

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659316

研究課題名(和文) 鎮痒薬の薬効評価に有用なバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for useful biomarkers for evaluation of antipruritic agents

研究代表者

倉石 泰 (KURAIISHI, Yasushi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：80111970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：鎮痒薬の薬効評価に有用な血清或いは血漿中のバイオマーカーを慢性そう痒のマウスモデルを用いて探索した。副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が慢性そう痒症のマウスの血漿中で減少し、この減少が痒み行動を抑制した薬物処置により抑制された。ACTHは痒みとそれに伴うストレスのバイオマーカーになる可能性がある。また、グランザイムAと血清中タンパクのプロテオミクス解析により得られた複数のタンパクを対象に、バイオマーカーの探索を継続している。

研究成果の概要(英文)：We searched useful biomarkers for evaluation of antipruritic agents in serum and plasma, using mouse models for chronic pruritus. Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was found to be reduced in the plasma of mice with chronic pruritus, and this decrease was reversed by agents that inhibited itching behaviors. Thus, ACTH may be useful biomarkers for itching and itch-associated stress. Granzyme A and some serum protein, changes of which were revealed by proteomic analysis, are still analyzed as possible pruritus biomarkers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：痒み 鎮痒薬 バイオマーカー 血清中因子 副腎皮質刺激ホルモン

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎をはじめとする皮膚疾患の痒みは十分に抑制できないことが多く、抑制できない痒みがストレスを招き、社会生活に支障をきたす。事実、アトピー性皮膚炎患者の多くが皮膚炎の治療より痒みの抑制を最優先に望む。しかし、痒みの第一選択薬である抗ヒスタミン薬が無効な難治性の痒みが多く、新規鎮痒薬の開発が患者と医師の両者から待たれている。

これまでに、様々な難治性痒みの動物モデルが作出され、掻き動作を痒みの指標として鎮痒薬の種々の候補化合物が薬効評価され提案されてきた。しかし、痒みは、主観的な感覚であり、プラセボ効果が非常に大きいため、臨床での評価が難しい。その結果、有望視された薬物の有効性が検出できず開発を断念した事例も多い。現在、痒みの臨床での評価は、視覚的アナログ尺度 VAS (Visual Analog Scale) によるものが主流である。この評価法は患者の主観に基づくため、個々の患者の痒みの程度の変化を知ることができるが、痒みの程度の客観的評価はできない。臨床における痒みの治療に掻き動作を痒みの客観的評価法として用いることはあるが、鎮痒薬の臨床試験への利用は容易ではない。鎮痒薬の薬効評価法に、掻き動作以外の客観的評価法が利用できれば、臨床試験における有効性の検出効率が高まると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、慢性の痒みの動物モデル (アトピー性皮膚炎マウスモデル、乾燥性皮膚掻痒症マウスモデル) を用い、鎮痒効果の明確な薬物投与後の血清或いは血漿成分の変化を分析して、痒みのバイオマーカーを見出し、客観的痒み評価法の提案を目指すことを目的とした。

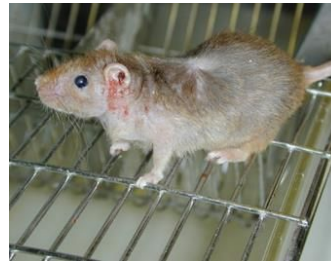
3. 研究の方法

実験動物：

実験には、雄性 ICR 系マウス及び NC 系マウスを用いた。

慢性アレルギー性皮膚炎マウスモデル：

NC 系マウスは、特定病原性微生物等の制御環境下 (SPF) で飼育すると皮膚は健康状態を維持し、痒み反応である掻き動作もほとんど認められない (健康 NC 系マウス)。一方、通常環境下でダニが寄生しているマウスと共存させる、ダニ感染が原因でアトピー性皮膚炎様の慢性アレルギー性皮膚炎を発症する (皮膚炎 NC 系マウス)。本実験では、健康マウスと皮膚炎マウスを用いた。



慢性アレルギー性皮膚炎 (NC 系マウス)

乾燥性皮膚掻痒症マウスモデル：

吻側背部を剃毛した ICR 系マウスを用いた。アセトン及びエーテル (1:1) 混液を浸み込ませた脱脂綿を 15 秒間剃毛部に作用させ、続いて蒸留水を染み込ませた脱脂綿を 30 秒間作用させた (AEW 処置)。この操作を 1 日 2 回 8 時間以上の間隔をおいて 5 日間行い、本モデルを作製した。



乾燥性皮膚掻痒症 (ICR 系マウス)

薬物と採血：

慢性アレルギー性皮膚炎マウスモデルには、アゼラスチン塩酸塩 (30 mg/kg) 或いは溶媒 (水道水) を 1 日 1 回 7 日間経口投与した。7 日間の投与の翌日、行動実験後、ウレタン麻酔下心臓採血を行い、一部は血清、一部は血漿に精製した。

乾燥性皮膚掻痒症マウスモデルには、1 日 2 回の AEW 処置それぞれの 1 時間後にタクロリムス (0.1%) 或いは溶媒 (エタノール) を 0.1 mL を剃毛部皮膚に 5 日間塗布した。5 日間塗布翌日、行動実験後、ウレタン麻酔下心臓採血を行い、一部は血清、一部は血漿に精製した。なお、両実験とも採血は一定の時間帯に行った。

行動実験：

行動観察 1 時間前にマウスを行動観察用ケージ (13×9×40 cm) に入れ、放置し、撮影環境に馴化させた。行動の撮影は、無人環境下にデジタルビデオカメラで行った。ビデオの再生により後肢による全身あるいは剃毛部への掻き動作をカウントした。マウスは、1 秒間に数回掻くので、足をあげて降ろすまでの一連の動作を掻き動作の 1 回としてカウントした。

血漿中副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 並びに血清中コルチゾールの測定：

血漿中 ACTH 並びに血清中コルチゾールの

測定は、株式会社モノリスに依頼した。

血清中グランザイム A 測定：

予め 96 ウェルプレートにグランザイム A 抗体をコーティングし、健常並びにアトピー性皮膚炎 NC マウス血清を作用させた。洗浄後、N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide (グランザイム A の基質) を含む溶液と反応させた。グランザイム A により切断され遊離した p-nitroanilide を 420nm で吸光度を測定した。

血清プロテオミクス解析：

薬物投与前のアトピー性皮膚炎 NC 系マウスの行動実験後、頭部頰の内頸静脈より血液を採取し、血清を精製し -80 で保管した。その後、アゼラスチン塩酸塩 (30 mg/kg) を 1 日 1 回 7 日間投与翌日に行動実験を行い、麻酔下心臓採血を行い、血清を精製した。

血清中免疫グロブリン除去カラムによるタンパク質の精製並びに 2 次元電気泳動によるタンパク質の分離と発現の増減に関する解析は、東和環境科学プロフェニックス事業部に依頼した。

4. 研究成果

(1)慢性アレルギー性皮膚炎マウスモデルにおける掻き動作、血漿 ACTH 濃度及び血清コルチゾール濃度へのアゼラスチン塩酸塩の影響

慢性アレルギー性皮膚炎の NC 系マウスは、健常な NC 系マウスと比べ有意に自発的掻き動作が増加し、血漿中 ACTH が減少していた (図 1)。血清コルチゾールは減少傾向を示した (図 1)。アゼラスチン塩酸塩の 7 日間の経口投与により、掻き動作回数が減少し ACTH とコルチゾールの減少が抑制された (図 1)。

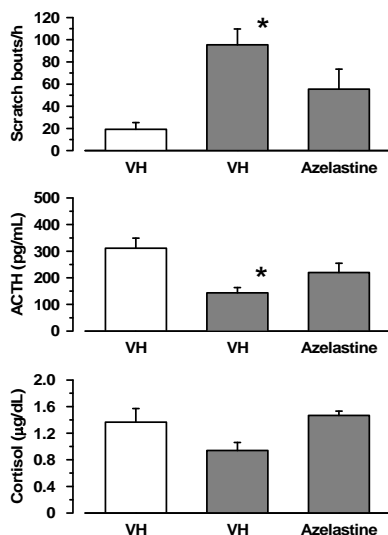


図 1.慢性アレルギー性皮膚炎マウスモデルにおける掻き動作、血漿 ACTH 濃度及び血清

コルチゾール濃度へのアゼラスチン塩酸塩の影響。アゼラスチン塩酸塩 (30 mg/kg) 或いは溶媒 (VH, 水道水) は、1 日 1 回 7 日間経口投与した。7 日間の経口投与翌日に行動実験並びに採血を行った。白カラムは健常 NC 系マウス、灰色カラムはアトピー性皮膚炎 NC 系マウスから得られた結果を示す。* $p < 0.05$ vs. 健常 NC マウス (行動実験及び ACTH $n = 5-6$; コルチゾール, $n = 3-6$) (Holm-Šidak test)

(2)乾燥性皮膚掻痒症マウスモデルにおける掻き動作、血漿 ACTH 濃度及び血清コルチゾール濃度へのタクロリムスの影響

乾燥性皮膚掻痒症マウスは、無処理健常マウスと比べ有意に自発的掻き動作が増加した (図 2)。血漿 ACTH は、減少傾向を示したが、血清コルチゾールは変化しなかった (図 2)。乾燥性皮膚掻痒症マウスにおいて、これまで当研究において掻痒反応を抑制することを見出してきた免疫抑制薬タクロリムスの 5 日間の塗布は、掻き動作回数を溶媒塗布群に比べ有意に抑制することを本実験で確認した (図 2)。ACTH とコルチゾール血清中レベルは増加傾向を示したが統計的には有意ではなかった (図 2)。

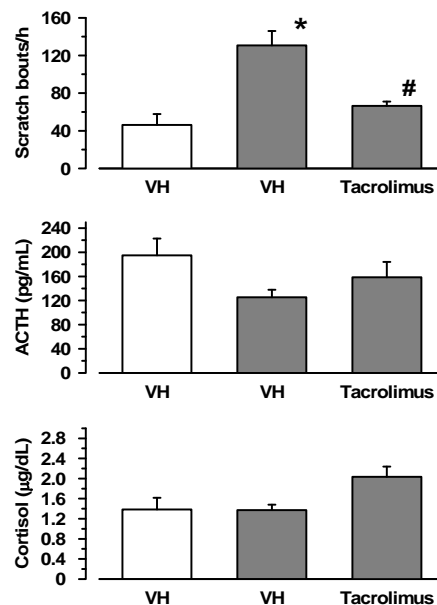


図 2.乾燥性皮膚掻痒症マウスモデルにおける掻き動作、血漿 ACTH 濃度及び血清コルチゾール濃度へのタクロリムスの影響。タクロリムス (1%) 或いは溶媒 (VH, エタノール) は、1 日 2 回 5 日間剃毛部皮膚に 0.1 mL の容量で塗布した。5 日間の塗布翌日に行動実験並びに採血を行った。白カラムは無処置健常マウス、灰色カラムは AEW 処置乾燥性皮膚掻痒症マウスから得られた結果を示す。

*p<0.05 vs. 無処置健常マウス,#p<0.05 vs. 溶媒塗布 AEW 処置乾燥性皮膚搔痒症マウス(n = 6-7)(Holm-Šidák test)

(3)慢性アレルギー性皮膚炎マウスモデルにおける血清中グランザイム A の活性

慢性アレルギー性皮膚炎 NC 系マウスや蚊アレルギーのマウスの痒み反応に T 細胞が関与することをこれまで明らかにしてきた。T 細胞から主に遊離される因子にグランザイム A がある。我々は、グランザイム A が T 細胞の関与する痒みのバイオマーカーになりうる可能性を調べた。血清中のグランザイム A の活性を測定する方法を開発し、急性アレルギー性の皮膚の痒みで血清中のグランザイム A 活性が上昇することを見出した。ここでは、本研究は、慢性アレルギー性皮膚炎の NC 系マウスの血清中のグランザイム A の活性を測定した。健常マウスに比べ、慢性皮膚炎マウスの血清中のグランザイム A の活性が有意に増加することを明らかにした(図 3)。

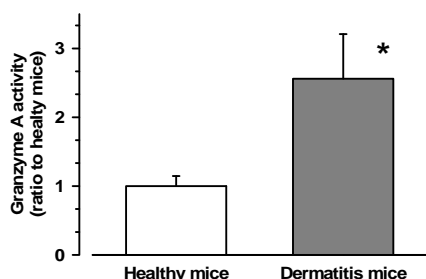


図 3. 慢性アレルギー性皮膚炎マウスモデルにおける血清中グランザイム A の活性。活性測定法は、方法を参照。*p<0.05 vs. 健常 NC マウス (n = 6)(Student's t-test)

(4)アゼラスチン塩酸塩投与慢性アレルギー性皮膚炎 NC 系マウスの血清のプロテオーム解析

慢性アレルギー性皮膚炎の NC 系マウスに 7 日間アゼラスチン塩酸塩を投与し、痒み反応が抑制されたマウスについて、アゼラスチンの投与開始前と投与終了後の血清を、2 次元電気泳動法で比較解析した。投薬終了後で増加したタンパク質の電気泳動スポットは 59 個、減少したスポットは 17 個であった。血清中には多くの免疫グロブリンが存在している。そこで、カラム処理により免疫グロブリンを除去した試料を 2 次元電気泳動で解析したところ、アゼラスチンの投薬後で増加したスポットは 67 個、減少したスポットは 19 個であった。

(5)まとめ

本実験では、痒み反応を抑制する薬物 2 種

(アゼラスチン塩酸塩とタクロリムス)を用い、そう痒症の発生機序が異なる慢性アレルギー性皮膚炎と乾燥性皮膚搔痒症のマウスモデルにおいて痒みとその抑制により血液中濃度が変化する内因性因子鎮痒薬評価のためのバイオマーカーの候補を探索した。痒みは、ストレスがかかることからストレスのマーカーとされている ACTH やコルチゾールを測定したが、2 つの痒みの病態モデルで共通して血漿中の ACTH が減少していることが明らかとなった。また、痒み行動を抑制する薬物投与により減少が抑制された。コルチゾールの増加は、一般的に ACTH により制御されている。今回の結果では、慢性そう痒で血清中のコルチゾールは統計的には有意ではなかったが低下の傾向とかゆみ行動の抑制による低下抑制が認められた。異なる病態モデルや異なる薬理学的作用機序の 2 つの鎮痒薬で同じような結果を得たことは、特に血漿中 ACTH が痒みあるいは鎮痒効果の評価のためのマーカーになる可能性がある。今後、更に別の痒みの動物モデル並びに鎮痒薬で評価し、確認する予定である。

本研究では、慢性アレルギー性皮膚炎マウスの血清中でグランザイム A の活性が増加していることも明らかにした。薬物による慢性そう痒抑制の効果の評価は終了していないが、ACTH などともに痒みと鎮痒の評価に使用できるバイオマーカーになるかどうか今後検討する予定である。

鎮痒薬投与により血清中で変化するタンパク質の網羅的解析を行うべく 2 次元電気泳動を用いた解析を行った。アゼラスチン塩酸塩の投与により多くのタンパク質の血清中での増減が認められた。今後、MALDI-TOF 法を用いて、変化タンパク質の同定を行い、健常マウスの血清との比較や他の鎮痒薬投与による血清中の変化など調べる予定である。

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 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 1 件)

名称: アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用

発明者：倉石 泰，安東嗣修，中野 祐
権利者：富山大学
種類：特許
番号：特許第 5297389 号
取得年月日：平成 25 年 8 月 2 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等 該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

倉石 泰 (KURAIISHI Yasushi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
教授
研究者番号：80111970

(2)連携研究者

安東 嗣修 (ANDOH Tsugunobu)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
准教授
研究者番号：50333498

(3)研究協力者

羽座 沙都美 (HAZA Satomi)
富山大学・大学院医学薬学教育部(薬学)・
大学院生

高橋 遼平 (TAKAHASHI Ryohei)
富山大学・大学院医学薬学教育部(薬学)・
大学院生

水田 彩花 (MIZUTA Ayaka)
富山大学・大学院医学薬学教育部(薬学)・
大学院生