

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590745

研究課題名(和文) 小児喘息患者におけるゲノムDNAメチル化異常の実態調査

研究課題名(英文) Survey of genomic DNA methylation abnormalities in pediatric asthma patients.

研究代表者

堺 温哉 (SAKAI, Haruya)

信州大学・医学部・委嘱講師

研究者番号：20303555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大気環境がより汚染されている地域(東京)と、汚染が少ない地域(伊那)、両者の中間地域(甲府)の3地域での、喘息児と非喘息児のFoxp3およびAlu-1でのメチル化状態を調査した。Foxp3は東京地域で一部のCpG siteで喘息群のメチル化頻度がコントロール群と比較して有意に低下し、甲府地域では有意に上昇していた。伊那地域では有意差がなかった。一部のCpG siteでは、3地域間に有意な差がみられた。Alu-1は、東京地域では喘息群が一部のCpG siteで有意に上昇し、一部のCpG siteでは有意に低下した。甲府地域と伊那地域では、喘息群とコントロール群間に有意な差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Asthma is the most frequent disease among children, and its pathogenesis is thought due to genetic factor and environmental factor. We researched about DNA methylation of Forkhead box transcription factor3 (Foxp3), transcription factor in Treg cell and Alu-1, index of global DNA methylation in three regions (Tokyo, Kofu, Ina). In Tokyo, DNA methylation of Foxp3 among the asthma children was decreased, but in Kofu, it was increased significantly. In Ina, there was no significant difference between the asthma children and control. There was a significant difference of DNA methylation of Foxp3 between the three regions. In Tokyo, DNA methylation of Alu-1 among the asthma children was decreased in one part and increased in the other part significantly. In Kofu and Ina, there was no significant difference between the asthma children and control. There was a significant difference of DNA methylation of Alu-1 between the three regions.

研究分野：環境疫学

キーワード：環境 アレルギー 喘息 ゲノム 大気汚染

1. 研究開始当初の背景

小児の喘息患者は近年増加傾向にあり、その原因は遺伝的な要因だけでは説明することができない。環状要因の関与が推測されるが、詳細は全く不明である。増加傾向を止めるためにも、早急に原因を明らかにする必要がある。

アメリカ合衆国の2か所の都市を対象に行った調査では(Nadeau et al, 2010)、大気環境の汚染地域に居住する小児の喘息患者は、制御性 T 細胞 (Treg) の Forkhead box transcription factor3 (Foxp3) プロモーター領域およびイントロン領域が高メチル化状態にあることが報告された。汚染物質の曝露により Foxp3 が高メチル化されたことによって Treg 機能抑制、異常免疫の継続が全色発症の要因の一つであると報告された。

また、アメリカ合衆国や韓国などの住宅域に居住する一般人(Baccarelli et al, 2009; Pavanello et al, 2009; Kim et al 2010)、北極圏に居住するイヌイトにおいて(Rusiecki et al, 2008)、汚染物質のばく露によるゲノム DNA (gDNA) のグローバルな低メチル化状態が報告された。これらの報告には、メチル化異常と疾患との関連性については明らかにされていないが、gDNA のグローバルな低メチル化状態は、様々な炎症性サイトカインやケモカインの産生増加、および自己免疫疾患への関与が推測される(Wilson et al, 2007)。これまで gDNA メチル化異常と喘息発症の関連については、前出した Foxp3 に関する1報告しかない。さらに喘息患者における遺伝子特異的なメチル化異常とグローバルなメチル化異常を総合的に調査した例は、国内はもとより海外においても皆無である。

2. 研究の目的

環境汚染物質の曝露によりゲノム DNA のメチル化異常が発生し、これに伴う免疫細胞の機能異常、サイトカインおよびケモカインの生産異常が喘息発症に関与すると仮説を立てた。小児喘息患者における gDNA のメチル化異常の実態と大気汚染との関連性を明らかにすることを目的とする。

(1) 小児喘息患者と一般対象コントロールにおける gDNA のメチル化状態を比較し、小児喘息患者のメチル化異常の実態を調査する。
(2) 交通量が多いなど大気環境がより汚染されている地域と、それより汚染がされていない地域、両者の中間地域の3地域を対象とする。各地域の病院の小児科に小児喘息で受診をした罹患グループ、ならびに非喘息罹患児グループの合計6グループを調査対象とし比較検討することで、大気環境の汚染と喘息発症の因果関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 調査対象

2015年1月に国立成育医療研究センター病院(東京都世田谷区)、2015年4月から6月

に市立甲府病院(山梨県甲府市)、2015年1月から5月に伊那中央病院(長野県伊那市)を受診した、気管支喘息と臨床的に診断されている15歳以下の小児および、年齢を一致させた対照者(コントロール)。

コントロールとしては15歳以下の者で、以下の患者は除いた。

慢性および急性の炎症性疾患(感染症、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、炎症性腸疾患、腎炎など)、血液および免疫疾患、皮膚ステロイド剤を含む免疫抑制療法中の患者。

児および保護者に本研究について文書によるインフォームドコンセントを行い、同意、署名が取得できた児を対象とした。

(2) 調査方法

頬粘膜細胞検体の採取と対象児情報の取得

前述の3病院にて頬粘膜細胞の採取を行った。サンプル採取前の30分間に飲食しなかったことを確認した。採取者は手袋を装着後、対象児の左右両方の頬粘膜をオムニスワブ(Whatman社)の先端のパット部分で擦過し、頬粘膜細胞を採取した(1人2本)。採取後2時間常温で乾燥させた後、パット部分を滅菌済みのマイクロチューブに入れ、gDNA抽出まで-30℃で冷凍保存した。また、対象児についての以下の情報を聴取した。年齢、性別、居住地域、内服の有無、喘息児は合併症や罹患年数、コントロール児は原疾患など。

頬粘膜細胞サンプルからの gDNA 抽出
昭和大学医学部衛生学公衆衛生学講座の協力にて、gDNA を抽出した。抽出には QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen 社) を用い、抽出方法はマニュアルに従った。

メチル化頻度解析

抽出した gDNA に Bisulfite 処理を行った。処理には EpiTect Plus Bisulfite Kits (Qiagen 社) を使用した。これにより、非メチル化シトシンはウラシルに変化するが、メチル化シトシンは変化しない。

次に、Foxp3 のプロモーター領域の2領域の CpG 部位と、ゲノム全体に存在するリピート配列で通常は高度にメチル化されている領域である Alu-1 の CpG 部位について、以下のパイロシークエンス法を用いてメチル化頻度を解析した。メチル化・非メチル化シトシンを含む領域を共通プライマーを用いて PCR で増幅し、この領域の塩基配列をパイロシークエンサーを用いて決定した。メチル化シトシンはそのままシトシンとして、非メチル化シトシンはチミンとして検出され、パイロシークエンサーにてその混合割合を数値化した。

対象児のデータベース登録を行った。

上記とのデータを用い、統計解析を行った。

(3) 統計解析

大気環境がより汚染されている地域(東京)

と、それより汚染がされていない地域(伊那)、両者の中間地域(甲府)の3地域での、喘息児および非喘息児の2群間を比較した。2群間比較には、Mann-WhitneyのU検定を用いた。3地域間の比較にはKruskal-Wallis検定を用いた。全ての統計解析は、有意確率5%未満を有意とした。統計ソフトはIBM SPSS Statistics 23を使用した。

(4)倫理的配慮

対象児および保護者に本研究についてインフォームドコンセントを行い、同意、署名を取得した。本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て実施した。また、協力医療機関である、国立成育医療研究センター病院、市立甲府病院、伊那中央病院の倫理委員会承認も得た。

4. 研究成果

(1)対象児の概要

表1. 対象児の内訳

n	喘息群			コントロール群		
	男児	女児	合計	男児	女児	合計
東京	22	10	32	9	13	22
甲府	14	4	18	8	6	14
伊那	13	7	20	9	6	15
計	49	21	70	26	25	51

喘息群は東京で32名、甲府で18名、伊那で20名の計70名、コントロール群は東京で22名、甲府で14名、伊那で15名の計51名であった(表1)。

表2. 対象者の年齢

	喘息群	コントロール群
東京	8歳9か月±3歳2か月	6歳1か月±4歳4か月
甲府	8歳3か月±3歳5か月	7歳1か月±5歳4か月
伊那	7歳10か月±4歳7か月	3歳10か月±3歳9か月
平均±標準偏差	8歳5か月±3歳8か月	5歳8か月±4歳7か月

対象者の年齢は、喘息群で8歳5か月±3歳8か月、コントロール群で5歳8か月±4歳7か月であった(表2)。

表3. 喘息群の平均罹患年数と治療の有無

	平均罹患年数(年)	治療なし n(%)	治療あり n(%)
東京	5.6	4(12.5%)	28(87.5%)
甲府	5.9	1(5.6%)	17(94.4%)
伊那	5.2	0(0%)	20(100%)
計	5.5	5(7.1%)	65(92.9%)

喘息群の平均罹患年数は5.5年であった。検体採取時に治療を受けていた児は92.9%、無治療の児は7.1%であった(表3)。

表4. 喘息群の重症度

n(%)	間欠型	軽症持続型	中等症持続型	重症持続型	最重症持続型	計
東京	9(28.1%)	12(37.5%)	8(25.0%)	2(6.3%)	1(3.1%)	32
甲府	8(44.4%)	7(38.9%)	3(16.7%)	0(0%)	0(0%)	18
伊那	16(80.0%)	4(20.0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	20
計	33(47.1%)	23(32.9%)	11(15.7%)	2(2.9%)	1(1.4%)	70

喘息群での検体採取時の重症度は、発作間欠型が47.1%、軽症持続型が32.9%、中等症持続型が15.7%、重症持続型が2.9%、最重症持続型が1.4%であった(表4)。

表5. 喘息群の治療状況

n(%)	半年以内にステロイド静注施行	吸入ステロイド	ロイコトリエン拮抗薬内服
東京	1(3.1%)	19(59.3%)	23(71.9%)
甲府	0(0%)	11(61.1%)	17(94.4%)
伊那	3(15.0%)	5(25.0%)	14(70.0%)
計	4(5.7%)	35(50.0%)	54(77.1%)

複数治療の併用例あり

n(%)	抗アレルギー薬内服	経口ステロイド薬内服	テオフィリン徐放製剤内服
東京	10(31.2%)	0(0%)	0(0%)
甲府	7(38.9%)	0(0%)	2(11.1%)
伊那	9(45.0%)	0(0%)	2(10.0%)
計	26(37.1%)	0(0%)	4(5.7%)

n(%)	2刺激薬内服	2刺激薬貼付	2刺激薬吸入	計
東京	0(0%)	0(0%)	3(9.4%)	3
甲府	1(5.6%)	2(11.1%)	2(11.1%)	5
伊那	0(0%)	8(40.0%)	3(15.0%)	11
計	1(1.4%)	10(14.3%)	8(11.4%)	19

検体採取時の喘息児の治療状況をまとめた。半年以内にステロイド剤の静注を受けた児は5.7%、吸入ステロイド施行児は50.0%、ロイコトリエン拮抗剤内服児は77.1%、抗アレルギー薬内服児は37.1%、経口ステロイド薬内服児は0%、テオフィリン徐放製剤内服児は5.7%、β2刺激薬の内服児は1.4%、β2刺激薬貼付児は14.3%、β2刺激薬吸入児は11.4%であった(表5)。

表6. コントロール群の内服状況

n(%)	内服なし	内服あり	計
東京	19(86.4%)	3(13.6%)	22
甲府	11(78.6%)	3(21.4%)	14
伊那	10(66.7%)	5(33.3%)	15
計	40(78.4%)	11(21.6%)	51

コントロール群で内服をしていた児は21.6%、内服をしていなかった児は78.4%であった(表6)。

(2)喘息児とコントロール児のメチル化頻度

Foxp3のprimer set1では両群間に有意な差はみられなかったが、primer set2では、東京地域の喘息群とコントロール群を比較すると、CpG site1~5すべてで喘息群のメチル化頻度が有意に低下していた。また、CpG site4で、甲府地域の喘息群がコントロール群と比較してメチル化頻度が有意に上昇していた。伊那地域ではいずれのCpG siteでも喘息群とコントロール群間に有意な差は見られなかった。

Alu-1のメチル化頻度は、東京地域でのCpG site1とCpG site3で喘息群が有意に上昇し、CpG site2で喘息群が有意に低下していた。甲府地域と伊那地域では、喘息群とコントロール群間に有意な差はみられなかった(表7)。

表 7. 喘息群とコントロール群の各 site のメチル化頻度

	喘息群	コントロール群	p値
Foxp3			
primer set1			
CpG site 1			
東京	58.6 ± 13.3	60.6 ± 6.3	0.846
甲府	63.1 ± 15.8	60.4 ± 18.6	0.694
伊那	68.6 ± 10.9	65.7 ± 16.1	0.831
CpG site 2			
東京	55.8 ± 12.2	58.6 ± 3.9	0.902
甲府	53.9 ± 12.7	56.3 ± 16.7	0.156
伊那	59.3 ± 8.0	57.9 ± 9.2	0.856
CpG site 3			
東京	74.2 ± 15.5	79.2 ± 4.7	0.902
甲府	68.6 ± 17.7	73.4 ± 20.9	0.071
伊那	77.9 ± 10.2	74.2 ± 12.6	0.587
primer set2			
CpG site 1			
東京	80.2 ± 14.2	88.3 ± 3.8	0.008 *
甲府	89.1 ± 3.5	86.4 ± 20.7	0.107
伊那	89.1 ± 10.9	90.3 ± 3.5	0.499
CpG site 2			
東京	83.4 ± 17.2	94.3 ± 4.2	0.000 *
甲府	95.8 ± 3.8	90.6 ± 22.7	0.779
伊那	94.7 ± 12.2	94.3 ± 4.5	0.080
CpG site 3			
東京	78.1 ± 13.3	86.2 ± 3.9	0.002 *
甲府	88.7 ± 2.8	83.3 ± 20.7	0.808
伊那	86.1 ± 10.7	87.2 ± 3.8	0.587
CpG site 4			
東京	71.8 ± 12.3	78.8 ± 3.4	0.024 *
甲府	85.9 ± 5.2	76.2 ± 18.7	0.003 *
伊那	82.0 ± 14.7	83.1 ± 5.8	0.240
CpG site 5			
東京	70.2 ± 11.2	76.1 ± 4.2	0.026 *
甲府	78.3 ± 3.4	74.6 ± 18.0	0.639
伊那	73.9 ± 13.9	76.7 ± 9.3	0.542
Alu-1			
CpG site 1			
東京	70.8 ± 3.8	63.4 ± 2.7	0.033 *
甲府	72.8 ± 2.6	71.9 ± 3.7	0.398
伊那	70.6 ± 4.2	73.3 ± 3.7	0.039 *
CpG site 2			
東京	53.8 ± 3.5	54.0 ± 2.6	0.000 *
甲府	56.7 ± 5.3	56.8 ± 2.1	0.750
伊那	55.2 ± 2.4	57.9 ± 4.2	0.093
CpG site 3			
東京	47.9 ± 1.6	46.8 ± 1.1	0.009 *
甲府	48.6 ± 3.8	47.5 ± 2.2	0.536
伊那	48.4 ± 2.0	48.1 ± 2.4	0.780

平均 ± 標準偏差

単位は%

(3)喘息児の3地域での比較

各 CpG site について、喘息群、コントロール群それぞれにおいて、3つの地域間でのメチル化頻度について検討した。喘息群では、Foxp3 primer set 1 CpG site 1、primer set 2 CpG site 1~5、Alu-1 CpG site 1 にて3地域間に有意な差がみられた。

コントロール群では、Foxp3 primer set 2 CpG site 1,4、Alu-1 CpG site 1,2 にて3地域間に有意な差がみられた(表 8)。

表 8.喘息群とコントロール群における、3地域でのメチル化頻度比較

	喘息群 p値		コントロール群 p値	
Foxp3				
primer set1				
CpG site 1	0.013	*	0.327	
CpG site 2	0.256		0.388	
CpG site 3	0.177		0.565	
primer set2				
CpG site 1	0.000	*	0.042	*
CpG site 2	0.000	*	0.332	
CpG site 3	0.000	*	0.256	
CpG site 4	0.000	*	0.048	*
CpG site 5	0.000	*	0.113	
Alu-1				
CpG site 1	0.038	*	0.000	*
CpG site 2	0.101		0.004	*
CpG site 3	0.684		0.193	

Kruskal-Wallis検定

考察

東京地域では、Foxp3 の一部の CpG site で喘息群のメチル化頻度がコントロール群と比較して有意に低下していた。甲府地域では1か所の CpG site で喘息群がコントロール群と比較してメチル化頻度が有意に上昇していた。伊那地域ではいずれの CpG site でも喘息群とコントロール群間に有意な差は見られなかった。過去の報告では、小児の喘息患者は、Foxp3 プロモーター領域が高メチル化状態にあることが報告されたが、本研究では一部は喘息群の方が高メチル化状態であり、一部は低メチル化状態であった。伊那地域で差がみられなかった理由として、喘息児の重症度が低く、コントロール児とのメチル化頻度の差異がなかった可能性が考えられた。あるいは、環境汚染が少ない地域のため、喘息群であっても高メチル化状態とならなかった可能性が考えられた。

また、Foxp3 の各 CpG site について、喘息群の3地域の児、コントロール群の3地域の児のメチル化頻度について検討したところ、喘息群においても、コントロール群においても一部の CpG site で3地域間に有意な差がみられた。Foxp3 のメチル化頻度は、地域など環境によって影響される可能性が示唆された。

Alu-1 のメチル化頻度は、東京地域では一部の CpG site で喘息群が有意に上昇し、また一部の CpG site では喘息群が有意に低下していた。甲府地域と伊那地域では、喘息群とコントロール群間に有意な差はみられなかった。過去の報告では、グローバルなメチル化の指標である Alu-1 は、汚染物質の曝露により低メチル化されると報告された。今回の結果は、これに合致したものとしなかったものがあつた。また、3つの地域別に Alu-1 のメチル化頻度を比較検討したところ、一部の CpG site で有意な差がみられたことから、環境汚染物質の曝露が Alu-1 のメチル化頻度

に影響した可能性が示唆された。

今後、東京地域の喘息児の Foxp3 プロモーター領域の CpG site が低メチル化状態であった原因、3 地域での差異等、さらなる検討を重ねる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堺 温哉 (SAKAI, Haruya)

信州大学・医学部・委嘱講師

研究者番号：20303555

(2)研究分担者

日高 義彦 (HIDAKA, Yoshihiko)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：40624713

津田 洋子 (TSUDA, Yoko)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：80512904

塚原 照臣 (TSUKAHARA, Teruomi)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：50377652

稲葉 雄二 (INABA, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：30334890

野見山 哲生 (NOMIYAMA, Tetsuo)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：70286441

(3)連携研究者

三澤 由佳 (MISAWA, Yuka)

信州大学・医学部・助教(受託研究)

研究者番号：10738644