

## 論 文 要 旨

**Cold temperature enhances innate eosinophilic airway inflammation via transient receptor potential ankyrin 1**

〔 寒冷刺激は transient receptor potential ankyrin 1 を介して  
自然免疫による好酸球性気道炎症を増強する 〕

堂嶽 洋一

**【序論および目的】**

気管支喘息は、慢性的な気道炎症と可逆的な気流制限を特徴とする疾患であり、呼吸困難、咳嗽、喘鳴などの症状を呈する。治療の進歩により多くの患者が良好なコントロールを得ている一方で、ウイルス感染や環境因子による増悪を繰り返す症例も少なくない。特に寒冷曝露は喘息発作の誘因となることが知られているが、その詳細な病態機序は未だ明らかではない。近年、喘息はタイプ2 (T2) 炎症の強弱により T2-high 型と T2-low 型に分類され、前者では Th2 細胞や2型自然リンパ球 (ILC2) が IL-4、IL-5、IL-13 などの2型サイトカインを産生し、好酸球性気道炎症を惹起することが知られている。ウイルスや寒冷刺激などの抗原非特異的刺激は、上皮由来サイトカイン (TSLP、IL-25、IL-33) を介して ILC2 を活性化し、喘息増悪に関与する。Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) チャネルは、温度や機械刺激など多様な感覚刺激に応答する受容体であり、知覚神経終末だけでなく非神経性細胞にも発現する。TRPA1 の活性化はヒトで咳反射を誘発し、またアレルギー誘発喘息モデルでは神経ペプチド放出や免疫応答を介して炎症を増強することが報告されている。しかし、TRPA1 が自然免疫経路を介した気道炎症に果たす役割は不明である。TRPA1 は 17°C以下の温度で活性化されることから、寒冷曝露により ILC2 依存性の気道炎症が増強される可能性が考えられる。本研究では、自然免疫を介する代表的モデルであるパパイン誘発性気道炎症において、寒冷曝露が TRPA1 チャネルを介して自然免疫による好酸球性炎症を増悪させるかを検討した。

**【材料および方法】**

本研究では、C57BL/6 系統マウスおよび Trpa1 欠損マウスを用い、パパイン誘発性気道炎症モデルを作製した。マウスにはパパインを3日間連続で鼻腔内投与し、一部の群では各投与後に4°C環境で8時間の寒冷曝露を行った。気管支肺胞洗浄液 (BALF) および肺組織を採取し、細胞数やサイトカイン濃度、ILC2 数を解析した。また、TRPA1 拮抗薬 HC-030031 の前投与による影響を検討した。さらに、ヒト正常気道上皮細胞 (NHBE 細胞) を用いて、パパインおよび TRPA1 作動薬 AITC による刺激実験を行い、上皮由来サイトカイン発現や細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。遺伝子発現解析には定量 PCR、タンパク発現解析には ELISA 法を用いた。ヒト気道上皮細胞分化誘導後の気液界面 (ALI) 培養も行い、免疫蛍光染色により TSLP 発現を評価した。得られたデータは GraphPad Prism 8 を用いて統計解析を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 【結果】

### 1. 寒冷曝露によるパパイン誘発性好酸球性気道炎症の増悪と TRPA1 チャンネルの関与

野生型 (WT) および Trpa1 欠損 (KO) マウスにパパインを投与したところ、WT マウスでは BALF 中の好酸球数、ILC2 数が増加し、IL-5 および IL-13 の産生も上昇した。これらの変化は KO マウスでも同程度であった。パパイン投与に寒冷曝露を併用した WT マウスでは、BALF 中の好酸球数、ILC2 数、IL-5 および IL-13 産生がさらに増強した。これに対し、Trpa1 KO マウスでは寒冷曝露による炎症増強は認められなかった。以上から、TRPA1 チャンネルは、寒冷刺激下での自然免疫による気道炎症の増悪に重要な役割を果たすことが示唆された。

### 2. TRPA1 チャンネル活性化による TSLP 産生誘導

寒冷曝露による炎症増悪機構をさらに検討するため、ILC2 を活性化する神経ペプチドである CGRP および NMU の発現を解析した。CGRP 遺伝子 (Calca) はパパイン刺激に寒冷刺激を加えることにより上昇したが、TRPA1 欠損の有無による差はなかった。NMU も同様に軽度の上昇傾向のみであった。次に、上皮由来サイトカインに着目した。パパイン投与により TSLP および IL-33 の発現は上昇したが、WT と KO で差はなかった。ところが、パパイン処理と寒冷曝露を併用した場合、WT マウスでは TSLP が著明に増加したのに対し、Trpa1 KO マウスではその上昇は消失した。一方、IL-33 には変化がなかった。これらの結果から、寒冷曝露により TRPA1 チャンネルが活性化され、上皮細胞からの TSLP 放出を誘導し、ILC2 を介した好酸球性炎症を促進する可能性が示唆された。

### 3. TRPA1 拮抗薬による炎症増悪の抑制

TRPA1 の薬理的阻害が欠損マウスと同様の効果を示すかを検討するため、WT マウスに TRPA1 拮抗薬 HC030031 を投与した。パパイン+寒冷曝露群でみられた好酸球および ILC2 の増加、ならびに BALF 中の IL-5・IL-13 上昇はいずれも HC030031 により抑制された。また、HC030031 は TSLP 発現上昇を抑制したが、IL-33 には影響を与えなかった。これらの所見は、TRPA1 阻害により寒冷曝露による自然免疫性炎症の増悪を抑制できる可能性が示唆された。

### 4. TRPA1 依存性 Ca<sup>2+</sup>シグナルによる TSLP 産生機構

TRPA1 活性化による TSLP 産生機構を明らかにするため、NHBE 細胞を用いて解析を行った。TRPA1 mRNA およびタンパクは NHBE 細胞にも発現しており、TRPA1 作動薬 AITC 刺激で発現が増強した。AITC またはパパイン単独で TSLP 発現が濃度依存的に上昇し、両者の併用で相加的に増強された。ALI 培養系においても、パパイン+AITC 併用刺激で TSLP 蛍光シグナルが著明に増強された。さらに、AITC 刺激により細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、Ca<sup>2+</sup>キレート剤 BAPTA-AM 処理により TSLP 発現が有意に抑制された。これらの結果から、気道上皮細胞において寒冷刺激による TRPA1 活性化が Ca<sup>2+</sup>シグナル経路を介して TSLP 産生を誘導し、自然免疫による好酸球性気道炎症を増悪させることが明らかとなった。

## 【結論および考察】

本研究により、寒冷曝露が TRPA1 チャンネルを介して自然免疫による好酸球性気道炎症を増悪させることが明らかとなった。寒冷刺激下で TRPA1 が活性化されると、気道上皮細胞から Ca<sup>2+</sup>シグナル経路を介して TSLP が放出され、ILC2 を刺激して IL-5 および IL-13 産生を亢進させる。一方、TRPA1 欠損または拮抗薬投与によりこれらの反応は抑制され、寒冷曝露による炎症増悪は消失した。これらの結果は、TRPA1 が神経系のみならず上皮細胞にも機能的に発現し、寒冷刺激による喘息増悪の新たな分子基盤となることを示唆する。したがって、TRPA1 チャンネルは寒冷誘発性喘息増悪の治療標的として有望である。

