

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32723

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21733

研究課題名（和文）TRPチャンネルを標的とした喘息発作の発症機構解明とその予防

研究課題名（英文）Chronobiological analysis of TRP channel for elucidation of asthma attack

研究代表者

三浦 伸彦（Miura, Nobuhiko）

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20229644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：先ず呼吸器におけるTRPチャンネルファミリーの日内変動を解析したところ、気道や肺においてTrpA1又はTrpV1の発現量に明らかな日内変動を認めた。呼吸器系でのTrpチャンネルの日内変動は報告されておらず新たな知見である。次に卵白アルブミン(OVA)による喘息モデルを構築し、喘息誘発物質に曝露する時刻をずらして喘息発作の程度を調べたところ、BALF中の好酸球数は16:00誘発群よりも4:00誘発群の方が有意に多く、誘発時刻によりアレルギー炎症性の強さが異なる可能性が示された。この結果は誘発時刻により喘息発作の程度が異なることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息発作は夜間の発作による睡眠不足や概日リズム攪乱を引き起こし、集中力や生産力の低下に結びつくため、社会生活におけるQOLは著しく低下させる。喘息治療薬としては長期管理薬と発作治療薬（2刺激薬、テオフィリン薬、ステロイド）が用いられるが、長期管理薬としても使用される吸入ステロイド薬の発がん性が疑われていることから安全な長期管理薬が必要となる。我々の検討がTRPチャンネル遮断薬の喘息抑制効果に結び付けば、TRPチャンネルが喘息の治療標的になる可能性が見えてくる。さらに、得られる結果は喘息のみならず同様のアレルギー疾患である花粉症とも共通することから、花粉症治療にも結び付く可能性もある。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to elucidate the mechanism of asthma attack by targeting the diurnal variation of TRP channels. First, we analyzed the diurnal variation of the TRP channel family in the respiratory system, and found clear diurnal variation in the expression levels of TrpA1 and TrpV1 in the airways and lungs. The diurnal variation of Trp channels in the respiratory system has not been reported, and this is a new finding. Next, we constructed an asthma model using ovalbumin (OVA) and examined the severity of asthma attacks by shifting the time of exposure to asthma inducers. The number of eosinophils in the BALF was significantly higher in the 4:00 group than in the 16:00 group, suggesting that the strength of allergic inflammation may differ depending on the time of induction. This result suggests that the severity of asthma attacks differs depending on the time of induction.

研究分野：時間毒性学

キーワード：日内変動 喘息モデル TRPチャンネル 時間毒性

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息により医療機関を受診する患者数は、増加傾向にある(年間推計患者数: 117万人, 2014年厚生労働省調べ)。年齢別患者構成割合では若年層(0~19歳)に多く、また年間約1,600人もの喘息死が報告されている(同調べ)。喘息死は吸入ステロイド剤の普及に伴い減少傾向にあるものの、決して看過できる数値ではない。また喘息発症によるQOLの著しい低下は、社会生活における大きな重荷となっている。

喘息の発症要因は環境因子(室内アレルゲン曝露など)や個体因子(アレルギー素因など)が挙げられるが、図Aのように、喘息の発作回数は顕著な日内変動を示し、明け方に多い。申請者らは薬毒物の作用における日内変動を考慮した研究を行い、毒性学に時間生物学視点を導入した「時間毒性学」を展開していることから、この「日内変動」に着目した。喘息発作の日内変動には自律神経バランスやホルモン分泌量の変化が考えられているが不明な点が多い。一方で、①最近になって喘息患者の気道上皮でTRPV1チャンネルが発現亢進し、温度制御や炎症メディエーター放出への関与が報告された(PubMed ID (PMID): 31496955)。②TRPチャンネルは温度などの物理刺激や、様々な化学物質応答に関与する受容体である。また③TRPチャンネルの発現量が視床下部や褐色脂肪組織で日内変動を示すことが報告されている(PMID: 28943398)。そして④喘息発作回数の高まる明け方は温度変化が激しいことから、温度差が発作を誘発する可能性も否定できない。以上を考え合わせると、喘息発作の日内変動はTRPチャンネルの量的変動がトリガーとなることは十分に予測される。

## 2. 研究の目的

気管支喘息による喘息死は減少傾向にあるものの、看過できる数値ではない(年間約1,600人)。喘息の発作回数は顕著な日内変動を示すことから、我々はこの「日内変動」に着目した。喘息発作の日内変動には自律神経バランスやホルモン分泌量の変化が考えられているが、喘息患者の気道上皮でTRPV1チャンネルが発現亢進していることや、TRPチャンネルの発現量が日内変動を示すことが報告されている。TRPチャンネルは温度などの物理刺激や種々の化学物質応答に関与する受容体であることから、喘息発作の日内変動にはTRPチャンネルの量的変動に関与する可能性がある。そこで本研究では、TRPチャンネルの日内変動を標的とした喘息発作の発症機構解明および、TRPチャンネル遮断薬の効果解析を目的とする。

## 3. 研究の方法

気管支におけるTRPチャンネルの日内変動を解析するとともに、喘息モデルマウスを用いてアレルゲン投与後のTRPチャンネルの量的変動を調べた。さらに喘息モデルマウスへのTRPチャンネル阻害剤の防御作用についても検討した。

### (1) TRPチャンネルの気管支における日内変動解析

マウスを、1日間のうち任意の6時点(8:00から4時間ごとに6点)で解剖を行い、呼吸器系臓器(肺、気道、気管支)を摘出してTRPチャンネル分子種のmRNAレベルおよびタンパク質レベルでの発現変動を調べた。

### (2) 喘息モデルマウスを用いた気管支におけるTRPチャンネルの変動解析

水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとし、マウスに卵白アルブミン(OVA)で腹腔内感作後、OVAを吸入投与しアレルギー性気道炎症を惹起させ、日内変動を確認した。また気管支肺泡洗浄液(BALF)中の液性および細胞性成分について日内変動解析を行った。

### (3) TRPチャンネル遮断薬の抑制効果

喘息モデルマウスに、TRPチャンネル遮断薬を投与し、OVAによる喘息抑制効果を検討した。

## 4. 研究成果

本研究ではTRPチャンネルの日内変動を標的とした喘息発作の発症機構解明を一つの目的としている。そのために呼吸器におけるTRPチャンネルファミリーの日内変動を解析した。無処理のC57BL/6Jマウス(7週齢、雄)を、4時間ごと(10時, 14時, 18時, 22時, 2時または6時)に解剖し、肺、気道、及び気管支を採材して、各臓器におけるTrpチャンネル分子種の発現量をreal time PCR法により定量した。その結果、気道におけるTrpA1発現量には明確な日内変動が観察され、22時に発現ピークを示した。一方TrpV1でも明らかな日内変動が認められたが、その発現ピークは10時であった。また肺ではTrpV1の発現量は14時から上昇し始め22時にピークとなる日内変動を示したが、TrpA1では18時にピークに達した後減少していく日内変動が確認された。呼吸器系でのTrpチャンネルの日内変動は報告されておらず新たな知見である。

一方、喘息モデルを構築するために、水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとし、Balb/cマウスに卵白アルブミン(OVA)で腹腔内感作後、OVAを吸入投与しアレルギー性気道炎症を惹起させた。Ova特異的IgE抗体の上昇を認めたものの文献値と比較して低く、また好酸球数の上昇も僅かであった。そこで感作方法の条件を変えつつ指標値の明確な上昇を認め

るモデル系の構築を行った。BALB/c マウス(7週齢,雌)に卵白アルブミン(OVA)を腹腔内に2回投与して感作を成立させ、OVAを気管内投与して喘息発作(アレルギー炎症)を誘発した。その結果、OVAの2回の腹腔内投与により、血漿中IgE及びOVA特異的IgG1の上昇が認められたことから、OVAによる感作成立が確認できた。そこでこの感作マウスにOVAを気管内投与して5日後に回収したBALF中の細胞性状を調べたところ、対照群(生理食塩水投与)には観察されない好酸球を多数認めたことから、喘息モデルが確立できたと考えられた。

そこで確立した喘息モデルを用い、喘息誘発物質に曝露する時刻をずらして喘息発作の程度を調べた。すなわち、BALB/c マウス(7週齢,雌)に卵白アルブミン(OVA)を腹腔内に投与し、5日後にもう一度OVAの腹腔内投与を行って感作を成立させた。このOVA2回目投与からマウスを2群に分けて明暗ボックスに入れ、明暗サイクルをコントロールして12日間飼育した。OVA2回目投与から12日後に、マウスの体感時刻(CT)の4:00及び16:00にOVAを気管内投与して喘息発作(アレルギー炎症)を誘発させた。誘発OVAの投与5日後に炎症の程度を調べたところ、OVA誘発したBALF中には対照群には観察されない多数の好酸球を認めたが、その数は16:00誘発群よりも4:00誘発群の方が有意に多く、誘発時刻によりアレルギー炎症性の強さが異なる可能性が示された。実験性の再現性を調べると共に、TRPA1阻害剤をOVA誘発の30分前に投与して喘息発作におけるTRPA1の関与を検討したところ、4:00群でアレルギー炎症性の強さが増大することは前回実験との程度の差はあったものの同様に観察された。TRPA1阻害剤の効果は個体間のばらつきが大きく結果を導くには至らず、時間的に新たな検討を加えられなかった。各種TRP阻害剤を用い、喘息発作とTRPチャンネルとの関係を検討していくことが重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 2) 鎌田大暉, 桂川真一, 香川(田中)聡子, 河村伊久雄, 吉岡弘毅, 三浦伸彦
2. 発表標題 マウスTRPチャネル発現の日内変動 ~呼吸器系統を中心に~
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 18) 桂川真一, 照井楓香, 宮澤正幸, 香川(田中)聡子, 河村伊久雄, 横田理, 吉岡弘毅, 三浦伸彦
2. 発表標題 肺気管支系におけるTRPチャネル発現の日内変動
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 25) 桂川真一, 横田黎, 宮澤正幸, 香川(田中)聡子, 河村伊久雄, 横田理, 吉岡弘毅, 三浦伸彦
2. 発表標題 マウスの呼吸器系統におけるTRPチャネル発現の日内変動
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔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	横田 理  (Yokota Satoshi)  (70706605)	国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官   (82601)	

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
---------	---------