



Studies on the Pathophysiological Role of TRPV3 in Itchy Dermatitis

Kasai, Erika

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6125号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006125>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

論文内容の要旨

氏 名 葛西 えりか

専 攻 生物学専攻

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on the Pathophysiological Role of TRPV3 in Itchy Dermatitis
(そう痒性皮膚疾患における TRPV3 の病態生理学的役割に関する研究)

指導教員 坂田 恒昭

【背景】

アトピー性皮膚炎 (AD) は増悪・寛解を繰り返すそう痒のある湿疹を主病変とする難治性の皮膚疾患である (日本皮膚科学会, 2008)。現在の薬物療法は、ステロイド外用剤、タクロリムス軟膏、保湿剤、抗ヒスタミン・抗アレルギー薬の 4 つが基本となっているが、いずれも対症療法であり、有効性や副作用面からも治療満足度は低い。AD の病態は、皮膚の生理学的異常や特異的/非特異的アレルギー反応が関与して生じる慢性炎症で、表皮角質層の異常に起因する皮膚の乾燥やバリア機能の低下、表皮の構成細胞であるケラチノサイトの増殖・分化異常や活性化、炎症性細胞の浸潤・活性化など多岐にわたり、様々な因子が複雑に絡み合った病態であることが知られているが、現在のところ、根治に迫る発症メカニズムの解明には至っていない。

また、AD の重要な症状のひとつに痒みがある。皮膚バリア機能の低下によって神経線維が表皮内まで伸展し、痒み過敏な状態となる。AD 患者の多くは、痒みによって病変部を掻破することで炎症の増悪を招き、さらなる痒みを引き起こす “itch-scratch cycle” という痒みの悪循環に陥っており、痒みは重症化・慢性化の一因となっているのみならず、患者の生活の質 (quality of life; QOL) を大きく低下させている。痒みによる苦痛の軽減と掻破による炎症悪化を予防する目的で、経口の抗ヒスタミン薬が用いられているが、その鎮痒効果は十分とは言えず、ヒスタミンが関与しない痒み発生機序が AD の痒みに重要であることが推察される。しかし、AD の痒み発生機序についても未だ十分には明らかにされておらず、有効で安全性の高い新規 AD 治療薬の開発が望まれている。

我々は、新規メカニズムの AD 治療薬創製を目指して、無毛形質を有し AD 様皮膚炎を自然発症する DS-*Nh* マウスを利用し、その病態解析を行っている。DS-*Nh* マウスは、通常環境下にて飼育した場合にのみ痒み様行動を伴う、ヒト AD 病態と類似した皮膚炎を発症する。近年、我々はこの DS-*Nh* マウスの無毛形質の原因遺伝子として、TRPV3 (transient receptor potential vanilloid 3) Gly573Ser 変異を同定した。さらに、Gly573Ser は機能亢進型変異 (gain of function mutation) であり、皮膚炎発症の原因遺伝子であることも明らかとしており、TRPV3 の皮膚炎増悪への関与が推察される。温度感受性カチオンチャネルである TRPV3 は、表皮ケラチノサイトに多く発現し、皮膚での温度受容に関わることが報告されている。しかしながら、in vivo で使用可能な選択的 agonist/antagonist の情報は乏しく、痛みや痒みといった皮膚感覚や免疫機能への関与など、温度センサー以外の皮膚生理機能についてはほとんど解明されていない。

【目的】

TRPV3 の皮膚炎への関与と皮膚生理機能を解明し、新規そう痒性皮膚疾患治療薬ターゲットとしての可能性を探ることを目的として、TRPV3 機能亢進型変異を有する DS-*Nh* マウスおよび、TRPV3 ノックアウト(KO) マウスを用いて、皮膚炎およびそう痒モデルを作製し、野生型 (DS または WT) マウスとの症状の比較、病態解析を実施した。

【結果・考察】

痒みに対する治療効果を検証するため、KO マウスおよび WT マウスを用いて、ヒスタミン非依存性の痒みを呈する乾燥性皮膚そう痒症 (ドライスキン) モデルを作製し、病態比較を実施した。剃毛したマウスの背部皮膚にドライスキンを誘起し、痒み様行動 (掻き動作; scratching) を評価したところ、KO マウスにおいて痒み様行動数の減弱が認められたが、皮膚の乾燥症状 (経皮水分蒸散量、角質水分量、病理学

的所見), 自発行動量には WT マウスとの間に明確な差は認められなかった。さらに, 病態時の皮膚を採取し, 抗 PGP9.5 (protein gene product 9.5; 神経マーカー) 抗体を用いて免疫染色を実施したところ, WT マウスにおいて認められた PGP9.5 陽性神経線維の表皮内伸展が, KO マウスではほとんど認められなかった。また, ウェスタンブロット法および RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法にて, 皮膚における皮膚内神経発因子 (semaphorin3A; Sema3A) の発現変化を評価したところ, WT マウスでは病態時に発現低下が認められたのに対して, KO マウスにおいては発現が維持されていた。これまでに, TRPV3 はケラチノサイトの神経栄養因子 (nerve growth factor; NGF) 産生に関与していることや, DS-*Nh* マウスの皮膚内 NGF 量は DS マウスに比べて増加していることが報告されている。以上より, TRPV3 はケラチノサイトからの NGF 放出, Sema3A 発現低下などを介して皮膚内神経伸展を促進し, 痒みを惹起していることが示唆され, TRPV3 の抑制はヒスタミン非依存性の痒みに対して有効性を示す可能性が示された。

次に, 新規 AD 治療薬ターゲットの探索および TRPV3 の皮膚生理機能解明を目的とし, DS および DS-*Nh* マウスの初代培養ケラチノサイトを用いて DNA マイクロアレイを, KO マウスおよび WT マウスの初代培養ケラチノサイトの培養上清を用いてサイトカインマルチプレックスアッセイを実施した。その結果, DS-*Nh* マウスにおける樹状細胞関連遺伝子の発現変動および, KO マウスにおける樹状細胞機能制御に関わるサイトカイン TSLP (thymic stromal lymphopoietin) の発現低下が見出された。そこで, TRPV3 と樹状細胞機能制御の関連を検証するため, DS および DS-*Nh* マウスを用いて, 樹状細胞が病態形成に重要な役割を示すことが知られるハプテン誘発接触過敏反応 (CHS) を誘起し, 病態比較を実施した。ハプテン誘発 CHS は, 皮膚を介してハプテンに感作された後, 同ハプテンに再び接触することで炎症が惹起される皮膚アレルギー反応である。DS-*Nh* マウスに, DNFB (2,4-dinitrofluorobenzene) をハプテンとして CHS を誘起したところ, DS マウスと比べて顕著な増強が認められた。CHS の感作成立には, 皮膚樹状細胞によるハプテンの取り込みと, 引き続き所属リンパ節への遊走が重要であることが知られている。そこで, DNFB と同じく, ハプテンとして知られる蛍光色素 FITC (fluorescein isothiocyanate) 塗布後に所属リンパ節を切除し, リンパ節細胞をフローサイトメトリーにより解析した。その結果, DS マウスと比較して, DS-*Nh* マウスにおいて FITC 陽性樹状細胞の割合が増加しており, DS-*Nh* マウスでは皮膚樹状細胞機能が亢進していることが示唆された。また, DS-*Nh* マウス由来の初代培養ケラチノサイトからの TSLP 放出量は, DS マウス由来のケラチノサイトに比較し有意に増加していた。一方, KO マウス由来のケラチノサイトからの放出量は, WT マウス由来のケラチノサイトに比べて有意に減少し, 温度応答性も認められなかった。これらの結果から, TRPV3 は, ケラチノサイトからの TSLP 放出増加と樹状細胞遊走能の促進を介して, アレルギー性皮膚炎症の増悪に関与している可能性が示された。

最後に, TRPV3 の痒みの伝達や急性皮膚炎症への関与を検証するため, KO マウス, WT マウスおよび DS マウス, DS-*Nh* マウスを用いて, 種々の急性刺激に対する反応性を比較した。起痒物質である Compound 48/80 (1, 3 $\mu\text{g}/\text{site}$) または substance P (50, 100 nmol/site) を KO マウスおよび WT マウスの背部に皮内注射し痒み様行動を惹起したところ, どちらの起痒物質においても, 両者の痒み様行動数に有意な差は認められなかった。また, 炎症誘発物質である TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 塗布による急性皮膚炎症や, Tape stripping による物理的皮膚バリア障害に対しても両者に差は認められなかった。一方, leukotrien などの 5-lipoxygenase による代謝産物が主に関与することが知られるアラキドン酸 (arachidonic acid; AA) 誘発耳介炎症を誘起したところ, WT マウスと比べて KO マウスで耳介浮腫が減弱し, DS マウ

スと比べて DS-*Nh* マウスで増強が認められた。このことから, TRPV3 は AA 代謝物による炎症増悪に関与し, TRPV3 の抑制は AA カスケード制御を介して抗炎症効果に関与する可能性が示された。

【結論】

TRPV3 による樹状細胞制御の可能性および TRPV3 抑制による抗そう痒, 抗炎症効果発揮の可能性は本研究において初めて見出された。TRPV3 は, 活性化ケラチノサイトの制御を介して, ヒスタミン薬抵抗性の難治性の痒みへの有効性を示すと共に, ステロイドなどで問題視される免疫担当細胞への過剰な抑制作用を示さない, 安全性の高い新規そう痒性皮膚疾患治療薬ターゲットとなる可能性がある。

氏名	葛西 えりか		
論文 題目	Studies on the Pathophysiological Role of TRPV3 in Itchy Dermatitis (そう痒性皮膚疾患における TRPV3 の病態生理学的役割に関する研究)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	坂田 恒昭
	副 査	教 授	前川 昌平
	副 査	准 教 授	中嶋 雅壽
	副 査		
	副 査		
要 旨			
【概要】 アトピー性皮膚炎 (AD) は増悪・寛解を繰り返すそう痒のある湿疹を主病変とする難治性の皮膚疾患である。AD の病態は、表皮角質層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリアー機能異常という皮膚の生理学的異常を伴い、多彩な非特異的刺激反応および特異的アレルギー反応が関与して生じる慢性炎症で、様々な因子が複雑に絡み合った病態であることが知られるが、現在のところ、根治に迫る発症メカニズムの解明には至っていない。 DS-<i>Nh</i> マウスは、ヒト AD 病態と類似した皮膚炎を発症する無毛形質を有する AD モデルマウスである。DS-<i>Nh</i> マウスの無毛形質および皮膚炎発症の原因遺伝子として、TRPV3 (transient receptor potential vanilloid 3) Gly573Ser の機能亢進型変異が同定されており、TRPV3 の皮膚炎増悪への関与が推察される。温度感受性カチオンチャネルである TRPV3 は、表皮ケラチノサイトに多く発現し、皮膚での温度受容に関わることが報告されている。しかしながら、<i>in vivo</i> で使用可能な選択的 agonist/antagonist の情報は乏しく、痛みや痒みといった皮膚感覚や免疫機能への関与など、温度センサー以外の皮膚生理機能についてはほとんど解明されていない。 本論文は、DS-<i>Nh</i> マウスおよび TRPV3 ノックアウト(KO) マウスを用いて、皮膚炎およびそう痒モデルを作製し、野生型 (DS または WT) マウスとの症状の比較、病態解析を実施することにより、TRPV3 の皮膚炎への関与と生理機能を解明し、新規そう痒性皮膚炎治療薬ターゲットとしての可能性を探ることを目的としたものである。 本論文は、3 章から構成されている。 第1章では、痒みに対する治療効果を検証するため、KO マウスおよび WT マウスを用いて、ヒスタミン非依存性の痒みを呈する乾燥性皮膚そう痒症 (ドライスキン) モデルを作製し、行動薬理学、生化学、組織化学的手法にて病態比較を実施した。その結果、KO マウスにおいて、痒み様行動の減弱と、表皮内神経線維の伸展抑制および皮膚内神経反発因子 (Sema3A) の発現維持が認められ、TRPV3 の抑制は、ケラチノサイトからの神経伸展関連因子の発現制御と皮膚神経の表皮内伸展の抑制を介して、抗そう痒効果に関与する可能性を見出した。 第2章では、まず、新規 AD 治療薬ターゲットの探索および TRPV3 の皮膚生理機能解明を目的とし、DS および DS-<i>Nh</i> マウスの初代培養ケラチノサイトを用いて DNA マイクロアレイを、KO マウスおよび WT マウスの初代培養ケラチノサイトの培養上清を用いてサイトカインマルチプレックスアッセイを実施した。その結果、樹状細胞関連遺伝子およびサイトカインの発現変動が見出されたことから、TRPV3 と樹状細胞機能制御の関連を検証するため、DS および DS-<i>Nh</i> マウスを用いて、樹状細胞が病態形成に重要な役割を示すことが知られるハプテン誘発接触過敏反応 (CHS) を誘起し、病態比較を実施した。その結果、DS-<i>Nh</i> マウスにおいて顕著な CHS 増強と、ケラチノサイトからの Thymic stromal lymphopoietin (TSLP; 樹状細胞活性化に関わるサイトカイン) 産生量の増加および樹状細胞遊走能増強が確認された。これらの結果から、TRPV3 は、活性化によりケラチノサイトからの TSLP 放出増加と樹状細胞遊走能の促進を介して、アレルギー性皮膚炎の増悪に関与していることが示唆された。			

氏名	葛西 えりか
第3章では、TRPV3 の痒みの伝達や急性皮膚炎への関与を検証するため、KO マウス、WT マウスおよび DS マウス、DS-<i>Nh</i> マウスを用いて、種々の急性刺激に対する反応性を比較した。起痒物質である Compound 48/80 (1, 3 □g/site) または substance P (50, 100 nmol/site) を KO マウスおよび WT マウスの背部に皮内注射し痒み様行動を惹起したところ、どちらの起痒物質においても、両者の痒み様行動数に有意な差は認められなかった。また、cyclooxygenase (COX) 代謝物が深く関与することが知られる炎症誘発物質である TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 塗布による急性皮膚炎や、Tape stripping による物理的皮膚バリア障害に対しても両者に差は認められなかった。これらの結果から、TRPV3 は、起痒物質による痒みの伝達や物理的皮膚バリア破壊からの修復機能、COX 代謝物による急性反応には深く関与しないものと考えられた。一方、leukotrien などの 5-lipoxygenase (5-LO) による代謝産物が主に関与することが知られるアラキドン酸 (arachidonic acid; AA) 誘発耳介炎症を誘起したところ、WT マウスと比べて KO マウスで耳介浮腫が減弱し、DS マウスと比べて DS-<i>Nh</i> マウスで増強が認められた。このことから、TRPV3 は AA 代謝物による炎症増悪に関与し、TRPV3 の抑制は AA カスケード制御を介して抗炎症効果に関与する可能性が示された。 以上、DS-<i>Nh</i> マウスや KO マウスを用いた病態解析から、皮膚炎発症メカニズム解明や新規皮膚炎治療薬開発に有用な新知見を得た。TRPV3 による樹状細胞制御の可能性および TRPV3 抑制による抗そう痒、抗炎症効果発揮の可能性は、本研究において初めて見出され、TRPV3 は、活性化ケラチノサイトの制御を介して、ヒスタミン薬抵抗性の難治性の痒みへの有効性を示すと共に、ステロイドなどで問題視される免疫担当細胞への過剰な抑制作用を示さない、安全性の高い新規そう痒性皮膚疾患治療薬ターゲットとなる可能性が見出された。 本研究は、TRPV3 についてその皮膚炎への関与と生理機能を研究したものであり、TRPV3 の新規そう痒性皮膚炎治療薬ターゲットとしての可能性を示す重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。 よって、学位申請者の 葛西 えりか は、博士 (理学) の学位を得る資格があると認める。	