

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791204
 研究課題名（和文） 自然免疫系、粘膜免疫系遺伝子を中心とした食物アレルギー関連遺伝子の探索
 研究課題名（英文） Exploring genetic susceptibility to food allergy in innate and mucosal immunity genes
 研究代表者
 広田 朝光 (HIROTA TOMOMITSU)
 独立行政法人理化学研究所・呼吸器疾患研究チーム・研究員
 研究者番号：50435674

研究成果の概要（和文）：

近年になり日本において、食物アレルギーは有病率が年々増加している。本研究は、食物アレルギーに関する病態機構の解明を試み、食物アレルギー群 600 検体、対照群 1900 検体を用いて患者・対照群関連解析を行った。その結果、IL13 遺伝子上の SNP において、食物アレルギーの発症と有意な関連が認められた (p value < 0.01)。また、サブグループ解析を行ったところ、気管支喘息合併、アトピー性皮膚炎合併食物アレルギーのそれぞれのグループでサブグループ化する前の関連より強い関連を示した。

研究成果の概要（英文）：

The prevalence of food allergy has increased over the past two decades in Japan. To elucidate the pathological mechanisms underlying food allergy, we conducted case-control studies using 600 food allergy patients and 1900 controls. As a result, we identified a significant association between a SNP of IL13 gene and food allergy ($p < 0.01$). In subgroup analysis, the association between the SNP of IL13 and food allergy was enhanced in subgroups patients with bronchial asthma and with atopic dermatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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：食物アレルギー、関連遺伝子、自然免疫、粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国の食物アレルギーの乳幼児における有病率は約 10% に達すると報告されており、年々増加傾向にある。一部の症例ではその後、アトピー性皮膚炎、気管支喘息やアレルギー性鼻炎への進展をきたし、アレルギーマーチと言われる病態を形成する。多臓

器に症状が現れ、時に血圧低下などのショック症状を引き起こす食物誘発アナフィラキシーも年々増加傾向にある。食物アレルギーおよび食物アナフィラキシーの発症や重症化の要因を探り、その予防や治療への対策を講ずることは急務である。

また、近年のゲノム解析技術の進歩は著し

く、遺伝子多型を利用した分子遺伝学的手法により数多くの多因子疾患で疾患関連遺伝子が報告され、その病態が明らかになりつつある。しかしながら、食物アレルギーに関する遺伝学的解析の報告は国内外問わず十分とは言えず、複数の集団や人種で検証された信頼性の高い関連遺伝子の報告は、同じアレルギー疾患である気管支喘息やアトピー性皮膚炎と比べ極めて少ない。

2. 研究の目的

本研究では分子遺伝学的手法を用いて食物アレルギーの遺伝学的解析を行い、その病態機構の解明を試みることを目的とする。

症例対照関連解析をより信頼性の高いものにするために、十分なサンプルサイズ、または複数の集団での検証を用いて関連遺伝子の検証を試みる。

食物アレルギーは、アトピー性皮膚炎や気管支喘息の発症などアレルギーマーチにおける第一段階である。本研究で得られた知見により、この部分を積極的に予防または治療を行いアレルギー疾患の多重罹患を防ぐことによって、アレルギー治療に要する莫大な医療費の削減につなげることが可能となれば、その医療経済学的効果は大きいといえる。

3. 研究の方法

既収集済みの食物アレルギー患者 500 検体、健常対照群 250 検体、および継続して収集を行った追加収集検体を用いて、食物アレルギー関連遺伝子を自然免疫系、粘膜免疫系遺伝子を中心に候補遺伝子アプローチにて探索を行った。

食物アレルギー患者の詳細な臨床情報(発症年齢、血清総 IgE 値、感作抗原の種類、合併症、アナフィラキシーの既往の有無など)も使用可能である。

また、統計解析上、より大きな検定力を発揮するため、サンプルサイズ(検体数)の増大を試みた。

(1) 検体収集、全血からの DNA 抽出

DNA サンプルは全血を凍結した状態にて収集を行い、これを QIAamp DNA Blood Midi(全血 2ml まで)または Maxi(全血 10ml まで) kit (QIAGEN 社)を用いて、DNA 抽出を行った。

(2) 遺伝子多型の抽出、連鎖不平衡地図の作成及び代表的遺伝子多型の選出

公共データベースである 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>)や International HapMap Project (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>)により候補遺伝子に関する日本人の Genotype の結

果を取得し、連鎖不平衡 Map の作製、Genotype を行うべき TagSNP の選出を行った。

また、1000Genomes や International HapMap Project において遺伝子多型の情報が充実していない遺伝子に関しては、日本人 12 人のゲノム DNA を用いてダイレクトシーケンシング(Life Technologies 社)を行い遺伝子多型の情報を収集した。

(3) Genotyping と関連解析

既収集の食物アレルギー患者 500 検体、健常対象群 250 検体、および継続して収集を行った検体を合わせ最終的に、食物アレルギー群 600 検体、対照群 1900 検体用いて患者・対照群関連解析、ハプロタイプ解析を行った。TaqMan PCR 法(Life Technologies 社)、Invader 法(Third Wave Technologies 社)による Genotyping を第一選択とし、Primer, Probe set を設計できない場合は、PCR-RFLP 法や PCR-Direct sequence 法などの手法を用いた。

食物アレルギーの検体は、詳細な臨床情報とともに収集されており、表現型を絞り込んだ(発症年齢、血清総 IgE 値、感作抗原の種類、合併症、アナフィラキシーの既往の有無など)サブグループ解析の検討も行った。

4. 研究成果

(1) 検体収集

遺伝学的な解析の信頼性をより高めるため、食物アレルギー患者約 100 検体の血液の追加収集を行い、また、これらの全血からの DNA の抽出を行った。その結果、食物アレルギーの DNA 検体数は、合計で約 600 となった。また非疾患対照群の対象年齢の拡張を行い、これまでの 250 検体から 1900 検体にサンプルサイズを増大させた。

(2) 候補遺伝子アプローチによる関連解析

自然免疫系、粘膜免疫系遺伝子群を中心とした候補遺伝子アプローチ(TSLP, IL33, IL1 gene cluster など)に加え、食物アレルギー以外のアレルギー疾患における GWAS による候補領域(ORMDL3, HLA 領域, C11orf30, IL6R, NLRP10, CARD11, ZNF365, CCDC80, CYP24A1 など)についての検討も行った。

その結果として、IL13 遺伝子上の SNP において、食物アレルギーの発症と有意な関連が認められた(p value<0.01)。更に種々の臨床情報を用いて、サブグループ解析を行ったところ、サブグループ化によるサンプル数の減少にも関わらず、気管支喘息合併、アトピー性皮膚炎合併食物アレルギーのそれぞれのグループでサブグループ化する前の関連に比べ、より強い関連を示した(p value<0.001)。

(3) IL13 遺伝子領域の連鎖不平衡地図の作成:

IL13 遺伝子領域の遺伝子多型情報について、日本人 12 検体を用いたリシークエンスの結果と 1000 Genomes の情報を用いて連鎖不平衡地図を作成した。

その結果として、前述の食物アレルギーと関連を認めたマーカー SNP と強い連鎖不平衡にあり、食物アレルギーの病態機構に機能的に関与している可能性の強い候補 SNP が絞り込まれた。

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 8 件)

① Tamari Mayumi, Shota Tanaka, Tomomitsu Hirota,
Genome-wide association studies of allergic diseases, *Allergology International*, [査読有り], 62 巻、2013、21-28

② Chang WC, Lee CH, Hirota T. et al. (1 番目/24 人)
ORAI1 Genetic Polymorphisms Associated with the Susceptibility of Atopic Dermatitis in Japanese and Taiwanese Populations, *PLoS One*, [査読有り], 7 巻、e29387、2012

③ Hirota T, Takahashi A, Kubo M, et al. (1 番目/30 人)
Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nature Genetics*, [査読有り], 44 巻、1222-1226、2012

④ 広田朝光、田中翔太、角大治朗、玉利真由美
アレルギーをめぐるトレンド ここが知りたい アレルギーの遺伝子解析入門、*皮膚アレルギーフロンティア*, [査読無し], 10 巻 3 号、2012、192-194

⑤ 広田朝光、富田かおり、玉利真由美
食物アレルギーの遺伝子多型 (特集 食物アレルギー研究の新たな展開)、*臨床免疫・アレルギー科*, [査読無し], 55 巻、2011、629-635

⑥ 広田朝光、富田かおり、玉利真由美
食物アレルギーのゲノム解析の現況 (特集 アトピー性疾患のゲノム研究 アップデート)、*アレルギー・免疫*, [査読無し], 18 巻

9 号、2011、56-62

⑦ 広田朝光、田中翔太、玉利真由美
解説 (基礎) GWAS による疾患遺伝子の解明、*呼吸*, [査読無し], 31 巻 7 号、2011、605-611

⑧ Hirota T, Saeki H, Tomita K, et al. (1 番目/25 人)
Variants of C-C Motif Chemokine 22 (CCL22) Are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies, *PLoS One*, [査読有り], 6 巻、e26987、2011

[学会発表] (計 3 件)

① 広田朝光、シンポジウム 3 アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析の現況、*日本アレルギー学会秋季学術大会*、平成 24 年 11 月 29 日、大阪国際会議場

② Tomomitsu Hirota, A variant of filaggrin (FLG) are associated with susceptibility to food allergy in the Japanese population. *The American Society of Human Genetics*, Nov 9, 2012, Moscone Center, San Francisco, USA

③ 広田朝光、P-28 Filaggrin (FLG) 遺伝子の変異と日本人食物アレルギー患者における関連解析、*日本人類遺伝学会*、平成 24 年 10 月 25 日、京王プラザホテル(東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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

広田 朝光 (HIROTA TOMOMITSU)

独立行政法人理化学研究所・呼吸器疾患研究

チーム・研究員

研究者番号：5 0 4 3 5 6 7 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし