

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17310

研究課題名（和文）アレルギー疾患発症に対する新生児期のヒストン脱アセチル化酵素阻害能の影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the influence of histone deacetylase inhibitory ability during the neonatal period on the development of allergic diseases

研究代表者

山崎 晋（Yamazaki, Susumu）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80771774

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は食物アレルギー（FA）児での、血中のHDAC阻害能と酪酸値を測定し、FA児では血清酪酸値やHDAC11活性阻害能が低いこと免疫寛容が弱くアレルギー反応起こりやすいという仮説の立証を目的とした。食物アレルギー小児と健常成人の血清中のアセト酢酸、 β -OHB、総ケトン体と血清中のHDAC阻害能（HDAC1～11）を解析したが、新生児期（臍帯血）で認められたような有意差は認めず、2群間のHDAC阻害能と血清 β -OHBに差は認めなかった。一方で、試薬酪酸濃度よりも低い酪酸濃度の検体血清でHDAC阻害能がより高い事象も確認され、HDAC阻害能の規定は酪酸以外の要因も大きい事が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギーの発症予防や発症原因の究明は未だ途上である。本研究は先行研究において臍帯血の酪酸値とHDAC11阻害能が成人検体に比べ高値でありそれによる免疫寛容が盛んであるという仮説から着想を得た研究である。本研究は酪酸はHDAC11阻害能を確実に持ち、FOXP3の発現を更新させる可能性は示せたが、一方で食物アレルギー児で酪酸濃度が低い訳ではなく、また血清酪酸濃度のみでHDAC阻害能全てを賅うと説明するには不十分であることが判明した。酪酸の摂取によるFOXP3の発現亢進、さらにはアレルギー発症予防という単純な結果は得られなかったが、アレルギー発症予防の研究の一旦は担ったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study measured HDAC inhibitory ability and butyrate levels in the blood of children with food allergies (FA), and confirmed the hypothesis that FA children have low serum butyrate levels and low ability to inhibit HDAC11 activity, resulting in weak immune tolerance and are more prone to allergic reactions. I tried to prove it. We analyzed serum acetoacetate, β -OHB, total ketone bodies, and serum HDAC inhibitory ability (HDAC1-11) in children with food allergies and healthy adults but found no significant differences as observed in the neonatal period (cord blood). No difference was observed in HDAC inhibitory ability and serum β -OHB between the two groups. On the other hand, it was also confirmed that sample serum with a butyrate concentration lower than the reagent butyrate concentration had higher HDAC inhibitory ability, confirming that factors other than butyrate also play a major role in determining HDAC inhibitory ability.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

本邦のアレルギー疾患罹患率は年々増加傾向にあり、その発症予防や新規治療法の開発が望まれている。アレルギーの病態は解明されつつあり、アレルギー症状の発症後にアレルゲンを同定し症状を軽減する薬は開発されているが、未だ、アレルギー症状の発症前の発症リスクを予測し、発症自体を予防することは困難である。

申請者は、新生児期エピジェネティクスと免疫寛容に注目し、科研費若手研究(B)「出生後FOXP3のエピジェネティクス変化と免疫寛容に関する解析」(平成28~30年度)において、成人と比較し新生児では血液中のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)11の活性が著しく阻害されていることを発見した。ヒストンのアセチル化は、遺伝子の転写活性化に関わるエピジェネティックメカニズムの一つである。HDACは、ヒストンの脱アセチル化によりクロマチン凝縮を促進し、転写抑制因子として作用する。反対に、HDAC阻害剤はヒストンのアセチル化を促進し遺伝子発現を誘導すると考えられている。ヒトでは、HDACは4つのクラスに分類される:I(HDAC-1、-2、-3、-8)II(HDAC-4、-5、-6、-7、-9、-10)III(Sirt-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7)IV(HDAC-11)(Bassett SA. et al. Nutrients. 2014)。HDAC11はHDACの中でも最も近年に発見された酵素で、その機能には不明な点も多いが、HDAC11は遺伝子発現の調節の結果、免疫細胞に対して様々な作用を持ち(Yanginlar C. et al. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2018)、抗炎症サイトカインであるIL-10の発現を減少させ炎症を誘導する作用を持つことが知られている(Villagra A. et al. Nat Immunol. 2009)。また、HDAC11はFOXP3に結合し、その脱アセチル化を促進させ、制御性T細胞の発現を抑制することが報告されている(Hang J. et al. Scientific reports. 2017)。これらから申請者は、新生児期に生じる生理的低血糖に対応するための高酪酸血症がHDAC11作用を阻害することで制御性T細胞の発現や抗炎症作用を亢進させアレルギーの発症を防いでいるのではと推察した(科研費若手研究B:16K19667)。そこで、申請者は、この推察を基に、HDAC11阻害能や酪酸値の差がアレルギー発症の原因に関与しているのではないかと仮説を立案した。

2. 研究の目的

目標 : 「アレルギー疾患患児と健常児とのHDAC阻害能に差があるのかを明らかにする」

目標 : 酪酸とHDAC阻害能の関係を確認するために、酪酸と各HDAC阻害能(HDAC1~11)の*in vitro*実験を行い、酪酸が特にHDAC11阻害能を有することを確認する。

目標 : HDAC11阻害能物質を同定し、抗アレルギー薬としての活用を見出す。

上記3つの成果から、HDAC11阻害能というエピジェネティクス要因から、アレルギー疾患の発症機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

方法 : 「アレルギー疾患患児と健常児とのHDAC阻害能に差があるのかを明らかにする」ために、食物アレルギー児と健常成人血清を対象とし、血清中のHDAC阻害能(HDAC1~11)について解析した。HDAC阻害能解析は、BPS Bioscience社に外注委託した。

方法 : 血中の酪酸の因果関係を確認するため、食物アレルギー児と健常成人の血清中のアセト酢酸、 β -OHBを測定した。

方法 : 酪酸が持つHDAC11阻害能の関係を確認するために、 β -OHBを試薬として1mM, 10mM, 100mMの濃度下でHDAC阻害能(HDAC1~11)を測定した。HDAC阻害能の解析は、BPS Bioscience社に外注委託した。

4. 研究成果

仮説の実証のため、食物アレルギーと診断された小児と健常成人例の血清中のアセト酢酸、 β -hydroxybutyrate (β -OHB)、総ケトン体と血清中のHDAC阻害能(HDAC1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11)について解析した。

HDAC阻害能解析にかかる費用の関係上、検体は3症例ずつと少数となった。結果、新生児期(臍帯血)で認めたとような有意差は認めず、健常成人と食物アレルギー児の間のHDAC阻害能と血清 β -OHBに差は認めなかった(図1)。

別に、酪酸によるHDAC阻害能の確認のため、 β -OHBを試薬として1mM, 10mM, 100mMの濃度下でHDAC阻害能(HDAC1~11)を測定した。100mM濃度下では全HDAC阻害能が100%となり、10mM濃度下ではHDAC6を除く他のHDAC阻害能は20%前後、1mM濃度では各HDAC阻害能は1~4%という結果であり、酪酸濃度が高いほどHDAC阻害能は高まり、酪酸はHDACすべての阻害物質である

ことは確認された(表1)。この結果は酪酸が濃度依存的にHDAC阻害能を持つという既報(Shimazu T et al. Science. 2013)に矛盾しなかった。また酪酸は、哺乳類のクラスIおよびIIa HDACを阻害することでエピジェネティックな遺伝子発現を調節することが知られているが(Newman JC. et al. Trends Endocrinol Metab. 2014)、本研究ではクラスIV(HDAC11)にも同等の作用を持つことを証明した。さらに、被検者、健康成人検体の平均 β -OHB濃度は0.0652mMであるにもかかわらず、各HDAC阻害能は β -OHB試薬1mMの阻害能よりも高かった(例、HDAC11阻害能平均値は21%)ということを示したことは新規の発見と考えられた。この結果より、ヒト血清が持つHDAC阻害能は酪酸値のみならず血清中の他蛋白質などの影響も大きいことが推察された。

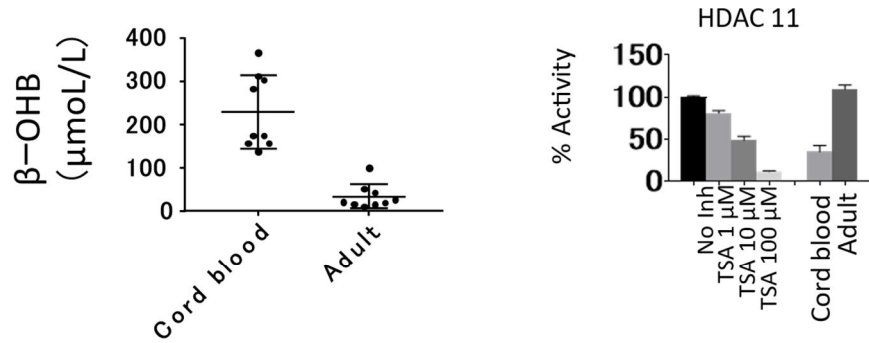
臍帯血中のCD4陽性T細胞内のCD25+FOXP3+細胞の割合は、成人よりも大幅に低く、出生後すぐに正常な成人レベルに達することが報告されている(Fuchizawa T. et al. Clin Immunol. 2007)。しかし、新生児がFOXP3+細胞の発現を誘導する理由は不明である。新生児は飢餓と低血糖状態で出生し、低血糖時にはケトン体が肝臓で生成され、低血糖の期間の脳への栄養として高酪酸血症となっているが(Newman JC. et al. Trends Endocrinol Metab. 2014)、わざわざ低血糖で出生する必要は無く、申請者は新生児期のこの生理的な高酪酸血症が免疫寛容に必要なものであると推察した(科研費若手研究B:16K19667)。酪酸は、FOXP3プロモーター領域でヒストンのアセチル化を促進し、それによって粘膜制御性T細胞を誘導するため(Furusawa Y. et al. Nature. 2013)、酪酸は免疫寛容に重要な役割を果たす可能性がある。この先行研究結果の下、健康者と食物アレルギー児の酪酸の値の差がでることを期待したが、本研究では有意な差は得られなかった。

酪酸と免疫能の関係については今後も非常に興味深い分野であると考え、酪酸がヒトの血液中のFOXP3発現に影響を与えるかどうかは証明されていない。我々の知る限り、食物アレルギー児の血清のHDAC阻害能力を検討した報告はない。特に、HDAC11は、多様な免疫機能の調節因子として知られている。たとえば、HDAC11は、マウスおよびヒト抗原提示細胞のIL-10の産生を抑制する(Villagra A, et al. Nat Immunol. 2009)。さらに、HDAC11はTbetおよびEomesの発現を制御することによってT細胞の炎症性応答を制御し、炎症性T細胞応答の負の調節因子としても機能する(Woods DM, et al. Blood. 2017.)。さらに、上述のとおり制御性T細胞の発現に関わる(Huang J, et al. Sci Rep. 2017)。私たちの研究結果は、食物アレルギー児ではHDAC阻害能や酪酸が、健康成人と有意差が出るほど認めなかったことから、これらの報告はin vitroのレベルであって、臨床的な現象として検査値として捕まえることや創薬の対象として開発するにはまだ大きな隔たりがあると結論づけられた。しかし、HDACの異常はアレルギー疾患に限らず、さまざまな疾患、特に多発性硬化症に関連しているが報告されている(Inkster B. et al. Neurobiol Aging. 2013)。したがって、HDAC11阻害作用の原因を特定することで、免疫疾患や多発性硬化症の創薬に役立つ可能性がある。

私たちの研究にはいくつかの限界がある。まず、検体数が少なく、限られた代表的なHDACのみを評価した。また、対象の患者の制御性T細胞を定量することはできなかった。食物アレルギーには腸管免疫が重要であるため、血清ではなく腸内細菌叢や便性に注目すると新たな可能性があったのかもしれない。

結語として、食物アレルギー児の血清においてHDAC阻害能や酪酸濃度が低い訳ではなく、また血清酪酸濃度のみでHDAC阻害能全てを賅うと説明するには不十分であることが判明した。酪酸の摂取によるFOXP3の発現亢進、さらにはアレルギー発症予防という単純な結果は得られなかったnegative studyとなったが、新生児期の酪酸が生理的に高い理由は依然として不明であり、興味深い。既報のHDACと免疫細胞の報告はin vitroレベルであることも本研究により明らかにできたと考える。アレルギー発症予防とエピジェネティクス要因の一つであるHDACという分野について、新規の研究の一旦は担ったと考えられた。

先行研究 (若手研究 B : 16K19667 主要データ)



Supplemental Table S1. General characteristics of newborns participating⁴²

Total number of newborns ⁴²	21 ⁴²
Sex (M/F) ⁴²	14/7 ⁴²
Gestational age (weeks) ⁴²	39.1 \pm 0.8 ⁴²
Birth weight (g) ⁴²	3083.2 \pm 362.1 ⁴²
Mother's age (years) ⁴²	29.4 \pm 5.9 ⁴²

Data are presented as means \pm SD or number⁴²

本研究 (課題番号 : 19K17310)

図 1

成人とFA児のHDAC阻害能%の比較(平均を示す)
有意差は認めなかった n=6

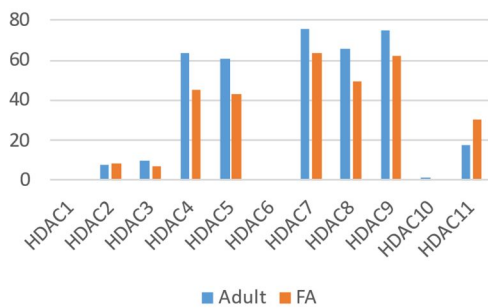


表 1

・酪酸は高濃度程、HDAC阻害能を有する

β -OHB濃度	1mM	10mM	100mM
HDAC1阻害能 (%)	4	22	100
HDAC2阻害能 (%)	1	19	100
HDAC3阻害能 (%)	1	23	100
HDAC4阻害能 (%)	2	20	100
HDAC5阻害能 (%)	2	17	100
HDAC6阻害能 (%)	2	3	100
HDAC7阻害能 (%)	2	21	100
HDAC8阻害能 (%)	1	19	100
HDAC9阻害能 (%)	0	18	100
HDAC10阻害能 (%)	2	23	99
HDAC11阻害能 (%)	1	21	99

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 晋 斎藤 暢知 山田 啓迪 馬場 洋介 大川 夏紀 工藤 孝広 寒竹 正人 大塚 宜一 清水 俊明
2. 発表標題 新生児期のヒストン脱アセチル化酵素阻害能と酪酸の関係
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎晋 田中裕子 佐藤まゆき 山田啓迪 米山俊之 横倉友諒 本庄明日香 馬場洋介 森真理 工藤孝広 大塚宜一 清水俊明
2. 発表標題 新生児の酪酸によるヒストン脱アセチル化酵素阻害能とFOXP3発現の関係
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------