

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17320

研究課題名(和文) 嗅覚受容による全く新しい発汗制御：熱中症予防や発汗異常の治療方法の確立にむけて

研究課題名(英文) Novel sweat regulation via olfactory receptors: Insight into prevention of heat stroke and establishment of treatment method for abnormal sweating

研究代表者

村山 直也 (MURAYAMA, Naoya)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：60835213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：特発性後天性全身性無汗症は原因なく全身の発汗を低下させ、発汗による体温調節を障害し、患者のQOLを大きく損なう難治疾患である。

我々は無汗症患者の汗腺組織の遺伝子発現を比較し、嗅覚受容体が患者の発汗部で増加し、無汗部で減少していることを発見した。さらに嗅覚受容体への作用がヒトの発汗に影響を与えることを健常者の発汗試験で確認した。そして試験管内での検討として、嗅覚受容体遺伝子を導入した培養細胞に、嗅覚受容体の作用物質を反応させたところ、活性が示された。これらの結果は、嗅覚受容体を介して発汗の制御ができる可能性を示唆しており、無汗症の治療開発や熱中症の予防に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は無汗症患者の発汗部と無汗部の遺伝子検査の結果から「嗅覚受容体」の発現を確認した。健常被験者を対象とした発汗試験や、試験管内の細胞実験で嗅覚受容体を活性化させる物質を投与することで発汗を促進あるいは抑制できる結果を得た。追加の検証として、嗅覚受容体やリガンドの構造から、より活性の強い物質の検索を行っている。これらの結果は難病である無汗症の病態解明や治療開発に加え、近年世界的な社会問題となっている地球温暖化や熱中症の対策の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Sweat maintains systemic homeostasis in humans. Although sweating disorders may cause multifaceted health problems, therapeutic options for sweat disorders are not established yet. To gain new insight into the mechanism underlying the regulation of perspiration, we compared eccrine sweat gland transcriptomes from hidrotic and anhidrotic lesions from anhidrosis patients and found out that olfactory receptors (ORs) were differentially expressed in anhidrotic and hidrotic eccrine sweat glands.

As an additional study, a sweat test and an in vitro test were performed to confirm the effect of the olfactory receptor on human sweating. As another study of in silico, we created a ligand binding prediction model from the structure of the olfactory receptor agonist and the olfactory receptor.

研究分野：皮膚科学

キーワード：無汗症 AIGA 熱中症 嗅覚受容体

1. 研究開始当初の背景

汗の機能には、大きく分けて体温調節機能、生体バリア機能、保湿機能があり、汗は生体機能を維持する上で必須のものである。体温調節機能とはヒトが暑熱環境下にいる場合や、運動をしている場合に体温を低下させるために発汗活動が生じる機能である。体表に汗をかき、その水分が蒸発する際に奪われる気化熱によって体温を低下させる。

近年、世界的に地球温暖化が問題となっている。世界各地で 1970 年代から年間で 0.05 から 0.25 程度の上昇が観測され、これは今後も続いて行く見込みとされている。地球温暖化と同様に、熱中症が社会問題になっている。気温の上昇や熱波により、日本を含めた世界中で毎年のように多くの死者を出している。日本の夏は高温に加え、高い湿度環境のため熱中症リスクは高く、エアコンの適正使用や高齢者の飲水指導が必要である。体温が上昇した際に体温調節にはたらくのは汗である。高齢者では発汗機能が低下しており、十分な体温調節機能が働かない。現代の高齢者の熱中症の原因は温度感覚の鈍麻によって「暑さに鈍く」なってしまうため、飲水量が減少することや、空調を適正温度で使用できない、などの様々な要因があるが、社会問題となっている高齢者の熱中症では発汗機能低下も一つの重要な要因と言える。また、熱中症の中にも無汗症の症例が隠れている可能性があるが、その認知度は低いと言わざるを得ない。

無汗症は先天性ライソソーム病である Fabry 病、先天性に汗腺が欠失する外胚葉形成不全症、自律神経失調を主症状とする Shy-Drager 症候群、脳梗塞や膠原病などに続発する二次性無汗症がある。中でも特発性後天性全身性無汗症 (AIGA) は、明らかな原因がなく後天性に全身の発汗低下を生じる疾患である。暑熱環境下や運動中にも汗がかけないため、体温を低下させることができず、熱中症をきたす。比較的若年に発症し、男女比は男性に多い傾向がある。就学及び就労年齢での発症は学校行事の参加や職業選択の制限を余儀無くされ患者の QOL を大きく損ねる。AIGA の治療は熱中症の予防につながると期待される。治療としてステロイドパルスが経験的に行われるが、その効果を裏付けるエビデンスはなく、無効例や再発例では頻回にステロイドパルスが施行される状況にある。「特発性」と冠するように、AIGA は原因不明であり、原因解明と治療薬開発が望まれている。

AIGA の病変部の病理組織像は汗腺の萎縮を伴う場合や汗腺の周囲に炎症細胞浸潤が見られることがある。しかし、病理像には多様性があり、これらの所見が全く見られない症例が少なからずある。病変部と健常部で明らかな差がない場合、形態学的な評価が困難であり、遺伝子レベルでの機能的な評価が必要であった。AIGA 患者は全身性に発汗が低下するが、部位によっては発汗能力が残存する部位がある。我々はここに着目し、これまでに AIGA 患者で、発汗部、無汗部の皮膚組織標本から回収した mRNA の発現を比較することで両者の機能的な差異を検討し、無汗症患者の発汗部では無汗部と比較し嗅覚受容体の発現が亢進していることを確認した。本研究では嗅覚受容体のヒト皮膚での発現の有無や、嗅覚受容体を介した発汗活動の機能的評価を実施した。

2. 研究の目的

ヒトの汗腺組織において嗅覚受容体の発現を確認し、発汗に影響を与える物質を同定する。嗅覚受容体に対する既知のアゴニストやアンタゴニストが発汗に与える影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) AIGA 症例の、発汗部、無汗部汗腺の遺伝子発現の検討 (図 1)

AIGA 患者でミノール法を行い、全身の発汗部、無汗部を特定する。

発汗部と無汗部からそれぞれ皮膚生検を行う。

パラフィン固定した組織標本をレーザーマイクロダイセクション法で汗腺だけを限定して摘出する。

RNA を回収し、RNA シークエンスする。

上記の方法で網羅的に RNA の発現を検索した。

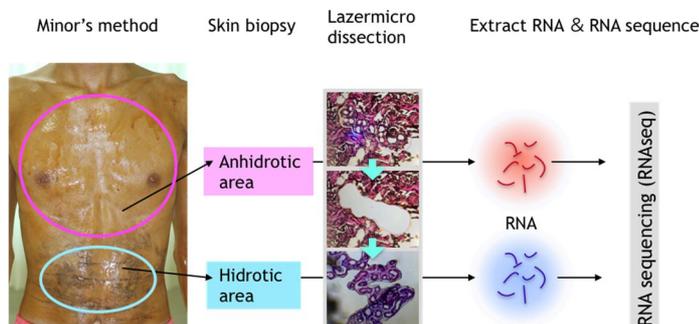


図 1 無汗症患者における遺伝子発現解析の概略

(2) 汗腺における嗅覚受容体の発現

汗腺での嗅覚受容体の発現を in situ hybridization、および免疫染色で検討した。

(3) TGF 切断アッセイを用いた嗅覚受容体に対する活性の評価

HEK 293 細胞に嗅覚受容体遺伝子発現ベクターとアルカリホスファターゼ-TGF 融合タンパク質の発現プラスミドベクター、G タンパク発現ベクターをリポフェクション法により導入し 24 時間培養する。

既知の受容体である イオンを添加し、1 時間反応させた後に上清を回収する。

回収した上清にアルカリホスファターゼの基質である p-ニトロフェニルリン酸 (p-NPP) 溶液をくわえた。p-NPP の添加後、波長 405 nm における吸光度を継続的に計測する。

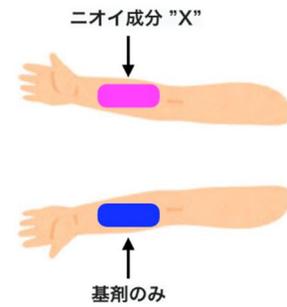


図 2 発汗機能検査

(4) 嗅覚受容体の発汗活動への作用

イオンを用いて発汗機能検査をおこなった。健康人の右前腕にイオンを単純塗布し、左前腕に基剤だけを単純塗布する。10 分間自然乾燥後に両側の前腕で同時に定量的軸索反射性発汗試験 (QSART; quantitative sudomotor axon reflex test) を行なった。

4. 研究成果

(1) AIGA の症例の発汗部、無汗部における RNA シークエンス解析

AIGA 症例の発汗部、無汗部組織から回収した RNA を用いてシークエンス解析をおこなった。有意差 $P > 0.01$ 、発現量の差が 2 倍以上を条件とすると 102 個の遺伝子が抽出された (図 3)。その中で、有汗部で発現が亢進し、無汗部で発現が低下しているものに、3 つの嗅覚受容体が含まれていた (Olfactory Receptor; OR51A7, OR6C74, OR4A15)。

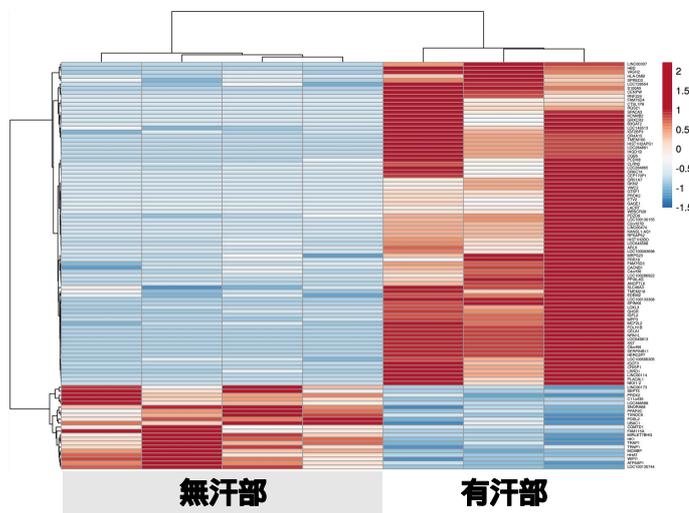


図 3 シークエンス解析結果

(2) 汗腺における嗅覚受容体の発現の確認

ヒト皮膚の汗腺における嗅覚受容体 OR51A7 の発現の有無を in situ hybridization で検討した。健康人と AIGA の発汗部では汗腺分泌部に嗅覚受容体が発現していた一方で、AIGA の無汗部では発現が低下していた (図 4)。

また、タンパクレベルの発現の有無を確認するため、免疫染色を実施した。OR51A7 に加えて、OR51A7 と同じ OR51 ファミリーの中で既知のリガンドが確認されている OR51E2 で実施した。結果は、健康人では嗅覚受容体 OR51A7、OR51E2 とともに発現が見られた。AIGA の発汗部と無汗部に

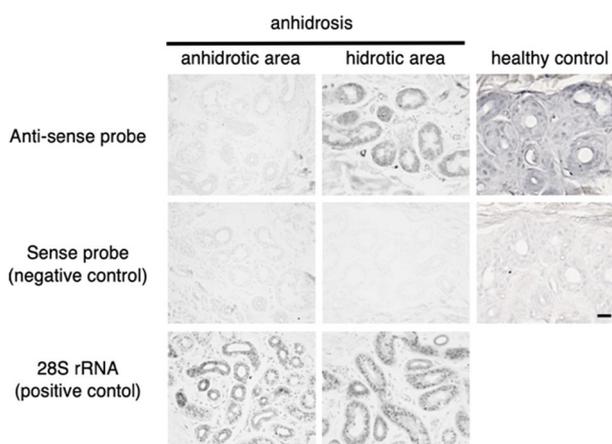


図 4 in situ hybridization 結果

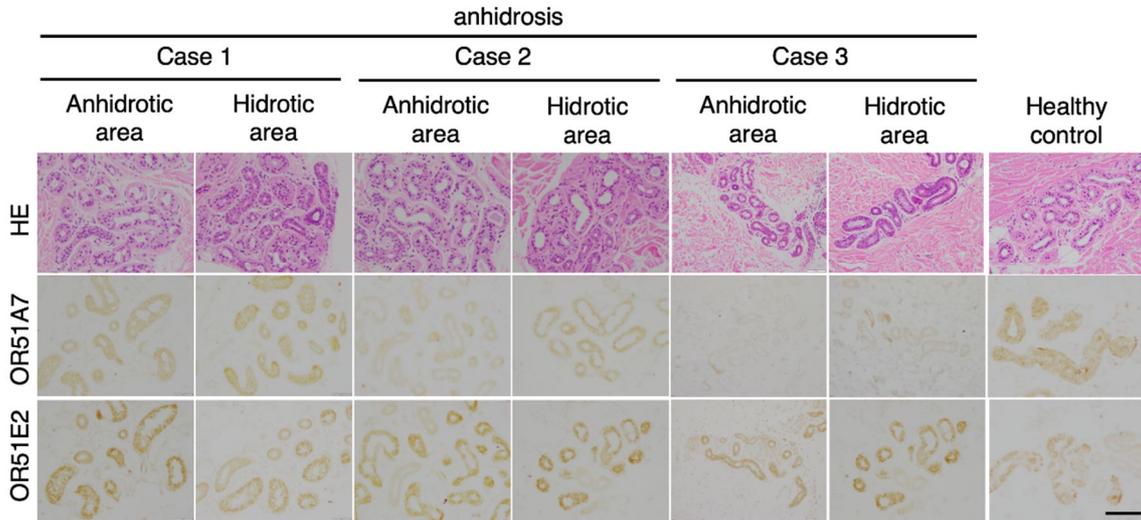


図 5 免疫組織化学染色結果

においても染色性の差は見られるが、いずれにおいても陽性であった (図 5)。

(3) TGF 切断アッセイを用いた嗅覚受容体に対する活性の評価 (図 6)

嗅覚受容体 OR51A7 または OR51E2 を介したシグナル伝達に対する Ca^{2+} の効果を調べた。既報を参考に HEK293 細胞ベースのレポーター細胞を用いたアルカリホスファターゼトランスフォーミング成長因子 (AP-TGF) シェディングアッセイシステムを採用した (Inoue A, et al. Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. Cell 2019; 177(7): 1933-47 e25.)。

HEK293 細胞を AP-TGF、OR51A7 / OR51E2、G q/i1、および/または Golf を含むプラスミドで一過性に形質転換した後、細胞に Ca^{2+} イオンを添加し、AP-TGF 融合タンパク質の細胞外ドメインの解離を測定した。

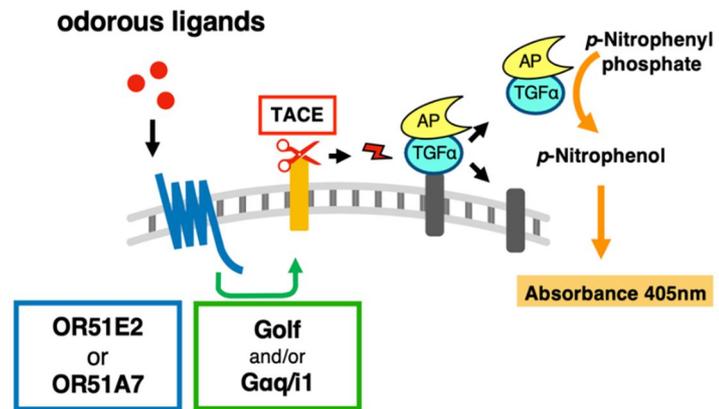


図 6 TGF 切断アッセイ法の概略

結果は、図 7 に示すように、 Ca^{2+} イオンは OR51A7、Golf および G q/i1 の存在下で濃度依存的に G タンパク質を活性化したが、G タンパク質を含まないトランスフェクタントおよび Golf または G q/i1 のみを含むトランスフェクタントでは反応は見られなかった。

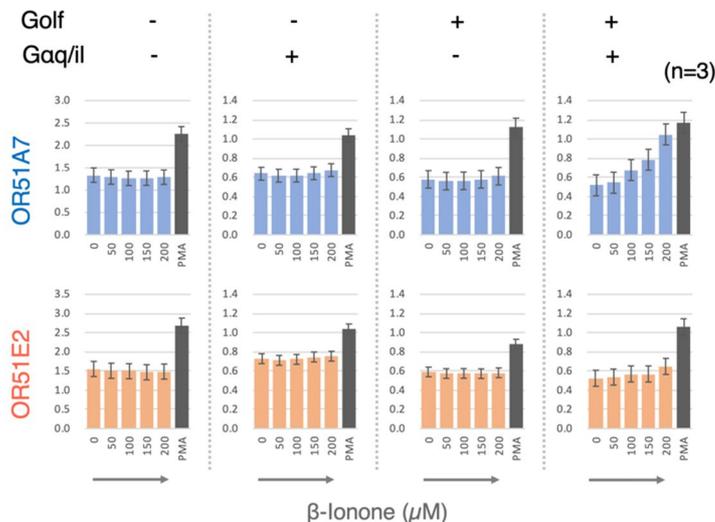


図 7 TGF 切断アッセイ結果

(4) ヒトでの嗅覚受容体の発汗活動への作用

過去の報告をもとに嗅覚受容体に特異的に作用するニオイ物質を用いて発汗機能検査をおこなった。健康人の右前腕にニオイ物質を単純塗布し、左前腕に基剤だけを単純塗布する。10 分間自然乾燥後に両側の前腕で同時に定量的軸索反射性発汗試験 (QSART; quantitative sudomotor axon reflex test) を行なった。

表 1 は男性 7 名、女性 6 名、計 13 名の健康被験者で実施した結果である。コントロールとした基剤に対してニオイ物質塗布群は 2 名では差は見られなかったが、女性では減少する傾向にあり、男性では増加する傾向にあった。

表 1 ニオイ物質を用いた発汗機能検査結果

Age	Gender	QSART (mg/5min)		daily exercise habit	smell	impact of topical β -ionone on sweating
		β -ionone	control			
50	F	0.039	0.305	+	+	decrease
49	F	0.29	0.242	-	+	not apparent
47	F	0.403	0.995	-	+	decrease
46	F	0.077	0.27	-	+	decrease
62	F	0.308	0.456	-	+	decrease
41	F	0.516	0.807	+	+	decrease
51	M	1.862	1.52	-	-	increase
35	M	1.424	0.456	+	+	increase
30	M	0.59	0.257	+	-	increase
41	M	1.484	0.219	+	+	increase
39	M	1.463	0.695	-	-	increase
39	M	0.528	0.573	+	-	not apparent
28	M	0.327	0.546	-	-	decrease

まとめ

本研究では、トランスクリプトーム解析を実施して AIGA の原因や治療標的となりうる遺伝子を発見した。エクリン汗腺での嗅覚受容体の発現は当初は予期していなかったものの組織化学的および機能的実験により、汗腺での発現および発汗のリガンド依存性活性化が確認できた。本研究における成果は、ニオイ物質による嗅覚受容体の活性化を介した発汗の調節の新しい可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 村山直也, 室田浩之	4. 巻 309
2. 論文標題 【どう診る?汗の病気】発汗検査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Derma.	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 室田浩之, 村山直也	4. 巻 309
2. 論文標題 【どう診る?汗の病気】無汗症の症状 痛み・痒みについて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Derma.	6. 最初と最後の頁 27-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 村山直也, 室田浩之	4. 巻 20
2. 論文標題 【フレッシュャーズ特集: 日常診療のコツとヒント-基本に立ち返って考えよう】(Part1)意外に知らない診察の基本(解説7) 汗の診察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Visual Dermatology	6. 最初と最後の頁 387-391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 村山直也	4. 巻 270
2. 論文標題 第119回日本皮膚科学会総会教育講演 知っておきたい無汗症の診断と治療.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 マルホ皮膚科セミナー放送内容集	6. 最初と最後の頁 25-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 村山直也, 室田浩之	4. 巻 37
2. 論文標題 【皮フのスポーツ医学-みんな皮フに包まれている-】総論 汗をかくということ.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床スポーツ医学	6. 最初と最後の頁 884-888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 江原大輔, 村山直也, 室田浩之	4. 巻 18
2. 論文標題 アトピー性皮膚炎のかゆみと汗	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 皮膚アレルギーフロンティア	6. 最初と最後の頁 11-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村山直也, 室田浩之
2. 発表標題 【教育講演 皮膚科医が知っておきたい発汗異常の基礎と臨床】 知っておきたい無汗症の診断と治療.
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山直也, 奥崎大介, 柴田恭明, 小路武彦, 井上飛鳥, 青木淳賢, 林日出喜, 石原淳, 田中義正, 室田浩之
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析を基にした発汗異常症の新規創薬 ~ 嗅覚受容体リガンドとその周辺 ~
3. 学会等名 第47回長崎障害者支援再生医療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 嗅覚受容体を介した発汗制御	発明者 室田浩之、村山直也	権利者 長崎大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-20740(P2020-20740)	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------