

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07760

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いた慢性の痒み成立機序へのヘモキニン-1の関与についての研究

研究課題名(英文) Investigating the involvement of hemokinin-1 in the pruritus mechanism using optogenetics

研究代表者

船橋 英樹 (Funahashi, Hideki)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10404435

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)：かゆみの機序の解明のため、AMPA受容体拮抗作用薬ペランパネルが急性・慢性のかゆみ行動を減弱させること(Haruta-Tsukamoto, Funahashi et.al. 2020)、セロトニン受容体のうち5-HT3受容体と5-HT7受容体がマウスにおいてクロロキンやヒスタミンの急性のかゆみ行動に関連していること(Miyahara, Funahashi et.al. 2021)を発表した。これらを基に、プレダイノルフィンの働きを光遺伝学的に操作してかゆみとの関連をまとめ、現在論文投稿中である(Funahashi, Pavlenko, Akiyama et. al.)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的にかゆみは患者のQOLを低下させるが、決定的な治療がなく、研究の発展や知見の積み重ねにより苦痛の緩和が強く望まれている。今回の研究ではヘモキニン-1のかゆみへの関与の解明には至らなかったが、その周辺であるAMPA受容体やセロトニン受容体、ダイノルフィン関連神経などの関与は明らかとなり、また光遺伝学による操作によって、より生体に近い形での研究手法が進展したことは、学術的にも社会的にも有益な結果であった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of itch, the AMPA receptor antagonist perampanel attenuates acute and chronic itch behavior (Haruta-Tsukamoto, Funahashi et.al. 2020), 5-HT3 receptor among serotonin receptors published that body and 5-HT7 receptors are associated with acute itch behavior of chloroquine and histamine in mice (Miyahara, Funahashi et.al. 2021). Based on these findings, we have optogenetically manipulated the action of predynorphin to summarize its relationship with itch, and are currently submitting a paper (Funahashi, Pavlenko, Akiyama et. al.).

研究分野：palliative care

キーワード：itch hemokinin-1 mouse tachykinin optogenetics

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 痒みの伝達経路の研究に関する世界的潮流とヘモキニン-1 研究の進展

近年、脊髄レベルでの痒みの伝達にガストリン放出ホルモン(GRP)(Sun ら 2007)、ナトリウム排泄増加性神経ペプチド B(Nppb)(Mishra ら 2013)、HTR7 受容体(Morita ら 2015)の関与が報告された。また、本学医学部神経生物学分野からタキキニンペプチドであるヘモキニン-1(HK-1)の痒みの神経伝達への関与も報告された(Endo ら 2006)。申請者はHK-1 に注目し、HK-1 のC末端のメチオニンをロイシンに置き換えた[Leu11]-HK-1 の髄腔内前投与が、疼痛行動は抑制しないが、ヒスタミンおよびセロトニンにより誘発される引っ掻き行動の誘発を抑制すること(Funahashi ら 2014, Fig.1)、HK-1 を構成する N-末端フラグメントペプチドの髄腔内投与が引っ掻き行動の誘発を抑制すること(Naono-Nakayama, Funahashi ら 2014)を世界に先駆けて Neuroscience 誌に発表した。また、HK-1 の受容体はニューロキニン-1(NK1)受容体とされてきたが、orphan 受容体の一つ G-protein coupled receptor(GPR)83 が HK-1 に特有の受容体である可能性を国際痒み学会(Naono-Nakayama, Funahashi ら 2015)、国際疼痛学会(Naono-Nakayama, Funahashi ら 2016)で発表した。さらに、[Leu11]-HK-1 の一部を D 体のトリプトファンで置き換えたペプチド([D-Trp9]-[Leu11]-HK-1 など)が急性の痒みによる引っ掻き行動を髄腔内投与後 24 時間まで抑制することを北米神経学会(Funahashi ら 2015)、国際痒み学会(Funahashi ら 2017)で報告し、現在論文投稿中である。このように、HK-1 は痒みの伝達に関与するペプチドであり、HK-1 受容体は痒みの伝達に重要な働きをしている可能性がある。

慢性の痒みは不安と密接に関連している

ところで、申請者は緩和医療学会の専門医資格を有し、肝疾患や抗がん剤による全身掻痒感の苦痛・ストレスも精神症状の緩和分野で重要であることを痛感している。臨床報告(船橋 2009)に加え、マウスの皮膚へのジフェニルシクロプロペノン(DCP)の塗布による慢性の痒みモデルでの研究を国際疼痛学会で報告し(Miyahara, Funahashi ら 2016)、論文が掲載された(Miyahara, Funahashi ら 2019)。マイアミ大学のグループは慢性の痒みと不安は悪循環を形成し(Sanders, Akiyama ら 2018)、その扁桃体の関与を光遺伝学的手法によるデータも含めて報告した(Sanders, Akiyama ら 2019)。申請者は 2019 年度にこのグループの元に留学し、光遺伝学や Miniscope など多角的な研究手法を得た。これらを基に、慢性の痒みの成立機序という「問い」とその症状緩和の方法や不安との関連を解明することは、基礎的研究としてだけではなく臨床的にも重要かつ喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究は、慢性痒みモデルのマウスにおいて、扁桃体を中心とした脳の働きと、神経伝達物質として働くタキキニンペプチドの一つ、ヘモキニン-1(HK-1)の関連を光遺伝学の技術を用いて評価することを目的とする。慢性の痒みと不安は悪循環を形成していることが指摘されており、光遺伝学により不安に関与する扁桃体の働きを操作し、HK-1 の阻害作用(アンタゴニストとして働くペプチドやタンパク毒素サポリンによる受容体の賦活化を用いる)を組み合わせて、慢性の痒みの成立機序における HK-1 の働きを明らかにし、最終的に慢性の痒みの症状緩和の方法を検討する。

### 3. 研究の方法

#### HK-1-SAP による HK-1 受容体のノックダウン

HK-1-SAP を外注し、マウスの髄腔内に投与し HK-1 受容体をノックダウンする。HK-1-SAP 投与 1、2、3、4 週後、10-3M の HK-1 を 10  $\mu$ l 髄腔内投与し、引っ掻き行動の回数を指標に HK-1-SAP の最適濃度と投与後の最適期間を決定する。

#### HK-1 受容体に関連する他の受容体の探索

HK-1 受容体ノックダウン群と SAP だけ髄腔内投与した対照群を用いて、サブスタンス P(SP)、ガストリン放出ホルモン(GRP)、ナトリウム排泄増加性神経ペプチド(Nppb)など既知の掻痒伝達物質を髄腔内に投与する。これらのペプチドの受容体と HK-1 受容体がどのような関係にあるかを推測する。

#### 急性の痒み刺激に対する HK-1 受容体のノックダウンの効果

HK-1 受容体ノックダウン群と SAP だけ髄腔内投与した対照群を用いて、ヒスタミン、クロロキンなどの掻痒誘発物質をマウスの頸背部に皮下投与する。引っ掻き回数を比較することで、急性の痒み刺激に対する HK-1 受容体の関与を評価する。また、いずれの群も投与 2 時間後にパラホルムアルデヒドにより灌流固定する。脊髄 C1-C3 を取り出して凍結切片を作成し、免疫染色化学(LSAS 法)により染色した c-Fos タンパク発現細胞数を比較する。以上より、HK-1 受容体の関与を評価する。

#### 扁桃体への AAV の注入、LED プロープの挿入

DAT-Cre(+)マウスを用いて HK-1 受容体ノックダウン群と SAP のみの対照群を準備する。両群に対して、ペントバルビタール麻酔下で定位脳手術により両側の扁桃体にウイルスベクター-AAV-CMV-FLEX-ChR2-eYFP を投与し、ChR2-eYFP を扁桃体のドーパミン神経に強制発現させる。さらに

LEDプローブを埋め込むことにより、青色光によるドパミン神経操作が可能となる。ウイルスの至適濃度、光の至適周波数などはマイアミ大学のプロトコルを参考にする。

HK-1 ノックダウン群における扁桃体の制御による急性の痒みの評価

で作成したマウスにおいて、ドパミン神経の刺激条件ごとにクロロキン、ヒスタミンなど痒み誘発物質を皮下に投与する。急性の痒みに対する引っ掻き行動の観察と、高架式十字迷路などを用いた行動実験による不安の評価、灌流固定による c-Fos 陽性細胞の分布を確認する。

慢性痒みモデルマウスの作成

マウスの頸背部の皮膚を露出し、0、7、14 日目に 1%DCP 溶液を塗布する。15 日目に 30 分間の引っ掻き回数を測定し、慢性痒みモデルの成立を確認する。

慢性痒みモデルの成立に対する HK-1 受容体の関与

HK-1 受容体ノックダウン群と SAP のみ髄腔内投与した対照群を用いて、0、7、14 日目に 1%DCP 溶液を露出した皮膚に塗布する。15 日目の 30 分間の引っ掻き回数の測定により、慢性の痒みモデルの成立に HK-1 受容体が必要か否かを明らかにする。また、いずれの群も前述の方法で c-Fos タンパク発現細胞数を比較し、HK-1 受容体の関与を評価する。

扁桃体への AAV の注入、LED プローブの挿入

DAT-Cre(+)マウスで作成した慢性痒みモデルについて、前年度と同様に AAV と LED プローブを投与・挿入する。

HK-1 ノックダウン群における扁桃体の制御による慢性の痒みの評価

すでに慢性の痒みによる引っ掻き行動を誘発されているマウスにおいて、ドパミン神経の刺激条件を変えて、慢性の痒みに対する引っ掻き行動の観察と、高架式十字迷路を用いた行動実験による不安の評価、灌流固定による c-Fos 陽性細胞の分布を確認する。

#### 4 . 研究成果

現在、プレダイノルフィンを介した脳内のかゆみの制御系に関する論文を投稿中であり、その結果により、研究成果を報告する。2023 年 6 月現在では、小修整の指摘の段階にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Darya Pavlenko, Hideki Funahashi, Kent Sakai, Takashi Hashimoto, Taisa Lozada, Gil Yosipovitch, Tasuku Akiyama	4. 巻 29
2. 論文標題 IL-23 modulates histamine-evoked itch and responses of pruriceptors in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 1209-1215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/exd.14206	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 H. FUNAHASHI, D. PAVLENKO, K. SAKAI, *T. AKIYAMA
2. 発表標題 Role of PBN projecting CeApydn amygdala neurons in nociception
3. 学会等名 SfN Global Connectome（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Funahashi, D. Pavlenko, K. Sakai, T. Akiyama
2. 発表標題 Role of PBN projecting CeApydn amygdala neurons in nociception
3. 学会等名 SfN Global Connectome（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----

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