

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09753

研究課題名（和文）好酸球性副鼻腔炎におけるTRPV3の機能解析と治療戦略

研究課題名（英文）Functional analysis and therapeutic strategy of TRPV3 in eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

加藤 幸宣 (Kato, Yukinori)

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教

研究者番号：00748981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸を採取して鼻茸上皮細胞を精製し、TRPV3アゴニストで刺激すると、TRPV3は鼻茸上皮細胞からのRANTESの発現を誘導した。RANTESは、好酸球に発現しているCCR3を介して好酸球を遊走するケモカインである。鼻茸上皮細胞をあらかじめTRPV3アンタゴニストで処理した後に、TRPV3アゴニストで刺激するとRANTESの発現は抑制された。また、ナীবマウスにTRPV3アゴニストを連日経鼻投与すると、鼻内に好酸球浸潤がみられた。これらの結果から、TRPV3は鼻茸上皮細胞からのRANTES産生を誘導することで、鼻茸内での好酸球遊走を誘導す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

好酸球性副鼻腔炎の病態には鼻茸上皮細胞、線維芽細胞、肥満細胞など、様々な細胞が関与している。TLR ligands、酸、CysLTなど、様々な因子が引き金となってTRPV3の発現・機能を亢進させ、活性化したTRPV3によるカルシウムイオン流入が、上皮細胞、線維芽細胞、肥満細胞からの炎症因子の放出を誘導するとすれば、TRPV3の活性化による細胞内へのカルシウムイオン流入が、難治性鼻茸の形成メカニズムの中心となっている可能性がある。つまり、TRPV3を制御することができれば、これまでとは全く異なる好酸球性副鼻腔炎の新規治療薬の開発が可能となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Nasal epithelial cells were purified from nasal polyps collected from patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis and stimulated with TRPV3 agonist. TRPV3 induced the expression of RANTES from nasal epithelial cells, a chemokine that migrates eosinophils via CCR3 expressed on eosinophils. The expression of RANTES was suppressed when nasal epithelial cells were pre-treated with TRPV3 antagonist and then stimulated with TRPV3 agonist. In addition, intranasal administration of TRPV3 agonist to naive mice on consecutive days resulted in eosinophil infiltration in the nasal mucosa. These results suggest that TRPV3 may induce eosinophil migration in nasal polyps by inducing RANTES production from nasal epithelial cells.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：TRPV3 好酸球性副鼻腔炎 好酸球 RANTES

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎は、著しい好酸球浸潤を伴う鼻茸を有し、高度の嗅覚障害、気管支喘息を高率に合併する難治性・易再発性副鼻腔疾患である。現在の治療は外科的治療と局所・経口ステロイド投与が中心である。しかし、術後の再発率が高いために頻回のステロイド服用が必要となるケースが存在する。アトピー性皮膚炎におけるステロイド軟膏やタクロリムス軟膏、気管支喘息における吸入ステロイド薬やオマリズマブ、アレルギー性鼻炎における舌下免疫治療など、他の2型炎症性疾患では有効な新規治療薬が開発されている。一方で好酸球性副鼻腔炎では有効な治療法が存在しない。気管支喘息やアスピリン不耐症を合併する重症型好酸球性副鼻腔炎では、術後再発率は約半数であり、極めて難治性である。

近年、イオンチャネルと Th2/好酸球性炎症との関連が注目されている。例えば、鼻上皮細胞において IL-13 によって誘導される Eotaxin-3 の発現は、細胞内の H⁺ と細胞外の K⁺ を交換するイオンチャネル、H⁺K⁺ATPase に依存的であることが報告されている。また、Th2 細胞の活性化や肥満細胞の顆粒放出には、細胞質内のカルシウム濃度が関係していると言われている。TRP チャネルは、6 回膜貫通領域を有するカルシウム透過性カチオンチャネルである。1989 年にショウジョウバエ TRP 遺伝子が発見されて以降、様々な種類の TRP 遺伝子が同定されている。現在、TRP スーパーファミリーは、哺乳類では 6 つのサブファミリーに分かれており、少なくとも 29 種類の遺伝子から構成されている。TRP チャネルは多くの機能を有している。温度刺激・機械刺激・化学物質刺激などで活性化されて、痛みや痒みの感覚に関わる。また、これらの受容体は、感覚神経のみならず、皮膚や気道上皮細胞あるいは免疫細胞にも発現していることが知られており、アレルギー疾患および呼吸器疾患との関連が注目されている。例えば、難治性喘息ほど気道上皮の TRPV1 の発現が増強しているという報告や、気道上皮細胞における TSLP の誘導、ムチンの産生調節に関する報告がみられる。また、アトピー性皮膚炎では、痒みが TRP チャネルと密接に関係していることが知られている。TRPV3 に関しては、皮膚ケラチノサイトにおいて皮膚の温度感覚や創傷治癒、痛みの知覚など多くの機能を有しており、上皮細胞に発現している TRPV3 がプロスタグランジン E2 を介して疼痛感受性を調節している。一方で、鼻茸内における TRP チャネルの機能、カルシウムイオン動態に関しては全く解明されていない。

2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎の病態は、2 型炎症性反応が中心である。鼻茸内では、活性化 Th2 細胞、group 2 innate lymphoid cells (ILC2s)、上皮由来サイトカイン、線維芽細胞、肥満細胞、CST1、ペリオスチンなど、自然免疫と獲得免疫が複雑に絡み合い、多種多様な因子が関与している。難治性副鼻腔炎と様々な因子との関連を示す論文が多数報告されている。しかし実際には、ある因子のみをコントロールしても、難治性鼻茸を抑制することは困難である。これは好酸球性副鼻腔炎の病態が一方向ではなく、多方向から成るためである。経口ステロイドは多くの因子を抑制することによって、症状を抑制する。しかしステロイドの使用は副作用が問題である。従って、新たな治療戦略として、炎症惹起に関わる様々な反応に共通する因子を同定し、抑制することが必要である。

TRP チャネルは、ナトリウムイオンやカルシウムイオンを細胞内に透過させる非選択的陽イオンチャネルである。カルシウムイオンは、セカンドメッセンジャーとして細胞内における様々な反応の根幹を担っている。好酸球性副鼻腔炎においても同様であり、カルシウムイオン流入の制御は、鼻茸組織内での 2 型炎症に関わる様々な反応を抑制し、Th2/好酸球性炎症を抑える効果が期待される。

申請者は次世代シーケンサーを用いて鼻茸の RNA-seq における transcriptome 解析を行ってきた。その結果、TRPV3 が好酸球性副鼻腔炎の鼻茸、特に鼻粘膜上皮に強く発現しており、TRPV3 と好酸球に正の相関があることを発見した。従って、TRP チャネルの中でも、特に TRPV3 は好酸球性副鼻腔炎の病態に密接に関連している。本研究では好酸球性副鼻腔炎における TRPV3 の機能解析と新たな治療戦略を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 鼻茸上皮細胞株・鼻茸線維芽細胞株を用いた in vitro の実験を行う。具体的には鼻茸上皮細胞株・鼻茸線維芽細胞株を TRPV3 agonist で刺激し、Th2/好酸球性炎症関連因子 (TSLP、IL-33、IL-25、Eotaxin 1-3、RANTES、CST1、periostin、IL-5 など) の産生を real-time PCR や ELISA を用いて解析する。

- (2) 好酸球性炎症モデルマウスを用いた *in vivo* の実験を行う。マウスに抗原経鼻投与を3週間行くと、鼻組織内に著明な好酸球浸潤を認める。好酸球性炎症モデルマウスを用いて、TRPV3 と好酸球浸潤の関連を解析する。鼻粘膜好酸球浸潤は組織学的評価やフローサイトメトリー (CCR3⁺Siglec-F⁺cells) を用いて解析する。

4. 研究成果

鼻茸の RNA-seq における transcriptome 解析結果では、非好酸球性副鼻腔炎に比べて、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸で TRPV3 の高い発現量を示した。そこで、鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎患者を好酸球性副鼻腔炎と非好酸球性副鼻腔炎に分類し、TRPV3 の発現を比較検討した。採取した鼻茸における TRPV3 mRNA の発現を real-time PCR を用いて解析すると、非好酸球性副鼻腔炎患者群の鼻茸に比べて、好酸球性副鼻腔炎患者群の鼻茸で TRPV3 mRNA の発現が有意に高値であった。次に免疫組織化学を用いて、鼻茸における TRPV3 の発現を調べると、やはり非好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸に比べて、好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸で TRPV3 の強い発現を認めた。免疫組織化学では、TRPV3 は特に鼻茸上皮細胞と好酸球に発現していた。JESREC の重症度分類に応じて鼻茸を非好酸球性副鼻腔炎・軽症・中等症・重症好酸球性副鼻腔炎と分類し、TRPV3 陽性細胞数を調べると、重症度が上がるにつれて有意に増加していき、重症好酸球性副鼻腔炎患者群で最も TRPV3 の発現が高いことが明らかとなった。また、鼻茸組織中の TRPV3 陽性細胞数と好酸球数には相関関係がみられた。

TRP チャネルファミリーにおいて、TRPV1 や TRPA1、TPPM8 は、気管支喘息の病態に関与していることが報告されている。好酸球性副鼻腔炎では、特に重症好酸球性副鼻腔炎において気管支喘息と強い関連があることが知られており、やはり TRP チャネルが病態に関与していると考えられる。

好酸球性副鼻腔炎の鼻茸内では、TRPV3 が重症度に応じて発現が上昇しており、好酸球性副鼻腔炎の病態に密接に関与していることが示唆された。そこで、鼻茸中における TRPV3 の機能について解析した。好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸を採取して鼻茸上皮細胞を精製し、TRPV3 アゴニストで刺激した後に、RANTES の発現を解析した。すると、TRPV3 は鼻茸上皮細胞からの RANTES の発現を誘導した。RANTES は、好酸球に発現している CCR3 を介して好酸球を遊走するケモカインである。鼻茸上皮細胞をあらかじめ TRPV3 アンタゴニストで処理した後に、TRPV3 アゴニストで刺激すると RANTES の発現は抑制される。また、ナイーブマウスに TRPV3 アゴニストを連日経鼻投与すると、鼻内に好酸球浸潤がみられる。これらの結果から、TRPV3 は鼻茸上皮細胞からの RANTES 産生を誘導することで、鼻茸内での好酸球遊走を誘導する可能性が示唆された。一方で、免疫組織化学では TRPV3 は好酸球にも発現しているが、鼻茸内の好酸球における TRPV3 の働きに関してはまだ分かっていない。好酸球性副鼻腔炎の鼻茸で高発現している TRPV3 の役割については今後更なる機能解析を進めていく必要がある。

好酸球性副鼻腔炎の病態には鼻茸上皮細胞、線維芽細胞、肥満細胞など、様々な細胞が関与している。上皮細胞から産生される上皮由来サイトカイン、好酸球遊走因子、cystatin family の一つである CST1 や、線維芽細胞から産生される好酸球遊走因子、ペリオスチンは、好酸球性副鼻腔炎の病態に関わる重要な因子である。肥満細胞は好酸球性副鼻腔炎の鼻茸内で増加しており、肥満細胞由来の tryptase や IL-5 が、Th2 炎症の増悪や好酸球浸潤に寄与している。Toll like receptor (TLR) ligands、酸、CysLT など、様々な因子が引き金となって TRPV3 の発現・機能を亢進させ、活性化した TRPV3 によるカルシウムイオン流入が、上皮細胞、線維芽細胞、肥満細胞からの炎症因子の放出を誘導するとすれば、TRPV3 の活性化による細胞内へのカルシウムイオン流入が、難治性鼻茸の形成メカニズムの中心となっている可能性がある。つまり、TRPV3 を制御することができれば、これまでとは全く異なる好酸球性副鼻腔炎の新規治療薬の開発が可能となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Kato Y (Corresponding Author), Morikawa M, Kato E, Yoshida K, Imoto Y, Sakashita M, Osawa Y, Takabayashi T, Kubo M, Miura K, Noguchi E, Fujieda S. | 4. 巻 206 |
| 2. 論文標題 Involvement of activation of mast cells via IgE signaling and epithelial cell-derived cytokines in the pathogenesis of pollen-food allergy syndrome in a novel murine model. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Immunol. | 6. 最初と最後の頁 2791-2802 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000518. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1. 著者名 Imoto Y, Ueki S, Kato Y, Yoshida K, Morikawa T, Kimura Y, Kidoguchi M, Tsutsumiuchi T, Koyama K, Adachi N, Ito Y, Ogi K, Sakashita M, Yamada T, Schleimer RP, Takabayashi T, Fujieda S. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Elevated Serum Leptin Levels in Patients With Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Front Pharmacol. | 6. 最初と最後の頁 793607 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.793607. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Yoshida K, Takabayashi T, Imoto Y, Sakashita M, Kato Y, Narita N, Fujieda S. | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Increased Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Response to Sublingual Immunotherapy for Allergic Rhinitis. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Laryngoscope. | 6. 最初と最後の頁 2413-2420 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29563. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1. 著者名 Yamada Y, Kidoguchi M, Yata A, Nakamura T, Yoshida H, Kato Y, Masuko H, Hizawa N, Fujieda S, Noguchi E, Miura K | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in <i>Nicotiana benthamiana</i> | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Front Plant Sci. | 6. 最初と最後の頁 344 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00344 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 Osawa Y, Ito Y, Takahashi N, Sugimoto C, Kohno Y, Mori S, Morikawa T, Kato Y, Okamoto M, Kanno M, Takabayashi T, Fujieda S | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Epidemiological study of oral allergy syndrome in birch pollen dispersal-free regions | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Allergol Int. | 6. 最初と最後の頁 246-252 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.09.008 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 1. 著者名 Imoto Y, Takabayashi T, Sakashita M, Kato Y, Yoshida K, Kidoguchi M, Koyama K, Adachi N, Kimura Y, Ogi K, Ito Y, Kanno M, Okamoto M, Narita N, Fujieda S | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Enhanced 15-Lipoxygenase 1 Production is Related to Periostin Expression and Eosinophil Recruitment in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biomolecules | 6. 最初と最後の頁 1568 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10111568 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1. 著者名 Yoshida K, Takabayashi T, Kaneko A, Takiyama M, Sakashita M, Imoto Y, Kato Y, Narita N, Fujieda S. | 4. 巻 267 |
| 2. 論文標題 Baicalin suppresses type 2 immunity through breaking off the interplay between mast cell and airway epithelial cell | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Ethnopharmacol. | 6. 最初と最後の頁 113492 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2020.113492 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 Sakashita M, Tsutsumiuchi T, Kubo S, Tokunaga, T, Takabayashi T, Imoto Y, Kato Y, Yoshida K, Kimura Y, Kato Y, Kanno M, Ogi K, Okamoto M, Narita N, Fujieda S | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Comparison of sensitization and prevalence of Japanese cedar pollen and mite-induced perennial allergic rhinitis between 2006 and 2016 in hospital workers in Japan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Allergol Int. | 6. 最初と最後の頁 89-95 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.07.004 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、森川太洋、加藤永一、吉田加奈子、意元義政、坂下雅文、大澤陽子、高林哲司、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 モデルマウスを用いた 花粉-食物アレルギー症候群の基礎研究 |
| 3. 学会等名 第1回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、加藤永一、坂下雅文、大澤陽子、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 花粉-食物アレルギー症候群における 免疫治療の可能性 |
| 3. 学会等名 第34回 日本口腔・咽頭科学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、森川太洋、吉田加奈子、木戸口正典、意元義政、坂下雅文、高林哲司、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 マウスのアレルギー炎症における鼻ILC2sの役割 |
| 3. 学会等名 第60回 日本鼻科学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、森川太洋、加藤永一、吉田加奈子、意元義政、坂下雅文、大澤陽子、高林哲司、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 新規モデルマウスを用いた 花粉-食物アレルギー症候群の病態解明 |
| 3. 学会等名 第70回 日本アレルギー学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣 |
| 2. 発表標題 モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明と治療戦略 |
| 3. 学会等名 第38回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣 |
| 2. 発表標題 モデルマウスを用いた口腔アレルギー症候群の病態と治療戦略 |
| 3. 学会等名 第3回 FUKUI AIT カンファレンス（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、森川太洋、加藤永一、吉田加奈子、木戸口正典 意元義政、坂下雅文、高林哲司、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 マウスのアレルギー炎症における鼻ILC2sの役割 |
| 3. 学会等名 第2回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣 |
| 2. 発表標題 モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群 の病態解明と治療戦略 |
| 3. 学会等名 第35回 日本口腔・咽頭科学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、加藤永一、森川太洋、吉田加奈子、意元義政、坂下雅文、大澤陽子、高林哲司、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 新規モデルマウスを用いた 花粉-食物アレルギー-症候群の病態解明 |
| 3. 学会等名 第71回 日本アレルギー学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、加藤永一、吉田加奈子、木戸口正典、意元義政、坂下雅文、高林哲司、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 マウスのアレルギー-炎症における鼻 ILC2s の役割 |
| 3. 学会等名 第61回 日本鼻科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 加藤幸宣、成田憲彦、菅野真史、佐々木千愛、高林哲司、藤枝重治 |
| 2. 発表標題 甲状腺未分化癌に対するレンパチニブの効果検討 |
| 3. 学会等名 第32回 日本頭頸部外科学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|