

氏名 しみず きょうこ
清水 教子

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 234 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学専攻

学位論文題目 The involvement of histamine released from epidermal
keratinocytes in α -melanocyte-stimulating
hormone-induced itching
(α -メラノサイト刺激ホルモン誘発搔痒発生への表皮ケラ
チノサイト遊離ヒスタミンの関与)

論文審査委員

(主査) 教授 足立 雄一
(副査) 教授 井村 穰二
(副査) 教授 服部 裕一
(副査) 教授 林 篤志
(指導教員) 教授 清水 忠道

論文内容の要旨

[背景と目的]

日焼けは皮膚の色素沈着と痒みを併せ持つ病態である。しかし、いずれも炎症に伴う副産物と解釈されていることから両者の関係性はこれまで明らかにされていない。紫外線などの刺激により皮膚の色素沈着を引き起こす神経ペプチドのひとつに α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) がある。 α -MSH は、皮膚においてケラチノサイトやメラノサイトで産生され、色素産生を促進するホルモンとして知られている。また、創傷治癒過程や透析中の慢性腎不全患者の皮膚でも色素沈着と痒みの併発を認めるが、これらの病態では α -MSH やその受容体の発現が上昇していることが報告されている (Airaghi L *et al.*, *Nephrol Dial Transplant* 2000, Muffley LA *et al.*, *J Histochem Cytochem* 2011)。

本研究では、 α -MSH が痒みを誘発する過程を解明することを目的とし、 α -MSH を皮内注射したマウス皮膚において痒みが引き起こされるかどうかを評価した。さらに、マウス表皮ケラチノサイトを用いて痒み誘発機序に対する遊離ヒスタミンの関与の検討を行った。

[方法並びに成績]

In vivo 実験系

α -MSH の痒み誘発作用を検討するため、 α -MSH を皮内注射した ICDR マウスを用いて搔破行動の経時的なカウントによる痒みの評価を行ったところ、 α -MSH の用量依存性に痒みが誘導された。次に、誘発される痒みへのヒスタミンの関与を検討するため、あらかじめ H1 受容体拮抗薬で前処置したマウスの背部皮膚に α -MSH を注射して搔破行動の変化を評価した。結果、搔破は抗ヒスタミン薬により部分的に抑制されたことから、ヒスタミンの関与が示唆された。さらに、肥満細胞の欠損マウスでも α -MSH を注射し搔破行動を評価した。その結果、肥満細胞を欠いていても α -MSH による搔破行動が誘導され、ヒスタミンは肥満細胞以外の細胞に由来することが示された。

In vitro 実験系

マウス正常皮膚およびマウス表皮ケラチノサイト細胞株である Pam212 において、 α -MSH の受容体である melanocortin receptor (MC1R, MC5R)、ヒスタミン生合成において重要な酵素である L-histidine decarboxylase (HDC) の発現を蛍光免疫染色により検討した。結果、マウス正常皮膚および Pam212 の両方で MC1R, MC5R, HDC の発現を認めた。次に、 α -MSH を添加した Pam212 における上清中のヒスタミン量を、ELISA 法を用いて定量した。さらに、MC1R, MC5R の関与を評価するため、 α -MSH を添加した Pam212 に MC1R, MC5R の siRNA を添加し、上清中のヒスタミン量を ELISA 法により定量した。結果、 α -MSH を添加した Pam212 の上清中ヒスタミン濃度は有意に増加し、それは MC1R または MC5R の siRNA を添加すると、抑制

されたことを確認した。

以上の結果から、 α -MSHはケラチノサイトにおけるヒスタミン産生を誘導し、痒みを引き起こしていることが証明された。

[総括]

本研究では、 α -MSHが痒みを誘発する過程を解明することを目的とし、*in vivo* および *in vitro* における検討を行った。 α -MSHは、*in vivo* 実験系において用量依存性にマウスの搔破行動を引き起こし、その痒みの機序の一部にはヒスタミンが関与しているが、その由来は肥満細胞ではないことが示された。また、*in vitro* 実験系においては、マウス培養ケラチノサイトで α -MSHは、MC1R、MC5Rを介してケラチノサイトを刺激し、ヒスタミン遊離を誘導することが示された。したがって、 α -MSHはケラチノサイトから遊離されたヒスタミンを介して痒みを引き起こす作用を有することが示唆された。

学位論文審査の要旨

【目的】

日焼けは皮膚の色素沈着と痒みを併せ持つ病態であるが、両者の関係性はこれまで明らかにされていない。紫外線などの刺激により皮膚の色素沈着を引き起こす神経ペプチドのひとつである α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) は、皮膚のケラチノサイトやメラノサイトで産生され、色素産生を促進するホルモンとして知られている。また、創傷治癒過程や透析中の慢性腎不全患者の皮膚でも色素沈着と痒みの併発を認め、これらの病態でも α -MSH やその受容体の発現が上昇していることが報告されている。そこで、 α -MSH が痒みを誘発する過程を解明することを目的として、マウスならびにマウス表皮ケラチノサイトを用いた *in vivo* ならびに *in vitro* の実験を行い、痒みの誘発機序における遊離ヒスタミンの関与について検討を行った。

【方法と成績】

In vivo 実験系：

α -MSH の痒み誘発作用を検討するため、 α -MSH を皮内注射した ICDR マウスを用いて搔破行動の経時的なカウントによる痒みの評価を行ったところ、 α -MSH は用量依存性に痒みが誘導した。次に、誘発される痒みへのヒスタミンの関与を検討するため、あらかじめ H1 受容体拮抗薬で前処置したマウスの背部皮膚に α -MSH を注射して搔破行動の変化を評価したところ、搔破は抗ヒスタミン薬により部分的に抑制されたことからヒスタミンの関与が示唆された。さらに、肥満細胞欠損マウスでも α -MSH の注射によって搔破行動が誘導されたことより、ヒスタミンは肥満細胞以外の細胞由来であることが示された。

In vitro 実験系：

マウス正常皮膚およびマウス表皮ケラチノサイト細胞株である Pam212 において、 α -MSH の受容体である melanocortin receptor (MC1R, MC5R)、ヒスタミン生合成において重要な酵素である L-histidine decarboxylase (HDC) の発現を蛍光免疫染色により検討した結果、マウス正常皮膚および Pam212 の両方で MC1R、MC5R、HDC の発現を認めた。次に、 α -MSH を添加した Pam212 における上清中のヒスタミン量を ELISA 法を用いて定量した。さらに MC1R ならびに MC5R の関与を評価するため、 α -MSH を添加した Pam212 に MC1R と MC5R の siRNA を添加して上清中のヒスタミン量を定量した。その結果、 α -MSH を添加した Pam212 の上清中ヒスタミン濃度は有意に増加し、それは MC1R または MC5R の siRNA を添加すると抑制されることを確認した。

なお、本研究は富山大学動物実験委員会にて承認された上で実施されている。

【総括】

本研究は、 α -MSH が皮膚の痒みを誘発するメカニズムについて検討したものである。 α -MSH をマウスの皮膚に投与することで用量依存性にマウスの搔破行動を引き起こし、その痒みは H1 受容体拮抗薬による前処置で有意に抑制されることから、搔痒発症機序の一部にヒスタミンが関与していることが明らかとなった。さらに、肥満細胞欠損マウスにおいて

も α -MSHの投与によって痒みが誘発されたことから、ヒスタミンは肥満細胞以外の細胞由来であることが示唆された。そこで、ヒスタミンを少量ではあるが産生することが既に報告されている皮膚ケラチノサイトからの遊離の可能性を検討する目的で、マウス正常皮膚およびマウス表皮ケラチノサイト細胞株であるPam212に α -MSHを添加したところ、培養上清中のヒスタミン濃度が有意に上昇し、これは α -MSHの受容体であるMC1RとMC5RのsiRNAを添加することで抑制されることを初めて証明した。

これらの結果により、皮膚の色素沈着を誘導する α -MSHがヒスタミンを介して皮膚の痒みを誘発することを示した点において新規性があり、さらにそのヒスタミンがマスト細胞ではなく皮膚ケラチノサイトから α -MSHの受容体であるMC1RならびにMC5Rを介して遊離されることを示した点で医学における学術性が高く、皮膚の痒み発症の新たなメカニズムの一端を解明することで今後の痒み治療への新たな方向性が示されたことで臨床的発展性も期待できる。以上より、本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値するものと判断した。