

研究課題名	温度感受性 TRPV4 チャンネル制御による食物アレルギー予防方法の検討
フリガナ	マツモト ケンジロウ
代表者名	松本 健次郎
所属機関 (機関名) (役職名)	京都薬科大学 薬物治療学分野 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	該当なし

### 研究結果要約

食物アレルギーは乳幼児に特に多い疾患であるが、近年全年齢でも増加しており、社会的問題となっているため食物アレルギーに対する効果的な予防・治療法が社会から切望されている。温度感受性 TRPV4 は、機械、圧刺激やアラキドン酸の代謝物などにより活性化される多刺激反応受容体である。TRPV4 は、腸上皮細胞に発現し、大腸炎の進行に関与することが報告されている<sup>1)</sup>。本研究では、卵白アルブミン (OVA) 誘発マウス食物アレルギー性腸炎の病態における TRPV4 の関与について TRPV4 遺伝子欠損動物 (KO) と野生型動物 (WT) を用いて検討した。

OVA 慢性投与により、WT では、体重減少、掻痒行動、うずくまり、ならびに下痢などのアレルギー関連症状を惹起した。これらの症状は、いずれも KO マウスにおいて有意に増悪した。OVA 慢性投与による、OVA 特異的 IgG、IgA、IgE の増大は、WT と比べ、KO で有意に増大した。マウス大腸、小腸において、TRPV4 は、上皮細胞に発現していることが確認された。KO では病態時における腸管透過性の亢進、および上皮細胞から放出される IL-33 が WT とくらべて有意に増大していることが示唆された。さらに KO の大腸粘膜では、病態時において、抗原提示細胞である樹状細胞の顕著な増大が観察された。よって TRPV4 は、OVA 誘発食物アレルギーの病態において、上皮細胞のアレルゲン透過性を制御することで、病態の進行に対し抑制的に機能していることが示唆された。

## 研究目的

### 【目的】

食物アレルギーの予防・治療として原因食物の除去療法や抗アレルギー薬などによる対症療法、そしてアレルゲン免疫療法による治療も行われているが、その効果は十分でなく、新しい治療方法と病態メカニズムの解明が強く求められている。食物アレルギーの原因となるアレルゲンは通常、消化管上皮細胞を通過することは少ないが、乳幼児では免疫システム、そして消化管構造の未熟さによって上皮細胞間のジャンクションが壊れやすく、アレルゲンが上皮を通過することによりアレルギー反応が惹起される。温度感受性 TRPV4 チャンネルは、消化管や皮膚の上皮細胞に発現し、E カドヘリンやクローディンといった細胞間接着分子とジャンクションを形成することで上皮透過性を制御している。本研究では、腸バリア機能を制御している温度感受性 TRPV4 チャンネルに着目し、食物アレルギー制御メカニズムの解明と効果的な予防方法の探索を行った。

### 【意義】

食物アレルギーの病態は長期的な評価が必要であり、KO マウスを用いた本研究の結果により、食物アレルギーにおいて TRPV4 が、防御的な役割を果たしていることを明らかにすることができた。TRPV4 は上皮細胞に発現しており、アレルゲンである OVA の腸上皮における透過性を制御していることが示唆された。本研究の成果はメカニズムが明らかになっていない食物アレルギーの病態解明だけでなく、TRPV4 制御による治療方法の開発などにつながることから、今後の社会的な波及効果が期待できる。

## 研究計画及び研究手法

TRPV4 の役割を明らかにするため、食物アレルギーモデルマウス (①)、上皮細胞株を用いた検討 (②) を行う計画を立てた。①については計画通り実施することができたが、②はコロナ禍における研究体制の変化のため、実験準備段階であり、検討を開始することができなかった。

### ①食物アレルギーの病態における TRPV4 の関与

## OVA 誘発食物アレルギーモデル

4 週齢の WT(C57BL/6)と KO に OVA と水酸化アルミニウムで感作後、OVA を週 3 回の頻度で計 10 回経口投与することでアレルギーを誘導した。病態は、期間中の体重変化、Stool score（便性状、下記参照）、Systemic score（搔痒行動、うずくまり行動、下記参照）、OVA 投与 5 回目と 10 回目の血清中 OVA 特異的 IgE、IgG、IgA について EIA キット（Chondrex 社）を用いて測定した。さらに、OVA 投与 5 回目と 10 回目の大腸、小腸における IL-33、IL-25 サイトカインを定量的 RT-PCR により、TRPV4、CD11c（樹状細胞）の発現を免疫組織染色により解析した。コントロールとしては正常飼育条件下の WT と KO を用いた。

Stool score: normal (score 0), soft with well-formed pellets (score 1), very soft (score 2), diarrhea (score 3), and severe diarrhea (score 4).

Systemic score : The systemic score (0-4) was defined as the sum of scores obtained from three criteria: scratching behavior, loss of mobility, and swelling. Scratching was graded based on the average number of scratching events during each 15-min interval (three intervals during a 45-min observation) as follows: 0, 0-3 events; 1, 4-5 events; 2, >6 events.

## 腸上皮細胞透過性の評価

OVA5 回目、10 回目投与 15 分後に、蛍光物質 FITC デキストラン（4 k Da）を経口投与し、2 時間後に血液を採取し、消化管上皮細胞を透過して血中に入った蛍光色素の量をプレートリーダーで測定した。

## ②食物アレルギー-Innate trigger としての消化管上皮細胞上 TRPV4 の役割

### 透過性の測定

トランズウェルに上皮細胞株を培養後、管腔面と基底面に Millicell ERS-2（本研究にて購入）の電極を挿入し電気抵抗値の変化を測定する。また上層に蛍光物質を適用後、下層への透過量をプレートリーダーで測定する。

## 上皮細胞による免疫制御機構の解明

TRPV4 作用薬適用後、上皮細胞が産生するサイトカインを定量的 RT-PCR、シグナルをウェスタンブロットティングにより測定する。

## 結果と考察

### ・結果

## OVA 誘発食物アレルギーの症状における TRPV4 の関与

感作後、OVA 50 mg を週 3 回の頻度で 計 10 回経口投与し、各回において Body weight、Stool score、Systemic score を測定した。正常動物にくらべ、病態モデル動物では WT、KO ともに体重減少、Stool score、Systemic score の顕著な上昇が確認された。さらに病態モデルにおける WT、KO の比較から、TRPV4 の欠損により、WT とくらべ KO では体重減少、Stool score、Systemic score が有意に増大することが明らかとなった。

OVA 投与 5 回目、10 回目における血清中の OVA 特異的 IgG、IgA、IgE の量は、正常動物にくらべ、病態モデル動物では WT、KO ともに上昇が確認された。特に OVA10 回目において顕著に上昇することが明らかとなった。病態モデルにおける WT、KO の比較から、TRPV4 の欠損により、血清中の IgG、IgA、IgE 量は、WT とくらべ有意に増大することが明らかとなった。

## 大腸、小腸における TRPV4 の発現

正常、OVA 誘発食物アレルギーモデル動物の大腸、小腸における TRPV4 の発現を免疫組織染色により解析したところ、TRPV4 は粘膜層に発現していることが観察された。次に上皮細胞のマーカであるケラチン 8/18 との 2 重染色を行ったところ、TRPV4 との共局在が確認された。よって TRPV4 は正常時、病態時において上皮細胞に発現していることが示唆された。

## 腸上皮透過性における TRPV4 の関与

5 回目、10 回目の OVA 投与後に 4kDa の FITC デキストランを経口投与し、2 時間後の血清中の

FITC 量を測定することで、腸上皮透過性を評価した。OVA 投与 5 回目、10 回目において血清中の FITC の量は、正常動物、病態モデル動物ともに WT とくらべ、KO では有意に上昇することが明らかとなった。よって TRPV4 の欠損は正常時、病態時において腸上皮の透過性を亢進させていることが示唆された。

#### 病態時における抗原提示細胞の変化

10 回目の OVA 投与後の WT、KO の大腸、小腸における CD11c 陽性細胞数の変化について免疫組織染色により評価を行った。正常動物、病態モデル動物ともに WT とくらべ、KO で CD11c の陽性細胞数は増加傾向を示した。特に病態モデルにおいて KO 動物の大腸では顕著な CD11c 陽性細胞数の増加が明らかとなった。

#### 腸上皮細胞から放出される炎症性サイトカインの変化

腸上皮細胞から放出され食物アレルギーの病態に関与するサイトカインである IL-33 と IL-25、について定量的 RT-PCR で mRNA の変化を測定した。WT では正常時とくらべ、病態時で、IL-33 と IL-25 の有意な変化は認められなかったが、KO では正常時とくらべ、病態時の IL-33 が有意に増加していた。

#### ・考察

TRPV4 は、正常時、病態時において、上皮細胞に発現していたことから、食物アレルギーにおける上皮細胞性の因子に着目して本研究を展開した。TRPV4 の欠損によって、食物アレルギーに関連する各種パラメーターが悪化したことより、TRPV4 は OVA 誘起食物アレルギーの病態において保護的に働いていることが示唆された。TRPV4 の欠損によって腸上皮の透過性の亢進と IL-33 が増加することが示唆された。さらに TRPV4 欠損では抗原提示細胞である、樹状細胞が増加することが明らかとなった。これらの現象により、病態時において、KO ではアレルゲンの消化管上皮細胞通過とその後の免疫応答の亢進が引き起こされることで、食物アレルギーの病態が悪化していることが

推察された。

- ・本助成研究結果の講評

本助成金により、WT、TRPV4KO における OVA 誘起食物アレルギーの病態評価を多角的に行い、TRPV4 が食物アレルギーに対して保護的に働いている分子であることを明らかにすることができた。予定どおり研究実施できない点もあったが、得られた研究データにより今後の方向性を明確にすることができたため、本助成による研究結果は十分なものであると考えている。

- ・助成期間後に残された課題

助成期間中の研究によって、TRPV4 は OVA 誘起食物アレルギーの病態において、上皮細胞の透過性を制御することで、保護的に働いていることが示唆された。しかしながら、TRPV4 が制御する分子、細胞内情報伝達機構など、メカニズムに関しては明らかにすることができなかった。この点について今後の研究活動で解明していきたいと考えている。

- ・学会や論文発表等の予定

研究成果は国際学術雑誌にて発表する。またオープンアクセス化によって広く情報発信をしていく。さらに最新の知見について日本アレルギー学会や日本小児アレルギー学会などにおいて、患者、医療関係者、研究者、企業に向けて発表、交流を積極的に行う。このような研究成果の発表を通し社会へ有益な情報提供を行っていく予定である。

## 今後の研究活動について

本助成研究の結果、以下のような研究を進めることが必要であると考えている。

### ①腸上皮細胞タイトジャンクションの測定

腸上皮の透過性を制御する分子として、タイトジャンクションタンパクが知られており、過去の報告から TRPV4 はタイトジャンクションを制御する分子であることが明らかにされている<sup>2,3)</sup>。

今後は、WT、KO 病態モデルにおいて、ZO-1、オクルーディン、クローディン、E-カドヘリンなどの変化を定量的 RT-PCR により測定する。変化のあったタイトジャンクションタンパクは、免疫組織染色、ウエスタンブロットによる評価を行う。さらに上皮細胞株を用いて、TRPV4 によるタイトジャンクションタンパクの制御について細胞内情報伝達機構を解析する。

### ②OVA 誘起食物アレルギーの病態における TRPV4 の機能解明

TRPV4 の欠損により上皮の透過性が亢進し、OVA の腸管からの透過量が増大していることが示唆された。その結果、抗原提示細胞（CD11C 陽性樹上細胞）がアレルゲンを捉えやすく、免疫応答亢進していると予想している。今後は蛍光物質で標識した OVA を用いることで、OVA が実際に腸上皮細胞を透過し、抗原提示細胞に取り込まれているか評価することができる。

### ③TRPV4 活性化による食物アレルギーの制御方法の検討

食物アレルギーモデルにおいて TRPV4 選択的作用薬、拮抗薬投与による病態変化を評価する。投与量や投与時期による効果の違いを検討する。

### 参考文献

- 1) D'Aldebert E, Cenac N, Rousset P, Martin L, Rolland C, Chapman K, Selves J, Alric L, Vinel JP, Vergnolle N. Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice. *Gastroenterology*. Jan;140(1):275-85.
- 2) Islam MA, Mizusawa M, Sharmin MM, Hayashi S, Yonekura S. TRPV4 Increases the Expression of Tight Junction Protein-Encoding Genes via XBP1 in Mammary Epithelial Cells. *Animals (Basel)*. 2020 Jul 10;10(7):1174.
- 3) Reiter B, Kraft R, Günzel D, Zeissig S, Schulzke JD, Fromm M, Harteneck C. TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J*. 2006 Sep;20(11):1802-12.

以上