

令和元年6月21日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10053

研究課題名(和文) 小児期発症の気管支喘息における小胞体ストレス関連分子ORMDL3の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ORMDL3 related unfolded protein response in childhood-onset bronchial asthma

研究代表者

二村 恭子 (FUTAMURA, KYOKO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・(非)研究員

研究者番号：60596956

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)：これまでに複数のゲノムワイド関連解析において、小児期発症の気管支喘息と強い相関を持つ領域として第17染色体q12-21が同定されており、疾患感受性遺伝子の有力な候補としてORMDL3分子に注目が集まっているが、その作用機序はこれまで明らかになっていなかった。そこで私たちは今回の検討によってORMDL3分子がウイルス感染時に小胞体ストレスを介して気道炎症を増悪させる機序の一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では最近数十年の間にアレルギー疾患は急速に一般的な疾病となり、罹患する人口が非常に多くなっており、生活の質の低下や医療費の増大を招くことで社会的に大きな負荷となっている。また幼少期に罹患した場合、その後も症状が持続して重症化することや他のアレルギー疾患が続発する現象が認められることから、早期の治療介入が望ましい。今回の研究で私たちは小児早期発症の気管支喘息について、疾患感受性分子ORMDL3の病態に対する作用を明らかにし、将来的には喘息の新規治療につながる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In plural genome-wide association studies, the 17th chromosome q12-21 was identified as the locus that had strong correlation with childhood-onset bronchial asthma. ORMDL3 is a dominant candidate for disease susceptibility genes. However, it remains unclear how the gene affected disease condition of bronchial asthma. In this study, we elucidated the mechanism that ORMDL3 molecules exacerbated bronchial inflammation through unfolded protein response during viral infection.

研究分野：アレルギー学

キーワード：ORMDL3 小児発症気管支喘息 小胞体ストレス ウイルス感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)本邦では最近数十年の間にアレルギー疾患は急速に一般的な疾病となり、罹患する人口が非常に多くなっており、生活の質の低下や医療費の増大を招くことで社会的に大きな負荷となっている。また幼少期に罹患した場合、その後も症状が持続して重症化することや他のアレルギー疾患が続発する現象が認められることから、早期の治療介入が望ましい。

(2)一方、これまでに複数のゲノムワイド関連解析において、小児期発症の気管支喘息と強い相関を持つ遺伝子座として第 17 染色体 q12-21 が同定されており、疾患感受性遺伝子の有力な候補として ORM DL3 分子に注目が集まっているが、気管支喘息の発症や増悪に作用する機序については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、小胞体ストレス応答関連分子として同定された ORM DL3 分子について、小児期に好発するウイルス感染時におけるアレルギー性炎症に対する影響を様々な角度で詳細に検討し、気管支喘息発症のメカニズムを解明する。自然免疫系から獲得免疫系への橋渡しとなる ORM DL3 分子の機能を明らかにすることで、患者数の増加や発症年齢の低下が問題となっている小児気管支喘息について、より有効な治療法の発見や発症自体の抑制につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、小胞体ストレス応答関連分子として同定された ORM DL3 分子について、小児期に頻発するウイルス感染時におけるアレルギー性炎症に対する影響を、以下の様々な角度で詳細に検討した。

(1) ヒト下気道上皮細胞におけるウイルス感染時の小胞体ストレスを介した ORM DL3 分子のアレルギー性炎症促進作用を解析した。

(2) ヒト末梢血 T 細胞におけるウイルス感染時の ORM DL3 分子の機能を検証した。

(3) 研究立案時には市場より入手可能な ormdl3 ノックアウトマウスが存在しなかったため、まずは遺伝子ノックアウトマウスを作成し、得られたマウスにおいて、ウイルス感染や抗原曝露時に誘導されるアレルギー性炎症の評価を行い、ヒトの *in vitro* モデルで得られた知見を *in vivo* にて検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト下気道上皮細胞の培養系において、ウイルス感染モデルとなる dsRNA 添加による種々のサイトカイン・ケモカインの誘導が ORM DL3 ノックダウンにより相当なレベルで抑制されることを確認した。また dsRNA 添加時に小胞体ストレスのある 1 系路が活性化することを転写因子の解析により確認した。また小胞体ストレスを緩和するケミカルシャペロンの添加により、炎症促進性サイトカイン・ケモカインの産生が一部抑制されることを確認した。

(2) ヒト末梢血 T 細胞については、これまで報告されていた ORM DL3 遺伝子発現レベルと比較して、今回検討した正常末梢血 T 細胞での発現レベルが相当低いため遺伝子ノックダウンによる細胞障害性分子の発現に対する作用は明らかとならなかった。そこで当初から代替手段として考慮していたヒトリンパ腫細胞株を用いて同様の検討を行った。この細胞株における ORM DL3 遺伝子発現レベルはヒト末梢血 T 細胞に比較すると高かったが、ORM DL3 ノックダウンによる細胞障害性分子についての発現変化は残念ながら認められなかった。

(3) 研究立案時には市場より入手可能な ormdl3 ノックアウトマウスが存在しなかったため、最初に CRISPER-CAS9 システムを用いた系で ormdl3 ノックアウトマウスを作成した。得られたマウスにおいて、dsRNA 吸入の気道ウイルス感染モデルにおける肺胞洗浄液・肺組織におけるサイトカイン・ケモカインの発現レベル変化についての解析に加えて、小胞体ストレス応答系路についての解析を行い、ヒトの下気道上皮細胞における *in vitro* の検討に一致する結果を得た。

以上のことから、本研究についてはまず気道のウイルス感染モデルにおける ORM DL3 分子の機能についての論文報告作成を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Sato M, Shoda T, Shimizu H, Orihara K, Futamura K, Matsuda A, Yamada Y, Irie R, Yoshioka T, Shimizu T, Ohya Y, Nomura I, Matsumoto K, Arai K. Gene Expression Patterns in Distinct Endoscopic Findings for Eosinophilic Gastritis in Children. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017 Nov - Dec;5(6):1639-1649.e2. doi:10.1016/j.jaip.2017.03.030. Epub 2017 May 16. PubMed PMID: 28526277., 査読有

二村恭子、松本健治、皮膚バリア機能障害とアレルギー発症のメカニズム、アレルギー・免疫(1344-6932)24巻6号 Page744-751(2017.05)、査読無

Kimura N, Futamura K, Arakawa M, Okada N, Emrich F, Okamura H, Sato T, Shudo Y, Koyano TK, Yamaguchi A, Adachi H, Matsuda A, Kawahito K, Matsumoto K, Fischbein MP. Gene expression profiling of acute type A aortic dissection combined with in vitro assessment. Eur J Cardiothorac Surg. 2017 Oct 1;52(4):810-817. doi: 10.1093/ejcts/ezx095. PubMed PMID: 28402522., 査読有

Y. Ito, A. Inoue, T. Seers, Y. Hato, A. Igarashi, T. Toyama, K. D. Taganov, M. P. Boldin, and H. Asahara. "Identification of targets of tumor suppressor microRNA-34a using a reporter library system," vol. 114, no. 15, pp. 1-6, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1620019114., 査読有

M. Sakaki, Y. Ebihara, K. Okamura, K. Nakabayashi, A. Igarashi, K. Matsumoto, K. Hata, Y. Kobayashi, and K. Maehara. "Potential roles of DNA methylation in the initiation and establishment of replicative senescence revealed by array-based methylome and transcriptome analyses," pp. 1 - 22, 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0171431., 査読有

Futamura K, Matsumoto K. Epicutaneous Sensitization in Patients with Atopic Dermatitis. Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology Vol. 29, No. 4 Reviews, Published Online: 1 Dec 2016 <https://doi.org/10.1089/ped.2016.0716>, 査読有

Takeda T, Unno H, Morita H, Futamura K, Emi-Sugie M, Arae K, Shoda T, Okada N, Igarashi A, Inoue E, Kitazawa H, Nakae S, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2016 Nov;138(5):1395-1403.e6. doi:10.1016/j.jaci.2016.01.032. Epub 2016 Apr 4. PubMed PMID: 27056266., 査読有

H. Tsumura, M. Ito, M. Takami, M. Arai, X. Li, T. Hamatani, A. Igarashi, S. Takada, K. Miyado, and A. Umezawa. "Conditional deletion of CD98hc inhibits osteoclast development," Biochem. Biophys. Reports, vol. 5, pp. 203-210, 2016. DOI:10.1016/j.bbrep., 査読有

二村昌樹、二村恭子、アトピー性皮膚炎の標準治療のこれまでとこれから、チャイルドヘルス(1344-3151)19巻10号 Page735-738(2016.10)、査読無

二村 恭子、アトピー性皮膚炎と IL-33、IL-25 および TSLP、臨床免疫・アレルギー科(1881-1930)66巻1号 Page56-60(2016.07)、査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

五十嵐ありさ、松田明生、松本健治、MicroRNA-29 は気道上皮細胞の IFNAR1 発現および sST2 産生を抑制する、第 67 回日本アレルギー学会学術大会、2018

Igarashi A, Matsuda A, Matsumoto K, "MicroRNA-29 suppresses cytokine-mediated production of soluble IL-33 receptor, sST2, by bronchial epithelial cells", AAAAI/WAO Joint Congress, 2018

二村 恭子、鈴木 加余子、中村 政志、佐藤 奈由、松永 佳世子、齋藤 正治、矢上 晶子、新規抗原の関与が示唆されたアボカドアレルギーの一例、第 48 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会、2018

矢上 晶子、二村 恭子、鈴木 加余子、下條 尚志、中村 政志、松永 佳世子、当科で診療した魚類アレルギー症例の検討、第 48 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会、2018

鈴木 加余子、二村 恭子、中村 政志、松永 佳世子、矢上 晶子、海外旅行中に摂取したデザートにトッピングされていたソバの実によるアナフィラキシーの 1 例、第 69 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2018

矢上 晶子, 二村 恭子, 鈴木 加余子, 中村 政志, 佐藤 奈由, 松永 佳世子, エビア
レルギーの診断について、日本皮膚科学会東海地方会第 286 回例会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ <http://www.ncchd.go.jp/research/nch.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：五十嵐 ありさ

ローマ字氏名：IGARASHI, arisa

所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

部局名：免疫アレルギー・感染研究部

職名：(非) 研究員

研究者番号(8桁)：60572998

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：折原 芳波、松本 健治

ローマ字氏名：ORIHARA, kanami MATSUMOTO, kenji

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。