

目次

序論.....	1
本論.....	6
第1章 NC/Nga マウスを用いたダニ抗原誘発皮膚炎モデルのアトピー性皮膚炎治療薬評価における有用性.....	6
1. 緒言.....	6
2. 実験材料および方法.....	7
2.1. 実験動物.....	7
2.2. ダニ抗原軟膏.....	7
2.3. 皮膚炎誘発.....	7
2.4. 皮膚病理組織観察.....	8
2.5. 血清総 IgE およびダニ抗原特異的 IgE 測定.....	8
2.6. 搔破行動.....	9
2.7. 免疫組織化学染色.....	9
2.8. 爪切除.....	9
2.9. 統計学的解析.....	9
3. 結果.....	10
3.1. 各系統マウスにおける皮膚炎スコアの変化.....	10
3.2. 病理組織学的所見.....	11
3.3. 血清総 IgE およびダニ抗原特異的 IgE.....	13
3.4. NC/Nga マウスにおける搔破回数および皮膚炎スコアの推移.....	14
3.5. 免疫組織化学染色.....	15
3.6. 爪切除による皮膚炎への影響.....	16
4. 考察.....	17
第2章 CB ₂ 受容体選択的作動薬である S-777469 のマウス皮膚炎症に及ぼす影響.....	19
1. 緒言.....	19
2. 実験材料および方法.....	21
2.1. 実験動物.....	21
2.2. 薬物および試薬.....	21
2.3. DNFB 誘発耳介炎症モデル.....	21
2.4. ダニ抗原誘発皮膚炎モデル.....	21
2.5. 皮膚病理組織観察.....	22
2.6. 2-AG による EoL-1 および HL-60 細胞の遊走.....	22
2.7. 皮膚からの 2-AG 抽出.....	23
2.8. LC-MS/MS による 2-AG の測定.....	23

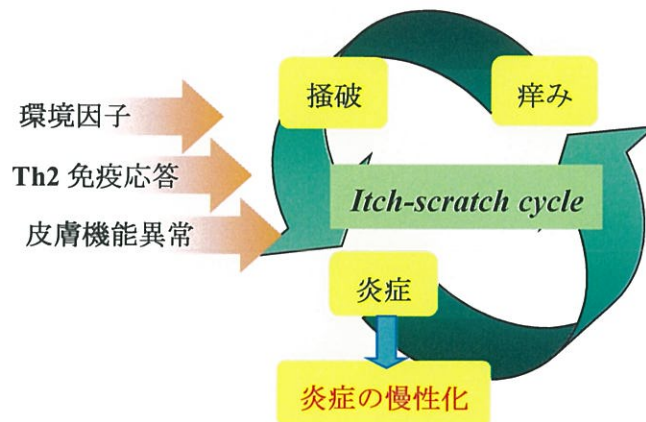
2.9. 統計学的解析.....	24
3. 結果.....	25
3.1. S-777469 の DNFB 誘発耳介炎症モデルに対する効果.....	25
3.2. S-777469 のダニ抗原誘発皮膚炎モデルに対する効果.....	26
3.3. S-777469 のダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおける好酸球浸潤に対する効果.....	28
3.4. ダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおける 2-AG 産生量.....	29
3.5. S-777469 の 2-AG 誘導細胞遊走に対する効果.....	30
4. 考察.....	31
第 3 章 CB₂ 受容体選択的作動薬である S-777469 のマウスおよびラットの搔破行動に及ぼす影響	34
1. 緒言.....	34
2. 実験材料および方法.....	36
2.1. 実験動物.....	36
2.2. 薬物および試薬.....	36
2.3. 搔破行動.....	36
2.4. S-777469 の反復投与による影響.....	36
2.5. 神経発火.....	37
2.6. 免疫組織化学染色用ウサギ抗 CB ₂ 受容体抗体の作製.....	37
2.7. 免疫組織化学染色.....	37
2.8. 統計学的解析.....	38
3. 結果.....	39
3.1. S-777469 の抗そう作用に対する CB ₂ 受容体拮抗薬の影響.....	39
3.2. S-777469 の様々な起痒物質による搔破行動に及ぼす影響.....	40
3.3. 搔破行動に対する S-777469 の反復投与による影響.....	42
3.4. DRG における CB ₂ 受容体発現.....	43
3.5. S-777469 の神経活動に及ぼす影響.....	44
4. 考察.....	45
総括.....	48
謝辞.....	51
引用文献.....	52

序論

アトピー性皮膚炎は、「増悪・寛解を繰り返す、そう痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因 (気管支喘息, アレルギー性鼻炎・結膜炎, アトピー性皮膚炎などの家族歴・既往歴があるか, または IgE 抗体を産生しやすい素因) を持つ」と定義されている [1]. 強い痒みによる不眠や集中力の低下, また皮疹による外見の問題などから, 日常生活あるいは社会的活動に支障をきたし, 患者の生活の質 (Quality of Life: QOL) が著しく低下する疾患である.

アトピー性皮膚炎の有病率は, 小児では先進国において 15-20% [2], 成人では調査によって異なるが 1-10%と推定されている [3]. 日本では, 平成 12 年から平成 17 年度にかけて実施された全国のアトピー性皮膚炎有病率調査の結果から, 4 か月から 6 歳では 12%前後, 20~30 歳代で 9%前後の頻度で認められることが明らかになった (アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2008). 厚生労働省の全国患者調査によると, 平成 8 年から平成 26 年までアトピー性皮膚炎の推計総患者数は増加する傾向にある.

アトピー性皮膚炎の病態は, ① 皮膚バリア機能障害, ② 免疫・アレルギー反応, ③ 痒みの3つの要素が複雑に絡み合って進行すると考えられている [4]. 3つの要素については, 以下の通りである. ① アトピー性皮膚炎の皮膚では角質間セラミドの低下, フィラグリンの異常, 抗菌ペプチドの発現低下などが生じており, バリア機能の低下, 水分保持能の低下, 痒みの閾値の低下, 易感染性などの機能異常が認められる. ② アトピー性皮膚炎の急性期にはInterleukin (IL)-4やIL-5などのサイトカインを産生する2型ヘルパーT (Th2) 細胞が優位な免疫応答によりIgE産生や好酸球浸潤が誘導され, 慢性期には Interferon (IFN) γ などを産生する1型ヘルパーT (Th1) 細胞が増加し, 病態の形成に関与することが知られている. 近年, IL-17やIL-22を産生する17型ヘルパーT (Th17) 細胞や22型ヘルパーT (Th22) 細胞, さらには抗原受容体を持たない自然リンパ球 (innate lymphoid cell: ILC) のサブセットのうち, IL-5やIL-13を産生する2型ILC (ILC2) もまたアトピー性皮膚炎の病態形成や炎症の悪化に関与していることが明らかになってきており [5-9], 非常に複雑な免疫反応が生じている. ③ 痒みは, アトピー性皮膚炎の疾患の定義に含まれるほど主要な症状の1つである. 痒みが搔破につながり, それがさらなる皮膚バリア機能の低下や炎症の悪化を引き起こすといったItch-scratch cycle と呼ばれる悪循環に陥る.



アトピー性皮膚炎は遺伝要因（皮膚のバリア機能異常や免疫応答異常）に加えて環境要因などが関与する多因子疾患であると考えられており、根治は困難であるが、現在の一般的な治療として、原因・悪化因子の除去、スキンケアおよび薬物療法が挙げられる。炎症に対して主に用いられる治療薬は、ステロイド外用薬およびタクロリムス（カルシニューリン阻害剤）軟膏であり、一定の治療効果は得られている。しかし、ステロイド外用薬には、毛細血管拡張、潮紅、ざ瘡、皮膚萎縮や多毛などの局所性副作用や、患者のステロイド忌避によるアドヒアランスの低下といった問題がある。一方、タクロリムス軟膏には、糜爛や潰瘍面に使用できない、薬効の強さに限界があるなど、ステロイド外用薬にはない使用上の制約がある [1]。また、痒みに対して抗ヒスタミン薬および抗アレルギー薬が使用されるが、その治療効果は弱く、コントロールできない場合が多いことから [10-12]、アトピー性皮膚炎の治療満足度は十分であるとはいえない。平成 20 年に、免疫抑制薬であるシクロスポリンの内服が、既存治療で十分な効果が得られない重症患者を対象に保険適応となった。現在、アトピー性皮膚炎を対象疾患として生物学的製剤の開発も進んでおり、今後さらに治療の選択肢は増えると考えられる。しかし、生物学的製剤は、適応が重症度の高い難治な患者に限られること、治療費が高額になることなどが予想される。以上のことから、アトピー性皮膚炎治療薬として、副作用が少なく、有効性や利便性の高い薬剤の開発が望まれる。

カンナビノイドは、大麻 (*Cannabis sativa*) の主成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (tetrahydrocannabinol: THC) を中心とする一連の化合物の総称である。生体内にはカンナビノイドが結合する、I 型カンナビノイド受容体 (cannabinoid type 1 receptor: CB₁ 受容体) と II 型カンナビノイド受容体 (cannabinoid type 2 receptor: CB₂ 受容体) の主に 2 種類の受容体が存在する。生体内で産生される主要な内因性カンナビノイドとして、アナンダミド (arachidonylethanolamide: AEA) [13] と 2-アラキドノイルグリセロール

(2-arachidonoylglycerol: 2-AG) [14] が存在し、いずれも細胞膜のリン脂質に含まれるアラキドン酸から合成され、脂質メディエーターとして機能する。内因性カンナビノイド、受容体 (CB₁, CB₂), 内因性カンナビノイドの合成酵素および分解酵素が働き (内因性カンナビノイドシステム), 神経系や免疫系などの様々な生体機能の制御に関わっている。大麻は古くから民間薬として、痛み、痙攣、不眠、喘息などに用いられており、カンナビノイド受容体が創薬標的となることが示唆される。カンナビノイド受容体の特徴として、CB₁ 受容体は主に中枢神経系に高レベルに発現し、記憶、運動および疼痛感覚などの脳高次機能を調節していると考えられている [15]。一方、CB₂ 受容体は主に末梢神経ならびに免疫系の臓器および細胞に分布し、精神機能への関与は少ないと考えられている [16]。CB₂ 受容体は、ヒト皮膚において感覚神経線維束、マスト細胞、マクロファージおよびケラチノサイトに発現していることから、皮膚の炎症、痒みおよび痛みの調節に関与していることが示唆される [16]。実際、動物モデルにおいて CB₂ 受容体作動薬が炎症を抑制する [17-21]、あるいはヒトにおいて CB_{1/2} 受容体作動薬である HU210 がヒスタミンにより惹起される痒みを抑制する [22] など、CB₂ 受容体作動薬が炎症や痒みを抑制することを示唆する報告が出されており、CB₂ 受容体選択的作動薬は、CB₁ 受容体に依存する中枢性の副作用 (向精神作用、鎮静作用、依存性など) の懸念が少ないアトピー性皮膚炎治療薬となることが期待できる。

本研究では、塩野義製薬により創製された CB₂ 受容体選択的作動薬である S-777469 (1-[[[6-Ethyl-1-(4-fluorobenzyl)-5-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonyl]amino]-cyclohexanecarboxylic acid) [23] のアトピー性皮膚炎治療薬としての可能性を検討した。新規治療薬の創製のためには、その病態の特徴をよく反映した動物モデルが必要となる。そこで、第 1 章では、NC/Nga マウスを用いたダニ抗原誘発皮膚炎モデルのアトピー性皮膚炎モデルとしての有用性について論述した。次いで第 2 章では、S-777469 の抗炎症効果について、第 3 章では、S-777469 の抗そう痒効果について論述した。

略語

AEA	arachidonoylethanolamide
2-AG	2-arachidonoylglycerol
APTES	(3-aminopropyl) triethoxysilane
CB ₁	cannabinoid type 1
CB ₂	cannabinoid type 2
CGRP	calcitonin gene-related peptide
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DFS	direct fast scarlet
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzene
DRG	dorsal root ganglion
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GST	glutathione S-transferase
HE	hematoxylin-eosin
HPLC	high performance liquid chromatography
5-HT	5-hydroxytryptamine
IgE	Immunoglobulin E
IFN- γ	interferon- γ
IL	interleukin
ILC	innate lymphoid cell
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MBP	maltose binding protein
MC	methylcellulose
MRM	multiple reaction monitoring
NK1	neurokinin 1
PCA	passive cutaneous anaphylaxis
PFA	paraformaldehyde
PGP9.5	protein gene product 9.5
PBS	phosphate buffered saline
QOL	Quality of Life
SDS	sodium dodecyl sulfate: SDS
SPF	specific pathogen free

TB	toluidin blue
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Th17	T helper 17
Th22	T helper 22
Δ ⁹ -THC	delta-9-tetrahydrocannabinol
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

本論

第1章 NC/Nga マウスを用いたダニ抗原誘発皮膚炎モデルのアトピー性皮膚炎治療薬評価における有用性

1. 緒言

アトピー性皮膚炎治療薬の創製を目指す上で、適切な病態モデルを使用することは非常に重要である。NC/Nga マウスは、無菌 (specific pathogen free: SPF) 環境下では皮膚炎を発症しないが、通常 (conventional) 環境下での飼育により皮膚炎を自然発症する。NC/Nga マウスの皮膚炎は、搔破行動、血中 IgE 濃度の上昇および病変部の病理組織学的特徴など、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いる [24, 25]。NC/Nga マウスの自然発症モデルや、ハプテン塗布モデルは、アトピー性皮膚炎の発症機序解明や治療薬の薬効評価モデルとして汎用されている。しかし、前者はげっ歯類に寄生するダニ (*Myocoptes musculus* や *Myobia musculi*) によって誘発され [26, 27]、後者はハプテンによって誘発されるといった発症要因の点でヒトと異なっている。そこで塩野義製薬株式会社では、これまでにこの NC/Nga マウスを用いて、ヒトのアトピー性皮膚炎の重要な原因抗原の1つであるダニの1種、コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*: Df) の虫体抽出物を軟膏にして繰り返し塗布することにより、SPF 環境下、3週間という短期間でアトピー性皮膚炎様の慢性化した皮膚炎を発症するモデルを確立した [28]。本モデルでは、臨床所見、病理組織学的特徴および免疫学的特徴がヒトのアトピー性皮膚炎と類似していること、またアトピー性皮膚炎治療薬として用いられているステロイド外用剤およびタクロリムス軟膏の薬効が認められることを確認している [28]。しかし、本モデルを作製するにあたり、NC/Nga マウス以外の系統を用いた検討は実施していなかったため、本研究では ICR, C57BL/6 および BALB/c マウスを用いて、ダニ抗原軟膏を塗布することにより、NC/Nga マウス同様、皮膚炎を惹起することが可能かどうか検討した。

アトピー性皮膚炎において、痒みは重要な臨床症状の1つであり、痒みに伴う搔破行動が皮膚炎の悪化を招き、さらに痒みが増すといった悪循環 (Itch-scratch cycle) が生じていることが知られている。そこで次に、NC/Nga マウスを用いたダニ抗原誘発背部皮膚炎モデルの病態と搔破行動の関係性を調べた。まず、皮膚炎発症への搔破行動の関与を調べるために、経時的に搔破行動を観察した。続いて、本モデルでは抗原誘発を止めても2週間以上皮膚炎が維持されることから [28]、マウスの後肢の爪を切除して搔破行動の影響を阻害することにより、慢性化した皮膚炎の持続への搔破行動の関与を調べた。

2. 実験材料および方法

2.1. 実験動物

NC/Nga, ICR, C57BL/6 および BALB/c マウス (雌性, 使用時 11-15 週齢) は日本チャールス・リバーより購入した。動物は, 室温: 20-26°C, 湿度: 30-70%, 照明時間: 明暗各 12 時間 (照明; 6:00-18:00), 換気: 10 回以上/時に設定した動物飼育室内で飼育した。固形飼料および飲水は自由摂取させた。動物実験計画は, 塩野義動物実験適正運用委員会の審査を受けて承認された。

2.2. ダニ抗原軟膏

コナヒョウヒダニ虫体 (*Dermatophagoides farinae* body: Dfb) 軟膏はビオスタより供与された (Dfb 軟膏 1 g あたり, タンパク量: 136.4 mg, ダニ主要アレルゲン Der f1: 234 µg および Der f2: 7 µg を含む)。

2.3. 皮膚炎誘発

誘発初日 (Day 0) にマウスの吻側背部をバリカンで刈り, 除毛クリームを用いて短い毛を丁寧に取り除いた。毛を刈った部位および耳介の表裏に Dfb 軟膏 100 mg あるいは基剤 (親水ワセリン) を塗布した。誘発 2 回目以降は, 生えてきた毛をバリカンおよび電気シェーバーを用いて刈り, 4% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS) を 150 µL 塗布することにより皮膚のバリアを破壊し, その約 3 時間後に Dfb 軟膏あるいは基剤 100 mg を毛刈りした部位および耳介の表裏に塗布した。この一連の作業を 1 週間に 2 回, 合計 6 回実施し, Day 17 の最終抗原誘発後, Day 21 あるいは Day 31 に解剖し, 免疫学および病理学的な変化を調べた。皮膚炎の重症度は, 皮膚炎スコアを用いて評価した。皮膚炎スコアは, 発赤・出血, 痂皮形成・乾燥, 浮腫および擦傷・組織欠損の 4 項目について, それぞれ 0 (所見なし), 1 (軽度), 2 (中等度), 3 (重度) の 4 段階で評価し, その合計とした。Day 14 および Day 21 の 2 週連続で皮膚炎スコアが 3 以上に達したマウスについて, 慢性化した皮膚炎を発症していると判断した。皮膚炎スコアの各項目の重症度の基準は以下の通りである。

①発赤・出血

0 : 発赤および出血が認められない状態

1 : 局所的に発赤および出血が認められる状態

2 : 散在的に発赤および出血が認められるか, 局所的に連続的な擦傷に伴う出血が認められる状態

3 : 全体的に発赤および出血が認められるか, 広範囲に連続的な擦傷に伴う出血が認め

られる状態

②痂皮形成・乾燥

- 0：痂皮形成および乾燥が認められない状態
- 1：局所的に痂皮形成および乾燥が認められ、わずかに皮膚の白色化や角質の剥離が認められる状態
- 2：散在的に痂皮形成および乾燥が認められ、明らかに角質の剥離が認められる状態
- 3：全体的に痂皮形成および乾燥が認められ、明らかに角質の剥離が認められる状態

③浮腫

- 0：皮膚の肥厚が認められない状態
- 1：わずかに皮膚の肥厚が認められる状態
- 2：明らかな皮膚の肥厚および浮腫が認められる状態
- 3：明らかな皮膚の肥厚および浮腫が認められ、指で触れた時に硬さが感じられる状態

④擦傷・組織欠損

- 0：擦傷および組織欠損が認められない状態
- 1：局所的に擦傷が認められ、組織欠損は認められない状態
- 2：散在的に擦傷が認められるか、局所的に連続的な搔破行動に伴う擦傷が認められ、組織欠損は認められない状態
- 3：全体的に擦傷が認められるか、広範囲に連続的な搔破行動に伴う擦傷および組織欠損が認められる状態

2.4. 皮膚病理組織観察

背部皮膚を採取し、10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) に浸漬固定後、パラフィン包埋し、4 μm の厚さの切片を作製した。表皮肥厚の評価にはヘマトキシリン-エオジン (hematoxylin-eosin: HE) 染色標本を、組織中マスト細胞数の評価にはトルイジンブルー (toluidin blue: TB) 染色標本をそれぞれ用いた。

2.5. 血清総 IgE およびダニ抗原特異的 IgE 測定

エーテル麻酔下、心臓採血により血清を回収した。血清中の総 IgE 値はマウス IgE 測定キット (ヤマサ) を用いて測定した。また、Dfb 特異的 IgE は、雌性 Wister ラット (日本エスエルシー) をレシピエントとした受動皮膚アナフィラキシー反応 (passive cutaneous anaphylaxis reaction: PCA 反応) によって評価した。すなわち、ラットの剃毛した背部皮内に、血清の 2 倍段階希釈液 50 μL を注射し、24 時間後に Dfb 1 mg とエバンスブルー 5 mg とを溶解した生理食塩水 0.5 mL を静脈内注射し、30 分後の色素漏出反応を調べた。皮膚

内面の青色斑が直径 5 mm 以上の場合を陽性反応とし、最大の希釈倍数を IgE 抗体力価とした。

2.6. 搔破行動

マウスを 4 つに仕切った観察用アクリルケージ (幅 × 奥行き × 高さ: 12 × 21 × 50 cm) に 1 匹ずつ入れ、無人環境下、赤外線ランプを付けたビデオカメラを用いてマウスの行動を夜間 (18:00-02:00) 撮影し、ハードディスクレコーダーに記録した。後日録画を再生し、引っ掻き回数を計数した。引っ掻き回数は、一連の引っ掻き行動 (後肢を上げて皮膚炎誘発部位である左右耳介および背部皮膚を何度か引っ掻き、その後肢を下ろすまでの行動) を 1 回として数えた。

2.7. 免疫組織化学染色

正常または皮膚炎を発症した (Day 21) NC/Nga マウスの背部皮膚を摘出し、O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan) で包埋後凍結し、クライオトームを用いて厚さ 5 μ m の切片を作製した。組織切片は、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングのために 0.3% 過酸化水素加メタノールで 15 分間処理した後、非特異性ブロッキング試薬で 10 分間処理した。一次抗体として、ウサギポリクローナル抗 protein gene product (PGP9.5) 抗体 (Biogenesis Ltd; 1:1000) を添加し、4°C で 1 晩反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識二次抗体で反応させた後、DAB 基質を添加し発色させた。その後ヘマトキシリンにより対比染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

2.8. 爪切除

Day 21 以降、慢性化した皮膚炎を発症したマウスの後肢の爪の先端を、週に 2 回、はさみを用いて切除し、爪やすりで整えた。

2.9. 統計学的解析

結果は平均 \pm 標準誤差 (S.E.) で示し、二群間の有意差検定には Welch's *t*-test を、多群間には Dunnett's test あるいは Tukey-Kramer test を用いた。皮膚炎スコアは、反復測定分散分析法を用いて検定した。いずれの検定においても $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

3.1. 各系統マウスにおける皮膚炎スコアの変化

ICR, C57BL/6 および BALB/c マウスを用いて, Dfb 軟膏を繰り返し塗布することによりアトピー性皮膚炎様の病変が惹起されるかどうかを NC/Nga マウスと比較して評価した. NC/Nga マウスにおいて, 初回誘発から 2 週間後には明らかな皮膚病変が認められ, その変化は抗原誘発を中止しても Day 31 まで維持されていた (Figure 1). 臨床所見としては, NC/Nga マウスにおいて, 紅斑, 出血, 丘疹, 鱗屑, 痂皮, 苔癬化等が認められた. 一方, 他の系統のマウスにおいては明らかな皮膚症状は認められなかった (Figure 2). データは示さなかったが, 皮膚バリア破壊後に軟膏基剤を塗布したコントロール群においては, いずれの系統のマウスにおいても皮膚炎は惹起されなかった.

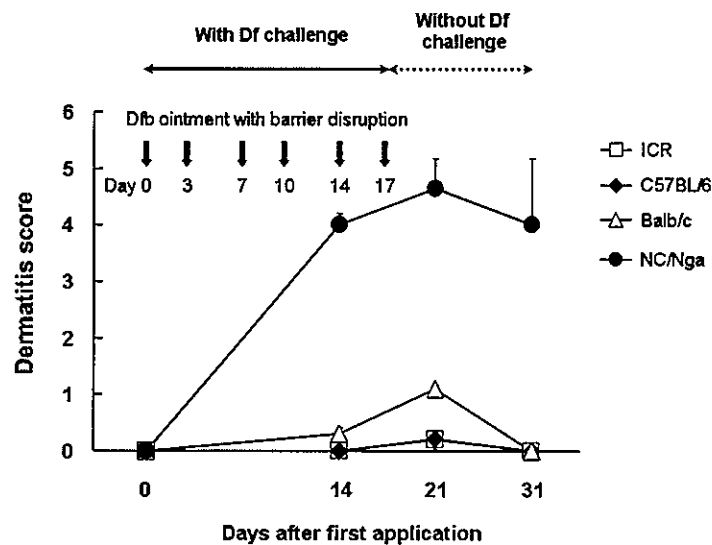


Figure 1. Development of atopic dermatitis-like skin lesions after Dfb application in ICR (open rectangles), C57BL/6 (closed diamonds), BALB/c (open triangles), and NC/Nga (closed circles) mice [29].

Elicitation was performed by the topical application of 100 mg Dfb ointment on the shaved dorsal skin and the surface of both ears on Day 0, 3, 7, 10, 14, and 17. Barrier disruption was achieved by 150 μ L of 4% sodium dodecyl sulfate treatment on the shaved dorsal skin and the surface of both ears 3 h before Dfb ointment application on Day 3, 7, 10, 14, and 17. Dermatitis scores were assessed on Day 14, 21, and 31. Data represent means \pm S.E. of 8-10 mice.

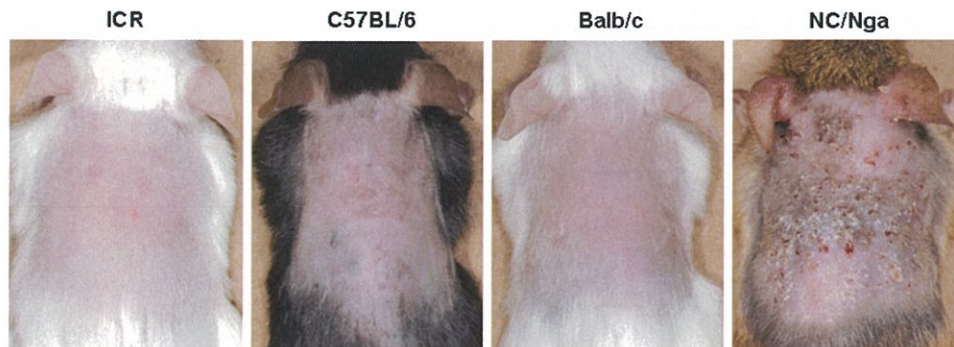


Figure 2. Skin features of each mouse strain on Day21 [29].

3.2. 病理組織学的所見

Day 21 および Day 31 における各系統マウスの背部皮膚の病理組織学的変化を調べた。HE および TB で染色した病理標本を観察した結果、Day 21 の NC/Nga マウスの病変部位において、顕著な真皮および表皮の肥厚、表皮突起の形成、過角化および錯角化が認められ、真皮中にはマスト細胞を含む炎症性細胞が多数浸潤していた (Figure 3a, b)。また、これらの病理変化は、Day 31 においても同様に認められた。一方、他の系統では、Day 21 において、軽度の表皮の肥厚およびマスト細胞を含む炎症性細胞浸潤が認められたが (Figure 3a, b)、Day 31 にはほぼ正常状態であった (データは示さず)。皮膚バリア破壊後に軟膏基剤を塗布したコントロール群においては、いずれの系統のマウスにおいても病理組織像の変化は認められなかった (データは示さず)。

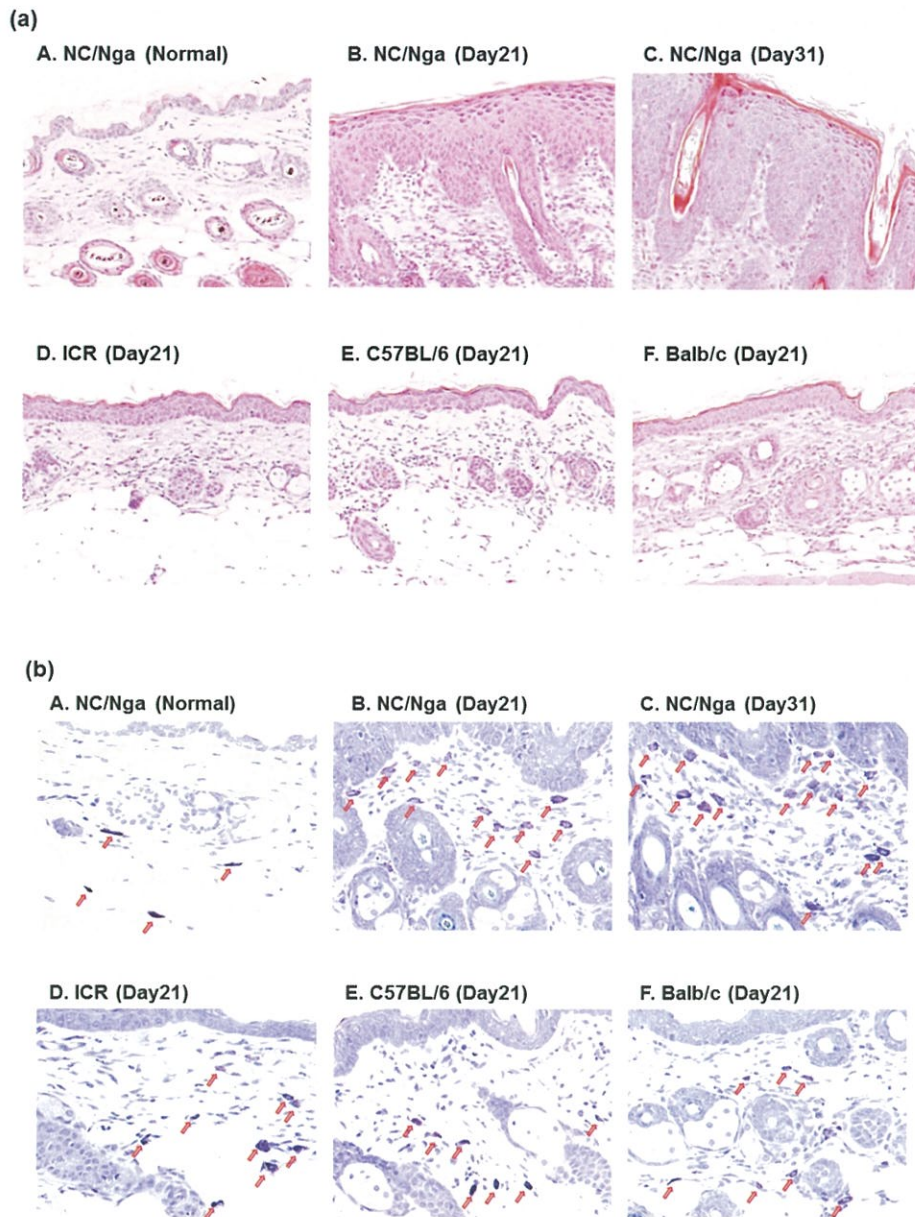


Figure 3. Histological changes of the dorsal skin after Dfb application in ICR, C57BL/6, BALB/c, and NC/Nga mice [29].

The dorsal skin of normal NC/Nga mice (A), Dfb ointment with barrier disruption-treated mice from each strain on Day 21 (B, D-F), Dfb ointment with barrier disruption-treated NC/Nga mice on Day 31 (C) were stained with hematoxylin-eosin (a) and toluidine blue (red arrows: mast cells) (b). Original magnifications: $\times 100$ for (a) and $\times 200$ for (b).

3.3. 血清総 IgE およびダニ抗原特異的 IgE

Day 21 および Day 31 における各系統マウスの血清中総 IgE 量およびダニ抗原に対する特異的 IgE 抗体価を測定した。その結果, Day 21 において, いずれの系統のマウスにおいても正常マウスおよびコントロール群と比較して, Dfb 軟膏塗布群において有意な総 IgE 値の上昇およびダニ抗原特異的 IgE 抗体価の上昇が認められた。NC/Nga マウスにおいては, Day 31 まで血中 IgE の高い状態が維持されたが, その他の系統においては, Day 31 には明らかに低下していた (Figure 4a, b)。

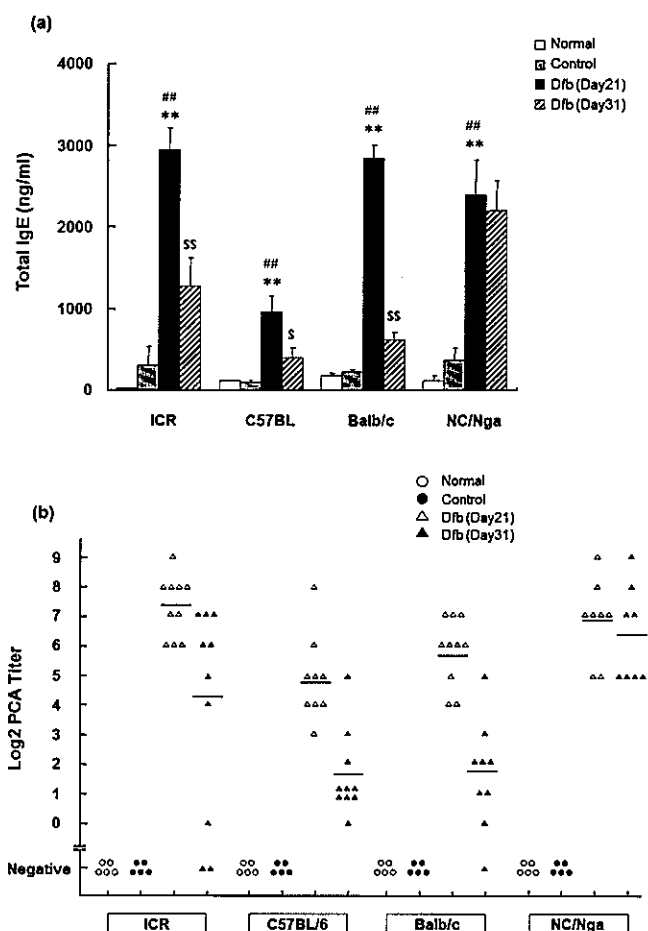


Figure 4. Serum levels of total IgE (a) and specific IgE to Dfb (b) in normal, ointment base with barrier disruption-treated (Control), and Dfb ointment with barrier disruption-treated (Dfb) ICR, C57BL/6, BALB/c, and NC/Nga mice on Day 21 and 31 [29].

Total IgE data represent means \pm S.E. of 5-10 mice. ** $p < 0.01$ compared with the normal group, ## $p < 0.01$ compared with the control group, \$ $p < 0.05$ and \$\$ $p < 0.01$ compared with the Dfb group on Day 21 (Tukey–Kramer test).

3.4. NC/Nga マウスにおける搔破回数および皮膚炎スコアの推移

NC/Nga マウスにおいて、ダニ抗原軟膏を繰り返し塗布した際の搔破回数の変化を調べた。その結果、ダニ抗原を塗布していない正常マウス (Day 0) の搔破回数と比較して、Day 6 において搔破回数の増加傾向が認められ、Day 9 以降有意な増加が認められた (Figure 5a)。皮膚炎症状は、Day 7 において、わずかに乾燥が認められる程度であったが、その後は搔破回数の増加に伴い、顕著な増悪化が認められた (Figure 5b)。

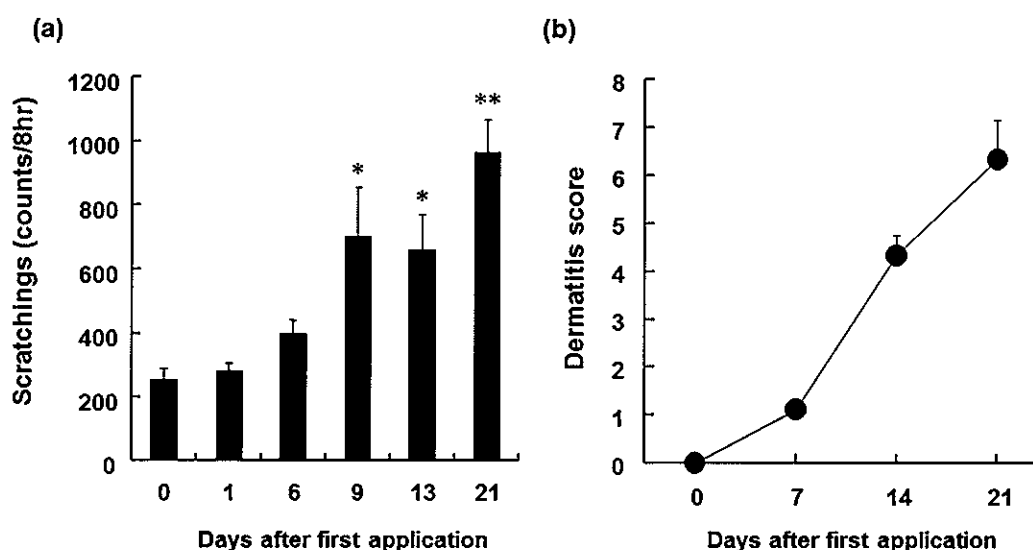


Figure 5. Time course of scratching behavioral counts (a) and dermatitis score (b) of NC/Nga mice [29].

Total scratching counts were measured for 8 h on Day 0, 1, 6, 9, 13, and 21. Dermatitis scores were assessed on Day 0, 7, 14, and 21. The following four parameters were assessed to score degree of dermatitis: 1) erythema/hemorrhage; 2) scarring/dryness; 3) edema, and; 4) excoriation/erosion. Each parameter was scored as either 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), or 3 (severe). The dermatitis score was calculated as the sum of the individual scores. Data represent means \pm S.E. of 7-10 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with Day 0 on each day (Dunnett's test).

3.5. 免疫組織化学染色

NC/Nga ダニ抗原誘発皮膚炎モデルの皮膚病変部における神経線維の分布を明らかにするために、主に神経に発現しているユビキチンカルボキシル末端加水分解酵素である PGP9.5 [30] に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。正常マウスの皮膚では PGP9.5 陽性神経線維は、真皮内に認められ、表皮中にはほとんど存在しなかった。一方、皮膚炎を発症したマウス (Day 21) の皮膚では、真皮、特に真皮上部における PGP9.5 陽性神経線維の明らかな増加および表皮内への神経伸展が認められた (Figure 6)。

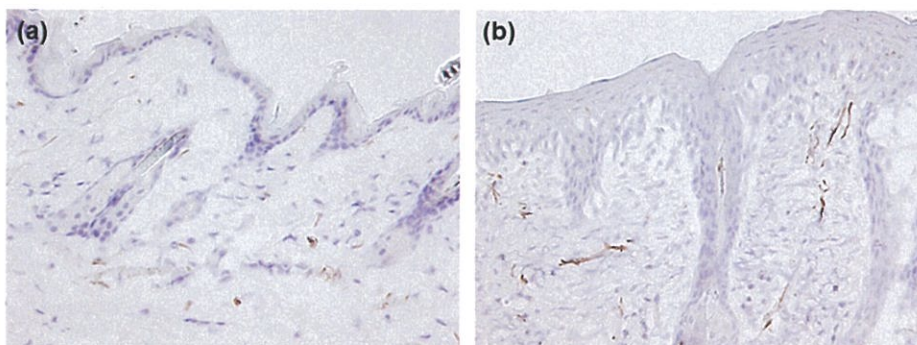


Figure 6. Immunohistochemical staining of PGP9.5 in the skin [29].

In normal NC/Nga mice, some of PGP9.5-positive nerve fibers (brown) were observed in the dermis, and few were located in the epidermis (a). Meanwhile, the nerve fibers were clearly increased in the dermis and sprouted into the epidermis in the established skin lesions of NC/Nga mice on Day 21 (b). Original magnification: $\times 200$.

3.6. 爪切除による皮膚炎への影響

抗原誘発を止めても持続する皮膚炎症状に、搔破行動が関与しているかどうかを検討する目的で、Day 21 の時点で慢性化した皮膚炎を発症した NC/Nga マウスの後肢の爪を切除し、搔破行動による影響を阻害した。爪を切るとすぐに皮膚炎スコアの低下が認められ、Day 31 まで下がり続けた (Figure 7a)。病理組織像を観察すると、爪切除の処置をしていないマウスと比較して、表皮の肥厚や真皮への炎症性細胞浸潤が明らかに改善した (Figure 7b)。また、Day 31 の血清中 IgE を測定したところ、爪切除によって爪切除の処置をしていないマウスと比較して、有意に低かった (Figure 7c)。

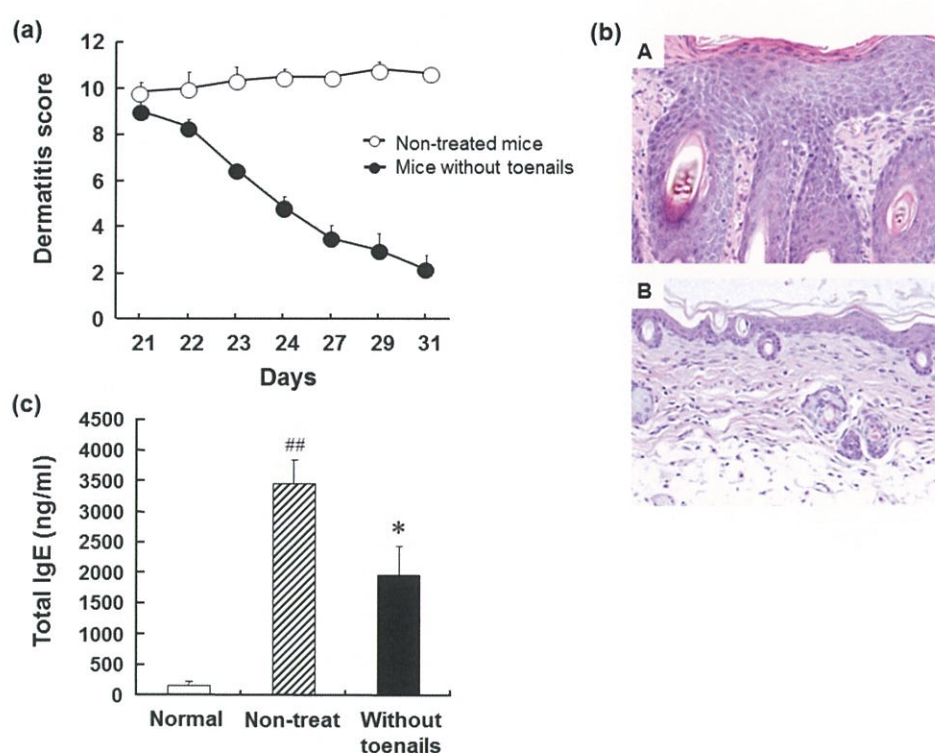


Figure 7. Effect of tipping of toenails on established dermatitis in NC/Nga mice [29].

The hind toenails of mice were trimmed on Days 21, 24, and 28 without further antigen application. (a) Time course changes in dermatitis score of mice without toenails and non-treated mice. Dermatitis scores were assessed on Days 21, 22, 23, 24, 27, 29, and 31. (b) Histological changes of the dorsal skin on Day 31. The dorsal skin of non-treated mice (A) and mice without toenails (B) was stained with hematoxylin-eosin. Original magnification: $\times 400$. (c) Serum levels of total IgE in normal mice, non-treated mice, and mice without toenails on Day 31. Data represent means \pm S.E. of 6 mice. ^{##} $p < 0.01$ compared with the normal group (Welch's t -test). ^{*} $p < 0.05$ compared with the non-treated group (Welch's t -test).

4. 考察

塩野義製薬株式会社において、アトピー性皮膚炎の病態モデルとして、NC/Nga マウスにダニ抗原 (Dfb) 軟膏を繰り返し塗布することにより、アトピー性皮膚炎と類似した皮膚炎を発症するモデルが構築されている [28]。本研究では、NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルに関して、詳細な解析を実施した。最初に、本モデルの作製に使用するマウスの系統について検討した。NC/Nga マウス以外の系統でも同様の皮膚炎を発症するか確認するために、ICR, C57BL/6 および BALB/c マウスを用いて、ダニ抗原軟膏を繰り返し塗布した。その結果、いずれの系統のマウスにおいても、血中総 IgE 値の有意な増加およびダニ抗原特異的 IgE の上昇が認められ、特に BALB/c および ICR マウスでは、NC/Nga マウスと同レベルまで上昇していた。このように、Th2 型の免疫応答が起こっていると考えられるにもかかわらず、皮膚炎スコアの上昇や明らかな皮膚病理像の変化は認められなかった。NC/Nga マウスでは、BALB/c マウスと比較して、IL-12R β 鎖の発現不全によって interferon- γ (IFN- γ) が産生されにくいことが報告されており [31]、他系統のマウスよりも強い Th2 偏向性の免疫異常が生じていると考えられる。また、皮膚の水分保持やバリア機能に重要な役割を果たしているセラミドの合成酵素であるスフィンゴミエリナーゼの活性が低く、皮膚バリア機能が障害されやすいことも知られている [32]。これらのことから、NC/Nga マウスでは、ヒトのアトピー性皮膚炎の病態と同様に、環境 (抗原)、免疫応答、バリア機能などの要因が複雑に絡み合っており、皮膚炎を発症すると考えられる。NC/Nga マウス以外の系統において、さらにダニ抗原の塗布回数・期間など、皮膚炎の惹起条件について検討する必要があるが、少なくとも本研究の条件では、ダニ抗原誘発皮膚炎モデルを作製するために使用するマウスの系統として、NC/Nga マウスが適していることが明らかになった。

次に、NC/Nga マウスにおけるダニ抗原誘発皮膚炎モデルに対して搔破行動が与える影響について検討した。本モデルにおいて、明らかな臨床所見が現れるのは Day 14 以降であるが、搔破回数はそれより前から有意に増加しており、搔破行動の増加に伴い、発赤、出血、浮腫、乾燥、表皮剥離や糜爛といった症状が観察されるようになった。さらに、皮膚炎が慢性化しているマウス、すなわち Day 14 から 21 まで明らかな皮膚炎症状 (皮膚炎スコアが 3 以上) が認められたマウスでは、抗原曝露を中止しても 10 日間以上皮膚炎が持続するが、後肢の爪を切除したところ、劇的に皮膚炎症状が改善した。これらの結果から、本モデルにおいて、皮膚炎の発症および慢性化状態の維持に、搔破行動が密接に関与していることが示唆された。Hashimoto ら [33] は、SPF 環境下、皮膚炎を発症した NC/Nga マウスとの同居飼育による自然発症モデルにおいて、後肢の爪を切除すると皮膚炎が発症しないことを示している。その他の NC/Nga マウスを用いた皮膚炎モデルにおける検討からも [34, 35]、皮膚炎の惹起方法に依存せず、皮膚炎の発症には搔破行動が非

常に重要な役割を果たしていると考えられる。このことを確かめるために、今後本モデルの皮膚炎発症過程における爪切除の影響を検討する必要がある。また興味深いことに、NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおいて、抗原曝露を中止しても、皮膚炎スコアと同様に、血中 IgE 値の高い状態が維持されるが、後肢の爪を切除すると、血中 IgE 値が有意に低下した。一方、ICR, C57BL/6 および BALB/c マウスにおいては抗原曝露を中止すると、血中 IgE 値は維持されることなく低下した。BALB/c マウスの表皮角化細胞株である PAM212 の可溶性画分を同系マウスの皮下に投与すると、外来抗原がなくても IgE 産生を増強すること、*in vitro* で PAM212 の可溶性画分を BALB/c マウスの脾細胞培養系に添加すると IgE 産生増強および IgE へのクラススイッチの引き金となる ϵ -germline transcription を誘導することが報告されている [36, 37]。これらの報告から、搔破によって表皮に物理的刺激が入ると、角化細胞から何らかの因子が産生され、その因子が抗原刺激のない状況においても、血中 IgE 値の高い状態を維持させている可能性が考えられる。以上より、搔破行動は慢性皮膚炎の維持だけではなく、IgE 産生の維持にも関与していることが示唆された。

続いて、アトピー性皮膚炎患者の皮膚病理像では一次感覚神経の表皮内への伸展が認められ、外部刺激に対して痒みを感じやすい状態になっていることが知られていることから [38, 39]、NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおいて、皮膚病変部の神経線維の分布を確認した。その結果、正常皮膚と比較して、PGP9.5 陽性神経線維が真皮上部と表皮内に増えており、持続的な搔破行動により、神経伸長が誘導されていると考えられた。本研究において、ICR, C57BL/6 および BALB/c マウスでは、ダニ抗原誘発によって皮膚炎を発症しなかったが、これらの系統では痒みが誘発されておらず、神経伸展も生じていない可能性があるため、今後さらに NC/Nga マウス以外の系統における搔破行動や神経伸展について検討する必要がある。

痒みは、アトピー性皮膚炎の主要な症状の 1 つであり、睡眠障害や集中力の低下を引き起こし、患者およびその家族にとって大きなストレスとなる [39]。アトピー性皮膚炎の痒みに対して抗ヒスタミン薬が処方されるが、奏効しない場合が多い。データには示していないが、NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルの搔破行動に対して抗ヒスタミン薬は明確な抑制効果を示さなかった。本モデルは、アトピー性皮膚炎の痒みのメカニズム解明および抗そう痒薬の評価も可能であることが示唆される。

以上より、NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおいて、皮膚炎の発症および慢性皮膚炎の維持に搔破行動が密接に関与しており、アトピー性皮膚炎患者同様、Itch-scratch cycle 様の現象が生じていることが示唆された。本モデルは、ヒトのアトピー性皮膚炎の病態との類似点が多く、アトピー性皮膚炎の病態解明や治療薬の開発に有用であると考えられる。

第2章 CB₂受容体選択的作動薬である S-777469 のマウス皮膚炎症に及ぼす影響

1. 緒言

カンナビノイドは、中枢神経系や免疫系などにおいて幅広い薬理作用を有しており、カンナビノイド系を標的とした薬剤は様々な病態に対して治療効果を発揮することが期待されている [40–42]。実際、古来より、カンナビノイドを活性成分として含む大麻が、鎮痛や食欲増進等の目的で使用されてきた。しかし、幻覚や記憶障害などの中枢性副作用や依存性リスクから、現在では一部の国や地域を除き、大麻の医療目的での使用は禁止されている。

カンナビノイドの受容体には主に CB₁受容体と CB₂受容体が存在し、いずれも 7 回膜貫通型の Gi/Go タンパク質共役型受容体である。CB₁受容体は中枢神経系に多く発現しており、記憶、運動および疼痛感覚などの脳高次機能を調節していると考えられている [15]。一方、CB₂受容体は主に末梢の免疫系臓器 (脾臓、扁桃腺、胸腺) および細胞 (B リンパ球、ナチュラルキラー細胞、単球・マクロファージ) に発現しており、免疫機能の調節に関与することが示唆されている [43]。実際、マウスにおいて、CB₂受容体選択的作動薬である HU-308 がアラキドン酸誘発耳介炎症を抑制することや [19]、O-3223 が LPS 誘発の急性炎症を抑制することなど [20]、CB₂受容体選択的作動薬が抗炎症作用を有することを示唆する報告が出されている [18, 21]。

カンナビノイド受容体への内因性リガンドとして、AEA および 2-AG が存在するが、Sugiura ら [44–46] によって、AEA は CB₁受容体に対して部分作動薬として作用するが、CB₂受容体にはほとんど作用しないこと、2-AG は CB₁および CB₂受容体に対して完全作動薬として作用することなどが示され、2-AG が真の内因性リガンドであると考えられている。2-AG は CB₂受容体を介して、ヒト好酸球性細胞株 EoL-1 細胞、マクロファージ様に分化させた HL-60 細胞、ヒト末梢血単核球、マウス脾臓細胞やマイクログリアといった細胞の遊走を引き起こすことが報告されている [47–50]。さらに *in vivo* では、2-AG および CB₂受容体がマウスのハプテン誘発接触皮膚炎モデルや 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 誘発の急性炎症に関与していること [51–53]、2-AG をマウスの耳介に投与すると炎症を惹起すること [54] などが報告されており、2-AG/CB₂受容体は皮膚の炎症反応において重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究では、塩野義製薬株式会社で合成された CB₂受容体選択的作動薬である S-777469 [23] の抗炎症効果を、マウスにおけるハプテン誘発耳介炎症モデルおよび第 1 章でアトピー性皮膚炎モデルとしての有用性を明らかにした NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚

炎モデルを用いて検討した。また、そのメカニズムを解明する目的で、S-777469 が 2-AG
によって誘導される EoL-1 および HL-60 細胞の遊走に及ぼす影響を調べた。

2. 実験材料および方法

2.1. 実験動物

雌性 BALB/c および NC/Nga マウスは日本チャールス・リバーより購入した。動物は、室温：20-26°C，湿度：30-70%，照明時間：明暗各 12 時間に設定した動物飼育室内で飼育した。固形飼料および飲水は自由摂取させた。動物実験計画は、塩野義動物実験適正運用委員会の審査を受けて承認された。

2.2. 薬物および試薬

使用した薬物および試薬は、以下の通りである。S-777469 (塩野義製薬)，1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene: DNFB) (ナカライテスク)，プレドニゾロン，アセトン (Sigma-Aldrich)，オリーブオイル，メチルセルロース (methylcellulose: MC)，酪酸ナトリウム (sodium n-butyrate) (和光純薬工業)，親水ワセリン (丸石製薬)，2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) (Cayman Chemical)。

2.3. DNFB 誘発耳介炎症モデル

予め毛刈りをした BALB/c マウスの腹部に 2 日間連続して 0.5% DNFB を 30 μ L 塗布することによって感作し (Day 0 および Day 1)，最初の感作から 6 日後および 8 日後に 0.3% DNFB を片側 10 μ L ずつ両耳介に塗布して炎症反応を惹起した。DNFB は、アセトンとオリーブオイルを 4:1 で混和した溶媒に溶かした。陰性対照群には、アセトン/オリーブオイル (4:1) を塗布した。S-777469 およびプレドニゾロンは 0.5% MC に懸濁して、最初の反応惹起日 (Day 6) から 1 日 1 回 4 日間、反復経口投与した。媒体 (Vehicle) 投与群には、0.5% MC を経口投与した。反応惹起日 (Day 6 および Day 8) には、薬物は DNFB 塗布後 30 分以内に投与した。耳介炎症の程度は耳介の厚さで評価した。耳介の厚さは、シクネスゲージ (SM-112; Teclock) を用いて測定し、左右の耳介の厚さの平均をその個体の耳介厚とした。耳介厚は Day 6 から Day 10 まで毎日測定し、反応惹起日は DNFB を塗布する直前に測定した。

2.4. ダニ抗原誘発皮膚炎モデル

誘発初日 (Day 0) にマウスの吻側背部をバリカンで刈り、除毛クリームを用いて短い毛を丁寧に取り除いた。毛を刈った部位および耳介の表裏に Dfb 軟膏 100 mg を塗布した。Day 3, 7, 10, 14, 17 に、生えた毛をバリカンおよび電気シェーバーを用いて刈り、4% SDS を 150 μ L 塗布することにより皮膚のバリアを破壊し、その約 3 時間後に Dfb 軟膏 100 mg を毛刈りした部位および耳介の表裏に塗布した。皮膚炎の重症度は、皮膚炎スコアを用

いて評価した。皮膚炎スコアは、発赤・出血、痂皮形成・乾燥、浮腫および擦傷・組織欠損の4項目について、それぞれ0(所見なし), 1(軽度), 2(中等度), 3(重度)の4段階で評価し、その合計とした。薬効評価には、皮膚炎が慢性化した個体として、Day 14でスコアが3以上かつDay 21でスコアが5-10に達した個体(全体の約半数)を使用した。S-777469は、Day 21に1回投与後、Day 22からDay 33まで1日2回経口投与した。プレドニゾロンは、Day 21からDay 31まで1日1回経口投与した。マウスはDay 34に解剖して皮膚病変部を採取し、病理組織学的評価を実施した。

S-777469の真皮内への好酸球浸潤に対する影響を調べる目的で、Day 21に再度、Dfb軟膏による誘発を行った。S-777469は、Dfb軟膏塗布の直前および16時間後の2回経口投与した。Control群はDay 21の抗原誘発前に解剖、0.5% MCを投与したVehicle投与群およびS-777469投与群はDay 22の抗原誘発24時間後に解剖した。

2.5. 皮膚病理組織観察

背部皮膚を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業)に浸漬固定後、パラフィン包埋し、4 μm の厚さの切片を作製した。表皮肥厚の評価にはヘマトキシリン-エオジン(HE)染色標本を、組織中マスト細胞数の評価にはトルイジンブルー(TB)染色標本を、好酸球数の評価にはダイレクト・ファースト・スカーレット(direct fast scarlet: DFS)染色をそれぞれ用いた。

表皮の厚さは、光学顕微鏡に接続したカメラ(DXM1200; Nikon)を介して組織画像を取り込み、解析ソフト(Image-Pro Plus; Media Cybernetics)を用いて測定した。毛包を避けて、無作為に5か所測定し、その平均を表皮の厚さとした。マスト細胞および好酸球の評価は、表皮から脂肪層まで1 mm幅内に存在する細胞の数を、無作為に3か所数え、その平均を測定値とした。

2.6. 2-AGによるEoL-1およびHL-60細胞の遊走

EoL-1およびHL-60細胞の走化性を、24ウェル培養プレートとケモタキセル(ポアサイズ5 μm ; クラボウ)を用いて検討した。EoL-1細胞は、0.5 mM 酪酸ナトリウムと5日間培養(37°C, 5%炭酸ガス)することにより好酸球様に分化させ、HL-60細胞は、100 nM 1, 25-(OH)₂ vitamin D₃と6日間培養(37°C, 5%炭酸ガス)することによって単球様に分化させた[55, 56]。分化したEoL-1およびHL-60細胞は、あらかじめ温めておいたCTバッファー(0.5% fetal bovine serum および 10 mM HEPES を含む RPMI 1640 培地)で3回洗浄し、CTバッファー 200 μL にそれぞれ 4×10^5 個、 2.5×10^6 個を懸濁し、ケモタキセル内に播種した(upper well)。2-AG, S-777469あるいはジメチルスルホキシド(dimethyl

sulfoxide: DMSO) は、CTバッファー 600 μ L に混ぜて、培養プレートの各ウェルに添加した (lower well). 4 時間培養 (37°C, 5% 炭酸ガス) 後に、upper well から lower well に遊走してきた細胞数を、粒子分析装置 (CDA-500; Sysmex) を用いて計測し、遊走の指標とした。

2.7. 皮膚からの 2-AG 抽出

直径 8 mm のバイオプシーパンチ (生検トレパン; カイ インダストリーズ) を用いてマウスの背部皮膚をくり抜き、重量測定後、ただちに液体窒素で凍結した。皮膚サンプルは、あらかじめ冷やした生理食塩水 (サンプル重量の 9 倍量 [μ L]) に入れて、組織破碎装置 (TissueLyser; Qiagen) を用いて、ホモジナイズ (25 Hz, 5 分間) した。ホモジネート 50 μ L にアセトニトリル/メタノール (1:1) 混液を 200 μ L 加え、ボルテックスにより 5 分間混和した。遠心 (25°C, 12,000 rpm, 5 分間) 後、上清を回収し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS) のための測定用サンプルとした。

2.8. LC-MS/MS による 2-AG の測定

2-AG の LC-MS/MS による測定において、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) は Prominence システム (島津製作所), MS は API 5000 トリプル四重極型質量分析装置 (MDS-Sciex) を用いた。2-AG 測定の内部標準物質として 2-AG- d_8 を用い、いずれも多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring: MRM) にて検出を行った。HPLC 条件および MS 条件は以下に示す。

HPLC 条件

注入量	: 10 μ L
分析カラム	: Cadenza CD-C18 (3 mm I.D. \times 50 mm, 5 μ m, Imtakt)
移動相	: アセトニトリル/水/ギ酸混液 (500 : 500 : 1)
流量	: 0.5 mL/min
分析カラム恒温槽設定温度	: 60°C
分析時間	: 約 14 分
オートサンプラー内設定温度	: 10°C
オートサンプラー洗浄液	: メタノール

MS 条件

Detection mode : electrospray ionization (ESI), positive
Declustering Potential : 91 V
Collision Energy : 19 eV
MRM : 2-AG ; m/z 379.2 > 287.0
: 2-AG-*d*₈ ; m/z 387.2 > 294.2

2.9. 統計学的解析

結果は平均 ± 標準誤差 (S.E.) あるいは平均 ± 標準偏差 (S.D.) で示した。二群間の有意差検定には Welch's *t*-test を、多群間には Dunnett's test あるいは Tukey test を用いた。皮膚炎スコアは、反復測定分散分析法を用いて検定した。いずれの検定においても $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

3.1. S-777469 の DNFB 誘発耳介炎症モデルに対する効果

BALB/c マウスを用い、ハプテンである DNFB を感作 (Day 0 および Day 1) ならびに誘発 (Day 6 および Day 8) することによって惹起される耳介炎症に及ぼす S-777469 (1, 3 および 10 mg/kg) の効果を検討した. 対照物質としては, 副腎皮質ステロイドであるプレドニゾロン (1 mg/kg) を用いた. Figure 8 に示すように, 初回誘発後, 陰性対照群と比較して Vehicle (0.5% MC) 投与群において, 顕著な耳介の肥厚が認められた. S-777469 (3 および 10 mg/kg, 1 日 1 回投与) は, 投与開始の翌日から耳介の肥厚を有意に抑制し, 実験終了日まで抑制し続けた. また, その効果はプレドニゾロン (1 mg/kg, 1 日 1 回投与) と比較して同等以上であった.

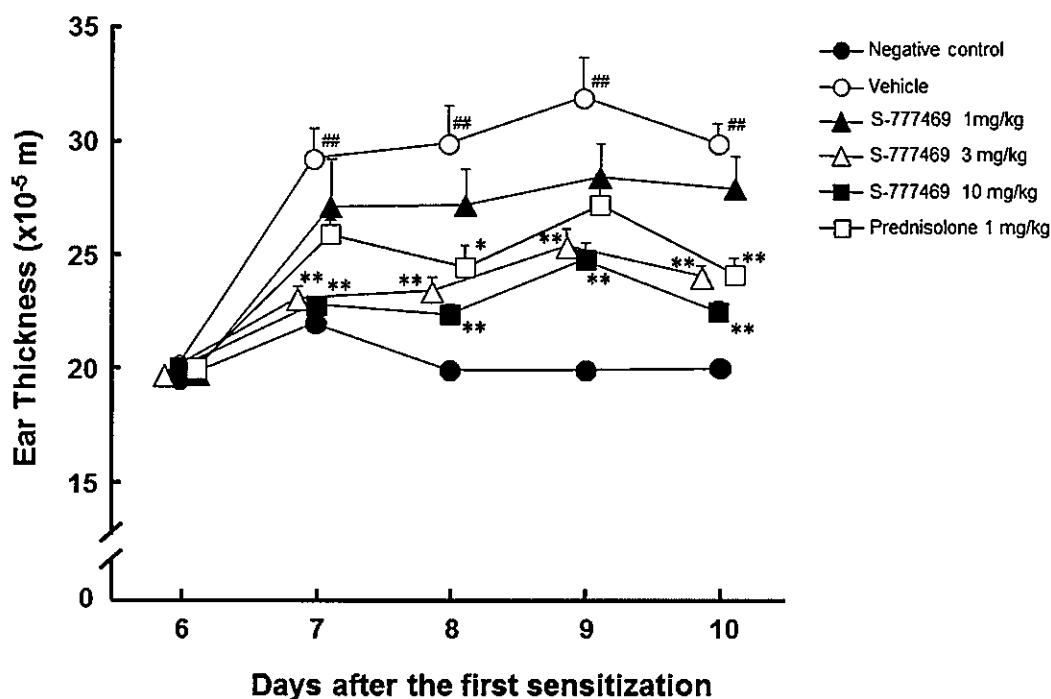


Figure 8. Effect of S-777469 on DNFB-induced ear swelling [57].

Mice were sensitized on days 0 and 1 by painting 30 μ L of 0.5% DNFB onto the shaved abdomen. On days 6 and 8, the mice were challenged by applying 10 μ L of 0.3% DNFB onto both surfaces of the right and left ears. The negative control mice were treated with acetone/olive oil (4:1). S-777469, prednisolone, and the vehicle (0.5% MC) were orally administered once daily from day 6 to day 9 ($n = 7$). Data are presented as the mean \pm S.E. ^{##} $p < 0.01$ vs. negative control, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ vs. vehicle (Tukey test).

3.2. S-777469 のダニ抗原誘発皮膚炎モデルに対する効果

NC/Nga マウスの背部に週 2 回、計 6 回、ダニ抗原を繰り返し塗布することによって誘発した慢性皮膚炎に対する S-777469 (10 および 30 mg/kg) の効果を、1 日 2 回 13 日間、経口投与して検討した。対照物質として、プレドニゾロン (5 mg/kg, 1 日 1 回投与) を用いた。皮膚炎スコアの変化を経時的に観察すると共に、実験最終日に背部皮膚を採取し、組織標本を作製して表皮肥厚および組織中マスト細胞数を計測し、薬物の効果を評価した。Figure 9 に示すように、Vehicle 投与群ではダニ抗原誘発を止めても、13 日間皮膚炎スコアが持続したが、S-777469 投与群では用量依存的に有意な皮膚炎スコアの低下が認められ、プレドニゾロン投与群においても、有意な皮膚炎スコアの低下が観察された。HE 染色像を観察すると、Figure 10 に示すように、Vehicle 投与群において明らかな表皮の肥厚および真皮内への炎症性細胞浸潤が認められた。S-777469 の投与によって、有意な表皮肥厚の抑制が認められ、その抑制率は、10 mg/kg : 34%, 30 mg/kg : 52%であった。一方、プレドニゾロンは明らかな効果を示さなかった (Figure 10a, c)。S-777469 は炎症性細胞の真皮内への浸潤を抑制しており (HE 染色)、マスト細胞数を評価すると、S-777469 投与群では、Vehicle 投与群に対して有意な抑制が認められ、その抑制率は、10 mg/kg : 25%, 30 mg/kg : 40%であった (TB 染色)。同様に、プレドニゾロンもマスト細胞数の有意な抑制効果を示し、その抑制率は 24%であった (Figure 10b, d)。

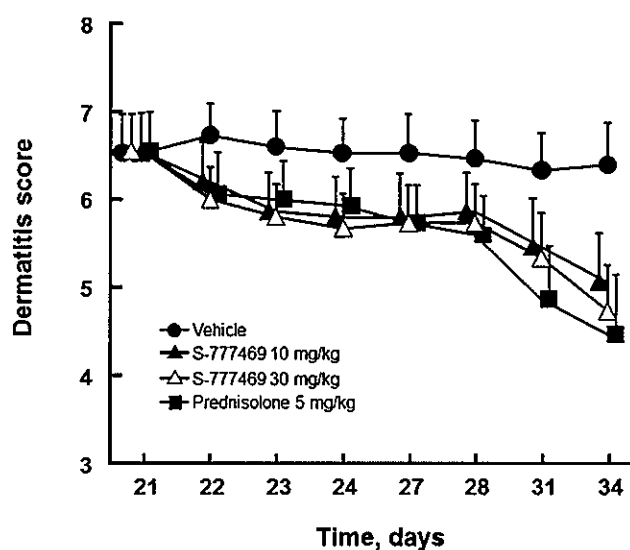


Figure 9. Effect of S-777469 on mite antigen-induced dermatitis in NC/Nga mice [57].

S-777469 and vehicle (0.5% MC) were administered twice daily, and prednisolone was administered once daily. The dermatitis score was evaluated on days 22, 23, 24, 27, 28, 31, and 34 (n = 15). Each value represents the mean \pm S.E. The statistical analyses were conducted using pairwise comparisons with the vehicle-treated group based on repeated ANOVA with a mixed-effects model. Multiple comparisons were conducted using Bonferroni's procedure.

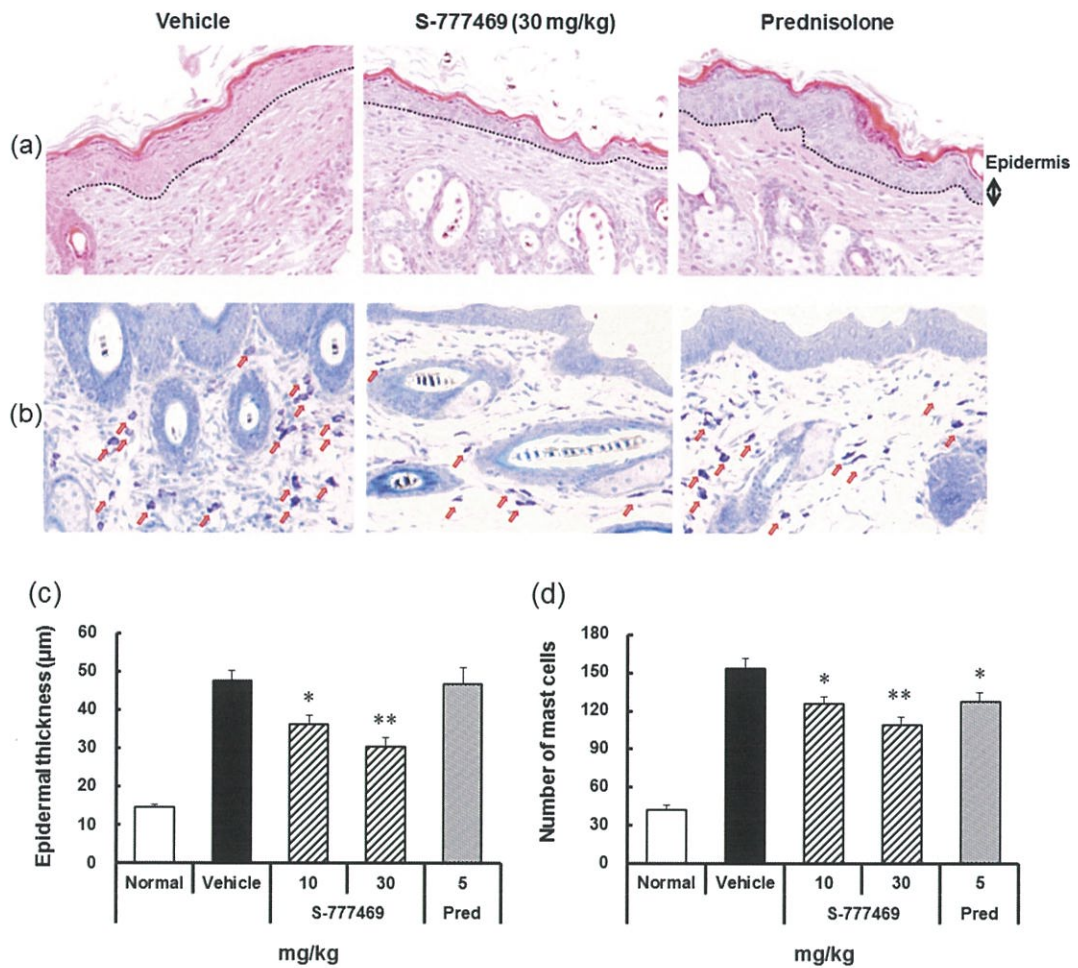


Figure 10. Effect of S-777469 on epidermal thickness and mast cell number in the dorsal skin of the mite antigen-induced dermatitis model [57].

S-777469 and vehicle (0.5% MC) were administered twice daily, and prednisolone was administered once daily. On day 13, histological changes in the dorsal skin samples stained with H&E (a) and toluidine blue (b), epidermal thickness (a, dotted line), and the number of mast cells (b, arrows) were evaluated (c, d). Mast cells in a 1 mm section from the epidermis to the panniculus adiposus were counted. Original magnification: $\times 200$ (a) and $\times 400$ (b). Each value represents the mean \pm S.E. of 10 mice in the normal group and 15 mice in the other groups.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle (Dunnett's test).

3.3. S-777469 のダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおける好酸球浸潤に対する効果

さらにダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおいて、皮内への好酸球浸潤に対する S-777469 の効果を調べた。本モデルにおいて、ダニ抗原誘発によって好酸球が皮内に一過性に浸潤することから、Day 21 に再度 Dfb 軟膏を塗布し、その 24 時間後に評価した。S-777469 (1 および 10 mg/kg) は抗原誘発の直前および 16 時間後の 2 回経口投与した。最終抗原誘発前の Control 群と比較して、Vehicle 投与群において皮内への好酸球浸潤が認められた。Control 群および Vehicle 投与群の好酸球数はそれぞれ、 32 ± 7.2 , 58 ± 7.5 cells/mm であった。S-777469 投与によって好酸球浸潤の抑制が認められ、その抑制率は、1 mg/kg : 29%, 10 mg/kg : 88%であり、10 mg/kg 投与群で有意であった (Figure 11)。

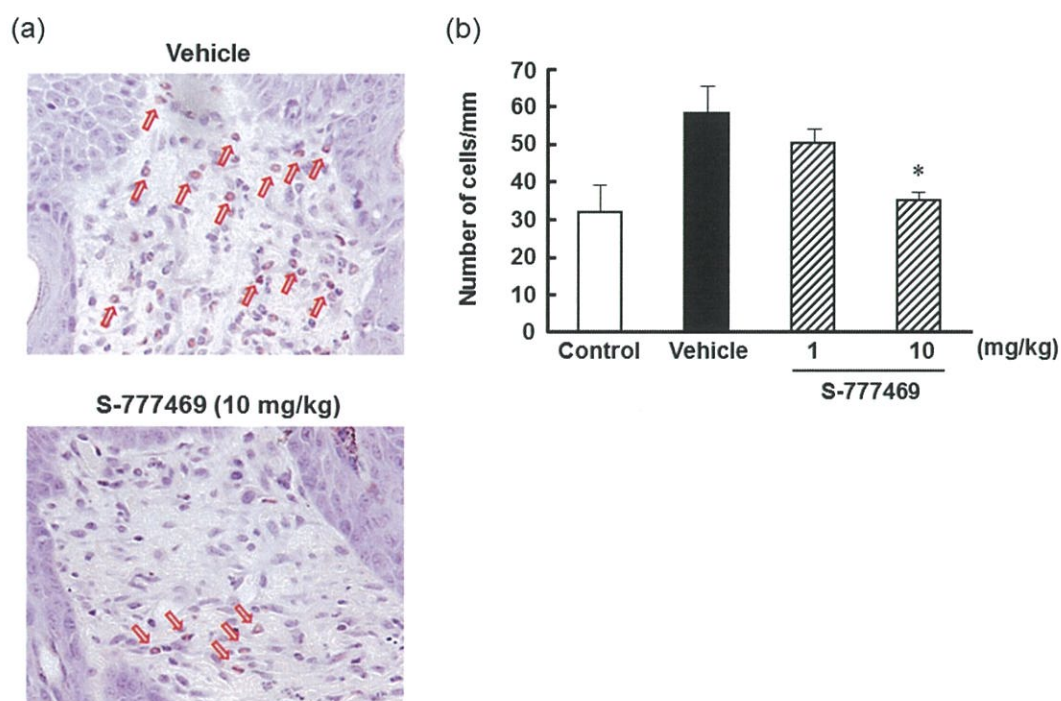


Figure 11. Effect of S-777469 on eosinophil infiltration in the mite antigen-induced dermatitis model [57].

S-777469 and vehicle (0.5% MC) were administered twice - immediately before and 16 hours after the last antigen challenge on day 21. Histological changes in dorsal skin samples stained with DFS (a) and the number of eosinophils (b) were evaluated 24 hours after the last antigen challenge. In the control group, eosinophils were counted prior to the last antigen challenge. The eosinophils in a 1 mm section from the epidermis to the panniculus adiposus were counted. Original magnification: $\times 400$. Each value represents the mean \pm S.E.

* $p < 0.05$ vs. vehicle (Dunnett's test).

3.4. ダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおける 2-AG 産生量

内因性 CB₂ 受容体リガンドである 2-AG の慢性炎症への関与を確認する目的で, ダニ抗原誘発皮膚炎モデルの皮膚病変部における 2-AG 量を測定した (Day 21). Figure 12 に示すように, LC-MS/MS で測定した結果, ダニ抗原誘発皮膚炎モデルの皮膚サンプル中 2-AG 量は, 正常マウスと比較して, 有意に増加していた.

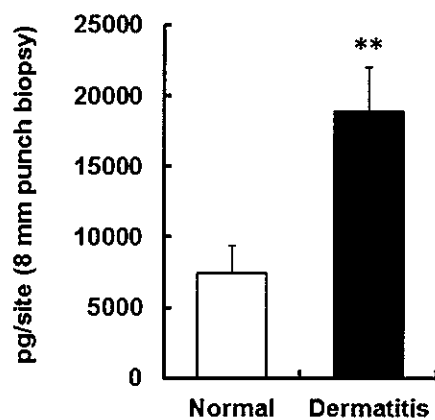


Figure 12. 2-AG level in the skin of the mite antigen-induced dermatitis model [57].

2-AG level in the skin of normal mice and the skin lesions of mice with dermatitis on day 21 were analyzed using LC-MS/MS analysis (n = 10 and 16). Each value represents the mean \pm S.D. ** $p < 0.01$ vs. normal (Welch's *t*-test).

3.5. S-777469 の 2-AG 誘導細胞遊走に対する効果

2-AG が CB_2 受容体を介してヒト好酸球性白血病細胞 EoL-1 の遊走を誘導することが報告されていることから [47], S-777469 が 2-AG によって誘導される EoL-1 遊走を阻害するかどうか検討した. 2-AG (0.5 μ M) は強力に EoL-1 細胞の遊走を誘導し, S-777469 はその遊走を濃度依存的に阻害した (Figure 13a). 阻害率は, S-777469 の濃度が 4, 20, 100 および 500 μ M において, それぞれ 16, 35, 58 および 88%であった (Figure 13a). 同様に, S-777469 は単球系に分化させた HL-60 細胞の遊走も濃度依存的に阻害した. その阻害率は, S-777469 の濃度が 12, 37, 111, 333 および 1,000 μ M において, それぞれ 19, 35, 57, 74 および 85%であった (Figure 13b). また, いずれの細胞においても, S-777469 単独では遊走を誘導しなかった (データは示さず).

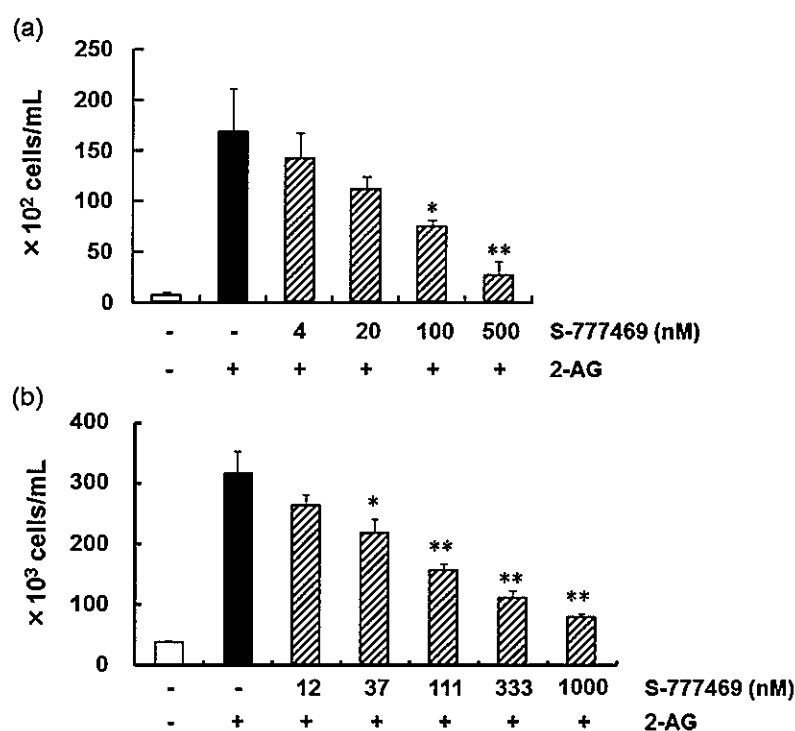


Figure 13. Effect of S-777469 on 2-AG-induced EoL-1 and HL-60 cell migration [57].

EoL-1 cells (4×10^5 cells) and HL-60 cells (2.5×10^6 cells) suspended in CT-buffer and 2-AG (0.5 μ M) were added to the lower and upper well, respectively. EoL-1 cells or HL-60 cells were treated with S-777469 or DMSO. Cells that migrated from the upper well to the lower well were counted. Each value represents the mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 2-AG-treated control (Dunnett's test).

4. 考察

塩野義製薬株式会社で見出された S-777469 は、CB₁ 受容体に比べ CB₂ 受容体に対する選択性が高く、向精神作用や依存性などの中枢性副作用の懸念が少ないと考えられる [23]. さらに S-777469 の CB₂ 受容体に対する選択性を確認するために、カンナビノイド受容体以外の各種受容体や炎症関連酵素に対する作用を検討したところ、データには示していないが、オピオイド、化学伝達物質、神経伝達物質ならびにケモカインなどの受容体 38 種、炎症反応に関連する酵素および神経伝達物質の代謝に関連する酵素を中心に 11 種に対して、S-777469 (10 μM) は明らかな阻害活性を示さなかった. 本研究では、CB₂ 受容体選択的作動薬である S-777469 の抗炎症効果について検討した.

カンナビノイドは、免疫細胞のアポトーシス誘導、細胞増殖抑制、サイトカイン(tumor necrosis factor- α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IFN- γ) 産生抑制ならびに制御性 T 細胞の誘導によって免疫抑制作用を示すことが知られており [58], これらの作用はカンナビノイド受容体の 1 つである CB₂ 受容体を介していると考えられている. また、CB₂ 受容体活性化によって、動物の炎症モデル、例えばアラキドン酸誘発耳介炎症モデル [19], カラゲニン誘発足浮腫モデル [18] や実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル [59] における炎症反応を抑制するといった報告がある. これらのことから、CB₂ 受容体は炎症の調節において、重要な役割を果たしていると考えられる. そこで、2 つのマウス皮膚炎症モデルを用いて、S-777469 の抗炎症効果について検討した. 最初に、皮膚の炎症モデルとして汎用されているハプテン (DNFB) 誘発耳介炎症に及ぼす S-777469 の影響を検討した. その結果、S-777469 は DNFB 誘発耳介肥厚を用量依存的に抑制し、対照であるプレドニゾロンも同様に有意な抑制効果を示した. このことから、S-777469 は非ステロイド性の抗炎症薬として皮膚炎症に明らかな抑制効果を示すことが明らかとなった. 続いて、第 1 章でアトピー性皮膚炎モデルとしての有用性を明らかにした NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルに対する S-777469 の影響を調べた. その結果、S-777469 は、投与期間中 (13 日間) 継続して皮膚炎スコアを抑制し、皮膚病変部の表皮の肥厚や炎症性細胞浸潤といった病理組織学的変化を改善した. 次に、S-777469 の抗炎症効果のメカニズムを明らかにするために、ダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおける内因性カンナビノイドの関与、ならびに内因性カンナビノイドによる反応およびダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおける好酸球浸潤に及ぼす S-777469 の影響を検討した. まず、ダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおける 2-AG の関与を確認するために、皮膚病変部位に存在する 2-AG 量を測定したところ、正常皮膚と比較して、有意な増加が認められた. DNFB 誘発耳介炎症モデルにおける 2-AG 量は測定していないが、DNFB を処置したマウス耳介において、その増加を確認している報告があり [51, 60], 同様に上昇していることが予想される. 続いて、S-777469 が 2-AG の作用を阻害するかどうか検討した. その結果、S-777469

は, *in vitro* で 2-AG が誘導する好酸球様 EoL-1 細胞および単球様 HL-60 細胞の遊走を濃度依存的に阻害した. S-777469 単独による細胞への影響は認められなかった. また, *in vivo* では, ダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおいて, S-777469 は抗原誘発から 24 時間後の皮内への好酸球浸潤を用量依存的に抑制した.

カンナビノイド受容体への主要な内因性リガンドとして, AEA および 2-AG が存在するが, 真の内因性リガンドは 2-AG であると考えられている [61]. 2-AG に関して以下のような報告が存在する. 2-AG は, *in vitro* で, CB₂ 受容体を介して好酸球やマクロファージ様の細胞などの遊走を誘導する [47, 48]. ハプテンや TPA などで惹起したマウス耳介炎症局所には顕著な 2-AG 量の増加が認められ, これらの耳介炎症は CB₂ 受容体拮抗薬である SR144528 の投与によって, あるいは CB₂ 受容体ノックアウトマウスにおいて抑制される [51–53]. 2-AG をマウスの耳介に塗布すると耳介の肥厚を惹起する [54]. これらの知見により, CB₂ 受容体の関与する炎症反応において, 2-AG が重要な役割を果たしていると考えられる. 一方で, CB₂ 受容体選択的作動薬である HU-308 や CB_{1/2} 受容体非選択的作動薬である Win55212-2 は, 2-AG あるいは TPA 誘発のマウスの耳介肥厚を有意に抑制するが, HU-308 や Win55212-2 単独では耳介炎症を誘発しないことや, Win55212-2 が 2-AG によって誘導される HL-60 細胞の遊走を阻害することが報告されている [54]. このことから, CB₂ 受容体選択的作動薬が, 2-AG による CB₂ 受容体を介した炎症反応に対して抑制的に働く可能性が示唆される. これらの結果は, CB₂ 受容体作動薬がまるで拮抗薬の様な働きをしており, 非常に複雑な事象である. Oka ら [54] は, CB₂ 受容体作動薬が 2-AG 誘導性の反応を阻害するメカニズムを解明するために, HL-60 細胞を用いて, 2-AG によって誘発される細胞内へのカルシウム流入に対する Win55212-2 の影響を検討した. HL-60 細胞を 2-AG で刺激すると, 細胞内カルシウム濃度が急速に上昇するが, 2-AG あるいは Win55212-2 によって前処理すると, CB₂ 受容体の脱感作を引き起こし, その後の 2-AG 刺激によるカルシウム流入が阻害される. この時, 2-AG の前処理では, 細胞は不応状態から非常に短時間で回復するが, Win55212-2 の前処理では, 2-AG に対する不応状態が比較的長時間維持されることが明らかになった. このことから, 遊走のような複雑な細胞応答には 2-AG による連続的な刺激が必要であるが, Win55212-2 処置によって細胞が脱感作することで, その 2-AG の作用が阻害される可能性がある. この結果から, Win55212-2 と同じ特徴を有する一部の CB₂ 受容体作動薬は, 2-AG による CB₂ 受容体を介した炎症反応に対して抑制効果を示すと考えられる. 未発表データにおいて, S-777469 の前処理によって, Win55212-2 と同様に, その後の 2-AG 刺激による HL-60 細胞のカルシウム流入を長時間阻害することを確認している. これまでの実験結果およびこれまでに得られている論文情報を踏まえると, S-777469 は Win55212-2 と同じメカニズムで, 2-AG によって誘導される炎症性細胞浸潤を抑制し, 抗炎症効果を示すことが示唆された.

以上をまとめると、CB₂受容体選択的作動薬であるS-777469は、マウスDNFB誘発耳介炎症モデルおよびNC/Ngaマウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルの皮膚炎症を抑制した。そして、その抗炎症効果は、カンナビノイド受容体の内因性リガンドである2-AGがCB₂受容体を介して誘導する炎症反応を阻害することによって発揮されると考えられた。これらのことから、S-777469はアトピー性皮膚炎のような炎症性皮膚疾患の治療薬となる可能性がある。

第3章 CB₂受容体選択的作動薬である S-777469 のマウスおよびラットの搔破行動に及ぼす影響

1. 緒言

痒みは、「引掻きたくなるような不快な感覚」と定義され [62], アトピー性皮膚炎を始めとする皮膚疾患, あるいは血液透析を必要とする慢性腎不全などの内臓疾患でも広く認められる症状である。

アトピー性皮膚炎における痒みは, 患者の QOL を低下させる自覚症状の 1 つであり, 疾患の定義にも含まれている。痒みによる搔破は, 皮膚炎の悪化や感染症, 眼合併症の誘因ともなるため, そのコントロールは非常に重要である。アトピー性皮膚炎の痒みに対してヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬 (抗ヒスタミン薬) が広く用いられているが, その効果は限定的であり, 不十分である。抗ヒスタミン薬が奏功しない原因として, 表皮内への神経伸長, H₁ 受容体以外のヒスタミン受容体の関与, ヒスタミン以外の痒み物質の関与などが考えられる。アトピー性皮膚炎患者の皮膚病変では, 感覚神経 (C 線維) が表皮真皮境界部を越えて表皮の角層直下にまで伸展しており, 外部刺激に対して C 線維が興奮しやすい状態, すなわち通常では痒みを感じないような軽微な刺激に対しても痒みを感じてしまう痒み過敏状態が生じている [63]。また, ヒスタミンの受容体は H₁~H₄ 受容体の 4 種類が同定されており, H₁ 以外に H₃ や H₄ 受容体の痒みへの関与も報告されていることから [64, 65], H₁ 受容体を遮断するだけではヒスタミンによる痒みを抑制できない可能性がある。さらに, ヒスタミン以外にも, マスト細胞, ケラチノサイト, T 細胞, 一次感覚神経などから産生・放出されるアミン (セロトニン), ペプチド (サブスタンス P, エンドセリン-1), サイトカイン (IL-2, IL-31, 胸腺間質性リンパ球新生因子 (thymic stromal lymphopoietin: TSLP)), プロテアーゼ (トリプターゼ), 脂質メディエーター (ロイコトリエン B₄) など多くの末梢性の痒みメディエーターが存在する [66, 67]。以上のように, 痒みの感覚, 特にアトピー性皮膚炎のような慢性皮膚疾患の痒みにおいて, その発生原因は非常に複雑であり, 痒みをコントロールすることは困難である。神経線維には, その線維の太さや機能によっていくつかの種類 (A α - δ 線維, B 線維および C 線維) があるが, 末梢性の痒みを伝える神経は, 求心性の無髄 C 線維であることが知られている [68-70]。また, 鈍く遅い痛みもこの侵害受容線維によって伝えられる。従って, C 線維による伝達を抑制することで, 痒みやある種の痛みを制御することができると考えられる。

CB₂ 受容体は, ヒトやラットの DRG およびヒトの皮膚感覚神経において発現が確認されており [16, 71, 72], 第2章で論じた皮膚炎症の調節の他に, 痒みや痛みへの関与も示唆される。実際, CB₂ 受容体選択的作動薬が鎮痛作用を有していることが報告されている

[19, 73-77]. また, $CB_{1/2}$ 受容体作動薬である HU210 が, ヒトにおいてヒスタミンにより誘発される痒みを抑制することが報告されており [22], カンナビノイド受容体が痒みの調節にも関与することが示唆されている. そこで, CB_2 受容体選択的作動薬である S-777469 の抗そう痒効果について検討した. 痒みというヒトの主観的な感覚を動物で評価することは非常に困難であるが, 1995 年に Kuraishi ら [78] がマウスの引っ掻き行動を指標としたモデルを報告した. 現在では痒みの評価方法としてこの引っ掻き行動を指標とした動物モデルが汎用されていることから, 各種起痒物質を用いて, マウスやラットにおける S-777469 の抗そう痒効果を評価した. また, ヒスタミンによって誘導される神経発火に対する S-777469 の効果および脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) における CB_2 受容体の発現を調べた.

2. 実験材料および方法

2.1. 実験動物

雌性 ICR マウスおよび F344/Du ラットは日本チャールス・リバーより購入した。雌性 JW/CSK ウサギは日本エスエルシーより購入した。動物は、室温：20-26°C、湿度：30-70%、照明時間：明暗各 12 時間（照明；8:00-20:00）に設定した動物飼育室内で飼育した。固形飼料および飲水は自由摂取させた。動物実験計画は、塩野義動物実験適正運用委員会の審査を受けて承認された。

2.2. 薬物および試薬

使用した薬物および試薬は、以下の通りである。S-777469 および SR144528 は、塩野義製薬の研究所にて合成し、フェキソフェナジン塩酸塩は、アレグラ錠 (Sanofi-Aventis) から抽出した。ヒスタミン、ジメチルスルホキシド (DMSO) (ナカライテスク)、コンパウンド 48/80, サブスタンス P, セロトニン, メチルセルロース (MC) (和光純薬工業), (3-アミノプロピル)トリエトキシシラン ((3-aminopropyl) triethoxysilane : APTES) (Dako)

2.3. 搔破行動

搔破行動を誘発する 2-5 日前に、バリカンを用いてマウスおよびラットの吻側背部の毛刈りをした。生理食塩水に溶解したコンパウンド 48/80 (3 $\mu\text{g}/\text{site}$), ヒスタミン (100 nmol/site), あるいはサブスタンス P (100 nmol/site) を 40 μL , マウスの背部皮内に投与することにより、搔破行動を惹起した。ラットにおいては、セロトニン溶液を 100 μL (200 $\mu\text{g}/\text{site}$) 皮内投与して搔破行動を惹起した。陰性対照 (Control) 群には生理食塩水を皮内に投与した。各起痒物質投与後、直ちにアクリル製の観察ケージ (幅 \times 奥行き \times 高さ : 10.8 \times 20.1 \times 14.5 cm) に 1 匹ずつ入れ、30 分間の引っ掻き回数を目視にて計数した。一連の引っ掻き行動 (後肢を上げて痒み惹起部位である吻側背部を何度か引っ掻き、その後肢を下ろすまでの行動) を 1 回として数えた。S-777469 およびフェキソフェナジンは、0.5% MC に懸濁し、起痒物質を投与する 1 時間前に経口投与した。SR144528 は、0.5% MC に懸濁し、S-777469 を投与する直前に経口投与した。Vehicle 投与群には、0.5% MC を経口投与した。なお、引っ掻き回数の抑制率は以下の式より求めた。抑制率 (%) = $(\text{Vehicle 投与群の引っ掻き回数の平均値} - \text{薬物投与群の引っ掻き回数の平均値}) / (\text{Vehicle 投与群の引っ掻き回数の平均値} - \text{Control 群の引っ掻き回数の平均値}) \times 100$ 。

2.4. S-777469 の反復投与による影響

S-777469 (10 mg/kg) は、1 日 2 回 7 日間 (最終日は 1 回) 経口投与し、最終投与の 1 時

間後にコンパウンド 48/80 (3 µg/site) を 40 µL 皮内投与して、痒みを惹起した。単回投与群は、S-777469 をコンパウンド 48/80 投与の 1 時間前に 1 回投与した。

2.5. 神経発火

薬物投与の 50 分後に、マウスをウレタン (1.5 g/kg, 腹腔内投与) 麻酔下、背部皮膚を切開して裏返し、感覚神経束を露出した。マウスは体温低下を防ぐために保温機能の付いた台に置いた。双極電極 (銀線) を神経束に接触させ、神経の電位変化を測定し、その電位変化を増幅器 (MEG-2100; 日本光電工業) を用いて増幅し、この増幅された電気信号 (アナログ信号) をアナログ/デジタル変換装置 (Powerlab/8SP; ADInstruments) を用いてデジタル信号に変換し、コンピューターのモニターで表記させた。データの記録用チャートへの出力および発火頻度等の解析は、ソフトウェア (Chart 5; ADInstruments) を用いて行なった。神経活動が安定してから、ヒスタミン溶液 50 µL (12.5 µmol/site) を神経支配領域の皮内に投与し、30 分間の神経発火の回数を測定した。

2.6. 免疫組織化学染色用ウサギ抗 CB₂ 受容体抗体の作製

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase: GST) およびマルトース結合タンパク質 (maltose binding protein: MBP) タグを C 末端に付加した CB₂ 受容体 (アミノ酸残基 302-347) タンパク質を大腸菌発現系によって発現・精製した。GST-CB₂ および MBP-CB₂ 融合タンパク質は、それぞれ CB₂ 受容体に対するウサギ抗血清の取得および抗血清からの CB₂ 受容体特異的抗体の精製のために用いた。

3 羽の JW/CSK ウサギに GST-CB₂ を 2 週間おきに合計 7 回皮内投与した。最後の免疫の 10 日後に GST-CB₂ に対する抗血清を採取し、抗体価をビオチン標識した GST-CB₂ を用いた競合酵素結合免疫吸着アッセイ (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 法によって測定した。最も高抗体価を示した抗血清から、CB₂ 受容体特異的な抗体を単離した。MBP-CB₂ を固定した AminoLink Coupling Resin (Thermo Fisher Scientific) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって CB₂ 受容体特異的な抗体を単離し、ELISA およびウェスタンブロットによって抗体の特異性を確認した。CB₂ 受容体特異的抗体は、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) に対して透析し、免疫組織染色に使用した。

2.7. 免疫組織化学染色

ペントバルビタール麻酔下、ICR マウスの腹部大動脈より PBS を灌流させた後、固定液として 4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) を灌流した。灌流後、DRG

を摘出した。固定したDRGをPBSでよく洗浄した後、エタノールを用いて段階的に脱水、キシレンで透徹し、パラフィンに包埋した。厚さ5 μ mの切片を作製し、APTESでコーティングしたスライドガラスに固定した。脱パラフィン処理し、PBSで500倍希釈した正常ヤギ血清で室温、30分のブロッキング処理後、作製したウサギ抗CB₂受容体抗体1.0 μ g/mL (PBS) と加湿条件下で室温、30分反応させた。PBS洗浄後、PBSで200倍希釈したビオチン標識抗ウサギ抗体 (Vector Laboratories) と室温で、30分反応させ、再度洗浄した。続いて、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories) と室温で、60分反応させた。DAB基質を添加し発色させた後、ヘマトキシリンを用いて対比染色し、脱水後、Entellan new (Merck) にて封入した。標本は明視野顕微鏡にて観察した。

2.8. 統計学的解析

結果は平均 \pm 標準誤差 (S.E.) で示し、二群間の有意差検定には Welch's *t*-test を、多群間には Tukey test を用いた。いずれの検定においても $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

3.1. S-777469 の抗そう作用に対する CB₂ 受容体拮抗薬の影響

これまでに, Odanら [23] がマウスのコンパウンド 48/80 誘発引っ掻き行動を, S-777469 が有意に抑制することを報告している. S-777469 の抗そう痒効果が CB₂ 受容体を介して発揮されることを確認するために, CB₂ 受容体拮抗薬である SR144528 の存在下あるいは非存在下で, S-777469 の引っ掻き行動抑制作用を検討した. ICR マウスを用い, SR144528 (0.2, 1 および 5 mg/kg) を経口投与した直後に S-777469 (1 mg/kg) を投与し, マスト細胞の活性化物質であるコンパウンド 48/80 を皮内投与して誘発される引っ掻き行動に対する効果を検討した. SR144528 は引っ掻き行動惹起の 1 時間前に投与した. Figure 14 に示すように, SR144528 非存在下において S-777469 (1 mg/kg) は有意な引っ掻き行動抑制作用を示した. 一方, SR144528 (1 および 5 mg/kg) 存在下では, S-777469 の引っ掻き行動抑制作用は減弱し, Vehicle (0.5% MC) 投与群との有意差が消失した. SR144528 (5 mg/kg) の単独投与はコンパウンド 48/80 誘発引っ掻き行動に影響を及ぼさなかった.

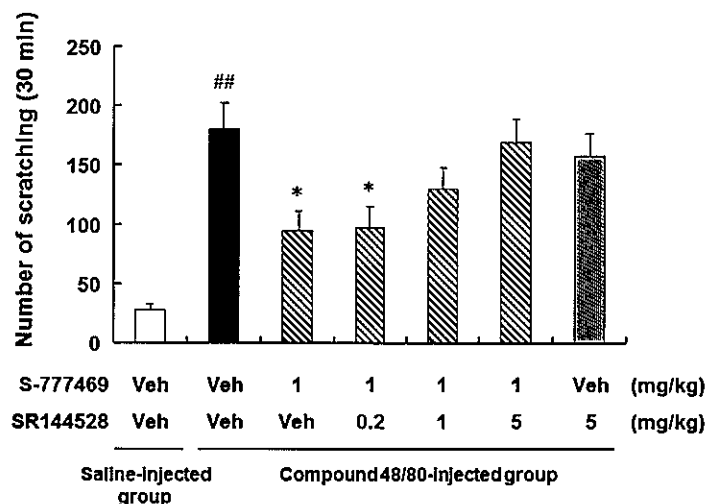


Figure 14. Effect of SR144528 on the inhibitory effect of S-777469 on compound 48/80-induced scratching behavior in mice [79].

S-777469 was administered orally 1 h before the intradermal injection of compound 48/80. SR144528 was administered orally just before the administration of S-777469. The number of scratching behavior was counted for 30 min after the injection of compound 48/80.

All data represent the mean \pm S.E. Veh: The vehicle group was administered 0.5% methylcellulose. ^{##} $p < 0.01$ vs Vehicle + Vehicle in saline-injected group, ^{*} $p < 0.05$ vs Vehicle + Vehicle in compound 48/80-injected group (Tukey test). $n = 14$.

3.2. S-777469 の様々な起痒物質による搔破行動に及ぼす影響

S-777469 の抗そう痒作用について、様々な起痒物質を用いて検討した。対照物質として、抗ヒスタミン薬 (H_1 受容体拮抗薬) であるフェキソフェナジンを使用した。最初に、ヒスタミン (100 nmol/site) を、ICR マウスの背部に皮内注射した際に認められる引っ掻き行動に及ぼす影響を確認した。S-777469 (0.3, 1, 3 および 10 mg/kg) あるいはフェキソフェナジン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) は、ヒスタミン誘発の 1 時間前に経口投与した。Figure 15a に示すように、ヒスタミン投与によって明らかな引っ掻き行動が惹起された。この反応に対して、S-777469 は用量依存的な抑制効果を示し、その効果は 10 mg/kg の投与量で有意であった。各用量における抑制率は、0.3 mg/kg : 28%, 1 mg/kg : 55%, 3 mg/kg : 59% および 10 mg/kg : 69% であった。また、フェキソフェナジンも用量依存的な抑制作用を示し、その効果は 10 mg/kg 以上の投与量で有意であった。各用量における抑制率は、1 mg/kg : 43%, 3 mg/kg : 52%, 10 mg/kg : 74% および 30 mg/kg : 80% であった。

次に、起痒物質としてヒスタミンの代わりにサブスタンス P (100 nmol/site) を用い、同様の方法にて S-777469 の引っ掻き行動抑制作用を評価した。S-777469 (0.3, 1, 3 および 10 mg/kg)、あるいはフェキソフェナジン (30 mg/kg) を引っ掻き行動惹起の 1 時間前に経口投与した。Figure 15b に示すように、サブスタンス P によって惹起される引っ掻き行動を S-777469 は用量依存的に抑制し、その効果は 3 mg/kg 以上の投与量で有意であった。各用量における抑制率は、0.3 mg/kg : 23%, 1 mg/kg : 37%, 3 mg/kg : 43% および 10 mg/kg : 48% であった。一方、フェキソフェナジン (30 mg/kg) は明らかな抑制作用を示さなかった (抑制率 : 12%)。

さらに、S-777469 の安全性試験ではげっ歯類動物としてラットを使用しているため、ラットにおける抗そう痒効果を確認した。ラットにおいてセロトニンの皮内投与によって引っ掻き行動が惹起されるという報告があることから [80]、S-777469 のセロトニン誘発引っ掻き行動に対する作用を調べた。F344/Du ラットを用い、セロトニン (200 μ g/site) を背部に皮内注射した際に認められる引っ掻き行動を 30 分間にわたり計測した。S-777469 (0.3, 1, 3 および 10 mg/kg) あるいはフェキソフェナジン (30 mg/kg) は、セロトニンによる引っ掻き行動惹起の 1 時間前に経口投与した。Figure 15c に示すように、S-777469 の経口投与によって用量依存的な引っ掻き行動抑制作用が観察され、その効果は 10 mg/kg の投与量で有意であった。各用量における抑制率は、0.3 mg/kg : 14%, 1 mg/kg : 15%, 3 mg/kg : 30% および 10 mg/kg : 33% であった。一方、フェキソフェナジン (30 mg/kg) は抑制作用を示さなかった。データには示していないが、マウスにおけるセロトニン (30 nmol/site) 誘発引っ掻き行動に対しても、S-777469 (10 mg/kg) は 43% の有意な抑制作用を示したが、フェキソフェナジン (30 mg/kg) は明らかな抑制作用を示さなかった。

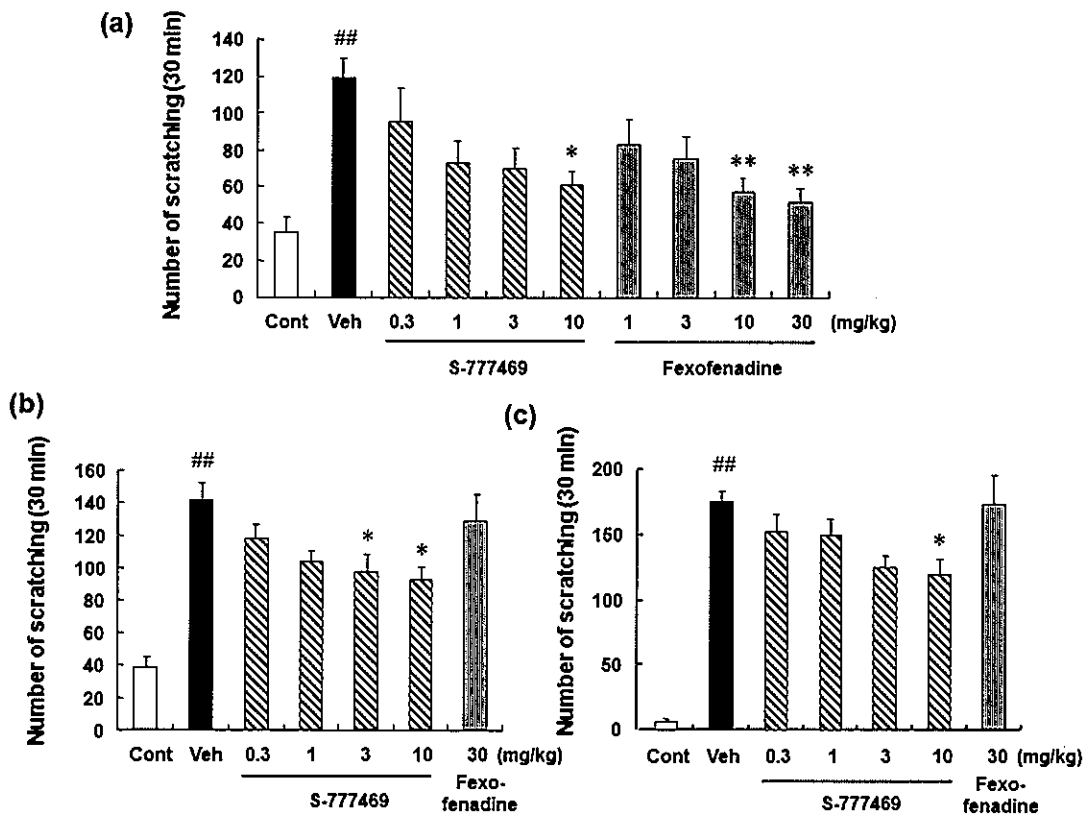


Figure 15. Effect of S-777469 and fexofenadine on scratching behavior induced by histamine (a), substance P (b), and serotonin (c) in mice (a, b) and rats (c) [79].

S-777469 and fexofenadine were administered orally 1 h before the intradermal injection of pruritogens. The number of scratching behavior was counted for 30 min after the injection of pruritogens.

All data represent the mean \pm S.E. Cont: The control group was injected with physiological saline. Veh: The vehicle group was administered 0.5% methylcellulose. ## $p < 0.01$ vs Control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Vehicle (Tukey test). $n = 20$.

3.3. 搔破行動に対する S-777469 の反復投与による影響

慢性的な痒みを治療するためには、長期的に薬物を摂取する必要がある。そこで、S-777469 を反復投与しても、その抗そう痒効果が維持されるかどうかを検討した。S-777469 (10 mg/kg) を1日2回7日間 (最終日は1回) 反復経口投与した後に、ICR マウスにおけるコンパウンド 48/80 誘発引掻き行動に対する作用を検討した。最終投与は引掻き行動惹起の1時間前に実施した。同時に、S-777469 (10 mg/kg) の単回経口投与 (1時間前処置) の効果も検討した。Figure 16に示すように、S-777469 (10 mg/kg) の単回投与は、コンパウンド 48/80 誘発引掻き行動を有意に抑制した。また、7日間反復投与後においても S-777469 は単回投与と同程度の有意な抑制効果を示し、薬効の減弱は認められなかった。

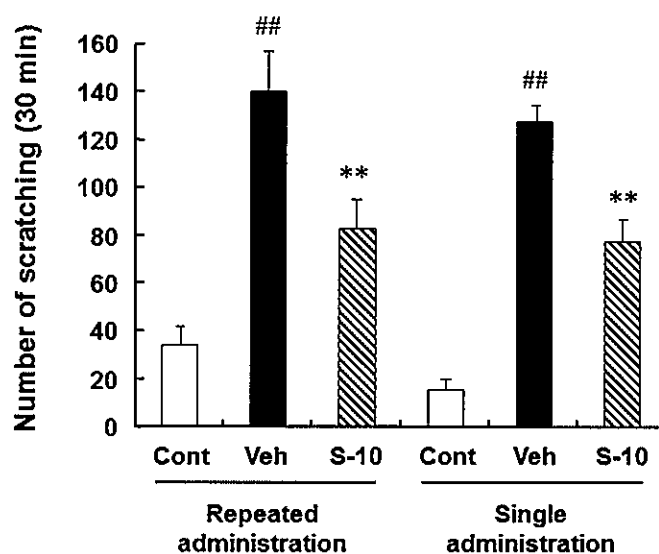


Figure 16. Effect of S-777469 on Compound 48/80-induced scratching behavior in mice after single or repeated administration [79].

In the repeated administration group, S-777469 was administered twice a day for 6 days and 1 h before the intradermal injection of compound 48/80. In the single administration group, S-777469 was administered 1 h before the compound 48/80 injection. The number of scratching behavior was counted for 30 min after the injection of compound 48/80.

All data represent the mean \pm S.E. Cont: Negative control, Veh: Vehicle, S-10: S-777469 10 mg/kg. ^{##} $p < 0.01$ vs Control (Welch's t -test), ^{**} $p < 0.01$ vs Vehicle (Welch's t -test). $n = 15$.

3.4. DRG における CB₂ 受容体発現

CB₂ 受容体の DRG ニューロンにおける局在を確認するために、免疫組織染色を実施したところ、CB₂ 受容体が主に小型 (直径 < 20 μm) の DRG ニューロンに発現しており、すべての DRG ニューロンのおよそ半分以上が CB₂ 受容体陽性であった。一方、CB₂ 受容体は直径が 20 μm 以上のサイズの DRG には検出されなかった (Figure 17).

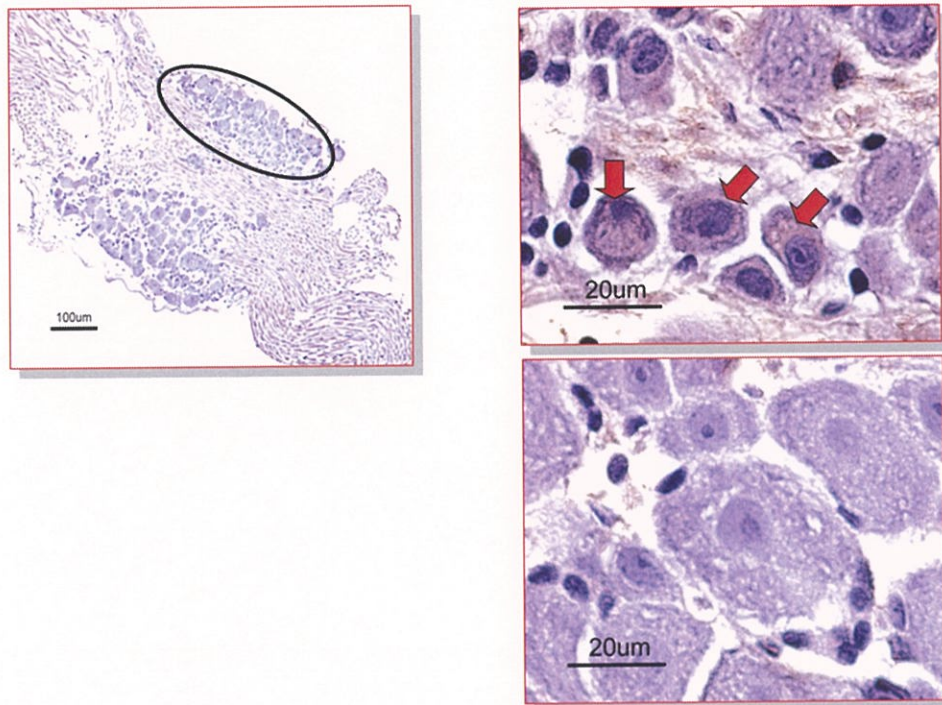


Figure 17. Expression of CB₂ receptors in DRG neurons [79].

Immunohistochemistry showing CB₂ receptors immunoreactivity in small (< 20 microm diameter) DRG neurons (top right) and in large (> 20 microm diameter) DRG neurons (bottom right). CB₂ receptors were expressed primarily in smaller-diameter neurons (arrows).

Left: Lower-magnification view. Right: Higher-magnification view of a circle area.

Scale bar: 100 μm (left), and 20 μm (right).

3.5. S-777469 の神経活動に及ぼす影響

S-777469 が抗そう痒作用を示すメカニズムを明らかにするために、引っ掻き行動との関連がある神経活動に対する S-777469 の影響を調べた。ヒスタミンを皮内に投与すると投与局所領域を支配する感覚神経の発火が生じた。S-777469 (10 mg/kg) はヒスタミンの刺激による神経発火数を有意に抑制した (Figure 18)。

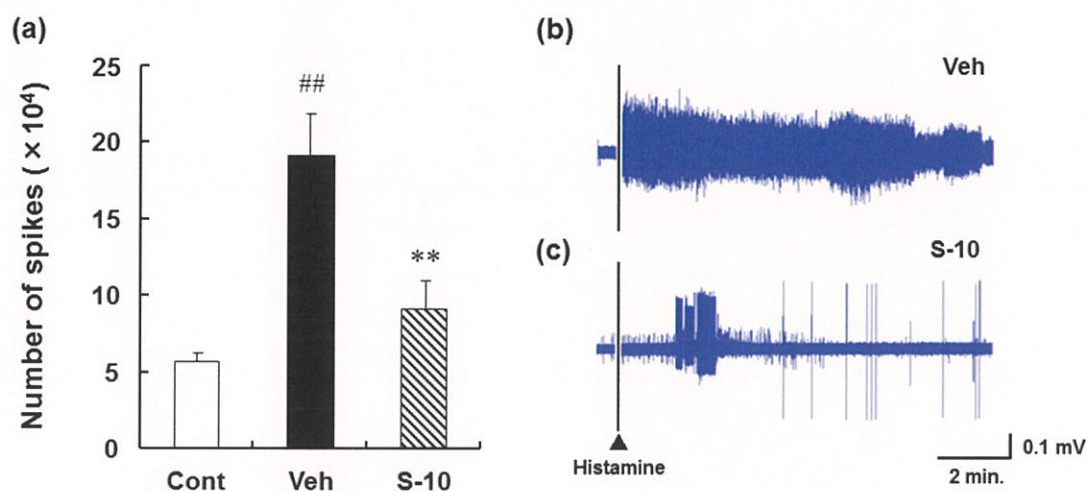


Figure 18. Effect of S-777469 on histamine-induced nerve firing in mice [79].

Cutaneous nerve activity was recorded for 30 min after intradermal injection of histamine. Total number of spikes was counted to determine the nerve activity (a), and the typical data of nerve firing in vehicle-treated group (b) and S-777469-treated group were shown. Histamine was injected at a dose of 12.5 $\mu\text{mol}/\text{site}$ as indicated by an arrow.

All data represent the mean \pm S.E. Cont: Negative control, Veh: Vehicle, S-10: S-777469 10 mg/kg. ## $p < 0.01$ vs Control (Welch's t -test), ** $p < 0.01$ vs Vehicle (Welch's t -test). $n = 13-15$.

4. 考察

慢性の痒みは、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患を含む様々な疾患において認められる症状であるが、痒みに奏効する治療薬はこれまでに存在しない。痒みの病態は非常に複雑であり、数多くの分子が痒みに関わる神経に作用していると考えられている [17, 66, 81]。カンナビノイド受容体の作動薬が、ヒトにおいてヒスタミン誘発の痒みを抑制することや、尿毒症の痒みおよびアトピー性皮膚炎に対して治療効果を示すことが報告されていることから [22, 82-84]、カンナビノイドが痒みの伝達を調節する可能性が考えられた。カンナビノイドの受容体には主に、CB₁受容体およびCB₂受容体が存在するが、CB₁受容体は中枢神経系に多く発現しているのに対し、CB₂受容体は末梢神経や免疫細胞に多く発現している [15, 85-88]。これらのことから、CB₂受容体選択的な作動薬は、CB₁受容体を介した中枢性副作用（向精神作用、鎮静作用、依存性など）の懸念が少ない末梢性の抗そう痒薬となることが期待できる。本研究では、CB₂受容体選択的作動薬である S-777469 の抗そう痒効果について検討した。

はじめに、S-777469 が各種起痒物質で惹起する痒み関連行動 [78] に及ぼす影響を調べた。S-777469 はコンパウンド 48/80 で惹起した搔破行動を抑制し、この抑制作用が CB₂受容体拮抗薬である SR144528 によって阻害されたことから、CB₂受容体を介した作用であると考えられた。続いて、その他の起痒物質によって惹起される搔破行動に対する S-777469 の効果を、抗ヒスタミン薬であるフェキソフェナジンを対照にして調べた。フェキソフェナジンは、マウスにおいてヒスタミン誘発搔破行動を抑制したが、サブスタンス P や、ラットにおけるセロトニン誘発搔破行動は抑制しなかった。フェキソフェナジンの薬理作用から考えて、妥当な結果である。一方、S-777469 はいずれの起痒物質による搔破行動も有意に抑制した。しかし、S-777469 はマウスのホルマリンテストや、ラットの尾をピンセットで挟む機械刺激によって生じる痛み関連行動には影響を及ぼさなかった（データは示さず）。また、S-777469 がヒスタミン、サブスタンス P およびセロトニンの受容体に対する拮抗活性を有していないこと、ラットにおいて 2000 mg/kg まで投与しても一般状態や一般行動に影響しないことを確認した（データは示さず）。これらのことから、CB₂受容体選択的な S-777469 が起痒物質の種類に関係なく引っ掻き行動を広く抑制する機序として、痒みの神経伝達を抑制することが考えられ、次にこの点について検討した。

カンナビノイドが痒みの伝達に関与している可能性を有していることはすでに報告がある [17, 81]。また、CB₂受容体はヒトやラットの DRG およびヒトの皮膚感覚神経において発現が確認されており [16, 71, 72]、CB₂受容体作動薬がカプサイシン刺激による DRG ニューロンの細胞内カルシウム濃度上昇を抑制することや、電気刺激による C 線維の活性化を抑制することが報告されている [72, 89]。これらのことから、マウスの DRG

における CB₂ 受容体発現および S-777469 の神経活動に対する作用を確認した。免疫組織化学染色による検討の結果、CB₂ 受容体は A δ 線維の一部や C 線維の細胞体である小型の DRG ニューロンに主に発現していた。種々起痒物質の痒みを CB₂ 受容体選択的作動薬が抑制する機序を明らかにするためには、すでに DRG に発現することが報告されているヒスタミン、サブスタンス P およびセロトニンの受容体である H₁・H₄ 受容体、ニューロキニン 1 (neurokinin 1: NK₁) 受容体および 5-ヒドロキシトリプタミン (5-hydroxytryptamine: 5-HT)₂ 受容体 [90–92] と、CB₂ 受容体との共発現を今後確認する必要があると考えている。さらに、マウスにおいて、皮膚に起痒物質を投与して誘発される神経発火と引っ掻き行動の関連性が示されていることから [93]、ヒスタミンによって誘発される神経発火に対する S-777469 の影響を確認したところ、S-777469 は神経発火を有意に抑制した。データには示していないが、セロトニン誘発神経発火についても S-777469 (10 mg/kg) が抑制するというデータを取得している。これらの結果から、S-777469 は痒みを伝える一次感覚神経の興奮を抑制することにより、様々な起痒物質によって生じる搔破行動を抑制すると考えられる。また、CB₂ 受容体作動薬 (AM-1241 および L-768242) がカプサイシン刺激によるラット脊髄スライスからのカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) の遊離を濃度依存的に抑制するという報告がある [94]。このことから、S-777469 は神経伝達物質の遊離を抑制することによって痒みを制御する可能性が示唆されるが、痒みに対する反応を抑制する一方で、痛みに対する反応を抑制しないメカニズムの解明も含め、さらなる検討が必要である。

慢性的な痒みの治療を考えた場合、長期的に薬剤を摂取する必要があるが、CB₂ 受容体作動薬によって持続的に CB₂ 受容体を活性化すると、CB₂ 受容体が細胞膜表面から細胞内に移動 (内在化: internalization) することが報告されており [95, 96]、CB₂ 受容体作動薬を長期投与すると耐性が生じる可能性が考えられる。そのため、マウスにおいて S-777469 を反復投与し、抗そう痒効果が維持されるかどうかを検討した。その結果、少なくとも 7 日間の反復投与において単回投与の場合と同様に有意な抑制効果が認められ、反復投与後も薬効が減弱しない、すなわち耐性が生じないことが示唆された。S-777469 の刺激によって細胞の応答が生じることを未発表データにおいて確認しており、S-777469 は CB₂ 受容体の内在化を引き起こすことが示唆される。Atwood ら [97] は、CB₂ 受容体作動薬には、CB₂ 受容体の内在化を起こす作用が強いものと弱いものがあることを示しており、S-777469 は後者である可能性がある。また別の可能性として、 δ オピオイド受容体の作動薬に関して、受容体の内在化が起きた後、受容体がリサイクルされる (再度細胞膜上に発現する) までの時間が、耐性の生じやすさに影響することが報告されている [98]。CB₂ 受容体においても同様の仮説が成り立つとすると、S-777469 の刺激で CB₂ 受容体が内在化を起こしてもすぐに回復することによって、耐性が生じにくいということが考えられ

るが、今後立証する必要がある。

以上より、S-777469 は痒みのシグナル伝達を抑制することによって、起痒物質の種類に関係なく、広く抗そう痒効果を示すと考えられる。S-777469 は、皮膚において様々な痒みのメディエーターが関与しているアトピー性皮膚炎のような慢性皮膚疾患の痒みに対して有効性を示す可能性がある。今後さらに、第 1 章で論じたアトピー性皮膚炎と類似した特徴を有する NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルを用いて S-777469 の抗そう痒作用を確認したい。

総括

アトピー性皮膚炎は、痒みを伴う湿疹が慢性的に繰り返す疾患であり、強い痒みによる不眠やストレス、皮疹による外見の悩みなど、日常生活および社会生活に支障をきたすことから、患者とその家族の QOL を著しく低下させる。アトピー性皮膚炎では、その特徴の 1 つである痒みが搔破行動を引き起こし、皮膚を損傷することにより炎症反応が増悪し、さらに強い痒みが生じるといった悪循環 (itch-scratch-cycle) が生じて疾患を難治化させている。アトピー性皮膚炎の患者の数は年々増える傾向にあり、成人重症例も増大している。治療にはステロイド外用薬およびタクロリムス軟膏が一定の効果を示し、広く使用されているが、副作用や使用上の制限などから、より安全で有効性の高い薬物の開発が望まれている。また、補助的にアトピー性皮膚炎の痒みに対して抗ヒスタミン薬が用いられているが、その効果は不十分であることから、痒みを標的にする薬物が開発されれば、さらに薬物療法の幅が広がると考えられる。

カンナビノイドは、中枢神経系や免疫系などにおいて幅広い薬理作用を有しており、カンナビノイド系を標的とした薬剤は様々な病態に対して治療効果を発揮することが期待されている [40–42]。カンナビノイド受容体の CB₁ 受容体は、中枢神経系に多く発現しており、脳の高次機能に関与している一方、CB₂ 受容体は免疫組織や末梢神経に発現しており、免疫機能や痛み・痒みの調節に関与していると考えられる。CB₂ 受容体選択的作動薬は抗炎症・抗そう痒効果を示すことが期待され、向精神作用、鎮静作用や依存性などの中枢性副作用懸念の少ないアトピー性皮膚炎治療薬となる可能性がある。

本研究では、アトピー性皮膚炎治療薬を評価・開発する上で重要となる病態モデルマウスの詳細な解析および塩野義製薬により見出された新規 CB₂ 受容体選択的作動薬である S-777469 の抗炎症作用および抗そう痒作用について検討した。

第 1 章では、NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルについて、アトピー性皮膚炎の病態モデルとしての有用性を明らかにした。アトピー性皮膚炎は非常に複雑な病態 (免疫異常、バリア機能異常、痒み) を呈する疾患であり、新薬の評価や開発の為には、その病態をなるべく反映したモデルを用いる必要がある。本モデルは、週 2 回 3 週間、背部皮膚のバリア破壊およびダニ抗原軟膏塗布によって、慢性化した皮膚炎を発症する。NC/Nga 以外の系統のマウス (ICR, C57BL/6 および BALB/c) でも同様の処置により皮膚炎の惹起を試みたが、明らかな皮膚炎は発症しなかった。NC/Nga マウスにおいて、抗原誘発開始以降、搔破行動と皮膚炎スコアのタイムコースを確認したところ、搔破行動の増加に伴って皮膚炎スコアの上昇が認められた。また慢性化した皮膚炎は、抗原誘発を止めても 10 日間以上維持され、血中 IgE 値についても高い状態が維持された。しかしながら、爪を切除することによって搔破の影響を減らすと、皮膚炎の顕著な改善と血中 IgE

値の低下が認められた。これらのことから、本モデルにおいて、皮膚炎の慢性化およびその維持に搔破行動が重要な役割を果たしており、itch-scratch cycleの現象が生じていると考えられた。さらに、本モデルの皮内の神経線維の分布を調べると、正常マウスと比較して、明らかな表皮内への神経線維の侵入・増生が認められた。これらの結果から、ヒトのアトピー性皮膚炎と同様、本モデルの病態形成には痒みにともなう搔破が大きく影響していると考えられた。

第2章では、S-777469の抗炎症効果について、マウスのDNFB誘発耳介炎症モデルおよび第1章でアトピー性皮膚炎モデル動物としての有用性を示したNC/Ngaマウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルを用いて検討した。S-777469はDNFB誘発耳介炎症モデルの耳介の肥厚を有意に抑制した。また、S-777469は、ダニ抗原誘発皮膚炎モデルにおいて治療効果を示し、表皮の肥厚や炎症性細胞（マスト細胞や好酸球）浸潤といった皮膚病理組織学的変化を改善した。CB₂受容体の主な内因性リガンドである2-AGがマウスにおいて炎症を惹起することや、炎症部位で増加していることが報告されている[49-52]。そこで、2-AGの作用に対するS-777469の影響を調べた。In vitroの細胞遊走実験により、S-777469は2-AGによって誘導される好酸球様EoL-1および単球様HL-60細胞の遊走を濃度依存的に阻害することが明らかになった。また、ダニ抗原誘発皮膚炎モデルの皮膚病変部に2-AGが増加していることを確認した。これらの結果から、S-777469は、2-AGがCB₂受容体を介して誘導する炎症反応（炎症性細胞浸潤など）を阻害することによって、抗炎症作用を発揮している可能性が考えられた。

第3章では、S-777469の抗そう痒作用について、マウスおよびラットを用いて各種起痒物質によって誘発される引っ掻き行動を指標に評価した。S-777469はコンパウンド48/80で惹起した搔破行動を抑制し、この抑制作用がCB₂受容体拮抗薬であるSR144528によって阻害されたことから、CB₂受容体を介した作用であると考えられた。続いて、ヒスタミン、サブスタンスPおよびセロトニン誘発の搔破行動に及ぼす影響を調べたところ、S-777469はいずれの搔破行動も有意に抑制した。一方、抗ヒスタミン薬であるフェキソフェナジンは、ヒスタミン誘発の搔破行動のみ有意に抑制した。S-777469がヒスタミンによって誘発される神経発火を抑制したことから、S-777469の抗そう痒作用は、CB₂受容体を介して痒みのシグナル伝達を阻害することによるものと考えられた。アトピー性皮膚炎の皮膚では、ヒスタミン以外にも様々な痒みのメディエーターが存在し、それらが末梢の感覚神経に作用し、痒みを引き起こしている[62, 63]。S-777469はCB₂受容体を発現した末梢神経の興奮を抑制することによって、様々な起痒物質に対する反応を抑制すると考えられ、S-777469は抗ヒスタミン薬に対して抵抗性を示す痒みに対しても有効である可能性がある。

以上より, 本研究ではアトピー性皮膚炎の病態モデルとして NC/Nga マウスのダニ抗原誘発皮膚炎モデルの有用性を明らかにした. 本モデルは, アトピー性皮膚炎の病態解明および治療薬の開発に大きく貢献すると考えられる. また, 新規 CB₂ 受容体選択的作動薬である S-777469 は, 抗炎症効果に加えて抗そう痒効果も示すことから, 新規の作用機序を有するアトピー性皮膚炎治療薬としての可能性が期待される.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました摂南大学薬学部薬効薬理学研究室 奈邊健教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり御指導と御討論を頂きました塩野義製薬株式会社 安井潔博士、山本美奈博士、有村昭典博士に心より感謝いたします。併せて、実験に際し多大な御協力と御助言を頂きました塩野義製薬株式会社 研究所諸氏に深謝いたします。

引用文献

- 1 加藤則人, 佐伯秀久, 中原剛士, 田中暁生, 栴島健治, 菅谷誠, 室田浩之, 海老原全, 片岡葉子, 相原道子, 江藤隆史. (2016) アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2016年版. 日皮会誌 **126**, 121–155.
- 2 Ódhiambo, J. A., Williams, H. C., Clayton, T. O., Robertson, C. F., Asher, M. I. and ISAAC Phase Three Study Group. (2009) Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 1251–8.e23.
- 3 Simpson, E. L., Irvine, A. D., Eichenfield, L. F. and Friedlander, S. F. (2016) Update on Epidemiology, Diagnosis, and Disease Course of Atopic Dermatitis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **35**, S84-8.
- 4 Kabashima, K. (2013) New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. *J. Dermatol. Sci.* **70**, 3–11.
- 5 Noda, S., Krueger, J. G. and Guttman-Yassky, E. (2015) The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 324–36.
- 6 Suárez-Fariñas, M., Dhingra, N., Gittler, J., Shemer, A., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J. G. and Guttman-Yassky, E. (2013) Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 361–70.
- 7 Noda, S., Suárez-Fariñas, M., Ungar, B., Kim, S. J., de Guzman Strong, C., Xu, H., Peng, X., Estrada, Y. D., Nakajima, S., Honda, T., Shin, J. U., Lee, H., Krueger, J. G., Lee, K.-H., Kabashima, K. and Guttman-Yassky, E. (2015) The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1254–64.
- 8 Gittler, J. K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K. J., Wang, C. Q. F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J. G. and Guttman-Yassky, E. (2012) Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 1344–54.
- 9 Roediger, B., Kyle, R., Le Gros, G. and Weninger, W. (2014) Dermal group 2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **31**, 108–14.
- 10 Berth-Jones, J. and Graham-Brown, R. A. (1989) Failure of terfenadine in relieving the pruritus of atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **121**, 635–7.

- 11 Herman, S. M. and Vender, R. B. Antihistamines in the treatment of dermatitis. *J. Cutan. Med. Surg.* **7**, 467–73.
- 12 Klein, P. A. and Clark, R. A. (1999) An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.* **135**, 1522–5.
- 13 Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. and Mechoulam, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946–9.
- 14 Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R. and Compton, D. R. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 83–90.
- 15 Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R. and Pertwee, R. G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **54**, 161–202.
- 16 Ständer, S., Schmelz, M., Metzke, D., Luger, T. and Rukwied, R. (2005) Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J. Dermatol. Sci.* **38**, 177–88.
- 17 Ständer, S., Weisshaar, E. and Luger, T. A. (2008) Neurophysiological and neurochemical basis of modern pruritus treatment. *Exp. Dermatol.* **17**, 161–9.
- 18 Quartilho, A., Mata, H. P., Ibrahim, M. M., Vanderah, T. W., Porreca, F., Makriyannis, A. and Malan, T. P. (2003) Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* **99**, 955–60.
- 19 Hanus, L., Breuer, A., Tchilibon, S., Shiloah, S., Goldenberg, D., Horowitz, M., Pertwee, R. G., Ross, R. A., Mechoulam, R. and Fride, E. (1999) HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14228–33.
- 20 Kinsey, S. G., Mahadevan, A., Zhao, B., Sun, H., Naidu, P. S., Razdan, R. K., Selley, D. E., Imad Damaj, M. and Lichtman, A. H. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. *Neuropharmacology* **60**, 244–51.
- 21 Wang, Z.-Y., Wang, P. and Bjorling, D. E. (2014) Treatment with a cannabinoid receptor 2 agonist decreases severity of established cystitis. *J. Urol.* **191**, 1153–8.
- 22 Dvorak, M., Watkinson, A., McGlone, F. and Rukwied, R. (2003) Histamine induced responses are attenuated by a cannabinoid receptor agonist in human skin. *Inflamm. Res.* **52**,

- 238–45.
- 23 Odan, M., Ishizuka, N., Hiramatsu, Y., Inagaki, M., Hashizume, H., Fujii, Y., Mitsumori, S., Morioka, Y., Soga, M., Deguchi, M., Yasui, K. and Arimura, A. (2012) Discovery of S-777469: an orally available CB2 agonist as an antipruritic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 2803–6.
- 24 Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G. P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P. W. and Ra, C. (1997) Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* **9**, 461–6.
- 25 Suto, H., Matsuda, H., Mitsuishi, K., Hira, K., Uchida, T., Unno, T., Ogawa, H. and Ra, C. (1999) NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **120 Suppl**, 70–5.
- 26 Morita, E., Kaneko, S., Hiragun, T., Shindo, H., Tanaka, T., Furukawa, T., Nobukiyo, A. and Yamamoto, S. (1999) Fur mites induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mice, NC/Kuj. *J. Dermatol. Sci.* **19**, 37–43.
- 27 Iijima, O. T., Takeda, H., Komatsu, Y., Matsumiya, T. and Takahashi, H. (2000) Atopic dermatitis in NC/Jic mice associated with *Myobia musculi* infestation. *Comp. Med.* **50**, 225–8.
- 28 Yamamoto, M., Haruna, T., Yasui, K., Takahashi, H., Iduhara, M., Takaki, S., Deguchi, M. and Arimura, A. (2007) A novel atopic dermatitis model induced by topical application with *dermatophagoides farinae* extract in NC/Nga mice. *Allergol. Int.* **56**, 139–148.
- 29 Yamamoto, M., Haruna, T., Ueda, C., Asano, Y., Takahashi, H., Iduhara, M., Takaki, S., Yasui, K., Matsuo, Y. and Arimura, A. (2009) Contribution of itch-associated scratch behavior to the development of skin lesions in *Dermatophagoides farinae*-induced dermatitis model in NC/Nga mice. *Arch. Dermatol. Res.* **301**, 739–46.
- 30 Wilkinson, K. D., Lee, K. M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J. M. and Pohl, J. (1989) The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* **246**, 670–3.
- 31 Matsumoto, M., Itakura, A., Tanaka, A., Fujisawa, C. and Matsuda, H. (2001) Inability of IL-12 to down-regulate IgE synthesis due to defective production of IFN-gamma in atopic NC/Nga mice. *J. Immunol.* **167**, 5955–62.
- 32 Aioi, A., Tonogaito, H., Suto, H., Hamada, K., Ra, C. R., Ogawa, H., Maibach, H. and Matsuda, H. (2001) Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **144**, 12–8.
- 33 Hashimoto, Y., Arai, I., Nakanishi, Y., Sakurai, T., Nakamura, A. and Nakaike, S. (2004) Scratching of their skin by NC/Nga mice leads to development of dermatitis. *Life Sci.* **76**, 783–

- 94.
- 34 Takahashi, N., Arai, I., Honma, Y., Hashimoto, Y., Harada, M., Futaki, N., Sugimoto, M. and Nakaike, S. (2005) Scratching behavior in spontaneous- or allergic contact-induced dermatitis in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.* **14**, 830–7.
- 35 Amano, H., Negishi, I., Akiyama, H. and Ishikawa, O. (2008) Psychological stress can trigger atopic dermatitis in NC/Nga mice: an inhibitory effect of corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology* **33**, 566–73.
- 36 Morimoto, K., Nabeshima, Y., Mochizuki, M., Oomizu, S., Yamamoto, S. and Hide, M. (2006) The extract of syngeneic keratinocytes enhances IgE production from BALB/c mouse splenic lymphocytes in vitro. *Arch. Dermatol. Res.* **297**, 358–66.
- 37 Sugiura, H., Omoto, M., Hirota, Y., Danno, K. and Uehara, M. (1997) Density and fine structure of peripheral nerves in various skin lesions of atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 125–31.
- 38 Tobin, D., Nabarro, G., Baart de la Faille, H., van Vloten, W. A., van der Putte, S. C. and Schuurman, H. J. (1992) Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **90**, 613–22.
- 39 Ständer, S. and Steinhoff, M. (2002) Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview. *Exp. Dermatol.* **11**, 12–24.
- 40 Pertwee, R. G. (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin. Investig. Drugs* **9**, 1553–71.
- 41 Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A. and Rodríguez de Fonseca, F. (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 218–24.
- 42 Porter, A. C. and Felder, C. C. (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* **90**, 45–60.
- 43 Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G. and Casellas, P. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **232**, 54–61.
- 44 Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. and Waku, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 89–97.
- 45 Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H. and Waku, K. (2000) Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not

- N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 605–12.
- 46 Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D. and Hipkin, R. W. (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol. Pharmacol.* **57**, 1045–50.
- 47 Oka, S., Ikeda, S., Kishimoto, S., Gokoh, M., Yanagimoto, S., Waku, K. and Sugiura, T. (2004) 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1002–9.
- 48 Kishimoto, S., Gokoh, M., Oka, S., Muramatsu, M., Kajiwara, T., Waku, K. and Sugiura, T. (2003) 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 24469–75.
- 49 Jordà, M. A., Verbakel, S. E., Valk, P. J. M., Vankan-Berkhoudt, Y. V., Maccarrone, M., Finazzi-Agrò, A., Löwenberg, B. and Delwel, R. (2002) Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood* **99**, 2786–93.
- 50 Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K. and Stella, N. (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* **23**, 1398–405.
- 51 Mimura, T., Oka, S., Koshimoto, H., Ueda, Y., Watanabe, Y. and Sugiura, T. (2012) Involvement of the endogenous cannabinoid 2 ligand 2-arachidonyl glycerol in allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **159**, 149–56.
- 52 Oka, S., Wakui, J., Ikeda, S., Yanagimoto, S., Kishimoto, S., Gokoh, M., Nasui, M. and Sugiura, T. (2006) Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice. *J. Immunol.* **177**, 8796–805.
- 53 Oka, S., Yanagimoto, S., Ikeda, S., Gokoh, M., Kishimoto, S., Waku, K., Ishima, Y. and Sugiura, T. (2005) Evidence for the involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation in mouse ear. *J. Biol. Chem.* **280**, 18488–97.
- 54 Oka, S., Wakui, J., Gokoh, M., Kishimoto, S. and Sugiura, T. (2006) Suppression by WIN55212-2, a cannabinoid receptor agonist, of inflammatory reactions in mouse ear:

- Interference with the actions of an endogenous ligand, 2-arachidonoylglycerol. *Eur. J. Pharmacol.* **538**, 154–62.
- 55 Saito, H., Hayakawa, T., Mita, H., Akiyama, K. and Shida, T. (1993) Effect of butyric acid on induction of differentiation into eosinophil-like cells in human eosinophilic leukemia cells, EoL-1 cell line: possible role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine differentiating factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **100**, 240–7.
- 56 Murao, S., Gemmell, M. A., Callahan, M. F., Anderson, N. L. and Huberman, E. (1983) Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Res.* **43**, 4989–96.
- 57 Haruna, T., Soga, M., Morioka, Y., Imura, K., Furue, Y., Yamamoto, M., Hayakawa, J., Deguchi, M., Arimura, A. and Yasui, K. (2017) The Inhibitory Effect of S-777469, a Cannabinoid Type 2 Receptor Agonist, on Skin Inflammation in Mice. *Pharmacology* **99**, 259–267.
- 58 Nagarkatti, P., Pandey, R., Rieder, S. A., Hegde, V. L. and Nagarkatti, M. (2009) Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med. Chem.* **1**, 1333–49.
- 59 Arévalo-Martín, A., Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Borrell, J. and Guaza, C. (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **23**, 2511–6.
- 60 Karsak, M., Gaffal, E., Date, R., Wang-Eckhardt, L., Rehnelt, J., Petrosino, S., Starowicz, K., Steuder, R., Schlicker, E., Cravatt, B., Mechoulam, R., Buettner, R., Werner, S., Di Marzo, V., Tüting, T. and Zimmer, A. (2007) Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science* **316**, 1494–7.
- 61 Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S. and Gokoh, M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog. Lipid Res.* **45**, 405–46.
- 62 Rothman, S. (1941) Physiology of itching. *Physiol. Rev.* **21**, 357–381.
- 63 Tominaga, M. and Takamori, K. (2014) Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: therapeutic implications. *J. Dermatol.* **41**, 205–12.
- 64 Morse, K. L., Behan, J., Laz, T. M., West, R. E., Greenfeder, S. A., Anthes, J. C., Umland, S., Wan, Y., Hipkin, R. W., Gonsiorek, W., Shin, N., Gustafson, E. L., Qiao, X., Wang, S., Hedrick, J. A., Greene, J., Bayne, M. and Monsma, F. J. (2001) Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 1058–66.
- 65 Rossbach, K., Nassenstein, C., Gschwandtner, M., Schnell, D., Sander, K., Seifert, R., Stark, H., Kietzmann, M. and Bäumer, W. (2011) Histamine H₁, H₃ and H₄ receptors are involved in

- pruritus. *Neuroscience* **190**, 89–102.
- 66 Liu, T. and Ji, R.-R. (2013) New insights into the mechanisms of itch: are pain and itch controlled by distinct mechanisms? *Pflugers Arch.* **465**, 1671–85.
- 67 Mollanazar, N. K., Smith, P. K. and Yosipovitch, G. (2016) Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **51**, 263–292.
- 68 Handwerker, H. O., Forster, C. and Kirchhoff, C. (1991) Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli. *J. Neurophysiol.* **66**, 307–15.
- 69 Schmelz, M., Schmidt, R., Bickel, A., Handwerker, H. O. and Torebjörk, H. E. (1997) Specific C-receptors for itch in human skin. *J. Neurosci.* **17**, 8003–8.
- 70 Schmelz, M., Schmidt, R., Weidner, C., Hilliges, M., Torebjörk, H. E., Handwerker, H. O., Andrew, D., Craig, A., Atanassoff, P., Brull, S., Zhang, J., Greenquist, K., Silverman, D., LaMotte, R., Beck, P., Handwerker, H., Zimmermann, M., Brull, S., Atanassoff, P., Silverman, D., Zhang, J., LaMotte, R., Chen, X., Tanner, K., Levine, J., Forster, C., Handwerker, H., Gee, M., Lynn, B., Cotsell, B., Green, B., Shaffer, G., Groene, D., Martus, P., Heyer, G., Hagbarth, K., Hongell, A., Hallin, R., Torebjörk, H., Hägermark, O., Hägermark, O., Hägermark, O., Strandberg, K., Hallin, R., Torebjörk, H., Jęftinija, S., Juhlin, L., Michaelsson, G., Kingston, W., Greaves, M., et al. (2003) Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J. Neurophysiol.* **89**, 2441–8.
- 71 Anand, U., Otto, W. R., Sanchez-Herrera, D., Facer, P., Yiangou, Y., Korchev, Y., Birch, R., Benham, C., Bountra, C., Chessell, I. P. and Anand, P. (2008) Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain* **138**, 667–80.
- 72 Sagar, D. R., Kelly, S., Millns, P. J., O’Shaughnessey, C. T., Kendall, D. A. and Chapman, V. (2005) Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 371–9.
- 73 Ibrahim, M. M., Deng, H., Zvonok, A., Cockayne, D. A., Kwan, J., Mata, H. P., Vanderah, T. W., Lai, J., Porreca, F., Makriyannis, A. and Malan, T. P. (2003) Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10529–33.
- 74 Khanolkar, A. D., Lu, D., Ibrahim, M., Duclos, R. I., Thakur, G. A., Malan, T. P., Porreca, F., Veerappan, V., Tian, X., George, C., Parrish, D. A., Papahatjis, D. P. and Makriyannis, A. (2007) Cannabilactones: A novel class of CB2 selective agonists with peripheral analgesic activity. *J. Med. Chem.* **50**, 6493–6500.
- 75 Manera, C., Cascio, M. G., Benetti, V., Allarà, M., Tuccinardi, T., Martinelli, A., Saccomanni,

- G., Vivoli, E., Ghelardini, C., Di Marzo, V. and Ferrarini, P. L. (2007) New 1,8-naphthyridine and quinoline derivatives as CB2 selective agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 6505–10.
- 76 Omura, H., Kawai, M., Shima, A., Iwata, Y., Ito, F., Masuda, T., Ohta, A., Makita, N., Omoto, K., Sugimoto, H., Kikuchi, A., Iwata, H. and Ando, K. (2008) The SAR studies of novel CB2 selective agonists, benzimidazolone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 3310–4.
- 77 Yao, B. B., Hsieh, G., Daza, A. V., Fan, Y., Grayson, G. K., Garrison, T. R., El Kouhen, O., Hooker, B. A., Pai, M., Wensink, E. J., Salyers, A. K., Chandran, P., Zhu, C. Z., Zhong, C., Ryther, K., Gallagher, M. E., Chin, C.-L., Tovcimak, A. E., Hradil, V. P., Fox, G. B., Dart, M. J., Honore, P. and Meyer, M. D. (2009) Characterization of a cannabinoid CB2 receptor-selective agonist, A-836339 [2,2,3,3-tetramethyl-cyclopropanecarboxylic acid [3-(2-methoxy-ethyl)-4,5-dimethyl-3H-thiazol-(2Z)-ylidene]-amide], using in vitro pharmacological assays, in vivo pain models, and. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 141–51.
- 78 Kuraishi, Y., Nagasawa, T., Hayashi, K. and Satoh, M. (1995) Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **275**, 229–33.
- 79 Haruna, T., Soga, M., Morioka, Y., Hikita, I., Imura, K., Furue, Y., Yamamoto, M., Imura, C., Ikeda, M., Yamauchi, A., Deguchi, M., Shichijo, M., Arimura, A. and Yasui, K. (2015) S-777469, a novel cannabinoid type 2 receptor agonist, suppresses itch-associated scratching behavior in rodents through inhibition of itch signal transmission. *Pharmacology* **95**, 95–103.
- 80 Nojima, H. and Carstens, E. (2003) 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₂ receptor involvement in acute 5-HT-evoked scratching but not in allergic pruritus induced by dinitrofluorobenzene in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 245–52.
- 81 Ikoma, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G. and Schmelz, M. (2006) The neurobiology of itch. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 535–47.
- 82 Szepietowski, J. C., Szepietowski, T. and Reich, A. (2005) Efficacy and tolerance of the cream containing structured physiological lipids with endocannabinoids in the treatment of uremic pruritus: a preliminary study. *Acta Dermatovenerol. Croat.* **13**, 97–103.
- 83 Eberlein, B., Eicke, C., Reinhardt, H.-W. and Ring, J. (2008) Adjuvant treatment of atopic eczema: assessment of an emollient containing N-palmitoylethanolamine (ATOPA study). *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **22**, 73–82.
- 84 Ständer, S., Reinhardt, H. W. and Luger, T. A. (2006) [Topical cannabinoid agonists. An effective new possibility for treating chronic pruritus]. *Hautarzt.* **57**, 801–7.
- 85 Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R. and Rice, K. C. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1932–6.

- 86 Pertwee, R. G. (1999) Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. *Life Sci.* **65**, 597–605.
- 87 Ahluwalia, J., Urban, L., Bevan, S., Capogna, M. and Nagy, I. (2002) Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones. *Neuroscience* **110**, 747–53.
- 88 Klein, T. W., Newton, C. A. and Friedman, H. (2001) Cannabinoids and the immune system. *Pain Res. Manag.* **6**, 95–101.
- 89 Nackley, A. G., Zvonok, A. M., Makriyannis, A. and Hohmann, A. G. (2004) Activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses C-fiber responses and windup in spinal wide dynamic range neurons in the absence and presence of inflammation. *J. Neurophysiol.* **92**, 3562–74.
- 90 Kajihara, Y., Murakami, M., Imagawa, T., Otsuguro, K., Ito, S. and Ohta, T. (2010) Histamine potentiates acid-induced responses mediating transient receptor potential V1 in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience* **166**, 292–304.
- 91 Nicholson, R., Small, J., Dixon, A. K., Spanswick, D. and Lee, K. (2003) Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* **337**, 119–22.
- 92 Andoh, T., Nagasawa, T. and Kuraishi, Y. (1996) Expression of tachykinin NK1 receptor mRNA in dorsal root ganglia of the mouse. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **35**, 329–32.
- 93 Maekawa, T., Nojima, H. and Kuraishi, Y. (2000) Itch-associated responses of afferent nerve innervating the murine skin: different effects of histamine and serotonin in ICR and ddY mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **84**, 462–6.
- 94 Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., Campanella, M., Nicolussi, E., Fredduzzi, S. and Reggiani, A. (2006) CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 1530–8.
- 95 Bouaboula, M., Dussossoy, D. and Casellas, P. (1999) Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses. *J. Biol. Chem.* **274**, 20397–405.
- 96 Grimsey, N. L., Goodfellow, C. E., Dragunow, M. and Glass, M. (2011) Cannabinoid receptor 2 undergoes Rab5-mediated internalization and recycles via a Rab11-dependent pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1554–60.
- 97 Atwood, B. K., Wager-Miller, J., Haskins, C., Straiker, A. and Mackie, K. (2012) Functional selectivity in CB(2) cannabinoid receptor signaling and regulation: implications for the therapeutic potential of CB(2) ligands. *Mol. Pharmacol.* **81**, 250–63.
- 98 Audet, N., Charfi, I., Mnie-Filali, O., Amraei, M., Chabot-Doré, A.-J., Millecamps, M., Stone,

L. S. and Pineyro, G. (2012) Differential association of receptor-G $\beta\gamma$ complexes with β -arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of δ opioid receptor agonists. *J. Neurosci.* **32**, 4827–40.