

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 2 8 年 5 月 1 6 日現在

機関番号：3 2 6 2 0

研究種目：基盤研究(C) ( 一般 )

研究期間：2013 ~ 2015

課題番号：2 5 4 6 0 7 2 7

研究課題名 ( 和文 ) 難治性かゆみにおける脊髄グリア細胞の役割の解明と新規治療法の開発

研究課題名 ( 英文 ) Elucidation of roles of spinal glial cells in intractable itch and development of antipruritic therapy

研究代表者

高森 建二 ( Takamori, Kenji )

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：4 0 0 5 3 1 4 4

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 4,000,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : 本研究ではアトピー性皮膚炎のかゆみに焦点を絞り、難治性かゆみにおける脊髄グリア細胞、特にミクログリアの役割の解明と治療への応用を目指した。

その結果、ミクログリア活性化阻害剤であるminocyclineの髄腔内投与は脊髄において増加したミクログリア数を減少させることで、アトピー性皮膚炎様症状を発症したNC/Ngaマウスのかゆみ行を抑制し、皮膚炎を改善した。

本研究の成果により、脊髄後角のミクログリアがアトピー性皮膚炎における難治性かゆみの治療標的のひとつに成り得ることが示唆された。

研究成果の概要 ( 英文 ) : This study was performed to investigate role of spinal glial cells, especially microglia, in intractable itch of atopic dermatitis (AD) using NC/Nga mouse, an AD model. Intrathecal injection of minocycline (an inhibitor of microglia) suppressed scratching behavior and improved the dermatitis scores through inhibition of increase of spinal microglia. Thus, this finding suggests that spinal microglial cell is one of antipruritic targets in AD.

研究分野：皮膚科学、かゆみ科学

キーワード：難治性かゆみ ミクログリア アトピー性皮膚炎 脊髄 ミノサイクリン

## 1. 研究開始当初の背景

かゆみは『掻破したいという欲望を起こさせる不快な感覚』として定義される。また、かゆみは病原体、昆虫、植物等の外部異物に対する自己防衛系であると共に、皮膚を含む全身の異常を知らせるシグナルである。一方、知覚異常としてのかゆみは痛みと同様に QOL を低下させる。特に、我慢できず、既存治療が無効な『難治性のかゆみ』は、不眠、自殺率(願望)の増加、労働・勉強障害などの一因にもなっている。しかし、かゆみの発症メカニズムは病態によって千差万別で、有効なかゆみ抑制法も個々に応じて異なる。そのため、難治性かゆみの発生機序の解明と新規治療法の開発が切望されており、近年では『QOL 向上』を最終目標に、世界各国でかゆみ研究を重点化する動きが出始めている。

このような背景から、これまで我々は中心的な研究対象としてきた難治性かゆみを伴うアトピー性皮膚炎(AD)や乾皮症などの皮膚では、知覚神経線維(主に C-線維)が表皮内に侵入し、増生することを見出した(Tominaga and Takamori, *Exp Rev Dermatol.* 2010, 5: 197-212)。この増生した表皮内神経線維は外部刺激により容易に興奮し、その興奮がかゆみシグナルとして脊髄一視床経路を介して脳に伝達され、かゆみが生じる。本経路には代表的な起痒物質であるヒスタミンが関与していないため、かゆみ治療の第一選択薬であるヒスタミン  $H_1$  受容体 ( $H_1R$ ) 拮抗薬が奏功しないと考えられる。また、表皮内神経線維の増生は表皮角化細胞が産生する神経伸長因子(NGF、amphiregulin、gelatinase)と神経反発因子(Sema3A、anosmin-1)の発現バランスによって制御されることを世界で初めて報告した(Tominaga et al., *J Dermatol Sci.* 2007, 46: 199-210; Tominaga et al., *Br J Dermatol.* 2008, 158: 842-4)。さらに、紫外線療法の PUVA (psoralen-ultraviolet A) は AD 患者の表皮にお

ける神経伸長因子と反発因子の異常発現を正常化し、表皮内で増生した神経線維を消退させ、かゆみを抑制した(Tominaga et al., *J Dermatol Sci.* 2009, 55: 40-6; Kamo et al., *J Dermatol Sci.* 2011, 62: 91-97)。これらの発見に基づき、我々は神経線維を退縮させる神経反発因子 Sema3A に着眼し、AD の難治性かゆみに対する Sema3A 軟膏の有効性を動物モデル実験で証明した(Negi et al., *J Dermatol Sci.* 2012, 66: 37-43)。このように、我々は神経ガイダンス分子に制御された表皮内神経密度がかゆみの難治化に寄与することを明らかにした。

前述した表皮内神経線維の稠密化に加え、AD の難治性かゆみでは、末梢で開始された持続的なかゆみ刺激が中枢神経系の生理的・解剖的变化を引き起こし、それが慢性化の引き金になると推定されている。さらに、かゆみが慢性化するとかゆみ閾値が低下し、皮疹が良くなってもかゆみが持続し、その強度も増加する。一旦、中枢性感作が起こると慢性のかゆみを治療するのは非常に困難となり、難治化する。従って、難治性かゆみを治療するためには末梢と中枢の両方に作用する薬剤の開発が切望されており、そのためには末梢だけではなく、中枢での知覚異常に基づくかゆみ発生の分子機構を解明する必要がある。

そこで、本問題解決の糸口として、痛みの先行研究から明らかにされつつある慢性疼痛の発生に関与している『グリア細胞』に着目した。近年の研究から、神経因性疼痛の発生には痛みを伝える神経細胞だけでなく、脳や脊髄のグリア細胞が深く関わっていることが明らかにされている(Nakagawa et al., *J Pharmacol Sci.* 2010, 114, 347-53; Inoue et al., *Exp Neurol.* 2012, 234: 293-301)。グリア細胞は痛覚回路における神経細胞の振る舞いを監視し、神経損傷などによって神経細胞が強い痛み信号を出すと、すみやかに脳に伝わる

ように痛覚回路の感度を上げる因子を放出する。また、グリア細胞はサイトカインを放出して炎症を惹起し、周囲の神経線維を敏感にする。グリア細胞のこうした反応は治癒を促す効果があるが、長く続き過ぎると、脳神経系の慢性的な過敏状態の引き金となり、慢性疼痛の発症に繋がると考えられている。さらに、グリア細胞は医療用麻薬への耐性にも関与している。慢性疼痛の患者には、麻薬性鎮痛剤が処方されることがしばしばあるが、次第に効果が弱くなり、投与量や頻度を増やさないと十分な効果が得られなくなる。グリア細胞はこうした麻薬系鎮痛剤の効力低下や、逆に中止した際の禁断症状の増強にも関与している。こうした知見から、最近ではグリア細胞を標的とした薬剤の開発も進んでいる。

一方、慢性そう痒におけるグリア細胞の役割は全く分かっておらず、脊髄グリア細胞を標的としたかゆみの治療戦略も確立されていない。このような状況の中、本研究では、先行する痛み研究の知見と比較しながら、ADモデル NC/Nga マウスの脊髄グリア細胞の動態を詳細に解析することで、グリア細胞を標的とする難治性かゆみの新しい治療法の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

近年、神経因性疼痛の発生には、神経細胞だけではなく、グリア細胞が深く関わっていることが明らかとなっている。しかし、グリア細胞のかゆみ発生における役割は全く不明である。本研究ではADに焦点を当て、難治性かゆみにおける脊髄グリア細胞の役割の解明を目指し、1) ADモデルマウスの脊髄グリア細胞の動態解析、2) ADモデルマウスにおけるグリア細胞活性化阻害剤の止痒効果について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ADモデルマウスの脊髄グリア細胞の動

## 態解析

痛みの先行研究では、神経損傷時のグリア細胞の変化として、『ミクログリア』の著明な増殖と肥大化、突起の短縮化が観察されている。この神経損傷前期には、損傷した神経細胞周囲にミクログリアが遊走・増殖し、種々の遺伝子発現増強が起こり、活性型ミクログリア (activated microglia)となる。その後、活性型ミクログリアは損傷した神経細胞の細胞体を取り込む貪食能を示すようになる。一方、『アストロサイト』は神経損傷時にGFAP 強陽性となり、突起の形状も変化し、反応性アストロサイト (reactive astrocyte)となる。このアストロサイトは神経損傷後期における神経因性疼痛の維持に関与していると考えられている。このような脊髄グリア細胞の反応性の変化は、末梢（皮膚）でかゆみが生じた際の搔破 (itch-scratch cycle) による末梢神経の損傷によっても起こり得ると考えられる。そこで、本研究では難治性かゆみを伴うADモデルマウスを用いて、免疫組織化学法により脊髄におけるグリア細胞の動態解析を行った。

ADモデルマウスの作製: 4% SDS 溶液でNC/Nga マウスの背側部の皮膚バリアを破壊後、コナヒョウヒダニ虫体(Dfb) 成分含有軟膏を同部位に週2回、100 mg/site で塗布し、この操作を3週間行うことでADモデルマウスを作製した(Dfb-NC/Ngaマウス) (Yamamoto et al., Allergol Int. 2007, 56: 139-148)。

ADモデルマウスの脊髄におけるミクログリア及びアストロサイトの分布解析: ミクログリア及びアストロサイトに着目し、ADモデル Dfb-NC/Nga マウスの脊髄後角におけるミクログリア及びアストロサイトの動態をIba1(ミクログリアマーカー蛋白)、GFAP (アストロサイトマーカー蛋白)に対する抗体を用いて免疫組織化学法で検討した。さらに、

これらグリア細胞の活性化状態を、リン酸化 p38 及び JNK を指標に免疫組織化学法により検討した。

かゆみの慢性化に伴う経時的な脊髄グリア細胞の動態変化の解析: Dfb 成分含有軟膏の反復塗布による AD 様症状の発症過程で、経時的に NC/Nga マウスの頸部脊髄を採取し、グリア細胞の動態変化をミクログリア及びアストロサイトに関する上記マーカー蛋白の発現を指標に免疫組織化学法で解析した。

## (2) AD モデルマウスにおけるグリア細胞活性化阻害剤の止痒効果

グリア細胞活性化阻害剤である minocycline (標的: ミクログリア) (Fan et al., J Neurosci. 2007, 27: 3057-63)を AD 発症モデルマウスの髄腔内に投与することで、難治性かゆみにおけるミクログリアの役割について検討した。

AD のかゆみ行動に対するミクログリア活性化阻害剤 minocycline の影響: AD 様症状を発症した Dfb-NC/Nga マウスの髄腔内に minocycline を 5 µg/5 µL 及び 50 µg/5 µL で週 3 回、2 週間投与し、投与終了後の搔破行動を SCLABA-Real system を用いて 12 時間撮影し、解析を行った。コントロール群として生理食塩水を髄腔内投与した群を設けた。また、minocycline 投与群における皮膚炎スコア、経表皮水分蒸散量 (TEWL)、自発行動について、コントロール群と比較検討した。加えて、臨床において minocycline は内服薬として使用されているため、AD のかゆみ行動に対する minocycline の経口投与の影響について検討した。

Minocycline 投与マウスの脊髄におけるミクログリアの組織学的検討: コントロール群及び minocycline 投与群から脊髄を採取し、抗

Iba1 抗体を用いて治療前後の脊髄におけるミクログリアの分布解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) AD モデルマウスの脊髄グリア細胞の動態解析

AD 未発症の SDS-NC/Nga マウス(コントロール)と比較して、Dfb-NC/Nga マウスの脊髄において Iba1 陽性細胞数の有意な増加を認めた (図 1)。

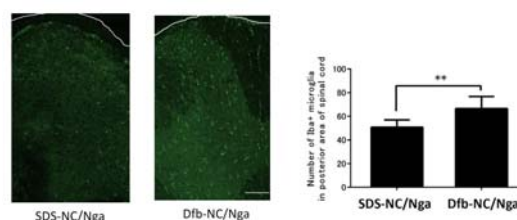


図 1. SDS-NC/Nga 及び Dfb-NC/Nga マウスの脊髄における Iba1 陽性細胞の分布

加えて、SDS-NC/Nga マウスと比較して、Dfb-NC/Nga マウスの脊髄において GFAP 陽性細胞数の増加傾向を認めた。各グリア細胞の活性化の指標であるリン酸化 p38 及び JNK の検出を免疫染色法により試みたが、現在のところ免疫染色に最適な特異的な抗体を見出せず、今後の課題となった。現在、AD 様症状の発症過程におけるミクログリア及びアストロサイトの経時的動態変化については検討中である。

### (2) AD モデルマウスにおけるグリア細胞活性化阻害剤の止痒効果

研究開始当初は、minocycline (標的: ミクログリア) に加えて Dfb-NC/Nga マウスの搔破行動に対する fluorocitrate (標的: アストロサイト)の髄腔内投与の影響についても検討したが、fluorocitrate の毒性が強いことが判明した。そこで、脊髄内ミクログリアに焦点を絞り、Dfb-NC/Nga マウスにおける minocycline のかゆみ抑制効果について検討を行った。Dfb-NC/Nga マウスの髄腔内に minocycline を

5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  及び 50  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  で週 3 回、2 週間投与した結果、コントロール群（溶媒投与群）と比較して、minocycline 投与群において、投与量依存的に搔破行動の抑制と皮膚炎の改善を示した（図 2a, 2b）。また、minocycline の髄腔内投与は自発行動に影響しなかった（図 2c）。このことから、髄腔内 minocycline 投与によるかゆみ抑制効果は、自発行動を抑制したためでは無いと考えられた。

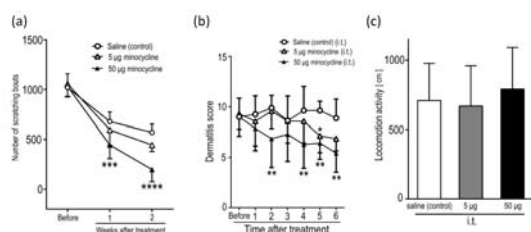


図 2. 搔破行動、皮膚炎、自発行動に対する髄腔内ミノサイクリン投与の影響

さらに、コントロール群と比較して、50  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  minocycline の髄腔内投与群において脊髄後角で増加した Iba1 陽性ミクログリア数が減少した（図 3）。

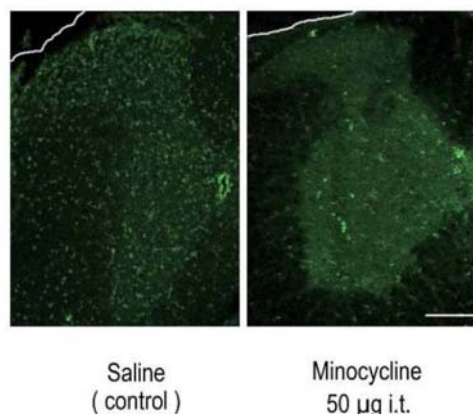


図 3. 脊髄の Iba1 陽性ミクログリアに対する 50  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  minocycline の影響

加えて、minocycline の経口投与は投与量依存的に搔破行動の抑制（図 4a）と Iba1 陽性ミクログリア数の減少傾向（図 4b）を示した。

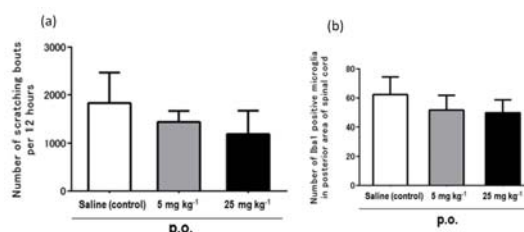


図 4. 搔破行動及び脊髄内 Iba1 陽性ミクログリアに対する minocycline の経口投与の影響

このように、脊髄後角のミクログリアは少なくとも AD における難治性かゆみの発症に関与すること、脊髄後角のミクログリアが AD における難治性かゆみの治療標的のひとつに成り得ることが示唆された。最近では、脊髄後角におけるアストロサイトも AD における慢性のかゆみの発症に関与することが報告されている。

今後は、これらの研究成果を踏まえて、脊髄後角におけるミクログリアとアストロサイトを単独あるいは両方を標的とする AD の難治性かゆみに対する治療応用に向けて研究を進める予定である。

## 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 57 件）

1. Torigoe K, Tominaga M, Ko KC, Takahashi N, Matsuda H, Hayashi R, Ogawa H, Takamori K. Intrathecal minocycline suppresses itch-related behavior and improves dermatitis in atopic dermatitis model mouse. J Invest Dermatol. 136, 879–81, 2016. doi: 10.1016/j.jid.2015.12.037. 査読有
2. Kamo A, Tominaga M, Matsuda H, Kina K, Kamata Y, Umehara Y, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin suppresses itch-related behavior in NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. J Dermatol Sci. 81, 212–5, 2016. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.11.014. 査読有
3. Ko KC, Tominaga M, Kamata Y, Umehara Y,

Matsuda H, Takahashi N, Kina K, Ogawa M, Ogawa H, Takamori K. Possible anti-pruritic mechanisms of cyclosporine A in atopic dermatitis. Acta Derm Venereol. 2015. doi: 10.2340/00015555-2318. 査読有

4. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Cathelicidin LL-37 induces semaphorin 3A production in human epidermal keratinocytes: implications for possible application to pruritus. J Invest Dermatol. 135, 2887-90, 2015. doi: 10.1038/jid.2015.243. 査読有
5. Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Kaneda K, Ko KC, Matsuda H, Kimura U, Ogawa H, Takamori K. The excimer lamp induces cutaneous nerve degeneration and reduces scratching in a dry-skin mouse model. J Invest Dermatol. 134, 2977-84, 2014. doi: 10.1038/jid.2014.256. 査読有

〔学会発表〕(計 51 件)

1. Takamori K. Itching in atopic dermatitis: what's new. American Academy of Dermatology (AAD) 47th Annual Meeting Washington, D.C., USA, March 4-8, 2016 (招聘講演)
2. Takamori K, Tominaga M, Kamo A, Kamata Y. The Kuraishi Lecture: A message from nerve fibers-Involvement of nerve fibers in intractable itch in atopic dermatitis. 8th World Congress on Itch, Nara, Japan, September 27-29, 2015
3. Torigoe K, Tominaga M, Takamori K. Intrathecal minocycline attenuates itch in atopic dermatitis mouse model. 8th World Congress on Itch, Nara, Japan, September 27-29, 2015
4. Tominaga M, Ko KC, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Takahashi N, Kina K, Ogawa M, Ogawa H, Takamori K. Pleiotropic action of cyclosporine on pruritus of atopic dermatitis. 8th World Congress on Itch, Nara, Japan, September 27-29, 2015
5. Takamori K. Recent topics of itch in atopic dermatitis. Baltic Association of Dermatovenerologists, Riga, May 30-31, 2014 (Invited Speak)

〔図書〕(計 3 件)

1. Tominaga M, Takamori K. Itch sensitization: NGF, semaphorins. Itch: Mechanisms and Treatment. Taylor and Francis Group, LLC. March 2014.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称: セマフォリン 3A 遺伝子発現増強剤、及びセマフォリン 3A タンパク産生亢進剤  
発明者: 吉岡康子、鎌田弥生、富永光俊、高森建二  
権利者: 学校法人順天堂、株式会社小林製薬  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-074574 号  
出願年月日: 2015 年 3 月 31 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所・高森建二グループ HP  
[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kankyo\\_igaku/k4\\_takamori.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kankyo_igaku/k4_takamori.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高森 建二 (Takamori, Kenji)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 40053144

(2) 研究分担者

富永 光俊 (Tominaga, Mitsutoshi)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 50468592

加茂 敦子 (Kamo, Atsuko)  
順天堂大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 50614088

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: