

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
消化管を主座とする好酸球性炎症症候群の診断治療法開発 疫学、病態解明に関する研究
分担研究報告書

好酸球性消化管疾患の病因検索と診断能向上のための研究

研究分担者 木下芳一 島根大学医学部内科学講座（内科学第二）教授
千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座 教授

研究要旨

好酸球性消化管疾患の病因を明らかにし、診断感度と特異度を向上させ難治例の治療に役立てるとともに診療のガイドライン作成の基礎データを作成することを目的として GWAS 解析、食道粘膜 mRNA のマイクロアレイ解析、血清バイオマーカーの開発、内視鏡検査と生検検査の信頼性を向上させるための検討を行ってきた。その結果、日本人の好酸球性食道炎と欧米の好酸球性食道炎の病態の類似性、血清バイオマーカーとして有望な分子、内視鏡診断に有効なマーカーと健常者の消化管各部位での正常浸潤好酸球数が明らかになった。これらの成績は好酸球性消化管疾患の診療指針の改定に役立つとともに、今後診療ガイドラインを作成していくうえで重要であると考えられる。

研究協力者

岩切勝彦（日本医科大学・准教授）
松本主之（岩手医科大学・教授）
大原秀一（東北労災病院・副院長）
石原俊治（島根大学・准教授）
石村典久（島根大学・講師）
大嶋直樹（島根大学・助教）
丸山理留敬（島根大学・教授）

A・研究目的

好酸球性消化管疾患の原因は明らかとはなっていない。さらに好酸球性消化管疾患に現在分類されている新生児食物蛋白誘発胃腸炎、好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎などが同一の原因で起こっているのか否かについても明らかとなっていない。そこで好酸球性消化管疾患に含まれる各種疾患の病因を明らかにするとともに各疾患の病因の違いを比較検討することを目的とする。さらに合わせて、好酸球性消化管疾患の

内視鏡、生検診断能を改善するとともに血清バイオマーカーを見出し、今後の診療指針の改訂と、特に重症・難治例を対象としたガイドライン作成の根拠となるデータを得ることも研究目的とする。

B. 研究方法

1. GWAS 解析を用いた好酸球性消化管疾患の原因遺伝子の検索

好酸球性消化管疾患の病因解明には GWAS(genome wide association study)を用いた網羅的な遺伝子の多型解析を行う。GWAS 解析を行うために好酸球性消化管疾患の患者を多数集積する。集積患者の臨床像、薬剤に対する反応性、臨床経過、予後に関する情報をデータベース化する。患者の血液検体は全て連結可能匿名化をおこなう。末梢血より DNA を抽出し、これを京都大学ゲノム情報疫学の松田文彦教授と共同で Illumina 社の SNP アレイを用いて多型解析

を行う。好酸球性消化管疾患に含まれる各疾患の患者から得られたデータを比較することで病態の類似性を判定するとともに、京都大学ゲノム情報疫学が保有する健常者データと比較することで健常者との差異を判定し病因・病態に迫る遺伝的感受性を明らかにする。

2. 食道粘膜の生検材料を用いた発現 mRNA のマイクロアレイ解析

食道粘膜は生検によって上皮層だけを採取することが可能で上皮層での発現蛋白の検討を粘膜下層の浸潤炎症細胞の影響を受けることなく行うことが可能であるという特徴を有している。そこで生検組織から mRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行って発現蛋白の検討を行う。さらに得られた成績を既に報告されている米国の小児の好酸球性食道炎例の成績と比較し好酸球性食道炎の病態に人種間で、また年齢によって違いがあるか否かを検討する。

3. 好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎例を対象とした血清診断バイオマーカーの検索

血清サイトカインのうち47種のサイトカインを選択して好酸球性食道炎と好酸球性胃腸炎例を対象として Multiplex assay を用いて測定する。好酸球性消化管疾患で高値をとるものを選択し、今後の診断バイオマーカーとしての感度と特異度の検討につなげる。

4. 好酸球性食道炎の診断能を向上させるための自覚症状と内視鏡診断能の比較調査

好酸球性食道炎の診断能を向上させるため前向きコホート研究を行って内視鏡診断を受ける患者を多数集積する。この中で好酸球性食道炎を示唆する自覚症状（胸焼け、胸のつまり感、嚥下障害、胸痛など）と好酸球性食道炎を示唆する内視鏡像（縦走溝、リング状狭窄、白斑など）がある場合には必ず複数か所の生検診断を行って好酸球性食道炎か否かの確定診断を行う。

多数例の検討をもとに自覚症状と内視鏡異常の診断能の比較調査を行い、最も感度と特異度の高い診断マーカーとしての自覚症状あるいは内視鏡異常像を明らかにする。

5. 消化管各部位の粘膜への健常者での好酸球の浸潤数の計測

健常成人の消化管粘膜に浸潤している好酸球の数を明らかにすることを目的として病理組織学的に健常者の消化管各部位の粘膜上皮、粘膜固有層、粘膜下層の浸潤好酸球数の計測を行う。多数例での検討を行うことで好酸球浸潤の正常値を設定することができ、好酸球性消化管疾患の病理診断能を高めることができるとともに診療指針の改訂に重要なデータを得ることができると考えられる。

（倫理面への配慮）

上記の全ての検討は研究プロトコルを島根大学の倫理委員会に諮り承認を得たのちに、対象者に文章による説明を行い、十分に倫理面に配慮しながら行う。

C. 研究結果

1. GWAS 解析を用いた好酸球性消化管疾患の原因遺伝子の検索

GWAS 研究に関しては、研究プロトコルを島根大学をはじめとする参加施設の倫理委員会に諮り承認を得た。その後、臨床データを匿名化して登録するための登録用の website を開設し運営している。現在は順調に好酸球性消化管疾患の患者の集積を行っている。末梢血は匿名化したのちに DNA を抽出しており現在好酸球性食道炎例約 20 例、好酸球性胃腸炎例 5 例の検体を得て DNA の抽出が完了している。今後 300 例の患者の集積を目指して、より多くの患者の集積を短期間で行うことを目的として好酸球性消化管疾患に関する情報提供と診療のアドバイスを行う website を開設する予定としている。

2. 食道粘膜の生検材料を用いた発現 mRNA のマイクロアレイ解析

無治療の好酸球性食道炎例の食道粘膜では健常者に比べて eotaxin3, periostin, IL-13, cadherin26 などが高発現し、filaggrin, claudin10 などが健常者よりも低発現であった。このような変化は欧米で小児の好酸球性食道炎患者で報告されている現象と極めて類似した結果であり、欧米の小児を中心とした好酸球性食道炎と日本の成人の好酸球性食道炎の病態が類似したものであることが明らかになった。また、これらの蛋白発現の異常はプロトンポンプ阻害薬やステロイドホルモンを用いて治療を行うと正常化することも明らかになった。

3. 好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎例を対象とした血清診断バイオマーカーの検索

まず IL-5, IL-13, IL-15, eotaxin3, TSLP の5種の血清中のサイトカインの測定を行ったがこの中の1つのサイトカインの値を用いても、5種のサイトカインの測定データを組み合わせても好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎の確定診断を行うことは困難であった。

そこで、次に測定サイトカインの種類を47種にまで増やしたところ好酸球性消化管疾患では G-CSF, IL-8, MCP-1, MCP-4, TNF, CTACK(CCL27), SDF-1, MIP-3, Lymphotoxin, MIG, periostin などの血清濃度が高いことが明らかになった。これらのサイトカインの好酸球性消化管疾患における診断感度、診断特異性、病勢との相関性に関して今後検討を重ねていくことが必要であると考えられた。

4. 好酸球性食道炎の診断能を向上させるための自覚症状と内視鏡診断能の比較調査

好酸球性食道炎の診断能を向上させるための研究では、現在、島根県内の病院の協力を得て約3万例の上部消化管内視鏡検査受検例のデー

タを集積している。この中で確定診断された20例の好酸球性食道炎例の症状、各種内視鏡異常像と最終診断との比較検討を行い、診断に用いうる全臨床データの中で内視鏡検査で判定される食道粘膜縦走溝が感度、特異度ともに最も優れていることを明らかにすることができた。自覚症状は診断における感度、特異度とも低値で好酸球性食道炎の診断の有力なきっかけとなるものではなかった。この成績は近く論文として発表する予定である。

5. 消化管各部位の粘膜への健常者での好酸球の浸潤数の計測

健常者の消化管の浸潤好酸球数の正常値を設定するための検討では、約100例の健常者の組織を得て食道では粘膜上皮内、胃、十二指腸、小腸、上行結腸、横行結腸、下行結腸、S状結腸、直腸では粘膜固有層の好酸球数の計測を行った。健常者では食道粘膜上皮内に好酸球はほとんど存在しないが、他の消化管の粘膜固有層には多数の好酸球の浸潤が見られた。特に上行結腸には健常者でも浸潤好酸球数が多く、現在用いられている好酸球性胃腸炎の診断指針に記載されている「好酸球数20以上/高倍率視野」をそのまま判定に用いると、健常者でも異常と判定されることがあり over diagnosis の危険性があることが明らかになった。この成績に基づき好酸球性胃腸炎の診断指針の修正の検討を始めるとともに、近く論文として研究内容を発表予定である。

D. 考察

GWASによる好酸球性消化管疾患の病因の検索に関しては、現在、臨床情報とDNA検体を収集する準備が完了して集積が進んでいるため2年程度で全データを得ることができると期待される。今後はより多くの施設の参加が可能となるように働きかけを行っていくことが必要であると考えられ、新たな website の開設の準備を行

っている。

食道粘膜生検組織を用いたマイクロアレイ解析では日本の成人の好酸球性食道炎と米国の小児の好酸球性食道炎がほぼ同じ病態であることが確認できたと考えられる。これは米国の診療の指針や治療の基本方針を日本の患者に対しても使用することが可能である可能性を示しており好酸球性食道炎の診療の一般化が可能になっていくものと期待される。さらにプロトンポンプ阻害薬による治療でもステロイドによる治療でも同様の病態改善効果があることが示されており、好酸球性食道炎の第一選択治療として副作用の少ないプロトンポンプ阻害薬が一般化してくるものと期待される。

血清のバイオマーカーに関してはまだ数種の候補が見つかった状況である。今後はこれらの血清サイトカインの濃度が好酸球性消化管疾患以外の疾患でどの程度上昇するかを検討し、好酸球性消化管疾患の血清診断バイオマーカーとしての感度と特異度を明確にしていくことが必要である。

好酸球性食道炎の診断では自覚症状は有用な診断補助ではなかったが、内視鏡検査で食道粘膜に縦走溝を見つけることが最も感度、特異度が高い診断方法であることが明らかになった。これは好酸球性食道炎の内視鏡診断の質を高めるとともに、症状から好酸球性食道炎を疑ってむやみに生検を行うコストとリスクを低下させることにも繋がると思われる。

E. 結論

好酸球性消化管疾患の病因を明らかにすることを目的とした GWAS 研究は、現在順調に患者コホートの収集が進んでおり 2 年程度で完了すると期待される。内視鏡診断能の向上と病理組織検査の正確さを向上させるための研究は終了し、成果を論文発表する予定である。血清診断バイオマーカーを検索する検討も順調に進行している。

F. 研究発表

論文発表

Kinoshita Y, Furuta K, Ishimura N, Ishihara S. Elevated plasma cytokines in Japanese patients with eosinophilic esophagitis and gastroenteritis. *Digestion*, 86: 238-243, 2012

Kinoshita Y, Furuta K, Ishimura N, Ishihara S, Sato S, Maruyama R, Ohara S, Matsumoto T, Sakamoto C, Matsui T, Ishikawa S, Chiba T. Clinical characteristics of Japanese patients with eosinophilic esophagitis and eosinophilic gastroenteritis. *Journal of Gastroenterology*, 48: 333-339, 2013

Furuta K, Adachi K, Aimi M, Ishimura N, Sato S, Ishihara S, Kinoshita Y.

Case-control study of gastrointestinal disorders with *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 53: 60-62, 2013

Ishimura N, Furuta K, Sato S, Ishihara S, Kinoshita Y. Limited role of allergy testing in patients with eosinophilic gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28: 1306-1313, 2013

Mishiro T, Kusunoki R, Otani A, Ansary Md, Tongu M, Harashima N, Yamada T, Sato S, Amano Y, Itoh K, Ishihara S, Kinoshita Y.

Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8.

Laboratory Investigation, 93: 834-843, 2013

木下芳一, 石原俊治, 天野祐二, 清村志乃, 多田育賢, 丸山理留敬: 好酸球性胃腸炎の診断と治療. *Gastroenterological Endoscopy*, 54: 1797-1805, 2012.

石村典久, 木下芳一: 好酸球性食道・胃腸炎.

消化器の臨床, 16: 5-14, 2013.

木下芳一, 大嶋直樹, 石村典久, 石原俊治:
好酸球性消化管障害の診断と治療. 日本消化
器病学会雑誌, 110: 953-964, 2013.

木下芳一: 好酸球性胃腸炎. In: カラー版消化
器病学 基礎と臨床 (浅香正博, 菅野健太郎,
千葉勉編). 西村書店, 東京, 2013,
pp672-674.

木下芳一, 大嶋直樹, 石村典久, 相見正史,
石原俊治: 好酸球性消化管疾患の診断基準.
胃と腸, 48: 1853-1858, 2013.

学会発表

石村典久, 古田賢司, 佐藤秀一, 石原俊治,
木下芳一: 好酸球性食道炎および好酸球性胃
腸炎患者における特異的IgE抗体測定の意義.
第99回日本消化器病学会総会, 2013.03.23,
鹿児島.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし