

DNAアレイを用いた免疫疾患の病態解析

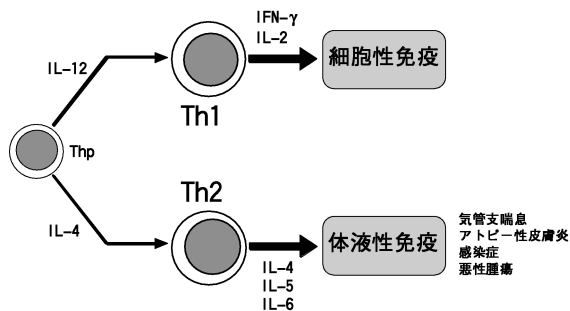
●幸田 敏明 ◆西村 孝司

北海道大学遺伝子病制御研究所

＜研究の目的と進め方＞

生体内の免疫応答は、細胞性免疫を制御するTh1、体液性免疫を制御するTh2の二種類のヘルパーT細胞によって調節されているが、この二つの細胞のバランスが崩れると様々な免疫疾患を引き起こすと考えられている。我々はこれまでに、肝炎、アレルギー性喘息等の抗原特異的な免疫疾患モデルを確立し、Th1、Th2主導の免疫応答がそれぞれ異なるタイプの炎症反応を引き起こすことを見出している。そこで、本研究では免疫疾患患者の末梢血リンパ球を用いて患者のTh1/Th2バランス状態を診断する方法を開発し、患者のTh1/Th2バランスと病態との関係を明らかにすることを目的としている。さらに、それに基づいて同じ免疫疾患でも個々の患者のTh1/Th2バランスに対応した治療を行うことを最終目標としている。

このために、まずマウスの系でTh1、Th2細胞に特異的に発現する遺伝子を同定し、これらの特異的な遺伝子を結合したDNAアレイにより、免疫疾患マウスにおけるTh1/Th2バランスを判定する系を確立した。



＜研究開始時の研究計画＞

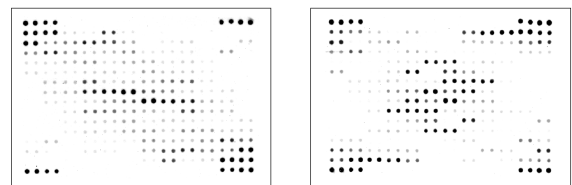
1. マウスTh1、Th2細胞に特異的に発現するmRNAの検索：T細胞レセプタートランスジェニックマウス(DO11.10)の脾細胞より高度に機能分化した均一なTh1、Th2細胞を誘導し、DNAマイクロアレイ法などによる遺伝子発現の検討を行い、Th1、Th2細胞に特異的に発現する遺伝子の検索を行う。
2. マウスのTh1/Th2バランスを判定するアレイフィルターを作成する：Th1、Th2細胞に特異的に発現する遺伝子をのせたDNAアレイフィルターを作製し、これを用いてマウスの生体内のTh1/Th2バランスを判定する方法を確立する。
3. ヒト用DNAアレイの開発に向けて、ヒトのTh1、Th2細胞に特異的な遺伝子をクローン化する。
4. 微量のRNAを用いてDNAアレイを行う方法を確立する。

＜研究期間の成果＞

1. Th1、Th2細胞に特異的な遺伝子発現を、DNAマイクロアレイ法を用いて調べた。この結果、約8700個の遺伝子のうちTh1に特異的に発現するものとして

82個、Th2に特異的なものとして52個の遺伝子が同定された。このほか、Representational Difference Analysis (RDA法)においても19個の遺伝子がTh1あるいはTh2に特異的な遺伝子として同定された。

2. 上記1の結果から、Th1あるいはTh2細胞に特異的な遺伝子を約150個選択し、RT-PCRにより平均500bpの長さのcDNAをクローン化し、DNAアレイフィルターを作製した。これを用いてTh1、Th2細胞についての解析を行い、その結果に基づきDNAアレイフィルターを改良した。改良点としては、DNAアレイ法で発現に差が認められる遺伝子に絞ったことと、バランスがどちらに傾いているかを視覚的にとらえることができるように、遺伝子の配置を改めた。次に、マウスの急性GVHDモデルをはじめとする免疫疾患モデルのRNAを用いて、DNAアレイによりTh1/Th2バランスを判定できることを明らかにした。この際、DNAアレイの結果からTh1/Th2バランスを客観的に判定するために、バランスの偏向を数値化する方法を開発した。
3. ヒト用のアレイフィルターを作製するために、マウスのアレイ作製のために選択された遺伝子について、ヒトのcDNAをクローン化した。
4. ヒトの末梢血を材料にする場合など、少ないRNA量からDNAアレイを行えるように、プローブの作製方法を検討した結果、1 mgのtotal RNAからでも十分なシグナルを得られる方法を開発した。



オーダーメイド 医療への応用

＜国内外での成果の位置づけ＞

我々が開発したDNAアレイ、並びにそれを用いてTh1/Th2バランスを判定する方法は、これまでにない独創的なものである。将来、患者末梢血を採取してTh1/Th2バランスを判定できるようになれば、同じ病気でも実際の生体内の免疫バランス状態に対応した治療を行うことができる。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

従来のDNAアレイ法の感度が予想以上に低かったため、RT-PCRで差があってもDNAアレイで情報の得られる遺伝子の数が少なかった。これについては、DNAアレイにのせる遺伝子を絞ることと、少量のサンプルから解析するための新しい方法を開発することにより、アレイ上に載せたほとんどの遺伝子について強いシグナルが得

られるようになり、克服できた。

〈今後の課題〉

この後のステップとしては、ヒト用のアレイフィルターを作製し、患者末梢血を用いてTh1/Th2バランスの判定と病態との関係を解析する必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. Yahata, T., Yahata, C., Ohta, A., Kitamura, H., Iwakabe, K., Habu, S., Azuma, S., Nakui, M., Sato, M., Koda, T., and Nishimura, T., Interleukin-4-dependent induction of preproenkephalin in antigen-specific T helper-type 2 (Th2) cells, *J. Neuroimmunol.*, 105, 103-108, 2000.
2. Sato M., Chamoto K., Tsuji K., Iwakura Y., Yogashi Y., Koda T. and Nishimura T., Th1 cytokine-conditioned bone marrow-derived dendritic cells can bypass the requirement for Th functions during the generation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes, *J. Immunol.*, 167 (7) , 3687-3691, 2001.
3. Takaoka A., Tanaka Y., Tsuji T., Jinushi T., Hoshino A., Asakura Y., Mita Y., Watanabe K., Nakaike S., Togashi Y., Koda T., Matsushima K. and Nishimura T., A critical role for mouse CXC chemokine (s) in pulmonary neutrophilia during Th type 1-dependent airway inflammation, *J. Immunol.*, 167 (4) , 2349-2353, 2001.
4. Li, J., Koda, T., Yamaguchi A., Yamamoto, S., Sato, T., Togashi, Y. and Nishimura T., Identification of Th1- and Th2-specific genes by microarray analysis, *Biomed. Res.*, 24 (6) , 299-307, 2003.
5. Yamaguchi, A., Koda, T., Abe, H., Sato, M., Li, J., Sakai, T., Togashi, Y., Shinohara, Y., Ikeda, H. and Nishimura, T., Development of a functional cDNA array for evaluation of the Th1/Th2 balance, *Immunol. Lett.*, 101 (1) , 95-103, 2005.

4) その他 (総説)

6. 山口亜希, 富樫裕二, 幸田敏明, 西村孝司「Th1/Th2 バランス解析用DNAアレイフィルターの開発」*日本臨床免疫学会会誌* 28 (2) , 86-91, 2005.