

2. アレルギー・アトピー性疾患における トランスクリプトーム解析

斎藤 博久*

現在、軽症のものを含めるとアレルギー疾患罹患率は日本で約3割と推定され、その背景となるスギやダニなどに対する普遍的なアレルゲンに対する感作率も増加している。環境に応答するゲノムの機能的役割を理解するためのトランスクリプトーム解析は、マイクロアレイ技術の急速な開発に伴い、約5万種類の遺伝子の発現レベルを同時測定することも可能となり、本来の意味である網羅的解析がほぼ実現している。マイクロアレイ技術の最大の利点は、通常的手法では予期できない新規病態分子の発見が可能にある。これが機能未報告の分子であれば、知的財産となる可能性がある。また、機能が知られていても、従来の学説を覆すような細胞に発現していることが判明する場合もある(例: マスト細胞における major basic protein の発見)。網羅的に各種臓器・細胞を比較解析することにより、細胞特異的に発現する分子を同定することも可能になる。

われわれは、アレルギー炎症に関係する細胞にのみ発現し、他の細胞には発現せず、さらに炎症反応制御および創薬上、重要な G 蛋白共役型受容体(GPCR)やイオンチャンネルを絞り込むことに成功している。このように、マイクロアレイによって得られたデータベースを解析することにより、アレルギー炎症に関与するが他の生理的に重要な臓器に発現していない、すなわち副作用の考えられない創薬標的分子を絞り込むことが可能である。将来的には、網羅的な分子解析によりコンピューター内での細胞機能のシミュレーションが可能になっていくと予想される。われわれは、すでにマウスのマスト細胞とヒトマスト細胞のトランスクリプトーム比較解析を発表しているが、将来マウスによる実験結果を、ヒトの細胞をもちいた結果としてシミュレーションすることも夢ではない。

Transcriptome analysis of allergic diseases

HIROHISA SAITO Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development



*さいとう・ひろひさ：国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部長。昭和52年東京慈恵会医科大学卒業。昭和61年ジョンスホプキンス大学免疫学フェロー。平成6年国立相模原病院小児科医長。平成8年国立小児病院小児医療研究センター免疫アレルギー研究部長。平成14年現職。主研究領域/ゲノム医学。マスト細胞生物学。

Key words

マイクロアレイ
オルトログ遺伝子
マスト細胞
トランスクリプトーム

1. トランスクリプトーム解析とは

ヒトのもつすべての遺伝情報(ゲノム)が記号(配列)として完全に解読されたことにより、ゲノムの示している意味を知るためのさまざまな手段(プローブ・機器)が急速に整備されつつある。アレルギー疾患病態に関しても、それらの手段を応用して、一塩基多型 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) などゲノム配列の個人差により疾患発症予測を行うことを目的とした遺伝子多様性解析研究や、病態に応じて発現変動する分子を根こそぎ同定するためのトランスクリプトーム(網羅的遺伝子発現)解析研究などが広く行われている。従来、遺伝子発現解析手法には Northern hybridization, Differential Display, SAGE (Serial analysis of gene expression) などが比較的良好に用いられていた。しかしながら、網羅的な解析としてはどの方法も不十分であった。一方、マイクロアレイは1回の実験で1万種類以上の遺伝子の発現量を定量できることから、網羅的な遺伝子発現解析ツールとして最も注目されている。本稿では、われわれがいままでに行ってきた DNA チップをもちいたアレルギー疾患関連のトランスクリプトーム解析を中心に、他施設からの報告も交え、以下に2つの研究手法の違いを強調して解説する。

2. アレルギー疾患関連遺伝子探索

トランスクリプトーム解析により、アレルギー病態に深く関与する新規分子、いままでのその機能が知られていなかった分子などが発見されている。

国立成育医療センター(旧・国立小児病院)では、1996年よりジェノックス創薬研究所との共同研究を、また2000年より理化学研究

所横浜研究所などとの多くの施設との共同研究であるミレニアムプロジェクトにおいて、喘息等アレルギー疾患関連遺伝子探索、特に病態に応じて発現の変動する遺伝子、分子のゲノムワイドな探索を行ってきた。病態関連発現遺伝子探索の目的は、疾患発症予測を確立することではなく、新たな診断方法の確立や薬剤標的分子の発見ということである。2003年に終了した前者のプロジェクトでは、すでに770の新規アレルギー関連遺伝子を発見し、特許を申請している。重症アレルギー疾患患者由来のT細胞や単球で著しく発現変動する既知遺伝子としては、ケモカイン受容体 CCR4 や Toll-like receptor 2, 4, 6(以上増加)、IL-12、インターフェロン γ (以上減少)など見いだしている。また、インターフェロンなどのTh1サイトカイン遺伝子発現を抑制するシグナル伝達分子である SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) 遺伝子の発現が、重症アトピー性皮膚炎および重症気管支喘息患者において発現上昇していることを見いだしている¹⁾。これらの分子の発見は、詳細なアレルギー疾患病態解析や遺伝子多様性解析の新規候補遺伝子の対象として有用である。

ヒトのマスト細胞などアレルギー炎症細胞特異的遺伝子群を同定する目的で各種細胞のトランスクリプトームをオリゴヌクレオチド・マイクロアレイ(アフィメトリックス社の GeneChip)をもちいて比較したところ、今まで好酸球特異的と考えられてきた強い組織傷害性を有する MBP (major basic protein) がマスト細胞にも強く発現していることが判明した(図1)²⁾。数年前までアレルギー疾患治療開発の最大の標的と考えられていた好酸球に代わって、マスト細胞の重要性が注目されていることは周知の通りである。

喘息モデル動物の肺組織や喘息患者気管支組織において arginase が増加しており、それ

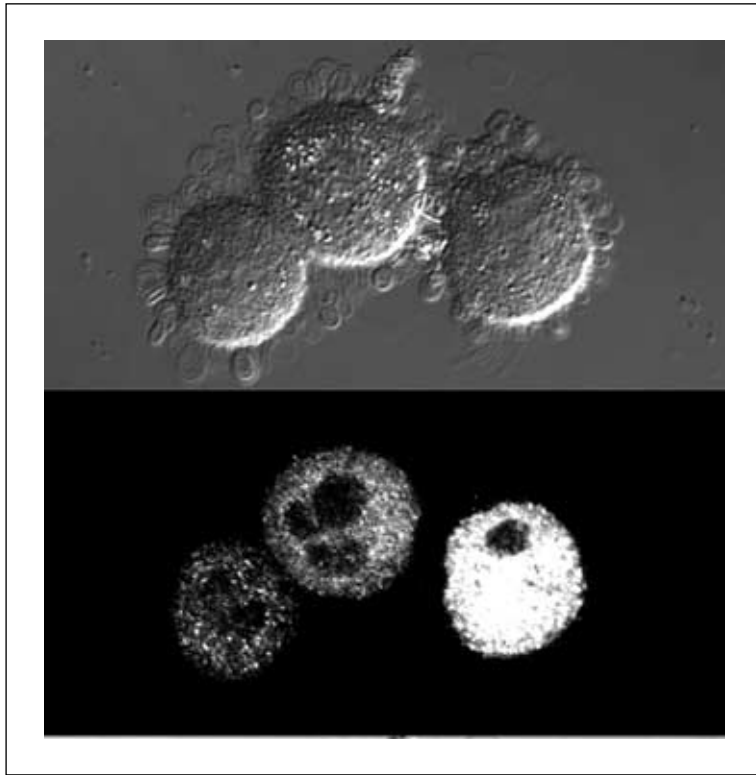


図 1 ヒト・マスト細胞における major basic protein (MBP) の発見

GeneChip による各種細胞網羅的遺伝子発現解析の結果、偶然、マスト細胞が MBP を高発現していることを発見し、共焦点レーザー顕微鏡にて蛋白質としても存在することを確認した（上：位相差，下抗 MBP 抗体染色）。

が気道過敏性等にかかわることも GeneChip をもちいて同定されている³⁾。さらに、GeneChip をもちいることにより、樹状細胞特異的発現遺伝子として同定され、機能解析により、IL-10 により発現増加し、樹状細胞のさらなる活性化を抑制する免疫調節分子であることが判明した thrombospondin の発見も注目される⁴⁾。

これらのトランスクリプトーム解析研究の多くは、学問的な新事実の発見とともに知的財産権の取得や新規薬剤開発にかかわるシーズの発見に貢献してきた。特にオリゴヌクレオチド・アレイは測定精度も上がり、臨床応用の段階に入っている。

3. システムバイオロジーへの貢献

網羅的解析の本来の意義は、いままで数種類しか定量できなかったものが、数万種類定量できるようになったということではない。全ての情報を知るという点が重要である。トランスクリプトーム解析により、新規疾患関連単一分子を探索する研究のほかに、ある薬剤の細胞や臓器、個体に与える影響を総合的に評価する報告も散見されるようになっていく。

Toll-like receptor を活性化し、アレルギー疾患治療薬として実用段階に入っている CpG モチーフ、あるいは LPS をもちいて、ヒ

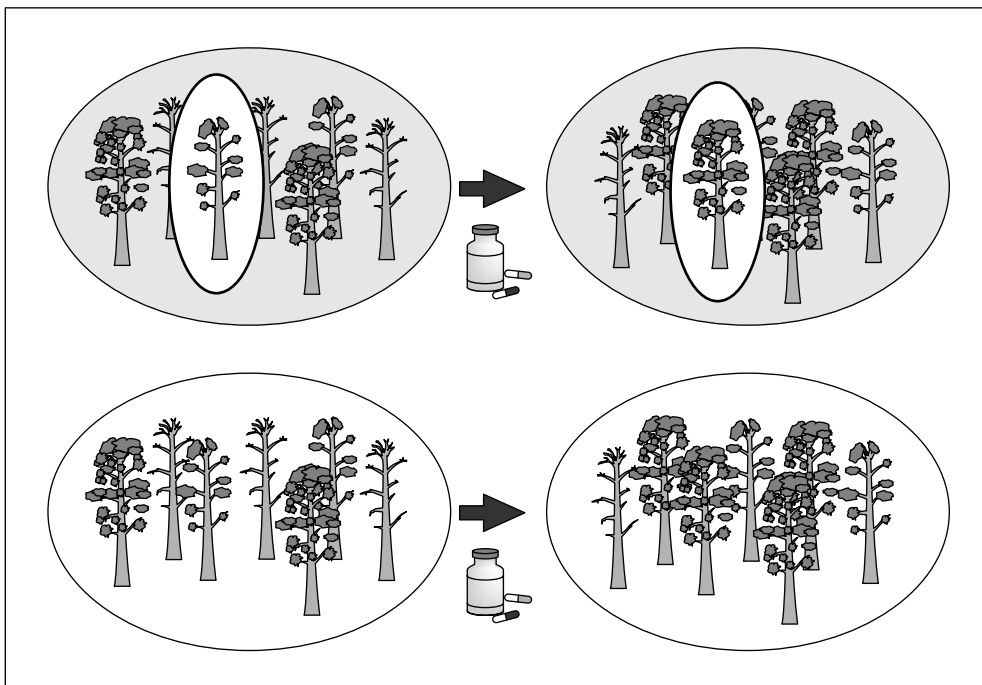


図2 網羅的遺伝子・分子発現解析による副作用の予知

従来の検査法では、一部の情報により、全体の大まかな評価が行われていた(上図)。しかし、網羅的解析を行うことにより、従来予期し得なかった副作用を検知することが可能になると期待される(下図。薬剤投与により左端の木が枯れていることに注意)。

ト末梢血単核細胞を刺激しトランスクリプトーム解析を行うと、CpG はTh1 細胞関連分子を強く誘導するが、炎症関連分子や調節性T細胞関連分子の誘導は弱く、LPS では炎症関連分子誘導能が非常に強いことがわかった⁵⁾。このようにCpGモチーフなどの薬効を、抗アレルギー効果とともに、生体に好ましくない副作用をも含めて総合的に理解することも可能になってきた(図2)。

好中球、好酸球、好塩基球の3種類の顆粒球とマスト細胞は炎症刺激により顆粒内のメディエーター等を放出し、感染防御に作用する。その中で、好中球以外の3種類の細胞は、寄生虫感染防御やアレルギー反応に重要な役割を演じている。したがって、これらの細胞のみを特異的に標的とした薬剤開発は、副作用回避という面で重要である。脱顆粒反応に

かわる分子としては、G蛋白質結合受容体(GPCR)やカルシウムチャンネルなどのイオンチャンネルが最も重要である。現在使用されているすべての薬剤の標的となっている遺伝子はわずか500種類である。これらは受容体などの開発しやすいものがほとんどである。これらの創薬標的となり得る遺伝子の数は、多く見積もっても全ゲノムの中の5%程度、つまり2,000程度であろうと推定されている⁶⁾。われわれは、各血球分画のトランスクリプトームを解析し、データベースを構築している(図3)が、これら創薬標的遺伝子の中で、アレルギー炎症に関与する好酸球、好塩基球、マスト細胞のみに発現し、感染防御等に関与する好中球やリンパ球あるいは心臓や脳などの重要臓器に発現していない遺伝子を同定している⁷⁾。これらの分子に対する薬

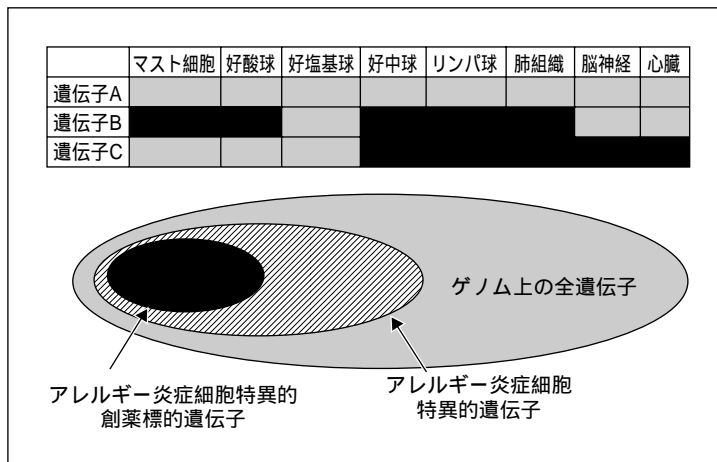


図3 アレルギー炎症細胞特異的創薬標的遺伝子の絞り込み

各種血球・臓器網羅的遺伝子発現データベースよりマスト細胞,好酸球,好塩基球にのみ発現するものを絞り込んだ(上図,遺伝子Cが相当)。そして,さらに,これらの遺伝子を GPCR などの創薬標的遺伝子の情報にて絞り込むことに成功した(下図)。

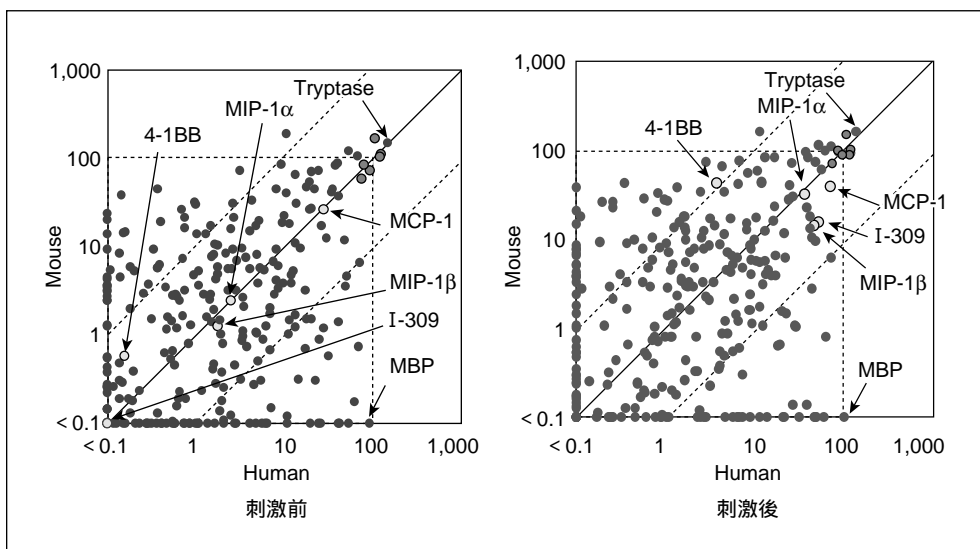


図4 ヒトとマウスのオルトログ遺伝子発現比較解析

ヒトおよびマウスのマスト細胞を IgE 受容体を介した刺激を行い,前後で網羅的遺伝子発現解析を行った。I-309 などの CC ケモカイン遺伝子発現調節はヒトとマウスでよく保存されていたが,MBP 遺伝子はヒト・マスト細胞のみで発現していた。

剤はアレルギー炎症のみを選択的に抑制し,他の生理的機能を抑制しないと予想されるので,副作用のない薬剤開発が期待される。こ

のように,ゲノム配列情報により,トランスクリプトーム解析が可能になり,それらの情報をもちいた効率的な薬剤開発が可能になっ

ている。

マウスとヒトのマスト細胞の配列相同性(オルトログ)遺伝子の発現パターンの異同を総合的に探索することも行われている。マウス実験喘息モデルにおいては、好酸球を標的とした抗IL-5療法が有効であったが、ヒトでは著効を示さなかった。マウスは古くからヒト疾患モデルとして使用され、医学の発展に大いに貢献してきた。マウスで有効であったアレルギー治療薬剤がヒトで無効である例は後を絶たない。このような状況において、ヒトとマウスの共通点と相違点を整理することは急務であると思われる。そこでわれわれは、ヒトおよびマウスのマスト細胞をIgEで感作後、抗IgE抗体あるいは抗原で刺激し、遺伝子発現の変動を網羅的に検討した。その結果、IgE抗体を介した刺激によりマスト細胞はケミカルメディエーターやサイトカインのみならずCCケモカインを産生し、アレルギーの炎症部位へ種々の免疫細胞を集積させる機構は、マウスとヒトにおいて非常によく保存されていることが判明したが、多くの遺伝子がヒトあるいはマウスのいずれか一方のマスト細胞のみに発現していた(図4)。なお、MBPはマウスのマスト細胞には存在しなかった⁸⁾。

これらの研究は、アレルギー病態に重要と思われる一分子を同定することが目的ではなく、CpGなどの薬剤やマスト細胞という細胞の総合的な働きを理解することを目的としている。それらを理解することにより、今までは予期できなかった副作用を予測できるようになる等のメリットが期待されている。ヒトとマウスのオルトログ遺伝子比較発現解析研究に関しては、ヒト疾患組織等を探索して発見された創薬標的遺伝子の機能解析を、マウス疾患モデルを用いた実験により確認できるかどうか予測するというような応用が可能で

ある。また、これらの情報を利用することにより、将来的に動物実験による病態関連分子の動態をヒトのオルトログ遺伝子の発現パターンに合わせて補正し、ヒトの病態のシミュレーション・データベースに登録することも将来的に可能になると期待される。いずれにしても、このような試みが進行していくと将来的には、細胞に含まれる全分子の働きをコンピューター内に再構築することが可能になり、それらをシミュレートすることにより疾患治療薬や発症予防法の選択が行われるようになるであろうと予測されている。

〔文献〕

- 1) Seki Y, Inoue H, Nagata N, *et al* : SOCS-3 regulates onset and maintenance of Th2-mediated allergic responses. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1047 - 1054.
- 2) Nakajima T, Matsumoto K, Suto H, *et al* : Gene expression screening of human mast cells and eosinophils using high-density oligonucleotide probe arrays : Abundant expression of major basic protein in mast cells. *Blood* 2001 ; 98 : 1127 - 1134.
- 3) Zimmermann N, King NE, Laporte J, *et al* : Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 2003 ; 111 : 1863 - 1874
- 4) Doyen V, Rubio M, Braun D, *et al* : Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 1277 - 1283.
- 5) Kato A, Homma T, Batchelor J, *et al* : Interferon- α/β receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide 2006. *BMC Immunol* 2003 ; 4 : 8 (On-line issue)
- 6) Zambrowicz BP, Sands AT : Knockouts model the 100 best-selling drugs. Will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov* 2003 ; 2 : 38 - 51.
- 7) Nakajima T, Iikura M, Okayama Y, *et al* : Identification of granulocyte subtype-selective receptors and ion channels by using a high-density oligonucleotide probe array. *J Allergy Clin Immunol* 2004 ; 133 : 528 - 535.
- 8) Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, *et al* : Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fc ϵ receptor I cross-linking : An interspecies comparison. *Blood* 2002 ; 100 : 3861 - 3868.

質 疑 応 答

座長(奥村) どうもありがとうございます。先生は小児科の患者を診ておられますか。

斎藤 今は休止しています。

福井裕行(徳島大) ranscriptome で多くの遺伝子産物が上がったり下がったりしますが、それがあつ一つのまとまりとして、さらにそれを統括する生理活性物質により調節する遺伝子などいくつかのグループに分けることは可能なのでしょうか。また、そういった研究はあるのでしょうか。

斎藤 bioinformatic として、それらを統括する転写因子や、クロマチンのリモデリング

などが実際にこれらの情報から推測できるかということでしょうか。これはデータベースがかなり揃ってきて、8割がたは大丈夫になってきているようです。私は実際にみていないのですが、下の先生に聞いたところではそのように言っていました。そしてそのソフトもかなり使いやすいものができてきて、この分野は進歩が非常に速いですから、あと2~3年もすれば、ボタンを一つ押すと、このパターンから、ここに関係している転写因子は何かということがすぐに出るようになるのではないかと考えています。

座長 斎藤先生、大変面白いお話をありがとうございました。