

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08809

研究課題名(和文) 乳幼児発症食物アレルギーの分子病態の解明

研究課題名(英文) Molecular pathophysiology of food allergy in early childhood

研究代表者

玉利 真由美 (Tamari, Mayumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：00217184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーの遺伝要因は海外で複数が同定されてきているが、日本人の患者集団での検証はまだまだ十分でない。本研究では経口負荷試験陽性または食物摂取後に明確な臨床症状を呈した食物アレルギー282症例について、症例対照関連解析を行なった。CCDC80；rs12630906、 $P=0.038$ OR 1.23 (95%CI 1.01-1.49) STAT6；rs11172106で $P=0.012$ 、OR(95%CI) 1.31(1.06-1.62)で有意な関連を認めた。rs12630906、rs11172106のeQTLについて検討したところ、ともにリスクアレルは発現低下の方向性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギーについては、日本人における遺伝要因の探索はあまりなされていない。本研究において、小児食物アレルギーとCCDC80；rs12630906、STAT6；rs11172106との有意な関連を認めた。rs12630906はメモリーCD8細胞においてCD200R1のeQTLであり、rs11172106は形質細胞様樹状細胞においてSTAT6のeQTLを認め、いずれも食物アレルギーのリスクアレルは発現低下の方向性を示した。研究期間全体を通して複数のSNVと食物アレルギーとの関連が認められ、今後は大規模なGWASにおいての検討が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：Although multiple genetic factors for food allergies have been identified in European populations, there is still a lack of validation studies in the Japanese patient population. In this study, we conducted a case-control association analysis using 282 food allergy cases with positive oral challenge tests or clear clinical symptoms after food intake. The control genotypes were obtained from the JENGER public database. We found a significant association with CCDC80 (rs12630906, $P=0.038$, OR 1.23, 95% CI 1.01-1.49) and STAT6 (rs11172106, $P=0.012$, OR 1.31, 95% CI 1.06-1.62). Additionally, we examined the an expression quantitative trait locus (eQTL) for these two SNVs. rs12630906 was identified as an eQTL for CD200R1 in memory CD8 cells, while rs11172106 was identified as an eQTL for STAT6 in plasmacytoid dendritic cells. Both risk alleles associated with food allergy exhibited a decreased expression pattern.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：食物アレルギー 遺伝バリエーション 症例対照関連解析 eQTL

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーとは食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象であり、我が国における有症率は乳児の約10%、3歳児の約5%とされている。症例の多くは経過とともに耐性を獲得していくが、一方で症状が継続したり、アナフィラキシーなど重篤な症状を呈したりする症例が存在し、病態の科学的な解明による新たな診断法や治療法の開発が待たれている。近年、GWAS、トランスクリプトーム、メタボロミクス等々の網羅的な解析技術の進歩により様々な疾患で分子病態の解明が進んでいるが、日本人の集団における食物アレルギーにおいてそれらの解析はほとんど行われていない。多くのアレルギー疾患でGWASが施行され、疾患感受性遺伝子が同定されている。TSLP、IL4、IL13等はアレルギー疾患のGWASでも同定された治療標的の遺伝子であり、それらを阻害する抗体医薬が、実際に複数のアレルギー疾患の治療に活用されてきている。遺伝的関連の存在はドラッグリポジショニングや治療標的分子同定の貴重なエビデンスとなる。一方、食物アレルギーの遺伝要因の解析は気管支喘息、アトピー性皮膚炎と比べあまり進んでいない。海外でピーナッツアレルギーのGWAS等が行われ、食物アレルギーの関連領域が同定されてきているが、日本人の患者集団での検証はいまだ十分でない。疾患関連領域の中には人種特異性を示す領域もあり、日本人の集団における遺伝解析の重要性が指摘されている。日本人の集団において食物アレルギーのゲノム解析データを蓄積していくことは非常に重要である。

2. 研究の目的

近年、アレルギー関連のゲノムワイド症例対照関連解析(GWAS)が行われ、多数の疾患関連遺伝子が同定されている。しかしながら、これらの知見は欧米の人種の集団によるものが多く、遺伝要因には人種特異性があることから、日本人の集団における遺伝解析の重要性が高まっている。本研究では乳幼児発症食物アレルギーに関連する様々な形質と遺伝要因の関連について検討する。

3. 研究の方法

慈恵大学小児科外来を受診している乳児期発症食物アレルギー患者において、サンプル収集を行った。また、遺伝要因の探索として専門医による診断を受け、経口負荷試験陽性または食物摂取後に明確な臨床症状を呈した食物アレルギー282症例(あいち小児保健医療総合センター)について症例対照関連解析を行なった。コントロール症例については日本人の公開データベース(JENGER https://www.ims.riken.jp/databases/ims_db_ct/index.php)より1026名のデータより当該遺伝バリエーション(single nucleotide variant, SNV)のタイピング結果を取得した。日本人の集団における連鎖不平衡も考慮し、代表的なSNVを選び、症例サンプルにおいてPCR-RFLP法を用いてタイピングを行った。各SNVsにおいて、2検定を用いて、Hardy-Weinberg平衡を確認した。2検定またはフィッシャー検定を用いて、症例と対照の被験者間の各バリエーションのアレル頻度の差を比較し、95%信頼区間(95%CI)を持つオッズ比(OR)も2x2アレル頻度表から計算した。統計解析はR statistical software version (R Project for Statistical Computing)を用いて行った。2021年に、日本人の集団における免疫細胞のeQTLデータベース(ImmNexUT, <https://www.immunexut.org/>)が拡充された。選択したSNVのeQTLの検討については、このデータベースを用いて行った。また、2021.10月に国際バイオバンク連携によるヒト疾患リスク遺伝子アトラスの構築が行われ、バイオバンクジャパンのサンプルを活用したPheWASの結果がBioBank Japan PheWebにおいて公表された(<https://pheweb.jp>)。アレルギー疾患においても気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症、アレルギー性鼻炎での大規模GWAS解析の結果が示された。SNVの選択においては、Pheweb.jpにて複数のアレルギー疾患で関連の認められるSNVを優先的に選択した。

4. 研究成果

2020年度は遺伝要因の探索としてGSDMB; rs921650, FCER1G; rs2070901, MALT1; rs57265082の3つの遺伝バリエーションを日本人の集団における連鎖不平衡も考慮して選択し、PCR-RFLP法を用いてタイピングを行ない、食物アレルギーについて、症例対象関連解析(case 282例、control 1026例)を行なった。rs921650およびrs2070901は気管支喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎の大規模GWAS(Nature genetics 2017;49:1752)で関連が追認された領域のバリエーションであり、これまで食物アレルギーとの関連は検討されていない。rs921650はORMDL3, CCR7, RP11-94L15.2, ZBP2, GSDMBの領域に存在し、rs2070901はUSF1, F11R, PPOX, ADAMTS4, B4GALT3, FCER1G領域の遺伝バリエーションである。これらの領域内のCCR7とF11Rは、ドラッグリポジショニングの解析で阻害薬が開発中であることが示されている。rs57265082はピーナッツアレルギー感受性MALT1領域(JACI 2019; 143:2326)で最も関連の強いバリエーションである。GSDMB rs921650 G/Aにおいて、有意水準(P<0.05)に満たないものの、Control; G 587(0.29) A 465(0.71), Case G 138(0.24) A 426(0.76) P=0.052 OR 0.81(95%CI 0.65-1.00)とAアレルが食物アレルギー

との関連する傾向を認めた。A アレル頻度は Case で高く、喘息、アトピー性皮膚炎とリスクアレルの方向性は一致していた。FCER1G rs2070901 G/T については、 $P=0.886$ 、また MALT1 rs57265082 G/T については $P=0.842$ と関連を認めなかった。

2021 年度は IL4R; rs3916997, rs6498004, CCDC80; rs12630906 の 3 つの遺伝バリエーションについて検討した。IL4R は 2 型炎症において重要な役割を果たす IL-4、IL-13 の受容体をコードする遺伝子であり、気管支喘息やアトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患、2 型炎症性疾患の治療に使用されるデュピクセントの治療標的分子である。また、対象とした IL4R; rs3916997, rs6498004 は eQTL データベース (ImmuNexUT: <https://www.immunexut.org/>) においてそれぞれ CD16+ Monocyte, ナイブ B 細胞において強い eQTL を示している。また CCDC80; rs12630906 は 2021 年に報告された日本人のアトピー性皮膚炎の GWAS で同定された CCDC80 領域の原因 SNP の候補 rs72943976 と $r^2=0.99$ の強い連鎖不平衡にある SNP である。なお、rs72943976 は CCDC80 領域にある遺伝子調節領域の活性に影響する SNP の探索により同定された原因 SNP の候補である。IL4R については rs3916997(A/G,) $P=0.462$, rs6498004(C/G) $P=0.125$, と有意な関連を認めなかったが、CCDC80; rs12630906 (C/T) については (数字はアレル数、カッコ内は頻度) Control: C 1395 (0.68), T 657 (0.32), Case C 356 (0.63) T 206 (0.37), $P=0.038$ OR 1.23 (95%CI 1.01-1.49) であり有意な関連を認めた。この食物アレルギーとの関連アレルの方向性はアトピー性皮膚炎と一致していた。遺伝要因には人種特異性があるが、CCDC80 はアトピー性皮膚炎の世界メタ解析において日本人の集団に特異的な関連領域であることが示されている。eQTL データベースの検索では、rs12630906 はメモリー CD8 細胞において CD200R1 の eQTL であり、リスクアレルは CD200R1 の発現低下の方向に働く。CD200 は炎症反応抑制に関わる分子であり興味深い。今回関連の傾向が認められた GSDMB rs921650 を含む関連領域はウイルス感染との関連が複数報告されており興味深い。

2022 年度はこれまで食物アレルギーとの関連が検討されていない 3 つの SNV について検討した。STAT6 については本年度、生後まもなく重症の複数のアレルギー疾患を発症し、アトピー性皮膚炎、好酸球性消化管疾患、食物アレルギー、高 IgE 血症、好酸球増多症を伴う患者において、STAT6 遺伝子変異 (p.Asp419Asn) が発見され、STAT6 が異常に活性化していることが疾患の原因であることが発表された (J Allergy Clin Immunol. 2022 Online PMID:36538978) STAT6 の SNP については、我々のグループが J Allergy Clin Immunol. 2017;140:1713-1716. PMID: 28629743 において検討し、STAT6(rs167769)と食物アレルギーとの関連について報告しているが、今回はその SNV と強い連鎖不平衡のない SNV2 つを検討した。さらに TSLP の SNV については、ヨーロッパの集団で気管支喘息、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA)、鼻ポリープを伴う慢性副鼻腔炎、日本人の集団でも気管支喘息、鼻ポリープを伴う慢性副鼻腔炎と関連する SNV(rs1837253)と連鎖不平衡のない rs1438673 について検討した。この 3 つの SNV は Pheweb.jp において、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症を統合した Allergy multi-trait において、強い関連を認めた (STAT6 rs11172106、 $P=5 \times 10^{-22}$ 、rs1059513、 $P=1.7 \times 10^{-26}$ 、TSLP rs1438673、 $P=1 \times 10^{-37}$)。症例対照関連解析の結果、STAT6(rs1059513)、TSLP (rs1438673)と食物アレルギーとの関連は認めなかったが、STAT6(rs11172106)と有意な関連を認めた $P=0.012$, OR(95%CI) 1.31(1.06-1.62)。rs11172106 について ImmuNexUT (<https://www.immunexut.org/>) において eQTL について検討したところ、形質細胞様樹状細胞において STAT6 に強い eQTL 効果を認め、食物アレルギーのリスクアレルは発現低下の方向性を示した (効果 = -0.268, $P=1 \times 10^{-37}$)。形質細胞様樹状細胞は IFN 産生をはじめ、ウイルスに対する免疫応答で重要な役割を果たす細胞である。

研究期間全体を通して複数の SNV と食物アレルギーとの関連が認められ、今後は大規模な GWAS においての検討が必要である。Pheweb.jp における食物アレルギーの GWAS の結果では、 $P < 1 \times 10^{-8}$ をみたく 5 つのバリエーション (EPAS1; rs1572620480, CDC14C; rs1269581244, PRKCE; rs542251783, FOXI1; rs1481522569, HECTD1; rs2074356) が示されている。今後は解析症例を増やし、ゲノムワイド関連解析を行い、Pheweb.jp の結果とのメタ解析も検討する。また症例を層別化して (食物アレルギー寛解群と非寛解群等) 遺伝要因との関連を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asano Koichiro, Tamari Mayumi, Zuberbier Torsten, Yasudo Hiroki, Morita Hideaki, Fujieda Shigeharu, Nakamura Yuumi, Traidl Stephan, Hamelmann Eckard, Raap Ulrike, Babina Magda, Nagase Hiroyuki, Okano Mitsuhiro, Katoh Norito, Ebisawa Motohiro, Renz Harald, Izuhara Kenji, Worm Margitta	4. 巻 71
2. 論文標題 Diversities of allergic pathologies and their modifiers: Report from the second DGAKI-JSA meeting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 310 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.05.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Sakura, Kainuma Keigo, Noda Tatsuya, Ebisawa Motohiro, Futamura Masaki, Imamura Tomoaki, Miyagawa Akihiro, Nakajima Saeko, Ogawa Yasushi, Inomata Takenori, Kan-o Keiko, Kurashima Yosuke, Masaki Katsunori, Myojin Tomoya, Nishioka Yuichi, Sakashita Masafumi, Tamari Mayumi, Morita Hideaki, Adachi Takeya	4. 巻 71
2. 論文標題 Evaluation of adrenaline auto-injector prescription profiles: A population-based, retrospective cohort study within the National Insurance Claims Database of Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 354 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉利真由美、廣田朝光
2. 発表標題 アレルギー疾患のゲノム解析
3. 学会等名 日本皮膚科学会東京支部 学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉利真由美
2. 発表標題 気管支喘息と重症化のメカニズム 遺伝要因について
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム3 喘息発症・重症化のメカニズムはどこまでわかったか（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉利真由美
2. 発表標題 エピジェネティクスと皮膚疾患 アレルギー疾患を中心に
3. 学会等名 第46回 日本小児皮膚科学会 学術大会 教育講演2 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉利真由美
2. 発表標題 移行期の免疫アレルギー疾患研究 最近の知見から
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会 学術大会 教育セミナー12 (招待講演)
4. 発表年 2022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
研究 分担者	田知本 寛 (Tachimoto Hiroshi) (40256409)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	
研究 分担者	岩本 武夫 (Iwamoto Takeo) (90568891)	東京慈恵会医科大学・医学部・非常勤講師 (32651)	

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
---------	---------