86（5-HT<sub>2B</sub> 受容体アゴニスト）の健常 NC マウスへの皮内注射は痒み反応を惹起したが、KM-212（5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニスト）では惹起しなかった。以上の結果から、5-HT<sub>2B</sub> 受容体が皮膚炎 NC マウスにおける自発的引っ掻きの誘発に関与している可能性があることを示唆する。

〔線維芽細胞とエオタキシン〕

エオタキシンは、好塩基球の遊走に寄与していることが知られている。そこで、皮膚炎 NC マウス皮膚で増加している脂質異常代謝物であるスフィンゴシルホスホリルコリンが線維芽細胞におけるエオタキシンの発現を増加させるか検討した。健常 NC マウス皮膚より単離した線維芽細胞初代培養は、vimentin を発現していることで線維芽細胞であることを確認した。スフィンゴシルホスホリルコリンの、マウス線維芽細胞初代培養への適用により、エオタキシン mRNA の発現を増加させた。このことは、スフィンゴシルホスホリルコリンが好塩基球の集積に重要な役割を担っていることを示唆する。

〔まとめ〕

本研究では、アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与に関して、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルを用いて検討した。皮膚炎マウスモデル皮膚では、マスト細胞の増加に比べ好塩基球の増加率が大きく、好塩基球除去抗体の投与は皮膚炎マウスの自発的掻き動作を減弱させた。また、好塩基球から遊離が想定されるセリンプロテアーゼやセロトニンの健常マウスへの皮下注射は、痒み反応を惹起したが、ヒスタミンやレチノイン酸、ストローマ細胞由来因子は惹起しなかった。さらに好塩基球の皮膚内集積に関しては、皮膚炎マウスの皮膚での増加が認められるスフィンゴシルホスホリルコリンの線維芽細胞への作用によるエオタキシンの産生増加が寄与している可能性が示された。以上の結果(下図)は、アトピー性皮膚炎の痒みに好塩基球並びにそこから遊離される因子が関与することを示唆する。したがって、これまで注目されていなかった好塩基球やそこから遊離される因子が新規鎮痒開発や治療薬選択のターゲットとなりうると思われる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Andoh Tsugunobu, Shimizu Tadamichi, Toyoda Masahiko, Maeda Manabu	4. 巻 9
2. 論文標題 Kampo medicine in the field of dermatology: basic and clinical aspects “1st International Symposium on Kampo Medicine”	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 115～116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tkm2.1322	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 Andoh Tsugunobu, Yoshihisa Yoko, Rehman Mati Ur, Tabuchi Yoshiaki, Shimizu Tadamichi	4. 巻 185
2. 論文標題 Berberine induces anti-atopic dermatitis effects through the downregulation of cutaneous EIF3F and MALT1 in NC/Nga mice with atopy-like dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114439～114439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2021.114439	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 安東 嗣修	4. 巻 56
2. 論文標題 皮膚におけるかゆみの調節機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 822～824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.56.9_822	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 安東 嗣修	4. 巻 75
2. 論文標題 好塩基球と皮膚掻痒症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 164～167
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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安東嗣修、田淵圭章、清水忠道
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎マウスモデルにおける皮膚炎並びに痒み反応へのberberineの効果
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsugunobu Andoh
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of Anti-Atopic Dermatitis Effects of Orengedokuto
3. 学会等名 1st International Symposium on Kampo Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 皮膚における痒みのメカニズム
3. 学会等名 第73回日本皮膚科学会中部支部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 ケラチノサイト由来の痒みについて
3. 学会等名 第52回日本皮膚免疫アレルギー学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 「かゆみ」の基礎について
3. 学会等名 第4回日本アレルギー学会東海地方会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安東嗣修, 吉久陽子, 清水忠道
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎マウスモデルにおける皮膚炎並びに痒み反応への黄連解毒湯の効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎とかゆみ
3. 学会等名 Excellence in Dermatology-1st AD Form-（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎とかゆみのメカニズム
3. 学会等名 第25回東海皮膚病理研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎とかゆみのメカニズム
3. 学会等名 2021皮膚科スキルアップセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序に関する最近の話題
3. 学会等名 皮膚とかゆみの研究会in富山2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東嗣修，大崎岳史，歌大介，久米利明，倉石泰
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルマウスの自発的搔痒反応へのセロトニン受容体サブタイプの関与
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（於：札幌）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎における痒みのメカニズム
3. 学会等名 第71回日本皮膚科学会中部支部（招待講演）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 安東嗣修
2. 発表標題 脂質メディエーターと痒み
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～難治性 かゆみの克服を目指して～（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究協力者	烏山 一  (KARASUYAMA Hajime)		
研究協力者	二宮(小畑) 一茂  (OBATA-NINOMIYA Kazushige)		
研究協力者	中林 数馬  (NAKABAYASHI Kazuma)		
研究協力者	羽座 沙都美  (HAZA Satomi)		
研究協力者	朝井 綾菜  (ASAI Ayana)		

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	倉石 泰  (KURAIISHI Yasushi)		
研究協力者	清水 忠道  (SHIMIZU Tadamichi)		

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