

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870894

研究課題名(和文) 脳ニューロステロイドをターゲットとした新規アトピー性掻痒治療薬の創出

研究課題名(英文) The neurosteroid allopregnanolone as a new target for treatment of itch in atopic dermatitis

研究代表者

藤井 正徳 (Fujii, Masanori)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40434667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳ニューロステロイドであるアロプレグナノロン(ALLO)とアトピー性皮膚炎における痒みとの関係を明らかにし、新規掻痒治療薬ターゲットを創出することである。特殊飼料給餌によりアトピー性皮膚炎様症状を発症したマウスにALLOを全身投与すると掻痒様行動が顕著に増加した。このALLO誘発掻痒には、脳内GABAA受容体機能亢進作用が関与することを明らかにした。また、ALLO合成酵素阻害薬finasterideの投与によりエタノール誘発性掻痒が抑制されたことから、内因性に産生されたALLOが痒みを誘発する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the relation between the neurosteroid allopregnanolone (ALLO) and itch in atopic dermatitis (AD), and to provide a new therapeutic target for AD itch. ALLO administration significantly increased scratching behavior in AD model mice, but not in normal ones. Pharmacological analysis showed that GABAA receptor activation in the brain contributes to ALLO-induced scratching in AD mice. It has been reported that ethanol increases ALLO in the brain. Pretreatment with a synthetic inhibitor of ALLO, finasteride, suppressed ethanol-induced scratching in AD mice. Therefore, our findings indicate that endogenously produced ALLO may be involved in itch under AD conditions.

研究分野：薬理系薬学/疼痛学

キーワード：痒み 脳ニューロステロイド アトピー性皮膚炎

## 1. 研究開始当初の背景

小児のおよそ 20% , 成人の 1-3% が罹患しているとされるアトピー性皮膚炎において、痒みは患者に最も苦痛を与える症状であり、痒みと搔破の悪循環は皮膚炎の増悪・維持に深く関わる。したがって、アトピー性皮膚炎の治療において痒みと搔破を制御することが重要であるが、アトピー性皮膚炎の痒みに対する特效薬はなく、新規搔痒治療薬の開発が強く望まれている。

これまでに我々は、飼料誘発性のユニークなアトピー性皮膚炎マウスモデルを開発し、その病態を解析してきた。すなわち、HR-1 系ヘアレスマウスに HR-AD 用精製飼料という特殊飼料を長期間摂食させる (HR-AD マウス) と、皮膚バリア機能低下及び搔痒様行動を特徴とするアトピー性皮膚炎類似の皮膚炎症状が発症すること (引用文献 ) , 本モデルの搔痒様行動に皮膚バリア機能低下が関与すること (引用文献 ) などを明らかにした。また、アルコール摂取がアトピー性皮膚炎の痒みの増悪因子として知られることから、皮膚炎を発症していない正常マウスと HR-AD マウスの搔痒様行動に対するエタノールの影響を調べたところ、HR-AD マウスにおいてのみエタノールの経口投与により搔痒様行動が著しく増強することを見出した。このエタノール誘発搔痒反応を薬理的に解析したところ、本反応は皮膚バリア機能低下による末梢性の痒みが、エタノールの GABA<sub>A</sub> 受容体や NMDA 受容体を介した中枢神経抑制作用により増強する結果起こることを明らかにした (引用文献 ) 。しかしながら、中枢神経系における痒みの増強・調節に関わる内因性物質は未だほとんど明らかではない。

アロプレグナロン (ALLO) やプレグネロン硫酸エステルは脳内で生合成・代謝されるステロイドであり、総称して脳ニューロステロイドと呼ばれる。ある種の脳ニューロステロイドが膜受容体を介したノンゲノミックな作用によりシナプス情報伝達に影響を及ぼし記憶や情動などに関与することや、脳ニューロステロイド量の変動がうつ病や統合失調症などのいくつかの中枢性疾患に関連することが明らかにされつつある (引用文献 ) 。また、ALLO はエタノールと類似した薬理作用を示し、GABA<sub>A</sub> 受容体の機能を亢進させることが知られている。しかしながら、脳ニューロステロイドと痒みとの関連は全く報告されていない。

## 2. 研究の目的

上述の背景を基に、研究代表者は、ALLO がアトピー性皮膚炎病態において痒みを誘発すると推測した。本研究の目的は、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、ALLO と搔痒様行動発現との関係を明らかにし、アトピー性皮膚炎の痒みに対する新規治療薬ターゲットを見出すことである。

## 3. 研究の方法

( 1 ) アトピー性皮膚炎モデル作製 : 4 週齢の HR-1 系ヘアレスマウスに、HR-AD 用精製飼料 (HR-AD, 日本農産) を少なくとも 8 週間以上摂食させ、アトピー性皮膚炎症状を誘発した (引用文献 ) 。なお、陰性対照として、通常飼料を同様に給餌した。

( 2 ) 薬物投与 : ALLO は、ヒマシ油/生理食塩水混液 (1:4) に溶解させた後、マウスの腹腔内 (i.p.) , 大槽内 (i.c.) , 髄腔内 (i.t.) もしくは皮内 (i.d.) に投与した。Naltrexone は、生理食塩水に溶解させた後、ALLO 投与 (10 mg/kg, i.p.) の 30 分前に i.p. 投与した。Picrotoxin は、生理食塩水に溶解させた後、ALLO 投与 (10 mg/kg, i.p.) の 5 分後に i.p. 投与した。BayK-8644 は、0.5% Tween80 含有生理食塩水に懸濁した後、ALLO 投与 (10 mg/kg, i.p.) 5 分後に i.p. 投与した。エタノールは、2.4 g/kg の用量で経口投与した。Finasteride は、20% シクロデキストリン含有生理食塩水に溶解させ、ethanol 投与の前日及び 1 時間前に i.p. 投与した。

( 3 ) 搔痒様行動の測定 : マウス後肢による搔痒様行動の計測は既報 (引用文献 ) のごとく行った。すなわち、マウスを測定ケージに入れ、およそ 30 分間馴化させた。上記に示した薬物を投与し、その後 30 分間もしくは 60 分間の行動をビデオ撮影した。自製の計測装置を用いて、後肢が皮膚に触れている累積時間を測定した。

( 4 ) 脳内 ALLO の定量 : マウスを頸椎脱臼した後、速やかに脳を摘出した。酢酸エチルを用いて ALLO を抽出した後、ELISA kit (DetectX Allopregnanolone EIA kit, Arbor Assays 社) を用いて ALLO を検出した。

\* 全ての実験は、学内の動物実験委員会において承認された実験計画に従い、実施された。

## 4. 研究成果

( 1 ) アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける ALLO 投与による搔痒様行動の増加

ALLO を i.p. 投与したところ、通常飼料を摂食させた正常マウスでは何ら搔痒様行動は誘発されなかったが、HR-AD 飼料を摂食させアトピー性皮膚炎様症状を発症したマウスでは用量に依存して有意に搔痒様行動が増加した。

ALLO の作用部位を明らかにするために、少量 (2.5 及び 5 µg/site) の ALLO を大槽内 (i.c.) , 髄腔内 (i.t.) もしくは皮内 (i.d.) に投与したところ、i.c. 投与のみ i.p. 投与と同程度の搔痒様行動が観察された。一方、正常マウスに ALLO を同様に i.c. 投与しても明らかな搔痒様行動は認められなかった。

## (2) アトピー性皮膚炎モデルにおける ALLO 誘発搔痒様行動の作用メカニズムの解析

HR-AD 摂食マウスにおける ALLO 誘発搔痒様行動の作用メカニズムを薬理的に解析した。

様々な痒み反応を抑制することが知られているオピオイド受容体拮抗薬 naltrexone の影響を検討したところ、ALLO 誘発搔痒様行動は抑制されなかったことから、本反応はオピオイド受容体を介する調節を受けていないことが示唆された。

一方、ALLO は GABA<sub>A</sub> 受容体を活性化する作用があることがよく知られている。そこで、ALLO 誘発搔痒様行動に及ぼす GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬 picrotoxin の影響を検討したところ、搔痒様行動が抑制された。したがって、本反応に GABA<sub>A</sub> 受容体機能亢進が関与することが示唆された。

ALLO は、L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル (L-VDCC) の阻害作用がある (引用文献) ため、ALLO 誘発搔痒様行動における L-VDCC の関与を検討した。L-VDCC アゴニストである BayK-8644 を投与したところ、ALLO 誘発搔痒様行動が抑制される傾向が認められたものの、有意な差は認められなかった。ALLO と同様に GABA<sub>A</sub> 受容体機能促進作用と L-VDCC 阻害作用をもつエタノールやバルビツール酸系薬による搔痒様行動は BayK-8644 の投与により有意に抑制される一方、GABA<sub>A</sub> 受容体選択的アゴニストと L-VDCC 阻害薬を併用しても搔痒様行動の増加は認められない (Fujii ら, 未発表成績) ことから、GABA<sub>A</sub> 受容体及び L-VDCC 以外の受容体やイオンチャネルも搔痒様行動の発現に関与することが予想される。

## (3) 内因性に産生された ALLO の搔痒様行動発現における関与

以前の検討で、エタノールをアトピー性皮膚炎モデルマウスに経口投与すると、搔痒様行動が著しく増加することを報告している (引用文献)。また、エタノール投与により脳内 ALLO 量が増加することが報告されている (引用文献)。そこで、内因性に産生される ALLO と搔痒様行動との関係について検討した。ALLO 産生酵素 (5 $\alpha$ -レダクターゼ) 阻害薬である finasteride を前処置すると、エタノール誘発搔痒様行動が有意に抑制された。

脳内 ALLO 量を ELISA kit を用いて定量したところ、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて、エタノール投与後に脳内 ALLO 量が増加する傾向が認められた。

## (4) まとめ

上位中枢神経系に存在する種々のメディエーターと痒みとの関係はほとんど未解明である。本研究から、アトピー性皮膚炎モデルマウスに ALLO を外因性に投与すると搔痒様行動が誘発されることを見出した (図 1A)。

また、その場合の ALLO の作用部位は脳であることを明らかにした。さらに、エタノール投与時に一過性に産生されると思われる ALLO が搔痒様行動を誘発する可能性を示した (図 1B)。これらは、アトピー性皮膚炎病態において、ALLO と痒みとの関係を初めて示した知見である。一方、ALLO 誘発搔痒様行動の作用メカニズムの解明は不十分である。また、エタノール非投与時における搔痒様行動発現における ALLO の役割についてさらに検討を行う必要がある。

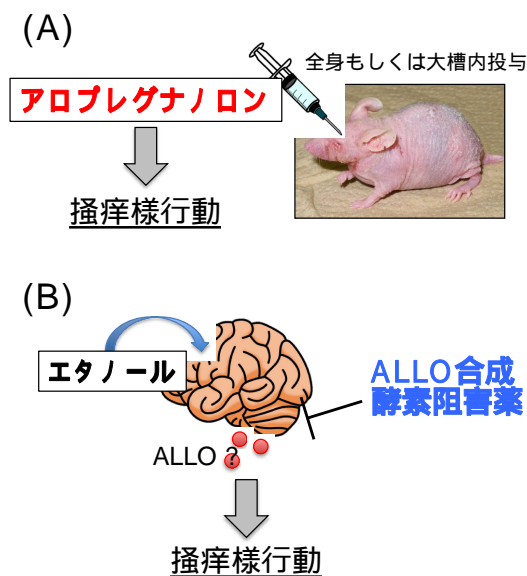


図 1 本研究のまとめ

### < 引用文献 >

Fujii M, Tomozawa J, Mizutani N, Nabe T, Danno K, Kohno S. Atopic dermatitis-like pruritic skin inflammation caused by feeding a special diet to HR-1 hairless mice. *Exp Dermatol* 14 (2005) 460-468.

Fujii M, Nabe T, Tomozawa J, Kohno S. Involvement of skin barrier dysfunction in itch-related scratching in special diet-fed hairless mice. *Eur J Pharmacol* 530 (2006) 152-156.

Fujii M, Nakamura T, Fukuno S, Mizutani N, Nabe T, Kohno S. Ethanol aggravates itch-related scratching in hairless mice developing atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol* 611 (2009) 92-99.

Schule C, Eser D, Baghai TC, Nothdurfter C, Kessler JS, Rupprecht R. Neuroactive steroids in affective disorders: target for novel antidepressant or anxiolytic drugs? *Neuroscience* 191 (2011) 55-77.

Hu AQ, Wang ZM, Lan DM, Fu YM, Zhu YH, Dong Y, Zheng P. Inhibition of evoked glutamate release by neurosteroid allopregnanolone via inhibition of L-type calcium channels in rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 32 (2007) 1477-1789.

VanDoren MJ, Matthews DB, Janis GC, Grobin AC, Devaud LL, Morrow AL. Neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one modulates electrophysiological and behavioral actions of ethanol. *J Neurosci* 20 (2000) 1982-1989.

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計3件)

Masanori Fujii, Fumiko Endo-Okuno, Asuka Iwai, Keisuke Doi, Junko Tomozawa, Shigekatsu Kohno, Naoki Inagaki, Takeshi Nabe, Susumu Ohya. Hypomorphic mutation in the hairless gene accelerates pruritic atopic skin caused by feeding a special diet to mice. *Exp Dermatol* (査読有) in press  
DOI: 10.1111/exd.13105

Masanori Fujii, Yuki Shimazaki, Yoshiko Muto, Shigekatsu Kohno, Susumu Ohya, Takeshi Nabe. Dietary deficiencies of unsaturated fatty acids and starch cause atopic dermatitis-like pruritus in hairless mice. *Exp Dermatol* (査読有) 24 (2015) 108-113.  
DOI: 10.1111/exd.12592

Masanori Fujii, Hiroyuki Nakashima, Junko Tomozawa, Yuki Shimazaki, Chie Ohyanagi, Naomi Kawaguchi, Susumu Ohya, Shigekatsu Kohno, and Takeshi Nabe. Deficiency of n-6 polyunsaturated fatty acids is mainly responsible for atopic dermatitis-like pruritic skin inflammation in special diet-fed hairless mice. *Exp Dermatol* (査読有) 22 (2013) 272-277.  
DOI: 10.1111/exd.12120

### [学会発表](計13件)

大神彩佳, 藤井正徳, 美淋都子, 渡邊保志, 浅野絵里香, 大矢 進. アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるフェノバルビタール大槽内投与による掻痒様行動の増強 **第128回日本薬理学会近畿部会**. 2015.11. (大阪)

Masanori Fujii. Scratching behavior

induced by centrally acting substances in atopic dermatitis model mice: A clue to understanding supraspinal itch mechanism in atopic dermatitis. **8th World congress on itch**. 2015.9. (Nara, Japan)

藤井正徳. ヘアレスマウスを用いたアトピー性掻痒モデルの開発とその解析. **第25回国際痒みシンポジウム**. 2015.9. (奈良)

藤井正徳. ヘアレスマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルの開発とその病態メカニズムの解析. **第88回日本薬理学会年会**. 2015.3. (名古屋)

大神彩香, 藤井正徳, 浅野絵里香, 奈邊 健, 大矢 進. 神経ステロイドであるアロプレグナノロンはアトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて痒みを誘発する. **第88回日本薬理学会年会**. 2015.3. (名古屋)

藤井正徳, 浅野絵里香, 大神彩佳, 奈邊 健, 大矢 進. アトピー性皮膚炎モデルマウスのバルビツール酸系薬剤による掻痒行動の増強における GABA<sub>A</sub> 受容体とL型電位依存性カルシウムチャンネルの関与. **第126回日本薬理学会近畿部会**. 2014.10. (和歌山)

Masanori Fujii, Erika Asano, Sayaka Ohgami, Takeshi Nabe, Susumu Ohya. Possible involvement of the neurosteroid allopregnanolone in itch in atopic dermatitis mouse model. **24th International Symposium of Itch**. 2014.10. (Tokyo)

浅野絵里香, 藤井正徳, 大神彩佳, 奈邊 健, 大矢 進. アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いたアロプレグナノロン投与による掻痒様行動における GABA<sub>A</sub> 受容体の関与. **次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2014**. 2014.8. (大阪)

藤井正徳, 浅野絵里香, 大神彩佳, 奈邊 健, 大矢 進. アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるアロプレグナノロン投与による掻痒様行動の増強. **第125回日本薬理学会近畿部会**. 2014.6. (岡山)

藤井正徳, 戸田隆弘, 中山貴敬, 奈邊 健, 大矢 進. 神経ステロイドであるアロプレグナノロンはアトピー性皮膚炎様症状を呈したマウスにおいて掻痒様行動を誘発する. **第124回日本薬理学会近畿部会**. 2013.11. (京都)

Masanori Fujii, Takahiro Toda, Takanori

Nakayama, Susumu Ohya, and Takeshi Nabe. The neurosteroid allopregnanolone induces scratching behavior in mice with atopic dermatitis. **23rd International Symposium of Itch.** 2013.10. (Osaka)

藤井正徳, 竹内香里, 中山貴敬, 大矢 進, 奈邊 健. アトピー性皮膚炎を発症したマウスにおけるエタノール及びバルビツール酸系薬剤による搔痒様行動の増強機構の解析. **第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会.** 2013.10. (京都)

Masanori Fujii, Kaori Takeuchi, Takanori Nakayama, Susumu Ohya, and Takeshi Nabe. Barbiturates induce scratching behavior in mice with atopic dermatitis: An animal model for mimicking nocturnal scratching in atopic dermatitis? **7th World Congress on Itch.** 2013.9. (Boston, MA, USA)

〔図書〕(計1件)

藤井正徳 他. 皮膚免疫・アレルギー疾患. 「食餌誘発アトピー性皮膚炎モデルの病態解析」 *BIO Clinica* 31 (2016) 92-97.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井正徳 (FUJII, Masanori)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 4043466