

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19580

研究課題名(和文) 食物タンパク質誘発性胃腸炎における診断基準の作成および重要細胞群の同定

研究課題名(英文) Searching for a diagnostic marker and identification of important cell groups in non-IgE mediated gastrointestinal diseases

研究代表者

折原 芳波(Orihara, Kanami)

早稲田大学・理工学術院・講師(任期付)

研究者番号：60450623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 全年齢層において世界中で患者数が増えつづけている好酸球性消化管疾患の中でも、特に新生児-乳児における病態は他疾患との判別が難しく、ときに生命に関わる重大な合併症を引き起こすことがある。

そこで本研究では、研究レベルで行われている抗原特異的リンパ球刺激試験が本疾患の診断に臨床応用できるか検討し、診断に有用であることが確認できた一方、IgE依存性の(通常の)食物アレルギーとの鑑別には弱さが残る結果となった。また、抗原特異的リンパ球試験の応用編としてサイトカインや増殖細胞群の検討もを行い、IgE依存性の食物アレルギーと本疾患との差を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)： Non-IgE-mediated eosinophilic gastrointestinal diseases are the diseases that the number of patients continues to increase all over the world, pathology of which in particular in neonates to infants is difficult to distinguish from other diseases. Thus, sometimes it causes life-threatening serious complications.

Therefore, in this study, we aimed to test the practical utility of the antigen-specific lymphocyte stimulation test, which is conducted at the research level at the moment, if it can be clinically applied to the diagnosis of these diseases. As a result, it was confirmed that it can be used for diagnosis, whereas weakness remains in distinguishing these diseases from IgE-mediated (normal) food allergy. I also examined cytokines and proliferating cell sub-populations as applied analysis versions of antigen specific lymphocyte tests, and I was able to find differences between IgE-mediated food allergy and non-IgE-mediated eosinophilic gastrointestinal diseases.

研究分野：免疫学、アレルギー学、分子生物学、時間生物学

キーワード：好酸球性消化管疾患 非IgE依存性食物タンパク質誘発性胃腸炎 リンパ球刺激試験

1. 研究開始当初の背景

好酸球性消化管疾患患者数は全年齢層において年々増えており、特に新生児～乳児における食物タンパク質誘発性胃腸炎はときに生命に関わる重大な合併症を引き起こすことが知られている。しかしながら、明確な診断基準が存在しないことが仇となっている。

2. 研究の目的

抗原特異的リンパ球刺激試験を本疾患の診断に臨床応用することを目的として、診断基準の作成のための判定を行うこと。

また、各病態における抗原反応性を示すリンパ球群の差異が病態の差異を引き起こしている可能性について検証した。

3. 研究の方法

対象患者群のほか、IgE 依存性牛乳アレルギー群、および健常群として臍帯血を用いて PBMC (CBMC) を分離し、抗原特異的リンパ球刺激試験を行い、診断基準への応用の可能性について検証した。

また、細胞増殖検出用とは別に抗原特異的リンパ球刺激試験を行い、細胞培養上清および増殖細胞分画について解析を行った。

4. 研究成果

特に患者数の多い、牛乳を原因食物とする患者群の抗原特異的細胞増殖試験について検証した。嘔吐、血便の有無によって4つの病型に分けられる本疾患について、6種の牛乳抗原に対するそれぞれの細胞増殖指標を算出し、そのうち最も高い反応性を示した抗原の指標を各ドナーから抽出し、比較検討を行った。その結果、食物タンパク質誘発性胃腸炎患者群において健常群と比較して有意に高い値が検出された ($p = 0.029$)。続いて Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を行ったところ、AUC が 0.821 ± 0.090 となり、high accuracy の判定を得た。しかしながら、IgE 依存性牛乳アレルギー群との比較においては、有意差は検出できず、 $AUC = 0.715 \pm 0.088$ となり、fair accuracy となってしまった (図

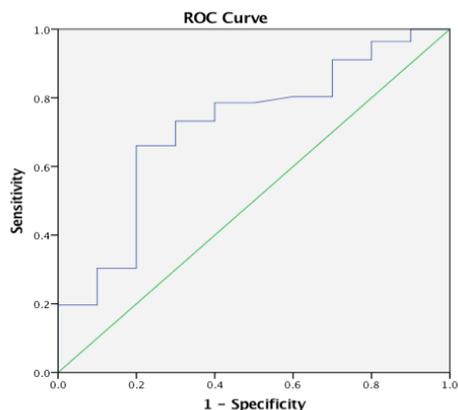


図 1. ROC 曲線解析結果 (牛乳を原因食物とする食物タンパク質誘発性胃腸炎患者群 vs IgE 依存性牛乳アレルギー患者群)

1) が、有用である可能性は示唆された。本計算には2種の統計ソフトを用いたが、ほぼ同一の値を算出したことから、現時点のデータとしては信用できる値であると思われる。また、鑑別に必要なカットオフ値も算出したが、各病態による差はほとんどなく、抗原特異的リンパ球刺激試験が健常群との判定には十分に使用できる指標であることが明らかになったが、IgE 依存性食物アレルギーとの鑑別が課題として残った。

細胞増殖検出用とは別に抗原特異的リンパ球刺激試験を行い、*in vitro* 培養系において細胞培養上清中に産生されるサイトカイン量について検討を行った。その結果、細胞増殖や細胞増殖については血便観察群と非血便観察群において有意差が検出できるものの、必須の IL-2 の産生量に有意差は観察できなかった。また、抗炎症性サイトカイン (TNF、IL-1 β 、IL-6) および IFN- γ 、IL-17A については牛乳抗原刺激により各産生量は有意に上昇するものの、両群間での差は認められなかった。一方、2型サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 については両群間で有意な差を認め、特に IL-5 にいたっては中央値にして10倍以上の上昇を観察した。制御性サイトカインの一つとして考えられる IL-10 は2型サイトカインと同様、両群間で有意な差を認めた。これらの結果より、消化管アレルギーの亜型である血便の有無は両群ともに抗原特異的免疫応答においていくつかの特性を共有するが、明確に異なる抗原特異的細胞増殖やサイトカイン産生など、重要な特徴を有しており、この両群が独立した2つの病型であり、血便を呈する群が血便を呈さない群の重篤な形態ではないことが示唆された。また、細胞増殖と上清中 IL-2 産生量に相関が見られなかったことに関しては、本実験が *in vitro* の閉鎖系であること、培養期間を1週間としていることにより、初期に顕著な細胞増殖が誘導された抗原刺激については細胞が死滅してしまっている可能性が考えられた。

細胞分画の検討については、メーカーによる抗体ロットの蛍光トラブル、機器の故障などのトラブルに見舞われたが、結果報告ができるまでに解析を進めてきた。

総じて言えることとしては、リンパ球増殖試験の結果として増殖が多く計測された抗原刺激が必ずしも特異的な細胞集団の増殖を促す抗原刺激と一致しない、ということである。これは、炎症性サイトカインの検討時にも観察されたことと類似して、制御性 T 細胞の関与が考えられる。炎症性 T 細胞の増殖が進む一方、制御性 T 細胞の増殖を促す刺激が同時、あるいは追従して入っているものと考えられる。

牛乳を抗原とする食物タンパク質誘発性胃腸炎患者群では、CD4⁺CCR4⁺および CD4⁺CCR6⁺、CD4⁺V α 24J α 18⁺分画の増殖が多く見られた。ま

た、CD4⁺分画においてもVα24Jα18⁺分画の増殖が観察された。機器不調により全マーカーを同時に測定することができたサンプルが少なかつた決定的なことは結論付けることはできないが、このことから、Th17を含むIL-17産生細胞やiNKT細胞の関与が可能性として考えられる。一方で、IgE依存性の食物アレルギー患者群においてはCD4⁺分画の増殖はあまり観察されず、CD4⁺分画、特にCCR4⁺とCXCR3⁺分画の増殖を認めた。このことから、メモリーT細胞の関与が食物アレルギーのほうが強いことが伺えた。そのメモリーT細胞の食物アレルギーへのより強い関与をサポートするデータとして、本抗原特異的増殖試験において、PBMCに抗原を加えずにIL-2のみを添加した群を観察すると、食物アレルギー患者群においてより多くの増殖が観察された。このことは、食物タンパク質誘発性胃腸炎の抗原特異的な反応が抗原特異的であるものの、メモリーT細胞に依らない機序により引き起こされている可能性を示唆し、自然免疫反応にて活躍するNK細胞、NKT細胞、ILC細胞群やPRRsの関与が考えられる。

本実験は*in vitro*の閉鎖系で行われているため、前述の上清中サイトカインの検討と合わせて解析をする必要があり、さらに生体内の反応指標として患者血清・血漿中のサイトカイン等の指標を参考にすることがある。

別途計測したデータによると、血漿中のサイトカインレベルに関しては、食物タンパク質誘発性胃腸炎患者群とIgE依存性食物アレルギー患者群との間に1型、2型、IL-17Aの産生レベルに有意な差は検出されなかった。一方、ケモカインレベルの解析において、CCL24/Eotaxin-2、CCL8/MCP-2が食物タンパク質誘発性胃腸炎患者群で有意に高く、逆にCCL4/MIP-1βは食物タンパク質誘発性胃腸炎患者群で有意に低いという結果を得ている。この結果からも食物アレルギーにはメモリーT細胞がIgE依存性深く関与している可能性が示唆される。

当初の予備検討においては嘔吐も血便も呈する群においてNKT細胞が、また、嘔吐あり・血便なしの群においてILC2細胞が顕著に増殖している可能性を指摘していたが、実際の病態は非常に複雑であることが判明した。ただ、病態別のNKT、ILC2細胞群存在比についても今後有意差を得られる可能性も残されており、今後も検討、解析を続けていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Morita H, Suzuki H, Orihara K, Motomura K, Matsuda A, Ohya Y, Saito H, Nomura I, Matsumoto K. Food

protein-induced enterocolitis syndromes with and without bloody stool have distinct clinicopathologic features. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Dec;140(6):1718-1721. e6. doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.002.

査読あり

2. Sato M, Shoda T, Shimizu H, Orihara K, Futamura K, Matsuda A, Yamada Y, Irie R, Yoshioka T, Shimizu T, Ohya Y, Nomura I, Matsumoto K, Arai K. Gene Expression Patterns in Distinct Endoscopic Findings for Eosinophilic Gastritis in Children. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017 Nov - Dec;5(6):1639-1649. e2. doi:10.1016/j.jaip.2017.03.030. 査読あり

3. Shoda T, Matsuda A, Nomura I, Okada N, Orihara K, Mikami H, Ishimura N, Ishihara S, Matsumoto K, Kinoshita Y. Eosinophilic esophagitis versus proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: Transcriptome analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Jun;139(6):2010-2013. e4. doi: 10.1016/j.jaci.2016.11.028. 査読あり

4. Shoda T, Matsuda A, Arai K, Shimizu H, Morita H, Orihara K, Okada N, Narita M, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K, Nomura I. Sera of patients with infantile eosinophilic gastroenteritis showed a specific increase in both thymic stromal lymphopoietin and IL-33 levels. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jul;138(1):299-303. doi: 10.1016/j.jaci.2015.11.042. 査読あり

5. Orihara K, Saito H. Controlling the peripheral clock might be a new treatment strategy in allergy and immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Apr;137(4):1236-1237. doi: 10.1016/j.jaci.2015.08.054. 査読あり

6. Shoda T, Futamura K, Orihara K, Emi-Sugie M, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Recent advances in understanding the roles of vascular endothelial cells in allergic inflammation. *Allergol Int.* 2016 Jan;65(1):21-9. doi: 10.1016/j.alit.2015.08.001. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1. Orihara K, Nomura I, Shoda T, Suzuki H, Morita H, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Stool EDN levels in different clusters of non-IgE-mediated gastrointestinal food

- allergy. The 73rd Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (国際学会) 2017年03月03日～06日 Atlanta, GA, USA
2. Nomura I, Suzuki H, Motomura K, Shoda T, Morita H, Orihara K, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Perinatal characteristics of infants with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. The 73rd Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (国際学会) 2017年03月03日～06日 Atlanta, GA, USA
 3. 野村伊知郎、正田哲雄、松田明生、鈴木啓子、折原芳波、岡田直子、森田英明、成田雅美、大矢幸弘、斎藤博久、松本健治 新生児-乳児消化管アレルギー、クラスター3における血清中 TSLP、IL33 の上昇 第65回日本アレルギー学会 2016年06月17日～19日 東京
 4. Orihara K, Nomura I, Shoda T, Morita H, Suzuki H, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Distinct plasma chemokine levels in non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy, compared with IgE-mediated food allergy. The 31st Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (国際学会) 2016年04月03日～08日 Charleston, SC, USA
 5. Orihara K, Nomura I, Shoda T, Morita H, Suzuki H, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Plasma cytokine/chemokine profiles in non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. 72nd Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. 2016年03月04日～07日 Los Angeles, CA, USA
 6. 折原芳波、野村伊知郎、正田哲雄、鈴木啓子、森田英明、松田明生、斎藤博久、松本健治 非 IgE 依存性消化管アレルギー患児における CRP 上昇には抗原特異的な IL-6 産生が関与する 第52回日本小児アレルギー学会 2015年11月21日～22日 奈良
 7. 折原芳波、野村伊知郎、正田哲雄、森田英明、松田明生、斎藤博久、松本健治 IgE 非依存性消化管アレルギーの病型ごとに抗原刺激リンパ球培養上清のサイトカインプロファイルは異なる 第64回日本アレルギー学会学術大会 2015年05月26日～28日 東京

[図書] (計 1 件)

1. 折原芳波、松本健治 「食物を原因とする IgE 依存性および非 IgE 依存性アレルギーにおける液性因子 (特集 わが国における最新のアレルギー臨床研究)/ Humoral immune factors in IgE- and

non-IgE-mediated food allergies」 科学評論社「臨床免疫・アレルギー科」66(6), 609-613, 2016-12

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

折原芳波 (ORIHARA, Kanami)
 早稲田大学・理工学術院・講師 (任期付)
 研究者番号：60450623

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()