

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591585

研究課題名(和文)小児期における消化管粘膜免疫機構の解析と消化器疾患の病態の解明

研究課題名(英文) Investigation of pediatric mucosal immune system and pathogenesis of pediatric onset gastrointestinal diseases.

研究代表者

大塚 宜一(OHTSUKA, Yoshikazu)

順天堂大学・医学部・客員准教授

研究者番号：90338335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：新生児一過性好酸性腸炎(NTEC)、食物過敏性直腸炎(FPIP)、小児炎症性腸疾患の粘膜をMicroarray、RT-PCR、免疫組織染色法を用い解析した。NTEC、FPIPではCCL11、CXCL13の関与が、小児クローン病ではCXCL-9、-10、-11、小児潰瘍性大腸炎ではMMP-1, 3, 7, 10の関与が示唆された。両者で発現亢進が確認されたCXCL13は、B細胞を誘導するリンパ濾胞形成因子であり、新生児期からの食物に対するIgA産生や寛容誘導に深く関わっている。その発現亢進は、小児に欠かせない免疫応答であると考えられる一方、炎症増強に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the pathogenesis of pediatric onset gastrointestinal diseases, such as food protein-induced proctocolitis (FPIP), neonatal transient eosinophilic colitis (NTEC), Crohn's disease (CD), and ulcerative colitis (UC), we examined the mucosal expression of inflammatory signals using microarray, RT-PCR, and immunohistochemical analysis. Enhanced expression of IL-6, CCL11, and CXCL13 was confirmed in both NTEC and FPIP. Mucosal infiltration of CD3- and IgA- but not IgE-positive cells was confirmed in both. Studies with CD and UC revealed that the expression of CXCL9, 10, 11 and MMP-1, -3, -7, -10 was significantly enhanced in active phase of pediatric CD and UC, respectively. Meanwhile, enhanced expression of CXCL13 was confirmed among these diseases suggested that IgA synthesis targeting multiple antigens is an important task for the mucosal immune systems during infancy since CXCL13 is a chemokine related to lymphoid follicle formation leading to IgA synthesis.

研究分野：小児消化器病学

キーワード：食物アレルギー 新生児・乳児消化管アレルギー 炎症性腸疾患 クローン病 潰瘍性大腸炎 リンパ濾胞 CXCL13

1. 研究開始当初の背景

新生児および乳児期から幼児期は、消化機能、バリアー機能、腸内細菌叢の変化などともない、粘膜免疫機能にダイナミックな変化が起こっていると考えられる。消化管の粘膜免疫機構は、消化機能、粘膜上皮細胞(バリアー機能)、免疫機能が3本の柱となって営まれている。消化機能が未熟であれば抗原性のある蛋白質やペプチドをアミノ酸まで消化できず、免疫反応が誘導される。一方、十分消化されなかったペプチドは粘膜上皮細胞が有するバリアー機能により管腔内に排除される。それでも体内に侵入してしまったペプチドに対しては、免疫寛容が誘導され生体の恒常性を維持している。一方、遺伝的素因や腸内細菌叢がその営みを修飾し、より寛容を誘導しやすい環境を提供する場合もあれば、リンパ濾胞増殖症、消化管アレルギー、新生児壊死性腸炎、炎症性腸疾患などの発症に関与している可能性も示唆される。特に、新生児や乳児は、消化機能およびバリアー機能が未熟であり、ウイルス性腸炎に罹患することも多い。その結果、十分に消化されていない抗原となりうるペプチドが、粘膜内へ侵入し、抗原提示の増強、免疫細胞の活性化などを介し寛容が破綻しアレルギーや炎症反応などの過剰な免疫応答が誘導されやすい状態であると考えられるが、その詳細は未だ不明である。

2. 研究の目的

新生児から乳児期および学童期に認められるリンパ濾胞増殖症、新生児・乳児消化管アレルギー、食物過敏性腸症、潰瘍性大腸炎、クローン病などの小児消化器疾患および正常対照群を対象とし、各種シグナル分子の発現を Microarray 法、real-time RT-PCR 法、免疫組織染色法などにて比較検討し、それぞれの疾患の病態を解明するとともに、小児期消化器病の特性について検討した。

3. 研究の方法

新生児から学童期のリンパ濾胞増殖症、新生児・乳児消化管アレルギー、食物過敏性腸症、潰瘍性大腸炎、クローン病などすべての小児消化器疾患および正常対照群を対象とする。

(1) 上記疾患患児およびその両親に対しインフォームドコンセントを行い、研究への協力を要請する。

(2) 免疫・分子生物学的解析

消化管の粘膜検体を生検し、採取された消化管粘膜を RNAlater (Applied Biosystems) に入れ-30度で保存する。

組織標本から mRNA を抽出し、cDNA を作成した後、Microarray 法を用い、炎症性・抗炎症性シグナル分子の発現を多角的に捉える。

Real time RT-PCR 法を用い、Microarray 法

により強く関与が示唆された分子の発現を定量的に確認する。

(3) 組織学的検討

組織標本はホルマリン固定後、HE 染色を行い病理学的解析を行う。

一部は OCT コンパウンドに包埋後、凍結保存し免疫組織染色を行う。特に、Microarray 法により強く関与が示唆された分子の発現を免疫組織染色法にて検証する。

4. 研究成果

(1) 新生児期および乳児期における下部消化管出血の解析

背景：日常診療において、新生児期から乳児期に下部消化管出血をきたす児に遭遇することは少なくない。大腸粘膜に多く確認される好酸球の存在や、末梢血中に存在する抗原特異的に反応するリンパ球などが確認され、母乳やミルクに対する消化管アレルギーの関与が指摘されている。しかし、哺乳以外の栄養法が確立されていない新生児に対して、抗原特異性を確認することは難しく、その病態の詳細は未だ不明な点が多い。そこで、新生児期から乳児期に下部消化管出血を認めた食物過敏性直腸炎(FPIP: Food protein-induced proctocolitis)および新生児一過性好酸球性腸炎(NTEC: neonatal transient enterocolitis)症例を対象に、S状結腸におけるシグナル分子の発現を中心に検討した。

方法:2008年1月から2012年6月までに、新生児期・乳児期に下部消化管出血を来たし当院で入院加療を行った、FPIPおよびNTECと考えられた22人を対象に、その臨床像と発症後の経過を検討した。また、下部消化管内視鏡検査を施行し、S状結腸の生検組織を用いて免疫染色を施行、シグナル伝達分子の発現を Microarray 法にて網羅的に検討した。さらに発現の増強を確認したCXCL13およびCCL11(eotaxin-1)に対し、それらの発現を real-time RT-PCR 法を用い確認した。

結果：対象は、FPIP 13人(平均日齢 10.46 ± 19.26)、NTEC 9人(平均日齢 0)。両群において、末梢血白血球の上昇(12,685 ± 3,754/μl、30,978 ± 16,166/μl)および好酸球の上昇(1,084 ± 816/μl、4,456 ± 3,341/μl)を認めた。いずれも NTEC において有意に増加していた(図1)。

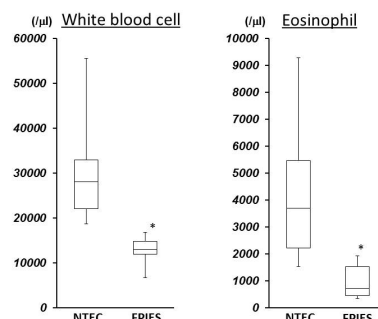


図1 NTECとFPIPにおける白血球数と好酸球数の比較. * $p < 0.05$

下部消化管内視鏡検査では、両群において、表層性の炎症・出血、リンパ濾胞の過形成を認めた。特に新生児期の症例（NTEC）に、より強い表層性の炎症所見を認めた一方、乳児期の症例（FPIP）に、より強いリンパ濾胞の過形成を認めた。粘膜の病理組織像では、好中球、リンパ球および好酸球の浸潤を認めた。特にNTECでより有意な好酸球浸潤を認めた。粘膜組織の免疫染色では、CD3陽性細胞とIgA陽性細胞を認めたが、IgE陽性細胞は認めなかった。リンパ濾胞の過形成を認めたFPIPの粘膜において、より多くのIgA陽性細胞を認めた（図2）。

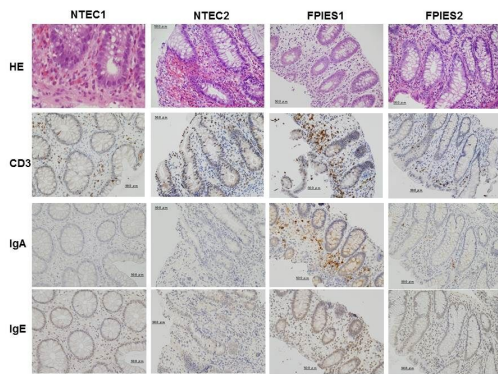


図2 NTECとFPIPにおけるHE染色、CD3、IgA、IgE陽性細胞。

Microarray法による解析では、特に著明なTh1およびTh2サイトカインのシグナル発現の亢進は認められなかったが、正常対象群と比較しIL-6、CCL11、CXCL13などの発現が亢進していた。以上の変化は、real-time RT-PCR法でも確認できた一方、NTECとFPIPを比較すると、特にFPIPにおいてCXCL13の発現が有意に強かった（図3）。

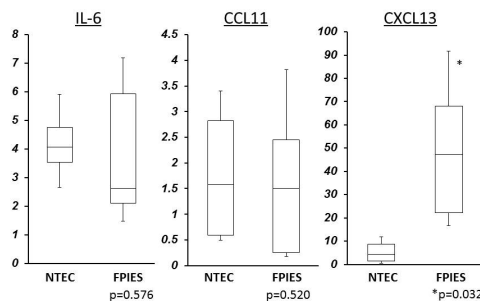


図3 NTECとFPIPにおけるIL-6、CCL11、CXCL13の発現の比較（real-time RT-PCR）。* $p < 0.05$

なお、検討を行った22人のうち、FPIPの1人のみ、1歳時に牛乳アレルギーを発症した。

結論：新生児期・乳児期のFPIP、NTECにおいてはIL-6、CCL11とCXCL13が病態に深く関与している可能性が示唆された。このうちCXCL13は、B細胞を誘導するリンパ濾胞形成因子である。リンパ濾胞は、食物などの抗原に対するIgA産生や寛容の誘導に深く関わっており、この時期にCXCL13の発現が亢進していることは生理的には好ましい現象であると考えられる。この「IgAを産生する」という生理的な反応の増強が、この時期の消化管出血の一因である可能性が示唆された。一方、（特に腸内細菌などに対する）IgAが十分に産生されるまでの防御機構を、CCL11の刺激を受け浸潤している好酸球が担っている可能性が示唆された。

NTECおよびFPIPの発症には、多種類の抗原の増加、腸内細菌叢の変化、免疫反応の増強などが影響しているものと考えられた。他方、新生児期から乳幼児期に認められる下部消化管出血には、アレルギー反応の関与が示唆されているが、今回の検討では、1歳時にミルクアレルギーを呈したものは1例に留まっていた。本検討からも、純粋なアレルギー反応とは異なった免疫応答が関わっている可能性が示唆された。

(2) 小児の炎症性腸疾患におけるCXCR3関連分子およびMMPファミリーの発現に関する検討

背景：本邦において炎症性腸疾患（IBD）が増加傾向にあることが指摘されている。特に小児のIBDは成人例と比較し、腸が広範に障害され、また病変の進行が早く、より重篤であることが特徴とされているが、その病態や増悪因子に関しては、十分な検討はなされていない。そこで、小児期発症のクローン病（CD）と潰瘍性大腸炎（UC）の粘膜を用い、炎症性シグナル分子の発現を中心に検討した。

方法：小児のIBDの発症機序を解明するため、急性期と寛解期のCD・UCの患児と正常対象それぞれ3名の腸粘膜をMicroarray法にて解析し、炎症性遺伝子の発現について検討した。加えて、Microarray法で急性期のCDとUC患児に過剰発現していたCXCL9, 10, 11, CXCR3, MMP-1, -3, -7, -10の評価のために各群からそれぞれ6名の児を抽出し、real-time RT-PCRと免疫組織染色を行った。

結果：Microarray解析では、いずれの疾患においてもTh1、Th2、Th17、Treg細胞関連のシグナル発現の亢進を認めた。特に、UCはいずれの分子の発現も増強していたのに対し、CDではよりTh1にシフトした発現亢進を確認した。また、CXCL9, 10, 11を含む8つの遺伝子とMMP-1, -3, -7, -10を含む15個の遺伝子が、それぞれ急性期のCD (fold change > 10, $P < 0.05$)と急性期のUC (fold change > 5, $P < 0.05$)において過剰に発現していた（図4）。CXCL13の発現亢進も確認された。

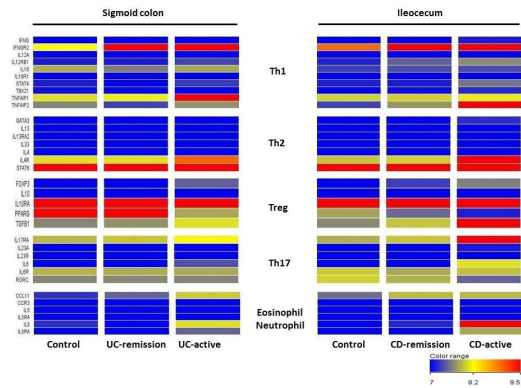


図4 活動期と寛解期のUC、CD粘膜炎を用いたMicroarray解析。

さらにCXCL9, 10, 11およびそのレセプターであるCXCR3の発現亢進をreal-time RT-PCRで確認した。これらの変化は、CDにおいて、より発現が亢進していた(図5, 7)。

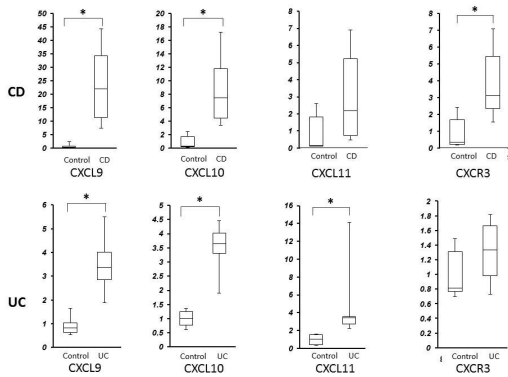


図5 活動期のUC、CD粘膜炎を用いたCXCL9, 10, 11およびCXCR3の発現の解析(real-time RT-PCR)。*p<0.05

同様に、MMP-1, -3, -7, -10の発現亢進をreal-time RT-PCRで確認した。以上の発現は、UCでより亢進していた(図6, 7)。

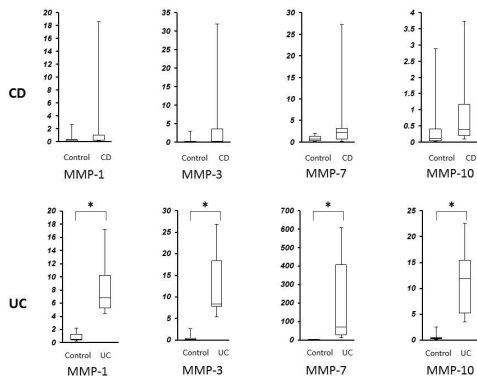


図6 活動期のUC、CD粘膜炎を用いたMMP-1, -3, -7, -10の発現の解析(real-time RT-PCR)。*p<0.05

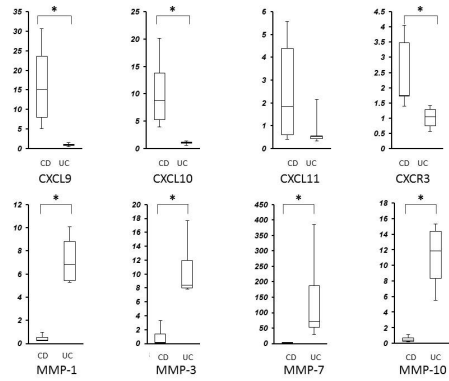


図7 活動期のUC、CD粘膜炎におけるCXCL9, 10, 11, CXCR3, MMP-1, -3, -7, -10の発現の比較(real-time RT-PCR)。*p<0.05

免疫組織染色では活動期のCD・UCの腸上皮細胞と粘膜炎固有層においてCXCL9, 10, 11, MMP-1, -3, -7, -10の過剰発現を認めた。CXCR3は粘膜炎固有層で過剰に発現していた。CXCL9, 10, 11はCDに、また、MMP-1, -3, -7, -10はUCにより著明に発現していた(図8, 9)。

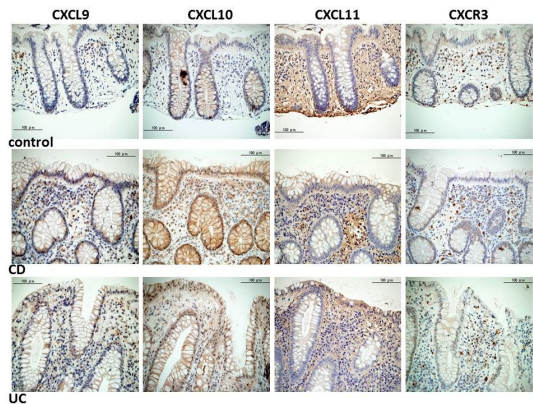


図8 活動期のUC、CD粘膜炎におけるCXCL9, 10, 11, CXCR3の発現(免疫染色)

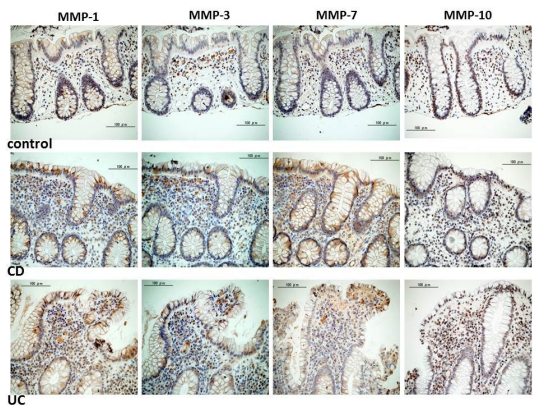


図9 活動期のUC、CD粘膜炎におけるMMP-1, -3, -7, -10の発現(免疫染色)

結論：以上の所見から、小児CDの粘膜炎障害には、CXCL9, 10, 11およびCXCR3分子が、また、小児UCの粘膜炎障害にはMMPファミリーが深く関与している可能性が示唆され

た。一方、CXCL13の発現亢進も確認され、これらの分子の発現が、小児IBDをより重篤なものにしている可能性が示唆された。今後は、成人発症IBDとの比較により、小児期発症IBDの特殊性を、より深く検討していきたい。

(3) 総括

本検討では、新生児期から小児期におけるNTEC、PFIP、UC、CDにおいて、CXCL13の発現亢進が確認された。CXCL13は、B細胞を誘導するリンパ濾胞形成因子であり、特に新生児期からの食物に対するIgA産生や寛容の誘導に深く関わっている。その発現亢進は、新生児期から小児期にかけ欠かせない生理的な免疫応答であると考えられる。従って、IgA産生のための反応が、何らかの影響で過剰になった状態がNTECやFPIPである可能性が示唆される一方、小児期の炎症性腸疾患においては、その炎症増悪に深く関わっていることが示唆された。

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6件)(すべて査読有)

Mori M, Ohtsuka Y, Ishida A, Yamazaki S, Jimbo K, Inage E, Aoyagi Y, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T. Outcome of infants presenting rectal bleeding: A retrospective study in a single institution. *Pediatr Int*. 2014;56:884-890. doi: 10.1111/ped.12366

Jimbo K, Ohtsuka Y, Kojima Y, Hosoi K, Ohbayashi N, Ikuse T, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Shimizu T. Increased expression of CXCR3 axis components and matrix metalloproteinase in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Pediatr Int*. 2014;56:873-883. doi: 10.1111/ped.12362

Fujitake Y, Ohtsuka Y, Ikuse T, Ohtani K, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Ishii M, Shimizu T. Analysis of inflammatory signals in Japanese children with Crohn's disease. *Pediatr Int* 55: 753-6, 2013 Jun 17. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/ped.12159.

Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto T, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to TH2. *J Allergy Clin Immunol* 131:590-592.e6, 2013 doi: 10.1016/j.jaci.2012.09.005

Ohtsuka Y, Jimbo K, Inage E, Mori M,

Yamakawa Y, Aoyagi Y, Suzuki M, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T. Microarray analysis of mucosal biopsy specimens in neonates with rectal bleeding: Is it really an allergic disease? *J Allergy Clin Immunol* 129:1676-8, 2012 doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.042

Ikuse T, Ohtsuka Y, Kudo T, Hosoi K, Obayashi N, Jimbo K, Aoyagi Y, Fujii T, Nagata S, Shimizu T. Microarray analysis of gastric mucosa among children with *Helicobacter pylori* infections. *Pediatr Int* 54:319-24, 2012 doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03573.x

[学会発表](計10件)

大塚宜一. 消化管から見た食物アレルギーについて. 2014年度港区小児科医会. 2014/8/7 芝パークホテル(東京)

大林奈穂, 幾瀬圭, 神保圭佑, 藤井徹, 工藤孝広, 大塚宜一, 清水俊明, 浅岡大介, 北條麻里子, 永原章仁, 渡辺純夫. 小児期および成人期の *Helicobacter Pylori* 感染胃粘膜における免疫・癌関連分子の検討. 第20回日本ヘリコバクター学会. 2014/6/28 東京ステーションコンファレンス(東京)

大塚宜一. 消化管アレルギーと好酸球性胃腸炎. 東京小児アレルギーフォーラム 2014. 2014/6/21 東京大学講堂(東京)

森真理, 大塚宜一, 石田明日香, 山崎晋, 稲毛英介, 馬場洋介, 神保圭佑, 青柳陽, 工藤孝広, 清水俊明. 新生児下部消化管出血の検討 FPIPとNTECの比較. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014/5/9 国立京都国際会館(京都)

大林奈穂, 幾瀬圭, 神保圭佑, 青柳陽, 藤井徹, 工藤孝広, 大塚宜一, 清水俊明. 小児期および成人期の *Helicobacter Pylori* 感染胃粘膜における免疫・癌関連分子の検討. 第117回日本小児科学会学術集会総会. 2014/4/12 名古屋国際会議場(名古屋)

森真理, 大塚宜一, 石田明日香, 山崎晋, 稲毛英介, 馬場洋介, 神保圭佑, 青柳陽, 工藤孝広, 清水俊明. 新生児一過性好酸球性腸炎と好酸球性食道炎の粘膜における Eotaxin の検討. 第50回日本アレルギー学会. 2013/10/19-20 パシフィコ横浜会議センター(横浜)

Jimbo K, Ohtsuka Y, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Shimizu T. A study of CXCR3 axis components and MMPs in pediatric inflammatory bowel disease in Japan. *The 1st*

Annual Meeting of Asia Organization for
Crohn's & Colitis. 2013/6/13-14 Hotel
Laforet Tokyo (東京)

Ohtsuka Y, Jimbo K, Aoyagi Y, Fujii T,
Kudo T, Shimizu T. Increased expression of
CXCR3 axis components and MMP families
in pediatric patients with inflammatory
bowel disease. Pediatric Academic Societies,
Annual Meeting. 2013/5/3-5 Washington
D.C. (USA)

大塚宜一. 新生児乳児消化管アレルギー
その粘膜病変について. 第49回日本小児
アレルギー学会_2012/9/15-16 大阪国際
会議場(大阪)

大塚宜一. 消化管アレルギーから見た小
児の粘膜免疫. 第39回日本小児栄養消化
器肝臓学会. 2012/7/14-15 梅田シティ梅
田スカイビル(大阪)

〔図書〕(計1件)

大塚宜一. アレルギーに関する画像とそ
の解説 食物アレルギーにみられる消化
器症状、画像診断、内視鏡・病理所見. ア
レルギー・免疫 19:498 (460-4), 2012

〔その他〕ホームページ

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=1777>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 宜一 (OHTSUKA, Yoshikazu)
順天堂大学・医学部・客員准教授
研究者番号：90338335

(2)研究分担者

清水 俊明 (SHIMIZU, Toshiaki)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：30260889

鈴木 竜洋 (SUZUKI, Ryuyo)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：70420859