

ニッポンハム食の未来財団 設立記念研究助成 研究完了報告書（1）

平成 28 年 4 月 29 日

一般財団法人ニッポンハム食の未来財団  
理事長 山田良司 殿

研究課題名	血清 microRNA を用いた 新生児・乳児消化管アレルギーの新規バイオマーカーの確立		
フリガナ	イノウエ ユウザブロウ		
代表者名	井上 祐三朗		
所属機関	（機関名）千葉大学大学院医学研究院小児病態学 （役職名）講師		
所属機関住所	〒260-8670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1- 8- 1		
連絡先	Tel: 043-226-2144 Fax: 043-226-2145 E-mail: yuzaburo@chiba-u.jp		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	下条 直樹（シメジ ヨウ ナキ）	千葉大学大学院医学研究院小児病態学・教授	研究指導
	山出 史也（ヤマデ ヒミヤ）	千葉大学医学部附属病院・医員	MicroRNA 発現解析
	工藤 可奈子（クドウ カコ）	千葉大学医学部附属病院・医員	臨床統計解析
本助成金による発表論文、学会発表	なし		

代表者名	井上 祐三朗
------	--------

## 1. 研究結果概要

新生児・乳児消化管アレルギーは、主に新生児期に、牛乳成分が原因で消化器症状を認める非IgE依存性食物アレルギーであるが、その病態は未だ明らかではない。そこで本研究では、新生児においても容易に採取できる血清を用いて、新生児・乳児消化管アレルギーに特異的な分泌型microRNA発現を解析し、本疾患の新たなバイオマーカーの確立することを目的とした。

新生児・乳児消化管アレルギー児5名、IgE依存型牛乳アレルギー児5名、健康新生児5名から血清を採取し、179種類の血清microRNAの発現を網羅的に解析した。

新生児・乳児消化管アレルギー児では、健康新生児およびIgE依存型牛乳アレルギー児と比べて、hsa-mir-30c-5pの発現が有意に高く、hsa-mir-22-5pおよびhsa-mir-2110の発現が有意に低かった。これらの血清microRNAは、新生児・乳児消化管アレルギーにおける、新規バイオマーカーとなる可能性があると考えられた。

これらのmicroRNAの候補標的遺伝子には、免疫制御に重要な役割をもつ制御性T細胞の転写因子であるHeliosや、消化管炎症に重要なサイトカインであるIL-21の受容体があり、新生児・乳児消化管アレルギーの病態形成に関わっている可能性が考えられた。

## 2. 研究目的

新生児・乳児消化管アレルギーは、主に新生児期に、牛乳成分が原因で消化器症状を認める非IgE依存性食物アレルギーである。患者数は増加傾向にあるが、その病態は未だ明らかではない。

MicroRNA(miR)は20-21塩基からなる1本鎖RNAであり、特定の遺伝子のmRNAの3'UTRに相補的に結合することで、mRNAの転写抑制や分解を誘導する。腫瘍をはじめとした様々な疾患において、特徴的なmicroRNA発現が認められることから、microRNAは病態に関連する遺伝子発現の転写後制御に働くことが示唆されている。近年、microRNAは細胞内だけでなく、様々な体液中に存在するエクソソーム中に存在する（分泌microRNA）ことが明らかになっており、より簡便に評価できることから、その解析は病態解明につながるだけでなく、疾患の新たなバイオマーカーとなることが期待されている。

これまで申請者らは、小児期気管支喘息疾患患者におけるmicroRNA発現を検討し、病態の解析を行ってきた。そこで本研究では、新生児においても容易に採取できる血清を用いて、新生児・乳児消化管アレルギーに特異的な分泌型microRNA発現を解析し、本疾患の新たなバイオマーカーの確立することと、本疾患の病態に関わる遺伝子転写後制御機構を明らかにすることを目的とする。

本研究により、新生児・乳児消化管アレルギー特異的な血清microRNAが明らかになることで、新生児・乳児消化管アレルギーの診断や発症予測に有用なバイオマーカーが確立され、新生児・乳児消化管アレルギー特異的microRNAをターゲットとした新たな治療法への知見が得られることが期待される。

代表者名	井上 祐三朗
------	--------

### 3. 研究計画及び研究手法

当初の研究計画では、健常新生児と新生児・乳児消化管アレルギーを持つ新生児において、血清 microRNA 発現を比較する予定であったが、同意取得できた症例が少なかつたため、以下の研究により新生児・乳児消化管アレルギー特異的な血清 microRNA を検討した。

#### <血清の採取>

- ① 千葉大学医学部附属病院の倫理委員会において、研究計画の承認を得た。
- ② 千葉大学医学部附属病院において、**新生児・乳児消化管アレルギー**と診断した 5 名の乳児において、同様に保護者から同意を取得し、血清 150  $\mu$ l を採取した。  
新生児・乳児消化管アレルギーの診断は、以下によりおこなった。
  - 生後 1 か月までに、人工乳摂取による消化器症状を認める。
  - 人工乳による経口負荷試験で、消化器症状が誘発される
  - 牛乳蛋白によるアレルギー特異的リンパ球増殖試験陽性
  - 生後 6 か月まで、血清牛乳特異的 IgE が陰性
- ③ 千葉大学医学部附属病院において、**IgE 依存型牛乳アレルギー**と診断した 5 名の乳児において、同様に保護者から同意を取得し、血清 150  $\mu$ l を採取した。  
IgE 依存型牛乳アレルギーの診断は、以下によりおこなった。
  - 生後 6 か月までに、人工乳摂取による消化器症状を認める。
  - 人工乳による経口負荷試験で、消化器症状が誘発される
  - 血清牛乳特異的 IgE が陽性
- ④ **健康新生児**（疫学研究「アレルギー発症機序の解明にむけたアレルギー出生コホート研究とヒト化マウス作製」参加者の保護者から同意を取得し、血清 150  $\mu$ l を使用した。

#### <血清 microRNA の網羅的発現解析>

血清からの RNA 抽出は、RNeasy Mini キット(Qiagen)を用いて行った。microRNA の cDNA 合成は、Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon)を用いて行った。179 種類の血清 microRNA の発現は、Exiqon 社 Serum / Plasma Focus microRNA PCR Panel を用いて解析した。

#### <新生児・乳児消化管アレルギー特異的 microRNA の検討>

新生児・乳児消化管アレルギー児において、IgE 依存型牛乳アレルギーおよび健康新生児の双方と比べて、発現が有意に異なる microRNA を新生児・乳児消化管アレルギー特異的 microRNA として抽出した。

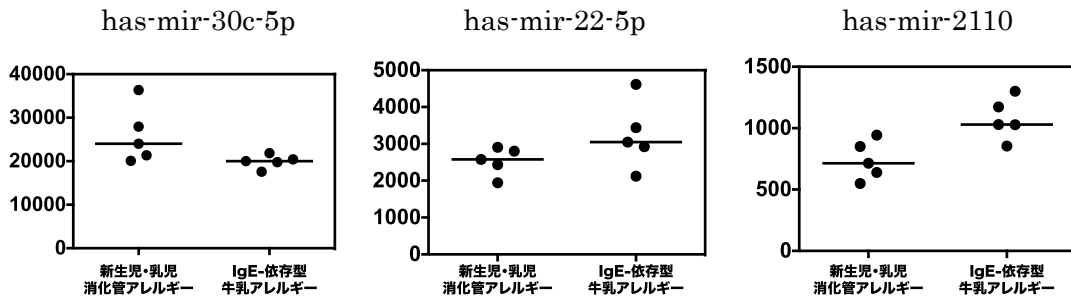
代表者名	井上 祐三朗
------	--------

4. 結果について

新生児・乳児消化管アレルギー特異的 microRNA の検索

新生児・乳児消化管アレルギー児では、健康新生児および IgE 依存型牛乳アレルギー児と比べて、以下の血清 microRNA の発現に有意な違いを認めた。

- 発現が上昇している microRNA
  - hsa-mir-30c-5p
- 発現が低下している microRNA
  - hsa-mir-22-5p
  - hsa-mir-2110



(Mann-Whitney 検定)

これらの血清 microRNA は、新生児・乳児消化管アレルギーにおける、新規バイオマーカーとなる可能性があると考えられた。

新生児・乳児消化管アレルギー特異的 microRNA の候補標的遺伝子

新生児・乳児消化管アレルギー特異的 microRNA の候補標的遺伝子から、これらの microRNA の、新生児・乳児消化管アレルギーの病態における役割について、考察をおこなった。

microRNA 標的遺伝子予測アルゴリズム DIANA-microT-CDS を用いて、新生児・乳児消化管アレルギー特異的 microRNA の標的と考えられる遺伝子を検索した。

microRNA

hsa-mir-30c-5p  
 hsa-mir-22-5p  
 hsa-mir-2110

候補標的遺伝子

*BRWD3, TBC1D10B, C9orf72* など  
*GCC2, GARS, SACM1L* など  
*NCR3LG1, G3BP2, ELK1* など

代表者名	井上 祐三郎
------	--------

4. 結果について（続き）

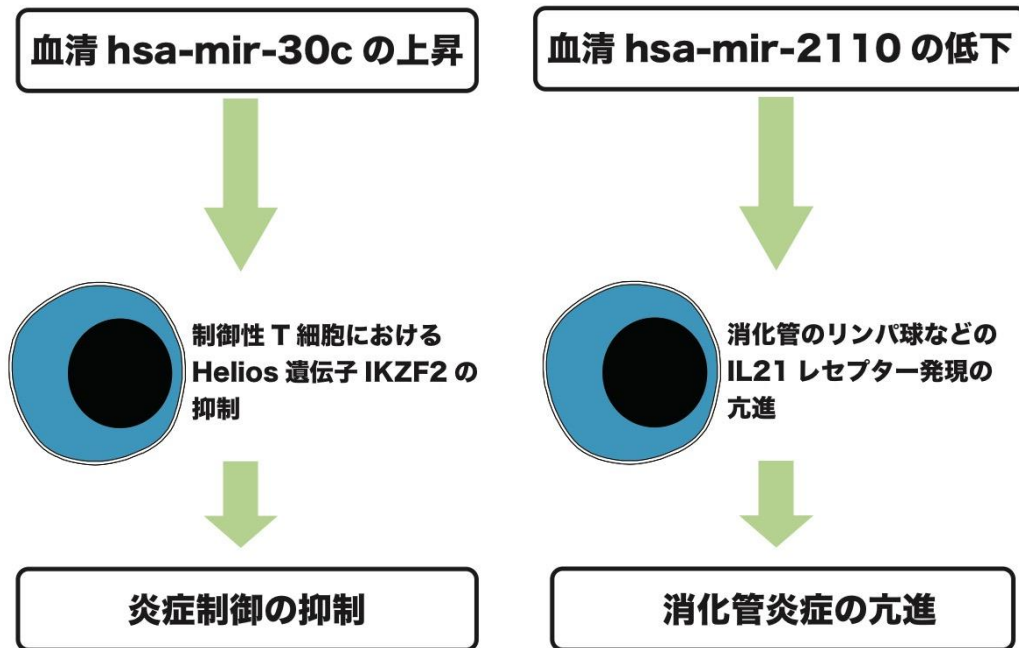
これらの候補標的遺伝子の中には、

- 免疫制御に重要な役割をもつ制御性 T 細胞の転写因子である Helios
- 消化管炎症に重要なサイトカインである IL-21 の受容体

が含まれていた。以下の図（仮説）に示すように、新生児・乳児消化管アレルギー患者に認められた特徴的な microRNA 発現は、これらの分子の発現の制御を介して、消化管の炎症に関わっている可能性が考えられた。

しかしながら、これらの microRNA が、本当にこれらの分子の発現制御に関わっているかの検討には、in vitro あるいは in vivo の実験による機能解析が必要であるが、本研究の研究期間および予算では遂行できなかつた。機能解析については、今後の研究課題としていきたい。

新生児・乳児消化管アレルギー特異的 microRNA の候補標的遺伝子と、新生児・乳児消化管アレルギーの病態における意義（仮説）



代表者名	井上 祐三朗
------	--------

5. 今後の研究活動について

本研究では、新生児・乳児消化管アレルギーにおける網羅的な microRNA 解析を行ったため、患者数は 5 名と限られた人数しか解析できなかった。

今後は、本研究で得られた結果を確認するために、解析対象とする microRNA を限定し、患者数を増やして、解析を行う必要がある。

また、論文化にあたっては、これらの microRNA の機能解析と、新生児・乳児消化管アレルギーの病態における役割の検討が必要であり、今後の課題である。

以上