

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659488

研究課題名(和文) アレルギー病態理解と新規治療法開発に向けたリンパ球刺激試験法の改良

研究課題名(英文) Improvement of Lymphocyte stimulation test.

研究代表者

荒川 浩一 (Hirokazu, Arakawa)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50272232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgEに依存しないアレルギー反応の補助診断法として、リンパ球刺激試験(LST)が有用であることが知られているが、多くの採血量、長期の培養、不安定性など幾つかの欠点がある。本研究では、LST法を改善し抗原特異的T細胞の存在・反応を短時間で検出する新規検査法の開発を目的とした。T細胞受容体のレパトアを次世代シーケンシング解析した結果、24時間の抗原刺激により全体的にTCRのタイプがエンリッチする傾向がみられた。また、発現アレイ解析により、いくつかの新規のマーカー遺伝子をスクリーニングした。これらのマーカーの発現量を定量PCRで測定することにより、LSTの結果を高い精度で判別可能なことが示された。

研究成果の概要(英文)：The lymphocyte stimulation test (LST) has been reported as a useful diagnostic for non-IgE mediated gastrointestinal food allergies. However, this method has some disadvantages including taking time, instability and relative a large amount of samples necessity. In this study, we propose the new method that overcomes the disadvantages of the LST. T cell receptor repertoire diversity was analyzed using next generation sequencing against the PBMC stimulated with milk antigen. After 24 hrs stimulation with antigen, some part of TCR clonotypes enriched slightly. We also tried to identify novel marker for T cell response to antigen. Several marker genes that the RNA expression level were changed by antigen stimulation were screened by gene expression array. The RNA expression level were quantified using qPCR and then compared to diagnosis by LST stimulation index. Some of these markers showed excellent discriminating accuracy (AUC0.79-0.91) by ROC analysis.

研究分野：小児科学

キーワード：リンパ球刺激試験 アレルギー T細胞

1. 研究開始当初の背景

アレルギー体外検査の一つであるリンパ球刺激試験 (LST: Lymphocyte Stimulation Test) は、患者末梢血由来のリンパ球を、試験管内において抗原で刺激し、幼弱化反応 (細胞分裂) を指標に抗原特異的リンパ球の存在を評価する試験である。LST 法は、近年注目されつつある特異的 IgE 値上昇を伴わない乳児期の消化管アレルギーの補助的診断として有用であることが知られている。しかし、現行の LST 法は、7 日程度の培養が必要なことや、検出する増殖細胞種が不明なこと、抗原提示細胞の抗原取り込み効率が結果に大きく影響すること、比較的採血量が多く乳幼児では検査の負担が大きいことなどの問題点が挙げられる。一方で、LST で増殖したリンパ球のタイピングにより、免疫学的な解析が得られるなど、大きな可能性のある検査法であるといえる。例えば、Sampson ら (*J Allergy Clin Immunol* 2009) は、ミルクアレルギー患者が寛解に至る際に、抗原特異的制御性 T 細胞が増加することを、LST 法を用いて明らかにしている。我々の研究室でも、従来法を改変し、増殖細胞について、ラジオアイソトープを使用せずに標識する新規手法や、増殖細胞のフローサイトメトリーや発現遺伝子の定量を用いたタイピングを試みてきた。しかし、採血量を減らし、効率よく病態を捉えた検査法とするためには、さらに大きく改変する必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

従来の LST 法の欠点を改善し、少ない材料を利用しより短時間で、アレルギーに対する T 細胞の反応を高感度で検出する手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

【研究 1】.LST 刺激培養で増殖する T 細胞の TCR 可変領域のシーケンス解析

サンプル

患者および健常コントロールボランティアより、ヘパリン加末梢血を採取した。末梢血単核球細胞 (PBMC) の分離は比重分離法 (Lymphoprep: Axis-Shield Poc AS) を用いて行った。

抗原刺激および培養

PBMC は、 1×10^6 cells/mL の濃度で AIM-V 培地 (Lifetechnologies 社) に懸濁した。96 ウェルプレートに、各ウェル 100 μ L ずつ分注し、刺激培養に供した。全血を用いた刺激培養は、末梢血を RPMI 培地 (Lifetechnologies 社) で 4 倍希釈した後、チューブあたり 400 μ L 分注して培養に用いた。

抗原は、代表的なミルク抗原、ラクトアルブミン、ラクトグロブリン、カゼイン、

カゼイン (シグマ社) を混合し終濃度 100 μ g/mL (各タンパク) になるように添加した。対照は PHA-M (Roche Applied Science 社) を 10 μ g/mL 添加、および無添加を設定した。

LST

抗原刺激後 5 日目に BrdU (Roche Applied Science 社) 10 μ M を添加し、6 時間後に検出を行った。BrdU の測定は、BrdU 発色キット (Roche Applied Science 社) のプロトコールに従って行った。

RNA 抽出

AGPC 法 (ToTally RNA Isolation Kit: LifeTechnologies 社) を用いて Total RNA を抽出した。逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life Technologies) を用いて行った。

TCR alpha V-J-CDR3 領域の増幅

TCR profiling kit (iRepertoire 社) を用いて V-J-CDR3 領域を PCR にて増幅した。増幅した産物はサイズセレクションを行った後、次世代シーケンスに供した。

V-J-CDR3 領域の次世代シーケンシング解析

Miseq v3 2x300bp キット (illumina 社) を用いてメーカープロトコールに従ってシーケンス解析を行った。

V-J-CDR3 領域のレパートア解析

シーケンスデータは、MiTCR (Bolotin DA., et al. 2013) を用いて V-J-CDR3 領域のヌクレオチド、アミノ酸解析を行った。

【研究 2】. LST において抗原特異的に反応する新規マーカーの探索

LST、刺激、培養、RNA 調整は実験 1 と同様に行った。

発現アレイ解析

24 時間刺激培養後の RNA を、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K v2 (Agilent Technologies 社) を用いて発現アレイ解析した。測定結果は、統計解析ソフト R (ver. R-3.1.0) の limma パッケージ (Bioconductor) を用いて、刺激-無刺激間で統計学的に有意な差がみられる遺伝子を抽出した。

新規マーカー遺伝子の定量解析

定量 PCR は、Taqman プローブ法を用い、各マーカー遺伝子の発現量を 18s rRNA 遺伝子 (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control、製品番号: 4319413E) でノーマライズした。

4. 研究成果

【研究 1】:LST 刺激培養で増殖する T 細胞の TCR 可変領域のシーケンス解析

乳幼児消化管アレルギー患者 4 名から分離した末梢血単核細胞 (PBMC) を、ミルク抗原タンパクおよびヒト血清アルブミンで 24 時間刺激培養し、RNA を抽出後、TCRalpha V-J-CDR3 領域を増幅、シーケンシングを行った。各サンプルあたりのリード数は、686,265 ~ 1,385,215 であった (表 1)。またシーケンスのダイバーシティーは 6,978-45,965 であった (表 1)。

表 1

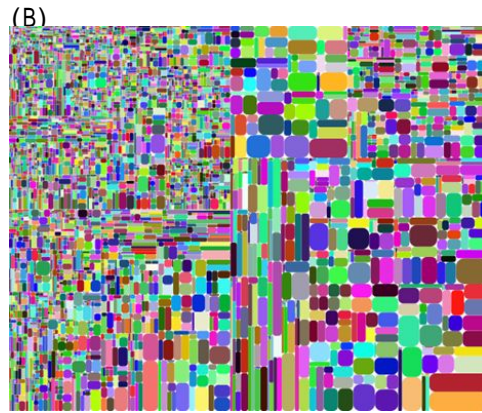
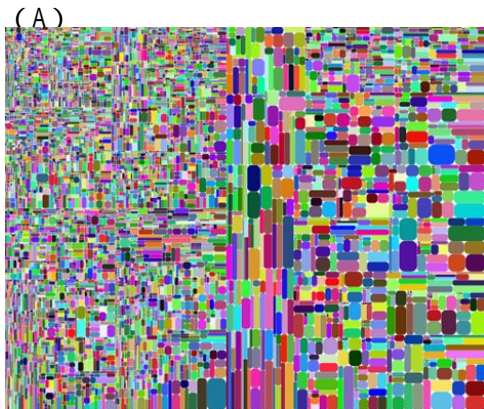
sample_id	sex	allergy	count	diversity
Control	M	control	1,385,215	24,599
Patient-1 Non	F	patient	1,366,661	27,944
Patient-1 Antigen	F	patient	1,038,297	18,332
Patient-2 Non	F	patient	1,328,254	45,965
Patient-2 Antigen	F	patient	1,117,363	29,430
Patient-3 Non	M	patient	1,043,224	23,287
Patient-3 Antigen	M	patient	923,568	19,556
Patient-4 Non	F	patient	686,265	10,420
Patient-4 Antigen	F	patient	699,644	6,978

抗原刺激培養による V-J-CDR3 ダイバーシティーの変化

24 時間の抗原刺激により特定の V-J-CDR3 のポピュレーションに変化があるかを解析するために、クロナリティーの解析を行った (図 1)。刺激なし (A) に比較して抗原刺激をした場合 (B) ではほとんどのスポットの大きさに変化は見られないが、一部のクロナタイプのポピュレーションが増加しているのがみられた。しかしながら、特定のスポットが爆発的に大きくなる現象は見られなかった。

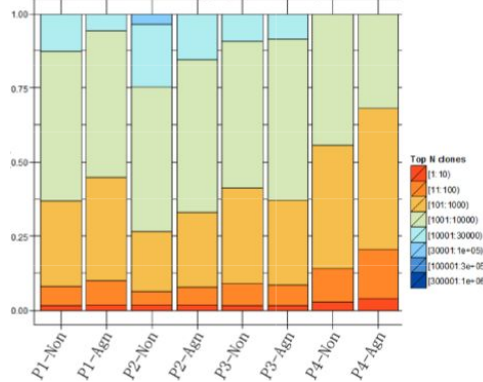
図 1 V-J-CDR3 領域のプロファイル

Patient4 における抗原刺激有 (A) および抗原刺激なし (B) 培養後の V-J-CDR3 のクロナタイプの TreePlot。



さらにクロナタイプの出現頻度ごとの相対的ポピュレーションを図 2 に示した。患者 1, 2, 4 では、それぞれ出現頻度 Top10, 100, 1000 の占めるポピュレーションが抗原刺激により増加していることが示された。

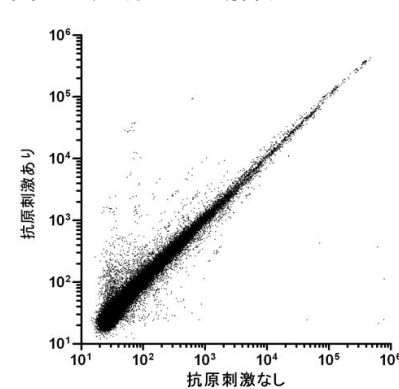
図 2 クロナタイプの出現頻度とのポピュレーションに占める割合



【研究 2】: LST において抗原特異的に反応する新規マーカーの探索

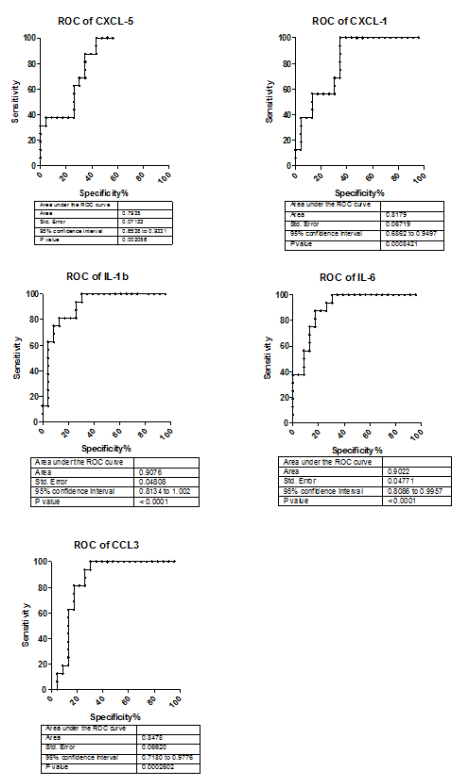
抗原刺激あり・なしの条件で 24 時間培養したサンプルの発現アレイ解析の結果を図 3 に示した。3 人の患者サンプルを用いて共通して発現が有意に上昇あるいは下降する遺伝子を抽出し新規マーカー候補とした。

図 3 発現アレイ解析



新規マーカー候補遺伝子の発現解析
 発現アレイ解析で見出したマーカー候補遺
 伝子について、さらに定量的PCRを用いて発
 現量を定量した。LST法により判定した陽
 性・非陽性を基準としてROC分析を行った(図
 4)。ここに示した5つの遺伝子では、高い
 精度でLSTの結果を判別できることが示さ
 れた(ROC 0.79 - 0.91)。

図4



結論

現行のLST法の欠点を改善する新規LST法の開発を行った。TCRのレパトア解析を行った結果、24時間の抗原刺激ではクロノタイプ全体がエンリッチする傾向はみられたものの、特定のタイプが爆発的に増加することはなかった。発現アレイ解析により選定した24時間の刺激培養で発現の変動する新規マーカー遺伝子のいくつかは、LSTの結果を高い精度で判別可能なことが示された。以上の結果より、旧来のLST法に比較して短時間の抗原刺激培養(24時間)で、同様の結果を得られる新規手法開発の可能性が示された。

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13件)

Hagiwara S, Mochizuki H, Muramatsu R, Koyama H, Yagi H, Nishida Y, Kobayashi T, Sakamoto N, Takizawa T, Arakawa H. Reference values for Japanese children's

respiratory resistance using the LMS method. Allergol Int. 査読有、63(1):113-9. 2014

DOI:10.2332/allergolint.13-0A-0591

荒川浩一.【小児食物アレルギー診療UP DATE-診る前に確認したい最新知見-】(5章) 診断 食物除去試験と食物経口負荷試験の進め方・注意点. 小児科. 査読無、55(5): 611-618. 2014

荒川浩一. 特集 アレルギーとエピジェネティクス 序 ~ エピゲノムから見た免疫・アレルギー疾患 ~. アレルギー・免疫. 査読無. 21(12): 9-12. 2014

小林靖子、荒川浩一. 特集 アレルギーとエピジェネティクス 各論 喘息以外の免疫・アレルギー疾患とエピジェネティクス ~ 微小変化型ネフローゼ症候群とエピジェネティクス ~. アレルギー・免疫. 査読無、21(12): 64-70. 2014

荒川浩一. 学校保健 皮膚科の現状と食物アレルギー対応 学校保健における食物アレルギーの対応 「学校生活管理指導表」を通じた指導のポイント. 日本皮膚科学会雑誌. 査読無、124(13): 2722-2724. 2014

八木久子、佐藤幸一郎、西田豊、小山晴美、石毛崇、滝沢琢己、荒川浩一. 新生児・乳児消化管アレルギーにおける補助的検査法の評価. 日本小児アレルギー学会雑誌. 査読有、28(3): 391-393. 2014

荒川浩一. アレルギーマーチ 疾患の自然歴と修飾因子 気管支喘息の自然歴と修飾因子. 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌. 査読無、12(1): 36-38. 2014

荒川浩一. 特集 アレルギー疾患の診断・治療における特異的IgE抗体の微量および高値測定の意義 小児科領域における検討. 臨床免疫・アレルギー科. 査読無、59(6): 717-725. 2013

金子真理、八木久子、小山晴美、中嶋直樹、村松礼子、滝沢琢己、荒川浩一. 食物依存性運動誘発アナフィラキシーとして発症したリンゴアレルギーの1例. 日本アレルギー学会雑誌. 査読有、62(6) 698-703, 2013

N. G. Papadopoulos, H. Arakawa, K.-H. Carlsen, A. Custovic, J. Gern, R. Lemanske, P. Le Souef, M. Mäkelä, G. Roberts, G. Wong, H. Zar, C. A. Akdis, L. B. Bacharier, E. Baraldi, H. P. van Bever, J. de Blic, A. Boner, W. Burks, T. B. Casale, J. A. Castro-Rodriguez, Y. Z. Chen, Y. M. El-Gamal, M. L. Everard, T. Frischer, M.

Geller, J. Gereda, D. Y. Goh, T. W. Guilbert, G. Hedlin, P. W. Heymann, S. J. Hong, E. M. Hossny, J. L. Huang, D. J. Jackson, J. C. de Jongste, O. Kalayci, N. Ait-Khaled, S. Kling, P. Kuna, S. Lau, D. K. Ledford, S. I. Lee, A. H. Liu, R. F. Lockey, K. Lødrup-Carlsen, J. Løtvall, A. Morikawa, A. Nieto, H. Paramesh, R. Pawankar, P. Pohunek, J. Pongracic, D. Price, C. Robertson, N. Rosario, L. J. Rossenwasser, P. D. Sly, R. Stein, S. Stick, S. Szeffler, L. M. Taussig, E. Valovirta, P. Vichyanond, D. Wallace, E. Weinberg, G. Wennergren, J. Wildhaber, R. S. Zeiger. International consensus on (ICON) pediatric asthma. 査読有、Allergy. 67(8):976-97. 2012
DOI:10.1111/j.1398-9995.2012.02865. x

Arakawa H, Yagi H, Koyama H, Nakajima N, Takizawa T. Characteristics and natural course of neonatal and infantile gastrointestinal milk allergy and the efficacy of oral immunotherapy. 査読有. Clinical & Experimental Allergy Reviews, 査読有、12, 20-24 2012
DOI: 10.1111/j.1472-9733.2012.01162.x

小林靖子、相澤明、滝沢琢己、荒川浩一. 先端医学講座 アレルギー疾患とエピジェネティクス：遺伝子の発現における環境因子の影響. アレルギーの臨床. 査読無、32 (12): 1137-1142. 2012

荒川浩一. アレルギー疾患発症因子の解明 - 出生コホートからエピジェネティクスまで -. International Review of Asthma & COPD . 査読無、14(3):39-42. 2012

〔学会発表〕(計4件)

荒川浩一、アレルギー疾患の診断・治療における特異的IgE抗体の微量および高値測定の意義：小児科領域における検討、第62回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012年11月29日、大阪国際会議場

荒川浩一、アレルギーマーチ：疾患の自然歴と修飾因子「気管支喘息の自然歴と修飾因子」、第30回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会、2013年6月9日、つくば国際会議場

荒川浩一、アレルギー性疾患発症因子の解明 - 出生コホートからエピジェネティクスまで -、第8回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2013年6月20日、前橋テ

ルサ

荒川浩一、アレルギーマーチ up to date - 小児から成人まで -、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013年11月29日、ホテルニューオータニ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称：IgE非依存性アレルギー疾患検査法
発明者：滝沢琢己、荒川浩一
権利者：国立大学法人 群馬大学
種類：特許
番号：特許2015-181356
出願年月日：平成27年9月15日
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

荒川 浩一 (ARAKAWA, Hirokazu)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50272232

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：