

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08513

研究課題名（和文）アレルギー性気道炎症における侵害刺激受容体TRPV2の役割

研究課題名（英文）Role of TRPV2 in antigen-induced airway inflammation

研究代表者

前澤 裕子（Yuko, Maezawa）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00724923

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：気管支喘息の有病率は増加傾向にあり、病態解明に基づくさらなる治療法の開発が求められている。本研究では、アレルギー性気道炎症におけるTRPV2の役割に焦点を当て、その機能を明らかにすることを目的とした。その結果、気道および肺におけるTRPV2発現がCD4陽性T細胞、樹状細胞、自然リンパ球（ILC）、気道上皮細胞、および好酸球等の炎症細胞および非炎症細胞において認められ、アレルギー性炎症の慢性炎症抑制に関与する可能性を明らかとした。また、各種転写因子欠損細胞の知見から、炎症細胞機能に関与する可能性を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息の標的特異的治療法としてIgEやTh2サイトカイン特異的抗体製剤が重症例に限定して使用される一方で、軽症例から重症例までに共通して治療薬の中心となっているのは依然としてステロイドや β_2 受容体刺激薬といった非特異的治療法であり、病態の解明に基づいたさらなる治療法の開発が求められている。気管支喘息の病型のうち最も有病率の高いアレルギー性喘息の機序の解明は、アレルギー性鼻炎や結膜炎など即時型アレルギーの病態を共通とする疾患の解明にも寄与するため、社会的意義が高いと考えられる。今回焦点を当てたTRPV2に関する知見は未だ少なく、アレルギー疾患のさらなる解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The precise mechanisms of antigen-induced airway inflammation is not fully clarified. I aimed to determine the role of TRPV2 in antigen-induced airway inflammation. For this purpose, I analyzed the expression patterns of TRPV2 in the mouse airways under HDM-induced acute/chronic inflammation and found that TRPV2 expression was seen in inflammatory/non-inflammatory cells such as CD4+ T cells, CD11b+DC, ILC, eosinophils, ILCs and airway epithelial cells. The expression levels were also maintained in chronic phase. Next, I aimed to determine the role of TRPV2 in airway inflammation using inflammatory/non-inflammatory cell-specific TRPV2 gene deletion models. For this purpose, I tried to construct inflammatory/non-inflammatory cell-specific TRPV2 gene deficient mice.

研究分野：アレルギー性炎症

キーワード：アレルギー性気道炎症

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の有病率は国内外ともに一貫して増加傾向にある。標的的特異的治療法として IgE や Th2 サイトカイン特異的抗体製剤が重症例に限定して使用されるが、軽症例から重症例までに共通して治療薬の中心となっているのは依然としてステロイドや β_2 受容体刺激薬といった非特異的治療法であり、病態の解明に基づいたさらなる治療法の開発が求められている。気管支喘息の病型のうち最も有病率の高いアレルギー性喘息ではアレルゲン刺激に対するアレルギー性気道炎症が病態の本質であり、その成立には Th2 細胞、Th17 細胞、自然リンパ球 (innate lymphoid cell (ILC)) などの血球系細胞に加え、気道粘膜上皮細胞などが関与しており、それらの病態における役割が解析されてきた。一方、近年になり transient receptor potential cation channel (TRP channel) family の気道での役割についても注目されている。

TRP channel family は温度変化や pH、浸透圧、化学物質など多彩な物理化学的刺激に反応し Ca^{2+} を中心に陽イオンの細胞内流入を引き起こすことで細胞外環境に対する侵害受容器として機能する。最も研究されている TRPV1 では I 型糖尿病における膵島の炎症制御への関与 (Cell 2006) など炎症性疾患における TRP channel 分子の重要性を示唆する報告がなされている。その一方、TRPV2 はマクロファージおよび樹状細胞の貪食能 (Biochem Biophys Res Commun 2010)、マスト細胞の脱顆粒 (J Exp Med 2004)、T 細胞の活性化 (Proc Natl Acad Sci USA 2008) への関与、ヒト喘息患者末梢リンパ球での遺伝子発現の亢進 (J Asthma 2013)、遺伝子多型と喘息患者の気道過敏性との関連 (Am J Respir Crit Care Med 2017) といった報告がなされており、これらの報告から喘息の病態形成における TRPV2 の関与が示唆されるものの、TRPV2 が如何にアレルギー性気道炎症に関与するかは未解明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、アレルギー性気道炎症における TRPV2 の役割に焦点を当て、遺伝子改変マウス等を用いてその機能を明らかにするとともに、喘息患者における TRPV2 発現の意義について検討し、喘息の新規治療法開発に向けた基軸を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗原誘発性気道炎症における TRPV2 発現細胞の解析

野生型 B6 マウスを用いた HDM 誘発性気道炎症モデルから肺組織を採取し、TRPV2 発現について解析を行う。また、既存のデータベースを活用し成熟肺組織・各種細胞分画及び疾患モデルマウス等における TRPV2 の発現を検討する。

(2) TRPV2 遺伝子改変マウスの樹立と TRPV2 発現のアレルギー性気道炎症への影響

気道上皮細胞、肺胞マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞における Tcf21 の役割を検討するため、気道上皮特異的 TRPV2 欠損マウス (CCSP-Cre/TRPV2 floxed mice)、マクロファージ特異的 TRPV2 欠損マウス (LyzM-Cre/TRPV2 floxed mice)、CD4 陽性 T 細胞特異的 TRPV2 欠損マウス (CD4-Cre/TRPV2 floxed mice)、好酸球特異的 TRPV2 欠損マウス (EPX-Cre/TRPV2 floxed mice) を定法にて樹立し、HDM 誘発性気道炎症のフェノタイプを野生

型マウスと比較する。ILC2 に発現する TRPV2 の機能解析については Rag-2/ γ c ダブル欠損マウスに血球系細胞特異的 TRPV2 欠損マウス(VAV-Cre/TRPV2 floxed mice) あるいはコントロールマウスから調整した肺 ILC2 を養子移入し、IL-33 を経気道投与後の気道炎症を比較する。

(3) 気道炎症における TRPV2 の作用機構の解析

研究計画(2)にて樹立した細胞種特異的 TRPV2 欠損マウスのうち最もフェノタイプが強いマウスについて、HDM 誘発性気道炎症を惹起後、TRPV2 を欠損させた細胞及び野生型細胞を肺組織から単離する。それらにおける遺伝子発現を RNA-sequence 法により比較解析し、TRPV2 発現により正負の制御を受ける遺伝子群を網羅的に探索する。

(4) 喘息患者における TRPV2 および関連分子の発現の解析

喘息患者および健常者の肺組織における TRPV2 及び関連分子の発現について検討を行い、喘息重症度など臨床症状との比較を行う。

4. 研究成果

(1) 抗原誘発性気道炎症における TRPV2 発現細胞の解析

マウス健常肺組織、およびアレルギー性気道炎症肺における細胞種別での TRPV2 発現の詳細は不明である。そこで、野生型 B6 マウスおよびアレルギー性気道炎症を誘発したマウスの肺組織について TRPV2 の発現を検討した。気道炎症はチリダニ (house dust mite(HDM)) 抗原を経気道的に投与し誘導した。その結果、無処置の肺において TRPV2 の発現は CD4 陽性 T 細胞、樹状細胞、自然リンパ球 (ILC)、および好酸球において発現が認められた (図 1)。また、気道上皮細胞においても TRPV2 は低発現量ではあるがその発現が確認できた。マウス ILC、好酸球、および気道上皮細胞における TRPV2 発現に関しては研究開始時点での既報はなく、今回新たに見出された。

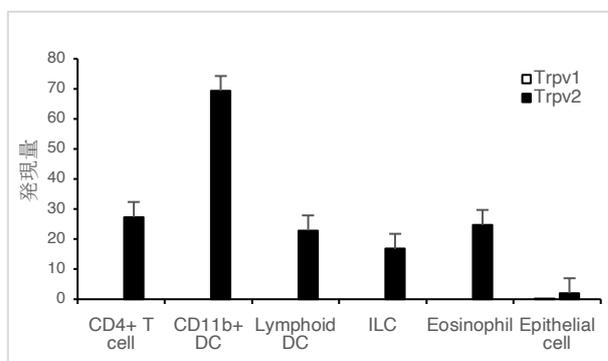


図 1 : マウス肺内細胞における TRPV 遺伝子発現の検討

野生型 B6 マウスより肺組織を採取し各細胞を単離した後、TRPV1 および TRPV2 の発現を比較した (縦軸単位 : cpm)。

次に、抗原刺激が気道 TRPV2 発現にどのような影響を与えるか検討するため、HDM 抗原投与後の肺内の各細胞における経時的な TRPV2 発現量の推移について検討した。その結果、CD4 陽性 T 細胞、CD11b 陽性樹状細胞、ILC、および好酸球においては day7 から day13 にかけての炎症の慢性相における発現亢進がみられた一方、気道上皮細胞においては抗原未刺激時と同等レベルの発現量の維持が認められた (図 2 A-E)。このことから TRPV2 が気道炎症細胞において抑制性に関与する可能性が示唆された。

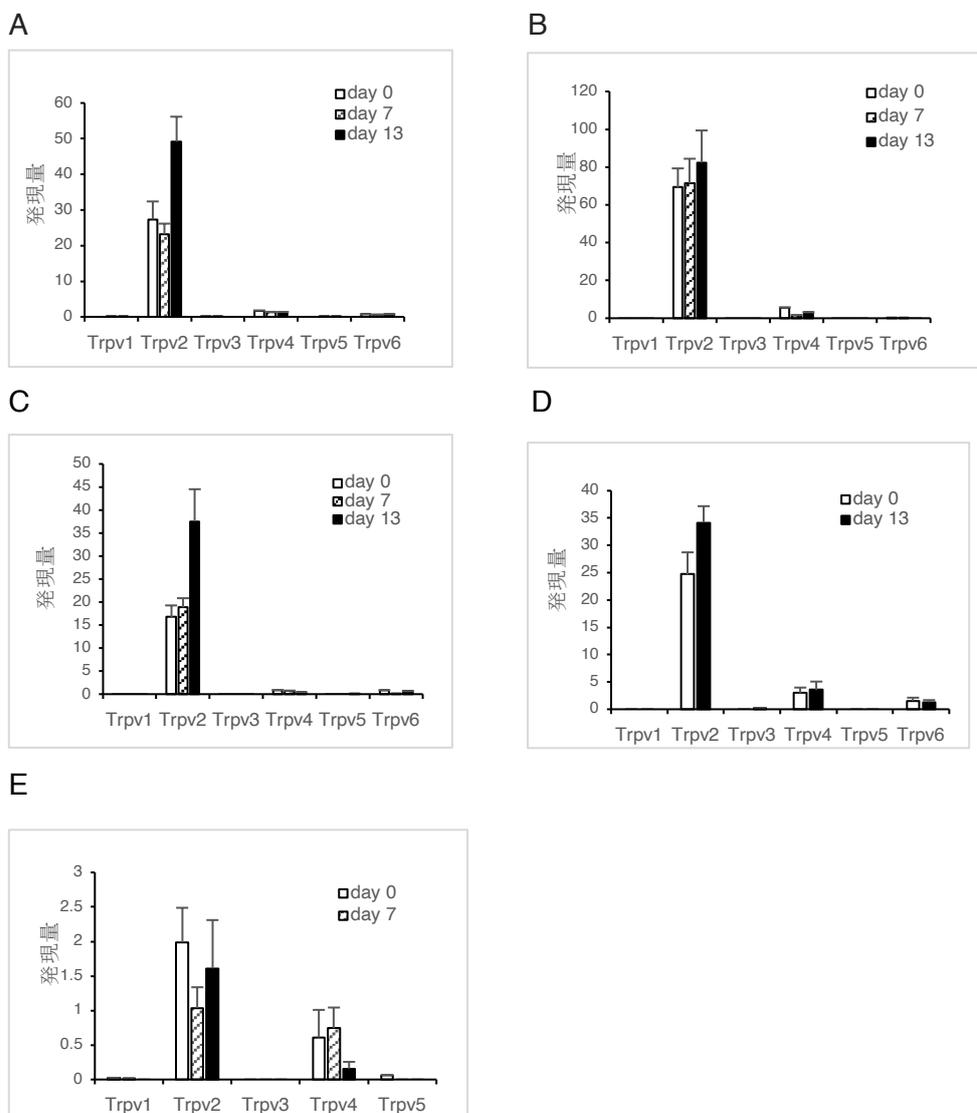


図2：野生型 B6 マウスに対して HDM の経気道的反復投与を行った後、経時的に肺組織を採取して各細胞を単離した後、TRPV ファミリー遺伝子発現を比較検討した（縦軸単位：cpm）。A) CD4 陽性 T 細胞、B) CD11b 陽性樹状細胞、C) ILC、D) 好酸球、E) 気道上皮細胞(TRPV1-5)

(2) TRPV2 遺伝子改変マウスの樹立と TRPV2 発現のアレルギー性気道炎症への影響
 上記の知見をもとに、各細胞種に特異的 TRPV2 欠損マウスの作成を定法にて行った。具体的には、気道上皮特異的 TRPV2 欠損マウス(CCSP-Cre/TRPV2 floxed mice)、マクロファージ特異的 TRPV2 欠損マウス(LyzM-Cre/TRPV2 floxed mice)、CD4 陽性 T 細胞特異的 TRPV2 欠損マウス(CD4-Cre/TRPV2 floxed mice)、好酸球特異的 TRPV2 欠損マウス(EPX-Cre/TRPV2 floxed mice)、制御性 T 細胞特異的 TRPV2 欠損マウス(FoxP-Cre/TRPV2 floxed mice)を定法にて樹立し、HDM 誘発性気道炎症のフェノタイプを野生型マウスと比較することとした（研究継続中）。

(3) 気道炎症における TRPV2 の作用機構の解析

TRPV2 の個々の炎症細胞・非炎症細胞における機能は未解明である。細胞種特異的 TRPV2 欠損マウスが作成途上のため、TRPV2 の細胞機能との関連について database をもとに検討した。CD40 刺激により活性化された B 細胞において TRPV2 発現が亢進すること、Aiolos 欠損 B 細胞において TRPV2 発現が低下し、Aiolos/ Oct binding

factor (OBF)-1 ダブル欠損マウスにおいてその発現低下が軽減されることから、B細胞の分化および活性化後の機能において TRPV2 が何らかの役割を果たす可能性が示唆された (GDS5407) (図 3 A, B)。さらに、Bcl-6 欠損 CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞において野生型 CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞と比較して TRPV2 発現が亢進することより、制御性 T 細胞機能においても TRPV2 が関与することが示唆された (GDS5161)(図 3 C)。これらの関連分子に関して今後さらに検討を進めると同時に、他の TRPV2 関連分子についても探索を行う予定である。

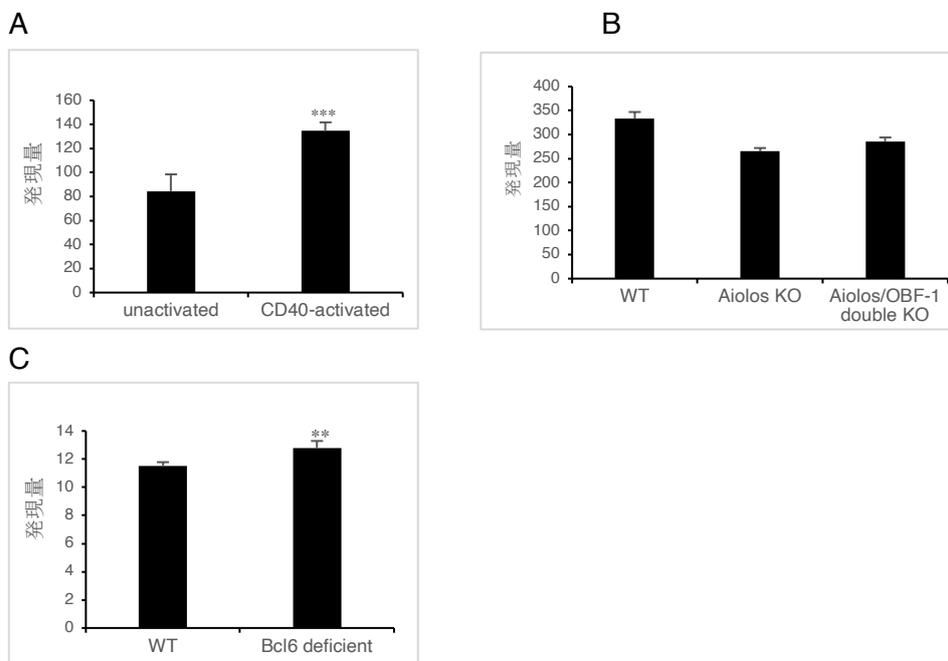


図 3： B 細胞における TRPV2 発現

A) 野生型 B 細胞における TRPV2 発現を非刺激下と活性化状態とで比較した。 B) 野生型 B 細胞、Aiolos 欠損 B 細胞、および Aiolos/ Oct binding factor (OBF)-1 ダブル欠損 B 細胞における TRPV2 発現。 C) 野生型および Bcl-6 欠損 CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞における TRPV2 発現 (***) $p < 0.005$, *) $p < 0.05$ 。

(4) 喘息患者における TRPV2 および関連分子の発現の解析

TRP family に分類されるレセプターには TRPV 以外に TRPM、TRPC、TRPA 等が含まれる。アレルギー性気道炎症における TRP family の意義に関しては、TRPV1 以外には既報はほぼ見出せず、これらの気道炎症における意義の詳細は未解明であると考えられた。TRP family 分子は侵害受容レセプターとして主に機能することが知られており、外気との interface である気道粘膜上皮における役割が想定される。そこで、気道上皮細胞における TRP family 分子の発現についてさらに検討を行った所、TRPM4、TRPM6、TRPM7 の発現が認められた (図は省略)。TRPA1、および TRPC subfamily についてはいずれも低発現であった。本報告時点において TRPM4 に関しては粘液分泌への関与に関する既報が、TRPC6 と TRPM7 については気道平滑筋機能への関与を示唆する既報がある一方、TRPM6 に関する既報は見出せなかった。これらの分子に関して今後さらに検討を進めると同時に、他の TRPV2 関連分子についても探索を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	中島 裕史 (Nakajima Hiroshi) (00322024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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