

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861539

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎におけるORMDL3遺伝子発現の影響

研究課題名(英文) Impact of ORMDL3 gene expression in allergic rhinitis

研究代表者

富田 かおり (Tomita, Kaori)

福井大学・医学部・特別研究員

研究者番号：30444227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：目的は小児気管支喘息の候補遺伝子とされるORMDL3が、アレルギー性鼻炎発症機序にどのように関与しているかを調べることである。そのために前年度に炎症細胞の分離条件の条件を確立し、炎症細胞の染色条件などを確立し、代表的な炎症細胞刺激因子による炎症細胞が生体内と同様に炎症反応を起こすことを確認した。組織内のアレルギー性炎症とORMDL3関連を調べた。手術で採取した鼻粘膜におけるORMDL3の発現量を検討したところ、アレルギー性炎症においてはORMDL3が病態の形成に深く関与することを示唆するデータを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate how ORMDL3, asthma susceptible gene, involve in the development of allergic rhinitis. In this study, we established the protocol for isolation of the inflammatory cells from peripheral blood, and we show that the isolated inflammatory cells show the same allergic inflammatory response as inside the body. We show high ORMDL3 expression level in nasal mucosa of eosinophilic chronic rhinitis patients. Our findings indicate that ORMDL3 may be involved in the development of the allergic disease in humans.

研究分野：アレルギー性鼻炎

キーワード：ORMDL3 アレルギー性鼻炎 鼻ポリープ

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性疾患は遺伝的背景が関与することは広く知られている。

遺伝的背景の解明のため、近年、全遺伝子解析によるアレルギー性疾患の解析が行われた。小児気管支喘息の全遺伝子解析では、ORMDL3 遺伝子領域が疾患に関連していると報告された。我々は ORMDL3 遺伝子領域とアレルギー性鼻炎発症の関連を報告した。

### 2. 研究の目的

(1)小児気管支喘息の候補遺伝子とされる ORMDL3 は、小胞体の膜関連タンパクで、カルシウムシグナルや細胞ストレスに関連すると報告されているが、その機能はわかっていない。また、ORMDL3 はクローン病や潰瘍性大腸炎などの自己免疫疾患においても全遺伝子解析によって関連が報告されている。この研究の目的は ORMDL3 がアレルギー性疾患の発症機序にどのように関与しているかを調べることである。

(2)アスピリン喘息のプロテオーム解析で同定されたアレルギー関連因子である LCP1 とアレルギー性疾患との関連を調べる。

### 3. 研究の方法

(1)手術で採取した健常人とアレルギー性疾患患者の鼻粘膜や鼻茸から mRNA を抽出し、ORMDL3 mRNA の発現量を検討した。

(2)抹消血から好酸球を分離する方法を確立する。分離した抹消血好酸球が生体内と同様なアレルギー反応を起こすかどうか確認し、様々なアレルギー誘発因子に対するアレルギー反応を測定する。

### 4. 研究成果

(1)手術で採取した鼻粘膜における ORMDL3 の発現量を検討したところ、アレルギー性疾患患者の鼻粘膜においては ORMDL3 がアレ

ルギー性疾患の形成に深く関与することを示唆するデータを得ることができた。

(2)好酸球の細胞株からは脱顆粒などの生体内のアレルギー反応は誘発されないことがわかった。また、好酸球細胞株内には顆粒が認められず、形態的にも通常の好酸球とは異なり、今回の研究には適さないことがわかった。

そこで抹消血からの好酸球の分離を試みた。しかし抹消血からの好酸球分離は一般に困難とされている。採取血液量、保存条件、分離試薬の反応時間などの検討を行い、安定して好酸球を分離する方法を確立した。抹消血から分離した好酸球は通常の生体内同様に、TSLP、IL33 などの好酸球刺激因子にて炎症反応を誘導されることを脱顆粒の観点から確認した(図 1)。

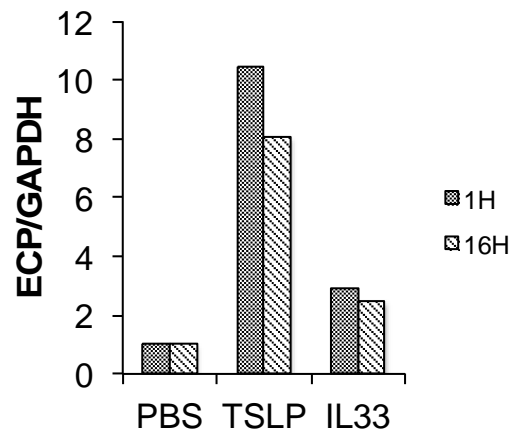


図 1, 抹消血好酸球の TSLP, IL33 刺激後の培養液中の ECP タンパク測定

末梢血好酸球を蛍光免疫染色し、細胞内での LCP1 の局在を同定したところ、アクチンや LCP1 は細胞質中に顆粒状に染色されることを共焦点レーザー顕微鏡で確認した(図 2)。

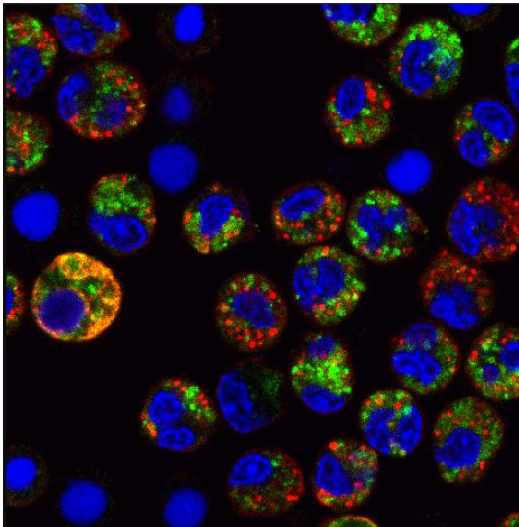


図 2, 分離した抹消血好酸球。青：核，赤：アクチン，緑：LCP1

また、鼻茸組織においてもアクチン、LCP1 は顆粒状に見えることを共焦点レーザー顕微鏡で確認した(図 3)。

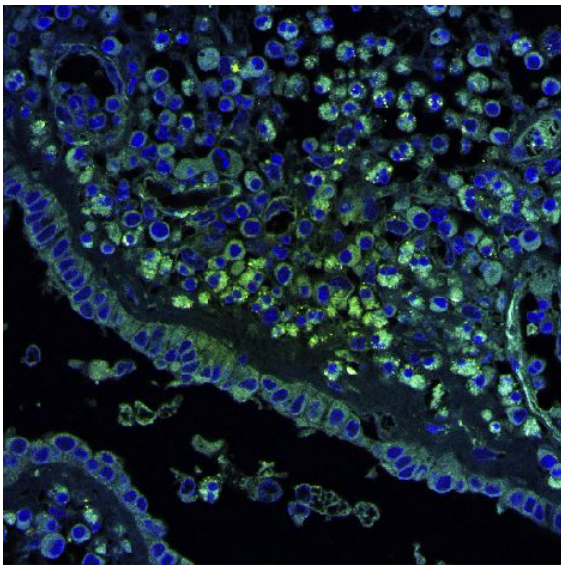


図 3, 鼻茸組織の蛍光免疫染色 青：核，赤：アクチン，緑：LCP1

また、抹消血好酸球への TSLP, IL33 刺激により LCP1, アクチンの蛍光強度が増加することをフローサイトメトリーにて確認した(図 4)。

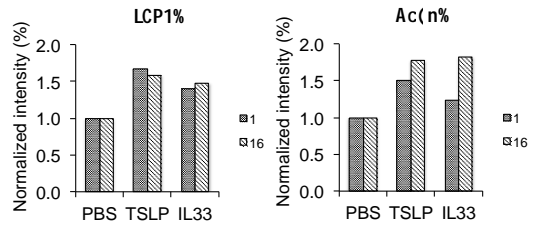


図 4, 抹消血好酸球の TSLP, IL33 刺激による LCP1, アクチンの蛍光強度の測定

LCP1 はアスピリン不耐性喘息患者の鼻茸中において慢性副鼻腔炎患者の鼻茸に比較して有意に発現が亢進していることが同定された。アクチンに結合したタンパクであり、白血球の遊走や癌の浸潤などに関連すると報告されているが、その機能はまだわかっていない。

本研究の結果から、LCP1 は好酸球における脱顆粒に関与する可能性が示唆された(図 5)。

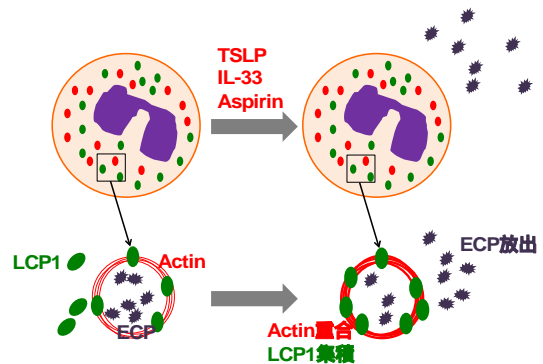


図 5, 抹消血好酸球における脱顆粒と LCP1 の関連

また、分離した抹消血好酸球への TSLP, IL33 による炎症関連物質の発現量の変化の検討を行った。分離末梢血好酸球をアスピリンで刺激したところ、CysLT1Rの発現が低下傾向を認めた。CysLT1Rは、ロイコトリエン受容体の一つであり、喘息発症に重要である。健常人はアスピリン投与でこの受容体が低下することにより喘息など生じにくいですが、喘息患者ではアスピリン投与でもこの受容体が低下しないのか今後検討する必要がある。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

日本耳鼻咽喉科学会北陸地方部会連合会  
第 317 回例会 2014 年 8 月 31 日 ホテル金  
沢(金沢市)

難治性鼻出血に対する鼻内視鏡下顎動脈ク  
リップングの経験

発表者 富田かおり

第 52 回日本鼻科学会学術講演会

2013 年 9 月 28 日 福井フェニックスプラザ  
(福井市)

好酸球における LCP1 と脱顆粒の関連-アスピ  
リン不耐性喘息関連タンパクの機能解析

発表者 富田かおり

〔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〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 かおり (TOMITA, Kaori)  
福井大学・医学部・特別研究員  
研究者番号: 30444227

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし