

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590723

研究課題名(和文) ヒスタミンH4受容体遮断薬の掻痒における作用点の解明と新たな治療戦略

研究課題名(英文) Mechanism of anti-pruritic action of histamine H4 receptor antagonist and its usefulness in the treatment of itching dermatitis.

研究代表者

山浦 克典 (YAMAURA, Katsunori)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10543069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎をはじめとする、痒み症状を伴う慢性皮膚疾患では、長期間にわたる外用ステロイド療法は必要不可欠となる。一方、申請者は、ステロイド外用剤を反復塗布すること自体が、痒みの原因となり得ることを報告してきた。ヒスタミンの4番目の受容体を阻害するH4受容体拮抗薬は、ステロイド外用薬の抗炎症作用を高め、且つ、ステロイドが引き起す痒みを改善することを本研究により明らかにした。H4受容体拮抗薬は、長期ステロイド外用療法をより安全に実施する上で有効な治療薬となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Topical glucocorticoids are the first-line therapy for chronic dermatitis. We previously reported that long-term topical glucocorticoids exacerbated pruritus in chronic dermatitis model mice. In this study, we clarified that oral dose of histamine H4 receptor antagonist prevented the worsening of pruritus, and additionally suppressed the inflammation. These results indicated that H4 receptor antagonist would be useful for prevention of the exacerbation of pruritus induced by topical glucocorticoids in patients with chronic dermatitis.

研究分野：薬理学

キーワード：H4受容体拮抗薬 ステロイド長期塗布誘発掻痒 プロスタグランジンD2 (PGD2) ケラチノサイト サブ
スタンスP (SP) ヒスタミン マウス

1. 研究開始当初の背景

掻痒は誰もが経験するありふれた症状であるが、慢性的な掻痒は不眠や集中力の低下を招き、患者の QOL を著しく損なう。難治性の慢性掻痒疾患に罹患する患者は年々増加しており、有効な抗掻痒薬の開発が急務となっている。動物を用いた痒みの評価法が長年存在しなかった為、この分野の研究は遅れていたが、1995 年に倉石らがマウスを用いた痒みの優れた評価法を報告してから、掻痒の研究は急速に前進し、痒みメディエータとして古くから知られるヒスタミンの他、トリプターゼ、ロイコトリエン B4 (LTB4)、サブスタンス P (SP) (Thomsen et al. Br J Dermatol. 2002)、一酸化窒素 (NO) (Andoh et al. Br J Pharmacol. 2003)、過酸化水素、オピオイドペプチド (Paus et al. J Clin Invest. 2006) など、様々な痒みメディエータが存在し、掻痒反応に関与していることが明らかとされてきた。2000 年に新規同定されたヒスタミン H4 受容体を刺激することで掻痒反応を誘発し (Bell et al. Br J Pharmacol. 2004) この反応は H4 受容体拮抗薬もしくは H4 受容体ノックアウトマウスにより抑制されることから (Dunford et al. J Allergy Clin Immunol. 2007) H4 受容体が痒み受容体として掻痒反応に関与している可能性が高まってきた。また、掻痒の抑制因子として、近年マスト細胞由来プロスタグランジン (PG)D2 が掻痒反応を抑制することが報告され (Hashimoto et al. J Pharmacol Sci. 2005) 注目を集めている。しかしながら、掻痒研究は緒に就いたばかりで、他の疾患に比べると著しく遅れており、未だ解明すべき課題が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) SP 誘発急性掻痒モデルにおける H4 受容体の作用点の検討

申請者は H4 受容体拮抗薬が SP 誘発急性掻痒に対し、有意な抗掻痒作用を示すことを報告しているが (Yamaura et al. J Toxicol Sci. 2009) その詳細は依然不明である。申請者はマスト細胞欠損マウスが野生型マウスに比較して強い掻痒反応を示す実験結果に注目し (未発表データ) マスト細胞が掻痒を抑制的に調節していると予測している。そこで本研究では、H4 受容体の掻痒における作

用点を検討する一環として、SP 誘発急性掻痒における末梢 H4 受容体の関与の検討、

SP 誘発急性掻痒における LTB4 の関与と搔破行動に及ぼすマスト細胞の役割を検討する。

(2) ケラチノサイトにおける H4 受容体の発現と機能に関する検討

近年申請者らは、アトピー性皮膚炎を模倣した慢性掻痒マウスモデルにおける、H4 受容体アンタゴニストの有効性を示し、H4 受容体が慢性皮膚疾患治療に有用な標的分子となり得ることを示唆した (Suwa E, Yamaura K, et al. Eur J Pharmacol 2011)。本研究では、慢性皮膚炎を模したケラチノサイト培養系により H4 受容体の発現と機能を検討する。

(3) ステロイド長期塗布誘発掻痒モデルにおける H4 受容体の関与の検討

アトピー性皮膚炎治療においてステロイド外用薬は第一選択薬として世界中で使用されているが、長期間のステロイド外用薬療法は掻痒のリバウンド現象を惹起する事が知られている。この現象の解明を目的に、申請者は近年、ステロイド外用薬を反復塗布すること自体が、掻痒の原因となり得ることを発見し、ステロイド外用薬により起痒する極めて独創的な新規掻痒モデルを作成した (Yamaura et al. J Toxicol Sci. 2011)。そこで本研究では、安全な長期ステロイド外用療法の確立を目的に、ステロイド長期塗布誘発掻痒モデルを用い、病変部位のヒスタミン H1 ~ H4 受容体の発現、ケラチノサイト由来 NO 産生における H4 受容体の関与、ステロイド長期塗布誘発掻痒モデルに対する H4 受容体拮抗薬の作用、同モデルにおけるマスト細胞由来掻痒抑制因子の関与について検討する。

3. 研究の方法

(1) SP 誘発急性掻痒モデルにおける H4 受容体の作用点の検討

SP 誘発急性掻痒は、6週齢の雄性 ICR 系マウスに SP を頸背部皮内へ投与することで、誘発した。H4 受容体遮断薬 (JNJ7777120) は SP と混合し投与した。掻痒反応の評価はマウス搔破行動測定装置 (MicroAct) を用い、30分

間の搔破回数を搔痒の指標とした。
SP誘発急性搔痒マウスの皮膚内LTB4産生および搔破行動について、マスト細胞欠損マウス(W/B6F1 W/Wv)を用いて検討した。マウスの頸背部にSPを皮内投与して急性搔痒を誘発した後、皮膚内LTB4産生量を解析した。LTA4はLTA4 hydrolaseによりLTB4に加水分解されるため、LTA4 hydrolase 阻害薬(JNJ26993135)を投与することによりLTB4産生を抑制することで、SP誘発搔痒が抑制されるかを検討した。

(2) ケラチノサイトにおける H4 受容体の発現と機能に関する検討
ヒト表皮株化ケラチノサイト(HaCaT)を用いた。Ca²⁺濃度1.6 mMに調整したDMEM培地によりHaCaTの分化を誘導した。H4受容体mRNA発現はReal-time PCR法で検討した。また、HaCaTをヒスタミン(100 μM)とTNFα(100 ng/ml)で刺激し、IL-8産生をmRNA発現で評価した。さらに、H4受容体拮抗薬JNJ7777120(10 μM)を用い、HaCaTのIL-8産生におけるH4受容体の関与を検討した。

(3) ステロイド長期塗布誘発搔痒モデルにおけるH4受容体の関与の検討
BALB/c系雌性マウスの両耳介に2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene(TNCB)を週3回反復塗布し慢性皮膚炎を誘発した。TNCB塗布開始2週間後より7週間、デキサメタゾン(DEX)を両耳介へ連日塗布すると共に、H4受容体拮抗薬(JNJ28307474)およびH1受容体拮抗薬(fexofenadine)をそれぞれ20 mg/kgおよび30 mg/kgの用量で1日2回連日経口投与した。搔痒は搔破回数をSCLABA®-Realを用いて、皮膚炎症状は耳介腫脹を指標に評価した。病変部位のH1~H4受容体mRNA発現は、解剖時に採取した耳介組織中のH1~H4受容体mRNA発現量をrealtime PCR法により測定した。
ヒト表皮株化ケラチノサイトHaCaT培養試験系を用い、IFN-γで刺激したHaCaTに対するDEXの作用について、H4受容体発現はReal-time PCR法で、NO産生はGriess法により検討した。またH4受容体拮抗薬(JNJ7777120)を共添加することでHaCaTにおけるH4受容体の機能を評価した。
マスト細胞由来搔痒抑制因子であるPGD2の

関与に関する検討では、C57BL/6マウスを用い、PGD2受容体DP1刺激薬(BW245C)をbetamethasone valerateと混合して8日間連日塗布し、搔痒に対する影響を評価した。

4. 研究成果

(1) SP 誘発急性搔痒モデルにおける H4 受容体の作用点の検討

SP 誘発急性搔痒反応が、SP と H4 受容体拮抗薬(JNJ7777120)の混合物を皮内投与することで抑制されたことから、H4 受容体拮抗薬の作用点が皮膚局所にあることが示唆された。また、SP 誘発急性搔痒マウスの起痒部位である皮膚のマイクロダイアリシス法を用いた検討により、SP 搔痒においてはNOの関与の可能性は低いと考えられた。

SP 搔痒における LTB4 の関与について検討した。SP 処置によりマウスの搔破行動ならびに投与部位の皮膚内 LTB4 産生は亢進した。一方、LTB4 産生を特異的に阻害する LTA4 hydrolase inhibitor を事前に処置したマウスでは、SP による LTB4 産生は抑制されたが、SP が誘発する搔破行動に変化は見られなかった。以上の結果から、本 SP 搔痒モデルにおける LTB4 の関与は小さい可能性が考えられた。さらに、マスト細胞欠損マウスと野生型マウスを用い、SP 処置部位の皮膚内 LTB4 産生量および搔破行動を検討した。SP はマスト細胞欠損マウスにおいて搔痒反応を惹起したが、LTB4 産生は亢進しなかった。これより、LTB4 の産生細胞としてマスト細胞が考えられること、また SP 搔痒においてはLTB4以外の因子の関与が大きい事が考えられた。

(2) ケラチノサイトにおける H4 受容体の発現と機能に関する検討

高 Ca 培地で HaCaT の分化を誘導したところ、H4 受容体の発現は、細胞の分化に伴い有意に亢進した(Figure 1)。

HaCaTをヒスタミンとTNFαで刺激したところ、各単独刺激に比べ、共刺激により有意なIL-8産生が誘導された。H4受容体拮抗薬JNJ7777120がこれを有意に抑制したことから、ヒスタミンとTNFαの共刺激によるケラチノサイトのIL-8産生誘導はH4受容体を介することが示唆された。(Figure 2)。

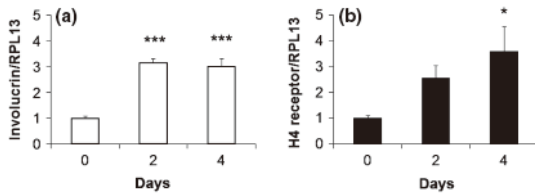


Figure 1. Expression of involucrin and H4 receptor on HaCaT cells. Relative expression of (a) involucrin and (b) histamine H4 receptor was determined by real-time RT-PCR. In all cases, mRNA levels were normalized to the corresponding RPL13 mRNA levels, and the mean value at day 0 was set to 1.0. Error bars represent means \pm SD of triplicates. All results are representative of at least three separate experiments. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with day 0 (Dunnnett's method).

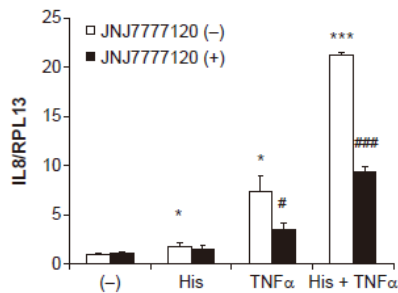


Figure 2. Effect of the H4 receptor antagonist JNJ777120 on the expression of IL-8 mRNA by histamine- and TNF α -treated HaCaT cells. Cells were cultured with histamine, TNF α and an H4 receptor antagonist as indicated. mRNA levels were normalized to the corresponding RPL13 mRNA levels, and the mean value in the JNJ777120 (-)/(-) group was set to 1.0. Error bars represent means \pm SD of triplicates. All results are representative of at least three separate experiments. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with JNJ777120 (-)/(-) group (Dunnnett's test). # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ compared with the corresponding value in the JNJ777120 (-) group (Student's t-test).

(3) ステロイド長期塗布誘発掻痒モデルにおける H4 受容体の関与の検討

ステロイド掻痒モデルの皮膚病変部における各ヒスタミン受容体 mRNA 発現量を検討し、正常マウスに比べ皮膚炎マウスの病変部位では H1 および H2 受容体に比べ H4 受容体 mRNA 発現が有意に亢進している知見を得た。更に、DEX 塗布により病変部位の H1 および H2 受容体 mRNA は有意に減少したが、H4 受容体 mRNA は減少しなかった。これより、DEX を長期塗布した皮膚においては、相対的に H4 受容体数が増加している可能性が考えられた。

ステロイド長期塗布による掻痒増悪において、ケラチノサイト由来 NO 産生と H4 受容体の関与を明らかにすることを目的に、HaCaT 培養系を用い検討した。IFN γ 刺激した HaCaT は DEX 添加により NO 産生の亢進を示した。この時、iNOS mRNA および H4 受容体 mRNA 発現はいずれも亢進していた。更に、NO 産生は JNJ777120 添加により有意に低下したことから、H4 受容体がケラチノサイトの NO 産生において、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

ステロイド長期塗布誘発掻痒モデルに対

する H4 受容体拮抗薬 (JNJ28307474) の有用性を掻痒誘発予防の観点から検討した。DEX は皮膚炎マウスの耳介腫脹を顕著に抑制したが、掻破回数は逆に増悪させた。JNJ28307474 は DEX が誘発した掻破回数が増悪を強く抑制し、DEX による耳介腫脹抑制作用を更に亢進した。一方、H1 受容体拮抗薬の fexofenadine は掻破回数、耳介腫脹いずれにおいても明らかな作用を示さなかった。以上の結果より、アトピー性皮膚炎をはじめとする長期外用ステロイド療法が必須となる皮膚疾患治療において、H4 受容体拮抗薬とステロイド外用薬との併用療法は、ステロイドにより誘発される掻痒の増悪を改善し、一方で抗炎症作用は増強する、極めて有効な併用療法となり得ると考えられた。

ステロイド長期塗布誘発掻痒モデルにおける、マスト細胞由来掻痒抑制因子である PGD2 の関与について検討した。その結果、長期ステロイド塗布が誘発する掻痒は、マスト細胞由来 PGD2 産生抑制に起因する可能性が示唆された。さらに、PGD2 受容体 DP1 刺激薬の BW245C をステロイド外用薬と同時に塗布することで、掻痒誘発が顕著に抑制出来ることを見出した。本知見より、ステロイド外用薬と DP1 受容体刺激薬の配合剤が長期ステロイド外用療法をより安全に実施する上で有用な治療薬となり得る可能性が示唆された。

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13件)

Suwa E, Yamaura K, Sato S, Ueno K. Increased expression of the histamine H4 receptor following differentiation and mediation of the H4 receptor on interleukin-8 mRNA expression in HaCaT keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 査読有、23、2014、138-140. DOI: 10.1111/exd.12313.

Yamaura K, Tomono A, Suwa E, Ueno K. Sex-related differences in SLIGRL-induced pruritus in mice. *Life Sciences*, 査読有、94、2014、54-57. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.10.036.

Yamaura K, Shigemori A, Suwa E, Ueno K. Expression of the histamine H4 receptor in dermal and articular tissue. *Life Sciences*, 査読有、92、2013、108-113.

DOI: 10.1016/j.lfs.2012.10.030.
Yamaura K, Tomono A, Suwa E, Ueno K. Topical royal jelly alleviates symptoms of pruritus in a murine model of allergic contact dermatitis. Pharmacognosy Magazine、査読有、9、2013、9-13.
DOI: 10.4103/0973-1296.108127.
Yamaura K, Doi R, Suwa E, Ueno K. Topical glucocorticoids exacerbate pruritus via inhibition of prostaglandin D2 production of mast cells in a murine model of allergic contact dermatitis. Journal of Toxicological Sciences、査読有、37、2012、1127-1134 .
DOI: 10.2131/jts.37.1127
Yamaura K, Akiyama S, Ueno K. Increased expression of the histamine H4 receptor subtype in hypertrophic differentiation of chondrogenic ATDC5 cells. Journal of Cellular Biochemistry、査読有、113、2012、1054-1060.
DOI: 10.1002/jcb.23436
Yamaura K, Oda M, Suzuki M, Ueno K. Lower expression of histamine H4 receptor in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis compared to those with osteoarthritis. Rheumatology International、査読有、32、2012、3309-3313.
DOI: 10.1007/s00296-011-2069-6

〔学会発表〕(計2件)

山浦克典、長期ステロイド外用療法に伴う痒みの誘発、千葉アレルギー臨床カンファレンス 2015、2015.1.21、オークラ千葉ホテル(千葉)
Yamaura K、Topical glucocorticoid-induced pruritus. 24th International Symposium of Itch、2014.10.18、Tokyo (Japan)
山浦克典、マウス搔痒評価系における搔破行動に及ぼす性差の影響、第21回日本免疫毒性学会学術年会、2014.9.11-12、徳島文理大学(徳島)
小沼盛司、ヒスタミン H4 受容体拮抗薬の長期外用ステロイド療法に伴う搔痒予防の有効性、第21回日本免疫毒性学会学術年会、2014.9.11-12、徳島文理大学(徳島)
小沼盛司、長期外用ステロイド療法に伴う搔痒増悪とヒスタミン H4 受容体拮抗薬の有効性、第41回日本毒性学会学術年会、2014.7.2-4、神戸コンベンションセンター(神戸)
山浦克典、長期ステロイド外用療法に伴う搔痒性皮膚毒性、第41回日本毒性学会学術年会、2014.7.2-4、神戸コンベンションセンター(神戸)
船越彩花、ステロイド誘発性搔痒モデル

における皮膚内 PGD2 の役割、第134回日本薬学会年会、2014.3.28-30、熊本大学(熊本)
諏訪映里子、ヒスタミン H4R をターゲットとする新たな難治性搔痒治療に関する研究、第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013.11.22-23、東北大学(仙台)
山浦克典、ステロイド誘発搔痒におけるマウス搔破行動に対するステロイド外用薬の作用強度の影響、第20回日本免疫毒性学会学術大会、2013.9.12-13、東海大学代々木キャンパス(東京)
Doi R, An in vivo and in vitro analysis of the mechanism of glucocorticoids-induced pruritus in chronic allergic contact dermatitis., 22nd International Symposium of Itch、2012.10.6、Tokyo (Japan)
Yamaura K、Expression of histamine H4 receptor in human skin and amelioration of experimental acute pruritus using H4 receptor antagonist. European Congress of Immunology、2012.9.5-8、Glasgow (UK)
Suwa E、Histamine H4 receptor mediates dermal inflammation and pruritus in a hapten induced long-term experimental model. European Congress of Immunology、2012.9.5-8、Glasgow (UK)
山浦克典、ステロイド外用剤のプロスタグランジン D2 産生抑制を介する搔痒誘発作用に関する研究、第39回日本毒性学会学術年会、2012.7.17-19、仙台国際センター(仙台)

〔図書〕(計2件)

Yamaura K, Ueno K. Alpha Science International (Oxford)、Anti-pruritic and anti-inflammatory herbal or natural products for treatment of skin disease. In: Natural Bioactive Molecules: Impacts & Prospects (Brahmachari G, ed.), 2013、11.1-11.13
Yamaura K, Suzuki M, Namiki T and Ueno K, InTech (Croatia)、Expression of the histamine H4 receptor in human tissue. In: Allergic Diseases - Highlights in the Clinic, Mechanisms and Treatment, (Raffi Tachdjian, ed.), 2012、31-42

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: DP1 アゴニストとステロイドとを含む外用剤
発明者: 山浦 克典、船越 彩花
権利者: 国立大学法人千葉大学

種類：特許
番号：特願 2014-194053
出願年月日：平成 26 年 9 月 24 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山浦 克典 (YAMAURA, Katsunori)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：10543069

(2) 研究協力者

諏訪 映里子 (SUWA Eriko)