

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08305

研究課題名(和文) 類天疱瘡の痒みにおけるプロテアーゼの機能解明

研究課題名(英文) Proteases in itch accompanied by bullous pemphigoid

研究代表者

廣保 翔 (Hiroyasu, Sho)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10571284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症性皮膚疾患の痒みは、既存の治療にしばしば抵抗性を示し臨床上的の問題となる。そうした痒みにはヒスタミン以外の起痒物質の関与が示唆されるが、具体的な分子が特定されていない疾患も多い。本研究を通じて申請者らは、類天疱瘡をはじめとした炎症性皮膚疾患において、プロテアーゼの一つであるグランザイムK(GzmK)がPAR-2活性化を介して痒みを引き起こすと仮説を立て、これをin vitroモデル、マウスモデル、ヒトサンプルを用いて検証した。その結果、特に尋常性乾癬において、炎症細胞から放出されるGzmKがその痒みに関連する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尋常性乾癬において、痒みは多くの症例で経験される症状で、そのコントロールは難しい。患者のQOLを保ちかつ掻きむしりによる症状の増悪を防ぐため、乾癬では疾患そのものの治療に加え痒みのコントロールが重要である。しかし、これまで痒み治療の中心であった抗ヒスタミン薬は、乾癬の痒みには有効性が低かった。今回我々はグランザイムKというタンパク分解酵素が乾癬の痒みの原因の一つであることを発見した。これにより、今後グランザイムKを標的とした治療薬を開発することが重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Itch in chronic inflammatory skin diseases is a significant clinical problem that often refractory to current treatment strategies. While non-histaminergic pruritogens are suggested as a major contributor in these refractory pruritus, specific molecules have not been identified yet in many diseases. In this study, we hypothesized that granzyme K (GzmK), one of the proteases, induces itch via PAR-2 activation in inflammatory skin diseases including pemphigoid diseases. We tested this hypothesis using in vitro models, animal models, and human samples. These results indicated that GzmK released from inflammatory cells contribute to the pruritus in these conditions, particularly in psoriasis vulgaris.

研究分野：皮膚科学

キーワード：痒み 乾癬 プロテアーゼ グランザイム

1. 研究開始当初の背景

痒痒は搔破したいという欲求を引き起こす感覚であり、itch-scratch サイクルとして知られる正のフィードバックループを引き起こす。このサイクルは炎症を増悪させるため、炎症性皮膚疾患の管理には効果的な痒痒のコントロールが不可欠である。しかし、痒痒に対する最も一般的な治療法である抗ヒスタミン薬は、ほとんどの痒痒性皮膚疾患に対して効果が乏しい。これはそうした痒痒性皮膚疾患に、ヒスタミン以外の痒痒経路が関与していることを示唆している。こうした非ヒスタミン作動性経路を同定することは、痒痒に対するより効果的な治療法を開発する上で極めて重要である。

非ヒスタミン作動性痒痒経路としてこれまでに示唆されたものの中に、プロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR-2) の活性化経路がある。PAR-2 は G タンパク質共役型受容体で、皮膚の感覚ニューロンを含む様々な細胞タイプに発現する。PAR-2 の活性化には、プロテアーゼ依存性の N 末端細胞外ドメイン配列の切断が必要であり、それが PAR-2 上の保存領域にあるリガンドに結合する。これまでのところ、皮膚疾患において PAR-2 誘導性痒痒を引き起こす特異的なプロテアーゼは同定されていない。しかし、セリンプロテアーゼであるグランザイム K は、PAR-2 を活性化することが報告されており、複数の痒痒性炎症性皮膚疾患で上昇することがこれまでに報告されていた。

2. 研究の目的

以上の背景から、我々は、グランザイム K が PAR-2 活性化を介した痒痒を誘導すると仮説を立てた。本仮説を立証するための標的疾患として、当初は水疱性類天疱瘡を考えていたが、予備実験行った免疫組織化学の結果、真皮に浸潤するグランザイム K 陽性細胞が比較的少なかったため、GzmK 陽性浸潤細胞が多い尋常性乾癬を標的疾患とした (図 1)。尋常性乾癬では、アトピー性皮膚炎や水疱性類天疱瘡ほどの頻度と重症度ではないものの、ヒスタミン内服により改善しない痒痒が症状として存在し、それによる搔破行動が皮疹を増悪させ (Koebner 現象) 重症度を上昇させることが考えられており、痒痒のコントロールは臨床的な課題である。本研究により、尋常性乾癬の痒痒においてグランザイム K が PAR-2 活性化を介して関与しているかどうかを調べることで、尋常性乾癬における痒痒のメカニズムを解明し、新規の痒痒治療につなげることを本研究の具体的な目的とした。

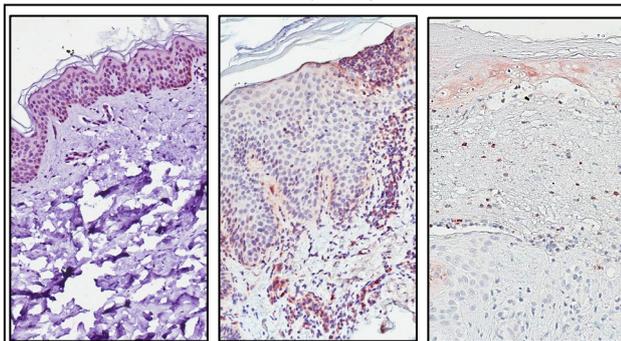


図 1: 正常ヒト皮膚 (左)、尋常性乾癬皮疹部 (中央)、水疱性類天疱瘡皮疹部 (右) におけるグランザイム K の免疫組織化学

3. 研究の方法

(1) ヒト患者サンプル、免疫組織化学

大阪公立大学の倫理委員会に認可された計画書に基づき、説明同意を得た患者から得られた診断用の乾癬皮疹部のホルマリン固定サンプルの余剰を免疫組織化学に用いた。切片は 10 μm の厚みにし、グランザイム K 抗体と PGP9.5 抗体を一次抗体として、一般的な手法で染色を行った。画像は共焦点顕微鏡で撮影し、z-stack を重ね合わせた。

(2) 研究マウス、脊髄後根神経節 (DRG) 細胞抽出

8-12 週齢の野生型 C57Bl/6 マウスを用いた。マウスは、購入、移送後 1 週間の観察期間を経て、イミキモドを外用されるか、搔破行動実験に用いられるか、もしくは DRG 細胞を抽出された。全ての動物実験は、大阪公立大学またはブリティッシュコロンビア大学の動物実験委員会が認可した計画書に基づいて行われた。

(3) イミキモド局所外用マウス

マウスの右耳に 7 日間イミキモドを外用し、右耳のみの局所的な乾癬様皮疹を誘導した。マウスの右耳は軽度の鱗屑を伴う紅斑を示し、HE 染色で表皮肥厚と炎症細胞浸潤が認められた (図 2)。

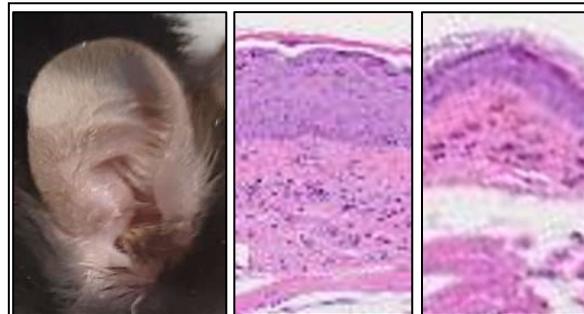


図 2: イミキモド外用マウス耳介の写真 (左)、HE 染色像 (中央)、対照マウス耳介 HE 染色像 (右)

(3) 搔破行動実験

ビデオによる 1 時間の投与前観察の後、グランザイム K 投与実験ではマウスの右頬部に PBS または 10 ng のグランザイム K を皮内投与し、投与後 1 時間のビデオ撮影を行った。撮影されたビデオは後日盲検下で観察され、後ろ足が地面を離れた瞬間から再度地面に触れるまでを搔破時間として定量され、その積算の左右差及び PBS 投与群とグランザイム K 投与群が比較された。投与前観察の後、イミキモド外用マウスへのグランザイム K 阻害薬投与実験では軽く全身麻酔をかけたうえでマウスの右耳介部にグランザイム K 阻害薬 (IαIP) を皮内投与し、投与後 1 時間のビデオ撮影を行った。撮影されたビデオを用いて後日上記の方法で定量し、その積算の搔破時間の投与前後の差を比較した。

(4) カルシウムイメージング

マウス脊髄後根神経節から抽出された DRG 細胞は、1 日間専用培地で培養された後、カルシウムイメージング実験に用いられた。DRG 細胞を実験 1 時間前に Fluo8-AM で前処理した後、専用培地または専用培地+PAR-2 アンタゴニストに培地を置換し、共焦点顕微鏡下でライブイメージングの手法で観察を開始した。観察開始 20 分後に GzmK を、さらにその 20 分後に KCl を投与した。得られた動画を用い、KCl で細胞内カルシウム濃度が上昇した DRG 細胞の中で、GzmK 刺激でも細胞内カルシウム濃度が上昇していた細胞の割合を定量した。

4. 研究成果

(1) グランザイム K はマウスの起痒物質である

グランザイム K がマウスにおいて搔破行動を増加させるかを検証するために、グランザイム K を野生型マウスの右頬の皮内に投与した。その結果、PBS を投与した群では左右ともに搔破時間が 30 分で 20 秒程度であったが、グランザイム K の投与群では右頬でのみ搔破時間が約 50 秒と、搔破時間の延長が見られた (図 3)。以上より、グランザイム K がマウスの起痒物質であることを確認した。

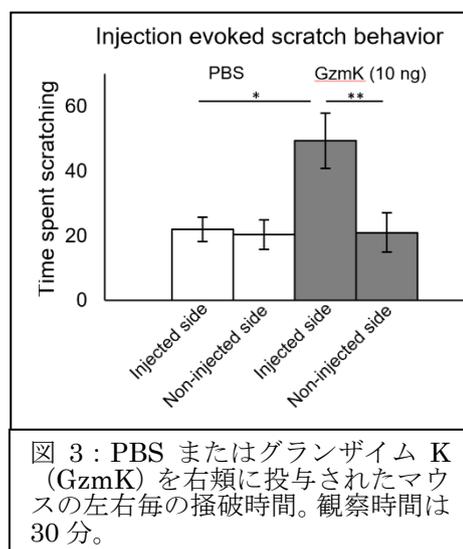


図 3: PBS またはグランザイム K (GzmK) を右頬に投与されたマウスの左右毎の搔破時間。観察時間は 30 分。

(2) グランザイム K は PAR-2 活性化経路を介して

DRG 細胞内のカルシウム濃度上昇を引き起こす

グランザイム K が直接的に DRG 細胞内のシグナル伝達に関与するかどうかを検証する

ために、培養マウス DRG 細胞にグランザイム K を投与し、その前後の細胞内のカルシウム濃度を観察した。その結果、約 4% の DRG 細胞でグランザイム K 投与後にカルシウム濃度が上昇していた (図 4)。このカルシウム濃度の上昇が、我々の仮説通りに PAR-2 活性化経路誘導性かどうかを観察するために、PAR-2 アンタゴニストである FSLLR Y を前投与したところ、細胞内カルシウム濃度が上昇した細胞は、全体の約 0.6% と FSLLR Y 非投与群に比べて低下した。

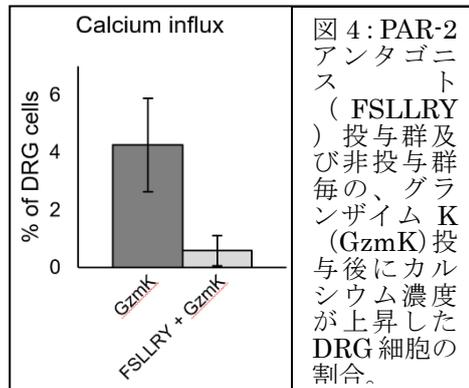


図 4: PAR-2 アンタゴニスト (FSLLR Y) 投与群及び非投与群毎の、グランザイム K (GzmK) 投与後にカルシウム濃度が上昇した DRG 細胞の割合。

(3) 尋常性乾癬皮疹部の真皮乳頭ではグランザイム K が感覚神経の近傍に局在する

これまでに尋常性乾癬の皮疹部でグランザイム K 産生細胞が増加していることは報告されているが、その詳しい局在は不明である。そこで、痒痒に関連のある表皮直下の神経乳頭部に局在する感覚神経終末の近傍にグランザイム K 陽性細胞が局在するかどうかを検証するために、尋常性乾癬皮疹部のグランザイム K と感覚神経の免疫組織化学を行った。その結果、真皮乳頭部に多数の浸潤グランザイム K 陽性細胞とその近傍に局在する感覚神経の存在を確認した (図 5)。

以上より、尋常性乾癬皮疹部の真皮乳頭ではグランザイム K が感覚神経の近傍に局在することを明らかにした。

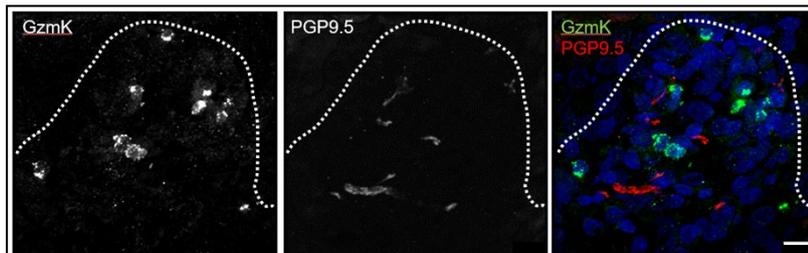


図 5: 乾癬皮疹部のグランザイム K (GzmK) と PGP9.5 の免疫組織化学。

(4) グランザイム K は

イミキモド誘導性乾癬様マウスの痒痒に関与する

以上より、グランザイム K が尋常性乾癬における痒痒に関与していることが示唆されたため、それをイミキモド誘導性の乾癬様マウスを用いて検証した。一般的に用いられる背部に皮疹が局在するモデルは後肢による搔破行動のみならず、口を用いた噛み付き行動を誘導することが懸念されたため、右耳介にイミキモドを外用し右耳介のみに皮疹を誘導した。その後、ごく軽度に全身麻酔をかけたうえでグランザイム K の阻害薬として報告のある I α IP またはコントロールとして PBS をマウス右耳介に皮内投与した。その結果、PBS 投与群で投与前後で搔破時間に変化がなかったが、I α IP 投与群では投与後に搔破時間が減少した。さらにサンプル数を増やす必要があるが、この結果より、グランザイム K がイミキモド誘導性乾癬様マウスの痒痒に関与しており、グランザイム K 阻害薬を尋常性乾癬に投与することにより、乾癬の痒痒が減弱する可能性が示唆された。

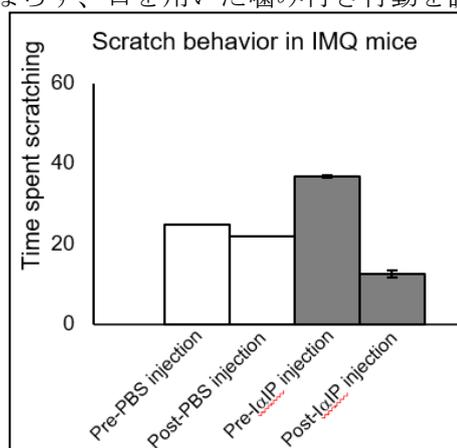


図 6: PBS またはグランザイム K 阻害薬 (I α IP) を右耳介に投与されたイミキモド (IMQ) 局所投与マウスの投与前後の搔破時間。観察時間は 20 分。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroyasu Sho, Hiroyasu Aoi, Granville David J., Tsuruta Daisuke	4. 巻 104
2. 論文標題 Pathological functions of granzyme B in inflammatory skin diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 76 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.10.006	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Hiroyasu Sho, Barit Jay V James G., Hiroyasu Aoi, Tsuruta Daisuke	4. 巻 50
2. 論文標題 Pruritogens in pemphigoid diseases: Possible therapeutic targets for a burdensome symptom	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 150 ~ 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16652	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sho Hiroyasu, Aoi Hiroyasu, David J Granville, and Daisuke Tsuruta
2. 発表標題 Protease Functions in Itch Associated with Pemphigoid Diseases
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第47回年次学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sho Hiroyasu, Matthew R. Zeglinski, Hongyan Zhao, Aoi Hiroyasu, Daisuke Tsuruta, David J. Granville
2. 発表標題 Granzyme K cleaves protease-activated receptor-2 and induces itch
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第46回年次学術大会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣保翔, Matthew R. Zeglinski, Hongyan Zhao, 廣保葵, 鶴田大輔, David J. Granville
2. 発表標題 水疱性類天疱瘡におけるPAR-2誘導性そう痒に関するグランザイムKの機能解析
3. 学会等名 第43回水疱症研究会
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	廣保 葵 (Hiroyasu Aoi) (20899603)	大阪公立大学・大学院医学研究科・研究員 (24405)	

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		
カナダ	University of British Columbia		