

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591346

研究課題名（和文） アレルギー発症予知のための臍帯血単核球網羅的遺伝子発現研究

研究課題名（英文） Microarray analysis of cord blood mononuclear cells for prediction of allergy in infancy

研究代表者

下条 直樹（SHIMOJO NAOKI）

千葉大学大学院医学研究院小児病態学・准教授

研究者番号：40221303

研究成果の概要（和文）：250 名の出生コホートにおいて乳児期アトピー性皮膚炎発症（AD）発症者 3 名、非発症者 3 名の凍結臍帯血単核球を解凍して、LPS で刺激した。刺激後 6 時間の mRNA をマイクロアレイにより解析した。差異が見られた分子の mRNA 発現について、AD 発症児 10 名、非発症児 10 名の LPS 刺激臍帯血単核球の mRNA を real time PCR で比較した。IL-10、IL-12p40、IL-6、Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)、GM-CSF の mRNA 発現が発症群において非発症群よりも有意に低値であることが判明した。AD を発症する児では出生時から自然免疫系細胞における TLR4 からの刺激に対する調整性 T 細胞誘導能が非発症児に比して低いことが示唆された。この機序の解明はアレルギー疾患発症の予防、ハイリスク児の早期発見につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Neonates were followed from birth to 12 months of age on the development of eczema in a birth cohort in Chiba city. Frozen cord blood mononuclear cells (CBMCs) from 3 children who developed eczema and 3 children who did not developed eczema at 12 months of age were thawed and stimulated with LPS for 6 hours and RNA were obtained. Gene chip analysis of mixture of RNA from each group revealed that substantial numbers of genes are differentially expressed between 2 groups. Using real-time PCR we further analyzed expression of mRNA from LPS-stimulated CBMCs from 10 children who developed eczema and 10 children who did not developed eczema at 12 months of age. IL-10、IL-12p40、IL-6、Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)、GM-CSF mRNA expression were significantly lower in eczema group compared to controls, suggesting that TLR4-mediated induction of regulatory T cells is dampened in cord blood mononuclear cells of babies who later develop eczema. Elucidation of this mechanism will give an important clue to predict and prevent allergic diseases in infancy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：臍帯血、マイクロアレイ、アレルギー、 Toll 様受容体、単核球

1. 研究開始当初の背景

乳幼児期のアレルギー疾患の発症は衛生仮説 (Hygiene hypothesis) により説明されることが多い。衛生仮説とは、「新生児期の適応免疫応答能はアトピー素因の有無に関わらず基本的に Th2 型の免疫応答であり、正常児では成長に伴い微生物に対する自然免疫分子を介する刺激により環境抗原に対して Th1 あるいは Treg (制御性 T 細胞) 優位の応答性に偏倚してゆく。衛生環境の向上による微生物曝露の低下が、Th1 あるいは Treg の誘導を妨げて Th2 型免疫応答性の持続によりアレルギー疾患発症の危険が高まる」とする仮説である。乳児がもっとも頻繁に曝露する微生物は腸内細菌叢であり、実際にアレルギーを発症する乳児では発症以前から腸内細菌叢の異常があることが北欧を中心とする出生コホート研究で報告されている。さらに、プロバイオティクスを新生児期から投与する試みがなされ、アトピー性皮膚炎の発症を半減させることが可能であった。しかしながらプロバイオティクスの投与による発症予防率は 100%ではなく、またプロバイオティクス投与によってもアトピー性皮膚炎を発症した患者ではその重症度が対照群の重症度と差がなかった。この結果は、出生時から自然免疫系の機能に個体差が存在する可能性を示しているが、アレルギー発症と関連する臍帯血中の自然免疫細胞の機能に関する研究は国内外でほとんど存在しない。

2. 研究の目的

出生時臍帯血単核球上の Toll 様受容体 (TLR) 刺激による遺伝子発現を、乳幼児期のアレルギー疾患の有無別に比較することによりアレルギー疾患の発症予知の可能性を検討する。

3. 研究の方法

我々が千葉市において設定した出生コホートで乳幼児期のアレルギー発症の有無が判明している児を対象として、あらかじめ採取し凍結保存してある臍帯血単核球を Toll 様受容体 (TLR) のリガンドで刺激して誘導される遺伝子の発現を Affymetrix 社 GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (およそ 20,000 個の遺伝子発現解析が可能) により解析する。これにより、アレルギー非発症健康児に比較してアレルギー発症児で発現が低下あるいは亢進している遺伝子を明らかにする。さらに候補遺伝子について実際の mRNA 発現を real time PCR を

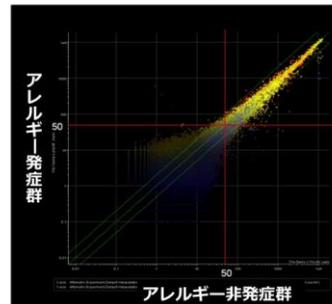
用いて定量化解析を行ない確認する。

4. 研究成果

(1) 1 歳児アレルギー発症児と非発症児での LPS 刺激による臍帯血単核球からの遺伝子発現の比較

1 歳で気管支喘息、アトピー性皮膚炎、あるいは食物アレルギーを発症した児 3 名とアレルギー疾患を発症しなかった対照群 3 名の臍帯血を解凍し、LPS で刺激 6 時間後の RNA を抽出した。これを Affymetrix 社 GeneChip®にて解析した (図 1)。これらの遺伝子の中で、アレルギー疾患発症群で非発症群と比べ LPS 刺激による発現が低い遺伝子を、①自然免疫刺激により活性化する遺伝子として、LPS 刺激により無刺激より 2 倍以上発現が増強した遺伝子、② その中で LPS 刺激下の遺伝子発現が、アレルギー疾患発症群で非発症群の 1/2 以下であった遺伝子、の基準で解析した。その結果、合計 73 の遺伝子が同定された。

図1 マイクロアレイによるLPS刺激臍帯血単核球の遺伝子発現解析



(2) 候補遺伝子の定量的評価

次に、1 歳でのアトピー性皮膚炎発症児 10 名と非アレルギー児 10 名について LPS 刺激臍帯血単核球を用いて、アレイ解析からの候補遺伝子の発現を定量的に解析した (表 1)。2 群間で、性別、出生体重、在胎週数、母親のアレルギー歴に差は認めていない。獲得免疫の評価として用いられる IgE も臍帯血血清中 IgE では 2 群間では差は認めず、有意差があったのは食物アレルギー発症頻度のみであった。

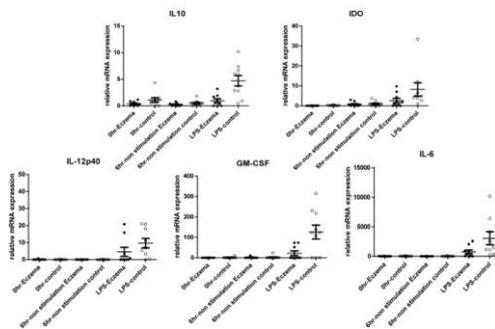
表1 定量的遺伝子発現解析対象の背景因子

	AD非発症群 (n=10)	AD発症群 (n=10)	P value
性別, 男児/女児 (人)	5/5	5/5	NS
出生体重 (g)	2970 ± 310	2990 ± 380	NS
在胎週数 (週)	39.2 ± 1.2	39.8 ± 1.7	NS
母親アレルギー既往 (人)	8	7	NS
母親アトピー性皮膚炎既往 (人)	1	1	NS
出産時母親年齢 (歳)	33 (26 - 40)	31 (26 - 38)	NS
食物アレルギー合併 (人)	0	4	0.043
気管支喘息合併 (人)	0	2	NS
臍帯血IgE (IU/ml)	1.37 ± 2.16	0.68 ± 1.04	NS

Mann-Whitney U test, Fisher's exact test

定量的PCRでは、IL-10, IDO (indolamine 2,3-dioxygenase)、IL-12p40、GM-CSF、IL-6の遺伝子発現がアトピー性皮膚炎発症群で対照群に比して有意に低下していた(図2)。

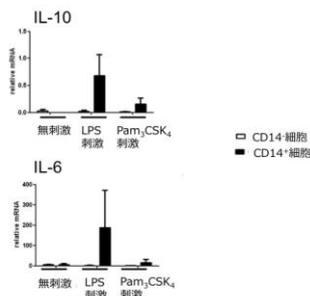
図2 定量的遺伝子発現解析で2群間で差異のあった分子



(3) LPS刺激でmRNA発現に差異のあった細胞の同定

LPS刺激でのmRNA発現に差異がみられた細胞を同定するために、あらかじめ臍帯血単核球を磁気ビーズ法でCD14陽性細胞とCD14陰性細胞に分画し、LPS刺激を行ってmRNA発現をみると、CD14陰性細胞での発現はほとんどなく、主な発現細胞はCD14陽性の単球であることが示唆された(図3)。

図3 CD14陽性細胞/陰性細胞におけるIL-10, IL-6発現



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3件)

① 下条直樹 食物アレルギー発症機序と発症予防への考え方 食物アレルギー研究会誌 査読なし 2011;11:84-91. DOI: 1882-1588

② 下条直樹 アトピー性皮膚炎の疫学 査読なし 日本医師会雑誌 2011; 140:959-962. DOI: 0021-4493

③ 下条直樹 専門医のためのアレルギー学講座 アレルギー疾患の早期治療介入 アトピー性皮膚炎 発症予防と重症化阻止は可能か 査読なし アレルギー 2011; 60: 956-963. DOI: 0021-4884

[学会発表] (計4件)

① 下条直樹、河野陽一 食物アレルギー診療ガイドライン2011に向けて 食物アレルギーの発症予知と予防 第47回日本小児アレルギー学会 2011.12.4 福岡

② 下条直樹 小児のアトピー性皮膚炎 免疫学的因子の視点から 食物アレルギーとの関わりについて 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011.11.10 東京

③ 下条直樹 乳幼児アトピー性皮膚炎の発症メカニズム up to date 第18回ニューロペプチド研究会 2010.12.3 横浜

④ Shimojo N, Arima T, Suzuki S, matsumoto K, Kohnno Y. Impairment of Toll like receptor signaling in cord blood mononuclear cells of children who later develop atopic eczema. 29th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2010.06.07 London.

⑤ 有馬孝恭、下条直樹、中野泰至、森田慶紀、落合伸伍、鈴木修一、富板美奈子、河野陽一 アトピー性皮膚炎発症の有無による臍帯血単核球のTLR刺激による遺伝子発現の違い 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009.10.30 秋田

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下条直樹 (SHIMOJO NAOKI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：40221303

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

有馬孝恭 (ARIMA TAKAYASU)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60400967

松本健治 (MATSUMOTO KENJI)
国立成育医療センター研究所免疫アレルギー
研究部アレルギー研究室・室長
研究者番号：60181765