

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861360

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文) Analysis of gene expression and function of TRP receptor in nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis

研究代表者

徳永 貴広 (Tokunaga, Takahiro)

福井大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：10464075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年日本において増加傾向にある難治性好酸球性副鼻腔炎(ECRS)の分子生物学的機序を解明するために、次世代シーケンサーを用いて網羅的なトランスクリプトーム解析(RNA-seq)を行った。その結果、ECRSの鼻茸において有意に高く発現している遺伝子が3個同定され、そのうち末梢血好酸球には発現していない遺伝子としてTRPV3が同定された。

TRPV3は鼻茸組織に浸潤する好酸球と粘膜上皮に強い発現を認め、重症度が高くなると有意に強く発現していることがわかった。TRPV3がECRSの難治性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) tends to be increased in recent years in Japan. Whole transcriptome analysis with next generation sequencer (RNA-seq) was conducted to investigate molecular biological mechanism of ECRS. RNA-seq showed that 3 genes were significantly highly expressed in nasal polyps of ECRS. In these genes, TRPV3 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3) was the only gene which is not expressed in peripheral blood eosinophils.

Further study showed that TRPV3 was highly expressed in infiltrating eosinophils and mucosal epithelium of nasal polyps of ECRS. This results suggested that TRPV3 may play a role of refractoriness of ECRS.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 鼻茸 TRPV3 次世代シーケンサー トランスクリプトーム

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。好酸球性副鼻腔炎の疾患概念はほぼコンセンサスを得られてきたが、診断基準や治療法等に関しては未だ議論がある。

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、投稿論文④)。

この診断基準とアルゴリズムによって、慢性副鼻腔炎は非好酸球性副鼻腔炎、軽症好酸球性副鼻腔炎、中等症好酸球性副鼻腔炎、重症好酸球性副鼻腔炎の4群に分類することができ、中等症と重症の好酸球性副鼻腔炎については、2015年7月から指定難病の対象となった。

2. 研究の目的

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。

本研究は、好酸球性副鼻腔炎の難治性に関わる発現遺伝子を網羅的に解析することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq・マイクロアレイ

当院で内視鏡下鼻副鼻腔手術を行い、採取した鼻茸を用いた。

JESREC studyを基に、各項目の診断基準を満たし、鼻茸組織中好酸球数が400倍視野で70個以上を好酸球性副鼻腔炎(ECRS)、それ以外を非好酸球性副鼻腔炎(Non-ECRS)と定義した。

ECRS 5例、Non-ECRS 5例の鼻茸組織からRNAを抽出し、rRNAを除去したのちcDNAライブラリーを作成し増幅させ、次世代シーケンサー(SOLiD5500x1)を用いてRNA-seq(全トラン

スクリプトーム解析)を行った。

解析は、Lifescop softwareを用いてhg19(UCSC transcriptome)にてゲノムマッピングを行い、Avadis NGS softwareを用いてRead depthをRPKM(reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads)単位で算出し、発現差解析を行った。

また、同じサンプルから得られたRNAでHumanHT-12_v4_Beadchipを用いて、マイクロアレイを行い、RNA-seqの結果との比較を行った。

(2) Realtime PCR, 免疫組織化学

RNA-seqとは別症例の鼻茸(ECRS 20例、Non-ECRS 20例)を用いて、realtime PCRにて発現差解析を行った。また、JESREC studyを元に、非好酸球性副鼻腔炎(Non-ECRS)、軽症好酸球性副鼻腔炎(Mild ECRS)、中等症好酸球性副鼻腔炎(Moderate ECRS)、重症好酸球性副鼻腔炎(Severe ECRS)の4群に重症度分類し、免疫組織化学を行って発現の多さと局在を確認した。

4. 研究成果

RNA-seqの結果、3個の既知遺伝子がECRS群で有意に高く発現し、7個の既知遺伝子がECRS群で有意に低く発現していた(図1、表1)。ECRS群で高発現の遺伝子のうち、過去の報告で末梢血好酸球には発現していない遺伝子としてTRPV3(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3)が同定された。

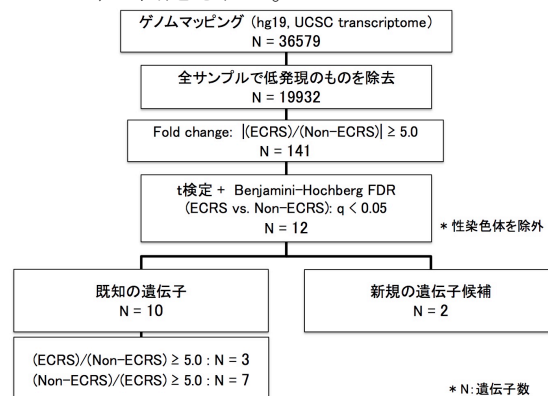


図1：発現差解析のフローチャート

(既知の遺伝子)

Gene	Locus	Gene Type	Fold change	q-value	Eosinophil**
高発現 (Fold change > 5.0)					
SIGLEC8	chr19	protein coding	7.76	0.047	(+)
TRPV3	chr17	protein coding	5.81	0.045	(-)
GPR97	chr16	protein coding	5.56	0.047	(+)
低発現 (Fold change < 5.0)					
LOC285141	chr2	protein-coding	-5.41	0.045	N.A.
HABP2	chr10	protein-coding	-6.22	0.045	(-)
CCDC153	chr11	protein-coding	-6.59	0.046	N.A.
LOC100652764	chr1	miscRNA	-6.79	0.030	N.A.
SCG3	chr15	protein-coding	-7.57	0.030	(-)
LRR18	chr10	protein-coding	-9.98	0.046	(-)
C1orf129	chr1	protein-coding	-11.47	0.030	N.A.

* t検定 + Benjamini-Hochberg FDRを施行。

Gene	Locus	Fold change	q-value
低発現 (Fold change < 5.0)			
New gene A	chr7	-6.73	0.045
New gene B	chr9	-7.26	0.045

** 好酸球への発現の有無 (Saito H, et al. Allergol Int 2006; 55:173-9) N.A.: データなし

表1：有意な発現差のあった遺伝子

TRPV3 の発現を realtime PCR で確認したところ、RNA-seq と同様に ECRS 群で有意に高いことが確認された。

免疫組織化学で確認すると、TRPV3 は組織に浸潤する好酸球と粘膜上皮に強い発現を認め、重症度が高くなると有意に強く発現していることがわかった (図 2)。

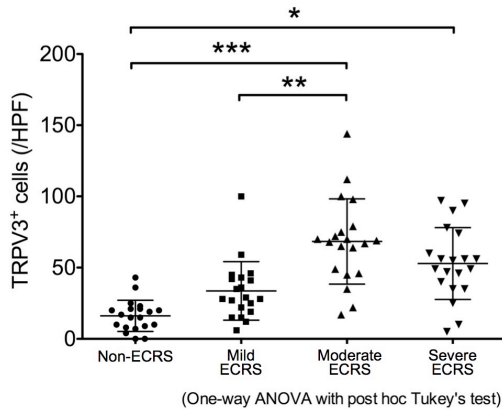


図 2 : 免疫組織化学 難治度別の TRPV3 の発現

さらに、RNA-seq とマイクロアレイの発現差解析を比較したところ、有意な相関を認めた ($R=0.75$, $p<0.0001$) (図 3)。

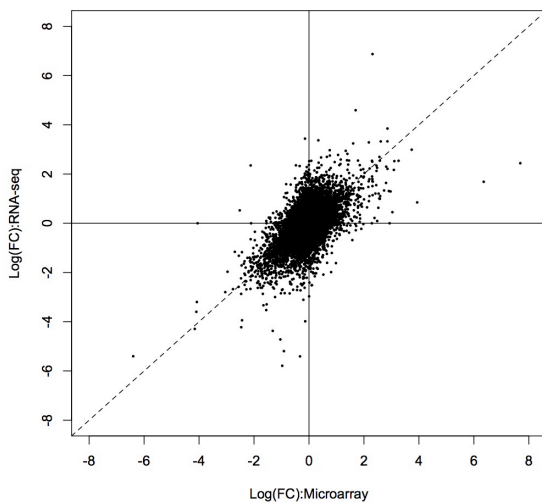


図 3 : RNA-seq とマイクロアレイの比較

チップに存在するプローブの遺伝子発現のみを同定できるマイクロアレイと比べて、RNA-seq は新規の遺伝子も含めた網羅的な遺伝子配列を解析でき、splicing variant も同定可能である。また、マイクロアレイは発現が極端に高いか、極端に低い遺伝子は正確に測定されないが、RNA-seq は発現を絶対定量で比較できる利点がある。

本研究では、鼻茸の発現差解析に RNA-seq を用いることによって、マイクロアレイでは同定しえなかった TRPV3 の発現を同定できた。

また、TRPV3 は難治性好酸球性副鼻腔炎の鼻茸組織中の粘膜上皮や好酸球に多く発現

しており、鼻茸の難治性に関与している可能性が示唆された。

本研究は、慢性副鼻腔炎を難治性によって分類し、次世代シーケンサーを用いて網羅的に鼻茸の発現遺伝子を解析しており、未だ同様の報告はなされていない。

今回同定された発現遺伝子の中で我々は TRPV3 に注目した。アトピー性皮膚炎患者の皮膚のケラチノサイトに発現する TRPV3 が樹状細胞の制御に関与しているという報告はあるが、鼻腔粘膜についての研究は認めない。

TRPV3 の属する TRP 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 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。一方、一部の TRP 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や、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、TRP ファミリーは炎症に関与している可能性も示唆されている。現在、TRP ファミリーの研究は、温度感受性についてや、神経障害性疼痛の治療についてのものがほとんどであり、炎症に焦点を当てた研究は少ない。

一方、TRPV3 はアンタゴニストも開発されており、神経傷害性疼痛に対する治験の第 II 相試験が開始されている。また、樟脳 (カンフル)、メンソール、オイゲノールなどがアンタゴニストであることも知られており、TRPV3 が治療のターゲットとなりうる可能性が高い。

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。また、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸では、TGF- α が TNF- α と共役して、ムチンの産生を亢進させるとの報告もある。

鼻茸組織でも皮膚のケラチノサイトと同様の反応が起きるとすれば、TGF- α が腺細胞・上皮細胞・線維芽細胞の増殖や血管新生を引き起こし、またムチンの産生を亢進させることによって、副鼻腔炎の難治性や再発性を高めるのではないかと推測される。現在、この証左を得るため、実験を追加して行っている。

この TRPV3 が好酸球性副鼻腔炎鼻茸での難治性炎症に関与していることが分かり、アンタゴニストやアンタゴニストが治療に応用できる可能性が明らかになれば、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

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① 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)
- ② 藤枝 重治, 徳永 貴広, 坂下 雅文. 【One airway, one disease-複眼的治療戦略-】好酸球性気道炎症の疫学と臨床. ENTONI. 182: 23-29, 2015. (査読なし)
- ③ 藤枝 重治, 坂下 雅文, 徳永 貴広, 岡野 光博, 春名 威範, 野口 恵美子(32 番目), 他 33 名. 好酸球性副鼻腔炎 診断ガイドライン (JESREC Study). 日本耳鼻咽喉科学会会報. 118 (6): 728-735, 2015. (査読なし)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibiinkoka/118/6/118_728/_article/-char/ja/
- ④ Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, Asaka D, Noguchi E (34 番目), Fujieda S (40 番目), 他 34 名. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. Allergy. 70 (8): 995-1003, 2015. (査読あり)
DOI: 10.1111/all.12644.
- ⑤ Tokunaga T, Ninomiya T, Osawa Y, Imoto Y, Ito Y, Fujieda S (11 番目), 他 5 名. Factors associated with the development and remission of allergic diseases in an epidemiological survey of high school students in Japan. Am J Rhinol Allergy. 29 (2): 94-99, 2015. (査読あり)
DOI: 10.2500/ajra.2015.29.4135.
- ⑥ 藤枝 重治, 坂下 雅文, 徳永 貴広, 岡野 光博, 春名 威範, 野口 恵美子(32 番目), 他 33 名. 好酸球性副鼻腔炎 (JESREC Study). アレルギー. 64 (1): 38-45, 2015. (査読なし)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/arerugi/64/1/64_38/_article/-char/ja/
- ⑦ 徳永 貴広, 坂下 雅文, 二之宮 貴裕, 意元 義政, 冨田 かおり, 森川 大洋, 藤枝 重治. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準. アレルギー・免疫. 22 (1): 22-28, 2014. (査読なし)

[学会発表] (計4件)

- ① 徳永 貴広, 意元 義政, 坂下 雅文, 高林 哲司, 藤枝 重治. Whole transcriptome 解析 (RNA-Seq) により同定された好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子. 第34回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2016. 2. 5: 鳥羽国際ホテル (三重)
- ② T.Tokunaga, M.Sakashita, T.Ninomiya, Y.Imoto, T.Morikawa, K.Tomita, T.Takabayashi, S.Fujieda & JESREC group. Novel scoring system and algorithm for classifying eosinophilic chronic rhinosinusitis: The JESREC Study. The 9th Biennial Symposium of International Eosinophil Society. 2015. 7. 16. シカゴ (アメリカ)
- ③ 徳永 貴広, 二之宮 貴裕, 意元 義政, 坂下 雅文, 野口 恵美子, 藤枝 重治. シンポジウム 11「アレルギーと遺伝子多型」次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析 (RNA-seq) による好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定. 第64回日本アレルギー学会学術大会. 2015. 5. 27: グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール (東京)
- ④ 徳永 貴広, 意元 義政, 坂下 雅文, 藤枝 重治. 次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析 (RNA-Seq) による好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定. 第33回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2015. 2. 26: 東武ホテルレバント東京 (東京)

[その他]

本研究成果は、第12回(2015年度)日本アレルギー学会学術大会賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 貴広 (TOKUNAGA, Takahiro)
福井大学・医学部附属病院・特命助教
研究者番号: 10464075

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤枝 重治 (FUJIEDA, Shigeharu)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 30238539

野口 恵美子 (NOGUCHI, Emiko)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 40344882