

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591529

研究課題名(和文) 臍帯由来間葉系細胞の遺伝子発現とエピジェネティクスのアレルギー疾患発症との関連

研究課題名(英文) Relationship between allergic diseases and gene expression and epigenetics of umbilical cord-derived cells

研究代表者

鈴木 洋一 (Yoichi, Suzuki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：80216457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： 出生コホートを形成し、臍帯の線維芽細胞、頬部の細菌定着等と対象者の1歳時の感作、アトピー性皮膚炎(AD)、喘鳴等との関連を調べ、アウトカムの予測に有用なマーカーの探索を行った。コホートには306例がエントリーされた。1歳までフォローアップされた参加者は235名となった。ADと診断された児は13.2%であった。

臍帯由来細胞にRSウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルスを感染させた場合の各種サイトカインの分泌量を検討した。ウイルスごとに異なった分泌パターンを示した。生後1ヶ月、6ヶ月時に児の頬部のブドウ菌の定着を調査したところ、6ヶ月時の定着のみがAD発症と有意に関連していた。

研究成果の概要(英文)： We have made a birth cohort to study relationship between several phenotypes of infants and sensitization, atopic dermatitis (AD), wheezing at one year of age. We cultured fibroblasts from cords of the newborns. We also investigated colonization of Staphylococcus aureus on cheeks of infants. Responses of cord-derived fibroblast to RS virus, Rhino virus, and parainfluenza virus showed a different cytokine excretion pattern. Colonization of Staphylococcus aureus at 6 months of age was significantly associated with AD development.

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：アレルギー アトピー性皮膚炎 臍帯 TSLP IL-33 IL-25 インターフェロン ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

我々の行った日本人小児、成人喘息に関わる遺伝子多型の研究(Undarmaa et al. J Hum Genet 2010)では、一般に個々の遺伝子多型の影響はオッズ比が 1.2~2.0 ほどとあまり大きく無いこと、各研究間の結果の差異が大きいことが明らかとなった。この原因として、CD14 遺伝子の多型のように、多型の影響が環境要因によって大きく変化することや、DNA やヒストンのメチル化といったエピジェネティックな変化がアレルギー疾患に関係することが考えられた。したがって、アレルギー疾患の発症のメカニズムの理解には、遺伝子多型のみではなく遺伝子発現に関連する DNA メチル化、ヒストンアセチル化、およびそれらに影響を与える環境因子を総合して解析する必要がある。しかし、そのような解析は現在まで国内外を通じてほとんど行われていなかった。

アレルギー疾患発症の要因となる遺伝因子と環境因子の真のリスクを評価するためには、妊娠期を含めた出生コホート研究が必須であり、私たちはその研究のためのリクルートを開始していた。このコホートでは、妊婦の採血、喫煙、栄養に関するアンケート、出産時以降では、母乳、児より臍帯、臍帯血等のサンプリングを行い、1 歳と 2 歳時点での、感作状態、アトピー性皮膚炎、喘息等の発症状況を調査する予定であった。

出生直後の子供の体質とその後のアレルギー疾患の発症との関連の研究では、従来から主として臍帯血単核球を用いた解析が行われているが、アレルギー疾患の発症には臓器を構築する内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞などの非免疫系細胞の役割も大きいと思われた。それらの細胞の機能変化が出産時から存在するのか生後の受動喫煙や感染などにより獲得されるのかは殆ど分っていなかった。

本研究では、出生直後の非血球系細胞の状況を把握するために、臍帯から分離した間葉系細胞について遺伝子の発現の差異やエピジェネティックな変化が母親の喫煙、食事習慣、アレルギーの状態から影響を受けるかどうかと、同細胞の表現型がその後の児のアトピーの進展、アレルギー疾患の発症へ影響するかどうかを関連解析から推定することを目的とした。遺伝子発現に影響を与えるヒストンの修飾としては、メチル化、アセチル化、リン酸化が良く知られているが、ピオチン化の関与も最近報告されていた。ホロカルボキシラーゼ合成酵素(HLCS)が、H3 ヒストンの 9 番目と 18 番目リジン残基をピオチン化することが示唆されていた。H3 の 9 番目のリジンはアセチル化やメチル化が起こる残基であり、IL-4 遺伝子でのエピジェネティックな変化が認められている。ピオチン化もアレルギー疾患の発症に関与する可能性があると思われた。研究代表者は、HLCS の cDNA のクローニングを行い HLCS 欠損症の患者の分子遺伝学的研究を行ってきており、HLCS 欠損のリンパ芽球、同線維芽細胞を所有している。HLCS 欠損症や、ピオチン欠乏症が、免疫系細胞の分化、機能に関与しているという報告もあり、本遺伝子によるヒストンのピオ

チン化を介した遺伝子発現への影響を見ることは意義があると思われた。

2. 研究の目的

(1)臍帯から線維芽細胞様の間葉系細胞(臍帯由来間葉系細胞)を分離、培養し、非刺激時、ウイルス感染時、インターフェロン、サイトカイン、病原体関連分子パターンで刺激した場合の、自然免疫系や炎症性サイトカインの発現・分泌について解析する。それらと母親の要因との間に関連があるかどうかを検討する。

(2)臍帯間葉系細胞における(1)で調べた遺伝子の発現量、メチル化の状態と、児の 1 歳時点でのアウトカム(アトピー、アトピー性皮膚炎、喘息)と関連があるかどうかを検討する。

(3)臍帯間葉系細胞と正常ないし HLCS 欠損の線維芽細胞において、ヒストンのメチル化やピオチン化の状態を検討し、ヒストンのメチル化とピオチン化の相互関係と HLCS のヒストン修飾における役割の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)患者のリクルート

対象は、千葉大学附属病院と JFE 川鉄千葉病院にて出産する妊婦とその児である。400 例のエントリーを目指す。

(2)臍帯の採取

臍帯は、出生後 24 時間以内に研究室にて処理し、臍帯血を除き、一部から直接 DNA を精製し冷凍保存、一部は将来の RNA の解析に備えて RNA later に保存する。さらに臍帯を数ミリ画ほどに切り、培養シャーレに 10%牛血清を含む MEM 培地で数日から 2 週間培養し、 $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞となった所で液体窒素保存し解析に備える。

(3)アンケート調査

アンケートは妊娠後期、出産直後、1 ヶ月、4 ヶ月、1 歳、2 歳時に母親に対して行う。妊娠中のアンケートは、アレルギー疾患、その他の疾患の有無、喫煙、薬物の服用、ペットの飼育状況、食事、出産後は、児の栄養、保育所通園、本人と兄弟の感染症の罹患状況について把握する内容としている。

(4)採血

母親については、妊娠後期、児については 1 歳時に採血を行い、総 IgE 値を測定する。

(5)臍帯由来間葉系細胞における遺伝子発現解析

臍帯由来細胞における表面マーカーの検討を行う。病原体関連分子パターン(PAMPs)への反応を検討する。また、RS ウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザを感染させた場合の同様の解析を行う。ウイルス感染後 24 時間、48 時間後の培地を回収し、サイトカイン等を定量する。サイトカイン等のスクリーニングには、BioRad 社の BioPlex 等を使用する。

(6)DNA のメチル化の解析

臍帯由来細胞からゲノム DNA を一般的な方法で精製後、methylation-sensitive endonuclease restriction 法を用いて、遺伝子のメチ

ル化の状態を解析する。遺伝子の臍帯由来細胞における発現やメチル化状態と、母体の要因、アウトカムとの関連の解析を行う。

(7)ヒストンの修飾の解析

臍帯由来細胞をフォルムアミド処理後、核を回収し、ピオチン化ヒストン抗体、アセチル化ヒストン抗体、メチル化ヒストン抗体を用いた、クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイを行う。

(8)アウトカム

臨床的なアウトカムとしては、1歳時健診時に小児科医の診断によるアレルギー疾患の有無、血清特異IgE、5種類によるアトピー、総IgE値とする。IgE値の測定は外部に委託する。

4. 研究成果

コホートには306名がエントリーされた。1ヶ月の乳児検診では282名、6ヶ月に達した者277名、1歳までフォローアップされ解析対象となり得た参加者は235名となった。1歳時にアトピー性皮膚炎(AD)と診断された児は13.2%であった。203名の新生児からの臍帯由来細胞を保存することができた。

臍帯由来細胞の性状を検討すると、細胞マーカーから、繊維芽細胞が主体であることがわかった。当初計画には無かったが、より生理的な反応を見たいと考え、細胞へRSウイルス、ライノウイルス(RV)、パラインフルエンザ(PIV)を感染させた場合の、各種サイトカイン、ケモカインの測定を行うことにした。その結果、RVの刺激で、IL-25、TSLP、INF- γ が分泌され、PIVの刺激では、主にIL-33、IFN- γ 、IFN- β が分泌され、ウイルス種によって異なった分泌パターンを示した。RSVでは、調べたサイトカインの中で分泌促進されたものは無かった。IL-25の分泌は、細胞ラインごとの差が大きかった。

また、生後1ヶ月、6ヶ月時に児の頬部のブドウ菌の定着があるかどうかを調査し、1歳時におけるADの有無との関連を調べた。生後6ヶ月時に黄色ブドウ球菌の定着がなかった児122名のうち5.7%、定着があった児113名のうち21.2%がADと診断され、黄色ブドウ球菌の定着はADと関連を示した($P < 0.001$)。生後1ヶ月時のブドウ球菌の定着とADとの有意な関連は無かった。生後6か月の黄色ブドウ球菌定着は卵白感作と有意に関連した($P = 0.011$)。このことから、乳児期後半の皮膚のブドウ球菌の定着は、その後のADの発症へ影響を与えている可能性が示唆された。

ヒストンのピオチン化の解析を行っていたが、ピオチン化ヒストンは生理的現象と思われるがその量は非常にわずかであるとの実験結果が発表された。疾患との関連、ヒストンの他の修飾との関連の可能性も低いことが推定されたため、詳しい解析は行わないこととした。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

1. Ozawa N, Shimojo N, Suzuki Y, Ochiai S, Nakano T, Morita Y, Inoue Y, Arima T, Suzuki S & Kohno Y. Maternal intake of

Natto, a Japan's traditional fermented soybean food, during pregnancy and the risk of eczema in Japanese babies. *Allergol Int* 63: 261-266, 2014. 査読有り

2. Takeuchi K, Mashimo Y, Shimojo N, Arima T, Inoue Y, Morita Y, Sato K, Suzuki S, Nishimuta T, Watanabe H, Hoshioka A, Tomiita M, Yamaide A, Watanabe M, Okamoto Y, Kohno Y, Hata A & Suzuki Y. Functional variants in the thromboxane A2 receptor gene are associated with lung function in childhood-onset asthma. *Clin Exp Allergy* 43: 413-24, 2013. 査読有り
3. Yamaide F, Undarmaa S, Mashimo Y, Shimojo N, Arima T, Morita Y, Hirota T, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Sato K, Suzuki S, Nishimuta T, Watanabe H, Hoshioka A, Tomiita M, Yamaide A, Watanabe M, Okamoto Y, Kohno Y, Tamari M, Hata A & Suzuki Y. Association study of matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and asthma in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 160: 287-96, 2012. 査読有り
4. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Horiguchi S, Shimojo N, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A & Suzuki Y. Association of the MMP9 gene with childhood cedar pollen sensitization and pollinosis. *J Hum Genet* 57: 176-83, 2012. 査読有り

(学会発表)(計7件)

1. 井上祐三朗, 鈴木洋一, 下条直樹他 小児期発症気管支喘息のクラスター解析によるフェノタイプ調査 第63回小児アレルギー学会 2013年11月28日 東京都
2. 鈴木洋一 ビタミンと臨床 Up-Date ピオチン(シンポジウム) 第65回ビタミン学会 2012年5月17日 東京都
3. 鈴木洋一, 下条直樹他 小学生の血清ピオチン値とアレルギー感作、スギ花粉症との関連 第64回ビタミン学会 2012年6月22日 岐阜市
4. 山出史也, 鈴木洋一, 下条直樹他 日本人における喘息とマトリックスメタロプロテアーゼ7および12遺伝子多型との関連:日本人における症例対照研究 第56回日本人類遺伝学会 2011年11月12日 千葉市
5. 山出史也, 鈴木洋一, 下条直樹他 日本人における喘息とマトリックスメタロプロテアーゼ12遺伝子多型との関連 第48回日本小児アレルギー学会 2011年10月30日 福岡市
6. K Takeuchi, Y Suzuki, N Shimojo et al. The role of thromboxane A2 receptor gene polymorphisms in lung function and severity in childhood-onset asthma. The 12th

- International Congress of Human Genetics,
2011年10月14日 カナダ モントリオール
7. F Yamaide, Y Suzuki, N Shimojo et al.
Association of matrix metalloproteinase-7
and -12 gene polymorphisms with asthma: A
case-control study of MMP-7 and -12 in a
Japanese population. The 12th International
Congress of Human Genetics, 2011年10
月14日 カナダ モントリオール

(図書) (計2件)

1. 鈴木洋一 気管支喘息発症に関連する遺
伝子 in 「小児科レクチャー 子どもの気管
支喘息」 総合医学社 2014年, pp451-457
総ページ数 261
2. 鈴木洋一 体質と疾患 アレルギー性鼻炎
とアレルギー感作 in 「JOHNS」 東京医学
社 印刷中

(産業財産権)

出願状況(計0件)

(その他)

ホームページ等

アレルギー疾患の遺伝疫学ホームページ

http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/pubheal/allergy_genetics/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 洋一 (SUZUKI, YOICHI)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号: 80216457

(2)研究分担者

下条 直樹 (SHIMOJO, NAOKI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 40221303