

令和元年6月24日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11208

研究課題名(和文)好酸球性炎症粘膜におけるTRP受容体ファミリーの発現とその機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of TRP receptor family on eosinophilic inflammation in mucous membrane

研究代表者

徳永 貴広 (Tokunaga, Takahiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：10464075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性副鼻腔炎の鼻茸細胞に、TRPV3を活性化するメントールやTRPV1を活性化させるカプサイシンを投与すると、RANTES(CCL5)、TSLP、IL-33などの炎症性サイトカインの発現が誘導された。反対に、TRPV3やTRPV1の機能をアンタゴニストで抑制することによってそれらの発現は抑制された。また、マウスにメントールやカプサイシンを経鼻投与すると、鼻粘膜組織に好酸球が誘導されることが示された。TRPV3やTRPV1は好酸球性炎症粘膜において、好酸球をはじめとした炎症細胞を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副鼻腔炎においても気管支喘息においても、その難治性の原因として粘膜における好酸球性炎症が注目を集めている。しかし、気道における好酸球性炎症の発生メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究においてTRP受容体ファミリーが気道粘膜における好酸球性炎症を誘導している可能性が示された。TRP受容体に対するアンタゴニストを用いることで、好酸球性炎症を制御できることから、今後の治療につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The menthol which activates TRPV3 and the capsaicin which activates TRPV1 induce inflammatory cytokines such as RANTES, TSLP and IL-33 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. On the other hand, antagonists of TRPV3 and TRPV1 suppress the expression of these inflammatory cytokines. Furthermore, transnasal administration of menthol and capsaicin induces eosinophil infiltration to nasal mucosa of mice. This results suggest that TRPV3 and TRPV1 may induce inflammatory cells such as eosinophils in the mucous membrane.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：好酸球性炎症 TRPV3 TRPV1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1980年代までの日本における慢性副鼻腔炎は、鼻汁および鼻茸組織中に好中球が多数認められ、感染を背景に持つ好中球性炎症が主な病態であると考えられてきた。この慢性副鼻腔炎に対する治療は、マクロライド療法と内視鏡下鼻内副鼻腔手術の進歩によって、近年治療成績が著しく向上した。

しかし、一方でこれらの治療を行っても、再発性が高く、また難治性の副鼻腔炎が存在し、次第に注目されるようになった。この難治性副鼻腔炎は、鼻茸中に著明な好酸球浸潤がみられることから、「好酸球性副鼻腔炎」と呼ばれている。

我々は、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究」により、15の共同研究施設および協力機関において、慢性副鼻腔炎1716例の術後再発性についての疫学的解析を行い、鼻茸好酸球数が400倍1視野あたり70個以上であると有意に再発しやすいことを示した。また、その解析結果を用いて、好酸球性副鼻腔炎の術前診断基準および難治性分類アルゴリズムを作成した(JESREC study: Allergy. 70(8): 995-1003, 2015)。

好酸球性副鼻腔炎の難治性が、どのような分子生物学的機序によって引き起こされているかについては、まだはっきりしていない。

我々はこれまでの研究で、難治性の好酸球性副鼻腔炎の鼻茸にTRP受容体ファミリーの1つであるTRPV3 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3)が有意に強く発現していることを示した(若手研究(B):平成26~27年度:26861360 好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸におけるTRP受容体の発現とその機能解析、投稿論文⑤)。

2. 研究の目的

TRPV3をはじめとしたTRP受容体ファミリーが好酸球性副鼻腔炎の難治性にどのように寄与をしているのかは、まだはっきりしていない。

本研究は、TRP受容体ファミリーの好酸球性炎症に関する機能を解析することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)鼻茸培養細胞におけるTRP受容体の発現制御とそれに伴う炎症性サイトカインの発現について

当院で内視鏡下副鼻腔手術を行い、採取した鼻茸から粘膜上皮細胞を抽出し培養した。培養した細胞にTRPV3アゴニスト(I-メンソール)、TRPV1アゴニスト(カプサイシン)、TRPV3およびTRPV1のアンタゴニスト(Ruthenium Red)を添加し刺激した後、細胞からmRNAを抽出し、Realtime PCRでRANTES(CCL5)、TSLP、IL-33の発現量を調べた。

(2)マウスへのTRP受容体アゴニスト投与による鼻粘膜好酸球性炎症の誘導

Balb/cマウスにPBS(コントロール)、TRPV1アゴニスト(カプサイシン)、TRPV3アゴニスト(I-メンソール)を2週間連日経鼻投与を行い刺激した後、鼻粘膜組織を採取した。フローサイトメトリーを用いて、好酸球(CD45⁺CD3⁻B220⁻CCR3⁺Siglec-F⁺)の比率を測定した。

4. 研究成果

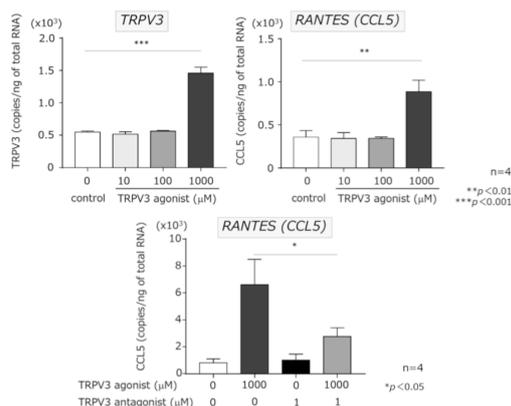
鼻茸培養細胞をTRPV3アゴニスト1000 μ Mで刺激するとTRPV3が誘導され、それに伴いRANTES(CCL5)が誘導された(図1の上段)。

一方、鼻茸培養細胞をTRPV3アゴニストで刺激しTRPV3を誘導した後にTRPV3アンタゴニストでその機能を抑制すると、RANTES(CCL5)の発現は抑制された(図1の下段)。

また、鼻茸培養細胞をTRPV1アゴニストで刺激すると、濃度依存性にRANTES(CCL5)、TSLP、IL-33が誘導された(図2の上段)。

一方、鼻茸培養細胞をTRPV1アゴニストで刺激しTRPV1を誘導した後にTRPV1アンタゴニストでその機能を抑制すると、RANTES(CCL5)、TSLP、IL-33の発現はいずれも抑制された(図2の下段)。

図1: 鼻茸細胞におけるTRPV3の発現誘導と抑制



これらの結果から、TRPV3 および TRPV1 は、好酸球に選択的な遊走活性を有するケモカインである RANTES (CCL5) の発現を誘導していること、そして上皮由来のサイトカインであり 2 型アレルギー炎症反応を惹起させると言われている TSLP や IL-33 の発現も誘導していることが示された。

次に、in vivo で TRP 受容体が好酸球性炎症を惹起しているかどうかを検討した。TRPV1 および TRPV3 のアゴニストを経鼻投与したマウスにおいては、PBS を経鼻投与したコントロールと比べて、鼻粘膜への好酸球浸潤が強いことが、フローサイトメトリーの結果から示された (図 3)。

本研究は、TRPV3 および TRPV1 が気道上皮の好酸球性炎症へどのように関与するかに注目した。

TRP 受容体ファミリーは、温度感受性の膜貫通型イオンチャンネルであり、カプサイシンレセプターである TRPV1 の研究を筆頭に、近年有望な創薬標的として注目を集めている。TRP 受容体ファミリーは神経障害性疼痛や温冷覚のみならず細胞内外の多様な化学物質や浸透圧などによっても活性化し、細胞内に陰イオンを流入させることで環境情報を電気信号に変換するトランスデューサーとしての機能を持つと考えられている。

TRP 受容体ファミリーの研究は、温度感受性についてや、神経傷害性疼痛の治療についてのものが多く、炎症に焦点を当てた研究は多くはない。しかし、一部の TRP 受容体ファミリーを発現した上皮細胞は活性化した結果、PGE2 や NGF などの炎症物質を遊離するという報告がある。また皮膚のケラチノサイトでの報告では、TRPV3 が活性化すると Ca^{2+} イオンが細胞内に TRPV3 を介して流入し、その刺激によって pro-TGF- α から TGF- α が遊離され、EGFR を介した反応を亢進させる、と報告されている。このように TRP 受容体ファミリーが炎症に関与している報告もなされている。

今回の研究では、TRPV3 および TRPV1 が好酸球の遊走を誘導するケモカインである RANTES (CCL5) や、2 型アレルギー炎症反応をひきおこす上皮由来サイトカインである TSLP および IL-33 の発現を誘導し、好酸球性炎症を引き起こすことが推測された。また、マウスによる実験でも TRP 受容体アゴニストの刺激で好酸球炎症が引き起こされていることが示された。しかし、過去の報告では、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンを副鼻腔炎患者の鼻腔に投与すると鼻茸が改善するという報告があり、本研究の結果とは矛盾している。

TRP 受容体ファミリーが気道上皮における好酸球性炎症に関与しているかもしれないが、まだ不明な点が残されている。さらなる研究でその関与が確認されれば、TRP 受容体に対するアンタゴニストが治療に応用できるかもしれない、好酸球性副鼻腔炎の治療に対する寄与は大きいと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

- ① Yamada T, Miyabe Y, Ueki S, Fujieda S, Tokunaga T, Sakashita M, 他 5 名. Eotaxin-3 as a Plasma Biomarker for Mucosal Eosinophil Infiltration in Chronic Rhinosinuitis. *Front Immunol.* 10, 74, 2019. (査読あり)
DOI: 10.3389/fimmu.2019.00074
- ② Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, Saito H, Honda K, Fukuchi M, 他 7 名. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood.* 132 (20): 2183-2187, 2018. (査読あり)
DOI: 10.1182/blood-2018-04-842260
- ③ T. Ninomiya, E. Noguchi, T. Haruna, M. Hasegawa, T. Yoshida, T. Tokunaga (16 番目), 他 16 名. Periostin as a novel biomarker for postoperative recurrence of chronic rhinosinuitis with nasal polyps. *Sci Rep.* 8 (1): 11450, 2018. (査読あり)
DOI: 10.1038/s41598-018-29612-2

図 2 : 鼻茸細胞における TRPV1 の発現誘導と抑制

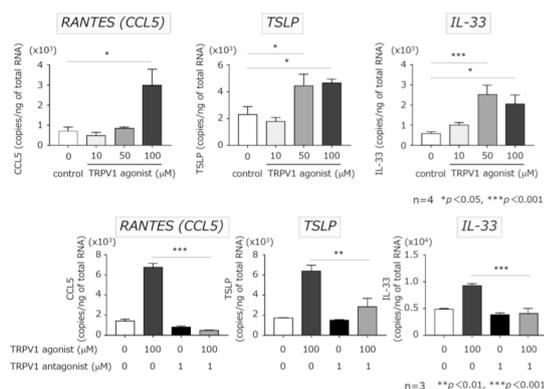
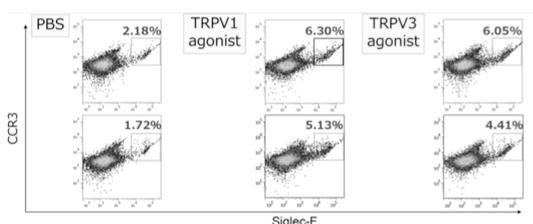


図 3 : マウス鼻粘膜への好酸球浸潤の誘導



- ④ Kato K, Takabayashi T, Sakashita M, Imoto Y, Tokunaga T, Ninomiya T, 他 4 名. The Expression and Functional Analysis of CST1 in Intractable Nasal Polyps. Am J Respir Cell Mol Biol. 59 (4): 448-457, 2018. (査読あり)
DOI: 10.1165/rcmb.2017-03250C
- ⑤ Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, Imoto Y, Sakashita M, Takabayashi T, 他 3 名. The significant expression of TRPV3 in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 66 (4): 610-616, 2017. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.alit.2017.04.002
- ⑥ Takabayashi T, Imoto Y, Sakashita M, Kato Y, Tokunaga T, Yoshida K, 他 3 名. Nattokinase, profibrinolytic enzyme, effectively shrinks the nasal polyp tissue and decreases viscosity of mucus. Allergol Int. 66 (4): 594-602, 2017. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.alit.2017.03.007
- ⑦ Ueki S, Tokunaga T, Fujieda S, Honda K, Hirokawa M, Spencer LA, 他 1 名. Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. Curr Allergy Asthma Rep. 16 (8): 54, 2016. (査読あり)
DOI: 10.1007/s11882-016-0634-5
- ⑧ 徳永 貴広, 藤枝 重治. 副鼻腔炎診療 update - 好酸球性副鼻腔炎の診断と治療. 週刊日本医事新報. 4800: 36-41, 2016. (査読なし)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 加藤 幸宣, 高林 哲司, 徳永 貴広, 二之宮貴裕, 吉田加奈子, 森川 太洋, 意元 義政, 藤枝 重治. 好酸球性副鼻腔炎における TRP チャネルの発現. 第 57 回日本鼻科学会総会・学術講演会. 2018. 9. 28: 星野リゾート OM07 旭川 (北海道)
- ② 徳永 貴広, 意元 義政, 坂下 雅文, 高林 哲司, 藤枝 重治. 好酸球性副鼻腔炎における TRPV3 遺伝子の発現解析. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016. 6. 17: 東京国際フォーラム (東京)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。