総 説

特集：遺伝子チップを用いた臨床免疫研究の最前線

アレルギー疾患への応用

斎藤 博久

Application to Allergic Diseases

Hirohisa SAITO

Department of Allergy & Immunology, National Research Institute for Child Health & Development

(Received February 7, 2005)

summary

The increasing prevalence of allergic diseases in developed countries is considered to be caused, at least in part, by rapid improvement of human hygiene. In human beings, the immune system developed as an ingenious device for defending against frequent attacks by microbes. Therefore, our immune system seems to have become deranged in our recent, unprecedentedly hygienic environment. It is now necessary to understand the total functional elements comprising the immune system, not just a single molecule present in an immunocyte working in our immune system. Microarray analysis is now becoming capable of detecting the whole transcripts present in a cell. It is anticipated that we can understand the deranged human immunity using the system biology. It is also expected to predict previously unexpected drug-related adverse events caused by interaction of a drug with responsible molecules present in vital organs.

Key words——allergy; microarray; systems biology

抄 録

ゲノム科学の成果を基盤に、コンピュータサイエンスなどの手段を利用・開発し、システムレベルでの生命の原理を研究すると共に、創薬などに応用しようという研究分野である「システム・バイオロジー」が急速に発展している。人類の進化の過程において細菌やウィルスの侵入など日常的な擾乱に対して発達した免疫システムは、想定していない擾乱、すなわち抗生物質による無菌状態下における大量の花粉飛散などの状態に対して極めて脆弱である。したがって、増加し続けるアレルギー疾患病態を理解し、適切な予防治療方法を開発するためには、システムとしての理解が求められている。また、システムを理解することにより、今までは予測できなかった薬剤の副作用をあらかじめ予測できるようになる等の画期的なメリットが期待されている。本稿では、アレルギー炎症細胞特異的に発現し、副作用が少ないと予想される創薬標的遺伝子の発見を含めて遺伝子チップ（マイクロアレイ）をもちいたアレルギー疾患病態システム解析のいくつかの試みについて概説する。

1. はじめに

ヒトをはじめ各生物において、全ゲノム配列の解読が次々と終了している。これらのゲノム科学の成果を基盤に、コンピュータサイエンスなどの手段を利用・開発し、システムレベルでの生命の原理を研究すると共に、創薬などに応用しようという研究分野と定義されたシステム・バイオロジーが急速に発展している¹⁾。20世紀後半より急速に増えたアレルギー疾患罹患率は、今は先進工業諸国において30%を超え、ありふれたアレルゲンに反応してIgE

抗体を産生しやすいアトピー素因の保有者は我が国の青年では9割に達している。アトピー素因はヘルパーT細胞ではTh2細胞が優位な状態と理解される。この原因としては、細菌由来のエンドトキシンレベルが高い環境で乳児期を過ごした場合、衛生的な環境で育った場合と比較して統計学的にアレルギー発症率が低いという衛生環境仮説が想定されている。そのメカニズムとして、乳児期において頻回にエンドトキシンなどの微生物由来の分子と遭遇しない限り過剰なアレルギー反応を抑制するTh1細胞や抑制性T細胞は発達することができないためであるといわれている²⁾。人類の進化の過程において細菌やウィルスの侵入など日常的な擾乱に対して

発達した免疫システムは、想定していない擾乱，すなわち抗生物質による無菌状態下における大量の花粉飛散などの状態に対して極めて脆弱である。したがって，増加し続けるアレルギー疾患病態を理解し，適切な予防治療方法を開発するためには，システムとしての理解が求められている。本稿では，アレルギー炎症細胞特異的に発現し，副作用が少ないと予想される創薬標的遺伝子の発見を含めて遺伝子チップ（マイクロアレイ）をもちいたアレルギー疾患病態システム解析のいくつかの試みについて概説する。

2. uA オリゴヌクレオチド・マイクロアレイと cDNA マイクロアレイ

マイクロアレイは DNA チップや遺伝子チップとも呼ばれ，主に多種類の遺伝子 mRNA の発現を同時に測定する装置のことである。そして，様々な遺伝子の全長 cDNA をスライドガラス上に貼り付けた cDNA マイクロアレイ³⁾とシリコンチップ上にオリゴヌクレオチドを合成して作成したオリゴヌクレオチド・マイクロアレイ（Affymetrix 社の GeneChip など）の 2 種類に大別される。

特許の対象となるような未知遺伝子・分子を探索する場合，未知の遺伝子配列を含む全長 cDNA をプローブとして使用した cDNA マイクロアレイ法の方が既知の配列を合成した GeneChip よりも有用であるといわれていた。しかし，ヒトゲノム配列解析が終了し，ヒトの遺伝子が 2~3 万程度であると推察されるに至った現在，有限であるヒトゲノムのほとんどすべての遺伝子は既に GeneChip などオリゴヌクレオチド・マイクロアレイのプローブ上に存在するようになった。また，以前はマイクロアレイ研究の利点は，ハイスループット，つまり少量のサンプルを用いて一度に複数の遺伝子の発現が解析できるという便利さであった。しかし，ほとんどすべての遺伝子発現が定量できるようになった現在，状況は一変した。すなわち，「すべての遺伝子について解析してしまった，つまり他にはもう可能性が残っていない」ということ自体に意味がでてきたのである。通常の候補遺伝子の検索では，誘導されなかった遺伝子は注目されないが，網羅的な解析では膨大な遺伝子群が「誘導されないこと」まで同時に確認できる。発現全遺伝子の構造から機能を類推することにより，細胞全体の機能を評価することも不可能ではなくなった。ただし，現時点でのマイクロアレ

イによる網羅的な遺伝子発現解析法は感度の低さなどの問題もあり，重要な発見に関しては蛋白質の発現も含めて他の方法を組みあわせて確認することが必要である。

3. ハイスループットな利点を生かしたマイクロアレイ研究

国立小児病院とジェノックス創薬研究所を中心に 1996 から 2003 年に行われた共同研究において，喘息やアトピー性皮膚炎等，アレルギー患者由来の細胞で発現変動する多くの新規遺伝子や今まで機能がよく知られていなかった遺伝子が発見されている。その中には重症アトピー性皮膚炎，気管支喘息患者における 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 遺伝子発現の発現増加の発見などがある⁴⁾。その他にも，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，ケモカイン受容体 CCR4 や Toll 様受容体 2, 4, 6（以上増加），IL-12，インターフェロン γ （以上減少）が確認されている^{5,6)}。

このような試みは世界各国で行われていて NIH では Gene Expression Omnibus (GEO) と名付けたサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) で喘息患者由来細胞を使ったマイクロアレイ解析の全データを公開している。GDS266 という database では 5 名の重症気管支喘息患者，15 名の軽症気管支喘息患者および 6 名の非アトピー対照者から採取した末梢血 CD4 陽性 T 細胞における遺伝子の発現を Affymetrix GeneChip U133A を用いて網羅的に解析している。このデータを全て自分のコンピュータにダウンロードして解析することも可能である。残念ながら，このデータの質はあまり高くなく，CD4 陽性細胞であるはずなのに，明らかに単球由来の分子の発現が高いものもあり，各グループ間の再現性に疑問がある。

患者由来のサンプルを使用した実験に比較すると，条件を厳密に設定することのできるマウス喘息モデルをもちいたマイクロアレイ解析は有利であり，実際，権威ある国際雑誌に成果が発表されることが多い。例えば，2 種類の気管支喘息モデルで arginase I と arginase II が共通に発現上昇していることを見だし，それが IL-4 や IL-13 によって誘導されることを示し，最終的に気管支喘息患者で増加していることを確認した論文などである⁷⁾。

4. システム・バイオロジーをもちいたアレルギー疾患発症予防戦略

人類は微生物に対する防御を目的として、非常に巧妙なシステムとしての免疫系を発達させてきた。しかしながら、われわれの免疫システムは微生物の脅威に対応して発達してきたため、現代社会の様な衛生的環境と、それに引き続く花粉などのアレルゲンの曝露に対しては極めて脆弱であると思われる。衛生的環境下における免疫細胞の反応性をシステムとして解析し理解することが必要であると思われる。この様なシステム・バイオロジー¹⁾の概念は、その必要性が以前から認識されていたが、ゲノム配列解析終了とマイクロアレイ技術の発展に伴い急速に浸透しつつある。

乳幼児における微生物に誘発される免疫反応の変化としては自然免疫系が重要である。自然免疫系は微生物に特有な構造を認識する Toll 様受容体 (TLR) を介して感染防止に関与しているのみならず、宿主の免疫をアレルギー性免疫反応 (Th2) から非アレルギー性免疫反応 (Th1) へとシフトさせる。現在までに、10 種類のヒト TLR が同定されている⁸⁾。したがって、乳幼児期において将来のアレルギー疾患発症を予防するためには、TLR リガンド、すなわち微生物成分を刺激することが十分に期待される。しかし、エンドトキシン等の TLR リガンドの中には、激しい組織炎症を誘発するため臓器障害を生じるものもある。TLR 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、あるいはエンドトキシンをもちい、ヒト末梢血単核細胞を刺激しマイクロアレイ解析を行うと、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、エンドトキシンでは炎症関連分子誘導能が非常に強いことがわかった⁹⁾。この様に TLR リガンドなどの薬効を、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。

5. システム・バイオロジーをもちいた創薬研究

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。脱顆粒反応に関わる分子としては 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全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うる遺伝子の数は、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¹⁰⁾。Nakajima ら¹¹⁾は、各血球分画の全遺伝子発現レベ

	マスト細胞	好酸球	好塩基球	好中球	リンパ球	肺組織	脳神経	心臓
遺伝子A								
遺伝子B								
遺伝子C

図1 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・臓器網羅の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2 システム解析によるマスト細胞特異的ステロイド薬抵抗性サイトカインの発見
マスト細胞を IgE 抗体を介した刺激で活性化すると数時間後には IL-13 などのサイトカインが分泌される。それらのほとんどは事前のステロイド薬処理で抑制されるが、アンフィレギュリンの産生は抑制されない (本文参照)。

図3 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、薬剤投与により左の木が枯れていることに注意)

ルを測定し、これら創薬標的遺伝子の中で、アレルギ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 (図1)。これらの分子に対する薬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。この様に、ゲノム配列情報により、網羅的遺伝子発現解析が可能になり、それらの情報を用いた効率的な薬剤開発が可能になっている。

喘息治療の第一選択薬は吸入ステロイド薬であり、今後の創薬標的としてはステロイド薬によって治療されにくい組織リモデリング (病的再構築) や喀痰排出過多などの病態に対する責任分子が重要である。マスト細胞は即時型アレルギー反応、好酸球性炎症反応の惹起以外に組織リモデリングに重要な働きを演じていることが判明している。そこで、Okumura ら¹²⁾は、活性化マスト細胞特異的に発現している遺伝子の中で、ステロイド薬処理により抑制されず、リモデリングを惹起すると想定されるものをマイクロアレイ・データより探索した結果、ア

ンフィレギュリン (AREG) を見いだした。実際、正常気道上皮と比して喘息患者由来気道上皮では AREG 陽性マスト細胞が著しく増加していること、AREG 処理した気道上皮細胞では過剰な喀痰排出に関わる MUC5A 遺伝子の発現が誘導されることも確認されている (図 2)。

マウスとヒトのマスト細胞の配列相同性 (オルソログ) 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、Nakajima ら¹³⁾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。その結果は、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。なお、MBP はマウスのマスト細胞には存在しなかった。

ヒトとマウスのオルソ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ソログ遺伝子の発現パターンにあわせて補正し、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。

6. おわりに

システム・バイオロジーに基づく創薬研究では、一つの分子や反応経路を同定することが目的ではなく、全ての反応経路や分子の働きを理解することが目標である。そのことにより、今までは予期できなかった副作用をあらかじめ予測できるようになる等の

メリットが期待される。測定対象物が 1 から 1 万になるということは単なる量的な変化に過ぎないが、100%の情報を定量できるとなると、これは全く意味が違う。臨床治験の有効性と安全性の評価は数千人の対象者について臨床情報と数十種類の蛋白質等の検査に基づいて判定される。しかし、実際に市場に出て、さらに多くの対象者に使用されると予期しない副作用が出現する¹⁴⁾。100%の情報を把握することとは、従来予測不可能であったこれらの副作用も予測できる (図 3) ということを意味する。この様なシステム解析手法は、今後、加速度的に発展し、臨床にも応用されていくことであろう。事実、一つ一つの分子を探索する時代は終わりに近づき、21 世紀はシステム・バイオロジーの時代であるといわれている。システム解析成果が蓄積していくことにより、将来的にはコンピューター内 (in silico) に細胞を構築することが可能になる。さらに臓器内のシステム解析、生体内のシステム解析と発展することにより数十年後には、実際に薬剤を投与することなく、個人の遺伝子多型情報を “in silico ヒトモデル” に入力することによりその有効性と安全性が確認できるようになるであろう。

文 献

- 1) Kitano H. : Systems biology : a brief overview. *Science*. **295** : 1662–1664, 2002.
- 2) Holla AD, Roy SR, Liu AH. : Endotoxin, atopy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. **2** : 141, 2002.
- 3) Seki Y, Inoue H, Nagata N, et al. : Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) regulates onset and maintenance of type 2 helper T cell mediated allergic responses. *Nat Med*. **9** : 1047, 2003.
- 4) Heishi M, Kagaya S, Katsunuma T, Nakajima T, Yuki K, Akasawa A, Maeda M, Gunji S, Sugita Y, Tsujimoto G, Saito H. : High-density oligonucleotide array analysis of mRNA transcripts in severe atopic dermatitis patients' peripheral blood cells. *Int Arch Allergy Immunol*. **129** : 57–66, 2002.
- 5) Nagata N, Oshida T, NL, Yuyama-Ohtani N, Sugita Y, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H. : Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patients. *Int Arch Allergy Immunol*. **132** : 156–167, 2003.

- 6) Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME. : Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest.* **111** : 1863–1874, 2003.
- 7) Takeda K, Kaisho T, Akira S. : Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* **21** : 335–376, 2003.
- 8) Kato A, Ogasawara T, Homma T, Saito H, Matsumoto K. : lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN- α/β signaling pathway in human monocytes. *J Immunol.* **172** : 6185–6194, 2004.
- 9) Hopkins AL, Groom CR. : The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* **1** : 727–730, 2002.
- 10) Nakajima T, Iikura M, Okayama Y, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H. : Identification of granulocyte subtype-selective receptors and ion channels by using a high-density oligonucleotide probe array. *J Allergy Clin Immunol.* **113** : 528–535, 2004.
- 11) Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito H, Okayama Y. : Fc ϵ RI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* **115** : 272–279, 2005.
- 12) Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, Tanaka A, Yoshikawa M, Tamari M, Hasegawa K, Matsumoto K, Tachimoto H, Ebisawa M, Tsujimoto G, Matsuda H, Nagai H, Saito H. : 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* **100** : 3861–3868, 2002.
- 13) Trontell A. : Expecting the unexpected-drug safety, pharmacovigilance, and the prepared mind. *N Engl J Med.* **351** : 1385–1387, 2004.