

アレルギー疾患のトランスクリプトーム解析Ⅱ 新規アレルギー疾患マーカーとしての扁平上皮細胞癌抗原(SCCA)の同定

出原賢治¹⁾

(KEYWORDS) マイクロアレイ, SCCA, IL-13

1. はじめに

ヒトゲノムプロジェクトが終了してポストゲノム時代となった現在、「トランスクリプトーム」に大きな関心が払われている。トランスクリプトームとは、遺伝子が mRNA として転写された状態全体を指している。トランスクリプトームが注目を浴びている理由は、一般に、ある細胞においてある時点では、遺伝子全体の約 5% しか転写されておらず、ほとんどの遺伝子は活性化されていないことが挙げられる。また、トランスクリプトームを解析することにより、様々な疾患の原因を明らかにできると期待されていることも挙げられる。マイクロアレイはトランスクリプトームを解析する最も強力な道具である。マイクロアレイを用いることにより、数千の遺伝子に関する発現解析を同時に、しかも比較的簡便に行うことが可能となっている。本稿では、われわれがマイクロアレイ法を用いて新規のアレルギー疾患診断マーカーを同定した試みについて紹介したい。それ以外の気管支喘息に対するマイクロアレイの応用については、他の総説を参考にさせていただきたい¹⁾。

2. IL-13 の気管支喘息発症における重要性

本雑誌でも述べているように、気管支喘息の発症に Th2 型サイトカインが関与していることは確かなものとなっているが、さらに、Th2 型サイトカインの中でも特に IL-13 が中心的な役割を果たしていると考えられるようになってい

る²⁾。その理由として以下のことが挙げられる。①気管支喘息の病変部位では、IL-13 を含む Th2 型サイトカインの発現が恒常的に起こっているか、あるいはアレルゲンチャレンジにより増強している。②IL-13, IL-4 レセプター α 鎖, STAT6 といった IL-13 シグナル伝達分子のノックアウトマウスの解析により、IL-13 シグナルが気道過敏性の誘導に重要であることが示されている。③いくつかの IL-13 シグナル伝達分子と気管支喘息の発症の間で遺伝学的に相関が認められている。

IL-13 の気管支喘息発症への関与としては、以前は B 細胞における IgE へのスイッチング, Th2 型細胞の誘導, 肥満細胞の活性化といった免疫系細胞への作用が中心だと考えられていた。しかし、マウスにおける解析から直接 IL-13 が気道組織の非免疫系細胞に作用することが重要であると考えられるようになった²⁾(図 1)。実際、非免疫系細胞に対する IL-13 の作用についても解析が進み、気管支上皮細胞に対しては、TGF- β , エオタキシン 3, 塩素イオンチャンネルである CLCA 1(マウスでは CLCA 3)の発現誘導, ムチン産生を、線維芽細胞に対しては、エオタキシン, インテグリンの発現, 増殖作用を、気管支平滑筋細胞に対しては、エオタキシン発現, 収縮増強作用を引き起こすことが知られている²⁾。

3. マイクロアレイ法による気管支上皮細胞における IL-13 誘導遺伝子の同定

われわれは、Affymetrix 社の 5,600 個の既知遺伝子に相当するオリゴヌクレオチドが付着して

1) IZUHARA Kenji 佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野/佐賀大学医学部附属地域医療科学教育研究センター重点医療研究部門

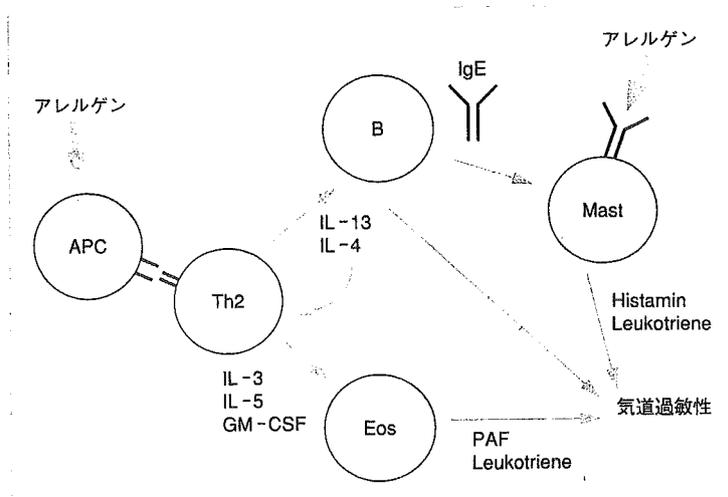


図1 気管支喘息におけるIL-13の役割
 気管支喘息において、IL-13はB細胞に対してIgE産生を誘導するとともに、気道組織に直接作用して気管支喘息の病態形成に関与している。

表1 IL-13による気管支上皮細胞での誘導遺伝子

- *squamous cell carcinoma antigen 1
- *squamous cell carcinoma antigen 2
- *DD 96
- *KAL 1
- periostin
- tenascin-C
- carboxypeptidase M
- IL-13 R α 2
- cathepsin C
- dioxin-inducible cytochrome P 450
- carbonic anhydrase II
- endothelin-A receptor

* 気管支喘息病変部位で発現増強している遺伝子

あるHuGeneFL Arrayを用いて気管支上皮細胞におけるIL-13誘導遺伝子を同定した³⁾。正常ヒト気管支上皮細胞をIL-13で24時間刺激した後RNAを回収し、それを用いて解析を行ったところ、12遺伝子が再現性よく誘導されたが(表1)、これらの中で発現誘導が最も強かった遺伝子は、squamous cell carcinoma antigen(SCCA)1とSCCA2であった。さらに定量的PCRとELISA法により気管支上皮細胞がSCCA蛋白質を産生するとともに分泌していることを確認した。

4. 気管支喘息の診断マーカーとしてのSCCA
 SCCAと気管支喘息との関連を明らかにするために、喘息患者と正常者の気道組織におけるSCCAの発現を解析した³⁾。4人のアトピー性正

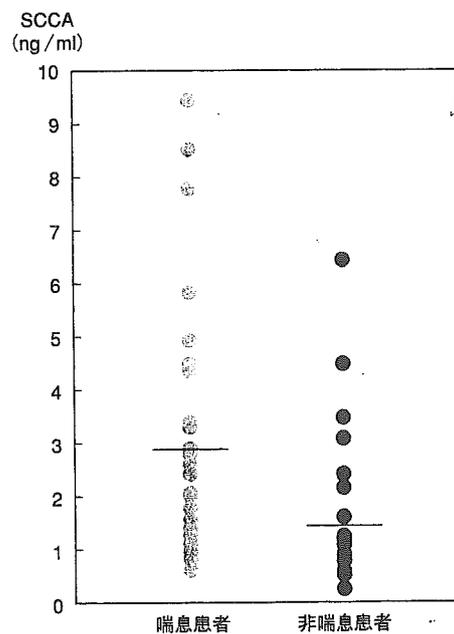


図2 気管支喘息患者における血中SCCAレベル
 気管支喘息患者と非気管支喘息患者における血中SCCAレベルを示した。喘息患者において有意にSCCAレベルが高くなっていることがわかる。
 [文献3)を改変して引用]

常者と3人のアトピー性喘息患者に気管支生検を行い、得られたRNAをプールしてライブラリーを作製し、それぞれのライブラリーからランダムに約4,000強個のクローンを選択してシーケン

スを行った。その結果、SCCAの発現は喘息患者の病変部位で正常者に比べて著明に強くなっていた(11クローン対3クローン)。

次に、気管支喘息患者の気道組織で発現が増強しているSCCAが、血中でのSCCAレベルにも影響を与えているか解析を行った^{3,4)}。佐賀大学小児科を受診した気管支喘息患者と非喘息患者(アレルギー歴がなく、炎症所見も示していない患者)の血中SCCAレベルを測定したところ、気管支喘息患者では有意に血中SCCAレベルが上昇していた(図2)。血中SCCAレベルは発作時に上昇しており、発作の改善により血中レベルは低下した。さらに、血中IL-13値と相関を示した。これらのことより、気管支喘息患者(特に小児)では、血中SCCA値を気管支喘息の病態を評価する上で有用なマーカーであることが明らかとなった。

5. アトピー性皮膚炎の診断マーカーとしてのSCCA

次にSCCAが気管支喘息のみならず、アトピー性皮膚炎の診断マーカーとなりうるか解析を行った(Mitsuishi K, et al, unpublished data)。順天堂大学皮膚科を受診したアトピー性皮膚炎患者の皮膚組織を解析したところ、患者の病変部ではSCCAの発現が増強していた一方で、健常部では増強は見られなかった。さらに、血中SCCAレベルと種々の臨床病態あるいは検査マーカーを比較したところ、臨床的重症度、好酸球数、LDH値と非常によく相関した。これらのことより、SCCAは気管支喘息のみならず、アトピー性皮膚炎の病態を示す有用なマーカーにもなりうるということが明らかとなった。

6. SCCAの生体内での役割

SCCAが気管支喘息、アトピー性皮膚炎といったアレルギー疾患の診断マーカーとなりうることを述べてきたが、それではSCCAの生体内での役割は何なのだろうか？ SCCA1とSCCA2はともにセルピンと呼ばれるセリンプロテアーゼインヒビターであり、SCCA1はパパイン、カテプシンS、K、Lといったシステインプロテアーゼを、一方、SCCA2はカテプシンG、キマーゼといったセリンプロテアーゼを阻害することが知られている^{5,6)}(図3)。われわれは主要なダニアレ

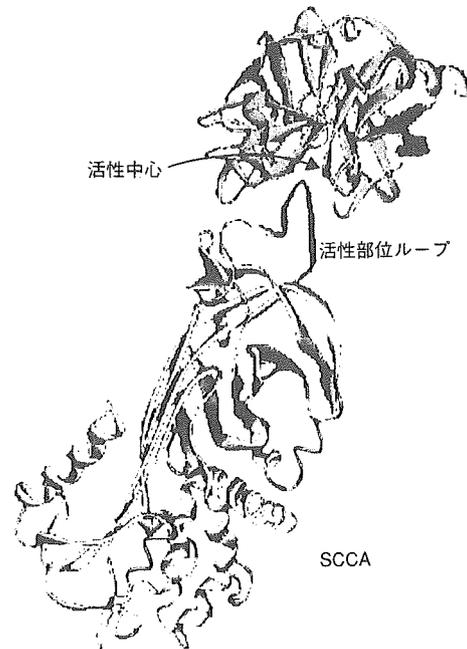


図3 SCCA1, SCCA2の機能と構造

SCCA1はパパイン、カテプシンS、K、Lといったシステインプロテアーゼを阻害する一方で、SCCA2はカテプシンG、キマーゼといったセリンプロテアーゼに加えてシステインプロテアーゼであるDer p1も阻害する。SCCA1, SCCA2ともに活性部位ループを活性中心に挿入して、酵素活性を阻害する。

標的プロテアーゼ

- SCCA1(SERPINB3)
 - パパイン
 - cathepsin K
 - cathepsin L
 - cathepsin S
- SCCA2(SERPINB4)
 - mast cell chymase
 - cathepsin G
 - Der p1

ルゲンであり、システインプロテアーゼであるDer p1あるいはDer f1をSCCA1とSCCA2の両方が、また特にSCCA2が強力に阻害することを見出した⁷⁾。このことから、微生物など生体への侵入によりIL-13が産生され、その微生物由来の外来性システインプロテアーゼを阻害する作用をもっているのかもしれない。一方で、そのように産生されたSCCAが内在性のプロテアーゼを阻害して局所のホメオスタシスを乱している可能性も考えられる。

7. おわりに

気管支喘息あるいはアトピー性皮膚炎の新規の

診断マーカーとして SCCA を同定した。今後この SCCA と臨床像とのさらなる詳細な関連性について検討することが望まれる。また、今回の試みのようにマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析は、疾患の診断あるいは治療において有用な方法であると考えられた。

文 献

- 1) Izuhara K, Arima K, Yuyama N, et al : Application of functional genomics to bronchial asthma. *Curr Pharmacogenomics* 2 : 351-356, 2004
- 2) Izuhara K, Arima K : Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma. *Drug News Perspect* 17 : 91-98, 2004
- 3) Yuyama N, Davies DE, Akaiwa M, et al : Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine* 19 : 287-296, 2002
- 4) Nishi N, Miyazaki M, Tsuji K, et al : Squamous cell carcinoma related antigen (SCCA) in children with acute asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 94 : 391-397, 2005
- 5) Izuhara K : The role of interleukin-4 and interleukin-13 in the non-immunologic aspects of asthma pathogenesis. *Clin Chem Lab Med* 41 : 860-864, 2003
- 6) Masumoto K, Sakata Y, Arima K, et al : Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1. *J Biol Chem* 278 : 45296-45304, 2003
- 7) Sakata Y, Arima K, Takai T, et al : The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1. *J Biol Chem* 279 : 5081-5087, 2004

お知らせ

お知らせ

千里ライフサイエンス技術講習会 第42回 [SNP, DNA チップの最新技術と応用]

日時 2005年11月4日(金)午後1時~5時

場所 千里ライフサイエンスセンタービル6階(展示場)

(地下鉄御堂筋線千里中央駅北口すぐ)

ねらい ゲノムデータが整備され、ゲノム解析技術も新しい局面を迎えている。短期間に全ゲノムの SNP を鳥瞰できるようになり、また DNA チップも遺伝子発現解析以外の種々の応用も可能になっている。本講習会ではこれらの進歩をふまえ、両技術の基本から最新の応用まで習得する。

コーディネーター

戸田達史 大阪大学大学院 医学系研究科 臨床遺伝学教授

プログラム

講義1: SNP 解析の基礎と応用

講義2: DNA チップによる解析と最新技術

実習: 実際の解析機器での講習とデータ解析

講師 戸田達史 大阪大学大学院 医学系研究科 臨床遺伝学 教授

油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センターゲノムサ

イエンス 教授

定員 30名

参加費 5,000円

申込方法 氏名、勤務先、所属、役職名、〒、所在地、電話および FAX 番号を明記の上、郵便、FAX または E-mail で下記宛お申し込み下さい。事務局より受付の通知を返送いたしますので、そこに記載した振込先口座に参加費をお振込みください。入金を確認後、通常1週間以内に領収書兼参加証をお届けいたします。

申込締切 2005年9月30日(財団必着)。但し、定員を超過した場合は参加者の調整を行う場合があります。

申込先 (財)千里ライフサイエンス振興財団

技術講習会 G 42 係

☎ 560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2

千里ライフサイエンスセンタービル8階

☎ 06-6873-2001 FAX 06-6873-2002

E-mail tnb-lsf@senri-lc.co.jp

(注 lsf ; エルエスエフ, lc ; エルシー)