

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：84518

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16850

研究課題名(和文) 鼻腔内におけるアセチルコリン受容体発現パターンの異種間での比較検証

研究課題名(英文) Comparative validation of acetylcholine receptor expression patterns in the nasal cavity among different species.

研究代表者

石川 正昭 (Ishikawa, Masaaki)

兵庫県立尼崎総合医療センター(研究部)・その他・医師

研究者番号：10813743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アセチルコリン(Ach)受容体の鼻腔内での遺伝子発現パターンにおけるマウス・ラット・ヒトにおける異種間差、ヒトでは臨床背景から受ける影響をトランスクリプトーム解析にて検証した。マウス・ラット鼻腔検体では、RNAseq量不足から解析不可能であった。control、好酸球性副鼻腔炎(ECRS)、非ECRSのヒト篩骨洞粘膜を用いた解析では、アセチルコリン受容体であるCHRM1がcontrol vs. ECRSにおいて発現変動遺伝子として認められた。ECRS4症例中3症例が気管支喘息を併発していた。ECRS、非ECRSいずれも術後鼻茸を有する再発を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHRM1は、気管支喘息の病態に関与している(Maeda et al., 2006)。術後再発を起こす難治性慢性副鼻腔炎(CRS)において、controlと比較した際に好酸球性CRSのみにこのCHRM1が発現変動遺伝子として認められた。そのため、CHRM1と好酸球の関連性が難治性CRSの病態解明に重要になるのではないかと考える。好酸球が2型免疫反応に関与/2型免疫反応を制御する因子として副交感神経から放出されるAchの重要性が報告されており(Bosmans et al., 2017)、この経路はコリン作動性抗炎症反応経路として知られている。この経路に焦点を当て、難治性CRSの病態解明に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the heterogeneity in gene expression patterns of acetylcholine (Ach) receptors in the nasal/sinonasal tissues in mice, rats, and human, and the influence of clinical background on the patterns. To achieve the aim, we collected nasal/sinonasal tissues from the three different species, and then performed transcriptome analyses. In human, tissues were obtained from non chronic rhinosinusitis (CRS) as the control, eosinophilic CRS (ECRS), and non ECRS.

As a result, in mice and rats, the analyses were impossible due to the insufficient volume of RNA seq. In human, CHRM1, an acetylcholine receptor, was found as one of differentially Expressed Genes in control vs. ECRS. Three of the four ECRS patients had comorbidity of asthma. In both ECRS and non-ECRS, all patients had postoperative recurrence with nasal polyps.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：アセチルコリン受容体 慢性副鼻腔炎 気管支喘息

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎(Chronic rhinosinusitis; 以下 CRS)には通常の治療に抵抗性を有する難治症例があり、その多くが Type2 免疫反応型である。近年、この Type2 免疫反応を制御する因子として副交感神経から放出されるアセチルコリンの重要性が報告されており、今後アセチルコリンと慢性副鼻腔炎の関連性に着目した研究の増加が予測される。しかしアセチルコリン受容体の全サブタイプを対象にして、ヒトと実験動物の鼻腔内発現パターンの比較を行った研究は現時点で皆無であり、鼻腔内でのアセチルコリン受容体発現パターンに対する更なる知見の蓄積が求められる。本研究の核心をなす学術的な「問い」は「アセチルコリン受容体の鼻腔内での発現パターンは、異種間によりどのような違いを生じるのか、またアセチルコリン受容体に着目した発現パターンは臨床的因子からどのような影響を受けるのか」である。

本研究ではマウス・ラット・ヒトから得られる検体を用い、アセチルコリン受容体発現パターンの異種間差を検証した。また、ヒトでは疾患別・患者背景別に発現パターンの差異も検証した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス・ラット・ヒトから得られる鼻腔・副鼻腔粘膜を用いてトランスクリプトーム解析を行う。これにより、鼻腔・副鼻腔内に発現する因子の網羅的解析を行い、アセチルコリン受容体を中心としたコリン作動性抗炎症反応経路に関与する因子の発現解析を行う。

3. 研究の方法

マウス・ラット・ヒト検体で解剖学的に重複する構造物は、鼻中隔粘膜である。異種間でのアセチルコリン受容体発現を評価する場合、鼻中隔粘膜を対象とするのが適切である。しかし、CRS に罹患した人の検体において、一番重要視される構造物は篩骨洞粘膜である。申請者はヒト検体から得られる成果を今後の研究成果に繋げたいと考えており、ヒト検体から得られる下鼻甲介粘膜・篩骨洞粘膜を収集する事にした。またヒトでは非 CRS(コントロール)・好酸球性 CRS・非好酸球性 CRS 症例を対象とした。マウス・ラットに関しては、下鼻甲介粘膜に相当する ventral nasal meatus から得られる粘膜を収集した。これらの検体をトランスクリプトーム解析した。

4. 研究成果

マウス・ラット検体を用いた研究

マウス・ラットの鼻腔組織を ventral nasal meatus から採取した。1 検体あたり 2 µg ほどの検体量しか収集できなかった。トランスクリプトーム解析に必要な検体数の検討を行なった。マウス・ラットともに 5、10、15 検体で比較を行なったところ、いずれも検体品質不適合の判定であった。検体量の不足・1 検体収集にかかる時間といった問題が根底にあると考えた。20 検体以上の検証も考慮したが、個体差の影響も考慮し、1 症例から十分な検体量を収集できるヒト検体を対象としたトランスクリプトーム解析に焦点を当てることにした。

ヒト検体を用いた研究

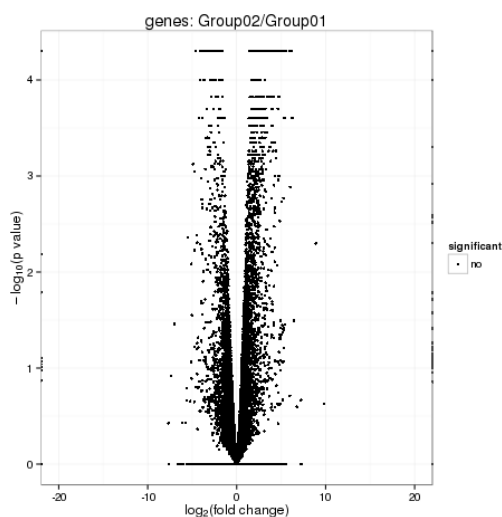
コントロール検体(副鼻腔嚢胞など)を 3 症例・非好酸球性 CRS 検体を 5 症例、好酸球性 CRS 検体を 4 症例選定し、トランスクリプトーム解析した。

各群の背景を以下に示す。なお、3 群の比較にはアウトカムが連続変数の場合 Mann-Whitney 検定、2 値変数の場合 Fisher's exact test を使用し、p<0.05 を統計学的有意とした。

	コントロール N = 3	非好酸球性副鼻腔炎 N = 5	好酸球性副鼻腔炎 N = 4	p-value
Age (Median ± IQR)	45 (39, 50)	47 (44, 50)	53 (46, 60)	0.44
Sex, male	1	2	2	1.0
Smoking index (Median ± IQR)	140 (120, 170)	140 (0, 150)	160 (115, 290)	0.38
鼻茸あり (%)	-	100	100	-
術後再発 (%)	-	100	100	-
気管支喘息 (%)	0	0	75	0.02
組織好酸球数 (Median ± IQR)	200 (170, 255)	200 (160, 430)	635 (548, 720)	0.002
末梢血好酸球 (%) (Median ± IQR)	2.3 (2.1, 2.9)	2.8 (1.5, 3)	6.0 (5.3, 6.8)	0.009

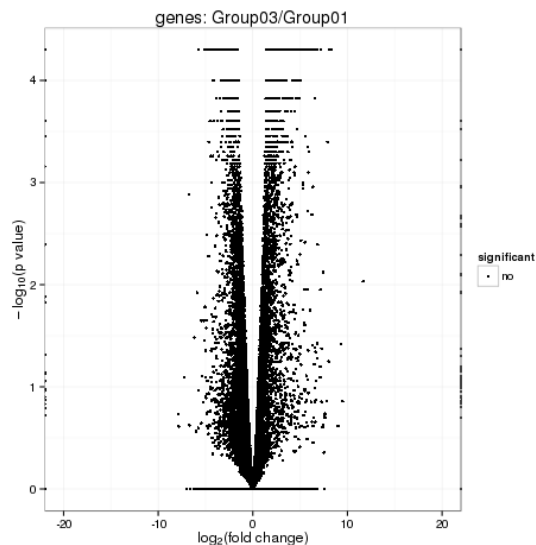
<A> コントロール vs 非好酸球性副鼻腔炎

解析により、444 の発現変動遺伝子を認めた。Up-regulated した上位因子は、IL-1B, CLC, CCL-13, AMH, OSM, SPRR18, CCL24, IL1ALINC0022, KRT16P2 であった。Down-regulated した上位 10 因子は、MEPE, HP, LPO, MUC7, OGN, LOC64483, SLC14A1, KCNA1GALNT13, SLITRK5, SMR3A であった。2 型免疫反応に代表的な因子である IL-4, 5, 13 の因子は発現変動を認めなかった。一方で、非 2 型免疫反応因子である T 細胞や NK cell・3 型免疫反応に代表的な因子の発現変動も認めなかった。これまで、鼻茸の有無で評価・分類されてきた因子を中心に検索をかけたことが原因かもしれない。術後再発する非好酸球性副鼻腔炎の病態の更なる病態解明が望まれる結果となっている。



 コントロール vs 好酸球性副鼻腔炎

解析により、111 の発現変動遺伝子を認めた。Up-regulated した上位因子は、AICDA, SPRR2D, IL17C, CXCL13, TCL1A, CCL13, C15orf48, CXCL9, UBD, CXCL10 であった。Down-regulated した上位 10 因子は、MUC7, PIP, GJC3, CHRM1, HMGS2, BP1FB2, AZGP1, TCN1, SCGB3A1, PHLDA1 であった。2 型免疫反応に代表的な因子である IL-4, 5, 13 の因子は発現変動を認めなかった。一方で、非 2 型免疫反応因子である IL17c(3 型免疫反応に特異的)、CXCL10(1 型免疫反応に特異的)に発現変動遺伝子を認めた。



コントロールと好酸球性副鼻腔炎の比較において、術後再発する好酸球性副鼻腔炎では、2 型免疫反応ではなく、1 型と 3 型免疫反応因子で発現変動が出ている点は興味深い。また抗コリン作動性抗炎症反応経路に關与するアセチルコリン受容体である CHRM1 が上位の Down-regulated 因子であったことから、コリン作動性抗炎症反応経路が難治性慢性副鼻腔炎の病態に何らかの形で關与している可能性が考慮された。CHRM1 は気管支喘息の病態に關与している事が知られており(Maeda et al., 2006)、今回好酸球性副鼻腔炎 4 症例中 3 症例が気管支喘息を併発していたことを反映していると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hatsukawa Hiroatsu, Ishikawa Masaaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Clinical Utility of Machine Learning Methods Using Regression Models for Diagnosing Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 OTO Open	6. 最初と最後の頁 e122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/oto2.122	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0件

〔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
---------	---------