

慢性掻痒性皮膚疾患における表皮内末梢神経伸展因子の探索

富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学

安 東 嗣 修

In addition to epidermal hyperplasia, chronic pruritic skin diseases (e.g., atopic dermatitis, dry skin) show the increased number of nerve fibers in epidermis. However, the characteristics and the mechanisms of sprout of nerve fibers are still unknown. In the present study, we investigated the characteristics of the nerve fibers in epidermis by using the immunohistochemical analysis and proteomics analysis of epidermal protein for identification of the factor for sprouting in the dry skin mouse model with itch. For preparing the mouse model, the rostral back was treated daily with cutaneous application of acetone/ether (1:1) mixture (AE), water following AE (AEW). The stratum corneum hydration decreased in AE- and AEW-treated mouse skin, but not non-treated skin. The treatment with AEW induced the spontaneous scratching as an itch-associated response, and increased the number of protein gene product 9.5-positive nerve fibers, which were calcitonin gene-related peptide-positive C-fiber neurons. However, these alterations were not shown in non- and AE-treated mice. The proteomics analysis showed a lot of epidermal proteins that the expression altered by treatment with AE and AEW, compared with non-treatment. We are doing the identification of these proteins by using MALDI-TOF/MS.

1. 緒 言

「痒み」は、皮膚と一部の粘膜において認められ、掻きたいという衝動を引き起こす不快な感覚である。痒みの発生は、皮膚内における痒みのメディエーターの産生に起因するものだけでなく、特に乾皮症やアトピー性皮膚炎患者では、皮膚が痒覚過敏（痒み刺激に対する反応の増大）あるいはアロネーシス（通常は痒みを生じない刺激で痒みが起こる状態）の状態になっていることが報告されている^{1,2)}。このような病態では、痒みのシグナルを伝える一次感覚神経の表皮内への伸展が報告されている³⁻⁶⁾。しがしながら、このような病理学的変化は観察されるものの、その伸展神経の特徴や痒み発生との関連に関して明らかになっていない。そこで、本研究では、乾燥性皮膚掻痒症マウスモデル⁷⁾を用いて、表皮内伸展神経の特徴を免疫組織学的に解析し、表皮における変化タンパクのプロテオミクス解析を行ない、末梢神経伸展因子の同定を試みた。

2. 実 験

2.1 実験動物

実験には、雄性ICR系マウス（7～8週齢、日本SLC、静岡）を用いた。



Identification of sprouting factor for peripheral nerve fibers in the epidermis with chronic pruritic skin disease

Tsugunobu Andoh

Department of Applied Pharmacology,
Graduate School of Medicine and
Pharmaceutical Sciences, University of
Toyama

2.2 乾燥性皮膚掻痒症モデルマウスの作製

乾燥性皮膚掻痒症モデルマウスは、Miyamotoら⁷⁾の方法により作製した。実験開始5日前に、ジエチルエーテル麻酔下、マウス吻側背部を2cm四方にバリカンで除毛後、さらにシェーバーで剃毛した。角質細胞間脂質を抽出する目的でアセトンとジエチルエーテルの1:1混液を2cm四方の脱脂綿に染み込ませ、これをジエチルエーテル麻酔下、剃毛部位に15秒間適用した（AE処置）、直後に蒸留水を2cm四方の脱脂綿に染み込ませ、30秒間適用した（AEW処置）。この操作を1日2回8時間以上の間隔をあげ、5日間行った。

2.3 角質水分量の測定

毎朝の皮膚バリア破壊処置前、および行動実験開始前に、Moisture Checker[®] MY707S (SCALAR Corporation, 東京)を用いて測定した。電気伝導率を指標として測定された角質水分量は、測定値として表示される単位(%)で示した。

2.4 行動実験

5日間のAEW処置の翌日にKuraishiら⁸⁾の方法でマウスの自発的掻き動作数を計測した。すなわち、動物の行動を無人環境下で8mmビデオカメラにて撮影した。行動観察はビデオの再生により行い、後肢による皮膚バリア破壊処置部位（剃毛部位）に対する自発的な掻き動作回数を数えた。マウスは、1秒間に数回掻くので後肢を挙げてから降りすまでの一連の動作を1回として数えた。

2.5 免疫組織化学染色

5日間のAEW処置の翌日に、マウスを4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定後、バリア破壊した吻側背

部皮膚を採取した。続いて厚さ 30 μ m の凍結切片を作製後、定法により抗 protein gene product 9.5 (PGP9.5) および抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 抗体を用いて免疫染色を行なった。染色した皮膚切片は共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-Rad, Radiance 2100) を用いて観察した。一部の実験では、マウス 1 匹当たり 5 ヶ所の表皮内伸展末梢神経終末数を数え、幅 1 mm 当りの本数の平均値を個体値とした。

2. 6 二次元電気泳動

無処置、AE 処置及び AEW 処置マウス皮膚を摘出後、表皮を剥離し、タンパク質を抽出した。IPG ストリップ (pH 3 - 10) を用いた等電点電気泳動に続いて、SDS-PAGE による電気泳動を行なった。ゲルをクマシーブリリアントブルー染色後、画像解析を行なった。変化したスポットに対して MALDI-TOF/MS によるタンパクの同定を試みた。

3. 結 果

3. 1 AEW 処置マウスにおける皮膚症状

剃毛した無処置マウスの皮膚は鱗屑等の乾皮症に類似する症状は認められなかった (Fig. 1A)。一方、1 日 2 回 5 日間 AE 処置 (data not shown) あるいは AEW 処置 (Fig. 1B) を行ったマウスでは、顕著な鱗屑を認める典型的な角化亢進を伴う乾皮症に類似する皮膚症状が観察された。本モデル皮膚の病理組織学的変化として、無処置マウス皮膚と比較して、AEW 処置マウス皮膚では明らかな表皮の肥厚、顕著な角化亢進の像が観察され、炎症性細胞の顕著な浸潤は認められなかった (data not shown)。

3. 2 AE 処置および AEW 処置による角質水分量と自発的掻き動作数の変化

角質水分量は、無処置群では変化しなかったが、AE 処置群において処置開始後 2 日目から、AEW 処置群においては処置開始後 1 日目から有意に減少した (Fig. 2A)。また、AEW 処置群はどの時点においても AE 処置群よりも有意に低い値を示した (Fig. 2A)。

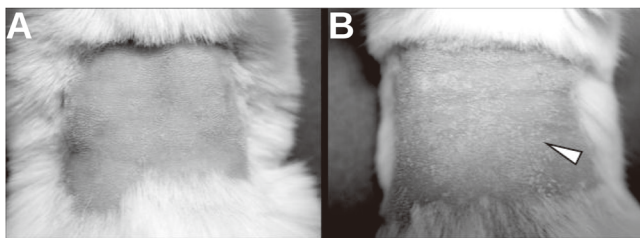


Fig. 1 Skin condition of AEW-treated mouse skin. The skin conditions in non-treated mouse skin (A) and in AEW-treated mouse skin (B).

一方、自発的掻き動作数は、AE 処置群では無処置群と比較して有意な差は認められなかったが、AEW 処置群は無処置群および AE 処置群のいずれに対しても有意に自発的掻き動作回数が増加した (Fig. 2B)。

3. 3 AE 処置及び AEW 処置による表皮内伸展末梢神経の変化

PGP9.5 は、神経のマーカーである。AE 処置および AEW 処置を 5 日間行った部位の表皮における、PGP9.5 陽性神経線維の分布を Fig. 3A-C に示した。無処置マウス (Fig. 3A) および AE 処置 (Fig. 3B) マウスの皮膚では末梢神経終末のほとんどが表皮-真皮接合部までしか達しておらず、表皮内への伸展は少なかった。一方、AEW 処置マウスの皮膚では無処置マウスの皮膚に比べ、多くの末梢神経終末が表皮内へ伸展しているのが観察された (Fig. 3C)。

また、無髄 C 線維が痒みの伝達に関与していることが知られている。また、その C 線維のほとんどがカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 含有神経である⁹⁾。そこで、AEW 処置を行った皮膚部位における CGRP 含有神経線維の分布を Fig. 4 に示した。AEW 処置マウスの皮膚では、数多くの CGRP 含有神経終末が表皮内へと伸展していた。

3. 4 AE 処置及び AEW 処置による表皮内タンパク質のプロテオミクス解析

無処置、AE 処置及び AEW 処置マウス皮膚より表皮を剥離し、抽出したタンパクを用いて二次元電気泳動を行っ

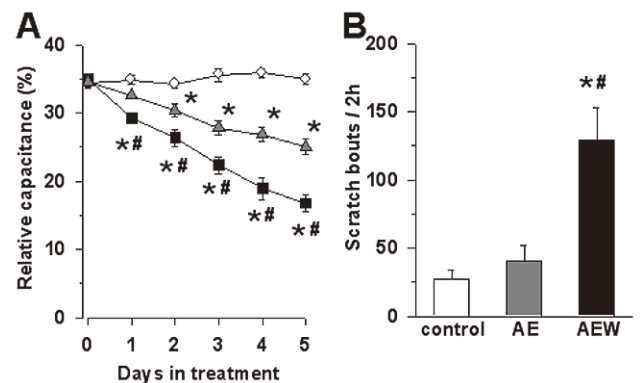


Fig. 2 Time-dependent changes in stratum corneum (SC) hydration and scratching behavior in mice treated with AE or AEW. (A) SC hydration was measured daily before AE or AEW treatment. (B) The number of scratching for 2h was measured the day after 5-days AE or AEW treatment. Values represent the mean $\pm$ SEM for 8 animals. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.05$ compared with control and AE-treatment, respectively (Dunnett's multiple comparisons).

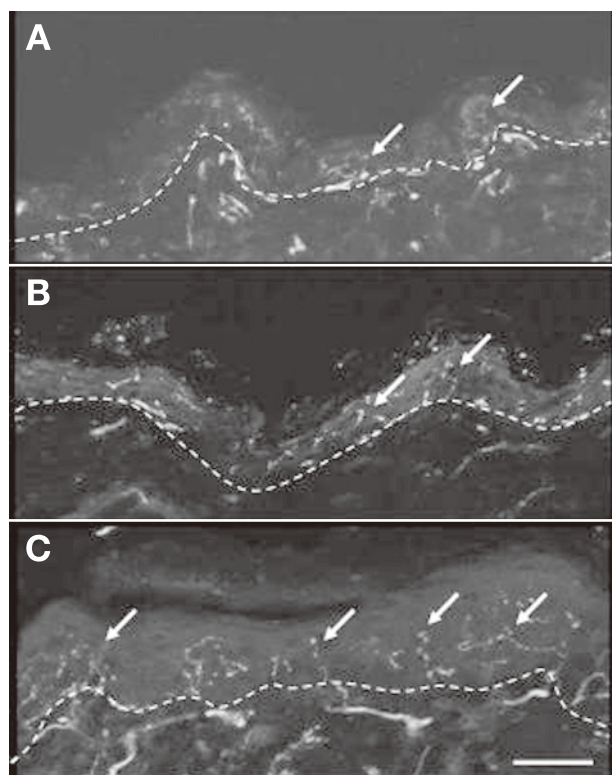


Fig. 3 PGP9.5-immunoreactive nerve fibers in the mouse skin. The skin sections obtained from non-treated (A), AE-treated (B) and AEW-treated (C) mice were immunostained with anti-PGP9.5 antibody. The dashed line in each panel indicates the border between the epidermis and the dermis. Arrows indicate nerve fibers in epidermis. Scale bar=50 μ m.

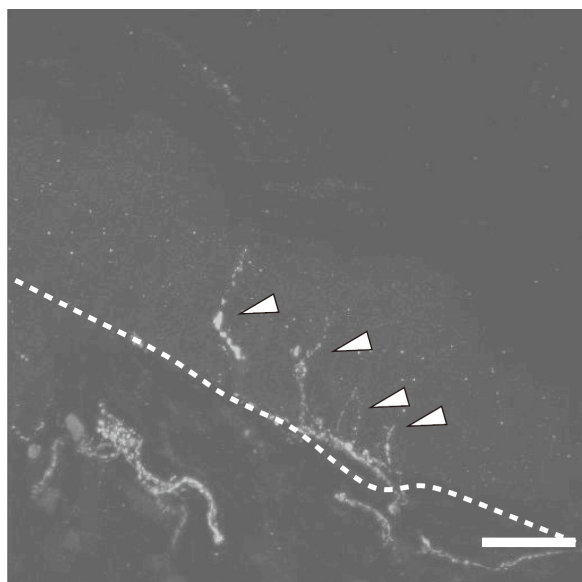


Fig. 4 CGRP-immunoreactive nerve fibers in AEW-treated mouse skin. The skin sections obtained from AEW-treated mouse mice was immunostained with anti-CGRP antibody. The dashed line in each panel indicates the border between the epidermis and the dermis. Arrow heads indicate CGRP-immunoreactive nerve fibers in epidermis. Scale bar = 25 μ m.

た。それぞれの処置により発現が増加，減少したタンパクが多く見つかった。現在，それぞれスポットを抽出して解析している。現在までに同定できたタンパクで，機能がわかっていてのものの一つで filaggrin あり，無処置，AE 処置及び AEW 処置と発現が減少していった。

4. 考 察

本研究において，AE 処置では皮膚は乾燥するものの自発的掻き動作や末梢神経の表皮内伸展は観察されず，AEW 処置マウスにおいてのみ自発的掻き動作の有意な増加や表皮内伸展神経線維数の増加が認められた。これらのことから，AEW 処置マウスにおける痒みが表皮内伸展末梢神経の増加に付随して誘導されていることが示唆される。皮膚の乾燥を伴うようなアトピー性皮膚炎などの掻痒性皮膚疾患の皮膚でも，表皮内に一次感覚神経が伸展している³⁻⁶⁾。この様な皮膚疾患の皮膚は，痒覚過敏あるいはアロネーシスの状態になっていることが報告されている^{1, 2)}。したがって，表皮内に伸展した末梢神経は，痒みの伝達に重要な役割を担っていると考えられる。

ところで，AEW 処置マウス皮膚の表皮内伸展神経が，主に CGRP を含有する無髄神経であった。CGRP⁹⁾は，無髄の C 線維に加え，有髄の A 線維にも発現している。しかしながら，有髄の A 線維のマーカである neurofilament 200 陽性神経の伸展は観察されなかった (data not shown)。このことから，伸展神経線維は，主に C 線維であることが示唆される。

表皮内への末梢神経伸展には，表皮の大部分を占めるケラチノサイトからの遊離因子が関与している可能性がある。そこで，表皮を剥離してプロテオミクス解析を試みている。その中で，AEW 処置により filaggrin の減少が認められた。

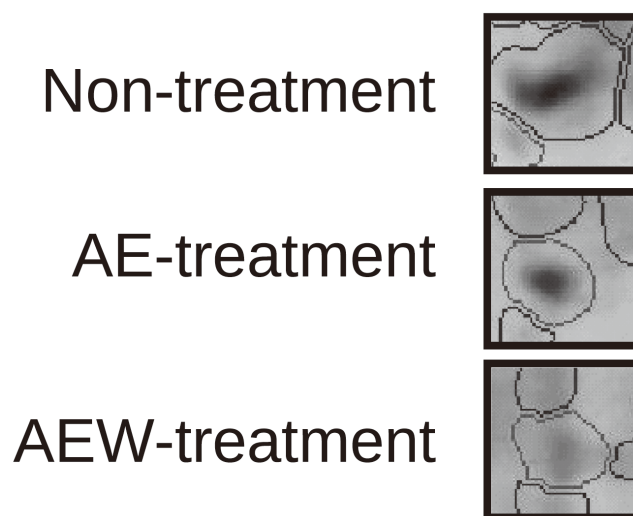


Fig. 5. Comparative analysis of differentially expressed protein spots in control and AE- or AEW-treatment epidermis. Zoom of the 2-DE gel on the spot of filaggrin.

Filaggrin は、脂質成分のセラミドと共に皮膚の保湿やバリア機能に関与している因子である。Filaggrin の遺伝子変異が魚鱗癬の発症の原因に関係していることが示唆されており、その患者の多くがアトピー性皮膚炎を伴っていることが報告されている^{11, 12)}。このように皮膚バリア機能が破壊されることにより外部からの刺激を受けやすくなっており、しかもこのことがケラチノサイト活性化に重要であるかもしれない。現在、AEW 処置によって変化するタンパク質の同定を行っており、直接神経伸展に関与する因子と細胞間接着因子など神経伸展に当り細胞間の隙間形成と表皮環境に関与するもの、更には、神経因子だけでなく痒みに関与する因子も見出されることが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。また、本研究にご協力くださいました当研究室 倉石泰教授、並びに浅川優太、桑園 崇両氏に感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Heyer G, Ulmer FJ, Schmitz J, et al.: Histamine-induced itch and alopecia (itchy skin) in atopic eczema patients and controls, *Acta Derm. Venereol.*, 75, 348-352, 1995.
- 2) Simone DA, Alreja M, LaMotte RH: Psychophysical studies of the itch sensation and itchy skin ("alopecia") produced by intracutaneous injection of histamine, *Somatosens Mot. Res.*, 8, 271-279, 1991.
- 3) Tobin D, Nabarro G, Willem A, et al.: Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90, 613-622, 1992.
- 4) Sugiura H, Omoto M, Hirata Y, et al.: Density and fine structure of peripheral nerves in various skin lesions of atopic dermatitis, *Arch. Dermatol. Res.*, 289, 125-131, 1997.
- 5) Urashima R, Mihara M: Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study, *Virchows Arch.*, 432, 363-370, 1998.
- 6) Kinkelin I, Motzing S, Koltzenburg M: Increase in NGF content and nerve fiber sprouting in human allergic contact eczema, *Cell Tissue Res.*, 302, 31-37, 2000.
- 7) Miyamoto T, Nojima H, Shinkado T, et al.: Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice, *Jpn. J. Pharmacol.*, 88, 285-292, 2002.
- 8) Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, et al.: Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 275, 229-233, 1995.
- 9) Lawson SN, McCarthy PW, Prabhakar E.: Electrophysiological properties of neurons with CGRP-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia, *J. Comp. Neurol.*, 365, 355-366, 1996.
- 10) Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al.: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, *Nat. Genet.*, 38, 441-446, 2006.
- 11) Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al.: Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris, *Nat. Genet.*, 38, 337-342, 2006.