

水疱性類天疱瘡の痒みにおけるグランザイムの機能解析

大阪公立大学大学院 医学研究科 皮膚病態学

廣保 翔

1. 諸言

痒みは、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、水疱性類天疱瘡、乾癬、腎臓肝臓疾患などのさまざまな疾患に伴い、搔破行動を引き起こす不快な症状である。患者の QOL を保ち、搔破による湿疹の合併を防ぐため、瘙痒性疾患では原疾患の治療に加えて痒みのコントロールが重要である。

これまで痒み治療の中心であった抗ヒスタミン薬は、ヒスタミンと皮膚感覚神経終末上の受容体の結合を阻害し、蕁麻疹などに著効する。しかし、他の瘙痒性疾患には有効性が低く、末梢性の難治性瘙痒性疾患ではヒスタミン以外の起痒物質が存在する可能性が示唆されてきた。

抗ヒスタミン薬抵抗性の瘙痒性疾患である類天疱瘡疾患（水疱性類天疱瘡や後天性表皮水疱症を含む水疱症の総称）は、全身の紅斑・水疱とそれに伴う強い痒みを特徴とする自己免疫性水疱症で、近年増加傾向にある。その主な病態は、表皮真皮間接着分子に対する自己抗体が引き起こす炎症であり、炎症細胞から放出される好中球エラスターゼなどのプロテアーゼが表皮真皮間接着分子を切断することで水疱が形成されることが、申請者を含む研究者により示されてきた¹⁾。その治療に内服ステロイドがよく用いられるが、その痒みは治療抵抗性である。

類天疱瘡疾患の痒みの機構はほぼ不明であるが、アトピー性皮膚炎と異なり IL-31 と痒みの重症度との間に相関は認められない²⁾。しかし、さまざまな起痒物質を放出する好酸球や好塩基球の数は痒みの重症度と相関し、類天疱瘡では IL-31 以外の起痒物質が存在しており、それらに対する治療は IL-31 標的治療よりも効果的である可能性が示唆される。

好酸球や好塩基球等の顆粒球は、類天疱瘡疾患の皮疹部で好中球エラスターゼやグランザイム (Gzm) などのプロテアーゼを分泌する。それらは上述のように水疱形成を引き起こすが、報告によると Gzm は、7 回膜貫通型受容体の protease activated receptors (PARs) の細胞外ドメインを切断し活性化させる³⁾。それらの PARs の中でも特に PAR2 は、皮膚感覚神経および表皮角化細胞上で活性化されると、神経内 Ca²⁺シグナルを誘

発し、痒みを引き起こす。そこでわれわれは、類天疱瘡疾患皮膚部において Gzm が、PAR2 活性化を介して痒みを引き起こすという仮説を立て、研究を始めた。

2.方法

まず GzmB および GzmK が PARs の細胞外ドメインを切断するかどうかを調べるために、PAR cleavage assay を行った。この実験系では、PAR-1、PAR-2、PAR-4 の細胞外ドメインに luciferase をタグしたものを CHO cell に発現させ、そこに GzmB、GzmK を加えて細胞外ドメインが上清中に放出されたかを luciferase の蛍光度で検出した。次に、GzmK がニューロンでカルシウム流入を引き起こすかどうかをみるために、カルシウム流入試験を行った。具体的にはマウスの dorsal root ganglion (DRG) 細胞を摘出し、それにカルシウムセンサーである Fluo-8AM を取り込ませた後に、DRG cells を PAR-2 のアゴニストおよび GzmK で刺激し、カルシウム流入が起きるかどうかをライブセルイメージングの手法で観察した。次に、GzmK がマウスにおいてそう痒を引き起こすかどうかをみるために、活性型 GzmK または陰性コントロールである PBS をマウスの頬に皮内注射し、その直後から 30 分間の搔破行動をビデオ撮影した後に搔破行動を解析した。後ろ足が地面を離れてから頬を搔いて地面に戻るまでの時間を time spent scratching として定量化した。最後に、痒痒性皮膚疾患での GzmK の局在をみるため、GzmK 抗体を用いて免疫組織化学を行った。

3.結果

PAR cleavage assay では、15 分間の刺激で、100 nM の GzmB に比べて、同濃度の GzmK がより効率的に PAR-1 および PAR-2 を切断することを示した (図 1)。このことから、この後はすべて、GzmK による PAR-2 の活性化を標的に研究を続けることとした。

次に、DRG cell のカルシウム流入実験では、PAR-2 agonist で Ca influx を起こした同一の細胞

が、agonist の wash out 後の GzmK 刺激で、カルシウムの再流入を起こすことを確認した (図 2)。これは、DRG cells がヘテロな集団なので、PAR-2 を発現している細胞が GzmK によってカルシウムを流入させることを間接的に確認するために行った。

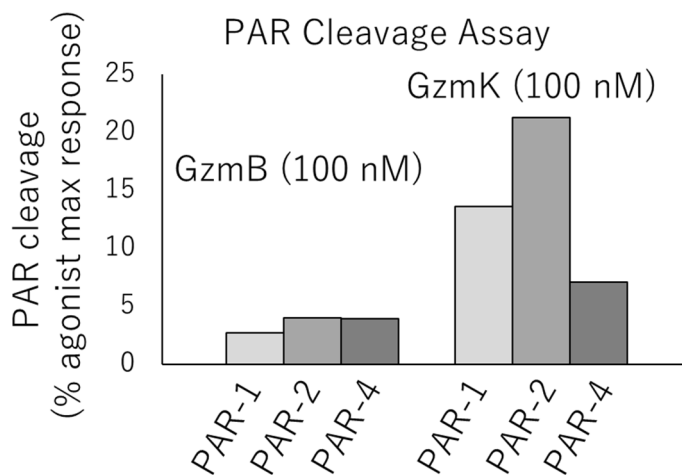


図 1 GzmB および GzmK による PAR cleavage assay

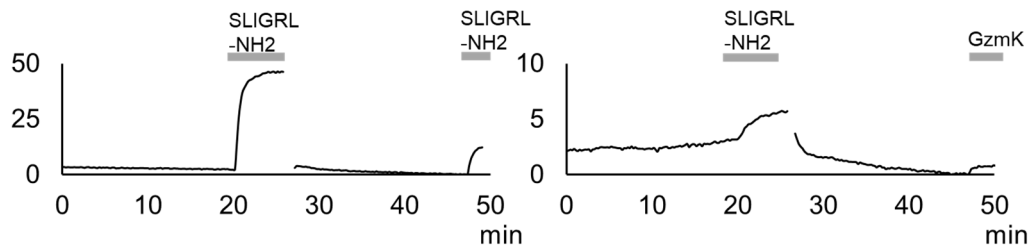


図 2 PAR-2 agonist と GzmK 刺激時の DRG cell のカルシウム流入

マウスへの皮内投与実験では、PBS を右頬に投与したあとには搔破行動に左右差は認められず、positive control である tryptase および GzmK の右頬への投与後には、右頬に対する搔破行動が有意に増えた (図 3)。

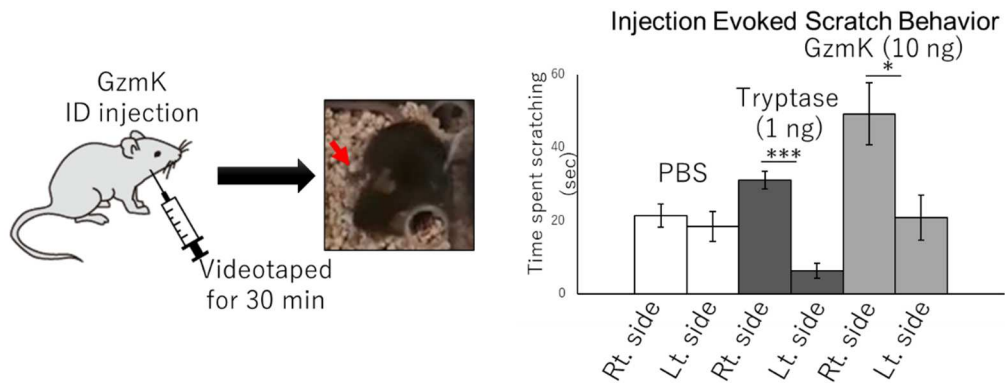


図 3 GzmK のマウス右頬への皮内投与実験

最後に、痒痒性皮膚疾患での GzmK の局在をみるため、IHC を行ったところ、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、水疱性類天疱瘡の皮疹部の真皮上層にて GzmK 陽性細胞の増加を認めた (図 4)。

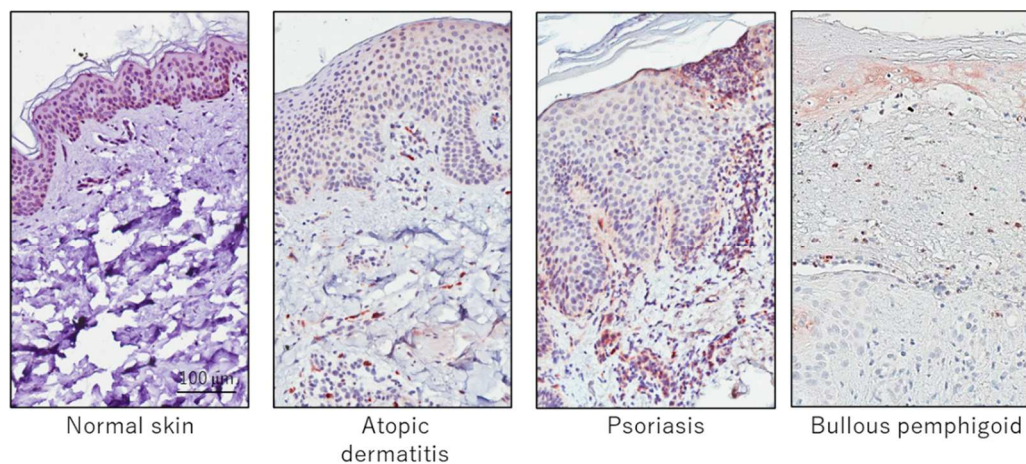


図4 痒痒性皮膚疾患における GzmK 陽性細胞の局在

4.考察

以上の結果から、われわれは炎症細胞が GzmK を放出し、その GzmK が感覚神経末端において PAR-2 の活性化に引き続くカルシウム流入を引き起こし、痒痒を引き起こすことを示した。この GzmK 誘導性痒痒を示す疾患としては、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、水疱性類天疱瘡が示唆される。これらの疾患が GzmK 誘導性痒痒を示すかどうかについては、今後モデルマウスを使った研究が必要である。また現在までのところ、GzmK の特異的阻害薬は知られておらず、ドラッグリポジショニングを目的としたスクリーニングなどが必要である。

5.結語

以上、本研究により、GzmK による PAR-2 活性化を通じた痒痒経路が存在することを示した。今後、疾患との関連の解明や GzmK に対する薬剤開発を行いたい。

6.文献

- 1) Hiroyasu S, Turner CT, Richardson KC. and Granville D. J. Proteases in Pemphigoid Diseases. *Front Immunol.* 2019; 10: 1456.
- 2) Hashimoto T. et al. Pathophysiologic mechanisms of itch in bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2020; 83: 53-62.
- 3) Cooper DM, Pechkovsky DV, Hackett TL, Knight DA, Granville DJ. Granzyme K activates protease-activated receptor-1. *PLoS One.* 2011; 6: e21484. doi: 10.1371/journal.pone.0021484. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21760880; PMCID: PMC3128063.
- 4) Kaiserman Id, D. et al. Granzyme K initiates IL-6 and IL-8 release from epithelial cells by

activating protease-activated receptor 2. 2022; 17: e0270584. doi:10.1371/journal.pone.0270584.

7.成果発表

雑誌論文

• Hiroyasu S, Barit JJG, Hiroyasu A, Tsuruta D. Pruritogens in pemphigoid diseases: Possible therapeutic targets for a burdensome symptom. *J Dermatol.* 2022 Dec 7. doi: 10.1111/1346-8138.16652. Epub ahead of print. PMID: 36477831.

学会発表

• Hiroyasu S, Hiroyasu A, Granville DJ, Tsuruta D. Protease functions in itch associated with pemphigoid diseases, 47th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Nagasaki, Japan. 2022.