

| | |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| 研究課題名 | 食物アレルギー罹患児の 血漿中におけるアレルギー関連 miRNA の発現プロファイル解析 |
| フリガナ | イガラシ アリサ |
| 代表者名 | 五十嵐 ありさ |
| 所属機関（機関名） （役職名） | 国立研究開発法人 国立成育医療研究センター研究所 研究員 |
| 本助成金による 発表論文，学会発表 | 特になし |

研究結果要約

microRNA (miRNA) は、細胞内で遺伝子の発現を調節する non-coding RNA の一つであり、細胞間の情報伝達物質としても作用していると考えられている。そのため、近年新たなバイオマーカーや機能分子として様々な分野で研究が進められている。

本研究では、食物アレルギー罹患児の血漿中にアレルギー疾患との関連が報告されている miRNA がどの程度検出されるのか、また食物アレルギーを持たない健常児と比較して、miRNA のプロファイルに違いがあるのかを明らかにし、血漿 miRNA がアレルギー疾患の病態をどの程度反映するのか検証を行うことを目的とした。

健常児および食物アレルギー罹患児の血漿における miRNA の発現を調べた結果、これまでの研究でアレルギーとの関連が報告されている、miR-146、miR-155、miR-21、miR-375、miR-19a はすべて検出限界以下であった。

一方、食物アレルギー罹患児の血漿でコントロールと比較して明らかに発現差のある新たな miRNA が認められた。健常児と比較して食物アレルギー罹患児の血漿で有意に高い miRNA は 7 種類、有意に低い miRNA は 145 種類であった。

今後はこれら miRNA が発現する細胞、ターゲット遺伝子等を検証して食物アレルギーへの関与を明らかにするだけでなく、更なる検証によりバイオマーカーとしての有用性を検証したいと考えている。

研究目的

小児の食物アレルギーは、成長すると 60-70%が治癒することが知られている。しかし、一方でアトピー性皮膚炎を伴う食物アレルギーや一部の症例では、年長児においても治癒しない場合が存在する。その原因の一つとして経口免疫寛容が誘導されないことが要因の一つと考えられるが、遷延化の詳細なメカニズムは明らかではない。

microRNA (miRNA) は、細胞内で遺伝子の発現を調節する non-coding RNA の一つであり、細胞から放出され、Exosome を介して他の細胞に取り込まれることから、細胞間の情報伝達物質としても作用していると考えられている。現在、ヒトにおいて 2,603 種類の miRNA が同定されており、血清、血漿中にも分泌されるため、近年、新たなバイオマーカーとして様々な分野で研究が進められている。

本研究は、第一に、食物アレルギーが遷延する児の血漿中にアレルギー関連 miRNA がどの程度検出されるのか、また食物アレルギーが治癒した児および、食物アレルギーを持たない健常児と比較して、miRNA のプロファイルに違いがあるのかを明らかにし、血漿 miRNA がアレルギー疾患の病態をどの程度反映するのか検証を行うことを目的とする。第二に、食物アレルギー罹患児において共通に発現し、且つこれまでにアレルギーとの関連が報告されていない miRNA が同定された場合は、その機能を明らかにし、将来的には miRNA を使用したアレルギーの診断および新たな治療方法開発を目指す。

研究計画及び研究手法

① <検体収集>

コホート研究で使用した検体及び国立成育医療研究センターアレルギー科を受診した児において診断のため採血した血液の余剰を使用した。

コントロールの 3 歳児は母子コホートより、9 歳児は成育コホートの中から、アンケート情報および臨床情報をもとに選択し、残血漿のあるものから 200 μ L を分取した。

食物アレルギー罹患児は、成育医療研究センターアレルギー科医師の協力を得て、食物アレルギーで同科を受診し、同意が得られた患児を対象に検査で使用した血液から同日中に血漿を分離した。分離した血漿は -80°C で保存し、臨床情報を基に使用検体を選択した。

研究計画では食物アレルギーが治癒した児の検体も収集する予定であったが、年度を越えてしまうため、本研究では健常児と食物アレルギー罹患児のみを収集した。

② <miRNA の抽出および miRNA の検出>

血清・血漿 miRNA 抽出 kit (QIAGEN) により血漿中の Total RNA の抽出を行った。

miRNA の検出には Agilent miRNA マイクロアレイ v21.0 を使用した。

③ <miRNA のプロファイル解析>

マイクロアレイデータの解析には、GeneSpring を使用した。

まず、3 歳児、9 歳児、食物アレルギー罹患児において検出された miRNA の種類数を比較した。

次に、プロファイルを比較するため、3 歳、9 歳、食物アレルギー罹患児、すべてのデータを使用して PCA 解析、クラスタリング解析を行い、その後、9 歳児、食物アレルギー罹患児のデータのみを用いてクラスタリング解析を行った。

また、アレルギー性炎症に関わる miRNA、miR-146、miR-155、miR-21、miR-375、および喘息に関する miRNA miR-19a のマイクロアレイでのシグナル値を確認した。

さらに、食物アレルギーで特異的に変動する miRNA の候補を抽出するため、9 歳児コントロールと、食物アレルギー罹患児で検出される miRNA を比較し、食物アレルギー罹患児で 2 倍以上発現差のある、($p < 0.05$) の miRNA を抽出した。

④ <既知の miRNA の発現の検証と影響の予測>

GeneSpring を用いて抽出した食物アレルギー特異的に変動する miRNA 候補について、IPA (Ingenuity Pathways Analysis) を使用して解析を行った。Network 解析により発現細胞、ターゲット遺伝子を解析し、miRNA の発現変動によりもたらされる影響を予測した。

結果と考察

① <検体収集>

コントロール検体

母子コホートより 3 歳児 11 検体、成育コホートより 9 歳児 35 検体が得られた。アンケートおよび臨床情報をもとに 3 歳児 11 検体、9 歳児 12 検体を食物アレルギーのコントロールとして使用した。

食物アレルギー検体

食物アレルギー罹患児は成育医療研究センターアレルギー科医師の協力により、49 名から同意が得ることができ、48 検体から必要量の血漿を分離することができた。48 検体の中から、臨床情報を

基準に 23 検体まで絞り込み、食物アレルギー患児検体とした。

研究計画では食物アレルギーが治癒した児の検体も収集する予定であったが、治療前後で比較するために十分な検体を単年度内で収集することができなかった。そのため、当初予想していたアレルギーが遷延する児、治癒する児の比較を行うことができなかった。

また、コホート研究または検査の残血漿を使用したため、3 歳児では十分な検体数を確保することができず、加えて、3 歳児と 9 歳児および食物アレルギー罹患児で、血漿の凍結融解の回数等、保存の条件を一定にすることができなかった。

さらに、当初は食物アレルギーの影響を見るため、アトピー性皮膚炎を併発していない検体を選択する予定であったが、9 割がアトピー性皮膚炎の治療中であり、アトピー性皮膚炎なしの患者検体は 4 検体しか得られなかった。そこで、本研究では既往のみの 5 検体と、治療中ではあるが IGA の症状がない 14 検体を含めて食物アレルギー検体とした。

② <miRNA の抽出および miRNA の検出>

各検体より RNA を抽出した。抽出に使用したすべての検体から十分量の RNA を抽出することができ、すべての検体について、解析に使用可能なデータが得られた。

③ <miRNA のプロファイル解析>

3 歳、9 歳のコントロール検体と食物アレルギー検体について、検出された miRNA の種類数を比較した結果、検出された miRNA の種類は食物アレルギーで有意に低かった。

PCA 解析を行った結果、3 歳と、9 歳コントロールまたは食物アレルギーの間に違いが認められた。miRNA には凍結融解等によって検出数が増加するものがある。3 歳児血漿は、融解回数が 9 歳児や食物アレルギーより多かったため、miRNA のプロファイルが異なったのではないかと推測される。また、3 歳児血漿では長期保存によって増加すると報告されている miRNA の値も他と比較して高かったため、今回の食物アレルギーとの比較における解析対象から除外することとした。

また、血漿中から検出される miRNA の種類は少ないため、検出数によってクラスターが分かれる傾向が認められた。そこで、解析対象を、全検体で発現している miRNA 127 種類に絞ったところ、検出数による差が抑えられた。これにより、9 歳児と食物アレルギー患児でプロファイルの比較が可能であると判断し、プロファイルの比較は 9 歳児コントロールと食物アレルギー患児全検体で発現している miRNA を対象とすることとした。

上記の条件下でプロファイルを比較した結果、miRNA と食物アレルギー罹患児で発現が低い傾向のある miRNA と、逆に高い傾向のある miRNA のクラスターが認められた (図 1)。

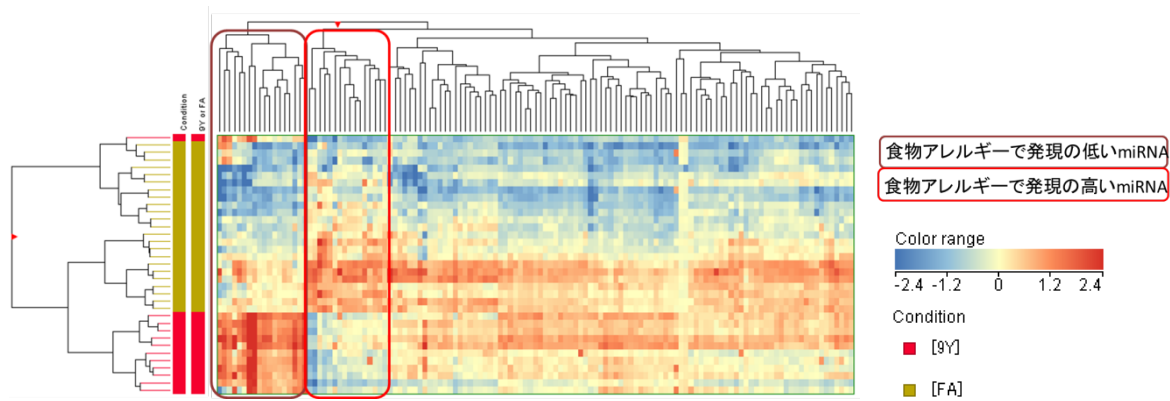


図1 クラスタリング解析結果 (コントロール：9Y 食物アレルギー：FA)

次に、研究計画時に、食物アレルギー罹患児の血漿中から検出されるのではないかと考えていた、アレルギー性炎症に関わる遺伝子を制御することが報告されている miRNA、miR-146¹⁾、miR-155²⁾、miR-21³⁾、miR-375⁴⁾、および喘息に関する miRNA miR-19a⁵⁾ の発現を確認するため、シグナル値を確認した。しかしながら、すべての miRNA のシグナルは検出限界以下であった。

一方、食物アレルギーで特異的に発現が上昇または低下する miRNA があるか調べるため、9 歳児と食物アレルギー罹患児を比較し、発現差が 2 倍以上 ($p < 0.05$) の miRNA を抽出した。その結果、食物アレルギー罹患児で有意に高い miRNA 7 種類と、有意に低い miRNA 145 種類 (計 152 種類) が認められた (図 2)。

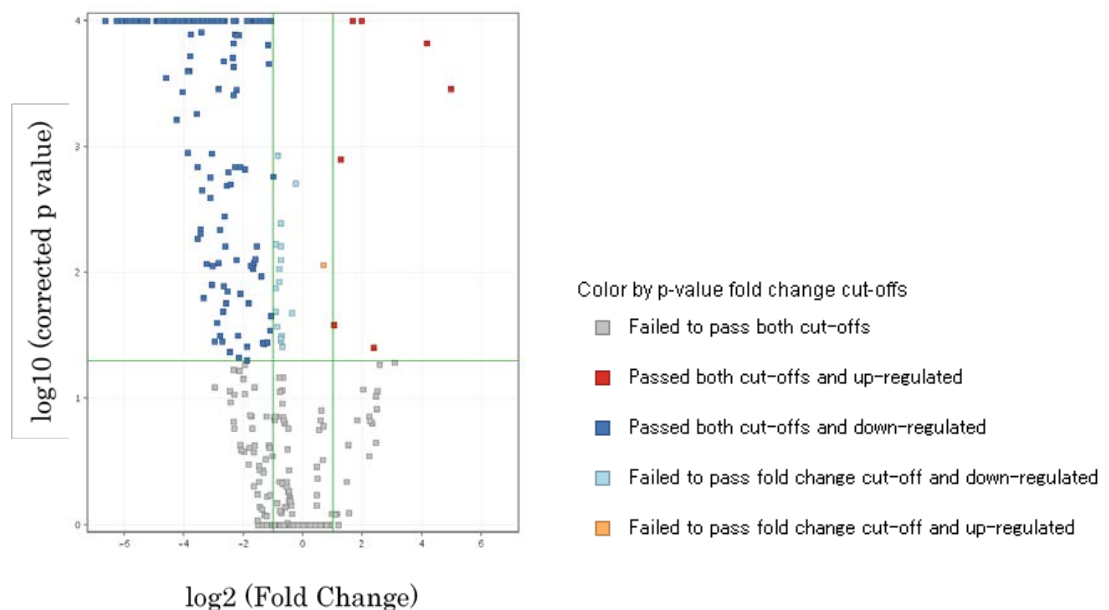


図2 食物アレルギーで発現差のある miRNA

④ <既知の miRNA の発現の検証と影響の予測>

食物アレルギー特異的に発現が上昇または低下する miRNA として抽出した 152 種類の miRNA について、IPA を用いて解析を行った。

Network 解析による影響予測

まず、食物アレルギー罹患児で有意に上昇する miRNA 152 種類が関与する疾患およびターゲット遺伝子を検索した結果、関与する疾患として糸球体腎炎やループス腎炎が上位に挙げられた（表 1）。これは、ループス腎炎において発現が上昇することが報告されている miR-575 の発現が、コントロールと比較して食物アレルギーでは 17 倍と高かったためであると考えられる。腎臓の細胞では発現が確認されているが、血漿中に分泌されるのかは明らかではない。今後、本研究で抽出された食物アレルギー特異的に変動する miRNA が何によって誘導されているのかを明らかにすることで、バイオマーカーとしての有用性が期待できると考えられる。

アトピー性皮膚炎の有無や IGA スコア等、アレルギーに関する臨床症状と関連する miRNA の種類についても検討したが、血漿中で発現する miRNA 中にこれら臨床情報と関連する miRNA は認められなかった。

miRNA の論文は、近年飛躍的に増えているため、既報のターゲットを予測するために IPA が使えると考えられたが、実際には 2012 年までのデータしか更新されていなかったため、既報のターゲットを検索するために使用するデータベースとしては不十分ではあったが、配列ベースでのターゲットが予測できたため、発現変動が影響すると考えられるタンパクや転写因子の候補も抽出することができた。

今後の研究活動について

本研究においては、アレルギーと関連があることが報告されている miRNA 5 種類は血漿中から検出することができなかった。他の miRNA に比べて絶対量が少なく、検出限界以下となったのか、エクソソーム等から検出されるのかは明らかではないが、本研究方法で食物アレルギー罹患児の血漿中から検出されないことが明らかとなった。他のアレルギー疾患や、炎症疾患において同じ検出方法を用いて血漿中から検出された場合、食物アレルギーの影響を除外することができる点で、本研究結果は有用であると考えられる。これら結果を踏まえて、他のアレルギー疾患で発現しているのか確認したいと考えている。

さらに、食物アレルギー罹患児の血漿において発現差のある 152 種類の miRNA が明らかとなった。これら発現差のある miRNA がどのような機序によってどのような細胞から産生されるのかは

明らかではない。これら miRNA のターゲット遺伝子や発現する細胞等、更なる検証を行い、血漿から食物アレルギーの様々な予測や診断が行えるようなバイオマーカーや治療ターゲット候補の探索に役立てたいと考えている。

参考文献

- 1) Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell*. 2010;142(6):914-29.
- 2) Johansson K, Malmhäll C, Ramos-Ramírez P, Rådinger M. MicroRNA-155 is a critical regulator of type 2 innate lymphoid cells and IL-33 signaling in experimental models of allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):1007-1016.
- 3) Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *J Immunol*. 2009;182(8):4994-5002.
- 4) Biton M, Levin A, Slyper M, Alkalay I, Horwitz E, Mor H, et al. Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium-T cell crosstalk. *Nat Immunol*. 2011;12(3):239-46.
- 5) Simpson LJ, Patel S, Bhakta NR, Choy DF, Brightbill HD, Ren X, et al. A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes T H 2 cytokine production. *Nat Immunol*. 2014;15(12):1162-70.

以上

表 1 食物アレルギーで発現が変動した miRNA が関連する疾患リスト

| Diseases or Functions Annotation | p-Value | # Molecules |
|-------------------------------------------------------|----------|-------------|
| Class II lupus nephritis | 2.62E-23 | 14 |
| Early stage invasive cervical squamous cell carcinoma | 7.27E-19 | 11 |
| Inflammation of organ | 1.49E-18 | 25 |
| Non-insulin-dependent diabetes mellitus | 6.60E-18 | 17 |
| Nonobstructive azoospermia | 1.57E-13 | 11 |
| Inflammation of absolute anatomical region | 2.88E-13 | 19 |
| Invasive carcinoma | 3.35E-13 | 13 |
| Interstitial pneumonia | 3.70E-13 | 10 |
| Idiopathic pulmonary fibrosis | 2.46E-12 | 9 |
| Diabetes mellitus | 9.60E-12 | 18 |
| Primary melanoma | 3.15E-11 | 7 |
| Experimental autoimmune encephalomyelitis | 4.22E-11 | 11 |
| Fibrosis | 2.00E-10 | 13 |
| Squamous cell cancer of the hypopharynx | 2.14E-10 | 7 |
| Benign pelvic disease | 2.36E-10 | 13 |
| Liposarcoma | 2.84E-10 | 7 |
| Invasive ductal breast carcinoma | 5.19E-10 | 8 |
| Dedifferentiated liposarcoma | 6.54E-10 | 6 |
| Pharyngeal carcinoma | 6.73E-10 | 11 |
| Stage II colorectal cancer | 1.47E-09 | 5 |
| Inflammation of body cavity | 3.62E-09 | 14 |
| Sinonasal natural killer/T-cell lymphoma | 3.90E-09 | 7 |
| Primary solid tumor | 7.34E-09 | 10 |
| Growth of human herpesvirus 1 | 1.09E-08 | 4 |
| Psoriasis | 2.59E-08 | 11 |
| Myelodysplastic syndrome with 5q- syndrome | 2.65E-08 | 5 |
| Corticotrophic adenoma | 2.90E-08 | 4 |
| G1/S phase transition of embryonic cell lines | 4.37E-08 | 4 |
| Primary tumor | 1.61E-07 | 9 |
| Pituitary ACTH hypersecretion | 1.86E-07 | 4 |
| Hepatocellular carcinoma | 2.17E-07 | 12 |
| G1/S phase transition of fibroblast cell lines | 3.87E-07 | 4 |
| Alzheimer disease | 5.58E-07 | 10 |