

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860883

研究課題名(和文) 小児アレルギー疾患におけるST2遺伝子発現と転写調節機構の解析

研究課題名(英文) ST2 gene expression and transcriptional mechanisms in children with allergic disease

研究代表者

馬場 洋介 (BABA, Yosuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40647971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児アレルギー疾患におけるIL-33R/ST2の機能解析を行った。各疾患検体や細胞実験においてアレルギー性炎症においてST2上昇が確認でき、特に小児アレルギー疾患の中でも、免疫担当細胞が耐性獲得を示す過程でST2発現が定量的に変化することを証明した。また消化管における粘膜免疫応答においても、分泌型IgA抗体を中心に抗原を認識する過程で、アレルギー疾患では細胞障害を呈し、IL-33の増加は乏しいもののST2の発現が増加しており、特殊な経路で免疫応答に関与していた。粘膜免疫における炎症にはST2は複雑な形で関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We conducted a functional analysis of IL-33R/ST2 in the infantile allergic disease. We could confirm ST2 elevation in allergic inflammation in each disease and a cellular experiment. And immunocompetent cells proved that onset of ST2 changed quantitatively in a process indicating the acquisition of resistance in children with allergic disease. The IgA antibody is massively produced in the intestinal Peyer's patches, and the secretory IgA (sIgA) plays an important role on mucosal immune responses. It is considered that sIgA regulates the cause of allergic reactions, but the mechanism by which sIgA recognizes some antigens has not been clarified in food allergy. We strengthened an immune response of the Th1 cell line, and zinc acted on skin and mucosal maintenance. We concluded that ST2 is an important factor in allergic diseases and speculated that it is because the relationships ST2 and IL-33 played an important role in children with allergy.

研究分野：小児アレルギー

キーワード：小児アレルギー IL-33 ST2 Th2細胞 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国のアレルギー疾患は増加しており、小児においてもその患者数は年々増加している。アレルギーは総じて生命に危険を及ぼすことのない疾患と認識されることが多いが、アナフィラキシーショックなどで死に至ることもある。その一方で詳細な発症機序はいまだに分かっておらず、治療は抗アレルギー薬などの対症療法が中心である。特に食物アレルギーは多くの食物で耐性獲得が見込めるものの、その評価の基準にはっきりとしたものはなく、集団生活などでの誤食によるアナフィラキシーは社会問題になっている。このような背景のもと、小児アレルギー疾患の診断やアレルギー性炎症の解明、とくに食物アレルギーの診断や耐性獲得の評価は非常に重要であり食物抗原特異的 IgE 抗体の定量はその評価に有用である。しかし乳幼児期では上昇を認めないことや、高値であっても耐性獲得を認める例が存在する。

IL-33 の受容体である IL1Receptor Like 1/ST2 は、細胞特異的な発現プロフィールを示し、特にマスト細胞や好塩基球に強く発現している。さらに感染や細胞傷害によって細胞外に放出にされ炎症応答を誘導する alarmin として作用するが、その詳細ははっきりしていない。マスト細胞と好塩基球が IL-33 の主要標的であり、IL-33 を媒介する Th2 型免疫応答において重要な役割を果たすことはわかっているが (Z. allakhverdi, et al., J Immunol 2007)、マスト細胞と好塩基球における ST2 発現機序はわかっていない。また alarmin として働く ST2 は、炎症による粘膜障害において重要な役割を演じ、特にアレルギー疾患などでも強く ST2 が関与することが考えられているが、どのような状況で発現を増強するのかはわかっていない。

われわれこれまでに IgE 受容体や、ST2 の作用機序とそれらの遺伝子発現制御機構について解明してきた。(Baba Y. et al., Allergol Int. 2012), (Baba Y. et al., J Biol Chem. 2012), (Inage E, Baba Y. et al., J Immunol. 2014). GWAS 解析において、ST2 遺伝子はアレルギー疾患の原因遺伝子として見出され、アレルギー病態と強く関与することが示唆されている。それらの報告を受け、われわれは ST2 遺伝子が食物アレルギーにおける免疫応答にも関与していることを見出し、その他小児アレルギー疾患における ST2 発現の程度や、その他の消化管粘膜免疫応答についても研究を進めてきている。

そこで小児アレルギー疾患の組織検体などで粘膜組織の炎症度と ST2 発現の程度に関連が見いだせれば、ST2 の測定が疾患の重症度を反映する可能性や、遺伝子レベルでの病態解明や標的治療につながる重要な基盤研究になると考えた。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をも

とに、本研究はアレルギー疾患における炎症細胞の ST2 発現と遺伝子発現制御を解明し、臨床応用に展開するための基盤となる研究を行うことを目的とした。

まず、小児アレルギー疾患における局所の炎症応答として、アレルギー患者の血液や新生児・乳児消化管アレルギー、炎症性腸疾患患者の大腸粘膜生検検体、気管支喘息患者や呼吸器感染症患者の気道分泌物検体などにおいて、IL-33 や ST2 発現がどう変化しているのかを分子レベルで調べる。特に IgA 抗体は腸管のパイエル板で多く産生され、分泌型 IgA はアレルギー発症や消化管粘膜の局所免疫応答に重要であり、アレルギー発症抑制と強く関連付けられている。しかし小児アレルギー疾患と分泌型 IgA の検討は少なく、また IgA 抗体がどのような抗原を特異的に認識しアレルギー発症に作用するのかははっきりしない。

本研究で、小児アレルギー疾患における IL-33R/ST2 の役割や、アレルギー疾患における粘膜免疫応答を解明することを目的とし、アレルギー患児の IL-33R/ST2 やそれらの関与する炎症関連分子の発現、さらには特異的 IgA 抗体と分泌型 IgA 抗体を調べ、それらにおける粘膜免疫応答を免疫学的および組織学的に解明する。また、細胞レベルでの遺伝子発現やゲノム DNA の変異を網羅的に解析する。特に、食物アレルギーの診断や耐性獲得との関与や小児に特徴的に観察される一過性喘鳴などにおいて、IL-33R/ST2 やこれらの分子発現の免疫応答の変化やアレルギー関連遺伝子における変化で証明できれば、疾患制御や治療効果の判定などに重要な情報となり、アレルギー制御に重要な臨床的有用な基盤研究となると考えた。

さらには、次世代シーケンサーを用いて、アレルギー患児の新たな遺伝子変異を調べる。特に ST2 プロモーター領域の一塩基多型 (SNPs) やエピゲノム解析にて、その関与を遺伝子レベルで調べる。

また、これまでのわれわれの検討から小児アレルギー疾患において ST2 発現が上昇していることを確認しているが、その詳細な機序を遺伝子レベルで解析したい。ST2 は恒常的に炎症細胞に発現しているが、どのような状況で発現を増強するのか不明である。その発現の増強が RNA シーケンスによる定量解析やエピゲノム解析などにより、遺伝子レベルでアレルギー発症と関連が確認できれば、アレルギー発症の予測因子となりうる可能性がある。さらに粘膜検体にて粘膜組織の炎症度と ST2 発現の程度に関連が見いだせれば、ST2 の測定が疾患の重症度を反映する可能性や、病態解明や標的治療につながる重要な基盤研究になると思われる。

気管支喘息やアトピー性皮膚炎での GWAS 解析で ST2 領域が同定されている一方、食物アレルギー、乳幼児消化管アレルギーや炎症性腸疾患では ST2 遺伝子多型の細かい解析報

告例がない。これらの背景から基礎研究で明らかにした炎症細胞における ST2 遺伝子発現が病状と深く関与し、遺伝子多型との関連が証明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は小児アレルギー疾患における粘膜免疫応答と遺伝子発現やその変異を解明し、臨床検体を用いて関連を証明する。申請者らはこれまでアレルギー疾患における IgE 受容体や IL-33 受容体の発現や遺伝子発現制御、粘膜免疫応答の関与について解明を行ってきた。本研究ではアレルギー発症やその耐性獲得における機序を免疫学的・遺伝子学的に解析し、小児アレルギー疾患の組織や血液検体を用いてその寄与を明らかにする。粘膜面木関連因子について、食物アレルギー患者の食物抗原特異的 IgA 抗体を調べる。すでにわれわれの先行研究より卵白アレルギー患者のオボムコイド特異的 IgA 抗体が低値であることが確認されていた。対象患者数を増やしながらか再現性の確認を行い、さらに便中や消化管粘膜組織から分泌型 IgA の関与を調べる。食物アレルギーの診断や耐性獲得の確認に抗原特異的 IgE 抗体だけでなく、分泌型 IgA や抗原特異的 IgA 抗体が関与していることが予想された。

気管支喘息やアトピー性皮膚炎での GWAS 解析で ST2 領域(IL1RL1/IL18)が同定されている一方、食物アレルギー、乳幼児消化管アレルギーや炎症性腸疾患では ST2 遺伝子多型の細かい解析報告例がない。しかし、動物モデルやヒト臨床検体の解析で ST2 の関与が示唆されている。これらの背景から基礎研究で明らかにした炎症細胞における ST2 遺伝子発現が疾患関与として明らかにでき、遺伝子多型との関連が証明されれば非常に特色のある研究になると考えられた。また、臍帯血を用いて抗原特異的 IgA 抗体や IgE 抗体、遺伝子のエピジェネティックな変化を新生児期から前方視的に観察できれば、食物アレルギー発症における病態解明の足がかりとなる可能性がある。

ST2 が小児アレルギー疾患に強く関与し、粘膜免疫や食物アレルギーにおける免疫応答にも関与していることを見出してきたが、アレルギー発症やその耐性獲得における粘膜免疫応答は極めて複雑であり、様々な因子が分子発現機構に関与し相互作用拮抗を示唆する現象が観察されている。これらを疾患制御に応用するためには、粘膜免疫応答を免疫組織学的および遺伝子学的に解析する必要がある。そこで、順天堂大学医学部附属静岡病院を受診した食物アレルギー患者や気管支喘息患者、さらには自己炎症性疾患などの免疫関連疾患患者らの血液検体などを用いて、食物抗原特異的 IgA 抗体と IgA 抗体誘導サイトカイン、IL-33、ST2 など粘膜免疫応答に関連する因子を ELISA 法などで測定した。また同様に組織検体からの RNA 抽出を行い、

同分子発現などの検討を行い、炎症における役割を調べた。小児アレルギー疾患においての IL-33 や、その受容体である ST2 について、その関与を検討するために、研究についての説明と同意を得た患者の臨床経過やその血清や組織から ELISA 法に関連する分子を測定した。GWAS 解析でも ST2 が多くのアレルギー疾患の原因遺伝子として見出され、アレルギー病態と強く関与することが示唆されているが、その発現制御機構はほとんどはつきりしていない。これまで我々が同定してきた ST2 遺伝子の SNPs の検討に加え、粘膜免疫応答因子に対するエピゲノム解析で、その関与を遺伝子レベルで調べた。

4. 研究成果

食物アレルギー患者では IL-33 の上昇を認めしたが、特に牛乳アレルギー患者において、微量の耐用量（乳蛋白量:100mg）でも症状を呈する症例では、著明な ST2 の上昇を認めていた (Baba, Yosuke et al. Serum ST2, but not IL-33, is elevated in children with food allergy due to low dose baked milk. J Allergy Clin Immunol. (139) Issue 2, AB264, 2017)。また、乳児期の初回喘鳴発作を呈した児における検討では、初回喘鳴発作を呈する患児らは IL33 と ST2 上昇を認めており (Figure.1,2)、のちに喘鳴を繰り返し気管支喘息の診断を受ける症例は初回発作の段階で ST2 が上昇していることを確認した (Figure.3)。

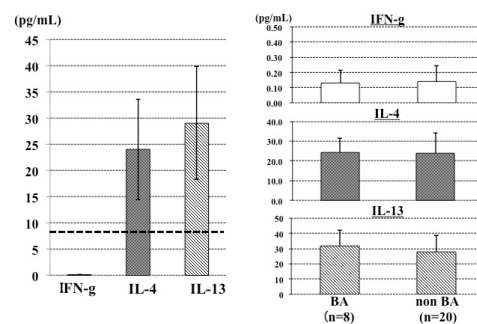


Figure.1 Serum concentration at initial wheezing

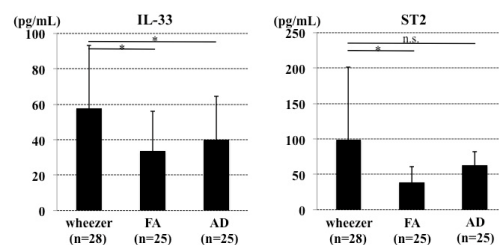


Figure.2 Serum IL-33 and ST2 levels in allergic children

また喘鳴発作を繰り返し、その後 ICS 導入が必要になった児は、ST2 発現が増強している

ことを確認した(Figure.4)。川崎病患者ではIL-33とST2が上昇するという報告が散見されるが、我々の結果では上昇している症例とそうでない症例に分類され、それらの背景に何が関与しているのかさらに考察していく必要があると考えている。

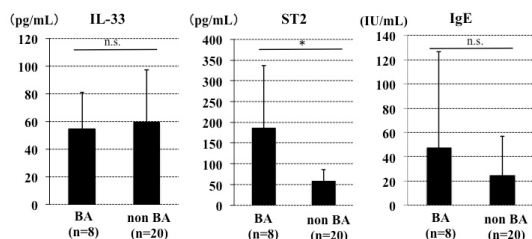


Figure3. Comparison between asthmatic group(BA) and initial stridor group(non BA)

小児気管支喘息の管理においてウイルス感染に伴う乳児の喘鳴発作(episodic wheeze)と遷延性喘鳴(IgE associated atopic persistent wheezing)との鑑別は困難であるが、管理において極めて重要な点である。IL33がアレルギー疾患や特に成人気管支喘息などで上昇することは既知の事実であったが、食物アレルギーや乳児喘息においてもIL-33を介した免疫応答を呈し、ST2発現制御に関与することは、アレルギー疾患制御においてIL-33の関与を解明する重要な点であり興味深い結果と考える。乳児喘息においてもIL33を介した免疫応答を呈し、可溶性ST2がdecoyとして受容体に結合し発現制御をすることにより、乳児喘息からIgEを介した喘鳴発症にかかわっているかもしれない。特に乳児喘息におけるST2の上昇は気管支喘息発症の新たなバイオマーカーになりうると考えられた。

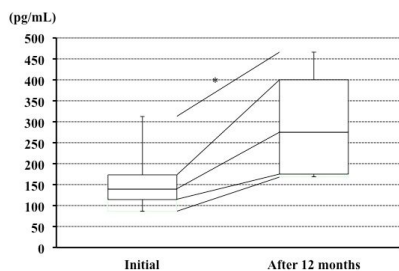
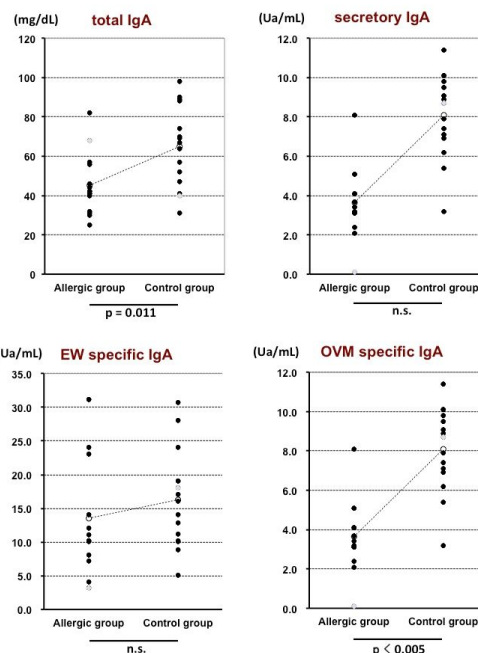


Figure.4 Serum concentration of ST2 (n=8)

食物アレルギー患者に対する粘膜免疫応答の関与として、食物抗原特異的IgA抗体や分泌型IgA抗体の測定を行なった。抗原特異的IgE抗体で症状誘発の分別のつかない食物アレルギー患者に対して、粘膜免疫関連分子の検討をおこなったところ、食物アレルギー患者では分泌型IgA抗体の低値が確認でき、その背景にはアトピー性皮膚炎の合併が多くみ

られた。IL-33やST2発現に差は見られなかったが、粘膜免疫応答レベルで細胞障害に対する防御因子として分泌型IgA抗体の役割やIgA抗体が抗原そのものを特異的に認識アレルギー性炎症に関わっている可能性が示された。



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)

Baba Y, Yoneyama T, Yamada H, Yamazaki S, Hong A, Inage E, Mori M, Ohtsuka Y, Kantake M, Shimizu T. Serum ST2, but not IL-33, is elevated in children with food allergy due to low dose baked milk. J Allergy Clin Immunol.(139) Issue 2, AB264,2017

馬場洋介, 山崎晋, 大塚宜一, 清水俊明. IL-33と炎症における免疫応答. アレルギーの臨床.36(1):57-9,2016

馬場洋介, 大塚宜一, 寒竹正人, 清水俊明. 抗原特異的IgA抗体は小児アレルギー患児の粘膜免疫応答において重要な因子である. 日本小児アレルギー学会雑誌.;30(2):237-8,2016

馬場洋介, 大塚宜一, 清水俊明. 小児アレルギー疾患におけるIL-33とST2遺伝子発現. アレルギーの臨床.35(11):1066-9,2015

Baba Y, Honjo A, Yamazaki S, Inage E, Mori M, Ohtsuka Y, Kantake M, Shimizu T. Measurement of Antigen-Specific IgA May be Useful in Children with Food Allergy. J Allergy Clin Immunol.(137) Issue 2, AB171,2015

〔学会発表〕(計 12件)

Baba Y, Yoneyama T, Yamada H, Yamazaki S, Hong A, Inage E, Mori M, Ohtsuka Y, Kantake M, Shimizu T. Serum ST2, but Not IL-33, Is Elevated in Children with Food Allergy Due to Low Dose Baked Milk The 73rd Annual Meeting of American Academy of Allergy Asthma and Immunology, Atlanta, GA, United States

Baba Y, Yamazaki S, Inage S, Mori M, Kantake M, Ohtsuka Y, Shimizu T. Antigen-Specific IgA Plays an Important Role in Mucosal Immune Response in Allergic Children: Measurement of Secretory IgA and Antigen-Specific IgA. The 23rd of the World Allergy Congress, Seoul, Korea

Baba Y, Honjo A, Yamazaki S, Inage E, Mori M, Kantake M, Ohtsuka Y, Shimizu T. Measurement of Antigen-Specific IgA May be Useful in Children with Food Allergy. The 72nd Annual Meeting of American Academy of Allergy Asthma and Immunology, Los Angeles, CA, United States.

Baba Y, Ohtsuka Y, Kantake M, Shimizu T. The Significance of measurement of antigen-specific IgA in children with food allergy. The 53rd annual meeting of the Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology.- International Pediatric Allergy Symposia- , Gunma, Japan

Baba Y, Yamazaki S, Inage E, Mori M, Kantake M, Ohtsuka Y, Shimizu T. Antigen-Specific IgA Plays an Important Role in Mucosal Immune Response in Allergic Children. 第44回日本免疫学会学術集会, 札幌

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場洋介 (BABA Yosuke)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40647971

(4) 研究協力者

清水俊明 (SHIMIZU Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30260889

大塚宜一 (OHTSUKA Yoshikazu)

順天堂大学・医学部・客員准教授