

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590921

研究課題名 (和文) サルコイドーシスのトランスクリプトームスキャン

研究課題名 (英文) Transcriptome Scan 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：マイクロアレイを用いて検討した結果、サルコイドーシスの肺胞マクロファージでは、LRAP、ZNF-101、CTSS (cathepsin-S)などの遺伝子発現が亢進していた。LRAPとCTSSの一部の一塩基多型はサルコイドーシスの発症と相関していた。またサルコイドーシスの血清中CTSS濃度は、他の多くの呼吸器疾患より上昇しており、診断に役立つ可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、肺胞マクロファージ、マイクロアレイ、遺伝子多型

## 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ある。病巣の本態である類上皮細胞肉芽腫を構成するのは、T細胞とマクロファージ系細胞が主体である。サルコイドーシスの遺伝性はそれほど強いものではない。しかし本邦ではこれまで約100家系の家族発症例が報告されており、米国の大規模な疫学研究でもサルコイドーシスに遺伝性があることが確認されている。

一般に遺伝素因の検索手法として、候補遺伝子アプローチとゲノムスキャンアプローチがある。前者についてはこれまでかなりの知見が報告されているが、未だに高いオッズ

比を示し、異なった患者集団や民族に共通して追認できる責任遺伝子の発見には至っていない。

後者に関してはこれまでの一つのゲノムスキャンの結果が報告されている。ゲノムスキャンはゲノム全域にわたって網羅的に遺伝子を検索するため、新規遺伝子の発見に至る期待感が大きい。しかしながら一方で、サルコイドーシスにおいて実際に発現されているか否か不確定な遺伝子の多型との関連を検討するために、多数の偽陽性結果を生む危険性がある。すなわち網羅的あること自体が、その手法の限界を生むという一種のジレンマが生じている。

## 2. 研究の目的

そこで我々は本研究において、疾患感受性遺伝子の一次スクリーニングを、網羅的遺伝子発現解析により強発現されていることが確認される遺伝子レベルで行う、いわば transcriptome scan を考案した。

## 3. 研究の方法

3名のサルコイドーシス患者と3名の対照者の気管支肺胞洗浄細胞から、CD2 ビーズ(MACS)によりT細胞を除く方法により、肺胞マクロファージを分離した。それより抽出した総 RNA について oligo DNA microarray (CodeLink, Amersham Biosciences) を用い、対照と比較してサルコイドーシスで強発現している遺伝子を検索した。

強発現している遺伝子のうち下記3種について、HapMap Project Home Page より日本人の tagSNP を検索し、それらを含む遺伝子多型と疾患発症との相関について 256名のサルコイドーシス患者と195名の対照者を対象として症例・対照研究を行った。

そのうちカテプシン S (CTSS)の蛋白濃度は、サルコイドーシス患者 52名、健常者 29名、疾患対照者 30名(間質性肺炎 19名、肺癌 11名、COPD 12名、喘息 22名)を対象として、ELISA kit (R & D)を用いて測定した。

新患との関連は $\chi^2$ 検定ないし Fisher の直接確率法、あるいはロジスティック回帰分析を用いた。ハプロタイプは EM アルゴリズムを用いた EH Program (Terwilliger and Ott)を用いて算出した。CTSS の濃度は Kruskal-Wallis 検定ないし Mann-Whitney 検定を行った。

## 4. 研究成果

(1)アレイスポットの発現が良好と判定された遺伝子に関して、サルコイドーシスと対照の発現比が2を超える遺伝子は1863個存在した。しかし、その中には house keeping gene である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)も含まれ、その比が 6.7 であった。そこでそれより発現比の高い遺伝子を選択すると 12個残った。その中でもっとも高い発現を示した遺伝子は、leukocyte-derived arginine aminopeptidase (LRAP)であった。

理化学研究所で同定した JSNP 中には、LRAP の一塩基多型(SNP)が 24 個含まれており、そのうち coding region の3つの SNP とサルコイドーシス発症との相関を検討した。その結果、第9エクソンの JST039064 (A/G)はサルコイドーシスの発症と相関していた(表1)。3つの SNP で構成されるハプロタイプの推定値は表2に示す通りで、そのうち 039064G/087747G/087623C がサルコイドーシスで有意に高い頻度を示した(表2)。

LRAP は 960 個のアミノ酸で構成されており、placental leucine aminopeptidase と

adipocyte-derived leucine aminopeptidase と共に、zinc metallopeptidase の M1 family のうちのひとつの独立した subfamily を成している。LRAP は骨格筋、心筋、白血球、脾臓、肺など多くの臓器で発現されており、細胞内局在としては小胞体にある。機能として多くの基質の N 末端を切断することから、小胞体の中で各種の抗原を処理し、クラス I 抗原との結合を促進することを介して抗原提示過程に関与していると考えられる(図1)。LRAP は他の多くの抗原提示に関連する蛋白同様 IFN- $\gamma$  によって発現が誘導される。サルコイドーシスでは IFN- $\gamma$  発現が亢進しており、その意味において今回の結果は首肯できる。しかしながら、サルコイドーシスの原因抗原と病態に鑑みて、現在のところ HLA クラス I 抗原の役割が必ずしも明確ではない。したがってむしろ LRAP の基質は抗原蛋白の前駆体ではなく、何らかの生理活性物質であり LRAP はその代謝を介してサルコイドーシスの発症や病態に影響を与える可能性もある。

今回の検討の対象とした LRAP の SNP は、現在判明しているものの一部に過ぎない。しかも、今回有意な相関が証明された JST039064 (A/G) は、第9エクソンに存在しているが同義置換であり、機能変異は期待されない。相関の本質は他の多型にあると考えられ、今後の検討課題である。

(2)次に高い発現比を示したのは ZNF101 であった。ZNF101 遺伝子周辺で現在判明している一塩基多型(SNP)は、約 30 個ある。HapMap project によるとその tagSNP は3つとされているので、それらとサルコイドーシス発症との相関を検討した。しかし、そのうち rs10401926 については今回検討した日本人集団では、すべて遺伝子型 AA のホモ接合体であり、その意義は検討し得なかった。さらに他のいずれの SNP もサルコイドーシスとの相関は認められなかった(表 3)。2つの SNP で構成されるハプロタイプの推定値は表 3 に示す通りで、それらもサルコイドーシスと有意な相関を示さなかった。

ZNF101 は 316 個のアミノ酸で構成されている。その遺伝子は他の 40 余りの zinc finger protein 遺伝子と共に、染色体 19p12-p13.1 上にクラスターを成して位置している 3)。それらには Kruppel Associated Box (KRAB)と呼ばれる蛋白ドメインがある。KRAB は TIF1 $\beta$ との相互作用により、遺伝子発現の強力な repressor として機能することが判明している。サルコイドーシスは臨床徴候のわりに発熱などの炎症症状が乏しいことが特徴であり、調節性 T 細胞の働きなどを介して、何らかの抗炎症機構の存在が示唆される。その意味で遺伝子転写抑制蛋白であると推定される ZNF101 遺伝子多型の意義に注目されたが、今回の検討では有意な相関は証明されなかった。しかし、tagSNP 以外にも蛋白のアミノ酸残基置換を伴う SNP が発見されており、今後その役割

を検討する必要がある。

(3)3番目に高い発現を示した遺伝子は、CTSSであった。HapMap projectの結果を参考に、CTSS遺伝子内にいわゆる tagSNP を2個(rs11576175[イントロン4]とrs10888390[エクソン4])同定した。それらについて遺伝子型を決定し、症例・対照研究を行った。個別の SNP はサルコイドーシスの発症と相関してはいなかった。しかし、2つの SNP によるハプロタイプ頻度とそれら2つの組み合わせであるディプロタイプ頻度は、全体としてサルコイドーシスと対照群間で有意な相違がみられた(表5)。また rs11576175 は臨床経過と、rs10888390 は罹患臓器数と相関する傾向が認められた。

(4)一方サルコイドーシス患者血清 CTSS 濃度は中央値 92 ng/ml、範囲 47-163 ng/ml であり、健常者(中央値 51、範囲 19-73、 $p<0.0001$ )、間質性肺炎患者(中央値 64、範囲 29-100、 $p<0.005$ )、肺癌患者(中央値 54、範囲 33-64、 $p<0.001$ )、COPD患者(中央値 67、範囲 60-94、 $p<0.005$ )、喘息患者(中央値 72、範囲 52-110、 $p<0.001$ )におけるそれぞれの値より有意に高値であった(図1)。全対照患者と全サルコイドーシス患者を解析対象とした際、71 ng/ml を cut off とするとサルコイドーシスの診断感度は 79%、特異度は 73%であった。間質性肺炎患者と活動性サルコイドーシス患者を対象とした際は、cut off 76 ng/ml で感度 74%、特異度 89%であった(図2)。

CTSS はシステイン蛋白分解酵素の一つで、他のカテプシンと同じ基質特異性を持つ。主としてマクロファージ系細胞で当初前駆体として産生され、早期活性化が防止されると共にその立体構造が保持される。小胞体からゴルジ体を経てエンドゾームに移行してから N 端の一部が酵素的に切断されて活性化し、クラス II 分子と結合している不変鎖(Ii)を分解し、CLIP

(class-II-associated invariant chain peptide)を残す。その後 CLIP も分解されクラス II 分子は抗原ペプチドと結合することができるようになり、抗原は T 細胞に提示される。CTSS は IFN- $\gamma$  によりその発現が誘導される。サルコイドーシスにおいて IFN- $\gamma$  の産生亢進はゆるぎのない事実であり、その結果としてサルコイドーシス肺胞マクロファージでの遺伝子発現亢進が確認されたのは、矛盾のない現象であった。

本年度の研究では、CTSS の蛋白発現について、もっとも簡便に入手できる血清についてその濃度の意義を検討した。その結果サルコイドーシス患者群の CTSS は、健常者はもとよりほとんどの代表的な呼吸器疾患よりも高値を示し、その疾患特異性はかなり高いことが判明した。しかし臨床 upstairs 全ての呼吸器疾患がサルコイドーシスの鑑別対象となる訳ではない。またサルコイドーシスも活動性を失うと、血清マーカーの上昇

は期待できない。そこで時に肺野の陰影で鑑別対象となり得る間質性肺炎と活動性サルコイドーシス患者間での最良カットオフ値を決定すると、感度は 74%、特異度は 89%であった。一般的にはかなり良好な数値であるが、古典的なマーカーである血清 ACE 活性はそれよりも勝れた数値を示し、なお臨床的有用性が高いことがうかがえた。しかし、その際のカットオフ値は一般的に用いられている標準値の上限ではなく 11.8 IU/l 37°C であり、通常値である 21.3 IU/l 37°C を用いると感度は大幅に低下する。今後 ACE はサルコイドーシス診断の上で特異性の担保に、CTSS は感度の向上のために補完的に用いることが有用と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

(1) 山口悦郎、横江徳仁、西村眞樹、河合聖子、高橋大輔、八木健郎、服部 努、馬場研二  
サルコイドーシス患者血清 Cathepsin S の臨床的意義に関する検討  
第 28 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会、平成 20 年 11 月 7 日、仙台

(2) Etsuro Yamaguchi, Daisuke Takahashi, Kenji Baba, Takeo Yagi, Seiko Kawai, Hiroyuki Tanaka  
Susceptibility gene search by transcriptome scan for genes expressed by alveolar macrophages in sarcoidosis  
4th International WASOG Conference on Diffuse Lung Diseases, October 20th, 2007, Tokyo

## 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

### (3) 連携研究者

表1. LRAP遺伝子多型とサルコイドーシスの相関

JST#	AIC	$\chi^2$	Df	p-value	Fisher's exact test
039064 (A/G)	5.0501	8.9463	2	0.0114	0.0116
087747 (G/T)	-2.8535	1.1473	2	0.5635	0.56
087623 (C/T)	-3.9251	0.0757	2	0.9629	1

表2. LRAPハプロタイプとサルコイドーシスの相関

Haplotype (064/747/623)	Overall	Sarcoidosis	Control	$\chi^2$	p-value	Permutation p-value
A-G-C	0.3361	0.3168	0.3638	1.3176	0.251	0.305
G-T-C	0.2839	0.2534	0.3274	3.5644	0.059	0.097
G-G-C	0.1298	0.1638	0.082	7.962	0.005	0.011
G-T-T	0.0974	0.0958	0.0983	0.0095	0.922	0.938
A-T-C	0.0947	0.1113	0.07	2.68	0.101	0.233
G-G-T	0.0464	0.043	0.0515	0.2156	0.643	0.731
A-G-T	0.0118	0.0159	0.007	0.9068	0.341	0.524

表3. ZNF101遺伝子多型とサルコイドーシスとの相関

rs12983292	AIC	$\chi^2$	Df	p-value	Fisher's exact test p value
Dominant model	-1.9583	0.0419	1	0.8378	1
Recessive model	-0.8717	-0.8717	1	0.2898	0.2999
Codominant model	-2.5946	1.3932	1	0.4983	0.4838
<b>rs2304130</b>					
Dominant model	-1.9916	0.008403	1	0.9278378	1
Recessive model	--1.2922	-0.7123	1	0.3987	0.4263
Codominant model	-3.2007	0.805	1	0.6687	0.7164

表4. rs12983292とrs2304130のハプロタイプとサルコイドーシスの相関

Haplotype (*92-*30)	Overall	sarcoidosis	control	Chi-square	p-value	Permutation p-value
G-A	0.7587	0.7523	0.7646	0.1497	0.6988	0.676
A-A	0.1477	0.1636	0.1292	1.71	0.191	0.22
G-G	0.0889	0.0841	0.0979	0.4257	0.5141	0.544
A-G	0.0047	0.0000	0.0083	3.5853	0.0583	0.119

表5. CTSSのtagSNPハプロタイプとサルコイドーシスの相関

Haplotype rs10888390-rs11576175	Overall	sarcoidosis	control	Chi-square	p-value	Permutation p-value
G-G	0.4821	0.4541	0.5197	3.7929	0.0515	0.062
A-G	0.3341	0.3549	0.3059	2.3827	0.1227	0.133
G-A	0.1660	0.1876	0.1367	4.1389	0.0419	0.075
A-A	0.0178	0.0033	0.0377	14.5551	0.0001	0.0052

Chi-square	p-value	Permutation p-value
21.2934	0.00009	0.0051

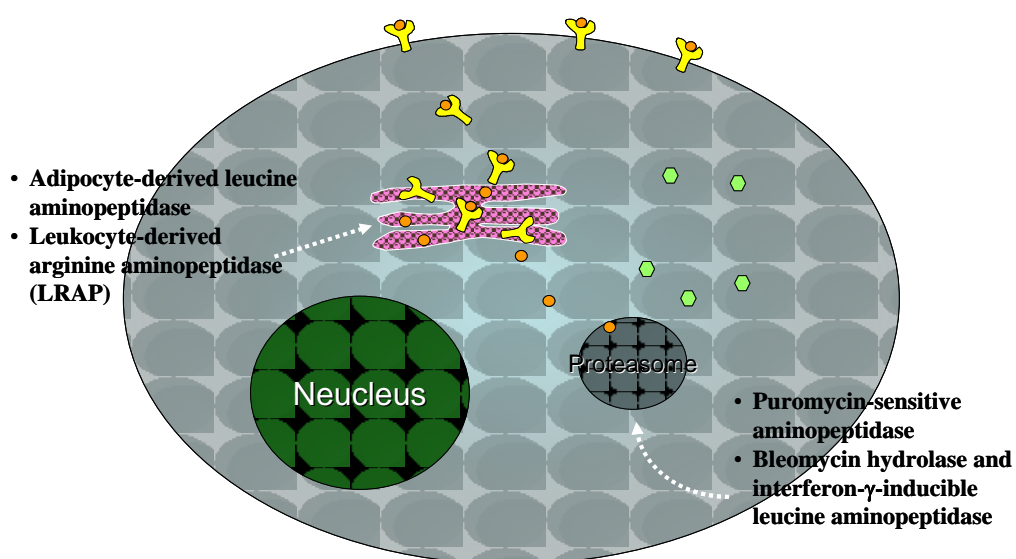
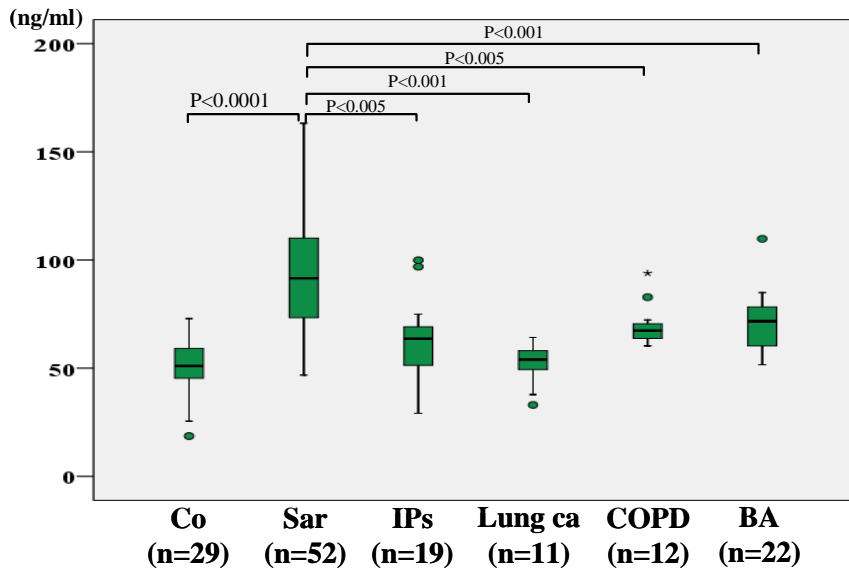
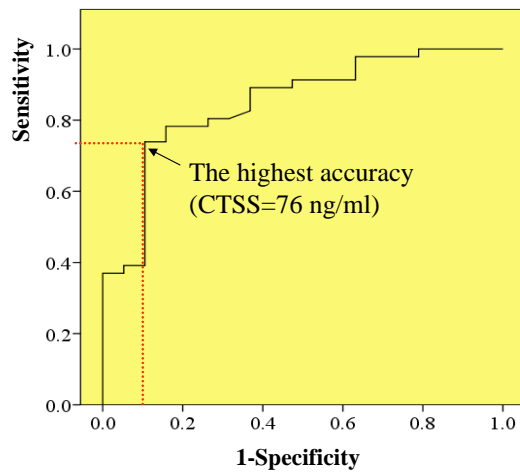


図1. クラス I 分子の処理過程



**図2. 血清カテプシンS濃度**

Co, 健常者; Sar, サルコイドーシス; IPs, 各種特発性間質性肺炎; Lung ca, 肺癌;  
COPD, 慢性閉塞性肺疾患; BA, 気管支喘息



**図3. 間質性肺炎を対照に活動性サルコイドーシスを鑑別するための血清カテプシンSによるROCカーブ**