

研究課題名	唾液の次世代プロテオーム解析による、非侵襲的な食物蛋白誘発胃腸炎の診断・症状誘発予測マーカーの開発		
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） （役職名）	千葉大学大学院医学研究院 総合医科学 特任准教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	山田 佳之 （ヤマダ ヨシユキ）	東海大学医学部総合診療学系 小児科学・教授	臨床検体収集
	川島 祐介 （カワシマユウスケ）	かずさDNA研究所ゲノム事業 推進部・ユニットリーダー	プロテオーム解析
本助成金による 発表論文、学会発表	1.Inoue Y, et al. In-depth proteomic profiles prior to symptom development in food protein-induced enterocolitis. In submission. 2.Inoue Y, et al. In-depth serum proteomic analysis of food protein-induced enterocolitis syndrome reveals dynamics of platelet and neutrophil activation responses and biomarker candidates. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology 2024. 2024/2/23-2024/2/26. Washington, USA. 3.Inoue Y, et al. In-depth serum and saliva proteomic analysis of food protein-induced enterocolitis syndrome reveals dynamics of neutrophil degradation response and extracellular trap formation. European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2024. 2024/5/31-2024/6/4. Valencia, Spain.		

研究結果要約

食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES)は、食物アレルギー摂取後に嘔吐などの消化器症状を来す非 IgE 依存性食物アレルギーの一つである。近年、乳幼児にいて卵黄による FPIES の報告が増加しているが、その原因は不明である。また、FPIES の症状発現に伴って自然免疫の活性化がおこることが知られているが、その機序は明らかではない。

そこで本研究では、血清・唾液の次世代プロテオーム解析により、FPIES の診断・症状誘発予測マーカーの同定や、病態解析をおこなうことを目的とした。

卵黄 FPIES と以前に診断された患者 17 名を対象とし、5g の加熱卵黄を用いた経口食物負荷試験(OFC)を実施した。OFC 実施前と摂取後 1 時間および 2 時間で、血清および唾液サンプルを採取しプロテオーム解析をおこなった。

血清および唾液からそれぞれ 4,138 および 7,202 のタンパクが検出された。OFC 陽性群では摂取 2 時間後に 609 タンパクの発現が増加し、プロテアソームや Neddylation 関連タンパクが含まれていた。また、症状発現時には好中球細胞外トラップ形成に関連するタンパクが認められた。好中球活性化関連タンパクは、症状とは無関係に血清および唾液の両方で増加した。

本研究で認められたタンパク発現の変化が、FPIES の病態にどのように関与するのかを明らかにするために、さらなる研究が必要である。

研究目的

食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES: Food protein - induced enterocolitis syndrome)は、食物アレルギー摂取後に嘔吐などの消化器症状を来す非 IgE 依存性食物アレルギーの一つである¹⁾。

FPIES の多くは、原因食物に対する特異的 IgE 抗体が陰性であるため、抗原特異的リンパ球刺激試験や便粘液好酸球検査などが、診断補助目的に施行されるが、その特異性は高くない。また、内視鏡検査・病理検査は侵襲的であり、専門施設以外で施行することは困難である。FPIES の診断や耐性獲得の確認には、食物経口負荷試験(OFC)が有用であるが、IgE 依存性食物アレルギーと異なり、症状誘発を予測可能なバイオマーカーがないため、時に誘発症状が重篤となることが問題である。非侵襲的に評価可能であり、診断や症状誘発予測に有用なバイオマーカーが確立されれば、より安全かつ簡便な診断・評価が可能となることが期待される。

近年、乳幼児における卵黄による FPIES(EY-FPIES)の報告が増加している²⁾。食物アレルギーの発症予防の観点から、授乳・離乳の支援ガイド(2019年改訂版)では、生後 5-6 か月から固ゆで卵黄の摂取が勧められている一方で、少数であっても加熱卵黄摂取で重篤な誘発症状を認める EY-FPIES 患者の増加は、乳児期における「安全な卵黄摂取の開始」に課題を投げかけている。

EY-FPIES が増加している原因は不明である。また、FPIES の症状発現に伴って自然免疫の活性化がおこることが知られているが^{3,5)}、その機序は明らかではない。しかし、卵黄 FPIES は、

牛乳 FPIES と比較して罹病期間が高いため、除去による QOL 低下がより問題となるため、EY-FPIES の病態を解明し、その予防や早期の寛解誘導へのアプローチを検討することは重要である。

そこで本研究では、血清・唾液の次世代プロテオーム解析により、FPIES の診断・症状誘発予測マーカーの同定や、病態解析をおこなうことを目的とした。

研究計画及び研究手法

<研究対象者>

千葉大学医学部附属病院および共同研究機関において、下記選択基準を満たし、除外基準に該当しない、診療上必要な卵黄 OFC を施行する予定の患者に対して、承認の得られた同意説明文書を保護者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、十分理解を得たうえで自由意志に基づく文書による同意を得た。

選択基準

以下の基準にすべて該当する患者

1. 同意取得時に 6 か月以上 6 歳未満の患者
2. 病歴あるいは過去の加熱卵黄を用いた OFC から卵黄 FPIES と診断され、卵黄の完全除去を継続している患者
3. 卵黄 FPIES 診断時の卵黄に対する特異的 IgE 抗体が、全て Class 2 以下である患者
4. 保護者から本研究参加に対するインフォームドコンセントを得た患者
5. 保護者が医師・看護師などとの意思疎通

が可能である患者

除外基準

以下の基準のいずれかに該当する患者

1. アトピー性皮膚炎・乳幼児喘息の合併を認める患者
2. 心疾患、肝疾患、腎疾患などの、アレルギー疾患以外の基礎疾患の既往歴があり、現在治療中の患者
3. 卵黄 FPIES 診断時に、卵黄に対する特異的 IgE 抗体のいずれかが Class 3 以上(3.5 UA/mL 以上)、または測定されていない患者
4. その他、医師が不適当と判断した患者

＜卵黄 OFC ・ 臨床検体採取＞

卵黄 OFC（5 g の加熱卵黄 単回摂取）前後において、下記の臨床検体を採取した。

唾液採取

以下の時点で、自然分泌唾液 1mL をシリンジに採取し、ろ紙に滴下後乾燥（あるいは滅菌チューブに保管）させ、-30℃で凍結保存する。

- 卵黄 OFC 開始 30 分前
- 卵黄摂取 1 時間後
- 卵黄摂取 2 時間後（すでに症状誘発を認める場合は省略）

血液採取

末梢静脈ルートを留置した場合には、以下の時点で、全血 0.5ml を採取（逆流採血）し、血清を -30℃で凍結保存する。

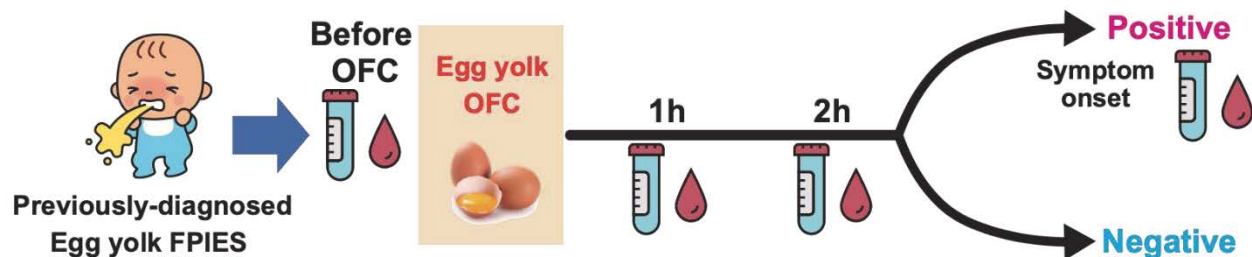
- 卵黄摂取 1 時間後
- 卵黄摂取 2 時間後
- 可能であれば、症状誘発時

末梢静脈ルートを留置せず卵黄 OFC を施行したが、症状誘発への対応のために末梢静脈ルートを確保する場合には、可能であれば、同時に全血 0.5m l を採取する（下図）。

＜プロテオーム解析＞

唾液および血清のプロテオームは、共同研究機関のかずさ DNA 研究所のデータ非依存性解析（DIA）ベースの質量分析計を用いて、高深度プロテオーム解析をおこなった。得られたタンパク定量値は、Perseus ソフトウェア (MaxQuant 社) を用いてデータ処理、統計解析を行い、発現変動タンパクの同定や機能解析を行った。

OFC 陽性患者と陰性患者で、背景因子に違いは認められなかった。両群とも、OFC 実施中に蕁麻疹や喘鳴などの IgE 依存性の症状は発現しなかった。血清と唾液の両方の採取に同意した 17 人の参加者のうち、9 人から血清を採取した。そのうち 4 名が OFC 陽性、5 名が OFC 陰性であった（次ページの表）。



	全参加者 (N=17)	OFC 結果		P 値
		陽性 (N=6)	陰性 (N=11)	
血清採取をおこなった参加者	9	4	5	
女兒 %	58.8	50.0	63.6	0.64
月齢, 中央値 (IQR)	15 (13 to 17)	15 (12 to 20)	15 (13 to 17)	0.84
身長 (cm), 中央値 (IQR)	76.0 (75.1 to 78.3)	76.6 (73.7 to 82.8)	76.0 (75.2 to 78.2)	0.84
体重 (kg), 中央値 (IQR)	9.3 (8.7 to 10.1)	9.5 (8.4 to 11.9)	9.3 (8.6 to 10.0)	0.61
末梢血好酸球数 (μ L), 中央値 (IQR)	290 (146 to 475)	321 (150 to 531)	262 (146 to 475)	0.73
血清総 IgE (IU/mL)	4.0 (0.0 to 14.0)	13.2 (0.0 to 36.2)	0.0 (0.0 to 8.9)	0.11
卵黄特異的 IgE (U_A /mL), 中央値 (IQR)	0.0 (0.0 to 0.33)	0.17 (0.0 to 0.34)	0.0 (0.0 to 0.35)	0.55
卵白特異的 IgE (U_A /mL), 中央値 (IQR)	0.0 (0.0 to 1.21)	0.97 (0.0 to 1.40)	0.0 (0.0 to 1.13)	0.16
最終卵黄摂取から OFC までの期間 (週数), 中央値 (IQR)	29 (25 to 37)	28 (21 to 42)	30 (25 to 36)	0.91
OFC 時の症状発現までの時間 (分), 中央値 (IQR)		206.5 (165 to 240)		
OFC 時の IgE 依存性反応, %	0	0	0	n.s

結果と考察

＜血清の解析＞

血清のプロテオミクス解析で同定された 4,883 種類のタンパクの中から、少なくとも 2 つのペプチドが検出された 4,138 種類のタンパクを分析した。その後の比較では、少なくとも 1 つのグループに各タンパクの有効値が最低 70%含まれるように約 2,000 個のタンパクを選択した。

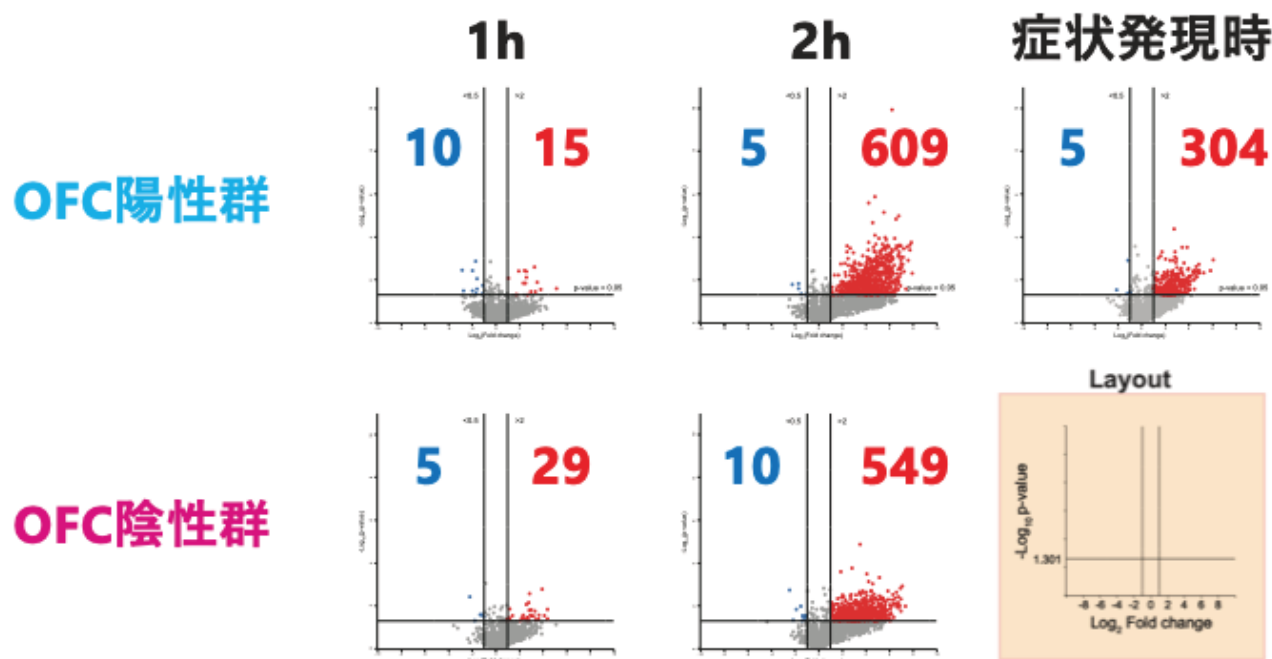
OFC 陽性群と陰性群の間で、OFC 実施前の血清プロテオームに違いを認めなかった。

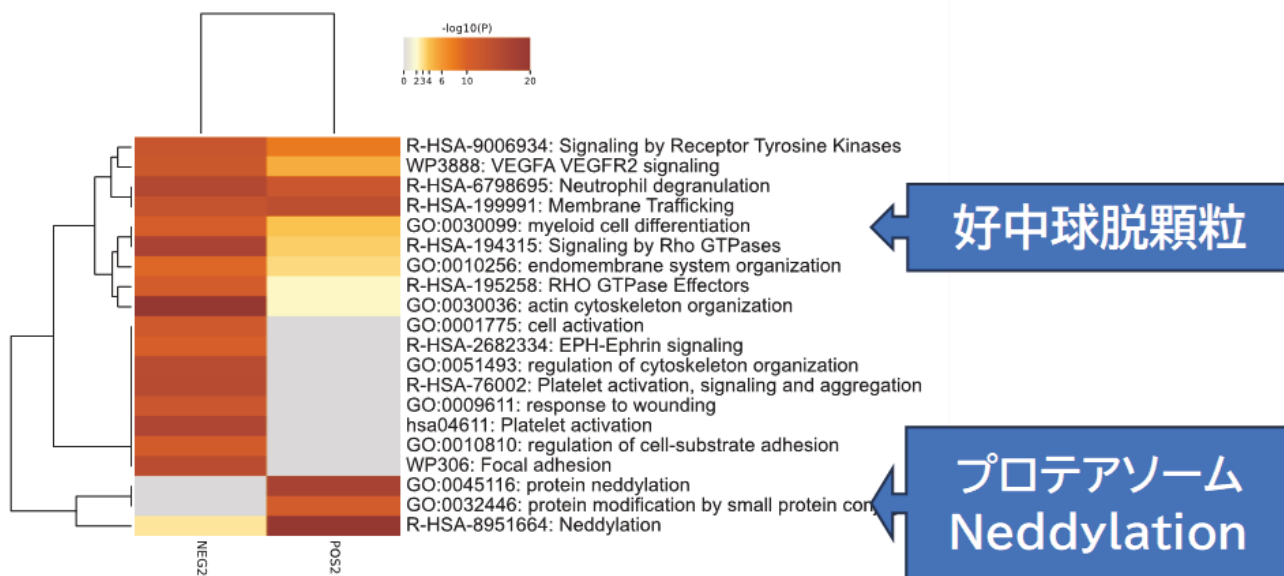
OFC 実施前と比較して、OFC 1 時間後、2 時間後、症状誘発時において、有意に発現が変化したタンパクを示す（下図）。

OFC1 時間後では、OFC 陽性群では 25 タンパク(15 タンパクが増加、10 タンパクが減少)、OFC 陰性群では 34 タンパク(29 タンパクが増加、5 タンパクが減少)が発現変動していた。

一方、OFC 2 時間後では、OFC 陽性群では 614 タンパク(609 タンパクが増加、5 タンパクが減少)、OFC 陰性群では 559 タンパク(549 タンパクが増加、10 タンパクが減少)が発現変動していた。

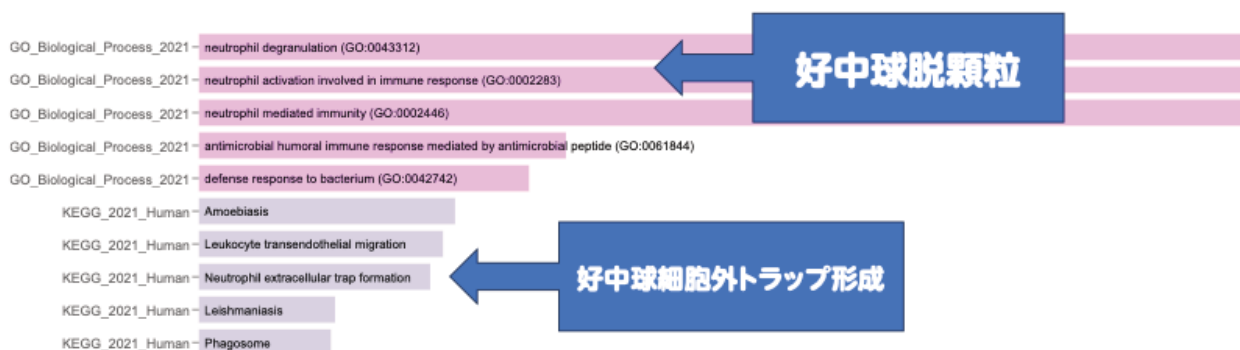
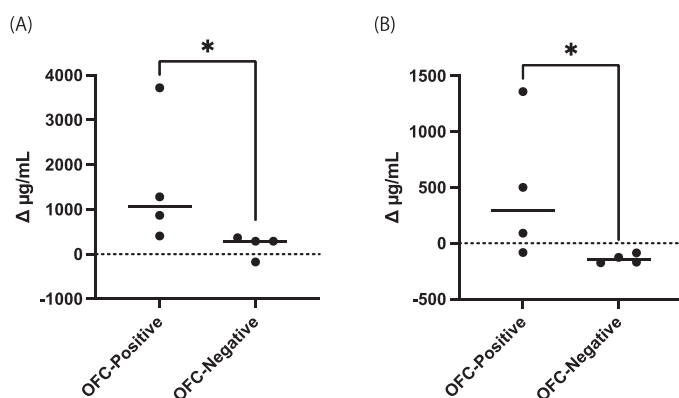
OFC 2 時間後の、OFC 陽性群と陰性群の変動タンパクのオントロジー解析では、OFC 陽性群においてプロテアソーム関連タンパク（GO:0032446）と Neddylation (R-HSA-8951664) が認められた。一方、好中球活性化に関連するタンパクは、両群において認められた（次ページ上図）。





OFC 陽性群におけるプロテアソーム関連タンパクと Neddylation 関連タンパクの高発現を確認するために、ELISA でプロテアソーム 20S (右図 A) と NEDD8 (右図 B) を測定したところ、陽性群において統計学的に有意な増加を認めた。

また、陽性群における症状発現時には、好中球細胞外トラップ形成関連タンパク、好中球脱顆粒関連タンパクの発現増加を認めた（下図）。



<唾液中の解析>

唾液のプロテオミクス解析では、8,108 タンパクが同定され、少なくとも 2 つのペプチドが検出された 7、202 種類のタンパクを分析した。その後の比較では、少なくとも 1 つのグループに各タンパクの有効値が最低 70%含まれるように約 6,000 個のタンパクを選択した。

OFC 2 時間後の唾液のプロテオーム解析では、OFC 陽性群と陰性群の変動タンパクのオントロジー解析において、OFC 陽性群において好中球脱顆粒に関連するタンパクの増加が認められた(下図)。

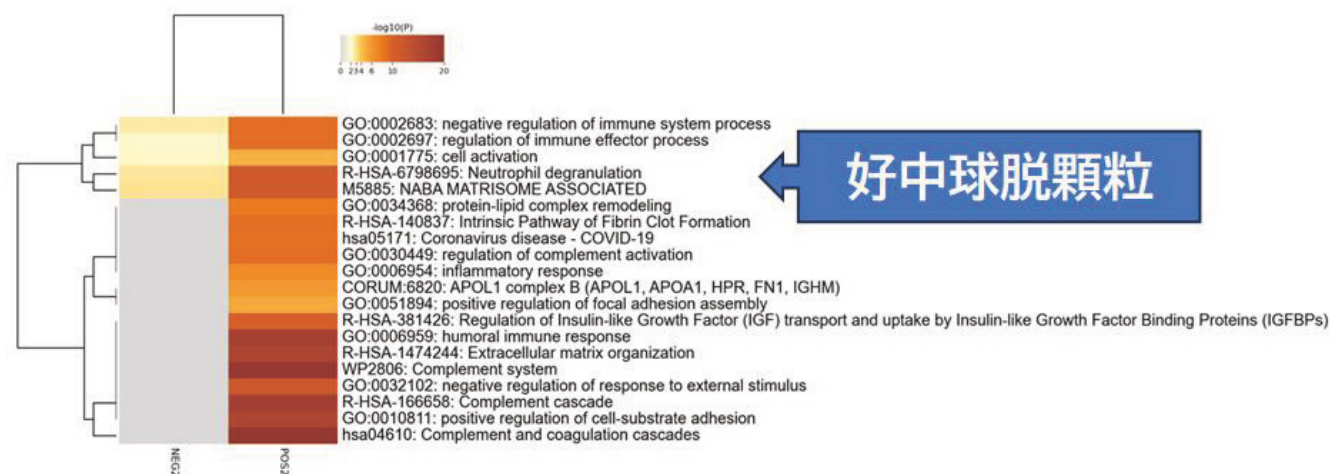
<考察>

FPIES 患者においては、症状発症の前に、血清のプロテアソームおよび Neddylaton 関連蛋白の一過性の増加が観察され、様々な自然免疫細胞の活性化の誘因になっている可能性が考えられた。

ユビキチン-プロテアソーム系は、不要なタンパクや欠陥のあるタンパクにポリユビキチンを付加し、プロテアソームを介してペプチドに分解

するもので、選択的非リソソームタンパク分解を担っている⁶⁾。生物学的機能を持つプロテアソーム複合体は、ヒト血漿/血清(循環プロテアソームとして知られる)で検出されており、悪性腫瘍、自己免疫疾患、敗血症、その他の疾患を含む様々な疾患で高発現していることが知られている。本研究は、アレルギー疾患におけるプロテアソームの高発現を示した初めての報告である。

一方、NEDD8 はユビキチン様タンパクであり、標的タンパクに共有結合すると、翻訳後修飾である Neddylaton が起こる⁷⁾。NEDD8 および Neddylaton 関連タンパクは、心臓疾患、代謝疾患、慢性肝疾患、神経変性疾患、免疫疾患など、さまざまな疾患でしばしば発現が上昇することが報告されている。プロテアソームと同様に、アレルギー疾患における Neddylaton 関連タンパクの過剰発現に関する報告はないが、これらのタンパクは、さまざまな感染症における自然免疫応答時の炎症性サイトカインおよびインターフェロンの産生を調節する役割を果たしている。Neddylaton 関連タンパクは、FPIES における食物誘発性の自然免疫反応にも関与している可



能性がある。

また、症状の発現にかかわらず、血清および唾液中に好中球の活性化に関連するタンパクの高発現が認められたことから、好中球活性化は必ずしも FPIES の症状発現の開始には必要ない可能性がある。しかしながら、FPIES の症状が出現したときには、好中球脱顆粒のみならず好中球細胞外トラップ形成⁸⁾に関連する蛋白の高発現を認めることから、FPIES の症状発現には好中球活性化の遷延や増強が関与している可能性がある。

今後の研究活動について

本研究により、プロテアソームおよび Neddylation 関連タンパクの発現増加が、FPIES の病態に関与していることが示唆された。これらのタンパクが、FPIES の診断・症状誘発予測マーカーとなるかについては、さらに解析症例を増やして検討する必要がある。また、これらのタンパクは FPIES の治療標的となる可能性があり、より詳細な病態への関与の機序について、検討を行う必要がある。

また、FPIES において好中球は、症状発現の有無によらず活性化されるが、症状発現時にはさらに強く活性化されており、病態への関与が強く示唆される。血清や唾液での解析ではその機序は不十分であるため、FPIES 患者から好中球を単離して、より詳細なタンパク発現の変化を解析する必要がある。

参考文献

1) Nowak-Wegrzyn A, Chehade M, Groetch ME,

et al. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: Executive summary-Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4):1111–1126.

2) Akashi M, Hayashi D, Kajita N, Kinoshita M, Ishii T, Tsumura Y, Horimukai K, Yoshida K, Takahashi T, Morita H. Recent dramatic increase in patients with food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES) provoked by hen's egg in Japan. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10(4):1110–1112.

3) Berin MC, Lozano-Ojalvo D, Agashe C, Baker MG, Bird JA, Nowak-Wegrzyn A. Acute FPIES reactions are associated with an IL-17 inflammatory signature. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(3):895–901.

4) Goswami R, Blazquez AB, Kosoy R, Rahman A, Nowak-Wegrzyn A, Berin MC. Systemic innate immune activation in food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1885–1896.

5) Mehr S, Lee E, Hsu P, Anderson D, de Jong E, Bosco A, Campbell DE. Innate immune activation occurs in acute food protein-induced enterocolitis syndrome reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(2):600–602.

6) Choi WH, Kim S, Park S, Lee MJ. Concept and application of circulating proteasomes. *Exp Mol Med*. 2021;53(10):1539–1546.

- 7) Zhang S, Yu Q, Li Z, Zhao Y, Sun Y. Protein neddylation and its role in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):85.
- 8) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532–1535.