

|                        |                                                                                                                                                                                 |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究課題名                  | 重症消化管アレルギーの病態解明                                                                                                                                                                 |
| フリガナ                   | モリタ ヒデアキ                                                                                                                                                                        |
| 代表者名                   | 森田 英明                                                                                                                                                                           |
| 所属機関<br>(機関名)<br>(役職名) | 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部<br>室長                                                                                                                                             |
| 本助成金による<br>発表論文, 学会発表  | Orimo K et al, Allergy Asthma Immunol Res. 2020 in press.<br>第 48 回日本免疫学会学術集会 シンポジウム, Morita H. Role of innate immunity in the development of allergic diseases. 浜松 2019 年 12 月 |

## 研究結果要約

近年、本邦において新生児・乳児消化管アレルギー（以下、消化管アレルギー）の症例報告が急激に増加している。消化管アレルギーは食物アレルギーの一種であるが、一般的な食物アレルギーとは病態が異なると考えられている。一般的な食物アレルギーとは異なり、消化管アレルギーは IgE 抗体を介さない機序（非 IgE 依存型アレルギー）が想定されている<sup>1)</sup>が、その病態の詳細はほとんど明らかになっていない。消化管アレルギーには、複数の亜型が存在することが知られているが、その中でも特に血便や嘔吐を認めない疾患群は、重篤な成長障害を認めることが多いこと、原因抗原の同定が困難な症例が多いことから、病態の解明及び新たな治療法の開発が期待されている。

そこで本研究では、消化管アレルギーの中でも、重篤な成長障害を認めることが多い、血便や嘔吐を伴わない乳児の消化管アレルギーに焦点を絞り、病態に関与する因子の同定を目的とし、胃および S 状結腸組織での遺伝子発現解析の比較検討を行なった。その結果、消化管アレルギーでは消化管局所で主に免疫細胞遊走に関与する遺伝子群が発現増強していること、これらは臓器毎に異な

るパターンを示す可能性が明らかとなった。

## 研究目的

近年、本邦において新生児・乳児消化管アレルギー（以下、消化管アレルギー）の症例報告が急激に増加している。消化管アレルギーは食物アレルギーの一種であるが、一般的な食物アレルギーとは病態が異なると考えられている。一般的な食物アレルギーは、原因抗原摂取後、1 時間以内に皮膚症状や呼吸器症状を認め、抗原特異的 IgE 抗体を介したマスト細胞・好塩基球の活性化により引き起こされていると考えられている。一方、消化管アレルギーは、原因抗原摂取後、数時間以降に主に消化器症状や体重増加不良を認め、IgE 依存型アレルギーと異なる症状の時間経過をとること、患者血清中から原因抗原特異的な IgE 抗体が検出されない症例が多いことから、IgE 抗体を介さない機序（非 IgE 依存型アレルギー）が想定されている<sup>1)</sup>が、その病態の詳細はほとんど明らかになっていない。消化管アレルギーには、複数の亜型が存在することが知られているが、その中でも特に血便や嘔吐を認めない疾患群は、重篤な成長障害を認めることが多い（約 75%）こと、原因抗原の同定が困難な症例が多いことから、病態の解明及び新たな治療法の開発が期待されている<sup>2)</sup>。

そこで本研究では、消化管アレルギーの中でも、重篤な成長障害を認めることが多い、血便や嘔吐を伴わない乳児の消化管アレルギーに焦点を絞り、消化管生検組織のマイクロアレイ解析、および末梢血中の免疫細胞プロファイルを通して、病態に関与する因子を同定し、新規治療法の開発につなげることを目的とする。

## 研究計画及び研究手法

消化管アレルギー患者とコントロール（病理初見に異常を認めなかった消化管アレルギー以外の疾患の患者）を対象とし、消化管内視鏡検査時に胃および S 状結腸から消化管組織を採取し、RNA stabilization Reagent（RNA later）中に保管した。組織が入った RNA later は、4°C で数日静置した後、-80°C 冷凍庫で保管した。

凍結保存した組織は、液体窒素および乳鉢を用いた方法でホモジナイズし、フェノール抽出をベ

ースとした方法で RNA 抽出を行った。

網羅的遺伝子発現解析は、Agilent 社の SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K を用いて行った。得られたデータはオミックスデータ解析ソフト (Subio Platform) を用いて解析した。

解析により得られたデータの一部を、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて、生物学的な解釈やパスウェイの解析を行った。

## 結果と考察

### 1) 解析した全組織を用いた解析

消化管アレルギー患者およびコントロール患者から採取した胃、S 状結腸両方の組織のデータを用いて、階層型クラスタリング解析を行った。階層型クラスタリングとは遺伝子発現プロファイルに基づき、類似するデータを複数のクラスターに分類し、近いクラスター同士を融合するプロセスを繰り返すことで樹形図を作成する方法である。

その結果、遺伝子群が大きな二つのクラスターに分類されることが明らかとなった。この二つのクラスターは、疾患の有無とは無関係で、むしろ解析対象とした臓器により規定されていることが判明した (図 1)。これらの結果は、同じ消化管でも臓器毎に遺伝子発現パターンは大きく異なることを示唆している。

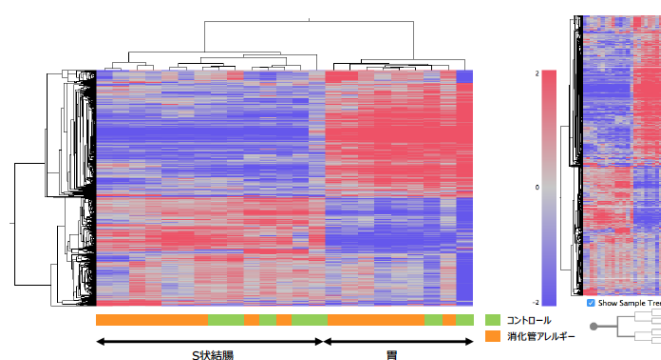


図 1 : 全組織を用いたクラスタリング解析結果

### 2) 胃組織における消化管アレルギーの遺伝子発現パターンの解析

次に、胃組織における遺伝子発現パターンを同定するために、消化管アレルギー患者およびコ

ントロール患者から採取した胃組織のデータを用いて、階層型クラスタリング解析を行った。その結果、遺伝子群が大きな二つのクラスターに分類されることが明らかとなった。更にこの二つのクラスターは、疾患の有無により規定されているが明らかとなった。コントロール患者と比較して、消化管アレルギー患者において有意に発現変動する遺伝子群 (Fold change >3, p-value<0.05) を抽出したところ、全部で 648 遺伝子存在することが明らかとなった (図 2)。また、これらの遺伝子群を用いた Gene オントロジー関連解析の結果、主に免疫細胞の遊走や、細胞増殖に関与する pathway が活性化していることが明らかとなった。

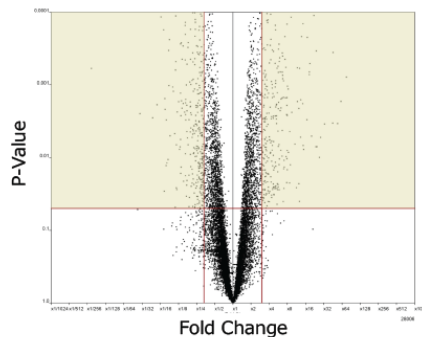


図2：胃組織における消化管アレルギーで発現変動する遺伝子群の解析 (volcano plot)

### 3) S 状結腸組織における消化管アレルギーの遺伝子発現パターンの解析

次に、S 状結腸組織における遺伝子発現パターンを同定するために、消化管アレルギー患者およびコントロール患者から採取した S 状結腸組織のデータを用いて、階層型クラスタリング解析を行った。その結果、遺伝子群が大きな二つのクラスターに分類されることが明らかとなった。更にこの二つのクラスターは、疾患の有無により規定されているが明らかとなった。一方で、胃組織での解析と比較して、個体間のばらつきが大きいことも明らかとなった (図 3)。コントロール患者と比較して、消化管アレルギー患者において有意に発現変動する遺伝子群 (Fold change >2, p-value<0.05) を抽出したところ、全部で 124 遺伝子存在することが明らかとなった。また、これらの遺伝子群を用いた Gene オントロジー関連解析の結果、主に免疫細胞の遊走に関与する pathway が活性化しているが明らかとなった。一方で、胃組織でのパターンとは異なることが明

らかとなった。

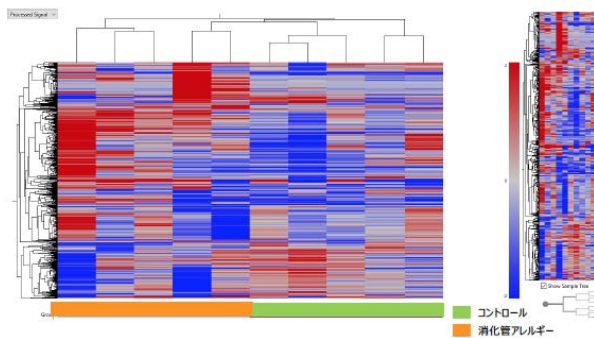


図3：S状結腸組織を用いたクラスタリング解析結果

#### 4) 臓器に共通する消化管アレルギーの遺伝子発現パターンの解析

次に 2 で明らかにした胃組織において消化管アレルギーで発現変動する遺伝子群と、3 で明らかにした S 状結腸組織において消化管アレルギーで発現変動する遺伝子群とを比較検討した。その結果、胃組織において特異的に発現変動する遺伝子群 625 個、S 状結腸組織において特異的に発現変動する遺伝子群 101 個、両方の組織に共通して発現変動する遺伝子群 23 が存在することを明らかとなった (図4)。

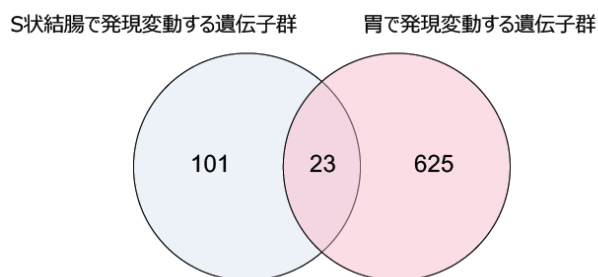


図4：S状結腸で発現変動する遺伝子群と胃で発現変動する遺伝子群の比較

消化管アレルギーの病態はこれまでほとんど明らかにされていない。今回の検討では消化管生検組織を用いて、局所での病態解析を行った。同じ消化管組織でも、臓器毎に遺伝子発現パターンが大きく異なることが明らかとなった。また、消化管アレルギーでは消化管局所で主に免疫細胞遊走

に關与する遺伝子群が発現増強していること、これらは臓器毎に異なるパターンを示す可能性が明らかとなった。

消化管アレルギーの病態これまでほとんど明らかになっていなかったが、本研究成果により病態の一端が明らかになりつつある。本研究成果は、消化管アレルギーの新たな治療法に結びつく可能性がある。研究成果は英文誌に投稿する予定である。

#### 今後の研究活動について

今年度の研究によって、消化管アレルギーの病態の一端が明らかになりつつある。一方で、ヒト検体での解析では詳細なメカニズム解析を行うことは難しく、ヒトでの病態を反映しうる適切な動物モデルの構築が必要である。今後は本研究により得られた患者炎症組織データに基づき、同疾患に類似する動物モデルの作製・確立を行い、さらなる病態解析および新規治療法の開発に繋げていくことが重要であると考える。

#### 6. 参考文献

- 1) Morita H, Nomura I, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Gastrointestinal food allergy in infants. 2013 Sep;62(3):297-307.
- 2) 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 Aug;12(4):297-303.

以上