

慢性的な痒みにおける脊髄アストロサイトSTAT3の役割

白鳥, 美穂

<https://hdl.handle.net/2324/1441175>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名	白鳥 (林) 美穂
論 文 名	慢性的な痒みにおける脊髄アストロサイト STAT3 の役割

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

痒みは、「皮膚や粘膜を搔破したくなるような不快な感覚」と定義され、病原体や寄生虫、植物などの外界からの有害物に対する生体の自己防衛システムの一つであると同時に、アトピー性皮膚炎や腎・肝疾患などに伴う愁訴であることから、皮膚を含む身体の異常を知らせるシグナルでもあると考えられている。痒みは、皮膚から一次求心性感覚神経 (C 線維)、脊髄を介し脳へと伝達される。従来、痒みは弱い痛み感覚であると想定されてきたが、近年、脊髄において GRP (gastrin-releasing peptide) - GRPR (GRP receptor) シグナルが痒み特異的シグナルとして同定され、現在では、痒みは痛みと異なる経路によって認識されと考えられている。通常、一過性の痒みは患部の引っ掻きにより消失するが、多くの皮膚疾患や全身疾患に伴う慢性的な痒みは、抗ヒスタミン薬などの既存の治療薬に抵抗性を示し、長期的な痒みによる搔破は皮膚症状を悪化させ、更に痒みを増強する「痒みと搔破の悪循環」を形成してしまう。また、通常の痒み刺激がより強い痒みを起こすハイパーネーシス (hyperknesis) 等の痒み過敏状態 (痒み感作) に陥り、更なる難治化及び遷延化につながる。この異常な痒みは患者に過度の肉体疲労や精神的ストレスを引き起こし、QOL (Quality of Life) を確実に低下させるため、慢性的な痒みのメカニズム解明及び治療薬開発は急務の課題である。近年、慢性搔痒患者における痒み感受性増大に脊髄レベルでの感作の関与が示唆されたが、詳細は不明である。また、これまでに、中枢神経系において、グリア細胞の一種であるアストロサイトが多くの神経疾患で変化し、その病態に関与する可能性が示唆されているものの、慢性的な痒みとの関連は全く明らかになっていない。そこで本論文では、慢性的な痒みのメカニズムを明らかにするため、脊髄アストロサイトに着目し、その関与を検討した。

その結果、次の事実が明らかとなった。NC/Nga マウスは無菌環境下では皮膚炎及び痒みを発症しない (SPF-NC/Nga マウス) が、通常環境下で飼育すると、ダニの寄生等により皮膚炎及び痒みを自然発症する (CV-NC/Nga マウス)。この他、抗ヒスタミン薬への抵抗性などの薬物効果や皮膚の病理組織学的形態など、多くの点でアトピー性皮膚炎患者との類似性が報告されており、NC/Nga マウスは自然発症のアトピー性皮膚炎モデルとして広く用いられている。まず、NC/Nga マウスにおける痒み行動及び皮膚炎の推移を検討したところ、SPF-NC/Nga マウスは特に変化が認められなかったのに対し、CV-NC/Nga マウスは生後 4 週齢頃から痒み行動の増加が始まり、8~15 週齢にかけて著しく増加するとともに皮膚炎も出現した (Fig. 1a)。痒み及び皮膚炎が著しく進行した 15 週齢の CV-NC/Nga マウスにおける上背部 (痒み及び皮膚炎が発症している部位) の皮膚を支配する脊髄後角において、アストロサイトのマーカーである GFAP (glial fibrillary acidic protein) の染色性が増強していた (Fig. 1b)。さらに、皮膚への塗布により接触性皮膚炎及び強い痒みを誘発する DCP を C57BL/6

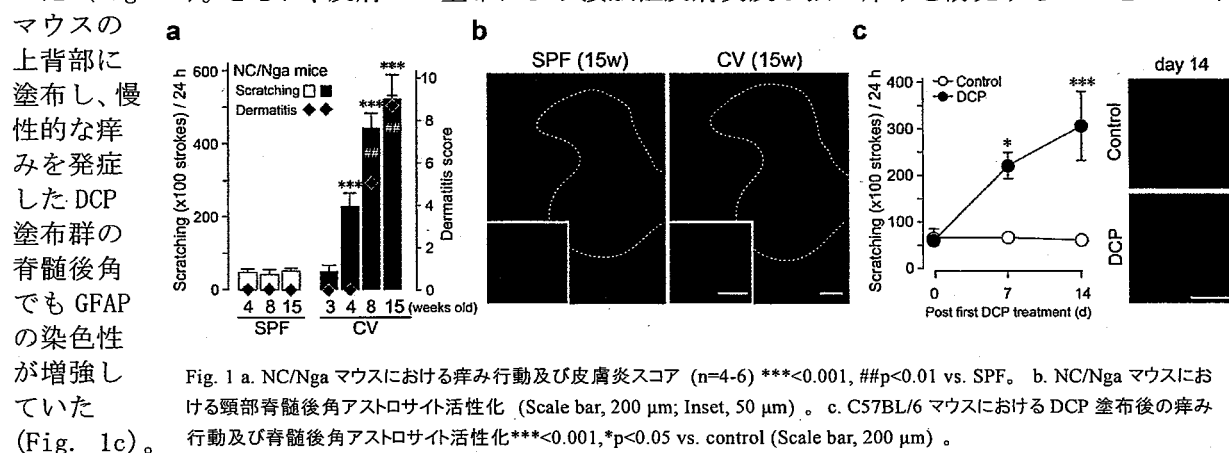


Fig. 1 a. NC/Nga マウスにおける痒み行動及び皮膚炎スコア (n=4-6) ***<0.001, ##p<0.01 vs. SPF. b. NC/Nga マウスにおける頸部脊髄後角アストロサイト活性化 (Scale bar, 200 μ m; Inset, 50 μ m). c. C57BL/6 マウスにおける DCP 塗布後の痒み行動及び脊髄後角アストロサイト活性化 ***<0.001, *p<0.05 vs. control (Scale bar, 200 μ m)。

これらの結果から、慢性搔痒時に認められる脊髄後角アストロサイトの活性化は、皮膚炎を伴った慢性搔痒モデルに共通して起こることが明らかとなった。

活性化アストロサイトの慢性的な痒みへの関与を明らかにするために、アストロサイト活性化に関与する転写因子である STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) に着目した。CV-NC/Nga 及び DCP 塗布マウスの脊髄後角アストロサイトにおいて STAT3 の強い点状の染色が認められた (Fig. 2a)。STAT3 の活性化阻害剤及びアストロサイト特異的 STAT3 不活性化 (*Gfap-Cre; Stat3^{flx/flx}*) マウスを用いて検討を行ったところ、アストロサイトの活性化及び慢性的な痒みが有意に抑制された (Fig. 2b, c)。しかしながら、*Gfap-Cre; Stat3^{flx/flx}* マウスにおけるヒスタミンや

ヒスタミン非依存的起痒物質による急性の痒み行動には変化がなかった。これらの結果から、脊髄後角アストロサイトにおける STAT3 の不活性化は、急性の痒みに影響を及ぼすことなく、慢性的な痒みの進行及び維持を抑制することが示唆される。

激しい引っ掻き行動による皮膚損傷は、慢性的な痒みの特徴である「痒みと搔破の悪循環」の形成に重要な役割を果たしている。皮膚損傷悪化と STAT3 活性化の経時変化が相関していたことから、アストロサイト STAT3 活性化における皮膚損傷の関連を検討した。CV-NC/Nga 及び DCP 塗布マウスの後肢の爪を切ったところ、皮膚損傷が著しく改善し、痒み行動も有意に抑制された。このような条件下で、脊髄後角アストロサイトにおける STAT3 活性化及び GFAP 発現上昇は抑制された (Fig. 3a)。さらに、あらかじめ後肢の爪を切った DCP 塗布マウスの皮膚に人為的皮膚損傷を加えたところ、後肢の爪を切ることによって生じたアストロサイト活性化及び痒み行動の抑制が消失し、人為的皮膚損傷によって増加した痒み行動は *Gfap-Cre; Stat3^{flx/flx}* マウスにおいて有意に抑制された (Fig. 3b, c)。

これらの結果から、引っ掻き行動による皮膚損傷は STAT3 依存的なアストロサイト活性化に関与している可能性が示唆される。

脊髄レベルでの痒み感作は、慢性的な痒みにおける重要な要素であると考えられている。STAT3 を介して活

性化したアストロサイトが、脊髄レベルでの痒み感作に関与しているか否か検討するために、まず、脊髄後角ニューロンの活動性を評価したところ、CV-NC/Nga マウスにおいて、ニューロン活動性マーカーである c-Fos の陽性細胞数が増加していた (Fig. 4a)。この増加した c-Fos 陽性細胞数は STAT3 の活性化阻害剤及びアストロサイト特異的 STAT3 不活性化によって有意に減少した (Fig. 4b)。さらに、NC/Nga マウスの脊髄腔内に脊髄の痒み特異的なニューロペプチドである GRP を投与したところ、SPF と比較し、CV-NC/Nga マウスの痒み行動が著しく増加し、その増加は STAT3 の活性化阻害剤によって抑制された (Fig. 4c, d)。これらの結果から、STAT3 依存的なアストロサイト活

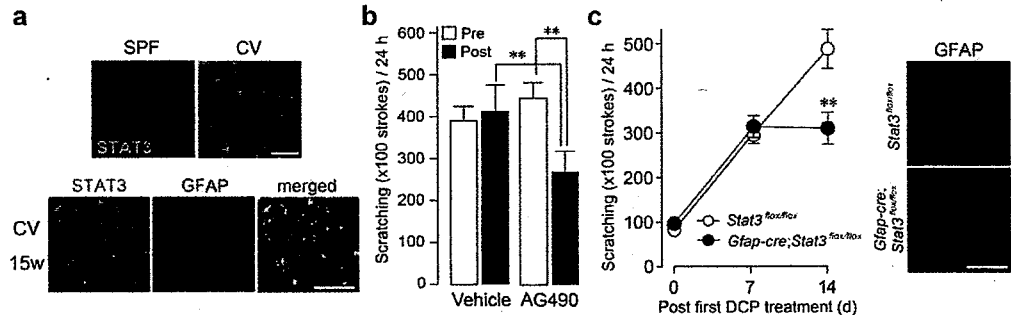


Fig. 2 a. NC/Nga マウスにおける脊髄後角 STAT3 の発現及び局在 (Scale bar, 100 μ m). b. CV-NC/Nga マウスの痒み行動における STAT3 活性化阻害剤 (AG490) の効果, ** <0.01 . c. アストロサイト特異的 STAT3 不活性化マウスにおける DCP 塗布後の痒み行動及び脊髄後角アストロサイト活性化, ** <0.01 vs. *Stat3^{flx/flx}* (Scale bar, 200 μ m)。

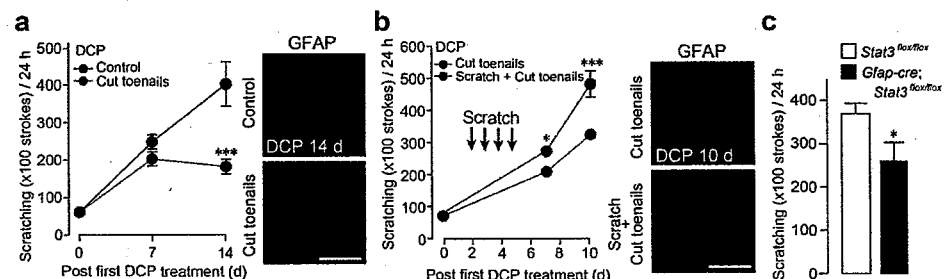


Fig. 3 a. 爪切除後の DCP 塗布マウスの痒み行動及び脊髄後角アストロサイト活性化, *** <0.001 vs. control. b. 爪を切除した DCP 塗布マウスに人為的皮膚損傷を加えた後の痒み行動及び脊髄後角アストロサイト活性化, *** <0.001 , * <0.05 vs. cut toenails. c. 爪切除済みのアストロサイト特異的 STAT3 不活性化マウスに DCP 塗布及び人為的皮膚損傷を加えた後の痒み行動及び脊髄後角アストロサイト活性化, * <0.05 vs. *Stat3^{flx/flx}*. Scale

性化は、慢性的な痒み発症時の脊髄後角における GRP 誘発痒みシグナルの感作に非常に重要な役割を果たしていると思われる。

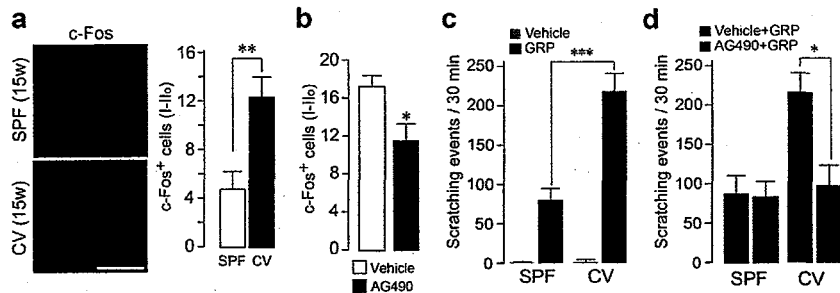


Fig. 4 a. NC/Nga マウスにおける脊髄後角 c-fos 発現及び陽性細胞数 **<0.01, (Scale bar, 200 μm) b. CV-NC/Nga マウスの脊髄後角 c-fos 陽性細胞数増加における STAT3 活性化阻害剤の効果, *<0.05. c. NC/Nga マウスにおける GRP 髄腔内投与誘発痒み行動, ***<0.001. d. NC/Nga マウスにおける GRP 髄腔内投与誘発痒み行動に対する STAT3 活性化阻害剤の効果,

本論文において、脊髄後角アストロサイトにおける STAT3 の活性化が、アトピー性皮膚炎及び接触性皮膚炎モデルにおける病態時の慢性的な痒みに重要な役割を果たすことを初めて明らかにした。複数の慢性搔痒モデル動物において、脊髄後角アストロサイトが共通して活性化し、脊髄における STAT3 の薬理的阻害はアストロサイト活性化、脊髄後角神経興奮及び慢性化した痒みを抑制した。さらに、アストロサイトにおける STAT3 の遺伝的不活性化はアストロサイト活性化及び脊髄後角神経興奮を抑制し、慢性的な痒みの進行も抑制したことから、アストロサイトの STAT3 活性化は慢性的な痒みの進行及び維持に関与していると考えられる。脊髄後角における STAT3 とアストロサイトの活性化は皮膚炎の重症度と相関しており、また爪を切り皮膚炎を改善することでアストロサイト活性化及び痒み行動が抑制され、そのような条件下で人為的に皮膚炎を悪化させることで再びアストロサイト活性化及び痒み行動増加が観察された。さらに人為的皮膚炎悪化による痒み行動増加はアストロサイトにおける STAT3 の遺伝的不活性化によって抑制されたことから、脊髄後角におけるアストロサイト STAT3 は、痒みの慢性期に観察される引っ掻き行動で悪化する皮膚症状に依存して活性化し、慢性的な痒みに関与していることが示唆される。

慢性搔痒患者で認められる痒み感受性増大に、脊髄レベルでの感作の関与が予想されている。本研究において、慢性搔痒モデルマウスの脊髄後角でニューロンの活動性が増加し、脊髄での痒み特異的分子である GRP による痒み行動が著明に増加することを初めて明らかにした。さらに、このニューロンの活動性増加や GRP 誘発痒み行動の著しい増加は STAT3 活性化の抑制によって有意に減少した。この結果は STAT3 依存的なアストロサイト活性化が脊髄後角における痒み感受性増大の原因であることを示唆している。近年、アストロサイトから放出される分子がニューロンに直接作用し、ニューロンの活動性を制御することが示されている。今後、痒みニューロンの活動性を制御するアストロサイト STAT3 依存的な新たな分子やその制御機構を明らかにすることは重要な課題の一つである。

アトピー性皮膚炎患者等で認められる慢性的な痒みには、「痒みと搔破の悪循環」が非常に重要な要素である。この悪循環のメカニズムは不明であるが、本研究で得られた結果から、引っ掻き行動による皮膚損傷によって STAT3 を介して活性化された脊髄後角アストロサイトが、脊髄における痒み感作に極めて重要な役割を果たし、通常では弱く感じる程度の痒みをより強く激しい痒みにすることで、強固な「痒みと搔破の悪循環」を形成し、慢性的な痒みの進行及び維持に関与している可能性が初めて示された。この脊髄後角アストロサイトの重要性を明らかにした本研究成果は、これまで全く明らかにされていなかった皮膚疾患時に慢性化する痒みの神経メカニズムの解明を大きく進展させる成果になると思われる。本研究成果から、STAT3 及びアストロサイトを標的とした有効な治療薬開発へと発展することが期待できる。

以上のことから、本論文は博士（薬学）の学位を授与するに相応しいと判定した。