

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 7 月 31 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591010

研究課題名（和文）サルコイドーシスにおけるカテプシン S の意義に関する研究

研究課題名（英文）Investigation on the Roles of Cathepsin S in Sarcoidosis

研究代表者

山口 悦郎 (YAMAGUCHI ETSURO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：10201831

研究成果の概要（和文）：サルコイドーシスの肺胞マクロファージの網羅的遺伝子発現解析から選り出した分子の一つであるカテプシン S (CTSS) の血清濃度を、サルコイドーシスを含む種々の疾患で測定し、その臨床的意義を血清アンジオテンシン転換酵素(ACE)活性と比較した。CTSS は ACE より肺実質性疾患との鑑別能が優れていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We selected cathepsin S (CTSS) by microarray analysis of gene expression by alveolar macrophages obtained from sarcoidosis patients and compared the clinical significance of serum CTSS levels with serum activities of angiotensin converting enzyme in various diseases. We found that CTSS is superior to ACE in differentiating sarcoidosis from parenchymal lung diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成 22 年度	600,000	180,000	780,000
平成 23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,114,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：サルコイドーシス・カテプシン S・アンジオテンシン転換酵素

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスは原因不明の全身性肉芽腫性疾患で、その診断は基本的には矛盾のない病理所見と他の疾患を除外することである。しかし生体試料として必ずしも組織が得られるとは限らず、いくつかの臨床兆候や検査所見を組み合わせた診断基準が作成されている。そのうち血液検査として古典的に

重視されているのはアンジオテンシン転換酵素(ACE)である。しかしその感度は高々 50%程度である。一方特異度はかなり高いものの、塵肺では高率に陽性域に達し、甲状腺機能亢進症や肝硬変でも上昇するとの報告がある。

2. 研究の目的

上記の背景から本研究ではより感度と特異度の高い血清マーカーを、網羅的手法を用いて選び出し、その臨床的意義を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

検討対象は健常者 29 名 (年齢範囲 20-31 歳)、サルコイドーシス患者 54 名 (23-84 歳)。疾患対照として塵肺患者 150 名 (54-93 歳)、間質性肺炎患者 19 名 (56-86 歳)、COPD 患者 12 名 (64-78 歳)、喘息患者 20 名 (23-87 歳)、肝硬変症患者 20 名 (43-83 歳)、肺癌患者 11 名、肺抗酸菌症患者 17 名 (45-83 歳)、甲状腺機能亢進症患者 19 名 (20-72 歳) である。

まず非喫煙サルコイドーシス患者 4 名と、非喫煙対照患者 (肺がん疑い) 3 名で気管支肺胞洗浄を行い、それらを等量ずつプールした。得られた細胞から CD2 beads (MACS) にて CD2 陽性細胞を除去し、残った細胞分画を肺胞マクロファージとした。次いで RNA を抽出し、患者試料、対照試料ともに 5 μ g をマイクロアレイ (Codalink, Kurabo) 解析に用いた。発現が高かった遺伝子のうち、サルコイドーシスの病態に照らし合わせて関連が深いと思われるいくつかの分子を選択した。そのうち蛋白の測定系が ELISA kit として入手可能なカテプシン S (CTSS) とカテプシン D (CTSD) を中心に検討した。

血清 CTSS 濃度は、300 倍希釈後に Human Cathepsin S Duo Set^R (R & D) を用いて測定した。ACE 活性は ACE Color^R (Fuji Rebio) を使用して測定した。CTSD は SensoLyte 520 Cathepsin D Assay Kit (Anaspec) を用いて測定した。

検討群全体の濃度変動が有意であるか否かは、Kruskal-Wallis 検定により評価した。2 群間の差は Mann-Whitney U test 後、Bonferroni 補正を行った。サルコイドーシ

スと種々の疾患との鑑別のためのカットオフ値は、ROC curve を用いて解析した。CTSS と ACE の相関は、Spearman 順位相関係数により評価した。ROC curve の比較検定は、ROKIT program (http://www-radiology.uchicago.edu/krl/KRL_ROC/software_index6.htm) を用いて実施した。

4. 研究成果

血清 CTSS 濃度は、健常者と比較し間質性肺炎、塵肺、肝硬変症、甲状腺機能亢進症、肺抗酸菌症で上昇していた (データ非提示)。サルコイドーシスでは、それら 5 疾患の内、肝硬変症を除く疾患対照より血清 CTSS 濃度は有意に高値であった (図 1)。

ACE についてはサルコイドーシス以外に肝硬変症と甲状腺機能亢進症で健常者より上昇していた (データ非提示)。疾患間の比較では、CTSS 同様にサルコイドーシスは肝硬変症を除くすべての疾患より有意に上昇していた。

サルコイドーシスと塵肺の鑑別に関して、CTSS の ROC 解析では曲線下面積は 0.87 (0.82-0.92, 帰無仮説である曲線下面積=0.5 に関して $p<0.001$) と十分に高値であり、CTSS 濃度 72ng/ml における感度は 78%、特異度は 79% であった。

ACE についても同様に ROC カーブによる解析を行うと、曲線下面積は 0.70 (0.61-0.79, $p<0.001$) で、ACE 活性 13.9 IU/l 37 $^{\circ}$ C における感度は 68%、特異度は 69% とやや低値であった。曲線下面積は CTSS の方が ACE のそれより有意に高かった ($p<0.05$) (データ非提示)。

実際の臨床では喘息や COPD、肝硬変症などの肺野に陰影を呈さない疾患とサルコイドーシスの鑑別が問題となることはない。そこで活動性のあるサルコイドーシスと、肺実

質に陰影を呈しサルコイドーシスとの鑑別
の対象となる実質性肺疾患（間質性肺炎、塵
肺、肺抗酸菌症）に関する ROC 解析を行っ
た（図 3）。CTSS について曲線下面積は 0.88
（0.78-0.97、 $p<0.001$ ）、CTSS 82 ng/ml にお
ける感度は 80%、特異度は 79%だった。ACE
については曲線下面積が 0.74（0.62-0.86、
 $p<0.05$ ）であり、有意に CTSS の方が高かつ
た。ACE 15 IU/l 37°Cでの感度は 70%、特異
度は 77%だった。

血清 CTSS 濃度と血清 ACE 活性は、健常
者と全患者を含めると全体として有意な相
関を示した（ $p=0.371$, $p<0.0001$ ）。しかしその
相関係数はさほど高値ではなく、両者が高い
領域では分布が拡散する様相を示した。

以上より血清 CTSS 濃度は、疾患特異性は
高くはないが疾患によっては ACE より高い
鑑別能を有する有用なマーカーと言える。

一方 microarray 解析では、CTSD も高い
発現が見られており、その血清濃度も測定し
た。しかし血清 CTSD 濃度は、健常者と比較
してサルコイドーシス患者では有意な上昇
を認めなかった（データ非提示）。したがっ
て肺胞マクロファージでの mRNA の発現が、
血清蛋白として反映されない場合もあるこ
とが分かった。

一方 microarray 解析で発現がもっとも亢
進していた LRAP (Leucocyte-derived
arginine aminopeptidase)については、その
ELISA 系が未整備であり、そのマーカーとし
ての可能性についても今後検討の余地があ
ると考えている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

Yamaguchi E. et al. The role of serum

cathepsin S levels in sarcoidosis.
European Respiratory Society Barcelona
2010, (Sept 2010, Barcelona Spain)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 悦郎 (YAMAGUCHI ETSURO)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：10201831

(2) 研究分担者

馬場 研二 (BABA KENJI)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：80211499
高橋 大輔 (TAKAHASHI DAISUKE)
愛知医科大学・医学部・助教
研究者番号：00431370

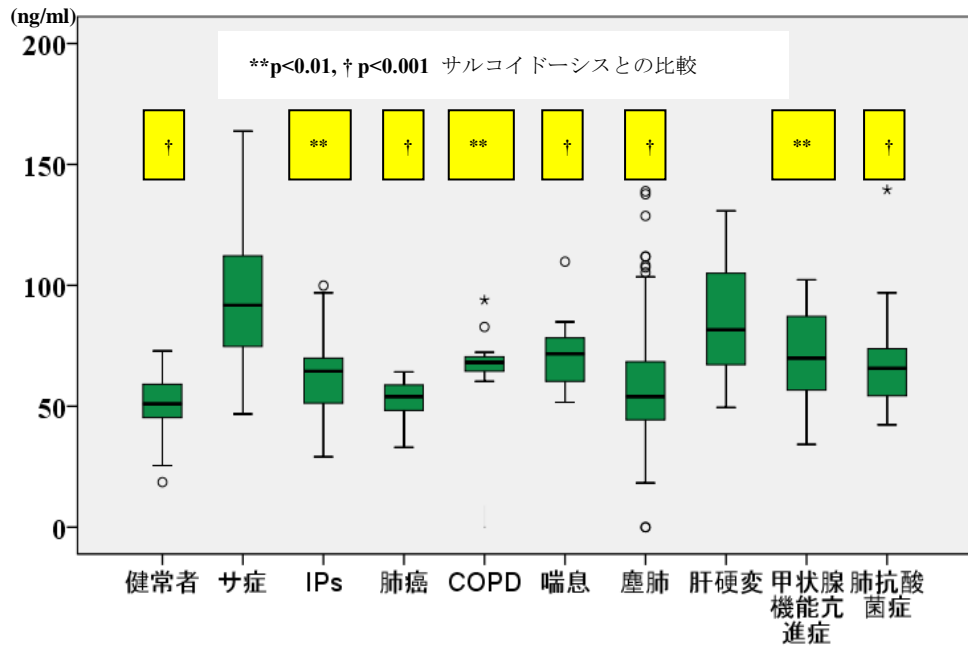


図1. 血清 CTSS 濃度

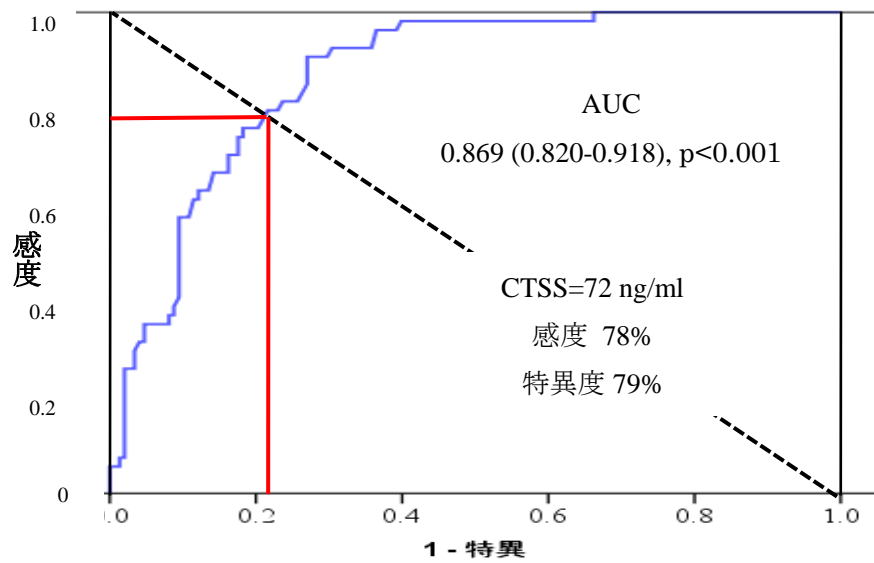


図2. CTSS 濃度によるサルコイドーシスと塵肺の鑑別

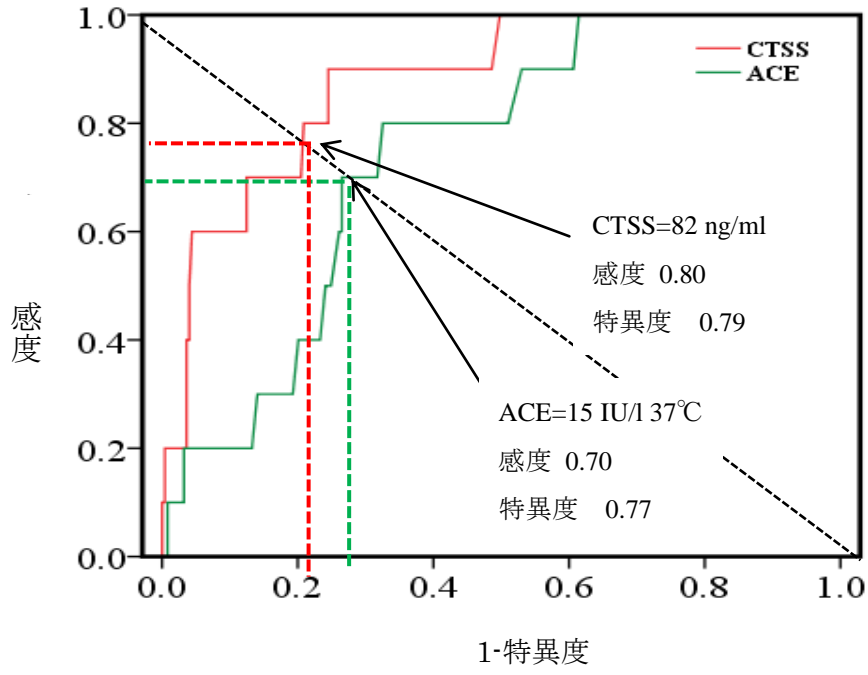


図3. CTSS 濃度による実質性肺疾患とサルコイドーシスの鑑別