

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5059600号
(P5059600)

(45) 発行日 平成24年10月24日(2012.10.24)

(24) 登録日 平成24年8月10日(2012.8.10)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50		Q
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		D
		GO 1 N 33/53		Q

請求項の数 5 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2007-508264 (P2007-508264)	(73) 特許権者	000001959
(86) (22) 出願日	平成18年3月17日 (2006.3.17)		株式会社 資生堂
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/306043		東京都中央区銀座7丁目5番5号
(87) 国際公開番号	W02006/098523	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成18年9月21日 (2006.9.21)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成21年3月3日 (2009.3.3)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	特願2005-80533 (P2005-80533)		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成17年3月18日 (2005.3.18)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 扁平上皮細胞癌関連抗原を指標とする皮膚性状の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

皮膚角層細胞の扁平上皮細胞癌関連抗原 (SCCA) の発現を指標とし、皮膚性状が、紫外線照射を原因とする皮膚老化、及び皮膚関連バリアー機能低下に伴う肌保湿力の低下による乾燥肌からなる群から選らばれる、皮膚性状の評価方法。

【請求項 2】

皮膚角層細胞の扁平上皮細胞癌関連抗原 (SCCA) の発現を指標とし、皮膚性状が、アトピー性皮膚炎を原因とする不全角化、及び花粉症による肌荒れからなる群から選らばれ、皮膚が上記性状を示す前にその性状の罹りやすさを予知する、皮膚性状の評価方法。

【請求項 3】

前記 SCCA の発現を、SCCA に特異的な抗体を使用する酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により実施する、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記皮膚角層試料がテープストリッピングにより採取されたものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

SCCA が SCCA - 1 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞の扁平上皮細胞癌関連抗原 (Squamous Cell Carcinoma Antigen、以下「SCCA」と称す) を指標とした、皮膚状態の評価方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

皮膚が正常の角化を行うと角質細胞で核が消滅する「脱核」という現象が生ずる。表皮角化細胞は基底層で増殖し、上層に移行して成熟し角層となる。しかしながら、例えば乾癬やアトピー皮膚炎といった皮膚病に罹り、正常な角化が行われな肌荒れした皮膚においては、角質細胞に核が未消化のまま残り、角質細胞が核を有した未熟な状態で角層中に存在することがあり、これを「不全角化」という。不全角化の現象は古くから知られているものの、不全角化が生じるメカニズムや生化学的な指標については知られていない。

10

扁平上皮細胞癌関連抗原 (SCCA) は扁平上皮癌細胞から抽出される抗原であり、子宮頸部、肺、食道、皮膚の扁平上皮細胞癌で高い血中濃度を示し、扁平上皮細胞癌の診断によく利用されている (H. Kato et al. Cancer 40: 1621 - 1628 (1977); N. Mino et al. Cancer 62: 730 - 734 (1988))。特に、SCCAの血中レベルは扁平上皮細胞癌の進行段階、悪性度、腫瘍の大きさなどに良好に相関するため、癌の早期発見のみならず、癌治療効果の評価や再発のおそれの診断などにおいて特に有効な癌マーカーである。

SCCAはまた、乾癬表皮の上層において発現の亢進が認められることでも知られる (Takeda A.ら、J. Invest. Dermatol. (2002) 118 (1), 147 - 154)。乾癬は皮膚病の一つであり、表皮細胞の増殖・分化異常と炎症細胞浸潤を特徴とする慢性、再発性の炎症性不全角化症である乾癬がある。乾癬は遺伝的素因に種々の環境因子が加わって発症すると考えられる (Hopsó-Havú et al. British Journal of Dermatology (1983) 109, 77 - 85)。

20

SCCAは染色体18q21.3上にタンデムに並んでいる二つの遺伝子SCCA-1及びSCCA-2遺伝子によりコードされる。それらによりコードされるタンパク質、SCCA-1及びSCCA-2は共に分子量約45000のタンパクであり、高い相同性を示し、そのホモロジーは核酸レベルで95%である。これらのSCCAはovalbumin-serine protease inhibitor (ov-serpin)ファミリーに属している。ov-serpinはセルピンス-パーファミリーの中でもユニークな特徴を有している。一般にセルピンは分泌されて細胞外で働くとされているが、ov-serpinは主に細胞内でも働くprotease inhibitorである。

30

SCCA1はパイン様システインプロテアーゼ阻害剤であるが、SCCA2はキモトリプシン様セリンプロテアーゼ阻害であり、相同性が高いにも関わらず反応部位のアミノ酸配列が異なるため、異なった特性を有することもある (Schick et al. J. Biol. Chem. (1997) 27213, 1849 - 55)。乾癬などの疾患やUVによってSCCA-1及びSCCA-2が高発現することはわかっていたが、それらが皮膚性状においてどのように関与しているかは不明であった。

【発明の開示】

40

【0003】

本発明者はSCCAが関与する表皮の生理学的メカニズムの解明を目的とする研究を行っていたところ、SCCAの発現が乾癬などの不全角化の生じた皮膚において特異的に亢進しており、SCCAが不全角化を含む皮膚の肌荒れ性状の一因であることを見出した。従って、SCCAの発現が肌の性状の指標となると考え、本発明を完成するに至った。

本発明は、皮膚角層細胞の扁平上皮細胞癌関連抗原 (SCCA)、詳しくはSCCA-1及び/又はSCCA-2、特にSCCA-1の発現を指標とする、皮膚性状の評価方法を提供する。好ましくは、前記SCCAの発現は、SCCAに特異的な抗体を使用する酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により実施する。より好ましい態様において、前記皮膚角層試料はテープストリッピングにより採取されたものである。

50

本発明の方法により、皮膚の性状、すなわち肌荒れ状態、不全角化状態などを生化学的レベルで判定することが可能となる。本発明の方法により判定される肌又は皮膚性状としては、肌荒れ、例えば紫外線照射を原因とする皮膚老化、皮膚バリアー機能低下に伴う肌保湿力の低下による乾燥肌、乾癬やアトピー性皮膚炎を原因とする不全角化、花粉症による肌荒れなど、さまざまな性状が挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、皮膚抽出物のウェスタンブロット分析を示す。H-99抗体及びh14D¹⁴⁶抗体を使用することにより、チモーゲン及び活性カスパーゼ-14の存在を免疫ブロット法で分析した。10 μ g(レーン1, 2及び4)及び1 μ g(レーン3)の全皮膚抽出物、皮膚等価抽出物及び角化細胞抽出物を適用した。

10

図2は、精製カスパーゼ-14の分析を示す。(A)SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、Superdex 75クロマトグラフィーから得られた画分No. 25をPVDF膜に移し、そしてクーマジープリリアントブルーで染色した。17kDa及び11kDaの2つのタンパク質バンドが示された。(B)H-99、h14D¹⁴⁶及びC20抗体を使用したウェスタンブロット分析。17kDaバンドがH99抗体及びh14D¹⁴⁶抗体の双方に対して陽性を示し、また11kDaバンドがC20抗体で認識されることが示された。M: マーカー; 1: Superdex 75 No. 25; 2: Superdex 75 No. 26-27, comc.

図3は、精製カスパーゼ-14に対する種々の合成インヒビターの効果を示す。ヒトカスパーゼは現在15種類が知られているが、各種カスパーゼに対するペプチドインヒビター(YVAD, VDVA, DEV, VEID, IETD, LEHD, DNLD)、並びにシステインプロテイナーゼ(IAA)及びセリンプロテイナーゼ(AESF)に対するクラス特異的インヒビターと一緒に、カスパーゼ-14をインキュベートした。1.3Mクエン酸ナトリウム及び5mM DTTの存在においてWEHD-MCAを基質として使用して、残留酵素活性を測定した。試験した酵素濃度はそれぞれ、5, 2.5及び1.25 μ Mとした。値は重複アッセイの平均値を表す。

20

図4は、(A)ICADに対する精製カスパーゼ-14の切断活性を示す。(B)FL331抗体を使用したウェスタンブロット分析を示す。33kDa及び27kDaの切断生成物が示された。10 μ M SCCA-1を用いた前インキュベーションによって、ICAD切断は完全に抑制された。コスモトロフィック塩の存在においてのみ、ICAD分解が観察された。アミノ末端に特異的な抗体を使用したウェスタンブロット分析は、カスパーゼ-14との延長されたインキュベーション中にインタクトなICAD分子の消失を示した。混合物にSCCA-1を添加すると、ICAD分解はもやは検出されず、16時間のインキュベーション後、影響を受けないままであった(B)。(C)合成カスパーゼ基質に対する加水分解活性を、コスモトロフィック塩の存在において調査した結果を示す。

30

図5は、活性カスパーゼ-14及びTUNELポジティブ細胞の局在を示す。正常なヒトの皮膚の薄い切片をH-99抗体(A)、h14D¹⁴⁶抗体(B)及びTUNEL(C)で染色した。Texas-Redを蛍光検出(B)のために使用した。TUNELにはFITCを用い、そして免疫染色にはTexas Redを用いて、TUNEL及びカスパーゼのための二重染色を実施した。(D)は重畳画像、(E)は明視野を示す。

40

図6は、ICAD及び不全角化核の共局在を示す。正常なヒトの皮膚の薄い切片を抗ICAD抗体FL331で染色した。下表皮のほとんどの核はこの抗体に対して陽性を示した。AD患者皮膚に由来する角化細胞の表在層上のICADを抗体で染色したときには、種々のサイズの陽性部位が示された(B)。核クラスターを示すヨウ化プロピジウム(PI)による核染色がしばしば認められた(C)。同じ部位の明視野は、表面上のオーバーラップされたスケールを示した(D)。重畳画像は、不全角化部位においてのみICADが存在することを明らかにした(E)。明視野における核染色の重畳画像も示されている(F)。

図7は、SCCA-1及び不全角化核の共局在を示す。SCCA-1は、正常な皮膚切

50

片内ではほとんど検出することができなかった。AD患者皮膚の表在層において、SCCA-1陽性部位は示された(H)。これらの部位上でのみ、核クラスターが認められた(I)。明視野を(J)に示す。重畳画像は、SCCA-1陽性部位が、好ましくは未消化核が存在する部位と重なることを示す(K)。SCCA-1染色及び明視野に対応する別の重畳画像も示す(L)。

図8は、露光及び非露光部位の表皮におけるSCCAの発現を示す免疫組織化学的検査結果を示す。

図9は、正常皮膚及び乾癬症に罹った皮膚におけるSCCAの発現を示す免疫組織化学的検査結果を示す。

図10は、ELISA法による正常皮膚角層におけるSCCA発現量結果を示す。

10

図11は、ELISA法による正常皮膚と乾癬皮膚角層におけるSCCA発現量の対比結果を示す。

図12は、ELISA法による正常皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚角層におけるSCCA発現量の対比結果を示す。

図13は、正常皮膚におけるSCCA発現量とTEWLの相関を示す。

図14は、花粉症皮膚における肌荒れとSCCA-1発現量との関係を示す。

図15は、花粉症皮膚における肌荒れとSCCA-1の発現亢進との相関図を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

SCCAは上述のとおり乾癬やUV照射皮膚で発現の亢進している分子量約45,000のタンパク質である。SCCA-1及びSCCA-2のアミノ酸配列並びにそれらをコードする核酸配列はTakeda A et al. J. Invest. Dermatol. 118, 147-154 (2002) (前掲)に記載されている。

20

本発明に係るSCCAの発現の測定は、SCCAを測定することのできる任意の方法に従い、定量的又は定性的に実施することができる。具体的には、SCCAに特異的な抗体を利用する免疫測定方法、例えば酵素ラベルを利用するELISA法、放射性ラベルを利用するRIA法、免疫比濁法、ウェスタンブロット法、ラテックス凝集法、赤血球凝集法等、様々な方法が挙げられる。免疫測定法の方式には競合法やサンドイッチ法が挙げられる。他に、SCCAの発現量はそれをコードする遺伝子の細胞内において発現された量の測定により行うこともできる。この場合、好ましくは、SCCAの発現は細胞内のSCCAをコードするmRNAの量を測定することにより決定する。mRNAの抽出、その量の定量的又は定性的測定も当業界において周知であり、例えばPCR法、3SR法、NASBA法、TMA法など、さまざまな周知の方法により実施することができる。他に、SCCAの発現はin situハイブリダイゼーション法やその生物活性の測定を通じて定性的に決定することができる。

30

被検体となる皮膚角層試料の採取は任意の方法で実施することができるが、簡便性の観点からテープストリッピング法が好ましい。テープストリッピングとは、皮膚表層に粘着テープ片を貼付し、剥がし、皮膚角層をその剥がした粘着テープに付着させることで角層試料を採取する方法である。テープストリッピング法を利用すれば、角層をテープ一枚採取するだけでSCCA発現の測定が可能となり、SCCAを指標とした非侵襲性の肌荒れ、不全角化の評価方法が可能となる。テープストリッピングの好ましい方法は、まず皮膚の表層を例えばエタノールなどで浄化して皮脂、汚れ等を取り除き、適当なサイズ(例えば2×5cm)に切った粘着テープ片を皮膚表面の上に軽く載せ、テープ全体に均等な力を加えて平たく押さえ付け、その後均等な力で粘着テープを剥ぎ取ることで行われる。粘着テープは市販のセロファンテープなどであってよく、例えばScotch Super strength Mailing Tape(3M社製)、セロファンテープ(セロテープ(登録商標);ニチバン株式会社)等が使用できる。粘着テープに付着した皮膚角層試料中のSCCAは、テープ片を適当な抽出液、例えばTris-buffer(pH8.0)(0.1M Tris-HCl, 0.14M NaCl, 0.1% Tween-20)に浸漬し、角層を抽出することでテープから単離・抽出させることができる。

40

50

本発明の好ましい態様においては、S C C Aは免疫測定方法、例えばE L I S Aにより測定する。E L I S Aにおいて使用するS C C Aに特異的な抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。モノクローナル抗体やポリクローナル抗体の作成方法は当業者に周知であり、例えばLunstrum et al., J Biol. Chem. 1986, 261: 9042 - 9048; Hurler et al. J Cell Science 1994, 107: 2623 - 2634に記載されている。

本発明に係る方法においては、サンドイッチ免疫測定法が特に好ましい。サンドイッチ免疫測定方法は例えば下記の通りに実施できる。

2種類のS C C Aに特異的な抗体の一方を一次抗体として担体に固定化する。担体としては固体担体が好ましく、例えば固体担体として免疫測定法において常用される任意のものを使用してよく、例えば任意の大きさ、形状に成形されたスチレンやポリスチレンなどの高分子担体のほか、これらの適当な材料で成形した反応容器、例えばE L I S Aプレートのウェルの内壁などが挙げられる。

上記一次抗体の担体への固定化は常法に従って行うことができ、例えば上記一次抗体を緩衝液、例えばリン酸緩衝食塩水(P B S)、ホウ酸緩衝液などに溶解して担体に吸着させることにより固定化することができる。また、例えば上記一次抗体に結合する抗体やその他のタンパク質、例えばプロテインCをあらかじめ担体に固定化し、これを上記一次抗体と接触させる等してもよい。更に、非特異的な結合を抑えるため、このようにして一次抗体を固定化した担体に適当なブロッキング剤、例えばP B S - B S Aや市販のブロッキング剤、例えばブロックエース(大日本製薬)を加え、約4 ~ 40、好ましくは20 ~ 37で、5分から数日、好ましくは10分から24時間、より好ましくは10分 ~ 3時間インキュベーションすることによりブロッキングするのが好ましい。

上記2種類のS C C Aに特異的な抗体の他方の抗体は二次抗体として使用し、標識する。標識としては、酵素標識、放射線標識、蛍光標識、などが挙げられる。酵素標識する場合、酵素を二次抗体に直接結合させて標識するか、または例えばアビジン-ビオチンのような相互反応性蛋白質を介して間接的に酵素で標識することもできる。酵素の抗体などへの結合は、例えば市販のチオール導入基試薬を利用して酵素及び標識すべき抗体などのそれぞれにチオール基を導入してから両者をS - S結合させることを行うことができる。酵素としては、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、D - ガラクトシダーゼなどが挙げられる。酵素の検出は、その酵素に特異的な基質を用いて行うことができる。例えばホースラディッシュパーオキシダーゼを利用する場合、T M B (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン) やA B T S (2, 2' - アジン - ジ[3 - エチルベンズチアゾリンスルホネート]) などが利用できる。

かかる免疫測定は、前記一次抗体を固定した担体、前記標識した二次抗体、被検試料を混合し、インキュベーションすることにより、担体に固定化された一次抗体に被検試料中のS C C Aを結合せしめ、このS C C A分子に標識二次抗体を結合せしめる。

このようにして、標識化抗体は、試料中のS C C Aの量を反映した量において、担体に固定化された一次抗体と試料に由来するS C C Aを介して担体上に固定される。かかるインキュベーションは、適当な緩衝液、例えばP B S中で約4 ~ 40、好ましくは20 ~ 37で、5分から数日、好ましくは10分から24時間、より好ましくは10分 ~ 3時間行う。

次に、上記担体から未結合の標識化抗体を分離する操作を行う。担体が固体担体である場合、この分離操作は固液分離により簡単に行うことができる。一定の既知量の標識二次抗体を使用した場合、担体に結合した標識もしくは未結合の標識又はこの両者を測定することができる。他方、任意の標識抗体を使用した場合、担体に結合した標識を検出、測定する。担体に結合した標識を検出するには、好ましくは担体を洗浄液、例えば適当な界面活性剤の入った緩衝液、例えばP B S - T w e e n 2 0により洗浄して未結合の標識化抗体を除去した後に検出を行う。検出は標識の種類に依存して常法に従って行うことができる。

以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限

10

20

30

40

50

定されるものではない。

【実施例】

【0006】

1. SCCAと不全角化の関係の解明

材料及び方法

材料

Ac-WEHD-MCA、Ac-YVAD-MCA、Ac-VDVAD-MCA、Ac-DEV D-MCA、Ac-VEID-MCA、Ac-IETD-MCA、Ac-LEHD-MCAはPeptide Institute, Inc. (日本、大阪府)から購入した。

ベンジルオキシカルボニル(Z)-YVAD-FMK、Z-VDVSD-FMK、Z-DEV D-FMK、Z-VEID-FMK、Z-IETD-FMK、Z-LEHD-FMK及びZ-VAD-FMKは、BioVision (Mountain View, CA)から購入した。組換えカスパーゼ-1~10はBIOMOL Research Labs, Inc. (Plymouth Meeting, PA)から得た。

カスパーゼ-14のプロ形及び大サブユニットの検出のために、H-99抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc)を使用した。H-99抗体はヒトカスパーゼ-14のアミノ酸24-122に対応するペプチドに対し生起された抗体であり、従ってカスパーゼ-14のプロ酵素及びそのプロセッシングされた形態、即ち、その大サブユニットと反応する。

カスパーゼ-14の小サブユニットの検出のためには、C-20抗体(Santa Cruz)を使用した。開裂部位特異的抗体(h14D¹⁴⁶)は、ヒトカスパーゼ-14の推定プロセッシング部位に相当する合成ペプチドTVGGDを用い、ウサギを免疫化することにより作成した。

WEHD-MCA加水分解活性の測定

Mikolajczyk J. et al., Biochemistry 43, 10560-9 (2004)に記載の方法に多少の変更を加え、Ac-WEHD-MCAを基質として、カスパーゼ-14活性を測定した。簡単には、アッセイ混合物を、45 µLの0.1M HEPES緩衝液(pH7.5)、0.06M NaCl、0.01% CHAPS、5mM DTT、1.3M クエン酸ナトリウム及び10 µM WEHD-MC Aから作製した(全て、最終濃度で表示)。この混合物に酵素試料(5 µl)を添加し、これを10~30分間にわたってインキュベートした。反応を150 µlの0.1Mのモノクロロ酢酸により停止させ、そしてFluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Co., Wolsam, MA)を用い、355 nmの励起波長及び460 nmの発光波長により測定を行った。インヒビターアッセイの場合、カスパーゼ-14及びペプチドインヒビターを室温で15分間、アッセイ緩衝液中でインキュベートし、そして5 µlの100 µM WEHD-MCAを添加することによりアッセイを開始した。

カスパーゼ-14の精製

健常人の踵からこすり取ったヒト角化細胞(約14 g)を、ガラスホモジナイザーを使用して、0.14M NaClを含有する0.1M Tris-HCl(pH8.0)で抽出した。60分間にわたって15,000 gで遠心分離した後、上澄みを得た。Amicon Ultra (Millipore, MA)で濃縮し、Fast Desalting カラムHR10/10 (Amersham Biosciences)で脱塩した後、粗生成物をHiPrep 16/10 Q XLカラムに塗布した。カラムを20mM Tris-HCl(pH8.0)で洗浄し、そして0~1Mの線形NaCl勾配で分離させた。画分は抗カスパーゼ-14抗体(H-99)(Santa Cruz Biotechnology, CA)及びh14D¹⁴⁶抗体を使用するウェスタンブロットにより追跡した。また、各画分についてAc-Tyr-Glu-His-Asp-メチル-クマリンアミド(WEHD-MCA)(Peptide Institute, Inc.

10

20

30

40

50

日本国大阪) に対する加水分解活性を測定した。陽性を示した画分を同緩衝液で平衡させた Mono Q カラムに載せ、これを最大 1 M の NaCl 勾配で溶離させた。カスパーゼ - 14 画分をさらに Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離した。カラムを 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡にし、そして 0 ~ 1 M の NaCl 勾配で溶離させた。陽性を示した画分を濃縮し、そしてこれを 25 mM エタノールアミン (pH 8.3) で平衡にしたクロマトフォーカシング Mono P カラムに載せた。Polybuffer (pH 5.0) 46 ml を使用し、pH 8 から 5 に至る pH 勾配を形成させながら、溶離を行った。カスパーゼ - 14 は Superdex 75 ゲルクロマトグラフィーを用い最終的に精製した。タンパク質濃度は BioRad Protein Assay Kit (BioRad Lab, Hercules, CA) で決定した。

10

組換えカスパーゼ - 14 及び SCCA - 1 の調製

カスパーゼ - 14 をコードする cDNA を順方向プライマー: AAGGATCCCAATCCGCGGTCTTTGGAAGAGGAG (配列番号 1) 及び逆方向プライマー: TTTCTGCAGGTTGCAGATACAGCCGTTTCCGGAGGGTGC (配列番号 2) を使用する PCR によってケラチノサイト cDNA から単離・増幅した。PCR 生成物を pQE - 100 Double Tag ベクター (Qiagen, Valencia, CA) 中にクローニングし、そして E. coli JM109 中で発現させた。

SSCA1 cDNA を乾癬 cDNA ライブラリー (Takeda A et al., J. Invest. Dermatol., 118, 147 - 54 (2002)) から分離し、そして pQE30 ベクター (Qiagen) 中にクローニングした。組換えタンパク質を Ni - NTA Agarose (Qiagen) 及び Mono Q クロマトグラフィーで精製した。

20

免疫組織化学

ヒト頭皮試験片を患者の同意のもと、形成外科手術により得た。組織をリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中の 4% パラホルムアルヒド (PFA) で固定し、パラフィン中に包埋した。薄切片を調製し、そして 4 で一晩にわたって適切な抗体と一緒にインキュベートした。ペルオキシダーゼ接合ヤギ抗ウサギ IgG (ニチレイ社製) を二次抗体として使用し、発色試薬としての DAB と反応させた。

TUNEL 陽性細胞及び活性カスパーゼの二重免疫検出の場合、Texas Red (登録商標) 色素接合抗ウサギ IgG (ロバ) を二次抗体として使用した。TUNEL 反応はフルオレセイン in situ 細胞死検出キット (Roche Diagnostics) を使用し、その製造者の指示書に従って実施した。

30

ICAD のウェスタンブロット及び免疫組織化学分析の場合、抗 ICAD IgG (FL331, Santa Cruz Biotechnology) 及び DFF45 / ICAD Ab - 2 (NeoMarkers, Fremont, CA) を使用した。

活性アトピー性皮膚炎 (AD) 患者の皮膚内には、クラスター化した不全角化が往々にして観察されることが報告されている (Sakurai K. et al., J. Dermatol. Sci. 30, 37 - 42 (2002); Piloto Valdes, L. et al., Allergol. Immunopathol. (Madr) 18, 321 - 4 (1990))。本実験においては、非侵襲的方法を用い、不全角化性皮膚における ICAD 及び SCCA - 1 の局在を調べた。AD 又は健常有志の皮膚から表在性角化層を採取し、そして医療用接着剤 Aron Alpha A (Sankyo Co., Tokyo) を使用してスライドガラス上に付着させた。3% パラホルムアルヒドで固定したあと、試料に 0.1% Triton X - 100 を浸透させ、そしてこの試料を抗 ICAD 又は抗 SCCA - 1 抗体で一晩にかけて 4 で免疫染色した。Alexa Fluor 400 接合型抗ラビット (ICAD) 又は抗マウス IgG (SCCA - 1) をそれぞれ二次抗体として、1 時間にわたって室温で使用した。核の視覚化のために、試料を 0.1% ヨウ化ピリジウム溶液中に 5 分間浸漬し、そして PBS で 3 回洗浄した。蛍光観察のために、Leica DMLA 顕微鏡を使用した。

40

ウェスタンブロット分析

50

S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、5 ~ 20 % 勾配のゲルでタンパク質を分離した。電気泳動後、タンパク質をポリビニリジンフルオライド膜 (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) 上に転写し、そして H-99, h14D¹⁴⁶ 又は C20 を含む抗カスパーゼ-14 抗体と一緒にインキュベートした。ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG (Sigma) 又は抗ヤギ IgG を二次抗体として使用し、そして免疫反応性タンパク質を ECL-プラス (Amersham) を用い化学発光法で視覚化させた。

結果

角化細胞中のカスパーゼ-14 は Asp¹⁴⁶ でプロセッシングされる

ウェスタンブロット分析によると、H-99 抗体は角化細胞抽出物中の 17 KDa のバンドしか検出しなかった (図 2)。この結果は、プロセッシングされていない 30 KDa の形態を含む、全皮膚又は皮膚等価モデル由来の抽出物についての結果とは一致しない。この 17 KDa バンドは h14D¹⁴⁶ 抗体 (図 2 B) でも認識され、活性カスパーゼ-14 (p17) の大サブユニットであると推定される。このことは、カスパーゼ-14 の成熟が、終末分化の最終段階中に Asp¹⁴⁶ での開裂によって達成されることを示唆する。さらに、30 KDa のバンドが、皮膚等価モデルにおいて、H-99 及び h14D¹⁴⁶ 抗体によっても認識され、このことは、Asp¹⁴⁶ における切断を示唆する。

角化細胞抽出物からのカスパーゼ-14 の調製

角化細胞中のカスパーゼ-14 の大部分はプロセッシングされた形態、それ故、活性型で存在すると推定されるので (Eckhart L. et al., J. Invest. Dermatol. 115, 1148-51 (2000); Lippens S. et al., Cell Death Differ. 7, 1218-24 (2000); Mikolajczyk, J. et al., Biochemistry 43, 10560-9 (2004))、ヒト角化細胞は優れたカスパーゼ-14 精製源であると考えられる。しかしながら、ヒト角化細胞がカスパーゼ-1 様酵素を含有することも知られている (Takahashi T., J. Invest. Dermatol. 111, 367-72 (1998))。カスパーゼ-1 の基質、例えば WEHD-基質は、カスパーゼ-1 及びカスパーゼ-14 の両者によって加水分解することができる。本発明者は先ず、1.3 M クエン酸ナトリウム及び 5 mM ジチオスレイトールの有無で、カスパーゼ-1 による WEHD-MCA 加水分解を試験した。WEHD-MCA は標準のカスパーゼアッセイ緩衝液中でカスパーゼ-1 の優れた基質であるにもかかわらず、コスモトロピックイオンの存在下では、カスパーゼ-1 はこの基質を加水分解できないことが確認された (データは示さない)。従って、それぞれの画分を、WEHD-MCA に対する加水分解活性、H-99 に対する反応性、及び h14D¹⁴⁶ 抗体といった 3 通りの方法で評価した。表 1 は、連続クロマトグラフィーの結果を示す。HiPrep Q カラムを使用した最初の陰イオン交換クロマトグラフィーの後、収率は 170 % の上昇を示し、比活性は約 10 倍上昇した。この上昇はおそらく、内在性のインヒビターからのカスパーゼ-14 の隔離によるものと考えられる。ウェスタンブロット分析によれば、画分 No. 16 ~ 20 は分子量 17 KDa の H-99 陽性且つ 14D¹⁴⁶ 陽性バンドを含有することが示された。これらの画分は、WEHD-MCA 加水分解活性も認められた。続く Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて、画分 No. 25 ~ No. 29 は、17 KDa の H-99 陽性且つ h14D¹⁴⁶ 陽性バンドの存在による判定に従い、プロセッシングされた形態のカスパーゼ-14 を含有する。これらの画分だけが WEHD-MCA 加水分解活性を示した。Mono S 陽イオンクロマトグラフィ及び Mono P クロマトフォーキングは主だった夾雑タンパク質を除去するのに有効であり、そして比活性はそれぞれにより 3.5 倍及び 7 倍上昇させた。ここでもまた、H-99 陽性且つ h14D¹⁴⁶ 陽性画分だけが WEHD-MCA 加水分解活性を示した。Superdex 75 クロマトグラフィーによる最終段階は分子量 30 KDa のピークを分離し、このピークは WEHD-MCA 加水分解活性ピークと一致した。S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、この調製物が 17 KDa 及び 11 KDa の断片を含むことを示した。前者は H-99 抗体及び

10

20

30

40

50

h 1 4 D ^{1 4 6} 抗体の両者に対して陽性を示し、後者はC 2 0 抗体で認識された。このことは、ヒトカスパーゼ - 1 4 が大サブユニット (1 7 K D a) 及び小サブユニット (1 1 K D a) から成るヘテロダイマーとして精製されたことを示唆する。また、S u p e r d e x 7 5 ゲルクロマトグラフィーは、他のカスパーゼとは異なり、ヒト角化細胞中のカスパーゼ - 1 4 はグランザイム B 活性化型のようにモノマーとして存在することを示した。表 1 はカスパーゼ - 1 4 の精製率をまとめている。約 1 0 0 m g の可溶性タンパク質抽出物から出発して、精製タンパク質 1 1 . 8 μ g を得た。比活性は 7 6 4 倍上昇し、収率は 9 . 1 % であった。

カスパラーゼ - 14 の精製のまとめ

	タンパク質濃度 ug/ml	量 ml	総タンパク質量 ug	酵素活性 AFU (mU)	比活性 (mU/mg protein)	総活性 U	収率 (%)
CC TBS Ext	312.0	320.00	99840.0	3.67	11.8	587.34	100.0
Hi Prep Q	1185.0	15.00	17775.0	133.59	112.7	1001.92	170.6
Mono Q	582.0	8.00	4656.0	150.30	258.2	601.19	102.4
Mono S	61.3	8.00	490.4	56.94	928.8	227.75	38.8
Mono P	50.5	1.00	50.5	338.31	6699.2	169.15	28.8
Superdex 75	11.8	1.00	11.8	106.52	9015.1	53.26	9.1

精製カスパラーゼ - 14 の酵素特性

精製カスパラーゼ - 14 の酵素特性を調べた (図 3 ~ 4)。カスパラーゼ - 14 は様々なカスパラーゼインヒビター、例えば YVAD - FMK (カスパラーゼ - 1 インヒビター)、VDVAD - FMK (カスパラーゼ - 2 インヒビター)、DEV D - FMK (カスパラーゼ - 3 インヒビター)、IETD - FMK (カスパラーゼ - 8 インヒビター)、LEHD - FMK (

10

20

30

40

50

カスパーゼ - 9 インヒビター) 及び VAD - FMK (pan - カスパーゼインヒビター) に対する感受性を有した (図 3)。なお、VEID - FMK の効果はほとんどなかった。とりわけ YVAD - FMK は、カスパーゼ - 14 活性に対して極めて強力な阻害効果を示した。このことはおそらく、カスパーゼ - 1 とカスパーゼ - 14 との間の構造類似性によるものと考えられる。pan - カスパーゼインヒビター VAD - FMK は、VAD - FMK と同程度にカスパーゼ - 14 活性を抑制した。システインプロテナーゼに対するクラス特異的インヒビターであるヨード酢酸 (IAA)、又はセリンプロテナーゼに対するクラス特異的インヒビターである 4 - (2 - アミノエチル) ベンゼンスルホニルフルオリド (AEBSF) は、この研究における試験濃度では有意な阻害効果を示さなかった。

ICAD 分解に対する精製カスパーゼ - 14 の効果

10

カスパーゼ - 14 の天然基質の模索中に、本発明者は ICAD に対するカスパーゼ - 14 の効果を試験した。というのも、核の消失は終末分化にとって極めて重要な事象の 1 つであるからである。通常のカスパーゼアッセイ緩衝液中で組換え ICAD タンパク質と共に精製カスパーゼ - 14 をインキュベートすると、抗 ICAD IgG を用いたウェスタンブロット分析による判定によれば、精製カスパーゼ - 14 は ICAD に対し何ら加水分解活性を示さなかった (図 4 A)。しかし、コスモトロピック塩の存在下では、インタクトな ICAD タンパク質が減少し、2 つの主要な分解生成物が増加することから、精製カスパーゼ - 14 は ICAD に対して限定的な分解作用を示した。SCCA - 1 によりカスパーゼ - 14 が阻害される

SCCA - 1 はセルピン超科に属するものの、システインプロテナーゼ、例えばパパイン及びカテプシン L を阻害する (Takeda A. et al., Biol. Chem. 383, 1231 - 6 (2002))。このことは、SCCA - 1 が CrmA³² のような固有のクロスクラスインヒビターであることを示す。従って、本発明者は SCCA - 1 がカスパーゼメンバーを阻害できるかどうかを試験した。カスパーゼ - 14 の場合、コスモトロピック条件を利用した。組換え活性カスパーゼを SCCA - 1 と共にインキュベートしても、カスパーゼメンバー (1 ~ 10) のいずれも酵素活性について何ら影響を受けなかった。これとは逆に、SCCA - 1 は用量依存式にカスパーゼ - 14 の WEHD - MCA に対する活性を抑制した (図 4 C)。SCCA - 1 はカスパーゼ - 14 による ICAD 分解も阻害した。インキュベーションを延長しても、酵素活性の回復を示すことはなかった。このことは、カスパーゼ - 14 と SCCA - 1 との強い結合を示唆する (図 4 B)。

20

30

活性カスパーゼ - 14 及び TUNEL 陽性細胞の局在

カスパーゼ - 14 が脱核プロセスに関与するかどうかを調べるため、本発明者は、活性カスパーゼ - 14 及び TUNEL の二重染色を行った。図 5 A に示すとおり、プロ形及び活性型を含むカスパーゼ - 14 は、正常ヒト表皮内の有棘細胞から角化細胞にかけて局在していた。このことは過去の所見 (Lippens et al., (2000)、前掲) と合致する。h14D¹⁴⁶ 抗体で検出された活性カスパーゼ - 14 は、角化細胞及び顆粒細胞の一部に限定されていた (図 5 B)。角化細胞のほとんどは遍在的に染色された。TUNEL 陽性細胞は、角化層のすぐ下側に観察されたが、これらの陽性細胞の多くは著しく制限された (図 5 C)。興味深いことに、TUNEL 陽性細胞は、専ら h14D¹⁴⁶ 陽性細胞と共に局在していた。このことは、これらの細胞中で DNA 断片化が起きており、活性カスパーゼ - 14 がこのプロセスに関与していることを示唆している。

40

不全角化性核における ICAD 及び SCCA - 1 の共局在

正常なヒト上皮の縦断面では、FL331 抗体を使用することで、基底細胞及び基底上細胞の核内に ICAD の局在が主にあることがわかる。細胞質は、基底細胞から顆粒細胞において弱く陽性を示した。角化層においては、ICAD に対する免疫反応性は大幅に低減した。N 末端ペプチド抗体 DFF45 / ICAD Ab - 2 を使用しても事実上同じ結果が得られた (データは示さず)。AD 患者の表在性角化層を抗 ICAD 抗体 (FL - 331) で染色した場合、様々なサイズのクラスター領域がこの抗体に対して陽性を示した (図 6 B)。PI による核染色は、不全角化性の核がこれらの斑状の島内に常に見いだ

50

されることを示した(図6C)。表在性角化層の明視野は、凹凸の多い粗い表面を示した(図6D)。重畳画像は、不全角化部位がICAD陽性部位と一致することを示した(図6E及び5F)。これらの結果は、終末分化において核を排除するのにICAD分解が必要とされることを示唆する。

正常な皮膚の場合、極めて低レベルのSCCA-1が顆粒層内で検出された。活性ADを有する表在性角化層内でも、陽性部位の斑状分布が顕著な強い免疫染色が見いだされた(図7H)。同様に、SCCA-1陽性領域は、PI陽性の核の層、即ち不全角化部位と一致した(図7J~L)。これらの結果をまとめると、ICAD/CAD系が脱核プロセスの主要な役割を果たし、そしてSCCA-1はサブレッサーとしてこの反応に関与することを示唆する。

10

考察

カスパーゼ-14は大部分が表皮内で発現され、その他の組織内ではほとんど発現されない(Van de Craen, Met al., Cell Death Differ. 5, 836-46(1998))。過去の報告によれば、ケラチノサイトの終末分化はカスパーゼ-14のプロセッシングと連携しているとのことであり、このことは、カスパーゼの有するプロテアーゼ活性の亢進を示唆する(Lippens, Set al., Cell Death Differ. 7, 1218-24(2000); Eckhartl. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 655-9(2000); Hus. J. Biol. Chem. 273, 29648-53(1988))。最近、Mikolajczyk et al., (2004)前掲)は、
 グランザイムB切断カスパーゼ-14がコスモトロピック塩の存在下で酵素的に活性であることを実証した。この研究において、本発明者は、ヒトカスパーゼ-14がケラチノサイト分化の最終段階において活性であるかどうかを調べるために、完全に分化されたケラチノサイトからのカスパーゼ-14の精製を試みた。本発明者は、大サブユニット、プロ形(H-99)(Asp¹⁴⁶(h14D¹⁴⁶)に推定カスパーゼ切断部位を有する)及び小サブユニット(C20)をそれぞれ認識する3種の抗体を使用した。最終調製物は2つのタンパク質バンド、すなわちh14D¹⁴⁶抗体によって認識された17KDaのタンパク質バンド、及びC20抗体によって認識された11KDaのタンパク質バンドから成った。これらのタンパク質バンドは、活性カスパーゼ-14の大及び小サブユニットである。精製工程の間、H-99陽性の17KDaのバンドが、h14D¹⁴⁶抗体と一緒
 に認識された。このことは、大サブユニットがそのカルボキシル末端においてAsp¹⁴⁶で終わることを示唆している。小サブユニットのアミノ末端領域はLys¹⁵³-Asp-Ser-Pro-Glnとして同定され、このことは、プロセッシングがIle¹⁵²とLys¹⁵³との間で生じることを示唆する。この部位はカスパーゼメンバーとしては奇異な切断部位である。このことは、包皮抽出物から免疫沈降させたカスパーゼ-14が同じ部位で切断を示すという、Chien他の発見(Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002 Aug 30; 296(4); 911-7)と合致する。従って、ヒトカスパーゼ-14は高活性ヘテロダイマーとして均質に精製されたと結論付けた。カスパーゼ-14の成熟には、2つの部位Asp¹⁴⁶及びIle¹⁵²におけるプロセッシング、並びにリンカー領域Xxx¹⁴⁷及びIle¹⁵²内の6つの残基の除去が関与するものと示唆された。2つの異なる切断部位(一方は酸性、他方は疎水性)の存在はまた、カスパーゼ-14の活性化が多数の酵素により多段階的に行われることを示唆する。

20

30

40

精製カスパーゼ-14の酵素学的特性は極めて独自のものであった。精製カスパーゼ-14は、既知のカスパーゼインヒビターに対し比較的広いインヒビター感受性を示した。とりわけ、カスパーゼ1インヒビターYVAD-FMKが最も強い阻害作用を示した。YVAD-FMKはWEHD-MCA並びに別のカスパーゼ-1基質であるYCAD-MCAに対して最も高い活性を示した。このことは、カスパーゼ-1とカスパーゼ-14との密な関係を示唆する。しかし、本発明者が明らかにしたところでは、カスパーゼ-14は顕著に異なる特性を有している。本発明者は、SCCA-1がカスパーゼ-14に対する

50

内在性インヒビターであることを初めて解明した。SCCA-1の最も特異的な特性は、カスパーゼ-14に対する著しい特異性である。カスパーゼ1~10の他の構成員がSCCA-1による影響を受けることはない。合成基質DEV D-MCA又は天然基質ICADを使用して、SCCA-1がカスパーゼ-3活性を阻害することはなかった。これはCrm Aとは対照的である。Crm Aもセルピン超科に属し、カスパーゼ-1及びカスパーゼ-8を含む多数のカスパーゼを抑制することができることで知られる(Gagliardini V. et al., Science 263, 826-8 (1994))。XIAPはカスパーゼ-3, -7及び-9を阻害することで知られる(Srinivasula S.M. et al., Nature 410, 112-6 (2001))。抗アポトーシス性タンパク質p35はカスパーゼ-1, -3, -6, -7, -8及び-10を阻害することから、より広いスペクトルを有すると考えられる。これらの阻害タンパク質Crm A, IAP及びp35の全てがいくつかの開始及び実行カスパーゼの一部を抑制し得るという事実は、これらの分子が典型的なアポトーシス経路の実行に参与していることを示唆する。他方、本発明者の結果が強く示唆しているのは、SCCA-1が通常のアポトーシス事象におけるキープレイヤーではないが、カスパーゼ-14により媒介される脱核プロセスにおける重要なレギュレーターである、ということである。

このプロセスの分子メカニズムは解明されていなかった。本発明者は、ヒトカスパーゼ-14がコスモトロピック塩の存在下において、ICADを分解できることを明らかにした。ICAD(DNA断片化因子「DF F45」とも称される)は、カスパーゼ活性化型DNアーゼ(CAD)(又はDF F40)と称されるマグネシウム依存性エンドヌクレアーゼに対するインヒビターである。ICAD/CAD系は、アポトーシス性細胞死中の染色体DNAの分解において主要な役割を演じる。CADに結合したICADは、不活性複合体として存在する。カスパーゼ-3は、ICADに対し限られたタンパク質分解を示し、2つの部位Asp¹¹⁷及びAsp²²⁴で切断する。この切断はCADを活性化し、DNA分解を開始させる(Nagata S. Exp. Cell Res. 256, 12-8 (2000))。カスパーゼ-3はアポトーシスの際の大量の細胞タンパク質の切断にとっては必ずしも必要でないが、ICADの切断にとっては必須である(Tang D. et al., J. Biol. Chem. 273, 28549-52 (1998))。このことは、カスパーゼ-3がDNA断片化に極めて重要であり、他の実行カスパーゼ、即ちカスパーゼ-6や7は重要ではないことを示す。興味深いことに、カスパーゼ-14はICADから、12kDa及び35kDaの似たような切断断片を生成した。配列分析は同一の切断部位を示した。このことは、カスパーゼ-14がカスパーゼ-3の完璧な代替物となり得ることを示唆している。カスパーゼ-14はICADを分解し得るものの、下記の理由から、プロアポトーシスカスパーゼ-3とは明らかに異なる。第1に、カスパーゼ-14の過剰発現はアポトーシス性細胞死を誘導しない(Van de Craen. Cell Death Differ. 5, 838-46 (1998))。このことはカスパーゼ-3とは対照的である。第2に、カスパーゼ-14は種々のアポトーシス性刺激では活性化されない(Lippens et al. (2000)、前掲)。開始カスパーゼ又はその他のカスパーゼメンバーは、プロ-カスパーゼ-14をプロセッシングすることができなかった。このことは過去の所見と一致する(Lippens et al. (2000)、前掲)。活性化は終末分化においてのみ発生する(Eckhart L. et al., (2000)、前掲)。第3に、カスパーゼ-14の合成は、成人組織における分化中のケラチノサイトに限定される(Eckhart L. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 655-9 (2000))。また、ICAD切断に対するカスパーゼ-14の能力は、カスパーゼ-3とは顕著に異なる様式で調節される。カスパーゼ-14によるICAD分解は、異常な高濃度のコスモトロピックイオンを必要とする。このようなイオン濃度では、他のカスパーゼはほとんど活性ではなかった。総合的に見て、カスパーゼ-14は、ケラチノサイト分化プログラムがその活性化を調節することから、カスパーゼメンバーの中では特殊な位置づけにあるように考えられる。

10

20

30

40

50

ケラチノサイト終末分化におけるICAD/CAD系の関与は、*in vivo*実験によってさらに裏づけされる。免疫組織化学的研究は、ICADが基底ケラチノサイトから有棘ケラチノサイトにかけて核内に存在し、顆粒細胞で消失し、核の消失は終末分化の際に起こることが示された。AD患者の表在性表皮内には、ICADの強い免疫染色が斑状部位に示された。これらの領域は若干粗い表面を有し、半透明性が低い。まさにこれらの領域上に、PI陽性な、未消化の核の集合が共局在していた。他の領域が抗ICAD抗体で染色されることはなかった。また、AD患者の皮膚からのテープストリッピング試料はインタクトなICADタンパク質の存在を示したが、健常人の抽出物中では検出されることはなかった。これらの結果は、ICADが終末分化の際の脱核プロセスに関与していることを示唆する。

10

正常な表皮ではSCCA-1はほとんど発現されない。他方、乾癬表皮、口腔粘膜及び食道においては、強い発現が報告されている(Takeda A. et al., *J. Invest. Dermatol.* 118, 147-54 (2002))。興味深いことには、これらの組織には不全角化が伴っている。本発明者は、不全角化部位にはSCCA-1の強い染色も見いだされることを明らかにした。さらに、SCCA-1及びICADは、核の集合が存在する箇所と同じ部位に常に共局在していた。SCCA-1又はICADが陰性である他の表皮表面部分はなかったため、不全角化部位におけるこれらの分子の共局在は、これらの分子が脱核プロセスの抑制に関与することを示唆する。パン-カスパーゼインヒビターVAD-FMKにより、皮膚等価モデルにおいて核が消失しなくなることが報告されている(Weil他、1999)。VAD-FMKが最も強力なカスパーゼ-14インヒビターの1つであるという本発明者の発見は、カスパーゼ-14がおそらくこの反応における候補であるという可能性を高める。カスパーゼ-14は、乾癬皮膚の不全角化部位内ではダウンレギュレートされ、また口腔表皮内には存在しない。口腔表皮では、核の消失は何らかの形で損なわれるか、或いは行われぬ(Lippens et al., (2000)、前掲)。興味深いことには、SCCA-1はこれらの組織内でアップレギュレートされる。おそらく、これらの分子の異常発現は、核の恒久的な存在などを含む、不完全な分化を引き起こすものと考えられる。

20

皮膚内のカスパーゼ-14の活性化メカニズムは全体的によくわかっていない。皮膚又は皮膚等価モデルにおいてのみ活性化が観察され、細胞培養系では観察されない(Eckhart L. et al. (2000)、前掲)。実際に、本発明者は種々の条件を試した。これらの条件には、血清の添加、集密になってからカルシウムの存在下もしくは非存在下での14日目までの培養期間の延長、カルシウムイオノフォアA23187による処理、又は多くの分化マーカーをアップレギュレートするのに十分な30分間にわたる空気暴露を含む。これらの分化刺激は顕著なカスパーゼ-14 mRNA発現を誘導するものの、カスパーゼ-14活性を引き起こすのに効果的な刺激はなかった(データは示さない)。活性化プロセスは厳密に制御され、単層培養中で強く抑制される。層化及び空気暴露がその活性化に必要と思われる。カスパーゼ-14の活性化は、アポトーシスプログラムによってではなく、分化プログラムによる制御を介して行われるのが明らかである。終末分化プロセス中には、セリン、システイン及びアスパラギン酸プロテイナーゼを含む多くのプロテイナーゼも活性化される。トリプシン様及びキモトリプシン様血清プロテイナーゼは、最も外側の角化細胞を脱落させる役割を演じることが示唆されている。システインプロテイナーゼの一部、例えばカテプシンB及びLは分化されたケラチノサイト中でアップレギュレートされる。カテプシンD、アスパラギン酸プロテイナーゼもまた、角化細胞を脱落させる役割を演じることが示唆されている。これらの酵素は他の分化メカニズム、例えばカスパーゼ-14の活性化に関与することがある。

30

40

以上をまとめると、本発明者は、ヒト角化細胞抽出物からカスパーゼ-14を精製した。カスパーゼ-14は核の消失を誘導し、この消失はアポトーシス様であるが、しかしケラチノサイト分化の最終段階でICAD分解を介して生じる区別可能な変化であることが強く示唆される。このプロセスはいくつかのアポトーシス性因子を共有するものの、これは損傷された細胞の排除を招く細胞死プロセスではなく、主要な役割であるバリアー機能

50

のための構造全体を完成することを目的とした構成プロセスである。カスパーゼ - 14 又は SCCA - 1 の異常発現は分化プログラムに直接的に影響を及ぼし、その結果、不全角化及びバリアー機能崩壊が生じる。

2. 皮膚角層細胞の SCCA の発現を指標とする、皮膚性状の評価材料と方法

(1) 抗体

SCCA - 1 及び 2 の両者を認識するポリクローナル抗体は、乾癬表皮の鱗屑から精製した SCCA (SCCA - 1 及び SCCA - 2) を用いて、ポリクローナル抗体を作製した。乾癬表皮の鱗屑抽出物 (抽出液: 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl) を遠心後、上清を Sephacryl S-200, DEAE Sepharose, Mono Q, Mono S, Mono P, Superrose 6

10

にて精製し、これを抗原として、ウサギを感作動物として用いた。抗 - SCCA - 1 モノクローナル抗体及び抗 - SCCA - 2 モノクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology, CA, USA より入手した。

(2) 免疫組織化学的検査

表皮生検を AMEX 手順 (Sato Y. et al. Am. J. Pathol., 125, 431-435 (1986)) に従い、冷却アセトンで固定してからパラフィンの中に包埋した。切片をキシレンで脱パラフィン処理し、アセトン、次いで PBS で洗浄した。次にその切片の非特異的結合部位を 10% 正常ヤギ血清 (Histofine, Tokyo, Japan) でブロックした。

表皮切片を抗 - SCCA - 1 モノクローナル抗体 (1:500 に希釈)、上記のとおり

20

(3) ELISA

皮膚角層試料は透明粘着テープ (セロテープ (登録商標) (NICHI BAN)) を皮膚表面に貼付したのち剥離するテープストリッピングにより採取した。皮膚角層の付着したこのテープを裁断、抽出バッファー (0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl, 0.1% Tween-20, 1 ml) に浸漬、超音波処理 (20 sec x 4) にか

30

け、試料抽出液を作製した。PBS に希釈したポリクローナル抗 SCCA 抗体 (1:1000 に希釈) を 100 µl ずつ、96 穴 ELISA プレートの各ウェルに分注し、一晚室温におき、プレートの固相に結合させた。その後、プレートへの非特異的な結合を阻害するために、ブロッキング溶液 (ブロックエースを PBS-Tween 20 で希釈した溶液、300 µl/ウェル) にて 1 時間インキュベートした。

上記試料抽出液 50 µl を ELISA プレートの各ウェルに添加し、37 °C で 2 時間反応させた。モノクローナル抗 SCCA - 1 抗体 (1:1000 に希釈) 又はモノクローナル抗 SCCA - 2 抗体 (1:1000 に希釈) を添加して 37 °C で 1 時間反応させた。次に、二次抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスを添加して 37 °C で 1 時間反応させ、0.1% Tween-20 PBS で洗浄後、基質 3,3',5,5'-テ

40

(4) 皮膚の経皮蒸散水分量 (TEWL) の測定

検体 (正常人の顔面及び内腕) の TEWL は、TEWA meter (TM120) を用いて測定を行った。

結果

(1) 免疫組織化学的検査

図 8 は、表皮検体として、非露光部位 (比較的日光に晒される機会の少ない部位) である上腕部 (ヒト 24 歳)、臀部 (ヒト 46 歳)、太腿部 (ヒト 75 歳) 由来の表皮、及び

50

露光部位（比較的日光に晒される機会の多い部位）である頬部（ヒト20歳、76歳）、目瞼（ヒト82歳）由来の表皮を採取し、抗体としてSCCA-1及びSCCA-2の両者に結合する抗-SCCAポリクローナル抗体を用い、顕微鏡観察した結果である。図8から、非露光部位と比べ、紫外線への暴露などといったより過酷な環境に常に晒されている露光部位の表皮上層においてSCCAが顕著に亢進していることがわかる。

図9は、正常表皮上層（50歳男性）及び乾癬に罹った表皮上層のSCCA-1及び2の発現を示す。図から明らかな通り、正常皮膚ではSCCA-1及び2共に弱い発現しか示さないのに対し、炎症性不全角化症である乾癬に罹った皮膚では、SCCA-1及び2ともに顕著な発現を示した。

以上より、正常な皮膚角層に比べ、露光部位や不全角化の生じた皮膚部位においてSCCAの発現の顕著な亢進が認められた。

(2) ELISA

1) 正常皮膚角層におけるSCCA発現量

正常な皮膚性状を示す露光部位の皮膚（顔面及び頬部）及び正常な皮膚性状を示す非露光部位（内腕）に対しテープストリッピングを施すことでそれぞれの角層を採取し、SCCA-1及びSCCA-2の発現量をELISAにより測定した。その結果を図10に示す。

非露光部位に比べ、露光部位でのSCCA-1及び2の発現が顕著に亢進していることがわかる。従って、ELISA法により、正常な性状を示すとはいえ、過酷な環境に常に晒されている露光部位の表皮上層の方が、非露光部位と比べ、SCCA、特にSCCA-1が顕著に亢進していることが定量的に判定できる。

2) 乾癬皮膚角層におけるSCCA発現量

正常な皮膚性状を示す個体の皮膚（非露光部位：内腕）及び乾癬に罹った患者の皮膚の各々に対しテープストリッピングを施すことでそれぞれの角層を採取し、SCCA-1及びSCCA-2の発現量をELISAにより測定した。乾癬に罹った患者の皮膚部位として、痒みを伴った被疹部位、痒みの伴わない被疹部位、及び無疹部位を試験した。その結果を図11に示す。

正常個体の皮膚角層においてはSCCA-1及び-2の発現はほとんど認められないのに対し、乾癬に罹った患者の被疹患部における角層では、痒みを伴うか伴わないかにかかわらず、SCCA-1及び-2の発現の顕著な亢進が認められた。なお、乾癬患者でも、乾癬症状の認められない皮膚部位（無疹部）においては、SCCA-1及び-2の発現はほとんど認められなかった。

3) アトピー性皮膚炎皮膚角層におけるSCCA発現量

正常な皮膚性状を示す個体の皮膚（非露光部位：内腕）及びアトピー性皮膚炎に罹った患者の皮膚の各々に対しテープストリッピングを施すことでそれぞれの角層を採取し、SCCA-1及びSCCA-2の発現量をELISAにより測定した。アトピー性皮膚炎に罹った患者の皮膚部位として、被疹部位及び無疹部位を試験した。その結果を図12に示す。

正常個体の皮膚角層においてはSCCA-1及び-2の発現はほとんど認められないのに対し、アトピー性皮膚炎に罹った患者の患部における角層では、被疹部位であるか無疹部位であるかにかかわらず、SCCA-1及び-2の発現の顕著な亢進が認められた。従って、アトピー性皮膚炎の場合、アトピー性皮膚炎の発症前であっても、SCCA-1及び/又は-2を指標とすることで、その疾患の診断を行うことが可能である。このことは、SCCAを指標とすれば、アトピー性皮膚炎の罹りやすさを判定でき、その予防又は早期（例えば発症前）対処が可能となる。

4) SCCA発現量と経皮蒸散水分量(TEWL)との相関

皮膚角層についてELISAによりSCCA発現量を測定するとともに、皮膚生理パラメーターとしてのTEWLも調べ、SCCA発現量とTEWLとの相関を調べた。その結果を図12に示す。SCCA-1とTEWLとではPearson相関係数が0.876であり、SCCA-2とTEWLとではPearson相関係数が0.600であり、と

10

20

30

40

50

もに有意な相関が認められ、従ってTEWLが高く、肌の性状が比較的悪い状態のとき、SCCA-1及び-2ともに、特にSCCA-1の発現量が高くなることがわかった。

5) 花粉症皮膚角層におけるSCCA発現量

正常な皮膚性状を示す個体の皮膚(コントロール)及び花粉症による肌荒れを患った患者の皮膚の各々に対しテープストリッピングを施すことでそれぞれの角層を採取し、花粉症皮膚における肌荒れとTEWLとの関係を調べるとともに、花粉症皮膚における肌荒れとSCCA-1の発現量をELISAにより測定した。皮膚部位として、内腕(非露光部)及び額(露光部)を選定した。

図14は花粉症皮膚における肌荒れと、TEWLとの関係(A)、及びSCCA1発現量との関係(B)を示す。この図から明らかとなり、花粉症によりTEWLの有意な上昇が認められ、皮膚バリアー機能の低下が生じ、肌荒れ状態となった皮膚では、正常個体に比べ、SCCA-1の発現が顕著に亢進していることが認められた。従って、SCCA-1が花粉症による肌荒れの指標となることが明らかとされた。また、花粉症皮膚では、日光の当たらない内腕でもTEWLの悪化、即ちバリアー機能の低下が認められ、全身の炎症反応とSCCAの亢進が身体のバリアー機能を悪化させていることが示唆された。図15は花粉症性皮膚における肌荒れ皮膚とSCCA-1の発現亢進との相関関係を示す。SCCA-1とTEWLとではPearson相関係数が0.8086であり、有意な相関が認められた。従って、花粉症により皮膚バリアー機能が低下し、即ち肌荒れ状態が悪化しているほど、SCCA-1の発現量が高くなることが明らかとなった。

従って、肌荒れの発症前であっても、SCCAを指標とすれば、花粉症による肌荒れの罹りやすさを判定でき、その予防又は早期(例えば発症前)対処が可能となる。また、花粉症皮膚において不全角化が生じていることは全く新たな知見であり、花粉症皮膚におけるバリアー機能の悪化や不全角化がSCCAに起因していることは注目に値する。

[配列表]

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> SHISEIDO CO.LTD.

<120> Method for Evaluating Skin Condition on the Basis of Squamous Cell Carcinoma Antigen

<130> SSD-S628

<150> JP 2005-080533

<151> 2005-03-18

10

<160> 2

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Forward Primer

20

<400> 1

aaggatccaa tccgcggtct ttggaagagg ag

32

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Reverse Primer

30

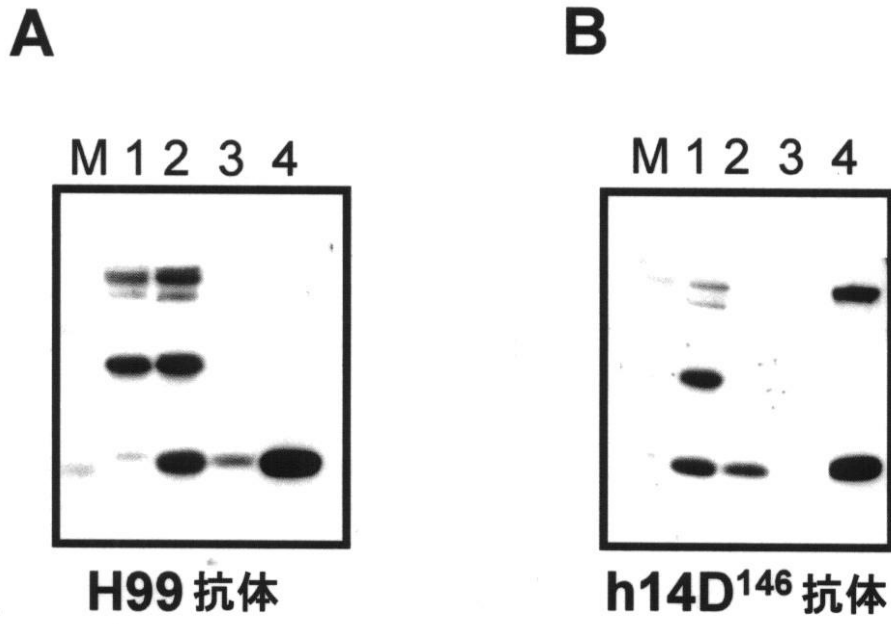
<400> 2

tttctgcagg ttgcagatac agccgtttcc ggagggtgc

39

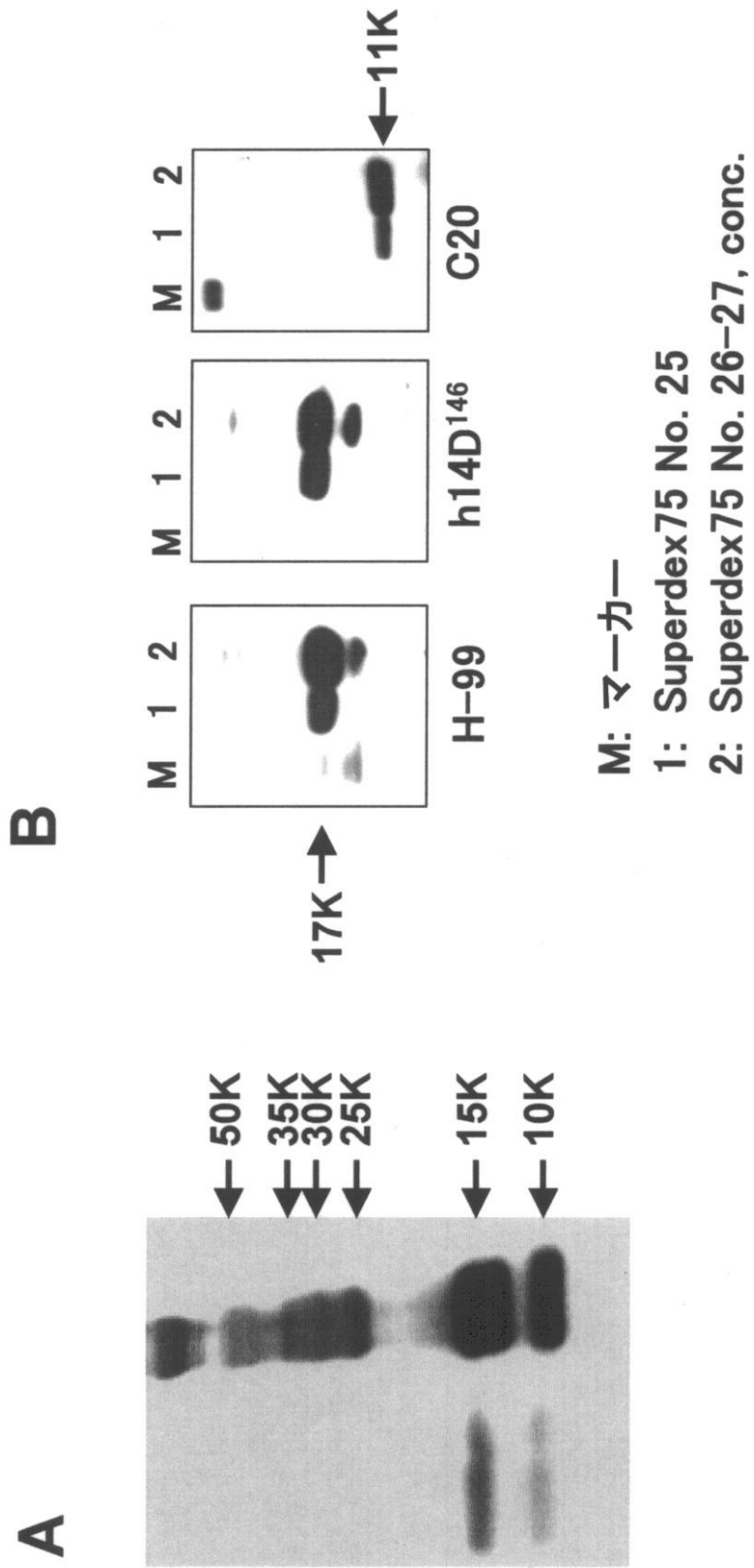
【 図 1 】

Fig.1



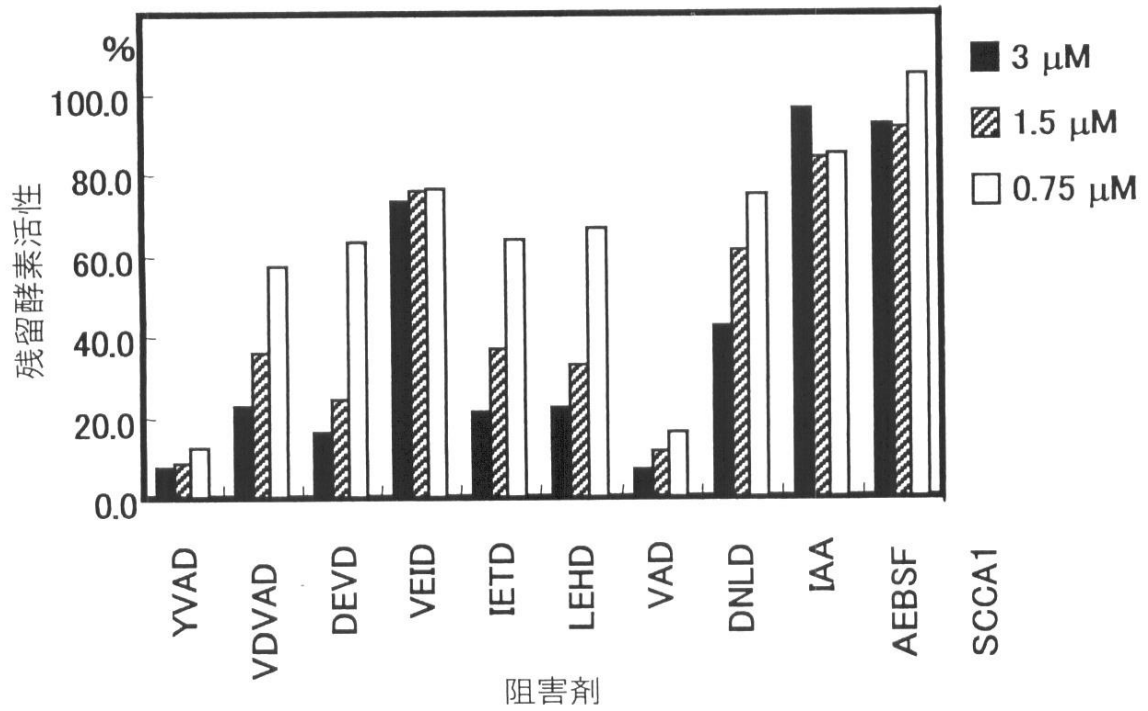
【 図 2 】

Fig.2



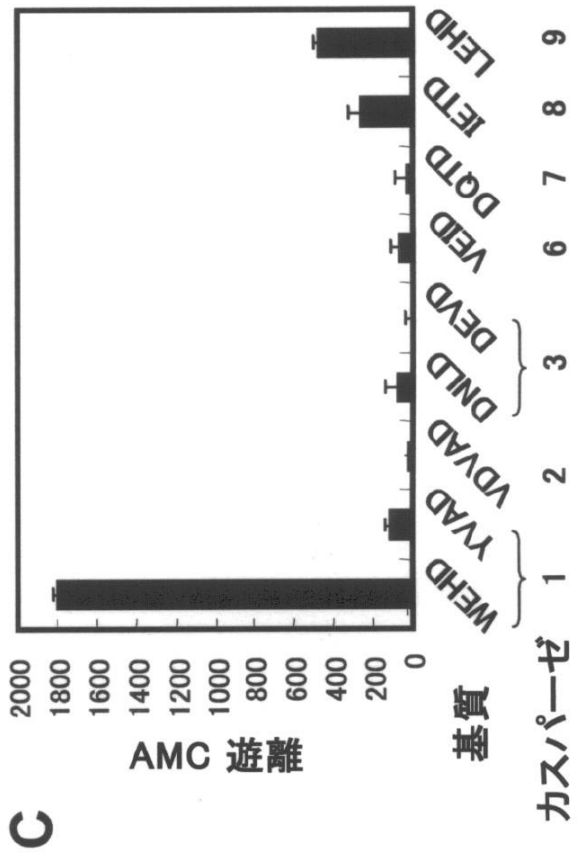
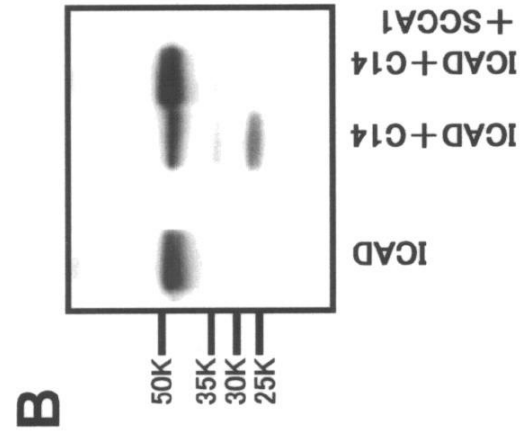
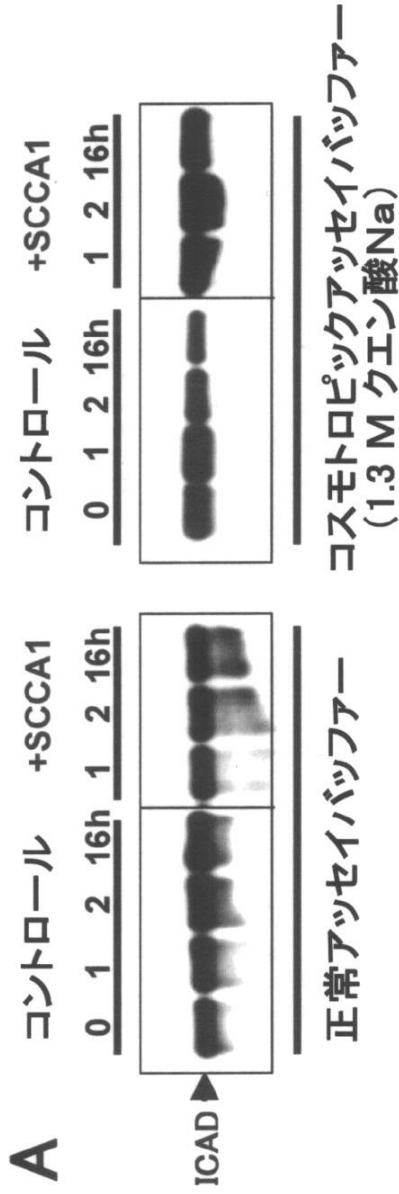
【 図 3 】

Fig.3



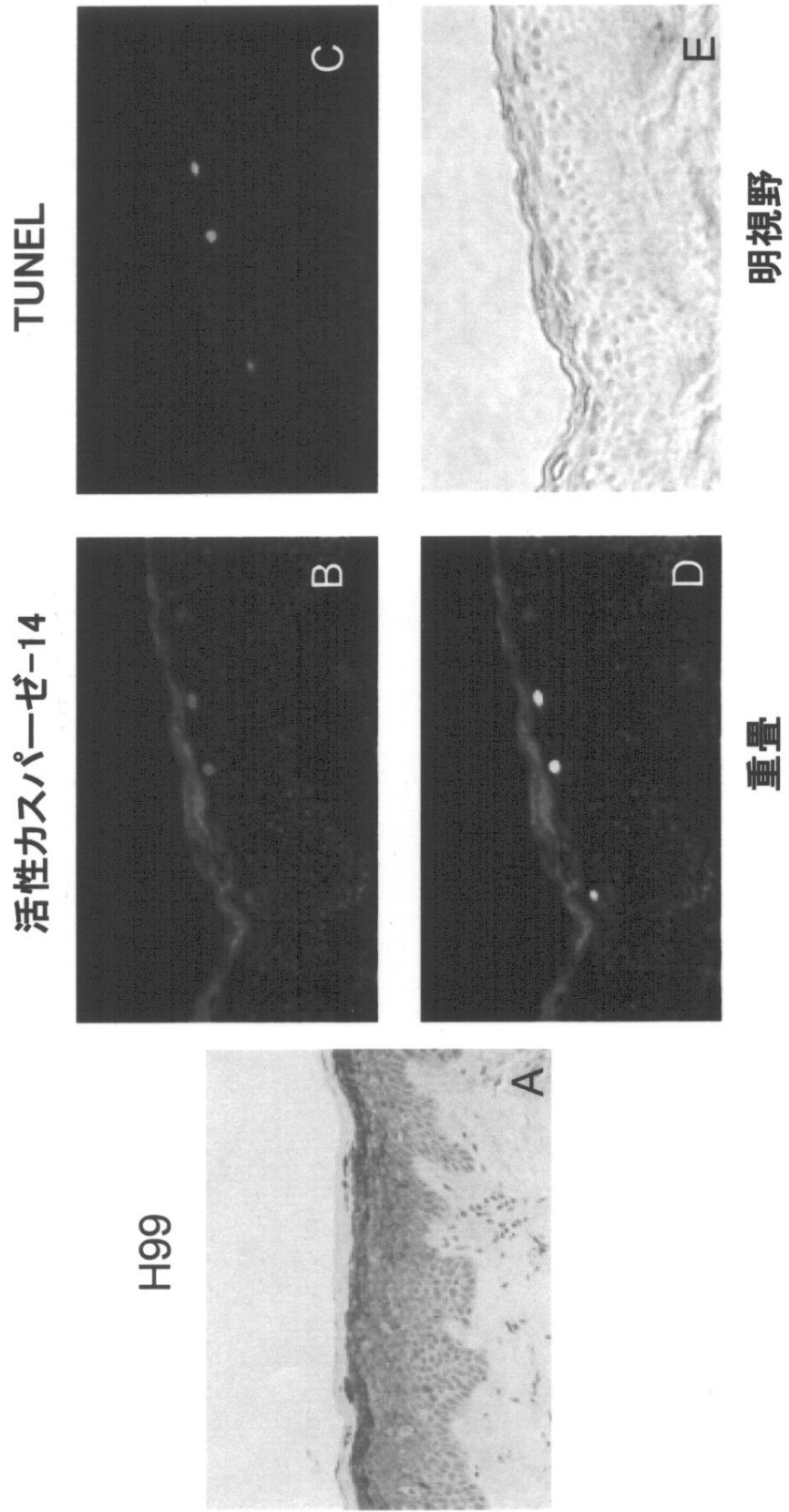
【 図 4 】

Fig.4



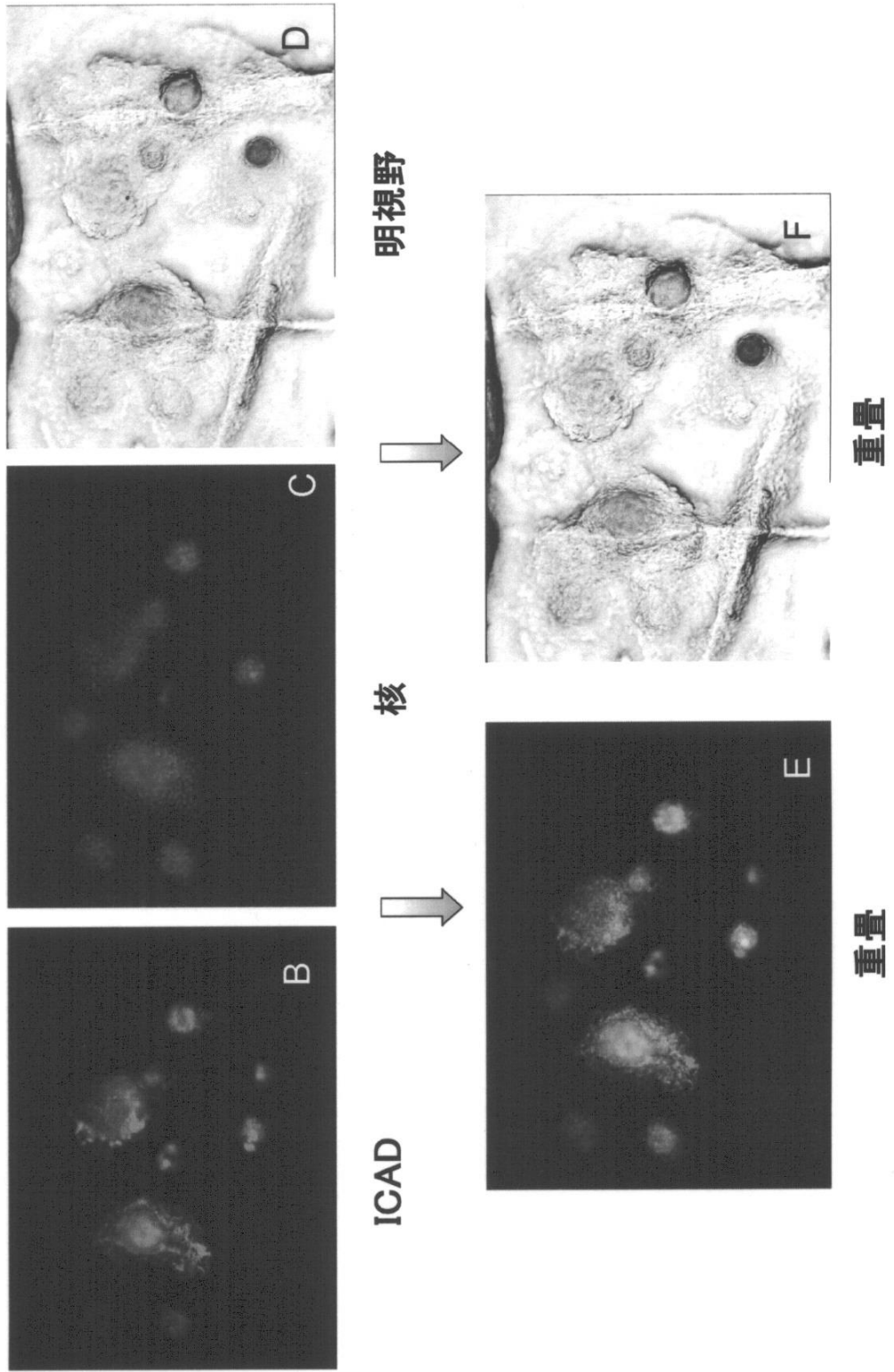
【 図 5 】

Fig.5



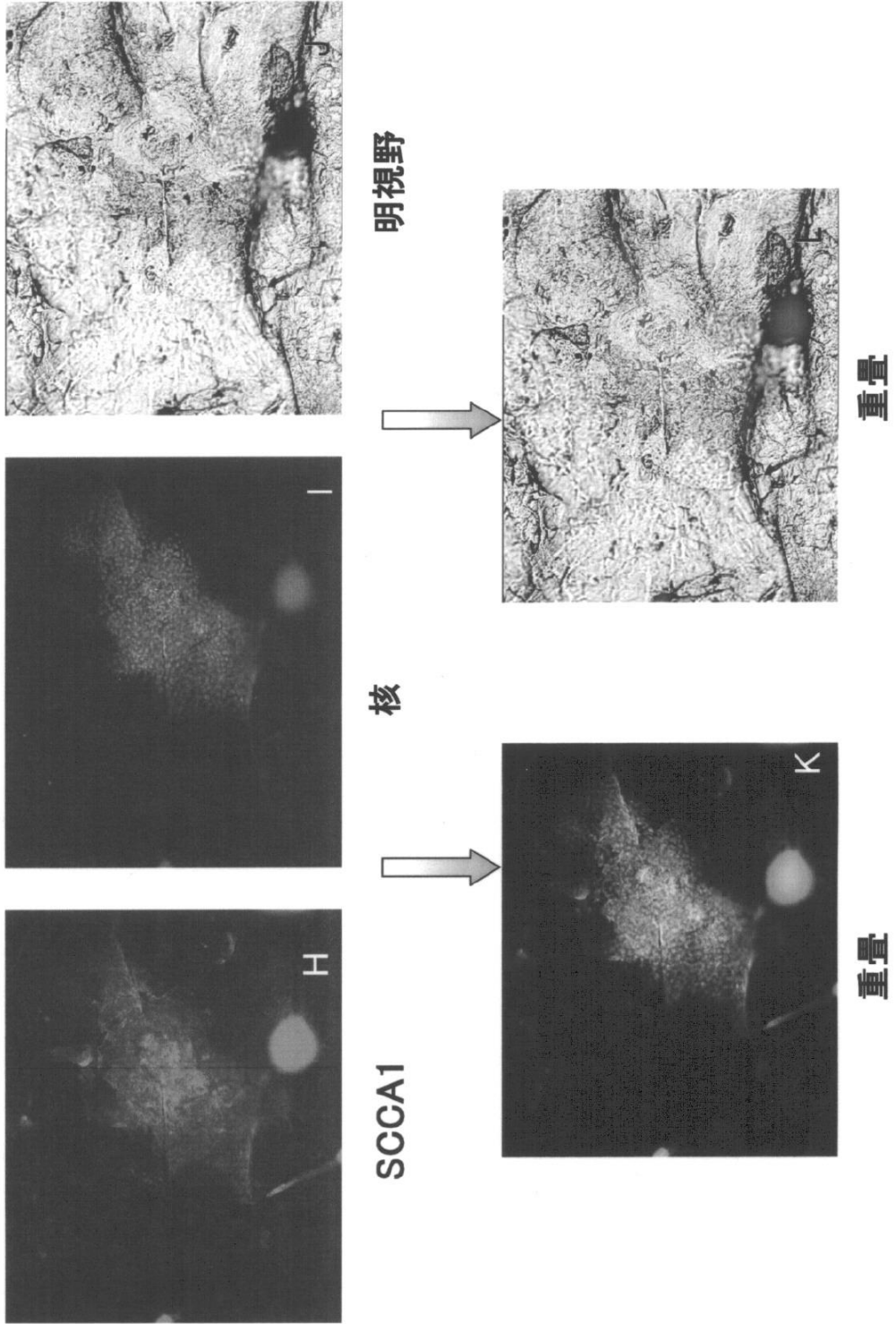
【 図 6 】

Fig.6



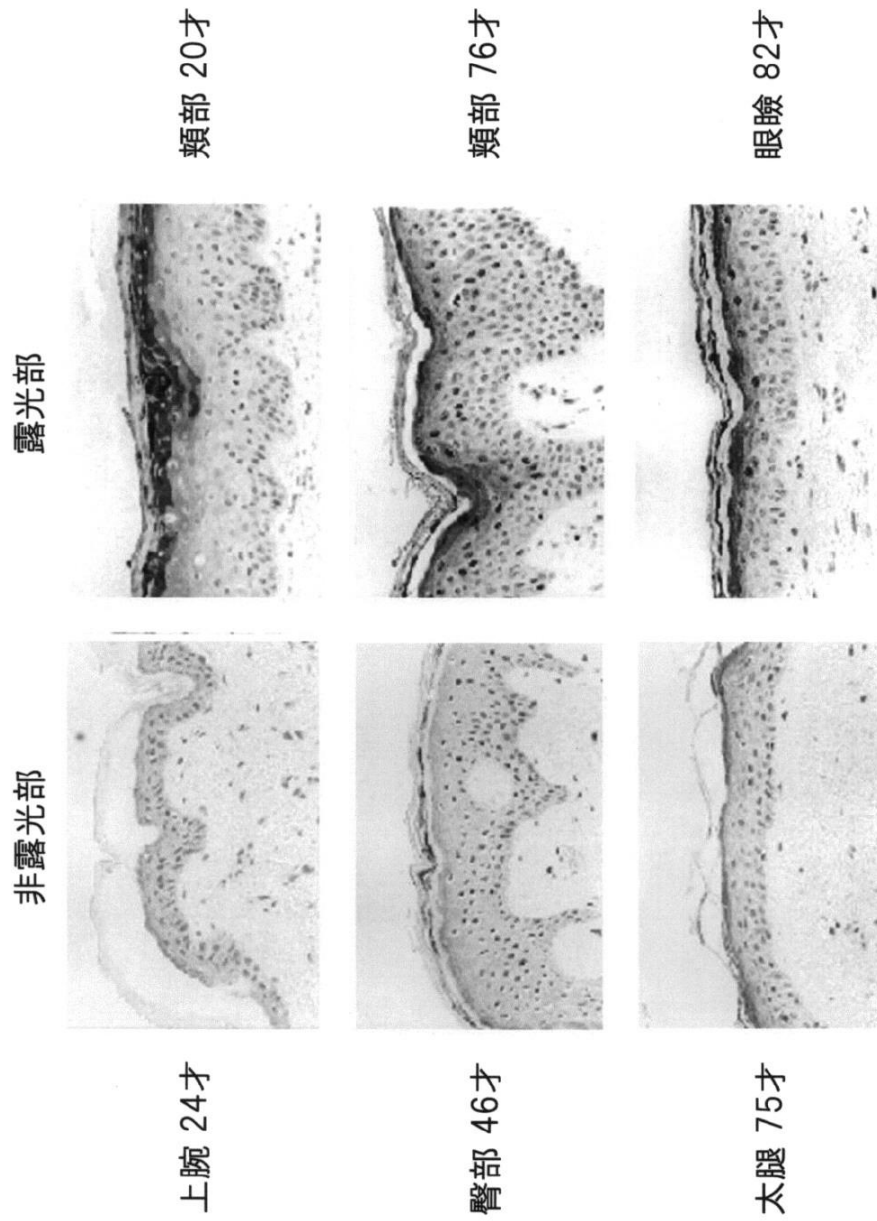
【 図 7 】

Fig.7



【 図 8 】

Fig.8



【 図 9 】

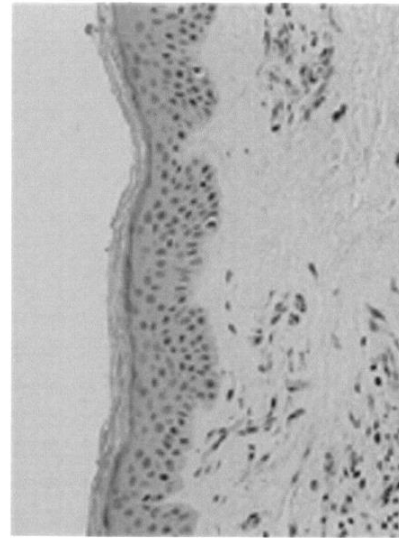
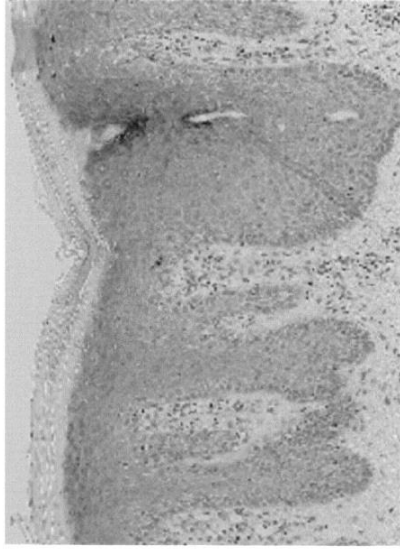
Fig.9

正常



SCCA1

乾癬



SCCA2

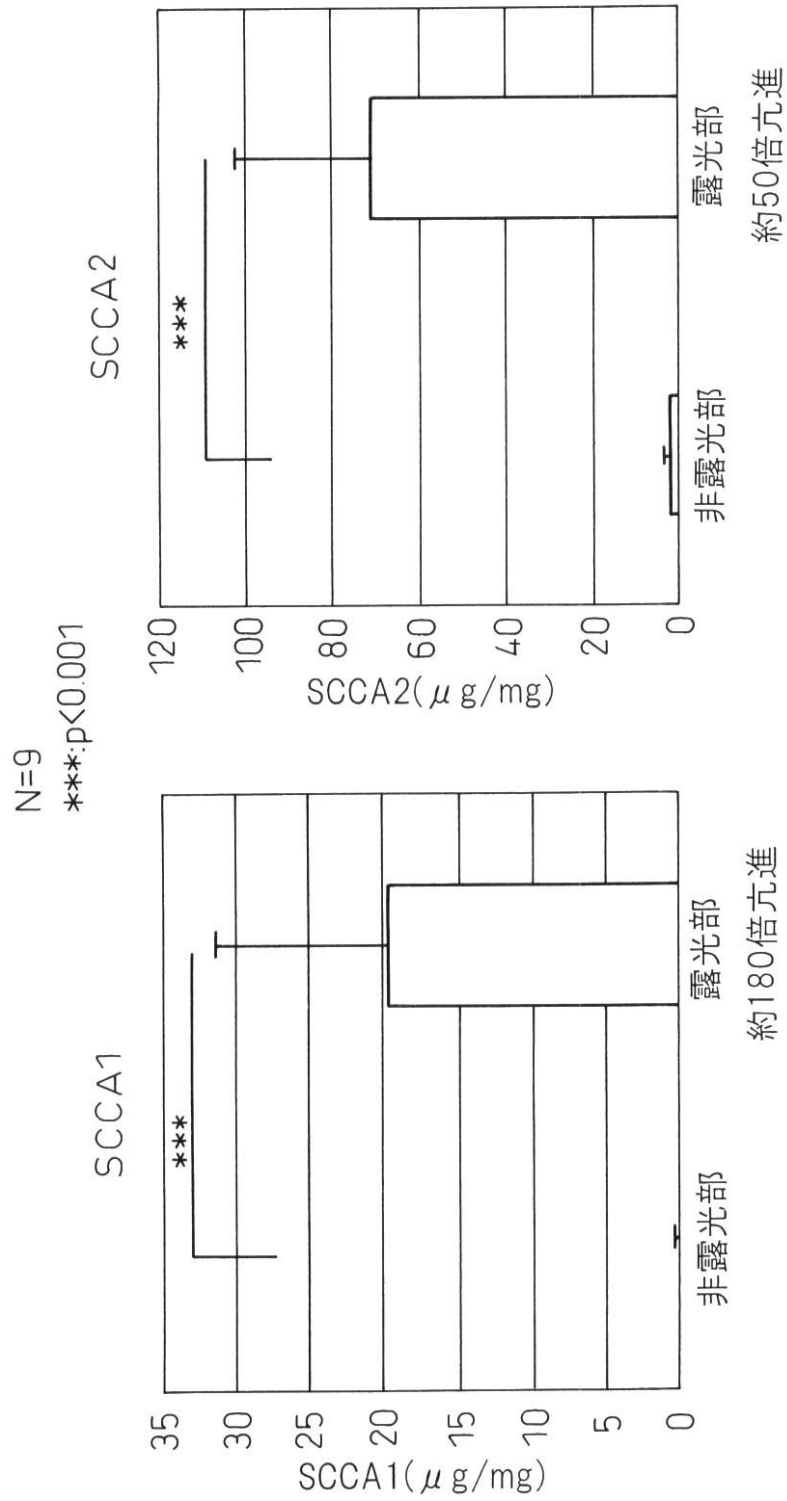


x10

x20

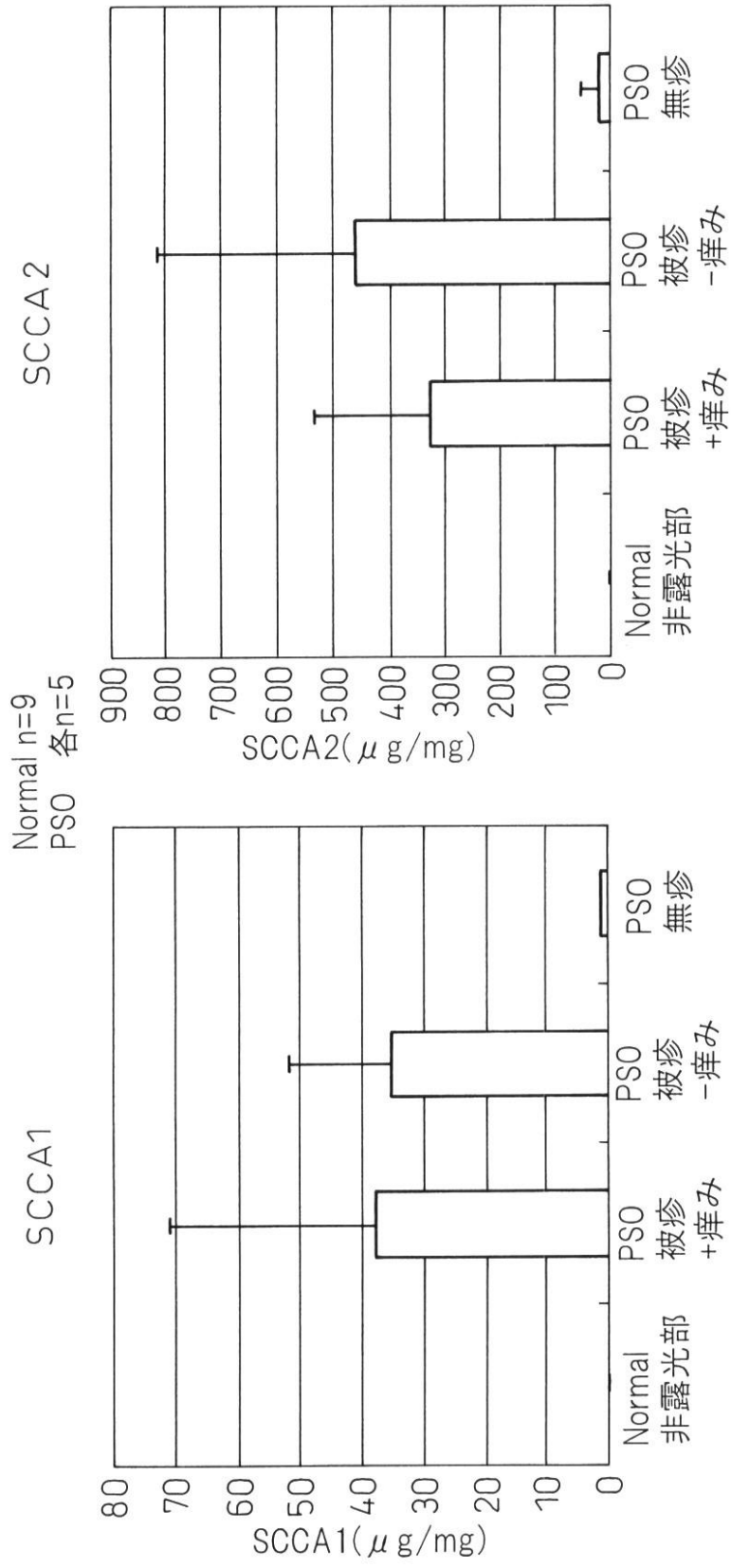
【 図 10 】

Fig.10



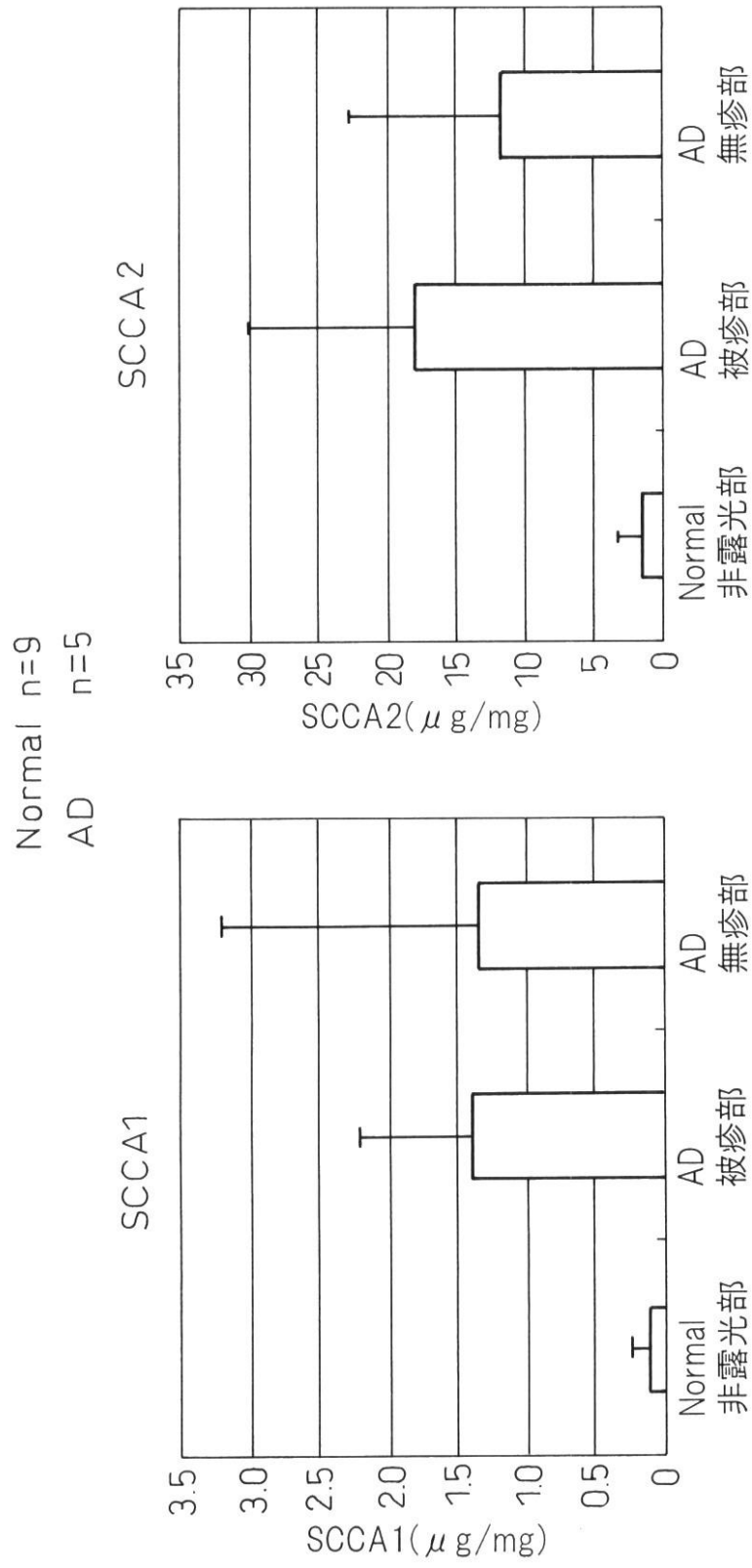
【 図 1 1 】

Fig.11



【 図 1 2 】

Fig.12



【 図 1 3 】

Fig.13

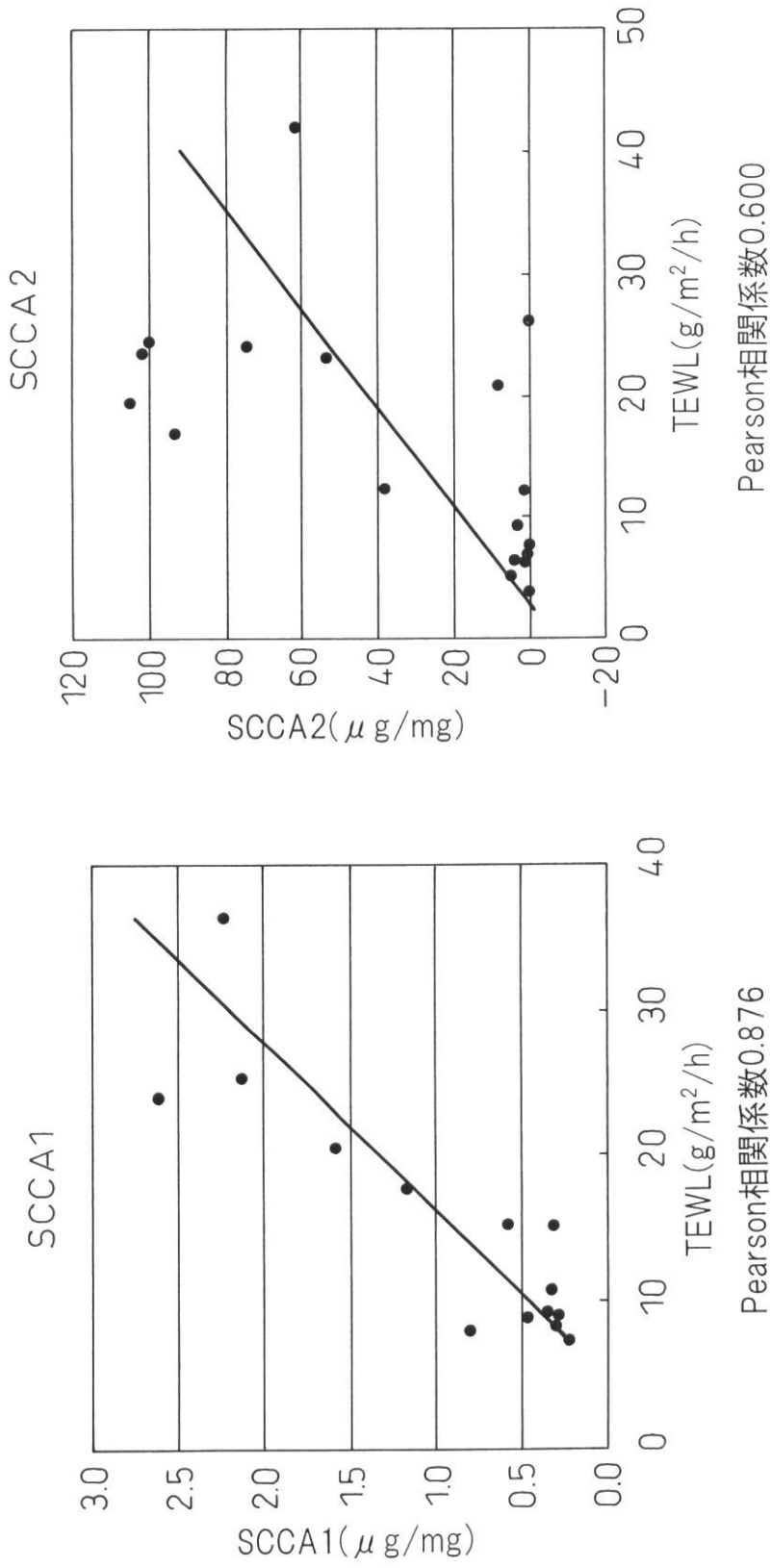
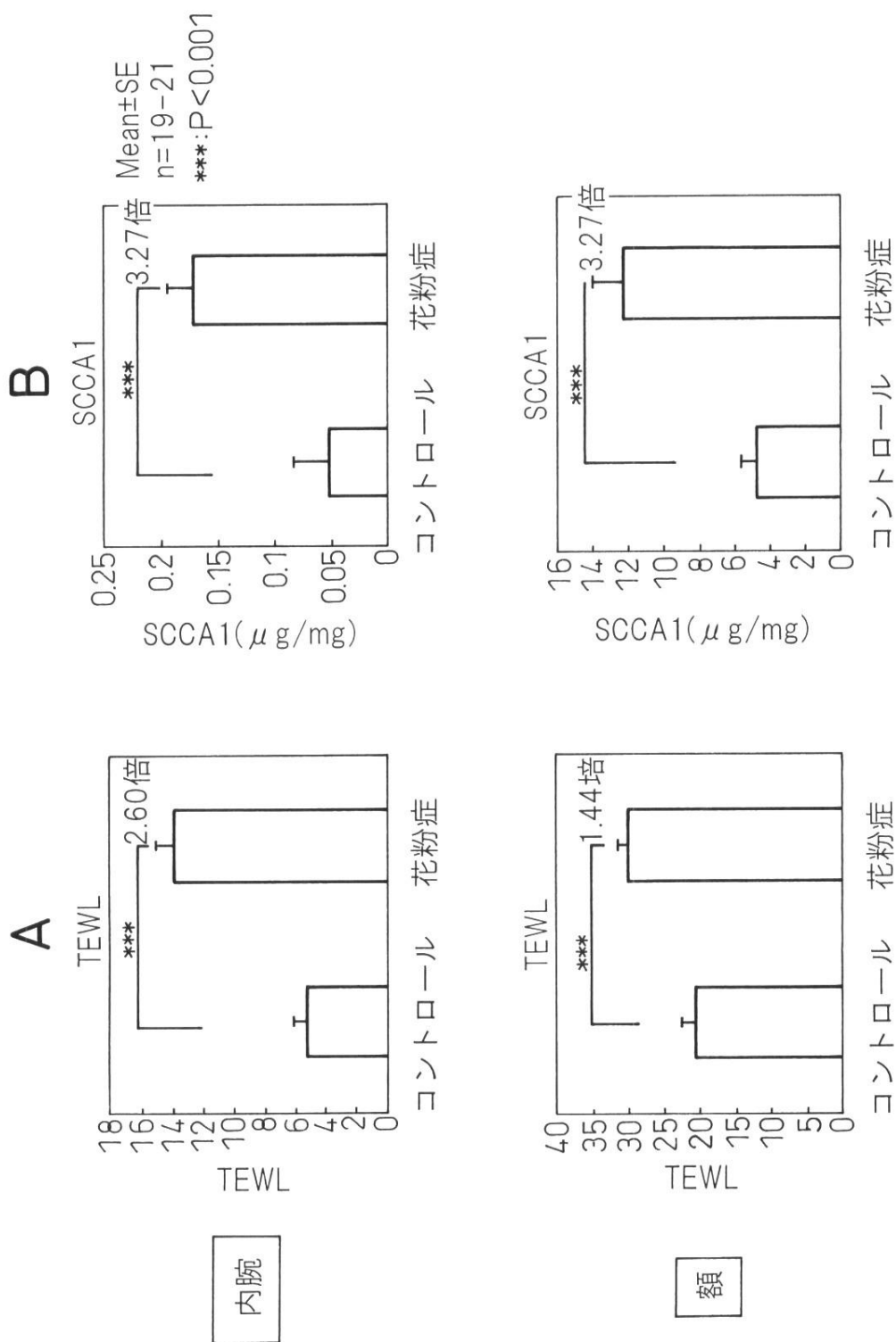
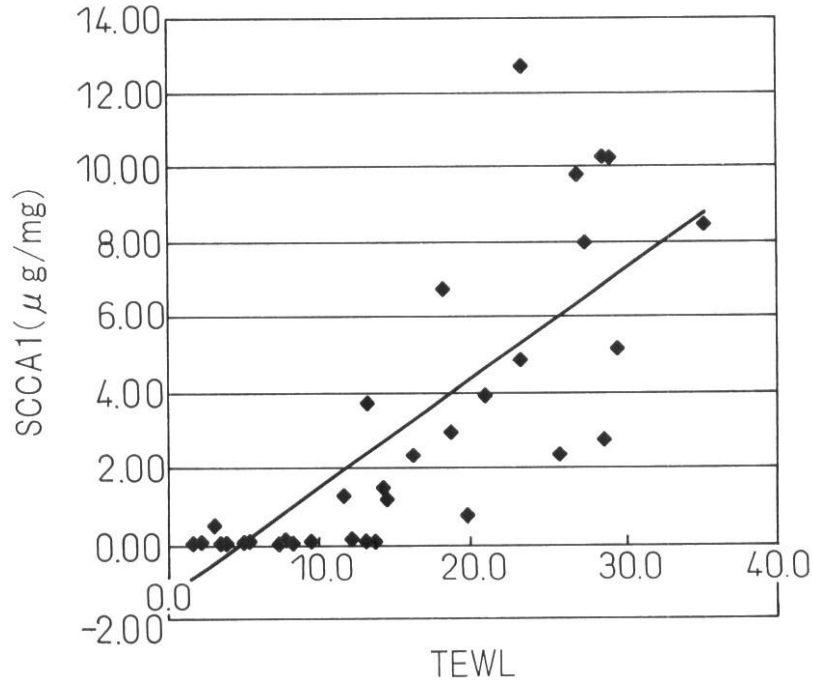


Fig.14



【 図 15 】

Fig. 15



フロントページの続き

- (72)発明者 片桐 千華
神奈川県横浜市金沢区福浦2 - 1 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内
- (72)発明者 仲西 城太郎
神奈川県横浜市金沢区福浦2 - 1 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内
- (72)発明者 日比野 利彦
神奈川県横浜市金沢区福浦2 - 1 2 - 1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内

審査官 宮澤 浩

- (56)参考文献 特開2004 - 028698 (JP, A)
特開平10 - 221340 (JP, A)
特開2005 - 272343 (JP, A)
Miriam V. Rivas, Identification of Aberrantly Regulated Genes in Diseased Skin Using the cDNA Differential Display Technique, Journal of Investigative Dermatology, 1997年, vol.108, no.2, p.188-194
Atsushi Takeda, Overexpression of Serpin Squamous Cell Carcinoma Antigens in Psoriatic Skin, Journal of Investigative Dermatology, 2002年, vol.118, no.1, p.147-154
出原賢治, マイクロアレイ法による新規診断マーカーの探索1 - 扁平上皮細胞癌抗原の診断マーカーとしての意義 - , 第52回臨床検査医学会総会・第45回臨床化学学会年会 連合大会 抄録集, 2005年, S1-3(p.23)
Journal of Molecular Biology, 1999年, vol.293, p.29-39,

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/50

