

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020B-20

課題名：小児～青年期の好酸球性消化管疾患、発現マイクロアレイ解析による疾患特異的発現パターン特定と治療反応性予測

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) 好酸球性消化管疾患研究室・室長 野村伊知郎

(研究成果の要約)

好酸球性胃腸炎は、消化管の慢性炎症性疾患である。その診断の難度は高く、しばしば、他疾患と混同され、治療の遅れにつながる。このため、Precision medicine を適用させる必要がある。このため、消化管組織発現マイクロアレイ解析を行う。またこれを利用して、治療反応性の有無を事前に予測できる方法を創出する。

国立成育医療研究センター消化器科医師が上下部消化管内視鏡によって採取した検体を、研究代表者が中心となってアレルギーセンター医師とともに検体保存を行った。好酸球性消化管疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、機能性胃腸障害について採取が進んでいる。

まず、胃粘膜の発現マイクロアレイ解析を行った。好酸球性胃腸炎5名、非炎症 Control (機能性胃腸障害) 6名、クローン病4名について、消化管内視鏡で得られた、胃粘膜組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。3万の遺伝子群の発現量から un-supervised のクラスター解析を行った (図1)。好酸球性胃腸炎5名、機能性胃腸障害6名、クローン病4名、各患者が縦一列に相当する。解析の結果、好酸球性胃腸炎は一つのクラスターに収斂した。有意に発現上昇または低下した遺伝子の数を示している。

機能性胃腸障害を炎症なしコントロールとみなした場合、好酸球性胃腸炎は、621個が、クローン病は107個が有意に上昇または低下していた。共通に変化した遺伝子は27個に過ぎず、好酸球性胃腸炎とクローン病が明確に区別できる疾患であると考えられた。疾患特異的に上昇していた mRNA は、病態に直結していると考えられる特徴的なものが多かった。

1. 研究目的

本研究の目的：

好酸球性胃腸炎は、消化管の慢性炎症性疾患である。その診断の難度は高く、しばしば、他疾患と混同され、治療の遅れにつながる。このため、Precision medicine を適用させる必要がある。このため、消化管組織発現マイクロアレイ解析を行う。またこれを利用して、治療反応性の有無を事前に予測できる方法を創出する。

好酸球性胃腸炎の消化管組織発現マイクロアレイ解析は、クローン病、潰瘍性大腸炎を疾患対照とし、機能性胃腸障害を非炎症対照とする。疾患特異的発現パターン、疾患サブグループ Endotype、食餌治療反応性の差を判別する遺伝子群を特定する。さらに Pathway

解析などによって、炎症の鍵となる key driver molecule を発見する。これらの分子から、患者が治療に入る前に、食餌治療、他の抗炎症治療、いずれを選択すべきか判断可能なバイオマーカーを特定する。上記により Precision medicine を実施するための基盤整備を行う。

2. 研究組織

研究者	所属施設
野村伊知郎	国立成育医療研究センター

3. 研究成果

本年度の研究は、検体の収集、消化管組織のマイクロアレイ解析、好酸球性胃腸炎および、

クローン病の疾患特異的発現パターン特定、治療反応性予測に関する post-transcriptomic study について当初の計画通りに進行している。以下各項目について、記述する。

1) 検体の収集、組織好酸球の測定

国立成育医療研究センター消化器科医師が上下部消化管内視鏡によって採取した検体を、研究代表者が中心となってアレルギーセンター医師とともに検体保存を行った。表 1 に示すように、採取が進んでいる。

Inclusion criteria を記述する。好酸球性胃腸炎については、① 1か月以上続く消化管症状があり、②各種検査によって鑑別疾患を除外、③内視鏡組織検査にて、20個/high power field 以上の好酸球集積を認めた患者としている。クローン病は、①消化器科医師が本症に矛盾しない臨床症状、検査所見を認め、②各種検査によって鑑別疾患を除外、③内視鏡組織検査にて、病理医が典型的所見を認めて病理学的診断を行った患者。潰瘍性大腸炎は、①消化器科医師が本症に矛盾しない臨床症状、検査所見を認め、②各種検査によって鑑別疾患を除外、③内視鏡組織検査にて、病理医が典型的所見を認めて病理学的診断を行った患者。

表 1. 現在までに収集された各疾患の検体数とマイクロアレイ解析実施数

	胃		十二指腸		回腸		横行結腸		S 状
	検体採取	マイクロアレイ	検体採取	マイクロアレイ	検体採取	マイクロアレイ	検体採取	マイクロアレイ	
好酸球性胃腸炎	13	5	14	ND	13	ND	11	ND	11
クローン病	9	4	10	ND	14	ND	11	ND	11
潰瘍性大腸炎	5	ND	6	ND	14	ND	14	ND	14
炎症なし対照群	16	6	18	ND	16	ND	13	ND	15

ND: not done 未実施

者。疾患対照は、臨床症状はあるものの、内視鏡検査にて異常を認めず、組織においても明らかな炎症がなく、機能性胃腸障害と診断された患者である。

正しい臨床および組織診断が行われた多くの患者の検体を収集することができた。本領域においては、国内では類を見ない質と数であると考えられた。また、詳細な臨床情報と紐づけされている点も特長である。

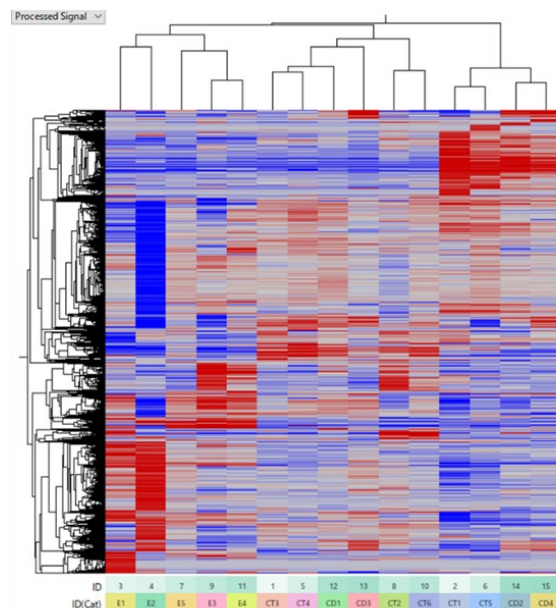
2) 消化管組織マイクロアレイ研究

本年度は、まず、胃粘膜の発現マイクロアレイ解析を行った。好酸球性胃腸炎 5 名、非炎

症 Control (機能性胃腸障害) 6 名、クローン病 4 名について、消化管内視鏡で得られた、胃粘膜組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

a. 好酸球性胃腸炎、クローン病、非炎症対照群の発現マイクロアレイ、クラスター解析

3 万の遺伝子群の発現量から un-supervised のクラスター解析を行った (図 1)。好酸球性胃腸炎 5 名、機能性胃腸障害 6 名、クローン病 4 名、各患者が縦一列に相当する。解析の結果、好酸球性胃腸炎は一つのクラスターに収斂した。好酸球性胃腸炎は、胃が病変の首座となることが多いが、明らかに機能性胃腸障害、クローン病との差がある。好酸球性胃腸炎の疾患特異的発現パターンの発見が可能となると予想がつく結果である。機能性胃腸障害とクローン病が、クラスターに分かれていないが、クローン病の病変の首座が回腸に存在することがその理由であろう。炎症はあるものの、胃においてははかなり軽微であるためと考えられる。これについては、個々の遺伝子発現を観察する必要がある。



好酸球性胃腸炎がクラスターを形成

図 1. 各患者胃粘膜組織を使用して測定した発現マイクロアレイ、クラスター解析の結果：3 万の遺伝子群の発現量から求めた。好酸球性胃腸炎 5 名、機能性胃腸障害 6 名、クローン病 4 名、各患者が縦一列に相当する。解析の結果、好酸球性胃腸炎は一つのクラスターに収斂した。機能性胃腸障害と、クローン病は、このクラスター解析では分かれていない。

図 2 に、好酸球性胃腸炎とクローン病について、炎症なし対照群と比較して、有意に発現上昇または低下した遺伝子の数を示している。好酸球性胃腸炎は、621 個が、クローン病は 107 個が変化していた。共通に変化した遺伝子は 27 個に過ぎず、好酸球性胃腸炎とクローン病が明確に区別できる疾患であると考えられた。

b. 好酸球性胃腸炎の胃粘膜で特異的に発現上昇する遺伝子群、疾患特異的発現パターン

注) 本研究班によって論文化されていない遺伝子名については秘匿のために、好酸球性胃腸炎 (Eosinophilic Gastroenteritis) に関するものは、EGE-Gene-A~Zとした。また、免疫細胞名も秘匿する目的で、免疫細胞 A などと表記した。好酸球性胃腸炎で上昇した遺伝子名の上位を見ると、既に知られているケモカイン CCL26 をはじめとして、免疫関連分子である EGE-Gene-A、EGE-Gene-B、EGE-Gene-C、EGE-Gene-D、EGE-Gene-E、EGE-Gene-F、EGE-Gene-G、EGE-Gene-H、EGE-Gene-I の上昇が認められた。

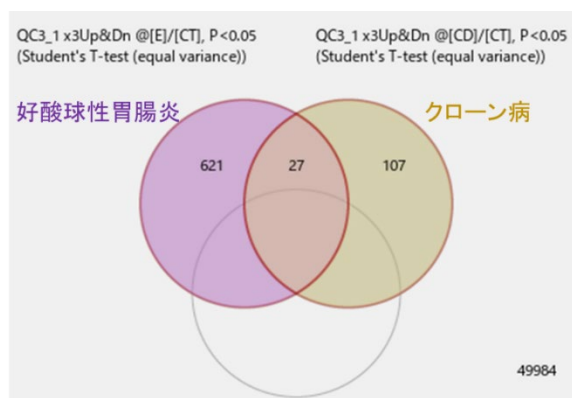


図 2. 好酸球性胃腸炎、クローン病、炎症なし対照の比較ベン図。

発現量の上昇または低下が、対照である機能性胃腸障害の 3 倍以上であり、統計学的に有意の差が得られた遺伝子を抽出している。好酸球性胃腸炎で変化した遺伝子 (紫色) は、621 個であり、クローン病 (黄色) では 107 個であった。共通に変化したものは 27 個に過ぎなかった。

機能が不明であり、議論の対象となる 免疫細胞 A に特異的な分子 EGE-Gene-J、EGE-Gene-Kも上昇していた。アトピー性皮膚炎の発症リスクとなる SNP として知られる、EGE-Gene-Lも上昇があった。本症の炎症への参画が議論されており、気管支喘息発症リスク SNPである免疫細胞 B のシグナル伝達に関わる EGE-Gene-Mの上昇もあった。そのほか多数の機能不明の遺伝子群の上昇が認

められた。

好酸球性胃腸炎で発現低下している遺伝子も多い。自然免疫に関わる分子 EGE-Gene-N、消化管神経を構成する分子 EGE-Gene-O、ビタミン結合分子 EGE-Gene-Pなどが低下していた。

以上は、好酸球性胃腸炎で、非炎症対照群と比較して明確な上昇もしくは低下があり、しかも、疾患対象であるクローン病において変化が見られない分子である。好酸球性胃腸炎の疾患特異的発現パターンとして差し支えないと思われる。論文化に十分な n 数となるよう、検体数を増やしてゆく。

c. クローン病の胃粘膜で特異的に発現上昇する遺伝子群

クローン病のみで上昇していた 107 の遺伝子の内、重要な 免疫分子 Cに関連する 23 遺伝子が含まれていて注目に値する。また、Th1、Th17 系のサイトカイン、ケモカイン群の上昇が顕著であった。これらは、好酸球性胃腸炎において上昇が全く認められておらず、クローン病の胃における疾患特異的発現パターンとしてよいと思われる。今後は論文化に十分な n 数となるよう、検体数を増やしてゆく。また、クローン病の首座である回腸におけるマイクロアレイ解析を進めて、クローン病の炎症の本質について発現パターンを調査する。

d. 好酸球性胃腸炎の食餌治療、治療反応性予測

好酸球性胃腸炎の、食餌治療で寛解可能であった患者とそうでない患者の比較を行う予定である。

現在のところ、両者の比較を行うための十分数のマイクロアレイ解析は未施行である。今後十分数を解析して比較を行い、治療反応性予測可能な遺伝子発現を特定する。

3. 治療反応性予測に関する post-transcriptomic study

上の 2d に記したように、マイクロアレイによる治療反応性予測は、食餌治療で寛解可能であった患者とそうでない患者の比較を行う必要があるが、少し時間がかかるため、先んじて、血清のサイトカイン、ケモカインを多数同時に測定して、治療反応性予測可能分子がないか解析を行った。方法は、60 種類のサイトカイン、ケモカインを各患者の治療前数ポイント、食餌治療によって改善する数ポイント

ト、原因食物負荷により、悪化する時期の数ポイントについて測定した。

好酸球性胃腸炎:13名の診断基準を満たし、食餌療法を行った患者を対象とした。食餌療法によって、完全な症状の寛解が得られた患者(食餌療法寛解群)が7名、得られなかった患者(食餌療法不応群)が6名であった。

結果は、60種類のサイトカイン、ケモカインのうち、Cytokine-Aのみが、食餌療法寛解群の症状の寛解に呼応して測定感度以下まで減少し、原因食物負荷により、4-7日後には再上昇を見た。Cytokine-Aは食餌療法不応群6名では、上昇したままであった。以上から、Cytokine-Aの食餌療法前後における変化は、治療の成功不成功を予測するマーカーとして使用できる可能性がある。

今後、マイクロアレイによる治療反応性予測を進めるとともに、Cytokine-Aについても、患者数を更に追加して、論文化を進めてゆく。

結論

2020年度は、胃粘膜組織のマイクロアレイ解析において好酸球性胃腸炎および、クローン病の疾患特異的発現パターン特定が行われた(世界で初の試み)。免疫学的に重要な遺伝子群の上昇および、低下が認められた。

鑑別疾患が多く、診断困難であることが少なくない好酸球性胃腸炎の確実な診断を行う素地が得られた。また、病態解明につながる各種免疫学的検討が可能となった。

好酸球性胃腸炎の治療反応性予測に関するpost-transcriptomic studyについては、血清の多種サイトカイン測定によって、Cytokine-Aがこれに該当する候補分子であることがわかった。

近年、好酸球性胃腸炎から炎症性腸疾患に進展した患者の症例報告がなされるようになり、これらの疾患をPrecision medicineにより、科学的に判別して研究を行う必要性が高まっている。NCCHDにおいても、好酸球性胃腸炎からクローン病に変化した5才児例がある。今後は、十二指腸、回腸、結腸についても、マイクロアレイ解析を行い、回腸を中心としたクローン病の、結腸を中心とした潰瘍性大腸炎の疾患特異的発現パターンを解析することにより、3疾患の病態解明を進める。

原因不明の難治慢性消化管炎症性疾患において、確実な情報をもとに診療、研究が行えるPrecision medicineの基盤が形作られようとしており、患者にとって大きな福音につながる可能性がある。今後、論文化に十分な検体数を得るとともに、胃だけでなく小腸、大腸に範囲を拡大して着実に研究を進行させる必要がある。

4. 研究内容の倫理面への配慮

1. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への人権の擁護

検査、各種データおよび評価結果などは個人情報である。この情報によって個人への不利益が派生することがないように、取り扱いと管理を厳重に行う。検査、各種データならびに評価結果は、解析する前に無作為に4桁からなるコード番号をつけ、その番号によって管理し、氏名、生年月日などは削除され、診断名に関してもコード化する。個人とこの符号を結び付ける対応表は、個人情報識別管理者(指定医師)において厳重に保管し個人情報を特定不可能な形式をとり、プライバシーの保護を確実に遂行する。このような管理を厳重に遂行することにより個人の解析結果は、分析を行う研究者にも誰のものか特定できなくなる。

2. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

今回の研究は通常の治療、診断でおこなっているものであり、これに伴う新たな苦痛、危険はない。その他の調査に関しても患者への時間制限もないため、不利益はないと思われる。利益についても発生しない。また、結果は集計結果として解析、公表することを予定しており、個人データとしての公表することはないため、個人の不利益になることはない。しかしながら、研究者と対象者が治療をする側とされる側という特殊性から治療、診療に対しての理解と共に結果の解析への利用と公表への同意は自由意志でおこなう。協力、同意をしないからといって不利益な扱いを受けないことなど十分なインフォームド・コンセントを行い、強要にあたらぬよう十分な配慮をおこなう。

3. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

本研究の対象患者が新生児、乳児も含むことから、被験者本人が十分な判断能力又は判断が困難であるため、近親者(両親)に対して以下の説明、同意(代諾)を頂く。対象者となる実施医師には、本研究の代表者および研究協力者が、本研究の目的と概要、プライバシーの保護と人権の尊重を患者説明文書などに従って詳細に説明する。同意(代諾)も同様に、同意(代諾)文書に署名をして頂くことで同意を得る。

本研究計画は成育医療研究センター倫理委員会の承認を受けている(#725)。