

ニッポンハム食の未来財団 平成 30 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	新生児・乳児消化管アレルギーの診断にむけた革新的検査法の開発
フリガナ	ヤギ ヒサコ
代表者名	八木 久子
所属機関（機関名） （役職名）	群馬大学大学院医学系研究科医科学専攻小児科学分野 医員大学院生
本助成金による 発表論文，学会発表	<ul style="list-style-type: none"> ・ Allergology International 誌に投稿中 ・ 第 56 回日本小児アレルギー学会学術集会（2019 年 11 月）での発表、およびもう一編、海外誌への論文投稿を予定している。

研究結果要約

新生児・乳児消化管アレルギーは、臨床症状が多様であり、一般のアレルギー疾患と異なり特異的 IgE 抗体が検出されないことより診断は容易ではない。アレルゲン特異的リンパ球刺激検査 (ALST) は、本疾患の補助的診断になり得るが、新鮮末梢血が多量に必要であること、培養時間が長いことなどの問題点がある。これらを克服し迅速、簡便、かつ少量の採血量で実施可能な定量的 PCR 法を利用した新規診断法の確立を目的とした。

乳の消化管アレルギー児と疾患対照児の末梢血全血を採取し、4 種類の牛乳アレルゲンコンポーネントの混合物 (Pmix) または α カゼインで 24 時間刺激した。その後、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により発現が有意に変化する遺伝子を同定した。Pmix 刺激では 232 遺伝子、 α カゼイン刺激では 9 遺伝子が患者群特異的に変化し、そのうち 4 遺伝子は両刺激に共通していた。アレルギー性炎症に関わる既知遺伝子も含まれていた。次に、同定された遺伝子を本検査法のマーカー候補とし、各マーカーの mRNA 発現量を定量的 PCR 法で測定し、ALST 法や臨床診断との関連を検討した。ALST 法との相関がみられ、臨床診断能の高いマーカーを見出した。以上より、本検査法は消化管アレルギーの補助的診断において有用である可能性が示された。

研究目的

新生児・乳児消化管アレルギー（以下、消化管アレルギー）は、食物アレルギーの一型で新生児から乳児において主に牛乳が原因で嘔吐や血便、下痢などを呈する疾患の総称であり、非 IgE 依存性アレルギーと考えられている。本疾患の報告数は最近 10 年で急激な増加を認めている。消化器症状を呈することが多いが、発熱、哺乳力低下、活気不良、体重増加不良などの非特異的のみの場合もあることや、一般のアレルギー疾患と異なり抗原特異的 IgE 抗体が検出されないことから診断は容易ではない。更に、患者の約 10%は重症で成長障害などを起こす可能性が指摘されており¹⁾、精度の高い診断に基づいた治療が切望されている。

確定診断には食物経口負荷試験が必要であるが、一部の症例では敗血症様症状など重篤な症状を誘発するリスクがあり一概に施行できないことや、患児の状態が安定後に施行する必要があり時間がかかることなどが問題となる。アレルギー特異的リンパ球刺激試験 Allergen-specific lymphocyte stimulation test (ALST) は細胞依存性（非 IgE 依存性）アレルギーの補助的診断として有用であり、本疾患にも応用されているが^{2),3),4)}、実施可能な施設が限られている上に、末梢血単核細胞 (PBMC) の単離のために新鮮血を多量に要することより患児の負担が大きく、検査に時間と手間がかかるという問題点がある。

T 細胞は、抗原認識および共刺激による活性化後 1~2 時間以内に interleukin 2 (IL2) の産生を開始する。数時間以内に CD69 および IL2 receptor alpha (IL2RA) の細胞表面への発現が増強し、引き続いて、細胞増殖、次いでエフェクター細胞および記憶細胞への分化が起こることが知られている⁵⁾。これに基づいて、我々は抗原刺激後の初期の転写応答が、ALST における細胞増殖の代替マーカーになる可能性を考えた。本研究では、全血をスタート試料としてマイクロアレイを用いて抗原刺激の初期に発現量の変化する新規マーカーを探索し、次いで短時間の抗原刺激培養後に、定量的 PCR 法で測定を行い、各マーカーの臨床的有効性を検証する。本研究で開発する手技が確立されれば、抗原刺激に対する反応のごく初期のマーカーを利用するため、培養時間を大幅に短縮でき、また全血をスタート試料とするため PBMC 単離を行う必要がなく採血量も大幅に減らすことが可能となる。以上より、ALST の問題点を克服し迅速、簡便、かつ少量の採血量で可能な定量的 PCR 法を利用した消化管アレルギー診断法の確立を目的とした。

研究計画及び研究手法

1) 新規マーカーの探索

乳の消化管アレルギー患児 4 名と疾患対照児 3 名から採取したヘパリン化末梢血を AIM-V 培地で 4 倍希釈し、4 種の牛乳アレルギーコンポーネントの混合物 (Pmix) または α カゼインを添加後、37 度のインキュベータに 24 時間静置し培養した後に回収した。

マイクロアレイ（アジレント社 SurePrint G3 Human GE Ver 2.0）にて網羅的遺伝子発現解析を実施。Limma（Linear Models for Microarray Data; R-Package）を用いて発現が有意に変化する遺伝子の同定を行い、本検査法のマーカー候補とした。

マイクロアレイの実施は下記の手順で行った。

- i. 刺激後末梢血全血を溶血した後に、total RNA を抽出
- ii. 抽出した Total RNA を超微量分光光度計（ThermoFisher 社、Nano Drop）により定量後、バイオアナライザー（アジレント社）を用いた純度、品質の確認
- iii. Total RNA からの標識 cRNA 合成および精製
- iv. ハイブリダイゼーション
- v. スキャナーによる Cy3 シグナル値の検出

2) 新規マーカーのスクリーニング

マイクロアレイによる一次スクリーニングから、さらに検体数を増やし、同定された各マーカーの mRNA の発現量変化を定量的 PCR 法で測定した。同時に、同検体を用いて従来の ALST 法による測定を行った。ALST 法は、PBMC に Pmix または α カゼインを添加して培養 5 日後に、増殖細胞を BrdU にて標識し、取り込まれた BrdU の量を ELISA 法で測定した。刺激、非刺激サンプルの比率を stimulation index (SI) とした。

ALST 法との相関は、各マーカーの mRNA 発現量と ALST 法の SI を相関解析（Spearman correlation）にて検証した。本新規検査法の診断能の検討には、患者検体と対照検体の各マーカーの発現量を Mann-Whitney 検定にて比較し、ROC 曲線解析を行った。全ての統計学的解析には GraphPad Prism version 7 for Windows（GraphPad Software 社）を用いた。

これまでに、患児 4 症例、対照児 12 症例を解析した。多重ロジスティック回帰モデルを用いた解析は、症例数が少なく困難であった。

また、同定されたマーカーの中で既にアレルギー性炎症に関連することが知られる遺伝子で、移行産物が分泌される可能性のあるものについては、培養上清中の蛋白質の量を ELISA 法（協和メディックス社セルフリー-N）やシングルプレックスサスペンションアレイ（BioRad 社 BioPlex 100）を用いて測定した。

結果と考察

1) 新規マーカーの探索

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析結果の Scatter plot では、患者群と対照群間で Pmix 刺激およびカゼイン刺激にて、一部の遺伝子の発現変化が確認された。患児群の Pmix 刺激では抗

原刺激で変化している遺伝子が多いものの、対照群への刺激でも相当数の遺伝子の発現の変化が観察された。一方、 α カゼイン刺激では、刺激により発現変化する遺伝子数は対照群では患者群に比べ少なく、Pmix に比べ非特異的变化が少ないと考えられた。

抗原刺激により発現が有意に変化する遺伝子は、P 値<0.05 での検定では、Pmix 刺激で 412 遺伝子（発現増加 234、低下 178）、 α カゼイン刺激では 38 遺伝子（増加 35、低下 3）が患者群特異的に同定された。これらのうち 11 遺伝子は両刺激に共通して変化していた。P 値<0.01 とより厳しい条件では、Pmix 刺激では 232 遺伝子（増加 156、低下 76）、 α カゼイン刺激では 9 遺伝子（全て増加）が患者群特異的に変化を認め、うち 4 遺伝子が両刺激に共通であった。

同定された遺伝子に、IL2RA と chemokine ligand 17 (CCL17)等のアレルギー性炎症に関わる既知の遺伝子が含まれていた。

2) 新規マーカーのスクリーニング

P 値<0.01 での検定で得られた患者群特異的に α カゼイン刺激で変化する 9 遺伝子に着目し、定量的 PCR 法で刺激による各マーカーの mRNA の発現量変化を測定した。2 つの遺伝子の mRNA 発現量は患者群と対照群で有意差を認めなかった。他の 7 遺伝子に関し mRNA 発現量の測定をすすめ、そのうち α カゼイン刺激における IL2RA と CCL17 の測定結果の解析を GraphPad Prism version 7 for Windows を用いて行った。

同一検体の ALST 法の測定値 SI と mRNA 発現との相関を相関解析で検証した。その結果、IL2RA ($r=0.350$; $p=0.184$), CCL17 ($r=0.407$; $p=0.133$)であり、有意差は認めないものの、mRNA 発現量変化と ALST 法による SI 値で正の相関が示唆された。これらの結果より抗原特異的な早期の IL2RA および CCL17 mRNA の上昇は、抗原特異的リンパ球増殖応答を反映しうると考えられた。

次に、本検査法の疾病診断能力の判定として、患者と対照群の α カゼイン刺激による各マーカーの mRNA 発現量変化を Mann-Whitney 検定と ROC 曲線解析を用いて検証した。その結果、IL2RA および CCL17 の mRNA 発現量は対照群と比べ患者群で有意に上昇していた (IL2RA ; $p=0.0022$, CCL17 ; $p=0.0015$)。疾患判別に対する ROC 曲線解析で ROC 曲線下の面積 (AUC) は、IL2RA、CCL17 で各々 0.9792 ($p=0.0053$)、で 1 ($p=0.0041$)であり、ともに疾患判別に有用なマーカーと考えられた。以上、臨床診断との関連では疾患判別に有用なマーカーも見出せたことより、本検査法は消化管アレルギーの補助的診断において有用である可能性が示唆された。

本研究で開発する手法が確立されれば、抗原に対する反応のごく初期のマーカーを利用するため、ALST 法で必要であった約 5 日間の培養を 1 日以下に短縮するとともに、全血をスタート試料とすることで、PBMC 単離を行う必要がなく採血量を大幅に減らすことが可能となる。具体的には ALST 法では 1 抗原刺激で約 1ml の血液が必要であるが、本検査法では 1 抗原刺激約 200 μ l の血液で測定

が可能であった。また、本検査法は RT-PCR での測定のため、抗原刺激後測定まで検体を冷凍保存することが可能であり、有用と思われる。

消化管アレルギーにおいて疾患判別に有用なマーカーが選出され、本疾患の補助的診断において、本新規検査法は有用である可能性が示唆された。残された課題として、解析症例数が少ない点、更に患者群と対照群で年齢に差がある点が挙げられる。後者に関しては、本疾患は乳児期の発症が多く同年代の対照群から検体を採取するには倫理的な制約、同意が得られにくいという問題点があった。今後、症例数を増やすとともに、同定された他の遺伝子の解析や、診断精度の高まる複数マーカーの組み合わせの検討などさらに検討を重ねたい。

現在、*Allergology International* に 1 編投稿中で、さらにもう一編の海外誌への論文投稿予定である。

また、2019 年 11 月 2-3 日に開催される第 56 回日本小児アレルギー学会学術集会で発表予定である。

今後の研究活動について

今回の研究の結果、同定された抗原刺激により消化管アレルギー患児特異的に変化する遺伝子が、どの細胞から発現されているか確認する必要があると思われる。

また、候補マーカーを詳細に解析し、各マーカーと消化管アレルギーの重症度³⁾との関連や、フェノタイプ^{6),7)}との関連等も検討することで、病態解明に寄与すると考えている。

参考文献

- 1) Nomura I, Morita H, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies: distinct differences in clinical phenotype between Western countries and Japan. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012;12:297-303.
- 2) Shek LP, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* 2005;60:912-9.
- 3) Yagi H, Takizawa T, Sato K, Inoue T, Nishida Y, Ishige T, et al. Severity scales of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants. *Allergol Int* 2019;68:178-84.
- 4) Kimura M, Oh S, Narabayashi S, Taguchi T. Usefulness of lymphocyte stimulation test for the diagnosis of intestinal cow's milk allergy in infants. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157:58-64..

- 5) Abbas AK, Lichtman AH, Shiv Pillai著, 中尾篤人 鑑訳. アバースーリックマンピレ 分子細胞免疫学 原著第9版 2018;224-225.
- 6) Nowak-Wegrzyn A, Katz Y, Mehr SS, Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1114-24.
- 7) Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, et al. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:685-8,e1-8.

以上