

令和元年6月21日現在

機関番号：82302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11358

研究課題名(和文) 消化管アレルギー性炎症との関連からの先天性消化管閉塞性疾患の病態関連分子の解明

研究課題名(英文) Understanding the molecules associated with congenital obstructive diseases of the digestive tract in relation to gastrointestinal allergic inflammation

研究代表者

山田 佳之(Yamada, Yoshiyuki)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号：80309252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性消化管疾患関連の消化管アレルギーと先天性消化管閉塞性疾患の関連性を検討した。先天性食道閉鎖・狭窄関連好酸球性食道炎ではプロトンポンプ阻害薬、またヒルシュスプルング病あるいはその類縁疾患関連好酸球性胃腸炎(EGE)では注腸ステロイドや多種抗原除去療法の有用性を報告した。また好酸球増多症候群関連EGEで複数の融合遺伝子が検出された。さらに消化管アレルギーでは末梢血Th1/Th2関連分子発現が有用な指標となる可能性が考えられた。そして新規の細胞分離法、簡易な好酸球の細胞傷害性評価法を確立した。本研究により消化管アレルギーと先天性消化管閉塞性疾患の関連性やその解析方法の新知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球性消化管疾患関連の消化管アレルギーと先天性消化管閉塞性疾患(ヒルシュスプルング病あるいはその類縁疾患、先天性食道閉鎖・狭窄)の関連性、関連遺伝子や合併例での治療法を示した。またその病態を探るための新しい実験方法を確立した。小児アレルギーと小児消化管疾患分野の臨床的、基礎的な研究の進歩につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The relationships between eosinophilic gastrointestinal disorders (EGIDs) and congenital obstructive diseases of the digestive tract were shown in this study. Proton pump inhibitors for EGIDs with congenital esophageal atresia and/or stenosis, and enema steroid and multiple food elimination diets for EGIDs with Hirschsprung's disease and allied disorders of Hirschsprung's disease were effective, respectively. Several fusion genes were identified from patients with hypereosinophilic syndromes associated with EGIDs. Th1/Th2 associated molecules on T cells could be good markers for gastrointestinal food allergies. A new cell isolation method and a simple eosinophilic cytotoxicity test were established. We believe that the present study could provide new insights into the relationship between gastrointestinal food allergy and congenital obstructive diseases of the digestive tract as well as into the development of new analytical methods for these disorders.

研究分野：小児科学、アレルギー免疫学

キーワード：消化管アレルギー 先天性消化管閉塞性疾患 好酸球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天的消化管閉塞性疾患には食道閉鎖・狭窄、ヒルシュスプルング氏病 (H 氏病)、ヒルシュスプルング氏病類縁疾患 (H 類縁)、十二指腸・小腸閉鎖・狭窄、鎖肛などが挙げられる。我々はこれまでに多くの患者で先天性食道閉鎖・狭窄 (CEA/CES) に関連して消化管アレルギー (GIFA) の1つとも考えられる好酸球性消化管疾患 (EGIDs) (好酸球性食道炎 (EoE) と胃腸炎 (EGE) を含む) の1つである EoE が見られること、また同患者群ではアレルギー疾患の既往歴・家族歴が高率に見られることを報告している (Yamada Y, et al. Int Arch Allergy Immunol. 2013)。また EGIDs の治療法に抗原除去療法があり、我々が EGE の治療法として提唱している多種抗原除去療法 (Yamada Y, et al. Allergol Int. 2014) が奏功した消化管閉塞性疾患患者を複数経験している。また食道閉鎖に関連する Foxf1 という転写活性因子は eotaxin や IL-8 のプロモーター領域にも結合することから先天性食道閉鎖と好酸球性炎症の遺伝的背景での関連も言われている (Gorter RR, et al. J Pediatr Surg. 2012)。さらにミルクアレルギーをもつ H 氏病患儿では術後腸炎を起こしやすいとの報告 (Umeda S, et al. Pediatr Surg Int. 2013) や、また H 氏病疑い患者での好酸球性炎症やミルクアレルギーの存在が言われている (Pacilli M, et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012、Ikeda K, et al. J Pediatr Surg. 2011)。このように GIFA と先天的消化管閉塞性疾患には関連性があるがこの観点での研究はまだ少ない。

2. 研究の目的

先天性消化管閉塞性疾患 (先天性食道閉鎖、H 氏病および H 類縁等) において、その病態に消化管のアレルギー性炎症で重要な好酸球が積極的な役割を果たしている可能性が考えられる。消化管閉塞性疾患の一部に家族内発症例があることから遺伝子の網羅的解析による関連遺伝子の推定を行い、さらに消化管閉塞性疾患患者がアレルギー性炎症を発症した場合には発症や治療前後で消化管組織の検体、あるいは血液、便検体をアレルギー性炎症の側面から解析し病態関連分子を探索する。これらによって関連分子の絞り込みや機能推定を行い、消化管閉塞性疾患での本質的に重要な分子を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象患者

群馬県立小児医療センターでの H 氏病、H 類縁患者リスト (疑い含む)、消化管生検 (上部、下部) を施行した患者リスト、CEA/CES 患者リストを病理報告書ベースで作成した。また EGIDs 診断 (合併) 例を中心に (治療前後を含む) 生検、血液、血清、便検体や臨床情報を収集した。非合併例は対照群とした。さらに において家族歴の強い症例がなかったため、家族歴や遺伝的素因が強い好酸球増多症候群 (HES) 関連 EGE 患者 2 名の保存検体、また他院から HES 関連 EGE として相談のあった剖検検体 (入手予定) を用いた。

(2) 消化管生検検体の保存

消化管生検検体は RNA later による処理を行い凍結保存した。また骨髓細胞や末梢血に関しては赤血球を溶血、あるいはファイコールを用いて単核細胞を分離して保存した。

(3) フローサイトメーター (FCM) での検討

末梢血を、CD4、Th2 指標 (CCR3、CCR4、CRTH2) と Th1 指標 (CCR5) に対する抗体 (蛍光色素を結合している) を用いて染色し、CD4 陽性リンパ球での表面発現を FCM にて検討した。

(4) 三次元マイクロファイバースystemでの細胞分離

CD49d を固相化したファイバーを用いて好酸球性細胞株 EoL-1 (対照は CD49d ノックダウン細胞)

を用いて細胞分離を行った。

(5) RNAシーケンス解析

HES関連EGE患者2名の骨髓保存検体からRNAを抽出しRNAシーケンス解析を行った。

(6) 好酸球細胞傷害性の検討

腸管上皮細胞株 Coca-2 と分離好酸球を共培養し、残存接着細胞数をカウントし、形態変化を観察した。

なお本研究は群馬県立小児医療センター倫理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 臨床的検討

2005年以降にH氏病およびその類縁疾患を疑われた患者検体はのべ約170検体が存在した。また食道生検検体は約160検体あり約35%に食道好酸球浸潤があり、約15%が食道好酸球増多を認めていた。関連学会で報告した。また2012年以降に34名のEGIDs患者からの検体が存在した。また組織検体を保存した。

1) CEA/CES術後患者でのEoEに対してはプロトンポンプ阻害薬が有意に食道好酸球数を減少させることが判明した(関連学会で報告)。

2) H氏病とH類縁疾患患者に合併したEGE症例について経過を観察した。1例は全身性ステロイドが効果を示したが依存性になり注腸ステロイド製剤によりステロイド離脱が可能になった。もう1例は多種抗原除去療法により改善し、再導入・負荷試験により即時型、遅発型両方の症状の原因食物が同定できた(関連学会で報告)。

また研究分担者(田口)らが中心になり研究代表者も作成に参加したH類縁疾患ガイドラインが公開され、学術論文としても受理された。

(2) フローサイトメーターによるTh1/Th2指標の検討

近年の乳児の非IgE依存性GIFAではEGIDsの合併が多く、IgE依存性の食物アレルギー群と細胞表面のTh1指標・Th2指標を比較した。いずれも非IgE依存性GIFA群で発現比率が高い傾向がみられた。またCCR5の発現には年齢が関係した(関連学会で報告)。

(3) 三次元マイクロファイバーシステムを用いた新しい細胞分離法の検討(東京大学工学部高井まどか博士との共同研究で同研究室にて施行)

白血病微小残存病変を解析する方法として検討してきており、これまでより少数の細胞を高純度で分離できる。将来的に消化管組織からの血球分離を行える可能性があり検討した。今回の研究ではまず前段階として好酸球性細胞株EoL-1(対照はCD49dノックダウン細胞)を用いて検討を行い、CD49dを標的として細胞分離ができる可能性が見いだされた(関連学会で報告)。

(4) RNAシーケンス解析による検討(国立成育医療センター血液研究部との共同研究)

HES関連EGEと診断された2症例(1例は疑い)について検討した。骨髓細胞の保存があり、これらの症例は家族歴や遺伝的素因が強いことから関連分子を見つけ易いと考えた。2名のRNAシーケンスを施行した。フィルターをかけた後、いずれも複数の融合遺伝子が検出された。またHES関連EGEとして相談のあった剖検検体のパラフィン切片から全ゲノム解析を行う(他の保存検体への応用も含め)準備を行った。倫理審査等の関係で研究期間内には解析ができなかった。

(5) 好酸球の細胞傷害性の検討

神経細胞等では形態学的な変化をみることも重要であることから、FCMを用いたこれまでの評価方法に加え、好酸球の細胞傷害性を標的細胞の形態変化と残存接着細胞数から判定した。結果からFCMの検討と同程度に好酸球の細胞傷害性が評価できると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計22件)

Dowa Y, Yamada Y, Kato M, Matsumoto N, Kama Y, Shiihara T. Sweet Potato Was Not So Sweet: Undetected Foreign-body Aspiration in a Healthy Child Leading to Acute Bronchial Asthma. Tokai J Exp Clin Med., 査読有, Vol. 44, No. 1, 2019, 1-4

Kobayashi Y, Konno Y, Kanda A, Yamada Y, Yasuba H, Sakata Y, Fukuchi M, Tomoda K, Iwai H, Ueki S. Critical role of CCL4 in eosinophil recruitment into the airway. Clin Exp Allergy, 査読有, 2019, in press, DOI: 10.1111/cea.13382

Shimizu A, Shimabukuro M, Shimizu M, Asai S, Tomizawa S, Hatakeyama S, Yamada Y. Painful Subcutaneous Edema of the Lumbar Region in IgA Vasculitis. Pediatrics International, 査読有, 2019, in press

Muto M, Taguchi T, Tomomasa T, Nio M, Tamai H, Tamura M, Sago H, Toki A, Nosaka S, Kuroda T, Yoshida M, Nakajima A, Kobayashi H, Sou H, Masumoto K, Watanabe Y, Kanamori Y, Hamada Y, Yamataka A, Shimojima N, Kubota A, Ushijima K, Haruma K, Fukudo S, Araki Y, Kudo T, Obata S, Sumida W, Watanabe T, Fukahori S, Fujii Y, Yamada Y, Jimbo K, Kawai F, Fukuoka T, Onuma S, Morizane T, Ieiri S, Esumi G, Jimbo T, Yamasaki T, Matsufuji H. Japanese Clinical Practice Guidelines for Allied Disorders of Hirschsprung's Disease, 2017. Pediatrics International, 査読有, 60(5), 2018, 400-410, DOI: 10.1111/ped.13559

Yagi H, Takizawa T, Sato K, Inoue T, Nishida Y, Ishige T, Tatsuki M, Hatori R, Kobayashi Y, Yamada Y, Arakawa H. Severity scales of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants. Allergol Int., 査読有, Volume 68, Issue 2, 2018, 178-184, DOI: 10.1016/j.alit.2018.08.004

山田佳之, 今井孝成, 大嶋勇成 . ガイドライン解説 食物アレルギー診療ガイドライン 2016 (第12章) 消化管アレルギーとその関連疾患(解説) . 日本小児アレルギー学会誌, 査読有, 32巻2号, 2018, 282-287

山田佳之 . 好酸球と消化管アレルギー . 日本小児アレルギー学会誌, 査読有, 32巻5号, 2018, 798-806

山田佳之 . 消化管アレルギー 特集: 食物アレルギー ~最近の話題・ガイドラインをふまえて~ . アレルギー・免疫, 査読無, Vol.25, 2018, 66-73

山田佳之 . 鶏卵による消化管アレルギー . ドクターサロン, 査読無, 62巻, 2018, 721-725

山田佳之 . 特別座談会 食物アレルギー診療の現状と課題 . Vita, 査読無, 35巻, 2018, 1-24

山田佳之 . 新生児・乳児消化管アレルギー: 病因および疾病分類 . 周産期医学 赤ちゃんとお母さんのためのアレルギー読本, 査読無, 48巻, 2018, 575-578

山田佳之, 西明 . 好酸球性食道炎の診断と治療 先天性食道狭窄およびその術後狭窄に続発した好酸球性食道炎の1例 . 胃と腸, 査読無, 第53巻第3号, 2018, 343-346

Sato M, Shoda T, Shimizu S, 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., 査読有, 5, 2017, 1639-1649, DOI: 10.1016/j.jaip.2017.03.030

山田佳之 . 新生児・乳児消化管アレルギー 内科的治療 特集: 新生児・乳児消化管アレルギー . 小児外科, 査読無, 49巻, 2017, 657-660

山田佳之 . 消化管アレルギーとその関連疾患 特集: 食物アレルギー診療ガイドライン 2016 . 喘息・アレルギー, 査読無, Vol.30, 2017, 180-184

Suzuki K, Kato M, Matsuda S, Nukag M, Enseki M, Tabata H, Hirai K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Mochizuki H. IP-10 is elevated in virus-induced acute exacerbations in childhood asthma. Tokai J Exp Clin Med., 査読有, 41, 2016, 210-217

山田佳之 . 【消化管アレルギー】消化管アレルギーの分類と鑑別 好酸球性食道炎 . 小児内科, 査読無, 48巻, 2016, 1292-1296

山田佳之 . 【好酸球と消化管障害-その分子機構にせまる】 幼児・小児の好酸球性消化管疾患の分子機構 . G.I.Research, 査読無, 24巻, 2016, 187-192

山田佳之 . 知っておきたい最新のアレルギー・免疫学用語 Eotaxin-1 . 日本小児アレルギー学会誌, 査読無, 30巻, 2016, 212-213

山田佳之 . 知っておきたい最新のアレルギー・免疫学用語 Eotaxin-3 . 日本小児アレルギー学会誌, 査読無, 30巻, 2016, 214-215

① 山田佳之 . その他の食物アレルギー関連疾患(消化管アレルギーを含む) . 食物アレルギー研究会会誌, 査読無, Vol.16, 2016, 79-85

② 山田佳之 . IgE に依存しない新生児・乳児の消化管アレルギー . Medical Tribune, 査読無, 2016,7

〔学会発表〕(計32件)

Yamada Y. Eosinophilic Gastroenteritis That Remitted and Maintained in the Absence of Lo

ng-term Systemic Steroids and/or Elimination of Multiple Foods. 2019 AAAAI Annual Meeting, 2019

清水真理子、島袋美起子、清水彰彦、山田佳之。複数の食物を原因とした新生児・乳児食物蛋白誘発胃腸症の1例。第1回日本小児アレルギー学会関東地方会、2019

山田佳之。新生児・乳児消化管アレルギー。第12回相模原臨床アレルギーセミナー(招待講演)、2018

山田佳之。新生児・乳児消化管アレルギー・好酸球性消化管疾患。第5回総合アレルギー講習会(招待講演)、2018

関根涼太、吉原彬文、近藤康人、須永芳幸、山田佳之、高井まどか。3次元マイクロファイバーシステムを用いた細胞捕捉におけるマーカー分子の発現量の寄与。化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会、2018

吉原彬文、山崎裕一、山田佳之、高井まどか。白血病細胞の選択的回収を目指した多機能ペプチドの設計。第67回高分子学会年次大会、2018

山田佳之、鎌 裕一、清水真理子、西 明、加藤政彦。軽症の小児好酸球性胃腸炎の検討(ミニシンポジウム)。第67回日本アレルギー学会学術大会、2018

山田佳之。非IgE依存性消化管アレルギー研究のまとめと新たな展開 新生児・乳児食物蛋白誘発胃腸症(炎) Minds 準拠ガイドラインの作成経過。第55回日本小児アレルギー学会学術大会、2018

Sekine R, Yoshihara A, Kondo Y, Sunaga Y, Yamada Y, Takai M. The development of cell-capture and -release device for leukemia prognosis improvement. 第28回日本MRS年次大会、2018

山田佳之、磯田有香、西 明、鎌 裕一、清水真理子、神保裕子、加藤政彦。好酸球性胃腸炎に対する経験的多種食物抗原除去療法の効果。アレルギー・好酸球研究会 2018、2018

Watanabe S, Yamada Y. Expression of Th2-associate Surface Makers on T cells in Allergic Disorders. 2018 AAAAI Annual Meeting (国際学会)、2018

Yamada Y, Nishi A, Kato M. Eosinophilic Gastroenteritis Associated with Hirschsprung's Disease and It's Allied Disorders. 10th Biennial Symposium of International Eosinophil Society (国際学会)、2017

山田佳之、西 明、鎌 裕一、清水真理子、加藤政彦。当院における小児の食道好酸球増多患者の特徴の推移。第66回日本アレルギー学会学術大会、2017

山田佳之。新生児・乳児消化管アレルギー。第11回相模原臨床アレルギーセミナー(招待講演)、2017

山田佳之、鎌 裕一、高澤慎也、清水真理子、西 明。好酸球性胃腸炎としての治療が奏効したヒルシュスプルング病およびその類縁疾患の検討。第44回日本小児栄養消化器肝臓学会、2017

山田佳之、西 明、鎌 裕一、清水真理子、加藤政彦。先天性食道閉鎖(術後)・狭窄に関連した食道好酸球増多に対するプロトンポンプ阻害薬の反応性。アレルギー・好酸球研究会 2017、2017

山田佳之。小児の気管支喘息と好酸球性炎症。第8回 Airway Medicine 研究会(招待講演)、2017

渡部 悟、山田佳之。アレルギー性炎症性疾患でのケモカイン受容体発現の検討。第64回日本臨床検査医学会学術集会、2017

山田佳之、鎌 裕一、高澤慎也、清水真理子、西 明、加藤政彦。小児の続発性好酸球性消化管疾患の検討。第54回日本小児アレルギー学会学術大会、2017

山田佳之。食物アレルギー治療の最前線 消化管アレルギー。第54回日本小児アレルギー学会学術大会(招待講演)、2017

②① 山田佳之。消化管アレルギーと類縁疾患(新生児・乳児消化管アレルギー・好酸球性消化管疾患)。日本アレルギー学会第4回総合アレルギー講習会 ~ Total Allergist をめざして ~ (招待講演)、2017

②② 関根和彦、羽鳥麗子、山田佳之、西 明、龍城真衣子、五十嵐淑子、石毛 崇、友政 剛、荒川浩一。本邦小児における好酸球性食道炎の臨床的特徴。第120回日本小児科学会学術集会、2017

②③ 山田佳之。小児気管支喘息治療における最新の話。前橋市小児科医会講演会(招待講演)、2017

②④ Watanabe S, Yamada Y, Murakami H. Th2-related chemokine receptors do not always reflect Th2 cells under physiological conditions. 2017 AAAAI Annual Meeting (国際学会)、2017

②⑤ Kato M, Matsuda S, Suzuki K, Nukaga M, Enseki M, Tabata H, Hirai K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Mochizuki H. Viral detection and cytokine profile in early transient wheeze and childhood asthma. 2017 AAAAI Annual Meeting (国際学会)、2017

②⑥ 山田佳之、加藤政彦。好酸球性胃腸炎の経験的主要抗原除去療法での原因抗原の推定。第119回日本小児科学会学術集会、2016

②⑦ 山田佳之、加藤政彦、磯田有香、西 明、山本英輝、鈴木 完、神保裕子。好酸球性胃腸炎の初発時と寛解後での原因食物の検討。第65回日本アレルギー学会学術大会、2016

②⑧ 山田佳之、渡部 悟。小児好酸球性胃腸炎での治療効果判定指標の検討。第63回日本臨床検

- 査医学会学術集会, 2016
- ②9 関根和彦、羽鳥麗子、山田佳之、西 明、龍城真衣子、五十嵐淑子、石毛 崇、友政 剛、荒川浩一. 本邦小児における好酸球性消化管疾患と好酸球性食道炎の臨床的特徴. 第43回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2016
 - ③0 佐藤絵里子、山田佳之、鎌 裕一、清水真理子、加藤政彦. 新生児・乳児の非 IgE 型消化管アレルギーに対する負荷試験の検討. 第 53 回日本小児アレルギー学会, 2016
 - ③1 五十嵐淑子、羽鳥麗子、小泉武宣、石毛 崇、関根和彦、龍城真衣子、西 明、山田佳之、友政 剛、荒川浩一. 胃食道逆流症を合併し、診断に難渋した好酸球性食道炎の1例. 第53回日本小児アレルギー学会, 2016
 - ③2 山田佳之. 「小児アレルギーの実際と検査」. 第23回関東甲信支部・首都圏支部免疫血清検査研修会(招待講演), 2016

〔図書〕(計4件)

- 山田佳之. 協和企画、食物アレルギーハンドブック 2018、2018、6
- 山田佳之. 中山書店、新生児・乳児食物蛋白誘発胃腸症 小児コモン 60 疾患 実践的ガイドライン活用術、2018、5
- 山田佳之. 医歯薬出版、新生児・乳児消化管アレルギー 食物アレルギー[特殊型] 食物アレルギーの栄養食事指導の手引き 2017 準拠 食物アレルギーの栄養指導、2018、4
- 山田佳之. 協和企画、消化管アレルギーとその関連疾患 食物アレルギー診療ガイドライン 2016、2016、10

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：田口 智章

ローマ字氏名：Taguchi Tomoaki

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：20197247

研究分担者氏名：林 泰秀

ローマ字氏名：Hayashi Yasuhide

所属研究機関名：群馬県衛生環境研究所

部局名：研究企画係

職名：研究員

研究者番号(8桁)：30238133

研究分担者氏名：加藤 政彦

ローマ字氏名：Kato Masahiko

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：準教授

研究者番号(8桁)：30292593

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：西 明

ローマ字氏名：Akira Nishi

所属研究機関名：群馬県立小児医療センター

研究協力者氏名：渡部 悟

ローマ字氏名：Satoru Watanabe

所属研究機関名：国立成育医療研究センター