

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08976

研究課題名（和文）新規分子を標的とした痒み治療薬の開発に向けた末梢神経における痒み伝達の解明

研究課題名（英文）Investigation of itch transmission in peripheral nerves for the development of novel molecular-targeted itch therapies

研究代表者

丸山 智之（Tomoyuki, Maruyama）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00894883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：野生型マウスの後根神経節に対してIL-31RA、Tmem45b、TRPV1の3重染色を行ったところ、Tmem45b陽性かつTRPV1陽性の細胞のうちIL-31-RAも陽性であったものは60%と高率に共発現していた。マウスに対して搔痒誘発物質を皮下投与して搔爬回数を評価したところ、野生型マウスに比較してTmem45bKOマウスは溶媒投与では搔爬回数に差がなかったものの、IL-31、Compound48/80で搔爬回数が有意に低いことが示された。また、DFNBやimiqimodによるアトピー性皮膚炎モデルにおいても同様に搔爬回数を測定した。野生型、KOマウスで明らかな差がないことが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、機械性痛覚過敏に関与するTmem45bがアトピー性皮膚炎の搔痒に関与していることが示され、治療薬開発の実現に有用な研究である。アトピー性皮膚炎による痒みは、搔爬行動により皮膚炎を悪化させ、更なる痒みが惹起されるといった悪循環を形成し、生活の質の低下、社会的、経済的な損失に繋がる。Tmem45bは中枢神経にほとんど発現を認めず末梢の知覚神経に選択的に発現しているため、Tmem45bをターゲットとした痒み治療薬の開発は、眠気などの中枢性の副作用のない痒み治療薬の開発につながる可能性が高い。本研究は、アトピー性皮膚炎におけるかゆみ治療法を大きく発展させる核心的な治療薬開発を実現しうる。

研究成果の概要（英文）：Triple staining of dorsal root ganglia of wild-type mice for IL-31RA, Tmem45b, and TRPV1 showed that a high percentage (60%) of Tmem45b-positive and TRPV1-positive cells also coexpressed IL-31-RA. When mice were intradermally treated with pruritogenic substances and the number of curettage was evaluated, Tmem45bKO mice showed significantly lower curettage with IL-31 and Compound48/80 than wild-type mice, although there was no difference in the number of curettage with solvent administration. The number of curettage was also measured in the same way in DFNB and imiqimod atopic dermatitis models. No obvious difference was observed in wild-type and KO mice.

研究分野：麻酔科学関連

キーワード：IL-31 痒み Tmem45b IL-31RA 末梢神経 搔痒

1. 研究開始当初の背景

痒みは、痛みと同様に外界の情報や生体の異常を感知するために不可欠な警告信号である。しかし、アトピー性皮膚炎で見られるような長期にわたって持続する病的な痒みは、不眠などにより身体活動や精神活動を制限するため著しく生活の質を低下させる。アトピー性皮膚炎では、痒みに対する搔爬行為自体が皮膚のバリア機能を障害するため、皮膚炎が悪化し、更なる痒みが生じるという悪循環が形成される。そのため、痒みを緩和する事がアトピー性皮膚炎の進行や合併症の発症を予防するために重要である。痒みが生じるメカニズムのさらなる解明、および副作用が少なくかつ複数の痒み発生機構を統合的に抑制する事ができる痒み治療薬の開発が望まれている。Cavanaughらは、マウスにおいて TRPV1 陽性神経が熱性痛覚過敏の発生に関与するが、機械性痛覚過敏の発生には関与しないことを明らかにした (Cavanaugh DJ PNAS 2009)。また申請者の教室では、これまで機能が未知であった Tmem45b という新規分子が皮膚の炎症下で機械性痛覚過敏の伝達に関与するが、熱性痛覚過敏の発生には関与しないことを見出した。ところが、発現分布解析の結果から Tmem45b と TRPV1 を共発現する神経細胞が存在することが明らかとなった。TRPV1 陽性神経に発現する Tmem45b はどのような体性感覚を伝達しているのであろうか？という疑問があった。アトピー性皮膚炎において難治性の痒み発生のカギとなる IL-31 は、TRPV1 受容体を活性化することにより痒みを伝達することが知られている (Dong X Neuron 2018)。そして予備実験により、Tmem45b と TRPV1 を共に発現する神経が IL-31 受容体を選択的に発現していることを確認した。申請者は、Tmem45b が、同じくアトピー性皮膚炎という炎症下で生じる病的な痒みの発生に関与するという仮説を立てた。もし、Tmem45b が痒み発生に関与していることが明らかになれば、Tmem45b はアトピー性皮膚炎において新たな痒み治療薬のターゲットとなる。

2. 研究の目的

「新しい痒み治療薬の開発に向けて、Tmem45b がアトピー性皮膚炎に伴って生じる痒みのカギとなる分子であることを明らかにすること」を目的とする。

Tmem45b は中枢神経にほとんど発現を認めず末梢の知覚神経に選択的に発現しているため、Tmem45b をターゲットとした痒み治療薬の開発は、眠気などの中枢性の副作用のない痒み治療薬の開発につながる可能性が高い。

3. 研究の方法

(1) 各種痒み関連分子と Tmem45b の発現分布解析

蛍光免疫染色と蛍光 in situ hybridization により、Tmem45b/TRPV1 共陽性神経における各種痒み関連遺伝子の発現を解析する。TRPA1、IL-4 受容体、GRP など痒み伝達に関与する各種分子と Tmem45b の共発現を確認する。

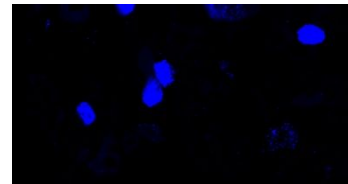
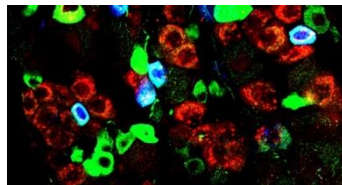
(2) 痒みモデルで観察される痒みにおける Tmem45b の役割 - 行動解析

野生型マウスと Tmem45b 遺伝子欠損マウスを用いる。痒み誘発物質を用いて、自発的搔痒行動 (scratching) の差を解析する。痒みモデルとして、アトピー性皮膚炎モデルと接触性皮膚炎モデルを用いる。自発的搔痒行動 (scratching) を経時的に測

定し、比較検討する。

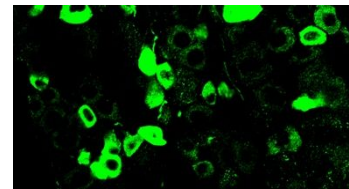
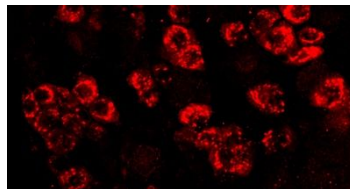
4. 研究成果

掻痒の知覚、熱性痛覚過敏に関与する TRPV1、TRPA1 が IL-31RA と共発現していることが報告されている。当教室で研究している Tmem45b という分子は機械性痛覚過敏に深く関わっている。しかし、熱性痛覚過敏には関与せず、TRPV1、TRPA1 と共発現している。IL-31RA、TRPV1 と共発現している Tmem45b は掻痒に関わっているのではないかと考えた。野生型マウスの後根神経節に対して免疫染色と in situ hybridization を行い、IL-31RA、Tmem45b、TRPV1 の3重染色を行ったところ、Tmem45b 陽性かつ TRPV1 陽性の細胞のうち IL-31-RA も陽性であったものは60%認められ、高率に共発現していた(図1,2)。IL-31RA、Tmem45b、TRPV1 の間には掻痒に関する関連性があると考えられる。マウスに対して掻痒誘発物質(IL-31、ヒスタミン、クロロキン、SLIGRL、Compound48/80)の投与を行い、掻爬回数を評価したところ、wild マウスに比較して Tmem45bKO マウスは溶媒投与では掻爬回数に差がなかったものの、IL-31、Compound48/80 において掻爬回数が有意に低いことが行動実験として示された。(128.3 ± 28.4 vs 89.6 ± 24.1, p = 0.0297, 380.8 ± 62.3 vs 238.7 ± 84.0, p = 0.0078)。また、モデルマウスとして Dinitrofluorobenzene(DFNB)や imiqimod を使用したアトピー性皮膚炎モデルを作成し、同様に掻爬回数を測定した。wild、Tmem45bKO マウスで明らかな差がないことが認められた。これらの結果をもって論文を執筆中である。論文査読者から指導があれば追加実験などを行う予定としている。



a : marge (IL-31RA, Tmem45b, TRPV1)

b : IL-31RA



c: Tmem45b

d: TRPV1

図1. 蛍光免疫染色と 蛍光 in situ hybridization による後根神経節染色画像

IL-31RA を青、Tmem45b を赤、TRPV1 を緑として染色を行い、解析を行った。以前の報告にあるように 3 つの標的細胞は小型の細胞を多く占めており、同一細胞に共発現している様が見て取れる。

n	IL31	45b	V1	3重+	IL31/45b	V1/IL31	V1/45b
1	500	2350	1978	345	390	409	572
2	399	1977	1463	292	311	278	503
3	348	1637	1573	305	271	310	467
4	332	2085	1493	293	317	282	494
average	394.75	2012.25	1626.75	308.75	322.25	319.75	509
sd	75.7600378	295.1964035	238.724911	24.8780358	49.5672943	61.1793811	44.6989933

a : 各染色の細胞数

$\frac{\text{IL31RA mRNA}(+) \text{ TRPV1}(+) \text{ Tmem45b}(+)}{\text{TRPV1}(+) \text{ Tmem45b}(+)}$	$\frac{308.8 \pm 24.9 \text{ 個}}{509.0 \pm 44.7 \text{ 個}}$	$60.7 \pm 3.2\%$	Mean ± SD n=4
--	---	------------------	------------------

b : Tmem45b 陽性かつ TRPV1 陽性神経のうち IL-31RA が陽性である率

図2. 3重染色による組織学的解析

Tmem45b 陽性かつ TRPV1 陽性の細胞のうち IL-31-RA も陽性であったものは60%認められ、高率に共発現していた。IL-31RA、Tmem45b、TRPV1の間には掻痒に関する関連性があると考えられる。

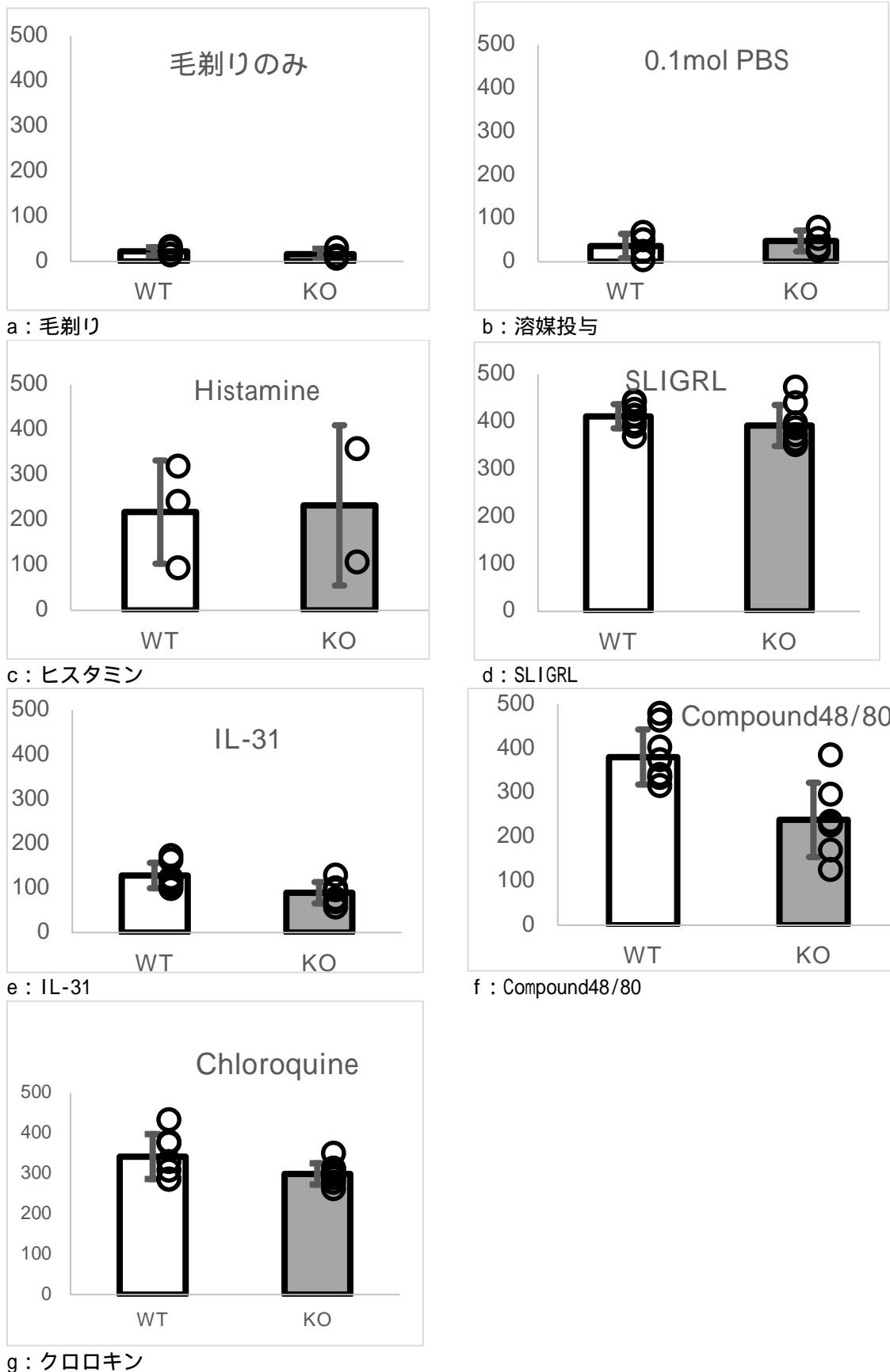
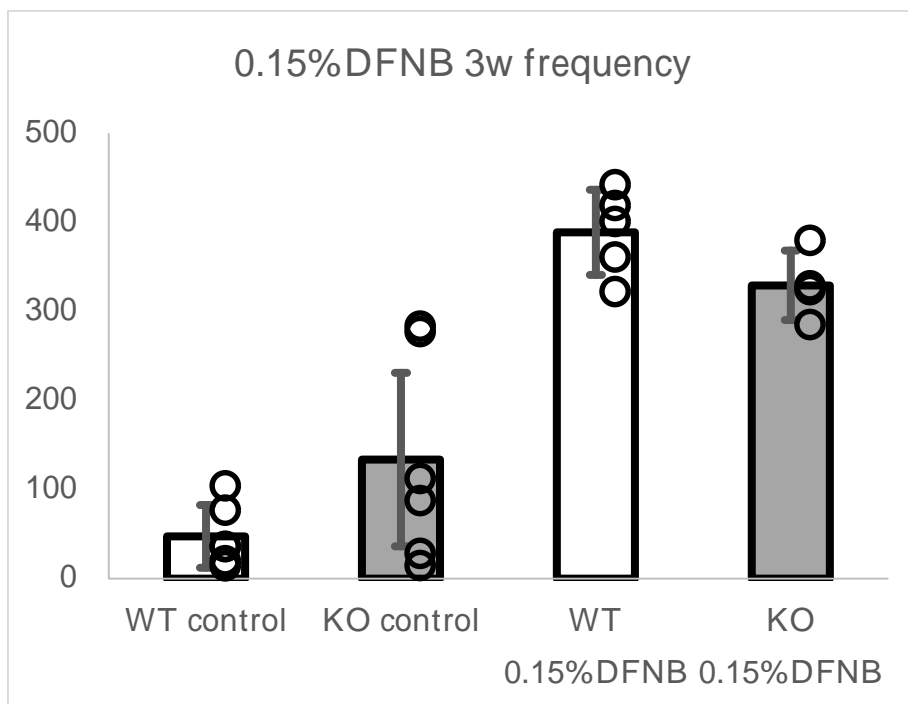


図3. 痒み誘発物質による行動解析

マウスの後頸部の毛を剃った24時間後に、50 μ Lの溶媒に各薬剤を希釈し、皮内注射により投与、その後1時間の後ろ足による搔爬回数をカウントし、野生型マウスとTmem45bKOマウスで比

較した。IL-31、Compound48/80 において Tmem45bKO マウスでは搔爬回数が有意に低いことが示された。(e : 128.3 ± 28.4 vs 89.6 ± 24.1 , $p = 0.0297$, f : 380.77 ± 62.31 vs 238.71 ± 83.98 , $p = 0.0078$)。



a : 0.15%Dinitrofluorobenzene

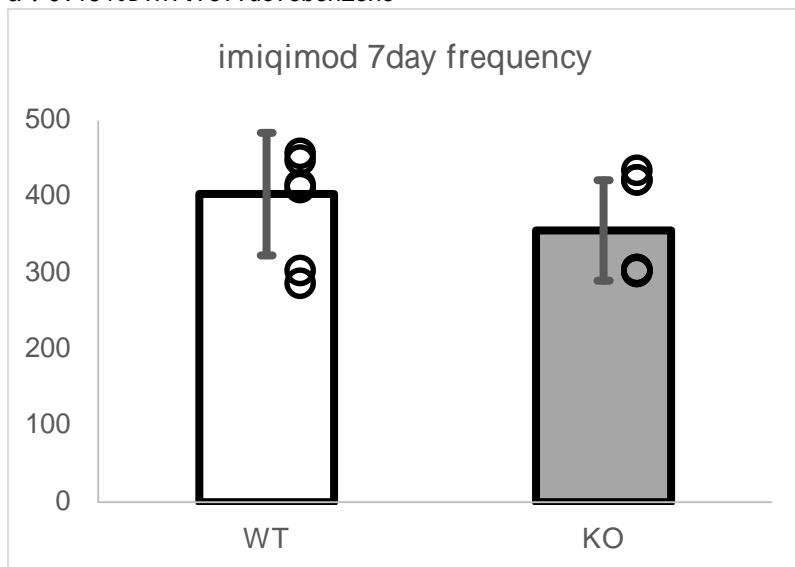


図 4. 接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎モデルにおける行動解析

DFNB、imiqimod による皮膚炎モデルを形成し、24 時間自発的な搔爬行動を観察した。野生型マウスと比較して Tmem45bKO マウス 1 時間あたりの搔痒行動が減少しなかった。(a: 388 ± 47 vs 329 ± 39 $p=0.14$, b: 403 ± 80 vs 356 ± 66 , $p=0.34$)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山智之
2. 発表標題 新規痛み関連分子Tmem45bはIL-31による掻痒行動に關与する
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第69回学術集会
4. 発表年 2022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	時永 泰行 (Tokinaga Yasuyuki) (60438281)	和歌山県立医科大学・医学部・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
---------	---------