

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07088

研究課題名（和文）乾癬に付随した難治性のかゆみの分子基盤解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of intractable itch associated with psoriasis

研究代表者

雑賀 史浩（Saika, Fumihito）

和歌山県立医科大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：10644099

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、イミキモド誘発乾癬掻痒モデルマウスを作製し、慢性掻痒における脊髄内痒み伝達機構におけるガストリン放出ペプチド（Gastrin-releasing peptide: GRP）- GRP受容体（GRPR）システムの役割に着目した。化学遺伝学的手法（DREADD）やターゲットトキシンによりGRP-GRPRシステムを制御すると、乾癬モデルマウスにおける痒みが抑制された。このように、乾癬による慢性的な痒みにおいてもGRP-GRPRシステムが重要な役割を果たすことから、慢性掻痒治療において有望な治療戦略になりう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

慢性掻痒症では、患者のQOLは著しく損なわれ、就業、学業などに大きな影響を与える。持続する痒みはさらに不眠や抑うつなどの心理的ストレスを惹起し、高血圧などの生活習慣病のリスクを上昇させるなどのことから、早期の対処が必須である。しかし、従来の治療薬が奏効しないため、現在、新しい着眼点に基づく新規抗掻痒薬の開発が求められている。本研究では、乾癬モデルマウスの慢性的な痒みの病態分子基盤における脊髄GRP-GRPRシステムの役割を明らかにした。この結果は、慢性掻痒症に対する新たな治療法の可能性を示唆するものであり、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated imiquimod-induced psoriasis model mice and focused on the role of the gastrin-releasing peptide (GRP)-GRP receptor (GRPR) system in the spinal itch transmission mechanism in chronic itch. Controlling the GRP-GRPR system by chemical genetic techniques (DREADD) and targeted toxins suppressed itch in the psoriasis model mice. Thus, the GRP-GRPR system also plays an important role in chronic itch caused by psoriasis, suggesting that it may be promising therapeutic strategy for the treatment of chronic itch.

研究分野：神経薬理学

キーワード：乾癬 かゆみ 脊髄 ガストリン放出ペプチド DREADD ミクログリア

## 1. 研究開始当初の背景

痒みは皮膚における潜在的な有害刺激を排除するための警告系であり、“掻きたい”という衝動を伴う不快な感覚である。特にアトピー性皮膚炎や乾癬などの慢性皮膚疾患に付随する病的な痒みは QOL を著しく損なうとともに、掻破行動自体が皮膚症状(掻痒、紅斑、皮膚の浸潤・肥厚や鱗屑など)を増悪させることから治療に難渋する場合が多い。これまでの研究から、アトピー性皮膚炎等の疾患については徐々にエビデンスが蓄積されているが、乾癬の痒みに関する研究はほとんど進展していない。乾癬の推定患者数は世界で1億人以上、我が国においても数十万人に及ぶと推計されており、その多くは従来の治療薬が奏効しない難治性の痒みに悩まされていることから、新しい着眼点に基づく新規抗掻痒薬の開発が世界規模で求められている。

## 2. 研究の目的

痒みの研究はその原因である皮膚に着目して行われてきた経緯があるが、皮膚において生じた痒み情報は一次知覚神経(C線維)で受容され、脊髄で統合・修飾され、脳へと伝達される。2007年にガストリン放出ペプチド(Gastrin-releasing peptide: GRP)が脊髄における痒み特異的な伝達物質であることが報告されて以降、痒み研究は大きく発展している。本研究では、乾癬病態モデル動物や遺伝子改変マウスを用い、脊髄内痒み伝達機構におけるガストリン放出ペプチド(Gastrin-releasing peptide: GRP)-GRP受容体(GRPR)システムが病的な痒みの分子基盤であることを検証するとともに、さらなる新規脊髄内調節因子について評価を行った。加えて、慢性疼痛との関連を示唆する多くの報告があるミクログリアのかゆみの調節における役割について乾癬掻痒マウスモデルを用い、免疫組織化学解析や遺伝子発現解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) イミキモド(IMQ)誘発乾癬モデルマウス

イソフルラン麻酔下、マウスの頸背部を剃毛後、62.5 mgのベセルナクリーム(5% IMQ)を反復塗布することにより乾癬様モデルマウスを作製した。痒みの評価には、マウスが後肢で頸背部を引っ掻く行動(Scratching)の回数を測定し、痒みの程度の指標とした。

### (2) DREADD 発現マウス

GRP-Cre マウスを ROSA26-STOP flox-hM4Di と交配させ、GRP 産生ニューロンにおいて Cre 依存的に変異型ヒトムスカリン受容体(hM4Di)を発現するマウスを作製した(GRP-Gi-DREADD)。コントロールマウスとしては、ROSA26-STOP flox-hM4Di を用いた(R26 hetero)。これらに選択的リガンドであるクロザピン-N-オキシド(CNO)を全身または局所投与し GRP 産生ニューロンを特異的に抑制させた際の、IMQ 誘発乾癬マウスの掻痒行動に及ぼす影響を行動解析にて評価した。

### (3) ターゲットトキシン

GRPR 陽性ニューロンを破壊するサポリン標識ボンベシンを IMQ 反復塗布開始 14 日前に脊髄くも膜下腔内(i.t.)投与し、IMQ 誘発乾癬マウスの掻痒行動に及ぼす影響を行動解析にて評価した。

#### (4) リアルタイム PCR

IMQ を反復塗布したマウス頸髄 (C3-C5) より総 RNA を抽出し、cDNA を作製した。SYBR Green の蛍光強度を指標とした定量的リアルタイム PCR を行い、GRP、GRPR およびミクログリアマーカーやミクログリア関連炎症性分子の mRNA 発現を定量化した。

#### (5) 免疫蛍光染色

IMQ 反復塗布によるミクログリア活性化について検討した。4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、摘出した頸髄 (C3-C5) の凍結組織切片を作製した。特異的抗体 (Iba1) を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にてミクログリアの発現を評価した。

### 4. 研究成果

(1) IMQ 反復塗布による乾癬モデルマウスの頸髄 (C3-C5) における GRP・GRPR 発現：

マウスに 5% IMQ を反復塗布 (10 日間) することで、塗布 4 日目頃から、皮膚の紅斑・肥厚や痂皮の落屑 (図 1a) とともに長期的な痒みの誘発を確認した (図 1b)。さらに、このかゆみ発現のスケジュールと一致した脊髄後角における GRP/GRPR mRNA の発現が塗布 7、10 日目に有意に増加していた (図 1c)。また、この IMQ 誘発乾癬モデルマウスの肥厚・硬化した皮膚において IL-1、IL4、CCL3、CCL4、F4/80 の著しい発現増加が認められた。

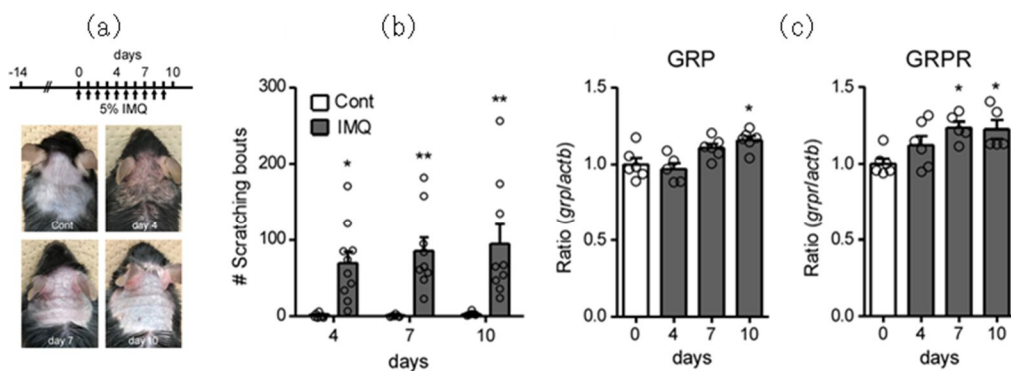


図1

(2) IMQ 誘発乾癬モデルマウスの脊髄内痒み伝達機構における GRP-GRPR システム：

GRP-Gi-DREADD マウスおよびコントロールマウスのいずれも IMQ 反復塗布 7 日目において有意な搔破行動の増加を認めた。

反復塗布 7 日目に両マウスに、CNO を腹腔内 (i.p.) または脊髄くも膜下腔内 (i.t.) 投与すると、コントロールマウスに比べ、GRP-Gi-DREADD マウスでは有意に搔破行動が減少した (図 2a)。このことから、乾癬病態モデルの搔痒誘発における脊髄 GRP 産生ニューロンの関与が示唆される。

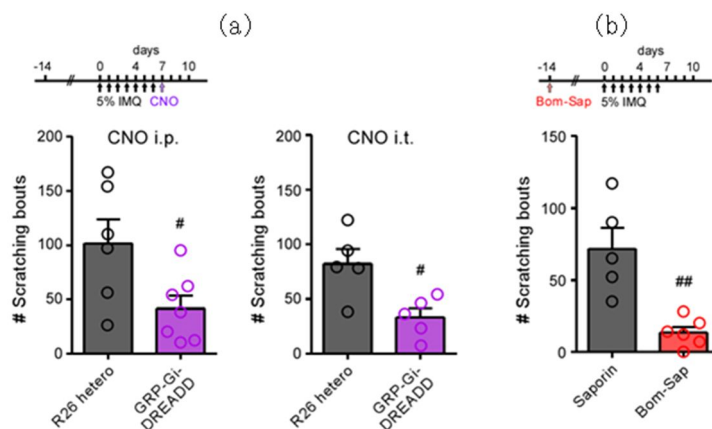


図2

IMQ 反復塗布開始前にサポリン標識ポンペシンを i. t. 投与し、脊髄後角の GRPR 陽性ニューロンを破壊したマウスでは、コントロールマウスに比べ、IMQ 誘発搔痒行動は顕著に抑制された( 図 2 b )。このことから、乾癬病態モデルの搔痒誘発における脊髄 GRPR 陽性ニューロンの関与が示唆される。

(3) IMQ 誘発乾癬マウスモデルと脊髄ミクログリア活性の特徴づけ：

IMQ 誘発乾癬モデルマウスの脊髄において、ミクログリアマーカー ( Iba1、CD11b ) やミクログリア関連炎症性分子 ( CCL2、TNF ) などの mRNA 発現増加 ( 図 3 ) および Iba1 抗体を用いた免疫組織化学染色によるミクログリアの数的/形態学的な活性化像 ( 図 4 ) を確認した。

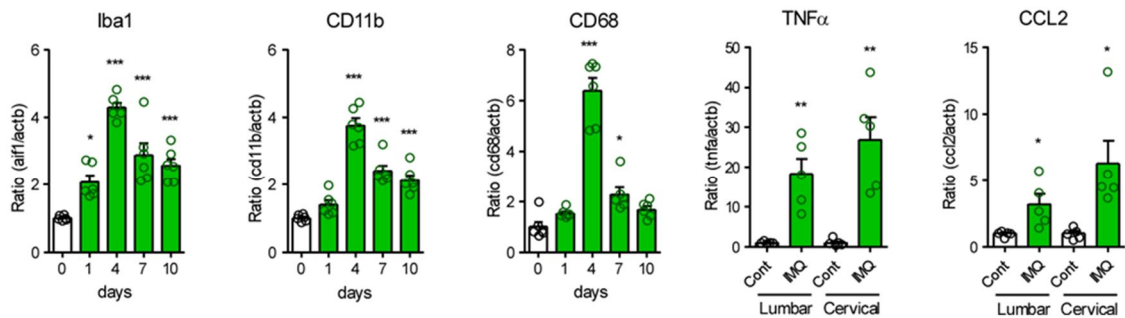


図3

まとめ：

本研究では、GRP-Gi-DREADD マウスを用いた GRP 産生ニューロンの活性抑制およびサポリン標識ポンペシンをを用いた GRPR 陽性ニューロン破壊処置がそれぞれ乾癬病態モデルにおける搔痒行動を有意に抑制させることから乾癬モデルマウスの脊髄内痒み伝達における GRP-GRPR システムの重要性を明らかにした。また、乾癬モデルの脊髄後角におけるミクログリアの活性化を免疫組織化学解析により明らかにした。

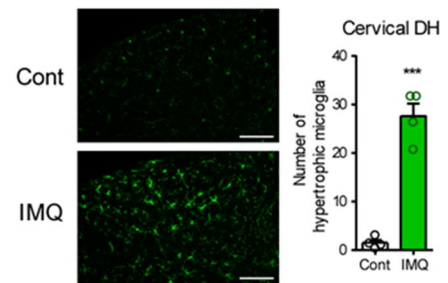


図4

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Saika Fumihiro, Matsuzaki Shinsuke, Kishioka Shiroh, Kiguchi Norikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Chemogenetic Activation of CX3CR1-Expressing Spinal Microglia Using Gq-DREADD Elicits Mechanical Allodynia in Male Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 874 ~ 874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040874	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 Kiguchi Norikazu, Fukazawa Yohji, Saika Ayano, Uta Daisuke, Saika Fumihiro, Nakamura Tomoe Y., Ko Mei Chuan, Kishioka Shiroh	4. 巻 9
2. 論文標題 Chemogenetic activation of central gastrin releasing peptide expressing neurons elicits itch related scratching behavior in male and female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.790	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 Kiguchi Norikazu, Saika Fumihiro, Fukazawa Yohji, Matsuzaki Shinsuke, Kishioka Shiroh	4. 巻 40
2. 論文標題 Critical role of GRP receptor expressing neurons in the spinal transmission of imiquimod induced psoriatic itch	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 287 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12120	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 Kiguchi Norikazu, Uta Daisuke, Ding Huiping, Uchida Hitoshi, Saika Fumihiro, Matsuzaki Shinsuke, Fukazawa Yohji, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Ko Mei-Chuan, Kishioka Shiroh	4. 巻 170
2. 論文標題 GRP receptor and AMPA receptor cooperatively regulate itch-responsive neurons in the spinal dorsal horn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108025 ~ 108025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2020.108025	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 Saika Fumihito, Matsuzaki Shinsuke, Kobayashi Daichi, Ideguchi Yuya, Nakamura Tomoe Y., Kishioka Shiroh, Kiguchi Norikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.00925	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 Saika Fumihito, Fukazawa Yohji, Kishioka Shiroh, Kiguchi Norikazu	4. 巻 153
2. 論文標題 Characterization of spinal microglial activation in a mouse model of imiquimod-induced psoriasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 183 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.09.004	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 雑賀 史浩、木口 倫一、松崎 伸介、西谷-中村 友重
2. 発表標題 Sex-dependent pain-regulatory effects of spinal microglia using Gi / Gq DREADD systems in mice
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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	松崎 伸介  (Matsuzaki Shinsuke)  (60403193)	森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授   (34448)	

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 分 担 者	木口 倫一  (Kiguchi Norikazu)  (90433341)	和歌山県立医科大学・薬学部・准教授     (24701)	

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