

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2019E-1

課題名：出生コホート（一般およびハイリスク）研究による長期診療データベースの構築と活用

主任研究者（所属施設）国立成育医療研究センター
（所属・職名 氏名）アレルギーセンター・アレルギーセンター長
大矢 幸弘

（研究成果の要約）本研究の目的は 20 世紀の後半から急増した小児の非感染性疾患（NCD:Non-communicable diseases）を中心に、疾病構造の変化をもたらす要因について、前向きコホート研究の方法を用いて因果推論を展開することにある。その解析手法は従来の疫学的方法にとどまらず、分子疫学的手法や免疫学的手法も取り入れ、より病院の詳しい構造を追求することを目指している。出生コホート研究は、2003 年から国立成育医療研究センターでリクルートを開始した妊婦と一般出生児約 1500 名からなる成育コホートとアレルギーハイリスク家系から出生したハイラッドコホートからなる。既に収集した成育コホートのデータを用いた解析では、近年、診療現場での著しい増加を実感する花粉食物アレルギー症候群：Pollen-food allergy syndrome (PFAS) について、13 歳での一般人口における有病率を明らかにした。花粉アレルギーは 51%に認められ、PFAS は 11.7%と非常に高いことが明らかとなった。また、未就学児のスミミングが喘息の予防になるとの常識について、前向きコホート研究で解析した結果、欧米の疫学研究結果と同様に効果がないことが明らかとなった。このほかに、妊娠高血圧症候群と児のアウトカムの追跡、アレルギーのハイリスク家系の出生コホートを行った。花粉抗原を中心としたアレルギーコンポーネント感作とゲノムデータ解析では、Amba 1 感作について GWAS を行った結果、IGHV 遺伝子領域上の SNP である rs35735004 が検出された、Betv2・Hevb8・Meral・0lee2・Phlp12 が含まれるプロフィリンにおいて、HLA 領域との関連が検出された。プロフィリン感作と各 HLA アレルと関連解析を行った結果、HLA-DRB1*09:.01 (P=8.57x10⁻¹⁰)、HLA-DQB1*03:03 (P=2.99x10⁻⁹)、HLADPB1*03:02 (P=5.39x10⁻⁹) が検出された。アレルギー特異的 IgE 抗体のアビディティは減感作療法の開始に伴い特異的 IgG4 の上昇とアビディティの低下が起こることがわかった。

1. 研究目的

20 世紀の後半から先進国を中心に急増したアレルギー疾患や肥満などの非感染性疾患（NCD:Non communicable diseases）に罹患した子どもは、21 世紀の今日、成人して、その子世代の罹患リスクが高くなり、ハイリスク家系を形成している。そのため、子どものアレルギー疾患を予防することに関心が高く、自主的に様々な予防策を講じている妊婦は少なくない。しかし、近年、出生コホート研究やランダム化比較試験（RCT）などの質の高い前向き研究は、従来の常識を否定するエビデンスを輩出しており、パラダイムシフトが生じている。大規模な横断研究によるゲノムワイド関連

解析（GWAS）により各種疾患と関連遺伝子の SNP が発見されてはいるが、個人の行動変容や社会環境の改善で、関連遺伝子にエピジェネティックな変化をもたらされるため、ゲノム情報は環境や行動との相互作用の詳細を明らかにしなければ社会や臨床現場のニーズに応えることはできない。すなわち、出生コホート研究参加者の詳細な臨床情報と生育歴の把握が欠かせない。アレルギーの感作前後およびアレルギー疾患発症前後の環境関連曝露、疾患発症後のトラジェクトリーや日本人の思春期の成長・性成熟および代謝動態などを 2 世代で追跡することにより、こうした NCD の発症予防に関する臨界期と介入すべき曝露因子を明

らかにして、成育医療のサイクルを視野に入れた実効性のあるパラダイムを再構築する必要がある。

本研究では、伝統的な疫学研究の手法を踏襲するだけでなく、分子疫学の手法を導入し、さらに関連する基礎研究とを組み合わせ、最新最先端の成果を得ることを特徴とし、独創的な長期追跡データベースの構築と活用による成果を生み出すことを目的としている。

2. 研究組織

研究者	所属施設
大矢 幸弘	国立成育医療研究センター
小林 徹	同上
堀川 玲子	同上
荒田 尚子	同上
森田 英明	同上
野口 恵美子	筑波大学
木戸 博	徳島大学

3. 研究成果

本年度の研究は、出生コホート研究（成育コホート研究およびハイラッド研究）によるデータベースの構築と令和3年度から開始する17歳調査の準備が中心である。

1) 近年、花粉症に関連する食物アレルギーである、Pollen-food allergy syndrome (PFAS)を診療する機会が増えているが、その疫学については、わが国の成人で花粉症患者の4-10%にPFASが認められる等と報告される程度であり、日本の一般的な小児集団におけるPFASの疫学的報告は極めて乏しい。今回、成育コホート研究における13歳児（思春期）506名において、PFASとアレルギーコンポーネントの感作に関する疫学的特徴を検討することを目的とし、小児期の鼻炎や花粉症の有無、および果物・野菜摂取時の口腔内症状などアレルギー症状に関する質問紙票および血液検査について調査した。結果、13歳の有病率として口腔アレルギー症状が15.0%、花粉アレルギーは51.0%に認め、PFASは11.7%に認められた。またPFASの原因となる食物としては、キウイ（39%）、パイナップル（39%）、モモ（28.8%）、リンゴ（22%）の順が多かった。さらに果物のPFASを有する者において、キウイ、リンゴ、モモ、大豆におけるPR-10

の感作は、それぞれAct d 8（30.4%）、Mal d 1（92.3%）、Pru p 1（82.4%）、およびGly m 4（66.7%）であり、モモ・リンゴ・大豆にPFASがある児はPR-10感作割合が高い一方で、キウイでは高くないことも判明した。

2) 質問票における3歳時にスイミングスクールに参加していた126名と、参加していない970名の両群で、5歳時点における最近12か月の喘鳴や鼻炎に関して、他の因子を調整し多変量解析を用いて比較検討した。また、予防効果を検討するため喘鳴や鼻炎の既往がない参加者や、治療効果検討目的に喘鳴や鼻炎の既往がある参加者においても解析を行った。結果、3歳時点での喘鳴あるいは鼻炎がない者では、スイミングスクールの参加と喘鳴や鼻炎に関連はなく（予防効果はなく）、また、3歳時点で喘鳴あるいは鼻炎がある者でも同様に関連がなく、治療効果がないことが判明した。PLoS One. 2021, aOR:0.72:0.41-1.25, P =0.239

3) アレルギー関連抗原112種類について網羅的な全ゲノム関連解析を行った。表現型としては出生後5歳・9歳時のアレルギーコンポーネント112種類の検査データ（ImmunoCAP ISAC, a multiplex array (Phadia AB, Uppsala, Sweden)）を使用し、カットオフ値0.3ISUとして陽性/陰性に分類した。遺伝子型については唾液または血液からDNAを抽出し、Asianscreening arrayのSNPアレイを用いて遺伝子型決定を行った。更にPlink2を使用してQualityCheckを行った（Guo et al. 2015）。Referenceとして1000Genomes EASゲノムデータを使用し、WholeGenome Imputationを実施した（Das et al. 2016）。各アレルギーコンポーネント検査データと各遺伝子型の関連について、ロジスティック回帰モデルに基づく統計解析を行った。HLA領域については詳細な解析を行うため、Deep*HLAを用いてHLAアレル及びアミノ酸多型を推定した（Naito et al. 2021）。最初に個々のアレルギー感作について、それぞれGWASを行った。Amba 1感作についてGWASを行った結果、IGHV遺伝子領域上のSNPであるrs35735004が検出された（P=4.52 x 10⁻⁹, OddsRatio=6.53 (3.49-12.23)）。更にアレルギーコンポーネントをタンパク質の性質ごとに再分類した

上でGWASを行うと、Betv2・Hevb8・Meral1・Olee2・Phlp12が含まれるプロフィリンにおいて、HLA領域との関連が検出された。この結果を踏まえ、プロフィリン感作と各HLAアレルと関連解析を行った結果、HLA-DRB1*09:01 ($P=8.57 \times 10^{-10}$)、HLA-DQB1*03:03 ($P=2.99 \times 10^{-9}$)、HLADPB1*03:02 ($P=5.39 \times 10^{-9}$)が検出された。更にHLA遺伝子領域中のアミノ酸多型についても関連解析を行った結果、HLADRB1では11箇所 ($\text{min}P=5.91 \times 10^{-9}$)、HLA-DQA1では1箇所 ($P=5.29 \times 10^{-9}$)関連が検出された。

4) 今回、児が思春期年齢に到達していることから、二次性徴発現時期とBMI等代謝因子、胎生因子との関連を明らかにする目的で、質問紙調査を継続して行った。質問紙調査に以下の項目を入れ、調査を継続した。男児：外性器の発達、陰毛・腋毛の発育、変声の有無と時期、女児：乳房発達、陰毛・腋毛の発育、初経の有無と時期

5) 成育コホート研究では1000名が5歳健診を受診した。そのうち双胎は48名、実際には当院で出産していない児が2名、合併症妊娠女性より出生した児が12名(高血圧 $n=5$ 、糖尿病 $n=2$ 、自己免疫疾患 $n=4$ 、慢性腎臓病 $n=1$)、児の血圧測定なしが4名であり、934名が解析対象であった。そのうち正常血圧妊娠より出生した児が909名であった。PE児は9名、GH児は16名であった。多重コホート研究では妊娠高血圧症候群の女性より出生した72組の母児が実際に検診に参加した。そのうち3名の児は不参加、2名は血圧測定なし、1名は自己免疫疾患合併女性より出生していたため除外した。多重コホートより65名(PE児 $n=35$ 、GH児 $n=30$)、母子コホート研究より16名(PE児 $n=13$ 、GH児 $n=3$)、C児 $n=909$ 、PE $n=57$ 、GH $n=49$ の血圧値を解析した。出生時の情報では、HDPではとくにPEで在胎週数が有意に短く、出生体重が有意に小さかった。また、早産(37週未満/34週未満)と低出生体重児の割合が有意に多かった。5歳健診結果ではPEで身長SDSが有意に低く、体脂肪率が有意に低かった。血圧はPEで $99.1 \pm 11.5 / 58.6 \pm 10.4$ mmHg、GHで $100.4 \pm 10.0 / 60.3 \pm 10.1$ mmHg、Cで $102.4 \pm 10.7 / 61.4 \pm 9.9$ mmHgであった。平均血圧はPEで 72.1 ± 9.8 mmHg、GHで

73.7 ± 8.7 mmHg、Cで 75.1 ± 8.8 mmHgであり、コントロール群で収縮期血圧と平均血圧が有意に高かった。近年成人病胎児期発症起源説(Developmental Origins of Health and Disease: DOHaD)が広く知られており、妊娠高血圧症候群に胎内で曝露された児の出生後の健康状態が注目されている。HDPを発症した女性から出生した児は、将来高血圧症や心血管病のリスクが高いという報告が集積(1, 2, 3)してきている。最近の16研究のシステマティックレビューでは、胎内でのPE曝露は出生後(5-8歳~13-19歳)の血圧と関連はなく、GH曝露は出生後(3-6歳~17歳)の血圧上昇と関連していた。4)本研究の集団では、C児のほうがPE児よりも有意に血圧が高く、GHではC児と同等の血圧であったことから、既報と同様の傾向とも考えられる。しかしその一方で、低出生体重や早産が小児期の血圧上昇と関連する(5, 6)という報告もあるため交絡となる因子の検討が重要となってくるとも考えられる。

3)ハイラッド研究では、妊娠中の母体への抗菌薬の投与がある場合に、生後1か月乳児におけるUKWPによるアトピー性皮膚炎診断が有意に多く、一方で母親の乳酸菌食品の摂取が多い場合に少ない傾向にある可能性が示唆された。また、新生児期および生後1か月時点での皮膚細菌叢のデータにおいて次元圧縮した解析結果と、分娩様式や抗菌薬使用などのアンケート結果と菌叢への影響・相関関係について検討した。結果、新生児期において、皮膚部位毎の菌叢に特徴は乏しいが、生後1か月頃より部位毎に分かれる傾向が認められた。母親の分娩様式や抗菌薬の使用は、いずれも児の菌叢へ影響を与えることが示唆された。

本年度は、生後6か月時点での血清を26件、生後1歳時点での血清を49件、生後2歳時点での血清を4件、採取し凍結保存を行った。

6)徳島大学関連病院で実施した17例(5-12歳、男:女比=12:5)の比較的重度の鶏卵アレルギー患者(egg white IgE: 12362(2032-32396)BUe/mL、OVA IgE: 8096(1300-21634)BUe/mL、OVM IgE: 9689(1799-24489)BUe/mL、median values)の加熱鶏卵経口免疫療法実施者のデータ解析の途中経

過を示す。1ヶ月間の入院下に急速減感作療法を実施し、その後維持量を開始時から12ヶ月持続した際の経過を各種パラメータでモニターした結果を示す。なお、記載は免疫療法開始時の表記パラメータの値を1として変化率として示した。

今回の解析群では、17例が全て経口免疫療法応答例となり、1例の脱落者も出なかった。急速減感作療法開始2週間後からsIgEは低下を開始し、12ヶ月間低下は持続した。sIgG4は急速減感作療法開始1週間後から早期に増加が始まり、3ヶ月目で増加はプラトーに達した。応答例においては、sIgE IC50はsIgG4の変化とほぼ同調して免疫療法開始直後から早期に増加して開始3ヶ月後には数十倍にまで増加してsIgEの抗原親和性の著しい低下が観察された。sIgE/IC50でモニターした結果も同様な変化が確認され、低抗原親和性のsIgEが免疫療法開始3ヶ月をピークに体内で優位を占める状態になっていることが判明した。従来のsIgE値測定のみ依存していた患者体内の免疫環境の変化を、これまでよりも高感度にモニターできることが判明した。sIgEのモニター単独に比べて、sIgE/IC50でモニターした方が治療に伴う体内の免疫環境変化の結果生じたsIgEの変化をより明確に示しており、免疫療法の効果が判定し易く、治療継続の可否の判断が付きやすいと推定された。

4. 研究内容の倫理面への配慮

成育コホート研究及びハイラッド研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理

指針ガイドンス」に基づき、国立成育医療研究センター倫理審査委員会の承認を得て実施した。また研究参加者の個人情報にはコホート管理室において研究責任者の管理の元に鍵のついた保管場所で厳重に管理し、保護に関しては最大限に配慮する。採血結果などの検査結果の取り扱いにおいては個人の識別不可能な調査番号により匿名化を行い管理した。

- ・成育医療の長期追跡データの構築に関する研究（受付番号52）
- ・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究「成育コホート研究における5歳健診での血液検査」（受付番号341）
- ・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究「成育コホート研究を用いた妊娠中のイベントと女性の生活習慣病リスクに関する研究」（受付番号342）
- ・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究（成育コホート研究7歳～15歳）（受付番号472）
- ・アレルギー疾患における遺伝要因の探索研究（受付番号533）
- ・成育医療の長期追跡データの構築と活用に関する研究「成育コホート研究における9歳健診での血液検査・13歳健診」（受付番号614）
- ・アレルギー疾患の経過・長期予後に関与する因子解明のための患者登録制度の構築（受付番号864）

また分担研究者が自施設で実施する研究については、各施設の倫理委員会の承認を得て行った。