

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590714

研究課題名(和文) 痒み・搔破行動のアレルギー性皮膚炎に対する影響

研究課題名(英文) The effects of itch/scratching on allergic dermatitis.

研究代表者

竹内 聡 (Takeuchi, Satoshi)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：80403997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性皮膚炎における痒みと搔破行動の関連について、各種皮膚炎マウスモデルで検討した。BALB/cマウスにおけるハプテンを用いた接触過敏皮膚炎で、12、24時間後の遺伝子発現を、マウスの搔破行動防止策の有無で比較したところ、12時間後127個、24時間で8個の遺伝子発現に差異がみられた。さらに初動遺伝子として好中球遊走因子MIP2αを同定し、その受容体であるCXCR2ノックアウトマウスで同反応をみたところ、健常マウスと差はなく、組織的にも多形核球を持った細胞が浸潤していた。現在、さらに解析中である。また、カテプシンノックアウトマウスでは後肢の動きが激しく正確な搔破測定ができなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined association of itch/scratching and allergic dermatitis using mouse models of dermatitis. Gene transcription at 12 and 24 hours after challenge in murine contact hypersensitivity reaction using hapten and BALB/c mice were examined. We found that A total of 127 and 8 genes were differentially transcribed at 12 and 24 hours, respectively. Furthermore, the neutrophil chemoattractant MIP2-alpha was identified as initial response gene in the skin inflammation. Impaired contact hypersensitivity reaction was expected in mice lacking CXCR2, the receptor for MIP2-alpha, but interestingly, there was no change in the reaction between the knockout mice and controls. Further investigation including local immunohistology is ongoing. We could not properly assessed the scratching in another model mice lacking cathepsin in E knockout mice, due to its vicious movement of the hind legs of the mice.

研究分野：疼痛学

科研費の分科・細目：7004

キーワード：アレルギー性皮膚炎 かゆみ 搔破行動

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎など慢性掻痒性皮膚疾患の治療において、痒みと掻破行動のコントロールは非常に重要である。なぜなら、痒みは掻破行動を誘い、皮膚の掻破行動は物理的に皮膚を傷害して皮膚炎を悪化させ、炎症性起痒物質を誘導してさらなる痒み・掻破行動を生んで再び皮膚炎を悪化させる、いわゆる「イッチ・スクラッチサイクル」を形成するためであり、代表的なアレルギー接触皮膚炎モデルであるハプテンを用いた「接触過敏性反応」においても、マウスの掻破行動が皮膚炎の増悪に貢献していることを確認した (Takeuchi et al, J Dermatol. Sci.2010;57(1):44-50. )

同論文ではまた、免疫反応の先兵的役割を果たす表皮ランゲルハンス細胞(LC)が、接触過敏反応を惹起するハプテンの陰性コントロールとして用いられるはずの溶媒のオリーブオイルの外用でも組織学的にLCが活性化されること、およびオリーブオイル外用後のマウスの局所皮膚の掻破行動を抑制することによりそのようなLC活性化が消失することを確認した(下図1)。

ただし、掻破行動がどのように影響して皮膚炎・免疫開始反応(LCの活性化など)をもたらしたかは明らかに出来ていない。そこで、未だ十分に解明されていないイッチ・スクラッチサイクルにおける、“痒み・掻破行動と皮膚炎のリンク”を検討するため、マウスの掻破行動の有無による種々の薬剤外用後の表皮内の変化について、網羅的な遺伝子発現解析を用いて明らかにしたい。また、執拗な痒みを起こす代表的な皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎(Atopic dermatitis=AD)の痒み治療薬として、臨床的には抗ヒスタミン薬があるが、現時点で抗ヒスタミン薬はADの痒み・掻破行動や皮膚炎を十分に制御できているとは言い難い。これらADの難治性の痒みには、サブスタンスPなどの“ヒス

タミン非依存性の炎症性起痒因子”の関与が示唆されており、実際にアトピー患者での血中サブスタンスPの高値や(Toyoda M et al. Br J Dermatol. 2002)、夜間の掻破行動への関連が報告されている(Hon KL et al. Br J Dermatol. 2007)。

我々はこれまでに、マウスのハプテン連続塗布によるTh2反応型のADマウスモデルの系において、掻破行動と現在トピックとなっている“表皮内への知覚神経伸長”、慢性皮膚炎形成に関与する様々な炎症関連因子の解析を通して様々な外用の抗炎症薬の抗かゆみ効果を研究し、一般に考えられている、表皮内への神経伸長が必ずしも掻破行動と関連しないことを示した(Kido M et al, J Dermatol. Sci.2010;58(2):130-5) また最近の報告では、掻破行動は単純に表皮内の神経伸長ではなく、皮膚でサブスタンスPの存在またはその枯渇が重要である可能性が示唆されている(Inagaki T et al. Eur J Pharmacol. 2010 Jan 25;626(2-3):283-9. )

カテプシン・イー(E)欠損(ノックアウト)マウスは、皮膚炎惹起時に血中のIL-4、IL-5やIgE高値などのTh2型免疫反応を来たす(Tsukuba T. J Biochem. 2003) ADのモデルマウスの一つであるが、カテプシンEは前述の起痒物質“サブスタンスP”を基質としており、同ノックアウトマウスでは脳内へのサブスタンスP蓄積による行動異常などが報告されている(Shigematsu N et al. J Neurochem. 2008) 一般に皮膚炎惹起時にも表皮ケラチノサイトなどからサブスタンスPが誘導されるが、同ノックアウトマウスでは産生されたサブスタンスPの(分解遅延による)皮膚局所への蓄積が期待でき、サブスタンスPによる掻破行動や慢性皮膚炎形成への影響をみるのに好適なモデルと思われる。そこでこのカテプシンEのノックアウト

マウスとコントロールマウス、同過剰発現（トランスジェニック）マウスを用いて、難治性痒み・掻破行動の原因となるサブスタンス P の掻破行動や皮膚炎への影響を in vivo で定量的に評価をしたい。

## 2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎をはじめとした執拗な痒みを伴う皮膚疾患における痒みおよび掻破行動の影響や関連について、各種皮膚炎マウスモデルを用いて in vivo にて検討するものである。

## 3. 研究の方法

### 1. BALB/c マウスの皮膚で塗布前(0時間)

塗布 12 および 24 時間後の表皮を、掻破行動をブロックしたマウス群と自由に掻破行動を許したマウス間で比較検討し、因子を推定する。各群、条件(0, 12, 24 時間)で 3 匹ずつ使用し、統計的手法を用いて比較検討し、各時間帯での組織像なども合わせて検討する。候補因子決定後、当該因子のノックアウトマウスや in vivo ブロッキングを行い、皮膚炎形成、掻破行動への影響を調べる。

### 2. カテプシン E のノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、コントロールマウス(いずれも B6 バックグラウンド)にハプテンである TNCB を反復塗布して皮膚炎を誘発し、炎症細胞浸潤、サブスタンス P や各種関連物質の皮膚組織・血中での発現とマウスの掻破行動を評価する。

掻破行動は、マウスの自動行動測定器 MicroAct システム(ニューロサイエンス社)を用いて測定する。事前に深麻酔下において、マウスの両後肢の皮下に極小型で軽量のコーティングされたマグネットを挿入する。その後、実験的に様々な処置を受けたマウスを MicroAct システムを用いて掻破行動を測定する。また、免疫組織学的解析には局所皮膚の免疫染色用の各種抗体、血中のサブス

タンス P 測定に ELISA キットを使用予定である。

## 4. 研究成果

アレルギー性皮膚炎の代表的モデルであるハプテンを用いた接触過敏皮膚炎を BALB/c マウスで施行した。感作したマウスの耳介をハプテンで惹起反応させ、惹起前、同 12 時間後、24 時間後の遺伝子発現を、耳介への掻破行動ができないようにマウスの頸部周囲に襟首を装着したマウス(襟首付マウス)と対照マウス群で比較したところ、12 時間後 127 個、24 時間で 8 個の遺伝子発現に差異がみられた。それぞれ 9、1 個の免疫関連遺伝子を含んでいた。さらに皮膚ハプテン塗布時の皮膚初動遺伝子のひとつとして好中球遊走因子 MIP2a を同定した。その受容体である CXCR2 ノックアウトマウスでは、好中球の遊走が阻害されることが知られており、ハプテンを用いた接触過敏反応の皮膚局所では好中球浸潤が目立つことから、同ノックアウトマウスでは同反応の減弱が期待されたが、健常マウスと比べて同程度であり、組織的にも多形核を持った細胞が炎症皮膚局所に浸潤していた。現在、さらに解析中である。また、カテプシンノックアウトマウスで皮膚炎を惹起させて掻破行動測定を試みたが、測定器の内壁に対して走行様行動を見せるなど、激しい後肢運動が目立ち、正確な掻破測定ができなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件表示、他 38 件)

1. Takeuchi S\*, Esaki H, Furue M. Epidemiology of atopic dermatitis in Japan. J Dermatol. 2014 Mar;41(3):200-4.
2. Yasukochi Y, Takenaka K, Yurino A, Kurihara Y, Miake S, Uchi H, Takeuchi

- S, Kohda F, Moroi Y, Okano S, Yamamoto H, Furue M. Atopic dermatitis with CD30-positive anaplastic large cell lymphoma. *Eur J Dermatol*. 2014 Feb 1;24(1):132-3.
3. **竹内聡** アトピー性皮膚炎 -ステロイド外用剤に抵抗性のかゆみ- *Dermatology Today*, 2014 Apr 16;16:4-9
  4. **竹内聡**. 皮膚疾患患者・家族のためのより良いコミュニケーションのために「皮膚掻痒症」*Clinical Derma* 2012, Dec.;14:9-10.
  5. **Takeuchi S\***, Saeki H, Tokunaga S, Sugaya M, Ohmatsu H, Tsunemi Y, Torii H, Nakamura K, Kawakami T, Soma Y, Gytoku E, Hide M, Sasaki R, Ohya Y, Kido M, Furue M. A randomized, open-label, multicenter trial of topical tacrolimus for treatment of pruritus in patients with atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2012 May;24(2):144-50.
  6. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, **Takeuchi S**, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012 Oct 7;44(11):1222-6.
  7. Furue M, Ebata T, Ikoma A, **Takeuchi S**, Kataoka Y, Takamori K, Satoh T, Saeki H, Augustin M, Reich A, Szepietowski J, Fleischer A, Blome C, Phan NQ, Weisshaar E, Yosipovitch G, Ständer S. Verbalizing Extremes of the Visual Analogue Scale for Pruritus: A Consensus Statement. *Acta Derm Venereol*. 2013 Mar 27;93(2):214-215
  8. Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Aoki S, Toda S, Inagaki N, Kurihara Y, Hayashida S, **Takeuchi S**, Koike K, Ono J, Noshiro H, Furue M, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest*. 2012 Jul 2;122(7):2590-600.
  9. **竹内聡**、古江増隆. アトピー性皮膚炎の治療アドヒアランス向上を目指した治療戦略. TARC 症例 Tool p1-4, シオノギ製薬 2012年1月発行.
  10. Chiba T, **Takeuchi S**, Esaki H, Yamamura K, Kurihara Y, Moroi Y, Furue M. Topical application of PPAR (but not / or ) suppresses atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Allergy*. 2012 Jul;67(7):936-42.
  11. Kido M, **Takeuchi S\***, Sugiyama N, Esaki H, Nakashima H, Yoshida H, Furue M. T cell-specific overexpression of interleukin-27 receptor alpha-subunit (WSX-1) prevents spontaneous skin inflammation in MRL/lpr mice. *Br J Dermatol*. 2011 Jun;164(6):1214-20.
- [学会発表](計11件(招請講演4件含) 詳細略。
- [図書](計1件) 詳細略。
6. 研究組織  
(1)研究代表者：竹内聡
- 研究者番号：80403997