

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791658

研究課題名（和文）鼻腔における温度センサーTRP チャンネルの発現と機能の検討

研究課題名（英文）The study for the expression and the role of thermo-sensitive TRP channels.

研究代表者

柴田 美雅（SHIBATA MINORI）

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：90512187

研究成果の概要（和文）：

温度感受性 TRP チャンネルに着目し、鼻の温度感知と鼻症状惹起の機構を解明することを目的とした。

蛍光免疫染色法・共焦点レーザー顕微鏡を用い、ヒト下鼻甲介における温熱刺激受容 TRPV1・寒冷刺激受容 TRPM8 の局在、および炎症性メディエーター（SP、CGRP）、神経マーカー（PGP9.5）との共存の有無を検討した。

自律神経系を介する既知の経路とは異なる、新たな鼻症状惹起経路が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The relationship between the nose and thermo-sensitive TRP channels using fluorescent immunohistochemistry and confocal laser scan microscope was examined. Specific distribution of TRPV1 and TRPM8 was found in the human inferior turbinate. Moreover, co-localization of the inflammatory mediators SP, CGRP, a nerve marker PGP9.5 with TRPV1 and M8 were examined.

These findings suggest the possibility of a new mechanism to regulate the nasal conditions without autonomic nerve reflex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻科学 温度センサー TRP チャンネル ヒト

1. 研究開始当初の背景

鼻腔領域におけるつらい自覚症状の3主徴は、くしゃみ・鼻漏・鼻閉である。鼻症状は生死に直結するわけではないものの、quality of life を大きく低下させる。近年、

我が国におけるアレルギー性鼻炎の罹患率は増加し、特に働き盛りといわれる30～50歳代の年齢層に多く、もはや国民病と言っても過言ではない。アレルギー性鼻炎は、社会的な生産効率の低下や国の医療費の増大に深く関わっており、これまで軽視されてきた

鼻症状の改善は、今や重要な課題である。

冷たい外気を吸い込むと急にくしゃみ・鼻水が出る、暖かい浴室に入ると詰まっていた鼻の通りが急に良くなる等、我々は日常生活を通じて鼻症状が温度と密接に関係していることを体験している。しかし、鼻腔が如何に温度を感知し、どのようなメカニズムで鼻症状を惹起するかについてはあまり検討されていない。

最近、基礎研究分野では、様々な刺激を感知する TRP (transient receptor potential) チャネルがトピックとなっており、その研究成果が他科臨床分野へ応用され始めている。TRP は、1989 年に発見されたショウジョウバエの光受容応答変異株の原因遺伝子 *trp* の遺伝子産物である。現在、TRP チャネルには 7 つのサブファミリーがあり、疼痛・温度・浸透圧・機械刺激などを感知するポリモーダルな 6 回膜貫通型イオンチャネルで、体内の様々な部位に発現している。

この内、温度感受性を有する TRP チャネルが 9 種類発見されている。各々の活性化温度閾値が異なり、熱刺激で活性化されるものが 2 種 (TRPV1: 42~53°C, TRPV2: 52°C)、冷刺激で活性化されるものが 2 種 (TRPM8: 25°C, TRPA1: 17°C以下)、温刺激で活性化されるものが 5 種 (TRPV3: 32°C以上, TRPV4: 27°C以上, TRPM2, TRPM4-5) ある。

温度感受性 TRP チャネルの内、最初に発見された TRPV1 は、426 アミノ酸からなる蛋白質で、熱刺激の他にもトウガラシの辛み成分であるカプサイシン、酸、炎症性物質等、多様な刺激で活性化される。また、弱い酸性化により活性化温度閾値が低下し、炎症性物質の ATP、ブラジキニンが、PKC を介して TRPV1 のリン酸化を行い、体温以下に活性閾値が下がる。TRPV1 は当初、末梢感覚神経で発現が確認されたが、気管支上皮、気道平滑筋、ケラチノサイト、膀胱上皮、肝細胞、免疫担当細胞など神経細胞以外にも発現していることが判明した。

他科領域では、TRPV1 の基礎研究や臨床への応用が既に始まっている。呼吸器分野では、慢性咳嗽患者の気道上皮において、TRPV1 を発現する神経数および気管支平滑筋における TRPV1 の発現の増加。喘息では、TRPV1 発現神経の興奮により、気道収縮や気管支腺からの漿液性分泌が、また TRPV1 のアゴニストのエタノールが、気管支毛細血管の漏出を来たすことが判明している。下気道における TRPV1 の発現と、過敏性の亢進

の関係が証明され、TRPV1 のアンタゴニストが、呼吸器疾患の治療薬として用いられる可能性が高まっている。

泌尿器科領域では、過活動膀胱に対し、TRPV1 の脱感作の特性を生かしたカプサイシン (TRPV1 のアゴニスト) の膀胱内低濃度投与が試験的に行われている。

また、皮膚科やペインクリニック分野では、帯状疱疹の疼痛コントロールに対し、カプサイシンクリーム塗布が行われている。また、海外では関節リウマチの関節痛・神経痛および糖尿病性神経痛にも使用されている。

TRPV1 以外の温度感受性 TRP チャネルも、多彩な分布と機能を有す。TRPM8 は前立腺、後根神経節や三叉神経節の感覚細胞に発現が見られ、25°Cの冷刺激で活性化し、リガンドであるメントールにより活性化温度閾値が上昇することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、「温度感受性 TRP チャネル」を手掛かりとした「鼻の温度感知と鼻症状を惹起するメカニズム」を検討することを目的とし、下記 2 段階で実験を行った。

- (1) ヒト下鼻甲介における温度感受性 TRP チャネル (TRPV1, TRPM8) の発現の有無および発現部位の検討。
- (2) ヒト下鼻甲介における炎症性メディエーター CGRP、substance (SP) や、神経分布と、温度感受性 TRP チャネルとの位置関係の検討。

3. 研究の方法

内視鏡下に摘出されたヒト下鼻甲介検体を用いて、蛍光免疫組織化学的染色法を行った。使用する各種抗体の至適希釈濃度を検討後、下記実験を行った。

- (1) 下鼻甲介を 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、スクロース化した後、クリオスタットにて 7 μ m の貼付切片を作成した。

室温にて PBST で洗浄後、ヤギ血清でブロッキングし、1 晩 4°Cにて 1 次抗体 (ウサギポリクローナル抗 TRPV1 または抗 TRPM8 抗体) 溶液で incubation した。尚、1 次抗体を

添加していない溶液で incubation したものを、陰性コントロールとした。

PBST で洗浄後、2 次抗体 (Alexa488 標識ヤギ抗ウサギ抗体) を用いて、室温で 1 時間 incubation した。PBST、次いで PB にて洗浄後、退色防止剤入り封入剤を用いて切片を封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて切片を観察し、Z-stack 画像を取得した。

(2) (1) と同様に Alexa488 で TRPV1 または TRPM8 を染色した後、蛍光二重免疫組織化学的染色法にて、炎症性メディエーター (SP, CGRP)、神経マーカー (PGP9.5) を Alexa568 で染色し、両者の位置関係 (共存の有無) を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

4. 研究成果

熱刺激感受性 TRPV1 の免疫陽性反応は、ヒト下鼻甲介の線毛上皮細胞、粘膜下鼻腺および知覚神経線維に見られた。また、TRPV1 免疫陽性の知覚神経には、炎症性メディエーターの SP および CGRP の共存が見られるものがあった。

一方、寒冷受容体 TRPM8 の免疫陽性反応は、線毛上皮細胞、海綿状組織、血管中膜および一部の粘膜下鼻腺に見られた。しかし、TRPV1 と違い、粘膜下神経線維には免疫陽性反応は見られなかった。

TRPV1 は通常 42°C 以上で活性化するが、pH が低下するとその活性化温度閾値が体温に相当する温度まで低下することが判明している。炎症組織では pH が低下するため、鼻炎を有する下鼻甲介では、知覚神経 c 線維に存在する TRPV1 が、体温で活性化される可能性がある。それにより、炎症性メディエーター (SP, CGRP) を放出して、血管の拡張やその他の鼻症状の出現を促進している可能性が推測される。

また、25°C 以下の寒冷刺激が、線毛上皮細胞・海綿状組織・血管中膜・粘膜下鼻腺に存在する TRPM8 を活性化させることで、線毛運動、鼻汁分泌、血管収縮を直接制御している可能性が推測された。

即ち、これまで知られてきた自律神経系を介する神経経路を介さずに、温度刺激を感知した鼻内の各組織が、直接鼻症状を惹起したりコントロールするという、全く新しいメカニズムが存在する可能性が示唆された。

本実験では、温度感受性 TRP チャネルの

内、TRPV1 と M8 に注目して検討を行った。今後、他の温度感受性 TRP チャネルについても検討を進めることで、新薬の開発や、温度コントロールによる新規治療法が開発される可能性が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

①柴田美雅, グウエン カック ホン, 若杉哲郎, 鈴木秀明:
ヒト鼻粘膜における寒冷受容体 TRPM8 の発現の検討 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2011 年 2 月 11 日 大分

②柴田美雅, 若杉哲郎, 北村拓朗, グウエンカック ホン, 鈴木秀明:
アレルギー性鼻炎を有するヒト下鼻甲介における温度感受性 TRP チャネルの発現の検討 第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2010 年 5 月 22 日 仙台

③柴田美雅, 若杉哲郎, 實地信介, 北村拓朗, 鈴木秀明:
ヒト下鼻甲介における温度感受性 TRP チャネルの発現の検討 第 48 回日本鼻科学会 2009 年 10 月 3 日 松江

④Shibata M, Wakasugi T, Suzuki H:
The relationship between nose and temperature -implication of thermo-sensitive transient receptor potential 第 36 回国際生理学会世界大会 2009 年 7 月 30 日 京都

⑤柴田美雅, 若杉哲郎, 實地信介, 北村拓朗, 平木信明, 鈴木秀明:
鼻における温度感知と温度感受性 TRP チャネルの関係について 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2009 年 5 月 16 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 美雅 (SHIBATA MINORI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：90512187