

## 母乳中 miRNA によるアトピー性疾患発症予防法の検討

研究代表者：大嶋 勇成（医学部・准教授）  
共同研究者：村井宏生（医学部・助教）、安富素子（医学部・助教）  
岡崎新太郎（医学部・大学院生）、河北亜希子（医学部・大学院生）  
林仁幸子（医学部・大学院生）

概 要	母乳栄養は乳児期のアレルギー発症に影響することが示唆されているが、母乳中のどのような成分が関与しているか不明の点が多い。本研究では、母乳中のマイクロ RNA（以下 miRNA）が授乳児のアトピー性疾患に関連するかを検討した。その結果、一方、母乳中には T 細胞の抑制や炎症の制御に関係するとされている miR-155 や Th1 分化を抑制すると報告されている miR-21 が検出された。また、miR-155 はアトピー性疾患を発症した児が摂取した母乳中で有意に高値であり、miR-21 はアレルギー歴のある母体から出生しかつアトピー性疾患を発症した児が摂取した母乳で高い傾向が認められた。以上の結果より、母乳中の miRNA は児のアトピー性疾患の発症に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。
関連キーワード	microRNA、母乳、アトピー性疾患、アトピー、バイオマーカー

### 研究の背景および目的

食物アレルギーやアトピー性皮膚炎などのアトピー性疾患の発症には遺伝的素因とともに、環境因子が関与すると考えられている。母乳は乳児期のアレルギー発症に影響することが示唆されているが、どのような成分が重要であるか、また、その影響が児のその後のアレルギー発症に防衛的に作用するのか、あるいは促進的に作用するかについては、現在のところ一定の結論が出ていない。

マイクロ RNA (miRNA) は他の遺伝子に対して相補的な配列を有し、その遺伝子の発現制御に関与している。miRNA の中には、標的細胞に内在性、あるいは外因性に働くことで、Th2 サイトカインおよびサイトカインレセプター機能に影響するものや、制御性 T 細胞の機能や分化に影響するものが報告されている。近年、エクソソーム内に存在

する miRNA が細胞間のメッセンジャー的役割を担うことが報告されており、母乳中のエクソソームも miRNA を介して母子間の免疫応答機能の伝達に関わる可能性が示唆されている。

これまで、アトピー性疾患の発症に影響する母乳成分としては、サイトカインが注目されてきたが、本研究では母乳中に含まれ Th2 細胞や制御性 T 細胞の機能や分化に影響を与える可能性のある miRNA 量に着目し、母親のアトピー素因が、母乳中の miRNA 発現量にどのような影響をあたえるか、また、母乳中の miRNA の発現量、発現パターンの違いが、その母乳を摂取した授乳児のその後のアトピー性疾患発症にどのような影響を与えるかを検討した。

### 研究の内容および成果

#### 1) 対象と方法

杉田玄白記念公立小浜病院で出産し、本研究に参加することの同意が得られた母子を対象とした。

母親のアトピー素因やアレルギー歴などを調査し、産後の3-5日目に、母乳を採取した。児に関しては、生後10か月健診時に哺乳歴、アレルギー歴、および臨床症を調査した。

アトピー性疾患発症児と未発症児の比較を行う上で、両群の対象者数が異なるため、あらかじめアレルギー性疾患を発症した児とほぼ同一の出生時体重、在胎週数を持つ児を対象ペアとして選び、

母乳中 miRNA 測定の対象とした。

母乳中の miRNA は、mirVana Paris Kit (Ambion, Carlsbad, CA) を用いて small RNA を抽出、逆転写を行った後、T 細胞の抑制や炎症の制御に関係するとされている miR-155 と Th1 分化を抑制すると報告されている miR-21 を定量的 PCR を用いて、 $\Delta\Delta CT$  法により測定した。House keeping miRNA として U6 量を測定し、相対的発現量を求めた。

#### 2) 結果

i) 対象症例の背景

アトピー性疾患発症群と未発症群間で、母親のアトピー素因、同胞のアトピー素因、出生体重および、在胎週数は2有意な差を認めなかった。アトピー素因のある母体出生の児がアレルギー疾患である可能性は、アトピー素因のない母体より出生した、児がアレルギー疾患である可能性と、統計学的に有意な差は認めなかった。

	アトピー性疾患発症群	アトピー性疾患未発症群
対象数	12名	12名
児のアトピー性疾患	FA 3名 AD 6名 FA/AD 2名 AA 1名	0名
母親のアトピー性疾患	AR 3名 AD 1名 AR/AD 2名	AR 3名 AD 1名 AR/AD 2名
出生週数週	37.9 (32-40)	39.0(37-41)
出生体重g	2799(1678-3622)	2915(2554-3528)

FA:食物アレルギー、AD:アトピー性皮膚炎、AA:喘息、AR:アレルギー性鼻炎

ii) 母乳中 miRNA とアトピー性疾患発症との関係

母乳中のエクソソーム分画からは miR-155、miR-21 を検出することが出来た。

アトピー性疾患発症群の母乳中には非発症群に比べ、miR-155 が多く検出された(図.1 p=0.0133)。

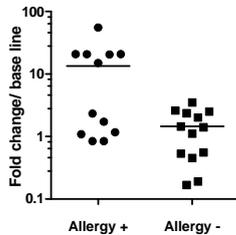


図 1. 母乳中の miR-155 の発現量の比較

しかし、母体のアレルギー歴や同胞のアレルギー歴の有無と母乳中 miR-155 量は相関を認めなかった。アトピー性疾患発症群の中でも miR155 の発現量が比較的多いものと比較的小さいものの存在が示唆されたが、この違いを規定する因子を明らかにすることは症例数が少なく出来なかった。

miR-21 の発現に関しては、アトピー性疾患発症群と非発症群との間に有意な差を認めなかったが、母親のアトピー素因の有無を考慮した場合、アトピー性疾患がある母より出生し、その後アトピー性疾患を発症した児の摂取した母乳中の miR-21 の発現量は多い傾向を示した (図 2)。

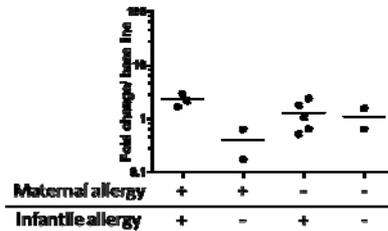


図 2. 母乳中の miR-21 の発現量比較

3) 考察

miR-155 は TLR リガンド、炎症性サイトカインなどの複数の炎症制御に関係することや、T 細胞の負の制御分子である CTLA4 の発現を抑制することが報告されている。また、気管支喘息やアトピー性皮膚炎の患者血清中に miR-155 の上昇を認めるとの報告がある。一方、miR-21 は IL-12p35 の発現を抑制することで、Th1/Th2 バランスを Th2 にシフトする役割があることが報告されている。今回の予備的な解析により、後にアトピー性疾患を発症した児が摂取した母乳中に miR-155, miR-21 が多く含まれていたことより、これらの miRNA がその後のアレルギー疾患の発症に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 1) Biotin and carnitine deficiency in infants with milk allergy due to hypoallergic formula nutrition. *Pediatr Int* (2014) in press
- 2) Mucosal immunity and the onset of allergic disease *Allergol Int* 62:279-289(2013)
- 3) Biotin and carnitine profiles in preterm infants in Japan *Pediatr Int* 55:342-346(2013)  
「特記事項」国際学会発表
- 1) Airway epithelial cells exposed to alternaria release IL-18 independent of NALP3/Caspase-1 pathway by inducing

autophagy and NF-κB activation (AAAAI annual meeting 2014, San Diego USA

- 2) IOS Is Useful In Younger Children Who Cannot Perform Spirometry (AAAAI annual meeting 2014, San Diego USA

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」  
食物アレルギーに対する制御性 T 細胞誘導を利用した経皮免疫療法の開発 基盤研究(C) 代表 (H25-H27)