

令和元年6月21日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09583

研究課題名(和文) 抗原非特異的な喘息増悪の病態におけるTRPチャンネルの役割に関する研究

研究課題名(英文) The role of TRP channel in the pathogenesis of antigen-nonspecific asthma exacerbation

研究代表者

町田 健太郎 (Machida, Kentaro)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：90597569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：喘息患者は、温度の変化により増悪を起こすことがあるがその詳細なメカニズムは不明である。本研究では、化学的・物理的刺激を感受するセンサーとして多様な生体機能に関わっているTRP-Xチャンネルの遺伝子改変マウスを用いて、TRP-Xチャンネルの喘息病態への関与について検討を行った。パパイン誘導性喘息モデルに低温暴露を加えると、野生型マウスではパパイン投与単独と比較して好酸球性気道炎症の増悪を認めた。一方、TRP-Xチャンネル遺伝子改変マウスでは、低温暴露による好酸球性気道炎症の増悪が抑制されていた。本研究により、TRP-Xチャンネルは温度変化による喘息の増悪に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、今までに十分には明らかにされていない温度変化による喘息増悪のメカニズムに、TRPチャンネルが関与していることが明らかとなった。今後更に詳細な分子メカニズムを明らかにする事によって、TRPチャンネルやそのシグナル経路を標的とした新たな創薬に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Asthmatic patients sometimes experience exacerbation by changes in temperature, but the precise mechanism is unknown. In this study, we investigated the involvement of TRP-X channel in the pathogenesis of temperature evoked asthma exacerbation using genetically modified mice of TRP-X channel involved in various biological functions as sensors that sense chemical and physical stimuli. Mice were exposed to cold temperature stimuli with papain administration intra-nasally, wild type mice showed exacerbation of eosinophilic airway inflammation compared to papain administration alone. On the other hand, in TRP-X channel genetically modified mice, cold temperature induced exacerbation of eosinophilic airway inflammation was suppressed. This study revealed that TRP-X channel is involved in the pathogenesis of cold temperature induced exacerbation of eosinophilic airway inflammation in asthma.

研究分野：呼吸器

キーワード：TRPチャンネル 気管支喘息 気道炎症 温度変化 免疫制御機構

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗原特異的なアレルギー性気道炎症増悪のメカニズムについては、近年、理解が進んできている。しかし、喘息患者は感作されている抗原に暴露される以外にも、ウイルス感染、大気汚染物質への曝露や気圧・温度の変化などの非特異的の刺激で症状が増悪することがあり、この抗原非特異的な刺激による症状・炎症増悪のメカニズムについては未だ解明されていない点が多い。

TRP (transient receptor potential) チャネルは主に感覚神経終末に発現する非選択性陽イオンチャネルであり、物理・化学的な刺激のセンサーとしてさまざまな細胞外刺激の感知を行っている。哺乳類では遺伝子配列の相同性の違いから大きく6つのサブクラスに分類されている。TRP が気道上皮細胞や免疫・炎症細胞に発現していること、また、重症喘息患者では気道上皮で TRPV1 チャネルの発現が亢進していることが報告されており、喘息の病態に TRP チャネルが関与する可能性が考えられる。

ウイルス感染、大気汚染物質への曝露や温度の変化などの抗原非特異的な刺激による喘息増悪に2型自然リンパ球 (ILC2) が関与することが報告されているが、ILC2 の制御機構については不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、TRP チャネルのセンサーとしての役割に注目し、抗原非特異的な刺激による喘息の病態への TRP チャネルの関与、その分子メカニズム、炎症/免疫応答の制御機構を明らかにすることを目的とした。また、TRP チャネルを介した ILC2 の制御機構についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

TRP チャネル遺伝子欠損マウスと野生型マウスにパパイン (25  $\mu$ g/40  $\mu$ L) を3日連続で経鼻投与を行い喘息モデルを作成した。温度変化刺激モデルは、パパイン投与後に22°Cと4°Cの温度刺激を12時間間隔で行った。

パパイン最終投与24時間後に気管支肺胞洗浄を行い、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数を測定した。

BALF 中の2型サイトカイン (IL-5、IL-13) の濃度を ELISA で測定した。また、肺組織での2型サイトカイン (IL-5、IL-13) の発現を定量 PCR で測定した。

肺における TRP チャネルの発現細胞を同定するために、野生型マウスの肺組織の免疫組織染色を行い、TRP チャネルの発現部位、発現細胞の同定を行った。さらにパパイン投与前後における TRP チャネル mRNA 発現量の変化についても検討した。

TRP チャネルを介した2型自然リンパ球 (ILC2) の制御機構を検討するために、BALF 中、および、マウス肺組織の浮遊細胞中の ILC2 をフローサイトメトリーで同定し、細胞数を比較した。また、肺組織浮遊細胞中の ILC2 を単離し、ILC2s における TRP チャネル mRNA 発現を定量 RT-PCR で解析した。

### 4. 研究成果

TRP チャネルの遺伝子欠損マウスを用いたパパイン誘導性気管支喘息モデルでは、野生型マウスと比較して好酸球性気道炎症が減弱しており、肺での IL-5、IL-13 の mRNA レベルでの発現や気管支肺胞洗浄液中の IL-5、IL-13 の濃度が低下傾向であったが有意差は認めなかった。

TRP チャネルの温度センサーとしての役割に注目し、パパイン誘導性喘息モデルに12時間おきに22°Cと4°Cの温度変化の刺激を行なった。

野生型マウスではパパイン投与に温度変化の刺激を加えると、パパイン投与単独と比較して好酸球性気道炎症の増悪を認めた。一方、TRP チャネル遺伝子欠損マウスでは、温度変化刺激による好酸球性気道炎症の増悪が抑制されていた (図1)。

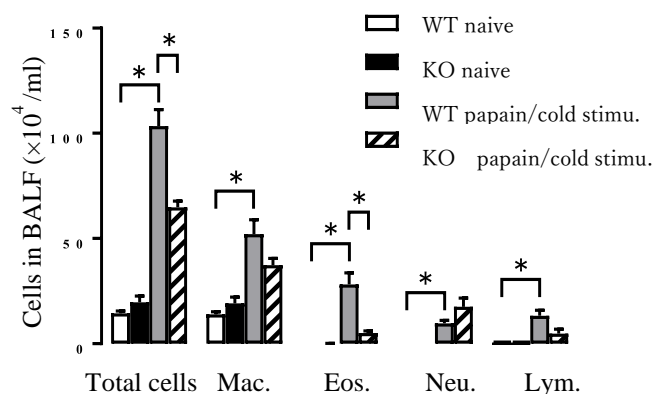


図1. 気管支肺胞洗浄液中の細胞数

肺での IL-5、IL-13 の mRNA レベルでの発現や気管支肺胞洗浄液中の IL-5、IL-13 の濃度が低下していた。

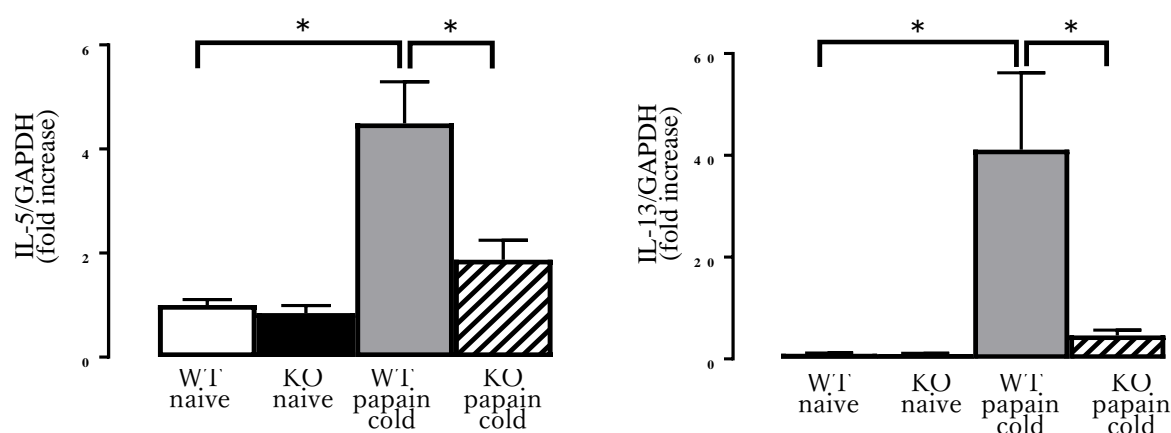


図 2. 肺組織におけるサイトカイン発現

さらに TRP 遺伝子欠損マウスでは、気道の ILC2 細胞数が減少していた。TRP チャンネルの肺での発現を検討したところ上皮細胞で発現を認めた。ILC2 細胞には TRP チャンネルは発現していなかった。

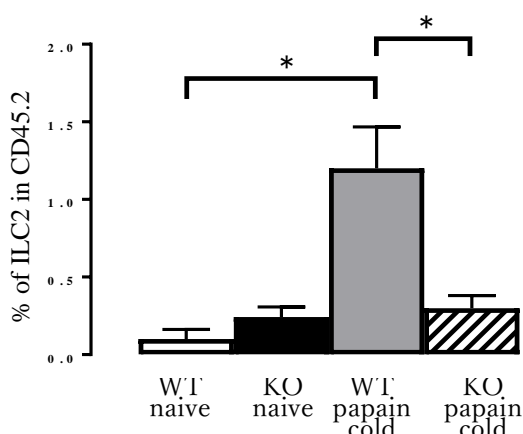


図 3. 気管支肺胞洗浄液中の ILC2

本研究により、気道上皮に発現している TRP チャンネルは、ILC2 の機能を制御することで、温度変化による喘息の炎症増悪に関与していることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① Takahiro Mathuyama, Kentaro Machida, Kota Sakaue, Koichi Takagi, Hiromasa Inoue  
TRPA1-deficient mice were suppressed airway inflammation in a papain induced model  
American Thoracic Society 2019 (国際学会) 2019 年
- ② Kentaro Machida  
Type 2 innate lymphoid cells expressing death receptor 3 are increased in airway of mild atopic asthmatic subject following allergen inhalation challenges  
2018 AAAAI/WAO Joint Congress (国際学会) 2018 年
- ③ Kentaro Machida  
Type 2 Innate Lymphoid Cells Up-Regulate DR3 Expression Upon Stimulation with IL-2 and IL-33  
American Thoracic Society 2017 (国際学会) 2017 年
- ④ 井上博雅  
喘息の病態と分子標的薬の可能性…重症喘息に対する分子標的薬の進歩

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：井上 博雅

ローマ字氏名：Inoue Hiromasa

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8 桁）：30264039

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：高木 弘一

ローマ字氏名：Takagi koichi

研究協力者氏名：松山 崇弘

ローマ字氏名：Mathuyama Takahiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。