

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K16881
研究課題名(和文) ORMDL3がアレルギー性鼻炎に与える影響についての研究

研究課題名(英文) Reseach about the effect of ORMDL3 on allergic rhinitis

研究代表者

扇 和弘 (Ogi, Kazuhiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：80464056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：orosomucoid-like 3 (ORMDL3) 過剰発現Daudi細胞を用いてORMDL3のB細胞における機能を解析した。B細胞受容体刺激後のNFATおよびMAPキナーゼの活性化を評価したが、いずれもORMDL3過剰発現による影響は確認されなかった。またThapsigargin (TG) 刺激後の、Unfolded protein response 経路における影響の解析を行ったが、ORMDL3過剰発現による影響は確認されなかった。TG刺激後の生存率に変化はなかったが、クロロキンはORMDL3過剰発現細胞のアポトーシスを促進し生存率を低下させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からはORMDL3が関与するオートファジーの調節によりB細胞の生理的な機能に影響を与えることなく、B細胞の分化生存が制御される可能性があると考えられた。アレルギー性鼻炎発症に関わるORMDL3がB細胞に与える影響を解析することにより、新たな治療法の開発のきっかけとなる可能性が示唆された。既存の抗ヒスタミン薬による肥満細胞のアウトプットの抑制を中心とした治療では治療効果が不十分である患者も多く、オートファジー機能をターゲットとしたこれまでとは異なる方面からの治療への選択肢を社会に示すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：There was no significant difference in nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activation and Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) phosphorylation via B cell receptor between vector-transfected and orosomucoid-like 3 (ORMDL3)-overexpressing cells. In addition, activation of unfolded protein response (UPR) was not affected in ORMDL3-overexpressing cells after thapsigargin (TG) treatment. Although the viability of vector-transfected cells did not significantly differ from that of ORMDL3-overexpressing cells after TG treatment, chloroquine reduced the viability of ORMDL3-overexpressing cells. These results suggest that ORMDL3 has an important role in the regulation of autophagy-related apoptosis, although it does not have significant role in the extracellular calcium mobilization and UPR.

研究分野：アレルギー性鼻炎

キーワード：ORMDL3 B細胞 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

これまでに複数のゲノムワイド関連解析により、*orosomucoid-like 3 (ORMDL3)* と小児気管支喘息の発症との関連が報告されている。また *ORMDL3* はその他に関節リウマチ、1型糖尿病、クローン病、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患、炎症性疾患との関連も報告されており、我々の研究室では *ORMDL3* の mRNA 発現に最も相関を示した染色体 17q21 の rs7216389 の遺伝子多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) がアレルギー性鼻炎発症との間に有意な相関 ($p=0.0012$) があることを報告した (Tomita K et al. Allergy 2013)。*ORMDL3* は小胞体に存在する膜貫通型タンパク質であり、unfolded protein response (UPR) を調節していると考えられている。

研究代表者はこれまでにラット肥満細胞 (RBL-2H3 細胞) にヒト *ORMDL3* の cDNA をトランスフェクションし過剰発現させた細胞を解析しその影響について検討した。その結果、*ORMDL3* 過剰発現肥満細胞は脱顆粒反応の変化は少ないが、高親和性 IgE 受容体刺激後の TNF、Interleukin-4 (IL-4) の産生が亢進していた。そしてそのサイトカイン産生亢進は S1P アゴニスト (FTY720) により、ベクターをトランスフェクションした親細胞と同程度まで抑制されることが明らかとなった。このように *ORMDL3* は肥満細胞の脂質代謝を介したサイトカイン産生を調節し、アレルギー性鼻炎の発症に関与している可能性が示唆された (現在投稿中)。

肥満細胞の高親和性 IgE 受容体に IgE と抗原による架橋が起こることにより、肥満細胞の活性化が誘導される。IgE を産生する B 細胞の UPR により活性化された Activating transcription factor 6 (ATF6) は Beclin1 を介して脾臓での B 細胞のアポトーシスを抑制、オートファジーを誘導すると考えられている (Dang J et al. J Immunol 2017)。このメカニズムにより *ORMDL3* は B 細胞の分化や増殖に影響を与えていると考えられるが、B 細胞の細胞内シグナル伝達に与える詳細な影響や脂質代謝への影響については明らかではない。肥満細胞の活性化に対して重要な役割を持つ B 細胞における *ORMDL3* の影響については不明な点が多く、研究の余地があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は *ORMDL3* が B 細胞のシグナル伝達および分化増殖に与える影響を明らかにし、アレルギー性鼻炎の病態を解明することである。*ORMDL3* はスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 産生に対する負の調節を行い、脂質代謝および炎症反応に関わっていると考えられている。S1P アゴニストである FTY720 が多発性硬化症のような難治性疾患に有効であることが報告されているが、*ORMDL3* の機能を更に明らかにすることができれば、*ORMDL3* 拮抗薬もしくは *ORMDL3* が関連するシグナル伝達経路を制御する薬剤により治療につながる可能性があると考えられる。

これまでにいくつかの報告で *ORMDL3* が炎症性疾患や自己免疫疾患に関係していることが報告されており、*ORMDL3* が免疫反応の調節において重要な役割を持っていることが示唆されている。特に気管支喘息に関しては多くの報告があるが、アレルギー性鼻炎と *ORMDL3* の関係についての報告は少なく、*ORMDL3* がリンパ球や骨髄球に与える影響についてはまだ不明なことが多い。この研究により *ORMDL3* の B 細胞における影響を明らかにする事で、アレルギー性鼻炎の病態を解明し、新たな治療薬の開発に貢献できると考えられる。さらにアレルギー性鼻炎のみでなく、難治性自己免疫疾患の治療につながる可能性も期待できる。

3. 研究の方法

(1) から (4) については、*ORMDL3* を過剰発現させた B 細胞とベクターをトランスフェクションした親細胞を比較してその影響について検討を行った。(5) については臨床検体を用いて実際のアレルギー性鼻炎患者での *ORMDL3* の発現について検討を行った。

(1) *ORMDL3* 過剰発現 B 細胞受容体 (BCR) 刺激後の Nuclear factor of activated T cells (NFAT) 産生に与える影響について解析を行った。*ORMDL3* および NFAT レポーター遺伝子を同時にトランスフェクションし過剰発現させた B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激し、刺激後の NFAT 活性化をルシフェラーゼアッセイを用いて定量化した。またウエスタンブロットを行い、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) および c-jun N-terminal kinase (JNK) 活性化へ与える影響について解析を行った。

(2) *ORMDL3* 過剰発現細胞の小胞体ストレスによる UPR 経路への影響について解析を行った。Thapsigargin (TG) により小胞体ストレスを負荷し、UPR の 3 つの経路 (PKR-like endoplasmic reticulum kinase [PERK] 経路、Inositol requiring 1 [IRE1] 経路、Activating transcription factor 6 [ATF6] 経路) について解析を行った。

(3) *ORMDL3* 過剰発現 B 細胞の脂質代謝に与える影響について解析を行った。BCR 刺激による小胞体ストレス負荷を与えた状態で S1P 産生に及ぼす影響について、S1P 測定キットにより解析を行った。

(4) 異なる段階でオートファジーを阻害する TG とクロロキンをを用いて、*ORMDL3* の過剰発現が

オートファジーの阻害による B 細胞の生存率に与える影響について解析した。

(5) アレルギー性鼻炎患者の下鼻甲粘膜組織における ORMDL3 の発現について免疫組織化学染色を行い検討し、次にアレルギー性鼻炎の重症度別に ORMDL3 の発現を評価した。ORMDL3 の発現部位 (上皮細胞、線維芽細胞、組織下) について解析を行い、肥満細胞については二重染色を行い確認した。またアレルギー性鼻炎の重症度や血清 IgE との相関が見られないか確認した。

4. 研究成果

(1) ORMDL3 を過剰発現させた Daudi 細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより NFAT 活性化について親細胞と比較を行ったが、ORMDL3 過剰発現による影響は確認されなかった。BCR 刺激後の細胞をサンプリングし ERK および JNK 活性化を評価したが、同様に ORMDL3 過剰発現による影響は確認されなかった。

(2) TG により ORMDL3 過剰発現 B 細胞に小胞体ストレスを負荷し、UPR 経路における影響への解析を行った。PERK 経路における PERK のリン酸化、IRE1 経路における IRE1 のリン酸化、ATF6 経路における ATF6、LC3、Beclin1 についてウエスタンブロットで解析を行ったが、ORMDL3 過剰発現による影響は確認されなかった。

(3) BCR クロスリンクによる刺激後の S1P 産生に及ぼす影響について、S1P 測定 ELISA キットにより解析を行ったが、S1P の測定はできなかった。他社の ELISA キットでも検討したが、同様に測定不能であったため、実験条件を BCR の刺激から TG による小胞体ストレス負荷に変更したが、やはり測定できなかったため今後の課題となった。

(4) TG およびクロロキンを各 B 細胞に曝露し、24 時間後に MTT アッセイにより細胞生存率を確認した。TG はオートファゴソームとリソソームの融合を阻害するが、TG 刺激後の ORMDL3 過剰発現細胞の生存率に変化はなかった。しかしオートファジーにおいてリソソーム分解機能を抑制するクロロキンは至適濃度において ORMDL3 過剰発現細胞のアポトーシスを促進し細胞生存率を低下させた (図 1)。

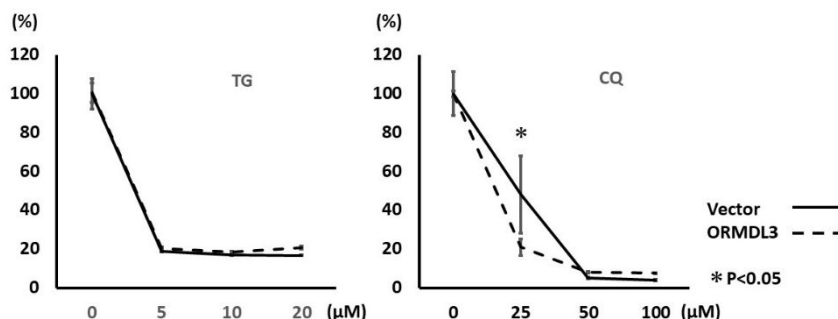


図 1 TG および CQ 刺激後の細胞生存率

(5) アレルギー性鼻炎症例の下鼻甲粘膜組織における ORMDL3 の発現の違いについて ORMDL3 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い検討した。肥満細胞については二重染色を行い確認したが、ORMDL3 は主に上皮細胞において発現量が高く、肥満細胞での発現量は高くなかった。アレルギー性鼻炎の重症度による粘膜組織中の ORMDL3 の発現の差や血清 IgE の差は認められなかった。

これらの結果は、ORMDL3 過剰発現は B 細胞において細胞外カルシウム流入を介するシグナル伝達への影響は与えず、小胞体ストレス負荷後の UPR 経路にも大きな影響は与えないと考えられた。しかしオートファジーを介するアポトーシスの制御に参与することを示唆していると考えられた。ORMDL3 が影響するオートファジーの段階を解明することにより、B 細胞の分化生存の制御が可能となりアレルギー性鼻炎の新規治療につながる可能性があると考えられた。

< 引用文献 >

- Tomita K, et al. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013; 68: 92-100.
- Dang J, et al. ORMDL3 Facilitates the Survival of Splenic B Cells via an ATF6 - Endoplasmic Reticulum Stress-Beclin1 Autophagy Regulatory Pathway. *J Immunol* 2017; 199:1647-59.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuhiro Ogi, Masafumi Sakashita, Tetsuji Takabayashi, Shigeharu Fujieda |
| 2. 発表標題 The role of ORMDL3 in the pathophysiology of allergic rhinitis |
| 3. 学会等名 Japanese Society of Allergology |
| 4. 発表年 2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|