

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
（総合）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とし、診断と治療の方法を改善するとともに、今後の診療ガイドラインの作成に有用な基礎データを得るために GWAS 解析、食道粘膜 mRNA のマイクロアレイ解析、好酸球性消化管疾患の発症リスク因子の検討、血清および内視鏡・生検診断能の向上を目指した検討を行った。検討の結果、日本人成人の好酸球性食道炎の病態と欧米の小児例の病態が極めて類似していることが証明された。また、診断のための血清バイオマーカーとして *Helicobacter pylori* 感染が陰性であることは発症リスク因子となりうるということが明らかになった。さらにバイオマーカーとして有望なサイトカインが見つげ出されたが抗原特異的な IgE は病因物質の同定には有効でないことが明らかになった。さらに、内視鏡診断に有用な特異性の高い異常内視鏡像、健常者の正常消化管臓器各部における浸潤好酸球数も明らかとなり、好酸球性消化管疾患の診断能は著しく向上したと考えられる。

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）

して研究を行ってきた。さらに合わせて、好酸球性消化管疾患の内視鏡、生検診断能を改善し、診断や病勢判断のための血清バイオマーカーを明らかとし、最終的には好酸球性消化管疾患の診療の指針を作成、改訂し特に重症・難治例を対象とした診療ガイドライン作成のための根拠データを創出することを研究目的としている。

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になっていない。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

B. 研究方法

1. 病因を明らかにするための GWAS 解析

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. 食道粘膜の発現蛋白を解析することで欧米の好酸球性食道炎と日本の好酸球性食道炎のちがいの有無を明らかにするための検討

好酸球性食道炎では食道粘膜の生検材料を用いた mRNA のマイクロアレイ解析を行うことで食道粘膜の発現蛋白を同定し健常者食道との違い、欧米の好酸球性食道炎との同異に関して検討を行う。

3. 血液サンプルを用いた発症リスク因子を明らかにするための検討

最近の衛生環境の改善が小児期における細菌感染のリスクを低下させ、これが原因となって Th2 系の免疫反応をおこしやすい個人が増加し、アレルギー疾患が増加しているとする衛生仮説が提唱されている。また日本においては Th1 系の免疫反応を誘発しやすく、小児期に慢性感染が成立する *Helicobacter pylori* 感染が最近著しく低下してきているが、この変化が好酸球性食道炎と好酸球性胃腸炎の発症リスクとなりうるか否かを検討する。

対象は好酸球性食道炎 18 例、好酸球性胃腸炎 22 例とそれぞれの case 例と年齢、性別、診断時期を一致させた健常者 (control) を case 1 例について 3 例ずつ当てはめ case control design で検討を行う。*Helicobacter pylori* の診断は血清を用いて抗体価の判定により行う。

4. 血液サンプルを用いて治療方針の決定に有用な情報を得るための検討

好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎は食物や空中の花粉、微生物などが抗原となっておこるアレルギー疾患であると考えられている。そこで、食物、花粉、微生物抗原に対する抗原特異的な IgE を患者の血中に同定することができるか否か、またこれをもとにアレルギー除去食を行うことが可能であるか否かを検討する。末梢血中の抗原特異的 IgE の測定は ELISA 法で行う。

5. 血液サンプルを用いて好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎の診断を行い、かつ病勢を判定するための検討

好酸球性食道炎例、好酸球性胃腸炎例、健常者の血液サンプルを材料として、Multiplex assay を用いて IL-5, -13, -15, eotaxin3, TSLP (thymic stromal lymphopoietin) の測定を行った。さらに、これらのサイトカインを含めて 47 種類の血清サイトカインの測定をおこなって診断、病勢判定に有用な血清サイトカインの発見を試みる。

6. 内視鏡検査を受診した対象者のコホートを用いて好酸球性食道炎の内視鏡診断能を高めるための検討

好酸球性食道炎の診断能を向上させるため上部消化管の内視鏡検査を受診する患者を対象として前向きコホート研究を行って、最も感度と特異度の高い診断マーカーとしての内視鏡異常像、自覚症状の種類を明らかにする。

7. 消化管粘膜中の好酸球浸潤数の正常値を決めるための検討

消化管粘膜の中で食道粘膜には好酸球の浸潤はほとんどないと考えられている。一方、小腸粘膜には健常者でも少数の好酸球の浸潤があると報告されている。ところが消化管全長の各部位において、それぞれの部位でどの程度の好酸球浸潤が健常者において見られるかは明らかになっていない。

そこで健常者の消化管粘膜の生検材料を用いて HE 染色と major basic protein(MBP)の免疫染色を行って消化管各部位の粘膜における好酸球数の正常値を明らかにする。

(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. 病因を明らかにするための GWAS 解析

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. 食道粘膜の発現蛋白を解析することで欧米の好酸球性食道炎と日本の好酸球性食道炎の違いの有無を明らかにするための検討

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。

3. 血液サンプルを用いて、発症リスク因子を明らかにするための検討

好酸球性消化管疾患例では好酸球性食道炎であっても好酸球性胃腸炎であっても *Helicobacter pylori* 感染陽性率は 20~30%であった。一方、年齢、性別、診断時期を一致させたコントロール例では *Helicobacter pylori* 感染陽性率は 50%程度であった。ここから計算される *Helicobacter pylori* 陽性者の好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎発症リスクの OR は好酸球性食道炎で 0.22、好酸球性胃腸炎で 0.31 であった。

この成績より、*Helicobacter pylori* 感染陰性者が好酸球性消化管障害を発症しやすいと考えられた。

4. 血液サンプルを用いて治療方針の決定に有用な情報を得るための検討

血清中の抗原特異的な IgE の存在を食品、花粉、微生物を中心に 33 種の抗原について測定した。好酸球性食道炎においても、好酸球性胃腸炎においても、検討したほとんどの抗原特異的 IgE が健常者に比べて高値を示していた(図1)。

図1a 好酸球性消化管疾患例の抹消血液中の総 IgE

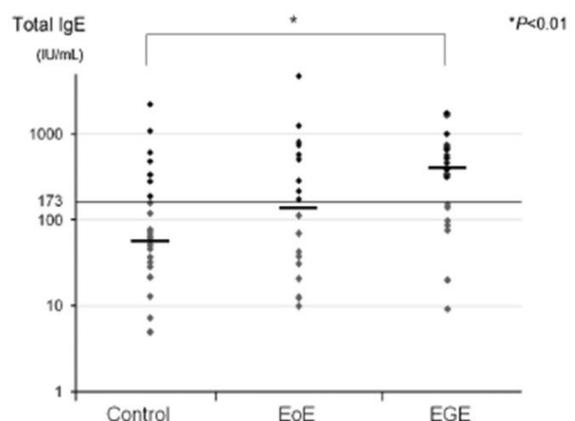


図1b 好酸球性消化管疾患例の抗原特異的 IgE

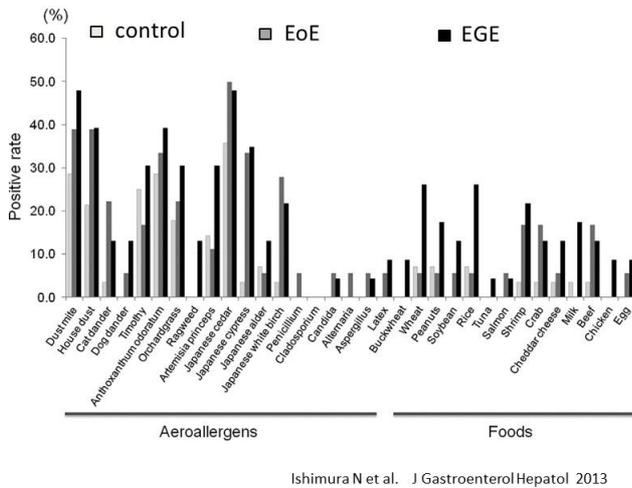
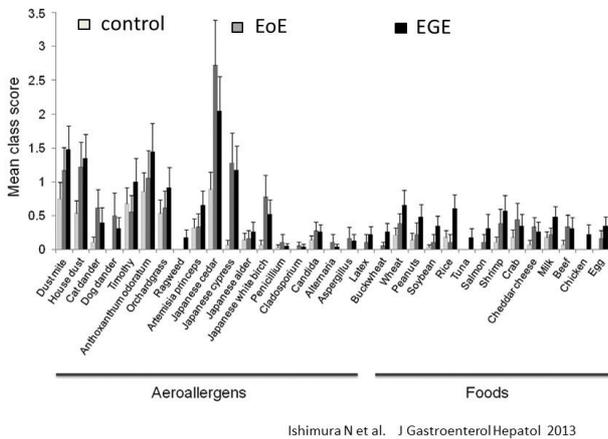


図1c 好酸球性消化管疾患例の抗原特異的 IgE



特定の抗原に対して多くの例が同一の高い IgE 量を示すことはなく、食物と非食物、花粉と非花粉、微生物と非微生物に分けても明確な特異性は得られなかった。即ち、好酸球性消化管疾患では抗原特異的な IgE の量を測定して原因アレルゲンを同定し、アレルゲンを除去する治療を計画することは困難であることが明らかになった。

5. 血液サンプルを用いて好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎の診断を行い、かつ病勢を判定するための検討

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。IL-5, IL-15 は健常者に比べて好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎で血中濃度が高かった。一方、

IL-13, eotaxin3, TSLP も好酸球性消化管疾患において高い値を示す例はあったが、その値には個人間で大きなバラツキがあった。個人間のバラツキのために測定をした 5 種のサイトカインの値だけでは、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, Lymphotoctin, MIG, periostin などの血清濃度が高いことが明らかになった(図2)。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。

図2a 変化が明確なもの (影の部分が正常値)

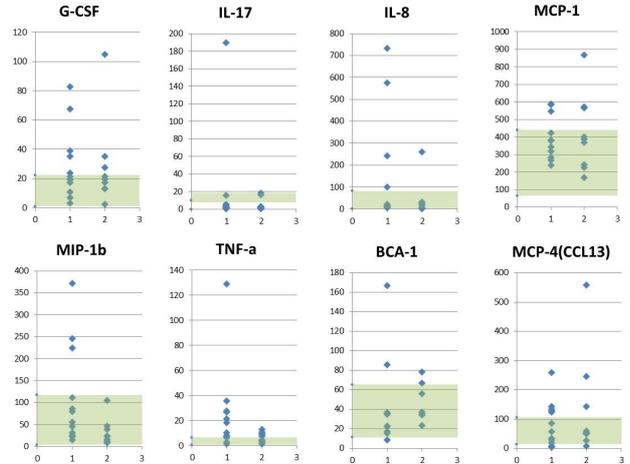
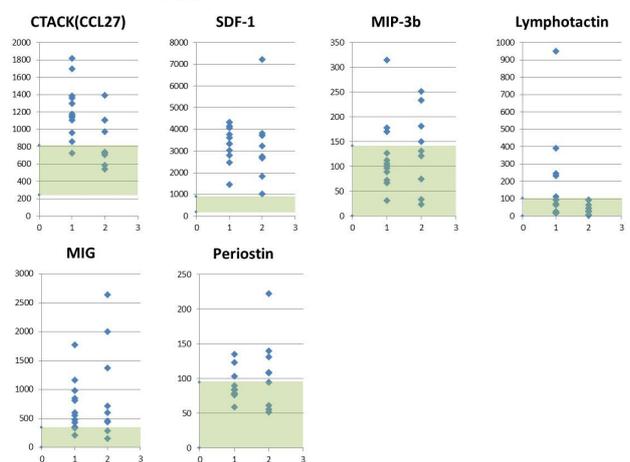


図2b 変化が明確なもの (影の部分が正常値)



6. 内視鏡検査を受診した対象者のコホートを用いて好酸球性食道炎の内視鏡診断能を高めるための検討

好酸球性食道炎の内視鏡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。一方、自覚症状は診断感度、特異度ともに低いことが示された。この成績は近く論文として発表する予定である。

7. 消化管粘膜中の好酸球浸潤数の正常値を決めるための検討

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と粘膜下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、粘膜下層には多数の好酸球の浸潤が見られた。特に終末回腸と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 の危険性を招くことが明らかとなった。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

平成 24 年度と 25 年度の研究結果より、日本人の好酸球性消化管疾患の病態とリスク因子が

明らかになってきた。

まず好酸球性消化管疾患の本体の遺伝子の異常に迫ろうとする GWAS 研究に関しては順調に患者サンプルの集積が進んでおり 2 年程度で解析に必要なサンプル数となることが期待されている。これが集積されれば好酸球性食道炎と胃腸炎の違いの有無、好酸球性食道炎の中で PPI 反応性のものと非反応性のものの違いを遺伝子レベルで論じることができるようになり病態解明も診療も向上することが期待される。好酸球性食道炎に関しては食道粘膜での発現蛋白量の欧米の小児での変化と日本の成人での変化が極めて類似しており小児と成人、欧米と日本の年齢、人種の差にもかかわらず同一の病態を有する可能性が高いことを明らかにすることができた。このような結果は欧米の患者で既に試みられている診断や治療の方法が日本においても有用である可能性を示唆しており、今後の診療の指針の改訂、ガイドラインの作成に極めて重要な情報であると考えられる。

好酸球性消化管疾患の発症リスク因子に関する検討では、私達は平成 24 年度に好酸球性消化管疾患例と健常者の case-controlled study を行って、好酸球性消化管障害例には *Helicobacter pylori* 感染例が少なく、*Helicobacter pylori* に感染していないことが好酸球性消化管障害の発症リスク因子であることを明らかにした。欧米においては 20~30 年前から *Helicobacter pylori* 感染が急激に少なくなり、その後好酸球性食道炎が増加している。また日本でも最近 *Helicobacter pylori* 感染が減少しつつある。そこで、日本においても今後好酸球性消化管疾患が益々増加していく可能性があるのではないかと考えられる。

Helicobacter pylori 感染の減少に伴って萎縮性胃炎が減少し、胃食道逆流症 (GERD) が増加しているが、GERD と好酸球性食道炎には症状や内視鏡像に類似点が多い。そこで *Helicobacter pylori* 感染の減少に伴って GERD

とともに好酸球性食道炎も増加し、今後この2疾患の鑑別診断が重要となっていくことを理解しておくことは重要であると考えられる。

好酸球性食道炎の診断において自覚症状は診断の感度と特異度が低く、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。好酸球性食道炎の縦走溝は十分な知識がない場合には逆流性食道炎の縦走びらんと混同されるがトレーニングによって確実な鑑別が可能であり、縦走溝の診断マーカーとしての認識が好酸球性食道炎の内視鏡検査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リスクを伴う生検が多数行われる可能性を低下させることが期待される。

好酸球性消化管疾患の血清診断バイオマーカーの検討では、好酸球性消化管疾患を血中の5種のサイトカインの測定値を用いて診断することは、健常者との overlap が大きく困難であると考えられた。また、病勢を評価したり、治療効果を判定することも、5種のサイトカインを測定するのみでは困難であることが明らかになった。Multiplex assay で47種のサイトカインを同時測定すると数種のサイトカインが好酸球性消化管疾患で著明な高値をとることが明らかになった。今後は他疾患においてこれらのサイトカインの測定を行い好酸球性消化管疾患のバイオマーカーとして感度とともに特異性の高いサイトカインを選定する必要がある。

好酸球性消化管疾患の生検診断の診断精度の向上を目指して健常者の消化管各部の粘膜の浸潤好酸球数の計測を行った。全消化管において健常者の粘膜浸潤好酸球数が明らかとなったことにより、現在の好酸球性胃腸炎の診断指針が over diagnosis をきたすリスクを有するものであることがわかった。早急に診断指針の改訂を行うことが必要になったと考えられ、データの確認を行った後に現在使用している診断指針を改訂することを予定している。

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。血清バイオマーカーを見つけ出すための研究は候補分子を数種に絞るところまで進行している。

F. 研究発表

論文発表

Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, Kinoshita Y. Roles of milk fat globule-EGF factor 8 in intestinal inflammation. *Digestion*, 85: 103-107, 2012

Otani A, Ishihara S, Aziz Md. M, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Ansary Md. Mu, Kinoshita Y. Intrarectal administration of milk fat globule epidermal growth factor-8 protein ameliorates murine experimental colitis. *International Journal of Molecular Medicine*, 29: 349-356, 2012

Tamagawa Y, Ishimura N, Uno G, Yuki T, Kazumori H, Ishihara S, Amano Y, Kinoshita Y. Notch signaling pathway and Cdx2 expression in development of Barrett's esophagus. *Laboratory Investigation*, 92: 896-909, 2012

Shimura S, Hamamoto N, Yoshino N, Kushiya Y, Fujishiro H, Komazawa Y, Furuta K, Ishihara S, Adachi K, Kinoshita Y. Diarrhea caused by PPI administration: comparison among lansoprazole, rebeprazole, and omeprazole. *Current Therapeutic Research*, 73: 112-120, 2012

Nishiura H, Kido M, Aoki N, Iwamoto S, Maruoka R, Ikeda A, Chiba T, Ziegler SF, Watanabe N. Increased

susceptibility to autoimmune gastritis in thymic stromal Lymphopietin receptor-deficient mice. The Journal of Immunology, 188: 190-197, 2012

Yamaga Y, Tsugihashi Y, Nakamura T, Taniguchi T, Honjou G, Kage M. Sinusoidal obstructive syndrome with hypereosinophilia successfully treated with prednisolone. Clinical Journal of Gastroenterology, 5: 24-30, 2012

Manabe N, Haruma K, Hoshihara Y, Kinoshita Y, Hongo M, Makuuchi H. Interobserver agreement on endoscopic diagnosis of low-grade reflux esophagitis, including minimal changes. Esophagus, 9: 9-16, 2012

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 murin. 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