アレルギーワクチン開発のためのDNAチップ研究

松本 健治 斎藤 博久

国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部

1. はじめに

欧米各国や本邦の共同で行われた Human Genome Projectによって、ヒトの遺伝子のほぼ全貌が明らかとなった。このことは同時にポストゲノム時代の本格的な始まりを意味する。本稿ではゲノム・21世紀型ポストゲノムを小児アレルギー診療にどのように展開するかの一例として、遺伝子の網羅的な発現解析手法にスポットを当て、その臨床応用や研究領域での応用法を概説し、さらに当研究室で行っているDNAチップを用いたアレルギーワクチン開発のための基礎研究の一端を紹介する。

2. 遺伝子配列研究と遺伝子発現研究

遺伝子研究には遺伝子配列研究と遺伝子発現研究の二つの分野がある。遺伝子の配列は両親から半分づつ受け継ぎ、また一生変え変わらないことから、体質などの家族性の素因を規定すると考えられている。1916年にCookeらによって気管支喘息や花粉症、湿疹などのアレルギー疾患に家族集積性が認められることが報告され、以後多くの研究者によってアレルギー疾患の遺伝様式の検索が行われてきた。しかしアレルギー疾患の遺伝は単一遺伝子による優生遺伝や劣性遺伝などでは説明が困難であり、現在は複数の遺伝子と生後の環境要因¹⁾が発症に関与している多因子多遺伝子性疾患であると考えられている。

喘息の発症に関わる遺伝子（疾患感受性遺伝子）の配列の具体的な検索には全ゲノム連鎖解析と候補遺伝子解析の二つの方法がある。全ゲノム連鎖解析は主に気管支喘息患者が多く含まれる家系や兄弟などを対象として、全遺伝子中の既知のDNAマーカーを用いて連鎖解析を行い、どの遺伝子のどのあたりに疾患の発症に関わる遺伝子があるかを検索する手法である。気管支喘息の発症について本邦では筑波大学の研究グループなどが精力的に研究を行っている²⁾。一方、候補遺伝子解析は既知の遺伝子で気道の過敏性を亢進させる

因子やIgE抗体の産生を促進する因子などを候補として、その遺伝子の多型（SNP）を発症群と対照群で比較して病態への関与を検討する手法である。これまでに50以上の遺伝子について気管支喘息患者と健常者で配列に差があることが報告されており、本邦でも理化学研究所や岐阜大学の研究グループなどが精力的に研究を行っている³⁾。これらの遺伝子は大きく分けてIgEの産生に関与するもの、気道の過敏性に関与するもの、炎症の形成に関与するものなど、様々な機能の分子が含まれており、今後も更に報告が増えるものと考えられる。

もう一つの分野は遺伝子の発現解析である。

3. 遺伝子の網羅的な発現解析手法

現在までに比較的良く用いられている遺伝子の網羅的な発現解析手法であるNorthern hybridization, differential display⁴⁾, serial analysis of gene expression (SAGE)⁵⁾, DNA chip (microarray)⁶⁾, GeneChip Affymetrix⁷⁾の特徴とその長所および短所を表1に示す。いずれの手法にもそれぞれの長所と短所があるので、その点を良く理解した上で用いることが肝要である。重要なことは、遺伝子の網羅的な発現解析法は細胞機能や組織の病変、生体の病変の解析のための分子生物学的な手法の一つであり、病態関連遺伝子などの候補分子を見つけるための単なるスクリーニングにすぎない、ということである。

mRNAの測定はpolymerase chain reaction (PCR) 法の開発などによって1990年代ごろから飛躍的に改善され、現在ではわずか1.2cm四方のチップ上で一度に約2万種類の遺伝子の発現を定量する技法（マイクロアレイ法、GeneChip法など）も普及してきている。発現解析では炎症を起こしている組織をbiopsyなどによって採取して、その組織内で強く発現誘導されている遺伝子を検索したり、疾患モデル動物の組織内でのmRNAの測定や、培養細胞や血球細胞に試験管内で疾患の病態を模した刺激（たとえば、気管支喘息ではIL-4やTNF- α などのサイトカイン）を加えることにより

表1 遺伝子発現解析法

	長所	短所	文献 a
Northern hybridization	転写産物のサイズと正確な発現量が測定可能	操作が大変で大量処理には向かない	多数
Differential Display	少量のRNAで多数の試料を同時に比較可能。未知の分子を検出することができる	定量性がない 再現性が低い	4)
SAGE (serial analysis of gene expression)	比較的大量の転写産物を短時間で処理可能	操作が大変で、多検体の解析には適していない	5)
DNA Chip (Microarray)	多数の遺伝子の発現を同時に解析可能	2 検体間の比較。コストは比較的安い、感度の問題あり	6)
GeneChip (Affymetrix)	1万個以上の遺伝子の発現を網羅的に解析可能	コストが高い。感度の問題あり	29)

a: 特にアレルギーに関係したものだけを記載した

発現誘導される遺伝子を様々な手法で定量することによって行われる。その遺伝子が実際にどの程度発現しているか、病態でどう変化するか、疾患の重症度でどう変化するかを定量することによって、その病態の形成機序が明らかにされる可能性がある。あるいは病態に深く関連するマーカーとなる分子が見いだされる可能性がある。

4. 遺伝子の網羅的な発現解析手法の臨床への応用

a. mRNA 測定の advantage

現在の臨床検査における末梢血検査は主として蛋白質の定量を行って診断に活かされている。しかし、蛋白質の定量は多くの血清を必要とするために特に小児科領域においては制約が多い。さらに蛋白質の発現にはmRNAの発現よりさらに長い時間が必要であるために迅速性に欠ける場合がある。一方mRNAの測定は遺伝子解析手法の進歩によって微量のサンプルから一度に他種類の遺伝子の発現解析を可能となっている。この方法を用いると、複数の遺伝子群の発現パターンの特徴からその病態の本態をよりリアルタイムにかつ正確に判定しうる可能性がある。

b. 未知の副作用の予見

現在の薬剤の開発には、ある検出系で多数の化合物

をスクリーニングして、目的とする活性のある分子を発見し、動物実験などを経て安全性を確認して臨床応用するという手法がある。この場合、その薬剤に目的とする活性があることは当然だが、それ以外に望ましくない副作用が生じる可能性がある。動物実験や臨床試験によっても検出されない副作用が薬剤の発売後に報告されることもしばしば経験される。このような未知の副作用の予見に *in vitro* や *in vivo* での網羅的な遺伝子発現解析は有用であると考えられる。

5. 遺伝子の網羅的な発現解析手法の研究への応用

新しい分子生物学的な機序の同定もしくは活性化などの経路の解析

臨床的、疫学的に明かな現象があるが、その機序が不明な場合に、*in vitro* や *in vivo* で同様の刺激を模した系を作成し、その細胞（群）や組織を用いて遺伝子の網羅的な発現解析を行うことにより、分子生物学的な機序が同定される可能性がある。あるいは後述するクラスタリング解析などの手法を用いると、ある刺激で変動する、もしくはある阻害剤で阻害される一群の遺伝子が同定されうる。こうして抽出された遺伝子群は同一の活性化の経路 (cascade) を介している可能性が強く予測されることから、遺伝子の網羅的な発現解析によって活性化の経路を明かにすることができる。

6. Hygiene Hypothesis と自然免疫系の活性化

a. アレルギー疾患の発症

近年、気管支喘息を初めとするアレルギー疾患の罹患頻度は年々高くなってきており、中でも先進工業国において特にその頻度が高くなっていることが知られている⁸⁾。アレルギー疾患の発症には多くの因子が関わっていることが知られているが、それらの因子は遺伝的素因と、環境因子などを含む後天性素因の大きく二つに分類される⁹⁻¹²⁾。遺伝的素因がこの数年で変化したとは考えにくいことから、近年、何らかの環境要因の変化によってIgE抗体の産生（アトピー素因）の亢進や、臓器特異的過敏性を亢進が誘導されたと考えることは非常に理に適っている。

この環境要因の変化を解析し、さらにそれらの環境要因がどのようにしてヒトの免疫系に影響を与えるのか、どのような免疫系の活性化が、どのような遺伝子の発現を介してアレルギーの発症を抑制するのかを明らかにし、さらにこの活性化を逆手にとってアレルギーの発症を抑制するワクチンを作り出すことが当研究室の現在行っている研究の最終目標である。

b. 古典的な Hygiene Hypothesis

1989年にStrachan DPらは、どのような環境要因がアレルギー疾患の発症を抑制するかを疫学的に検討し、気管支喘息や湿疹の有病率は同胞の数に反比例しており、またその効果は年少の同胞の数よりも年長の同胞の数に大きく依存している事を明かにした¹³⁾。また、この論文の考察で著者らはこの現象が起こる要因として感染の機会の増加が関与しているのではないかと推察し、非衛生的に年長児から感染を貰うことによってアレルギー疾患の発症が防がれるのではないかとする“Hygiene Hypothesis”を提唱した。また、年長の同胞の影響が大きく、年少の同胞の影響が少ないことは生後早期のほうが成長してからよりもこのような感染の影響を受けやすいことを示唆すると考えた。その後、このような予防効果は気管支喘息の発症だけでなくIgE抗体の陽性頻度（アトピー素因）にも影響を与えていること、さらにこの予防効果は同胞でなくとも生後早期に保育園（Day nursery）に預けられることでも同様であることなどが報告された¹⁴⁾。さらに、Illi Sらは幼小児期の上気道感染はその頻度が多くなればなるほどその後のアトピー素因の獲得を防ぐ効果があることを追試報告した¹⁵⁾。一方、このような感染による気

管支喘息発症の抑制は乳幼児期までの感染に限ってその効果があることも追試された。

c. 環境中の endotoxin

一方、上述した感染症だけでは説明できない現象も数多く報告されてきた。たとえばStrachan DPらは年長の同胞の存在がアトピー体質の獲得を抑制すると最初に報告したが、その後年長の同胞が兄である場合と姉である場合を比較して、兄の存在には抑制効果が認められるが、姉の存在はその効果が非常に弱いことを報告した¹⁶⁾。また、Braun-Fahrlander Cらは農家（特に家畜を飼育している）で生まれた、もしくは幼小児期を過ごした子供はその後のアレルギー疾患の発症もアトピー体質の獲得も非常に少ないことを報告した¹⁷⁾。さらにAlm JSらは非文明的な共同生活をしている子供達においてもアトピー体質の獲得が有意に低いことを報告した¹⁸⁾。また近年のアレルギー疾患の罹患頻度の増加は少子化だけでは説明できないことも明らかとなった¹⁹⁾。これらの事実は感染症の多寡だけでなく、他の因子もアトピー体質の獲得に大きく関与していることを強く示唆する。2000年、Gereda JEらは3回以上喘鳴をきたした乳幼児のうちで、IgE抗体陽性の児の家庭内粉塵中に含まれる家庭内のendotoxin量は、IgE抗体陰性の児のそれよりも有意に少なく、また家庭内のendotoxin量にはIFN- γ 産生性CD4陽性細胞と正の相関が認められたと報告した²⁰⁾。さらにその後、農家（特に家畜を飼育している）の家庭内粉塵中に含まれるendotoxin量は、勤務労働者の家庭やそれ以外の地域の家庭に比して著しく多いことも報告された^{1, 21)}。

これらの事実は顕性感染症だけでなく、乳幼児期を過ごした環境内に含まれるendotoxinに対する慢性的な曝露が何らかの免疫学的な機序を介して強力にアレルギー疾患の発症やアトピー体質の獲得を抑制する可能性を示唆している。

d. 結核菌に対する暴露やBCGの接種

Shirakawa Tらはツベルクリン反応の程度がIgE抗体の陽性率や気管支喘息の発症に逆相関することを報告し²²⁾、結核菌自体が宿主の免疫応答を変容させ得る可能性を示唆した。これを受けて、von Hertzen Lらは女性においては小児期の結核感染は気管支喘息の発症に予防的に作用することを報告した²³⁾。さらに結核の罹患頻度の高い国では気管支喘息の発症頻度が低いことも報告されており²⁴⁾、結核菌に対する曝露は結核の発

症に至らなくともアレルギー疾患の発症やアトピー素因の獲得に強く関与していると考えられる。また、これらの報告は弱毒化した結核菌の接種であるBCGに人為的なアトピーやアレルギーの予防効果がある可能性を示唆する。実際にAaby Pらは、BCGを生後早期に行えば行うほどアトピー素因の獲得を抑制する可能性があることをコホート研究で明らかにした²⁵⁾。しかしBCG接種による発症予防には使用するBCGの株や、対象者の年齢、人種を含めた対象者の免疫状態²⁶⁾やその国の衛生状況など多くの因子が関与することも報告されている²⁷⁾。

e. 自然免疫とアレルギーの発症

それでは頻回の感染症や結核菌、環境中のendotoxinはどのような機序を介して宿主の免疫応答を制御するのであるか？その答えは、近年著しい注目を集めている自然免疫系の活性化であろうと思われる。自然免疫系とは広く種を越えて保存された、細菌やウイルスに対する免疫応答系である。自然免疫系の活性化は様々な経路を介して獲得免疫系（遺伝子の再構成を必要とする、抗原特異的な免疫応答）の活性化に大きく影響を与える、いわばAdjuvantの様な役割を演ずる。自然免疫系を司る分子群のうちで最も重要な役割を演じている受容体がToll-like receptors (TLRs)である²⁸⁾。乳幼児期における、ある種のTLRsを介した刺激は個体に対して二つの大きな意味を持つ。一つは生後來持っていたTh2型優位の免疫応答をTh1型優位に変化させることであり、もう一つはこのような免疫応答の変異が非常に長い期間に渡って個体の免疫応答を制御する事である。

f. TLRsを介した刺激が誘導する遺伝子群について

私達は自然免疫系の活性化がどのような分子機構を介してアレルギー疾患の発症を抑制するかを明らかにすることを目的として、TLRsを介した刺激が誘導する遺伝子群について網羅的な解析を行った²⁹⁾。具体的には、健康成人末梢血単核細胞をTLR4のligandであるlipopolysaccharide (LPS)とTLR9のligandである合成CpG含有 oligodeoxynucleotide (CpG ODN)で刺激し、6時間後に細胞を回収してtotal RNAを抽出し、型のごとく処理してGeneChip System (Affymetrix)を用いて、約10,000種類の遺伝子の発現を定量した。その結果、LPS刺激によって刺激後早期にTNF- α やIL-6, IL-1 β , COX-2などの強力な誘導が見いだされ、これらの分子

群の誘導がLPSによる重篤な炎症反応の成因となることが示唆された。一方、CpG ODN刺激ではこれらのpro-inflammatoryな遺伝子群の誘導はほとんど認められないか、あっても非常に軽度でありCpG ODNの投与が重篤な炎症を惹起しないことが分子レベルでも証明された。一方、CpG ODN刺激とLPS刺激によって共通に誘導される遺伝子群にはI型IFNによって誘導される遺伝子群が多く含まれており、中でもTh1型T細胞を特異的に遊走させるケモカインのIP-10などが見いだされ、自然免疫系の活性化によるアレルギー疾患の発症の抑制に関与している可能性が示唆された。

7. おわりに

自然免疫系の活性化刺激を誘導する物質(ワクチン)を人為的に乳幼児に投与してアレルギー疾患の発症を予防するためには、まだまだ乗り越えなくてはならない数え切れないほどのハードルが存在することは明かである。特に、このような人為的なTh1型の免疫応答の誘導が強すぎて、自己免疫疾患などを発症しないようにすることはこの研究の根幹に関わる問題である。近年、様々なタイプのregulatory T細胞と呼ばれる細胞群がアレルギー疾患と自己免疫疾患の両方の発症を抑制していることを示唆する報告^{30,31)}が散見されており、実際に自然免疫系の活性化がいかんにして、どのタイプのregulatory T細胞を誘導するのかなど、多くの疑問が残されている。

疫学的研究の成果によってHygiene Hypothesisが提唱され、それをサポートする追試結果とそれ以外の因子の存在を示唆する追試結果が蓄積された。また、この現象の機序に関する基礎研究も盛んに行われている。このような疫学-基礎研究-臨床研究のサイクルを上手く機能させるためにも、ゲノム情報を活かした網羅的な遺伝子の発現解析は非常に有効な手段といえる。今後はこれらの情報を臨床に返していくための研究が推進されなくてはならない。特にアレルギー疾患の発症予防は小児科が中心となって行っていくべき分野であると考えており、今後この方面の研究が進んで、アレルギー疾患の発症が少しでも低下することを期待してこの稿を閉じる。

文 献

- 1) Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W,

- Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufer A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347: 869-877.
- 2) Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, Nishihara M, Yamakawa-Kobayashi K, Takeda K, Imoto N, Ichikawa K, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* 2000; 66: 152-160.
 - 3) Higa S, Hirano T, Mayumi M, Hiraoka M, Ohshima Y, Nambu M, Yamaguchi E, Hizawa N, Kondo N, Matsui E, Katada Y, Miyatake A, Kawase I, Tanaka T. Association between interleukin-18 gene polymorphism 105A/C and asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1097-1102.
 - 4) Schwiebert LM, Mooney JL, Van Horn S, Gupta A, Schleimer RP. Identification of novel inducible genes in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 106-113.
 - 5) Kuramasu A, Kubota Y, Matsumoto K, Nakajima T, Sun XM, Watanabe T, Saito H, Ohtsu H. Identification of novel mast cell genes by serial analysis of gene expression in cord blood-derived mast cells. *FEBS Lett* 2001; 498: 37-41.
 - 6) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470.
 - 7) Yap G. Affymetrix, inc. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 709-711.
 - 8) Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998; 351: 1225-1232.
 - 9) Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1139-1146.
 - 10) Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, Ecochard D, Feingold J, Gormand F, Grimfeld A, Lathrop M, Matran R, Neukirch F, Paty E, Pin I, Pison C, Scheinmann P, Vervloet D, Lockhart A. EGEA (Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy)-- descriptive characteristics. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 17-21.
 - 11) von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 9-19.
 - 12) Steinke JW, Borish L, Rosenwasser LJ. 5. Genetics of hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 495-501.
 - 13) Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299: 1259-1260.
 - 14) Kramer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1999; 353: 450-454.
 - 15) Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *Bmj* 2001; 322: 390-395.
 - 16) Strachan DP, Harkins LS, Golding J. Sibship size and self-reported inhalant allergy among adult women. ALSPAC Study Team. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 151-155.
 - 17) Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC, Wuthrich B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 28-34.
 - 18) Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 1999; 353: 1485-1488.
 - 19) Wickens K, Crane J, Pearce N, Beasley R. The magnitude of the effect of smaller family sizes on the increase in the prevalence of asthma and hay fever in the United Kingdom and New Zealand. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 554-558.

- 20) Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, Liu AH. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355: 1680-1683.
- 21) Gereda JE, Klinnert MD, Price MR, Leung DY, Liu AH. Metropolitan home living conditions associated with indoor endotoxin levels. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 790-796.
- 22) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77-79.
- 23) von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T. Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1211-1214.
- 24) von Mutius E, Pearce N, Beasley R, Cheng S, von Ehrenstein O, Bjorksten B, Weiland S. International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax* 2000; 55: 449-453.
- 25) Aaby P, Shaheen SO, Heyes CB, Goudiaby A, Hall AJ, Shiell AW, Jensen H, Marchant A. Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 644-650.
- 26) Hylkema MN, Timens W, Luinge M, Van Der Werf N, Hoekstra MO. The effect of bacillus Calmette-Guerin immunization depends on the genetic predisposition to Th2-type responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 244-249.
- 27) Marks GB, Ng K, Zhou J, Toelle BG, Xuan W, Belousova EG, Mapplsc, Britton WJ. The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: An historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 541-549.
- 28) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.
- 29) Kato A, Homma T, Batchelor J, Hashimoto N, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. Interferon-alpha/beta receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide 2006. *BMC Immunol* 2003; 4: 8.
- 30) Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 263-276.
- 31) Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 771-778.