



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103149367 B

(45) 授权公告日 2015.04.01

(21) 申请号 201310065333.8

(22) 申请日 2006.10.19

(30) 优先权数据
2005-306498 2005.10.21 JP

(62) 分案原申请数据
200680039191.6 2006.10.19

(73) 专利权人 株式会社芳珂
地址 日本神奈川县横滨市中区山下町 89 番地 1

专利权人 宫崎香 池泽善郎 相原道子
森山佳谷乃

(72) 发明人 宫田智 宫崎香 安田知永
岩松明彦 池泽善郎 相原道子
森山佳谷乃

(74) 专利代理机构 北京连和连知识产权代理有限公司 11278
代理人 贺小明

(51) Int. Cl.
G01N 33/68(2006.01)

(56) 对比文件
WO 2005/078124 A2, 2005.08.25, 权利要求 28-34, 说明书第 [0027]-[0028]、[0037]、

[0041]、[0052]-[0054]、[0058] 段。

M. Kucharekova, et al. Effect of a lipid-rich emollient containing ceramide 3 in experimentally induced skin barrier dysfunction. 《Contact Dermatitis》.2002, 第 46 卷

Yuji Owada, et al. Analysis on the phenotype of E-FABP-gene knockout mice. 《Molecular and Cellular Biochemistry》.2002, 第 239 卷

Monica Ruse, et al. S100A7 (psoriasin) interacts with epidermal fatty acid binding protein and localizes in focal adhesion-like structures in cultured keratinocytes. 《The Journal of investigative dermatology》.2003, 第 121 卷 (第 1 期),

审查员 许珊萍

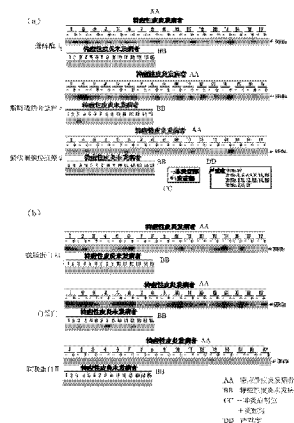
权利要求书1页 说明书22页 附图15页

(54) 发明名称
特应性皮炎标记物及其利用技术

(57) 摘要

本发明以探索可成为特应性皮炎疾病标记物的物质为目的,涉及包括测定皮肤细胞及/或皮肤组织中特定蛋白质的表达及/或其基因表达的判定特应性皮炎的方法,所述方法中,所述特定蛋白质伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变或因特应性皮炎起因的程度其表达发生改变。本发明还提供用于判定特应性皮炎的炎症程度或特应性皮炎发病的危险度的试剂盒及鉴定具有治疗及/或预防特应性皮炎作用的物质的方法。

CN 103149367 B



1. 可特异性识别伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的特定蛋白质的抗体在制备诊断或检测特应性皮炎的制剂中的应用,所述特定蛋白质包含 FABP-5。

特应性皮炎标记物及其利用技术

[0001] 本申请是申请号为 200680039191.6, 申请日为 2006 年 10 月 19 日, 申请人为株式会社芳珂、宫崎香、池泽善郎、相原道子和森山佳谷乃, 发明名称为“特应性皮炎标记物及其利用技术”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及特应性皮炎标记物及其利用技术。

背景技术

[0003] 特应性皮炎因遗传因素、环境因素等多种因素而引发疾病, 其机理尚不明确。目前因特应性皮炎主要通过肉眼观察进行诊断, 在临床医学上带有主观意识, 因此缺乏客观性。特别是在特应性皮炎中, 要判断决定治疗方法的皮疹的严重度是非常难的课题。还因为社会上对常用于特应性皮炎治疗的巨大支柱类固醇外用剂的忌讳潮流日趋强烈, 所以希望有适合的治疗方法及合适的药量。因此, 探索作为病情恶化、改善指标、治疗效果的表现的可将特应性皮炎严重度分类的特应性皮炎标记物是十分重要的课题。

[0004] 目前, 特应性皮炎标记物使用 IgE。但是, 显示 IgE 的抗体效价上升的疾病除特应性皮炎以外, 还有支气管哮喘、肝硬化等, 所以即使 IgE 的抗体值呈现高值, 也未必就一定与特应性皮炎有关。最近有一新见解, 指出因 SCCA1 在特应性皮炎患者的皮肤、血液中表达增高, 所以可作为新型生物标记物 (非专利文献 1)。还有关于 NGF、P 物质 (Substance P)、IL-16 等作为特应性皮炎患者的血清标记物非常有效的报道 (非专利文献 2 及 3)。此外还有使用特应性皮炎的炎症部位和非炎症部位的皮肤, 对特应性皮炎的生物标记物进行全面调查的方法。例如, 基于使用 DNA 微阵列的基因表达分析, 鉴定特应性皮炎关连基因的疾病标记物已申请了专利 (专利文献 1 及 2)。另外, 还有如下报道, 培养从特应性皮炎患者的皮肤组织中获取的表皮角化细胞、纤维芽细胞后, 从细胞中提取蛋白质, 通过二维电泳分离后, 用质谱仪鉴定特应性皮炎标记物 (非专利文献 4 及 5)。

[0005] 但是, 至今为止还没有使用特应性皮炎模型小鼠皮肤组织中的蛋白质进行蛋白质组分析的先例。且对人体的特应性皮炎进行的蛋白质组分析, 是从皮肤采集细胞, 在初代培养后进行蛋白质组分析, 所以很难说能立即反映人体的特应性皮炎的状况。

[0006] 专利文献 1: 日本特开 2005-110602 号公报

[0007] 专利文献 2: 国际公开第 W O 01-065259 号 pamphlet

[0008] 非专利文献 1: Clin. Exp. Allergy 2005; 35: 1327-1333

[0009] 非专利文献 2: Br. J. Dermatol. 2002 Jul; 147(1): 71-79

[0010] 非专利文献 3: Br. J. Dermatol. 2006 Jun; 154(6): 1112-1117

[0011] 非专利文献 4: Proteomics 2004, 4, 3446-3455

[0012] 非专利文献 5: Proteomics 2006, 6, 1362-1370

发明内容

[0013] 本发明的目的是提供作为特应性皮炎的客观性标记物而在诊断及治疗中有效的物质。且本发明的目的还是提供利用特应性皮炎标记物,筛选对特应性皮炎的预防或治疗有效的成分的方法。

[0014] 本发明者对特应性皮炎模型小鼠(NC/Nga 小鼠)涂布半抗原,人为诱发特应性皮炎。同时进行已知抑制特应性皮炎的乳铁蛋白处理来抑制炎症。使用此时的皮肤组织测定因特应性皮炎发病而发生变化的蛋白质。分析方法为使用二维电泳(2-DE)和质谱(MS)进行蛋白质组分析,对于经鉴定的蛋白质进一步用免疫印迹法确认其变化。

[0015] 其结果,作为伴随特应性皮炎发病其表达增加的蛋白质,鉴定出FABP-5、载脂蛋白A1(Apolipoprotein A1)、波形蛋白(Vimentin)、Rho GDI等。另外,作为伴随特应性皮炎的炎症其表达减少的蛋白质,鉴定出半乳糖凝集素-1、-3、-4、-7、-8(Galectin-1、-3、-4、-7、-8)等的半乳糖凝集素(Galectin)类、为细胞骨架蛋白的结蛋白(Desmin)、膜突蛋白(Moesin)、埃兹蛋白(Ezrin)、根蛋白(Radixin)、还有膜联蛋白II(Annexin II)、烯醇酶1(Enolase1)、FABP-4、PARK7、HSP70、HSP90等。这些蛋白质的大多数在进行半抗原处理后再进行乳铁蛋白处理时显示出相反的变化,表明特应性皮炎有无发病与表达的增减有良好的相关性。

[0016] 而且,为分析如前所述发现的特应性皮炎标记物与人体特应性皮炎炎症程度之间的相关性,从特应性皮炎发病者及健康的志愿者身上使用可非侵袭地、安全、简便地采集角质层的角质测试仪(checker)采集角质层,从中提取蛋白质,通过Western印迹法测定特应性皮炎标记物的表达。其结果,证实了伴随特应性皮炎炎症程度的增加,血清白蛋白(Serum albumin)、免疫球蛋白G(Immunoglobulin G)、膜联蛋白II(Annexin II)、载脂蛋白A1(Apolipoprotein A1)、FABP-5、烯醇酶1(Enolase1)、半乳糖凝集素-7(Galectin-7)的表达也增加。另外,作为伴随特应性皮炎炎症程度的增加其表达减少的蛋白质,鉴定出精氨酸酶I(Arginase I)、尿嘧啶DNA糖基化酶(Uracil-DNA glycosylase)。

[0017] 本发明的主要内容如下。

[0018] 1. 判定特应性皮炎的方法,其包括测定皮肤细胞及/或皮肤组织中下述特定蛋白质的表达及/或其基因表达,所述方法中,所述特定蛋白质伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变。

[0019] 特定蛋白质有以下23种:

[0020] (1) 从半乳糖凝集素-1(Galectin-1)、半乳糖凝集素-3(Galectin-3)、半乳糖凝集素-4(Galectin-4)、半乳糖凝集素-7(Galectin-7)、半乳糖凝集素-8(Galectin-8)所组成的Galectin组中选择的蛋白质,

[0021] (2) 从HSP70、HSP90所组成的HSP组中选择的蛋白质,

[0022] (3) 从波形蛋白(Vimentin)、Rho GDI、结蛋白(Desmin)、膜突蛋白(Moesin)、埃兹蛋白(Ezrin)、根蛋白(Radixin)所组成的细胞骨架蛋白组中选择的蛋白质,

[0023] (4) 从FABP-4、FABP-5所组成的FABP组中选择的蛋白质,

[0024] (5) 此外还有血清白蛋白(Serum albumin)、免疫球蛋白G(Immunoglobulin G)、膜联蛋白II(Annexin II)、载脂蛋白A1(Apolipoprotein A1)、烯醇酶1(Enolase1)、PARK7、精氨酸酶I(Arginase I)、尿嘧啶DNA糖基化酶(Uracil DNA glycosylase)。

[0025] 2. 1. 中所述的方法,其中,皮肤细胞及/或皮肤组织是用角质测试仪采集的皮肤

的角质层。

[0026] 3.1. 中所述的方法,其在蛋白质水平上测定特定蛋白质的表达。

[0027] 4.1. 中所述的方法,其在 RNA 水平上测定特定蛋白质的基因表达。

[0028] 5. 用于判定特应性皮炎的试剂盒,其包含对于皮肤细胞及 / 或皮肤组织中的下述特定蛋白质,测定伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的所述特定蛋白质的表达的试剂。

[0029] 特定蛋白质有以下 23 种:

[0030] (1) 从半乳糖凝集素 -1 (Galectin-1)、半乳糖凝集素 -3 (Galectin-3)、半乳糖凝集素 -4 (Galectin-4)、半乳糖凝集素 -7 (Galectin-7)、半乳糖凝集素 -8 (Galectin-8) 所组成的 Galectin 组中选择的蛋白质,

[0031] (2) 从 HSP70、HSP90 所组成的 HSP 组中选择的蛋白质,

[0032] (3) 从波形蛋白 (Vimentin)、Rho GDI、结蛋白 (Desmin)、膜突蛋白 (Moesin)、埃兹蛋白 (Ezrin)、根蛋白 (Radixin) 所组成的细胞骨架蛋白组中选择的蛋白质,

[0033] (4) 从 FABP-4、FABP-5 所组成的 FABP 组中选择的蛋白质,

[0034] (5) 此外还有血清白蛋白 (Serum albumin)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G)、膜联蛋白 II (Annexin II)、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、烯醇酶 1 (Enolase1)、PARK7、精氨酸酶 I (Arginase I)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil DNA glycosylase)。

[0035] 6.5. 中所述的试剂盒,其具备用于采集皮肤细胞及 / 或皮肤组织的角质测试仪。

[0036] 7.5. 中所述的试剂盒,其中,试剂为可特异性识别伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的特定蛋白质的抗体。

[0037] 8.5. 中所述的试剂盒,其中,试剂为可与伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的特定蛋白质的 mRNA 特异性杂交的核酸探针。

[0038] 9.5. 中所述的试剂盒,其中,试剂为可与伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的特定蛋白质的 mRNA 特异性杂交的核酸引物、及可与以所述 mRNA 为模板合成的 cDNA 特异性杂交的核酸引物所组成的 1 对核酸引物。

[0039] 10. 鉴定对治疗及 / 或预防特应性皮炎有作用的物质的方法,其包括以下工序:

[0040] (a) 使皮肤细胞及 / 或皮肤组织与被测物质接触的工序,

[0041] (b) 在规定时间内培养工序 (a) 中与被测物质接触过的皮肤细胞及 / 或皮肤组织的工序,

[0042] (c) 测定工序 (b) 中培养的皮肤细胞及 / 或皮肤组织中下述特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达的工序,所述工序中,所述特定蛋白质伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变,以及

[0043] (d) 通过比较工序 (c) 中测定的特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达和对照的皮肤细胞及 / 或皮肤组织中特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达,评价被测物质对于皮肤细胞及 / 或皮肤组织中特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达的作用的工序。

[0044] 特定蛋白质有以下 23 种:

[0045] (1) 从半乳糖凝集素 -1 (Galectin-1)、半乳糖凝集素 -3 (Galectin-3)、半乳糖凝集素 -4 (Galectin-4)、半乳糖凝集素 -7 (Galectin-7)、半乳糖凝集素 -8 (Galectin-8) 所组成的 Galectin 组中选择的蛋白质,

- [0046] (2) 从 HSP70、HSP90 所组成的 HSP 组中选择的蛋白质，
- [0047] (3) 从波形蛋白 (Vimentin)、Rho GDI、结蛋白 (Desmin)、膜突蛋白 (Moesin)、埃兹蛋白 (Ezrin)、根蛋白 (Radixin) 所组成的细胞骨架蛋白组中选择的蛋白质，
- [0048] (4) FABP-4、FABP-5 所组成的 FABP 组中选择的蛋白质，
- [0049] (5) 此外还有血清白蛋白 (Serum albumin)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G)、膜联蛋白 II (Annexin II)、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、烯醇酶 1 (Enolase1)、PARK7、精氨酸酶 I (Arginase I)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil DNA glycosylase)。
- [0050] 通过本发明，可确立特应性皮炎的诊断及测定其严重度的评价系统。使用此评价系统，与以往方法相比，可更客观地判定特应性皮炎的严重度及发病风险。此外，本发明还提供用于判定特应性皮炎的严重度及发病风险的试剂盒及鉴定具有抑制特应性皮炎炎症作用的成分的方法。

附图说明

- [0051] 图 1 表示使用 4 种实验条件 ((1) 半抗原 (-)/ 乳铁蛋白 (-)、(2) 半抗原 (-)/ 乳铁蛋白 (+)、(3) 半抗原 (+)/ 乳铁蛋白 (-)、(4) 半抗原 (+)/ 乳铁蛋白 (+)) 的小鼠皮肤的状态。
- [0052] 图 2(a) 表示使用特应性皮炎模型小鼠的皮肤组织进行二维电泳的结果 (半抗原 (-)/ 乳铁蛋白 (-) 及半抗原 (+)/ 乳铁蛋白 (-) 的实验条件)。
- [0053] 图 2(b) 表示使用特应性皮炎模型小鼠的皮肤组织进行二维电泳的结果 (半抗原 (-)/ 乳铁蛋白 (+) 及半抗原 (+)/ 乳铁蛋白 (+) 的实验条件)。
- [0054] 图 3 表示特应性皮炎模型小鼠的皮肤组织中半乳糖凝集素的表达变化。
- [0055] 图 4 表示特应性皮炎模型小鼠的皮肤组织中细胞骨架蛋白及 HSP 蛋白质的表达变化。
- [0056] 图 5 表示特应性皮炎模型小鼠的皮肤组织中蛋白质的表达变化。
- [0057] 图 6 表示对特应性皮炎发病的样品中表达增加的蛋白质使用质谱仪 (MALDI TOF-MS) 鉴定的结果。
- [0058] 图 7 表示特应性皮炎患者的皮肤组织中蛋白质的表达变化。
- [0059] 图 8(a) (b) 表示特应性皮炎患者的严重度与蛋白质表达量的相关关系。
- [0060] 图 9(a) (b) 表示按患者的严重度不同将对烯醇酶 1 (Enolase1)、FABP-5、SCCA2、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、血清白蛋白 (Serum albumin) 的各 5 种标记物蛋白质在各样品中的表达强度定量的结果进行归纳。
- [0061] 图 10(a) - (f) 表示健康者和有特应性皮炎病史的人中经皮水分丧失量与标记物表达量之间的相关关系。
- [0062] 图 11(a) - (f) 表示健康者和有特应性皮炎病史的人中角质细胞面积与标记物表达量之间的相关关系。

具体实施方式

- [0063] 以下更详细地说明本发明的实施方式。
- [0064] 本发明提供一种判定特应性皮炎的方法，其包括测定皮肤细胞及 / 或皮肤组织中

特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达。特定蛋白质伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变。

[0065] “表达发生改变”的方式可以是蛋白质及 / 或其基因的表达的有无发生改变、表达量发生增减等。

[0066] 特定蛋白质优选从载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、FABP-4、FABP-5、波形蛋白 (Vimentin)、Rho GDI、膜联蛋白 II (Annexin II)、烯醇酶 1(Enolase1)、半乳糖凝集素 -1(Galectin-1)、半乳糖凝集素 -3(Galectin-3)、半乳糖凝集素 -4(Galectin-4)、半乳糖凝集素 -7(Galectin-7)、半乳糖凝集素 -8(Galectin-8)、PARK7、结蛋白 (Desmin)、膜突蛋白 (Moesin)、埃兹蛋白 (Ezrin)、根蛋白 (Radixin)、HSP70、HSP90、血清白蛋白 (Serum albumin)、免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G)、精氨酸酶 I(Arginase I) 及尿嘧啶 DNA 糖基化酶(Uracil-DNA glycosylase)所组成的组中选择。选择的蛋白质可以是 1 种,也可以是多种。

[0067] 上述 23 种的特定蛋白质如下所示 :

[0068] (1) 从半乳糖凝集素 -1(Galectin-1)、半乳糖凝集素 -3(Galectin-3)、半乳糖凝集素 -4(Galectin-4)、半乳糖凝集素 -7(Galectin-7)、半乳糖凝集素 -8(Galectin-8) 所组成的半乳糖凝集素 (Galectin) 组中选择的蛋白质,

[0069] (2) 从 HSP70、HSP90 所组成的 HSP 组中选择的蛋白质,

[0070] (3) 从波形蛋白 (Vimentin)、Rho GDI、结蛋白 (Desmin)、膜突蛋白 (Moesin)、埃兹蛋白 (Ezrin)、根蛋白 (Radixin) 所组成的细胞骨架蛋白组中选择的蛋白质,

[0071] (4) 从 FABP-4、FABP-5 所组成的 FABP 组中选择的蛋白质,

[0072] (5) 此外还有血清白蛋白 (Serum albumin)、免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G)、膜联蛋白 II (Annexin II)、载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、烯醇酶 1(Enolase1)、PARK7、精氨酸酶 I(Arginase I)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil DNA glycosylase)。

[0073] 载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1) 是分子质量为 30, 778Da 的分泌蛋白质,对促进胆固醇从组织中的流出或胆固醇向肝脏的反向输送起作用。已知其是大量存在于乳糜微粒、血浆高密度脂蛋白 (plasma HDL) 中的分泌蛋白质,在皮肤组织中,在干癣 (以表皮的不规则性肥厚和角化不全为特征) 中表达。基因序列信息 (Apolipoprotein A1, Nucleic Acids Res. 11:2827-2837(1983), P02647)。氨基酸序列信息 (Apolipoprotein A1, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:623-630(1978), M27875)。

[0074] FABP-5(脂肪酸结合蛋白 -5:Fatty acid binding protein-5) 是分子质量为 15, 033Da 的细胞内蛋白质,是主要存在于表皮中的蛋白质,因在干癣 (以表皮的不规则性肥厚和角化不全为特征) 的组织中表达升高而被鉴定。是与脂肪酸 (油酸)、疏水性配基结合的细胞内蛋白质,参与脂肪酸的摄取、输送、代谢,还参与细胞的增殖、分化等。增殖过程中表皮角化细胞的 FABP-5 表达少,但通过分化诱导可增加到约 2 倍。与在干癣中高表达的 S100A7(钙依赖性信号蛋白) 结合,定位于表皮角化细胞分化阶段中的粘着斑 (focal adhesion) 样结构中。基因序列信息 (Fatty acid binding protin5, J. Invest. Dermatol. 99:299-305(1992), BC070303)。氨基酸序列信息 (Fatty acid-binding protein, epidermal, Biochem. J. 302:363-371(1994), Q01469)。

[0075] 波形蛋白 (Vimentin) 是分子质量为 53, 520Da 的细胞骨架蛋白,是组成 classIII

型中间丝的蛋白质。在许多间叶细胞内大范围网状分布,赋予细胞强度以应对外界机械压力。通过磷酸化调节其结构。还已知存在网蛋白、联丝蛋白(synemin)的结合蛋白质。基因序列信息(Vimentin, Nucleic Acids Res. 18:6692-6692(1990), M14144)。氨基酸序列信息(Vimentin, Electrophoresis 18:588-598(1997), P08670)。

[0076] Rho GDI(Rho GDP 解离抑制因子 1)(Rho GDP-dissociation inhibitor1) 是分子质量为 23, 207Da 的细胞内蛋白质,在表皮角化细胞分化时高表达,抑制性调节 Rho 蛋白质从 GDP 型向 GTP 型的转换。因此,通过使 Rho GDI 在细胞内强制表达,使应力纤维、粘着斑等消失,细胞内的肌动蛋白骨架系统崩溃。基因序列信息(Rho GDP-dissociation Inhibitor1, Exp. Cell Res. 209:165-174(1993), X69550)。氨基酸序列信息(RhoGDP-dissociation inhibitor, P52565)。

[0077] 膜联蛋白 II (Annexin II) 是分子质量为 38, 473Da 的细胞内蛋白质,据报道,其一部分向细胞外分泌。其是受钙控制的膜结合蛋白质,该蛋白质结合两个钙离子,定位于细胞膜附近。2 组膜联蛋白(annexin)重复子中 1 个与钙结合,1 个与磷脂结合。此蛋白质或与细胞膜上磷脂结合的肌动蛋白、细胞骨架蛋白交联,或通过 tPA(组织型纤溶酶原激活剂:tissue plasminogen activator) 激活纤维蛋白溶酶原。基因碱基序列信息(Annexin A2, Gene 95:243-251(1990), BC015834)。氨基酸序列信息(Annexin A2, J. Biol. Chem. 266:5169-5176(1991), P07355)。

[0078] 烯醇酶 1(Enolase1) 是分子质量为 47, 038Da 的细胞内蛋白质,具有 2-磷酸-D-甘油酸 = 磷酸烯醇式丙酮酸 + H₂O(2-phospho-D-glycerate = phosphoenolpyruvate + H₂O) 的酶活性,在糖酵解系统中起作用。据报道,其一部分与细胞增殖、过敏有关。在白血球、神经中,控制细胞表面的纤维蛋白溶酶原的活化,参与纤维蛋白的形成。具有稳定的二聚体结构时需要镁。虽然定位于细胞质内,而只有同源二聚体存在于细胞膜中。 α -烯醇酶(α -enolase) 在大部分的组织中表达, β -烯醇酶(β -enolase) 只在肌肉组织中表达, γ -烯醇酶(γ -enolase) 只在神经组织中表达。基因序列信息(Alpha enolase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:6741-6745(1986), M14328)。氨基酸序列信息(Alpha enolase, Enzyme Protein 48:37-44(1995), P06733)。

[0079] 半乳糖凝集素 -1(Galectin-1) 是分子质量为 14, 585Da 的细胞内蛋白质,也向细胞外分泌,存在于心脏、胃、骨骼肌、神经、胸腺、肾脏、胎盘等中。与 β -半乳糖苷、CD45、CD3、C D4 等结合。已知其影响细胞的增殖促进作用、细胞死亡的诱导及免疫应答。此外,与层粘蛋白、整合素等的细胞外基质的组成成分、细胞受体特异性结合,对细胞粘附、移动产生很大的影响。基因序列信息(Galectin-1, J. Biol. Chem. 264:1310-1316(1989), BT006775)。氨基酸序列信息(Galectin-1, J. Biochem. 104:1-4(1988), P09382)。

[0080] 半乳糖凝集素 -3(Galectin-3) 是分子质量为 35, 678Da 的细胞内蛋白质,是与 IgE 结合的半乳糖特异性凝集素,主要表达可见于大肠的上皮、活化巨噬细胞中。据报道,半乳糖凝集素 -3(Galectin-3) 由表皮角化细胞产生,存在于皮肤的胰岛细胞表面,与 IgE 结合,调节免疫系统。基因序列信息(Galectin-3, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:7324-7328(1990), AB006780)。氨基酸序列信息(Galectin-3, P17931)。

[0081] 半乳糖凝集素 -4(Galectin-4) 是分子质量为 35, 941Da 的细胞内蛋白质。半乳糖凝集素 -4(Galectin-4) 从结肠癌细胞株 T84 中分离,存在于细胞和基质间的粘着部位、

细胞间的粘着部位。基因序列信息 (Galectin-4, Eur. J. Biochem. 248:225-230 (1997), AB006781)。氨基酸序列信息 (Galectin-4, P56470)。

[0082] 半乳糖凝集素-7 (Galectin-7) 是分子质量为 14,944Da 的细胞内蛋白质。一般来说,在细胞之间、细胞和细胞外基质间控制细胞的增殖,是与细胞凋亡有关的蛋白质,控制 JNK 的活性、细胞色素 C 的释放。也向细胞质、核、细胞外分泌。是在人体表皮最早被克隆的半乳糖凝集素亚家族的成员,从培养表皮角化细胞的研究中得知,半乳糖凝集素 7 (Galectin-7) 不受角质化程度的影响,在所有的表皮细胞中表达。基因序列信息 (Galectin-7, Dev. Biol. 168:259-271 (1995), L07769)。氨基酸序列信息 (Galectin-7, J. Biol. Chem. 270:5823-5829, 1995, P47929)。

[0083] 半乳糖凝集素-8 (Galectin-8) 是分子质量为 35,539Da 的细胞内蛋白质。半乳糖凝集素-8 (Galectin-8) 在肝脏、心脏、肌肉、肾脏、脑等很多组织中表达,且在前列腺癌中特异性表达,不存在于正常前列腺、良性前列腺肥大部中。基本不存在于胚胎中,但在成熟的各组织中有非常高的表达。基因序列信息 (Galectin-8, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:7252-7257 (1996), X91790)。氨基酸序列信息 (Galectin-8, 000214)。

[0084] PARK7 是分子质量为 19,891Da 的细胞内蛋白质。PARK7 是作为与帕金森氏病有关的蛋白质而被鉴定,但其后还证实其参与皮肤创伤愈合过程中的再上皮化作用 (re-epithelialization)。且从其立体结构来看,也说明其可能作为蛋白酶起作用。基因序列信息 (Parkinson disease7, Biochem. Biophys. Res. Commun. 231:509-513 (1997), BC008188)。氨基酸序列信息 (DJ-1 protein, Q99497)。

[0085] 结蛋白 (Desmin) 是分子质量为 53,405Da 的细胞骨架蛋白,是在保持细胞结构、强度中起作用的 class III 型中间丝的一种。是纤维状多肽的聚合体,存在于平滑肌、横纹肌中。基因序列信息 (Desmin, Gene78:243-254 (1989), U59167)。氨基酸序列信息 (Desmin, P17661)。

[0086] 埃兹蛋白 (Ezrin) 是分子质量为 69,268Da 的细胞内蛋白质。下述膜突蛋白 (Moesin)、根蛋白 (Radixin) 是同族分子。主要起连接细胞骨架蛋白和细胞膜的作用。定位于细胞膜的被称为微绒毛 (microvilli) 的丝状突起的内侧,构成肠上皮细胞的微绒毛 (microvilli),由酪氨酸激酶磷酸化。基因序列信息 (Ezrin, J. Biol. Chem. 264:16727-16732 (1989), X51521)。氨基酸序列信息 (Ezrin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224:666-674 (1996), P15311)。

[0087] 根蛋白 (Radixin) 是分子质量为 68,564Da 的细胞内蛋白质。主要起连接细胞骨架蛋白和细胞膜的作用。基因序列信息 (Radixin, Genomics16:199-206 (1993), L02320)。氨基酸序列信息 (Radixin, P35241)。

[0088] 膜突蛋白 (Moesin) 是分子质量为 67,689Da 的细胞内蛋白质。主要起连接细胞骨架蛋白和细胞膜的作用。据报道,在异常分化的表皮角化细胞中表达降低。基因序列信息 (Moesin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:8297-8301 (1991), M69066)。氨基酸序列信息 (Moesin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:8297-8301 (1991), P26038)。

[0089] FABP-4 (脂肪酸结合蛋白-4: Fatty acid-binding protein-4) 是分子质量为 14,588Da 的细胞内蛋白质。具有向脂肪细胞输送脂质的作用,主要与细胞内的脂肪酸、视黄酸结合,依赖脂肪细胞的分化阶段表达增加,与 FABP-5 具有高的同源性。基因序列

信息 (Fatty acid-binding protein, adipocyte, Biochemistry28:8683-8690(1989), BT006809)。氨基酸序列信息 (Fatty acid-binding protein, adipocyte, P15090)。

[0090] HSP70(热休克蛋白70:Heat shock protein70)是分子质量为70,052Da的细胞内蛋白质,通常在细胞内作为分子伴侣起作用,参与蛋白质的折叠、输送、聚集和降解等。且HSP70在线粒体、ER中的作用是使蛋白质正常转移,还与HSP90协同参与细胞内的信号传递。基因碱基序列信息 (Heat shock70kDa protein1A, Immunogenetics32:242-251(1990), BC002453)。氨基酸序列信息 (Heat shock70kDa protein1, P08107)。

[0091] HSP90(热休克蛋白:Heat shock protein90)是分子质量为85,453Da的细胞内蛋白质。细胞遭遇高温时,HSP90改变结构,作为防止其他蛋白质的不可逆变性的分子伴侣起作用。也有如下报道,在某种细胞中参与信号传递。基因碱基序列信息 (Heat shock protein90, Nucleic Acids Res.17:7108-7108(1989), X15183)氨基酸序列信息 (Heat shock protein90, J. Biol. Chem. 264:2431-2437(1989), P07900)。

[0092] 血清白蛋白 (Serum albumin)是在血清中大量含有的分子质量为69,367Da的分泌蛋白质。血清白蛋白 (Serum albumin)的基本功能是血液的胶体渗透压的维持和种种物质的运送。基因序列信息 (Serum albumin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:71-75(1982)., V00494)。氨基酸序列信息 (Serum albumin, FEBS Lett. 58:134-137(1975)., P02768)。

[0093] IgG:免疫球蛋白G(Immunoglobulin G)是分子质量为42,632Da的分泌蛋白质,占人体总免疫球蛋白的75%。IgG的生理活性有补体的活化、巨噬细胞摄取的增强、胎盘通过性等。另外,免疫球蛋白G(ImmunoglobulinG)是免疫球蛋白IgG的大亚单位(H链),通过基因类别转换表达。在血清中大量存在,半衰期长,与轻链(L链)一起形成多种抗体分子,在免疫反应中起中心作用。基因序列信息 (Immunoglobulin gamma, Nucleic Acids Res. 16:11824-11824(1988)., X14356)。氨基酸序列信息 (Immunoglobulin gamma, Protein Sci. 13:2819-2824(2004)., P12314)。

[0094] 精氨酸酶 I(Arginase I)是分子质量为34,735Da的细胞内蛋白质,是使L-精氨酸水解为L-鸟氨酸和尿素的单向反应酶。定位于肝脏中,在肾脏、脑、乳腺、皮肤中也有极微量存在。欠缺时会引起精氨酸血症,精神发育迟缓、痉挛性四肢麻痹。基因序列信息 (Arginase typeI, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:412-415(1987)., AY074488)。氨基酸序列信息 (Arginase-1, P05089)。

[0095] 尿嘧啶DNA糖基化酶 (Uracil-DNA glycosylase)是分子质量为34,645Da的细胞内蛋白质。DNA中的胞嘧啶脱氨基形成尿嘧啶时,会与腺嘌呤形成碱基对诱导突变。为防止此现象,尿嘧啶DNA糖基化酶水解脱氨基作用中生成的脱氧尿苷的N-糖苷键。存在2种亚型。亚型I在细胞内定位于线粒体,作为组织分布定位于肌肉中。亚型II在增殖的组织细胞核中大量表达。基因序列信息 (Uracil-DNA glycosylase, EMBO J. 8:3121-3125(1989)., X15653)。氨基酸序列信息 (Uracil-DNA glycosylase, EMBO J. 8:3121-3125(1989)., P13051)。

[0096] 上述蛋白质可以是前体蛋白,也可以是成熟蛋白,可以是切割型,也可以是不切割型。前体蛋白可以是前蛋白、前原蛋白。前蛋白、前原蛋白等中,有的也具有信号肽。

[0097] 本发明的方法,可以测定皮肤细胞及/或皮肤组织中特定蛋白质的表达,也可以测定其基因表达。例如,可用Northern印迹法、RT-PCR法、Western印迹法、免疫组织化学分

析法、ELISA法、抗体芯片、cDNA微阵列、荧光共振能量转移(FRET;Fluorescence resonance energy transfer)测定法等测定。

[0098] 为在蛋白质水平测定特定蛋白质的表达,可使用特异性识别作为测定对象的蛋白质的抗体。抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体中的任一种。这些抗体可用公知方法制造,也可为市售品。用Western印迹法测定时,抗体可用¹²⁵I蛋白质标记物A、过氧化物酶结合的IgG等进行二次检测。用免疫组织化学分析法测定时,抗体可用荧光色素、铁蛋白、酶等标记。

[0099] 为在RNA水平测定特定蛋白质的基因表达,可使用可与作为测定对象的蛋白质的mRNA特异性杂交的核酸探针(用Northern印迹法测定时),或也可使用可与作为测定对象的蛋白质的mRNA特异性杂交的核酸引物、及可与以所述mRNA为模板合成的cDNA特异性杂交的核酸引物所组成的一对核酸引物(用PCR法测定时)。核酸探针及核酸引物可根据作为测定对象的蛋白质的基因信息设计。核酸探针通常以约15~1500碱基为宜。核酸探针可用放射性元素、荧光色素、酶等标记。核酸引物通常以约15~30碱基为宜。

[0100] 本发明中,可以检测皮肤细胞及/或皮肤组织中有无特定蛋白质的表达及/或其基因表达,也可以测定表达量。有无蛋白质及/或其mRNA的表达,可通过在规定位置有无出现斑点、条带来确认。蛋白质及/或其mRNA的表达量可通过斑点、条带的染色强度来测定。或也可对蛋白质及/或其mRNA定量。为了同时检测多数基因表达、多数蛋白质表达,可优选使用DNA阵列(将探针固定在基板上)(NATURE REVIEWS, DRUG DISCOVERY, VOLUME1, DECEMBER2002,951-960)蛋白质芯片(将抗体固定在基板上)(NATURE REVIEWS, DRUG DISCOVERY, VOLUME1, SEPTEMBER2002,683-695)、流式点阵仪(Luminex)(NATURE REVIEWS, DRUG DISCOVERY, VOLUME1, JUNE2002,447-456)等的检测方法。

[0101] 皮肤细胞及皮肤组织可以来自成为判定对象的被测体,被测体的生物种可以是人、猪、猴、大猩猩、狗、牛、兔、大鼠、小鼠等的哺乳动物等。

[0102] 通过本发明的方法,为判定特应性皮炎,可使用皮肤活检样品或从中获得的皮肤培养细胞、皮肤培养组织等。皮肤活检样品可如后述实施例中所述,使用将皮肤的角质层用胶带(角质测试仪)采集的样品。

[0103] 皮肤细胞可列举为表皮角化细胞、皮肤纤维芽细胞、胰岛细胞、黑色素细胞、肥胖细胞、内皮细胞、皮脂细胞、毛乳头细胞、毛母细胞等。皮肤细胞可通过公知的方法从皮肤采集[(用于分子生物学研究的新细胞培养实验法,p57-71,羊土社,1999)[日语原名:[「分子生物学研究のための新細胞培養実験法,p57-71,羊土社,1999」]]]。

[0104] 皮肤组织可列举为皮肤的角质层、表皮、真皮等。皮肤组织可通过公知的方法从皮肤采集(Acta. Derm. Venereol.,85,389-393,2005)。

[0105] 皮肤活检样品可以是细胞,也可以是组织。皮肤活检样品,如后述实施例中所述,可使用角质测试仪等的胶带采集的皮肤角质层等。角质测试仪一直以来被用于采集角质层样品,该角质层样品用于测定角质层的角化不全度和细胞面积、评价肌肤的粗糙程度和角质层的更新速度[(化妆品的有用性·评价技术的进步和未来展望,日本化妆品技术者会,药事日报社,p95-96)[日语原名:[「化粧品の有効性・評価技術の進歩と将来展望,日本化粧品技術者会,薬事日報社,p95-96」]]]。作为可在咨询(counseling)店、自家内简单、安全地采集角质层样品、从角质层非侵袭地获得蛋白质的方法非常有效。

[0106] 作为本发明的例子之一, 特应性皮炎可用以下标准判定。

[0107] 如使用实施例 1(图 8) 所示的烯醇酶 1(Enolase1)、FABP-5、SCCA2、载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、白蛋白(Albumin) 及膜联蛋白 II(Annexin II) 等的各种抗体的分析例所示, 从特应性皮炎发病的志愿者身上获取皮肤样品, 测定多种标记物蛋白质的表达量或其基因的表达量, 揭示病状与表达量的关系。

[0108] 从特应性皮炎发病者的发病部位(分析样品) 和非发病部位(发病者对照样品) 及特应性皮炎非发病者的相同部位(非发病者对照样品) 的表达量的比较中, 判定分析样品特应性皮炎症状的程度、发病原因。如此, 标记物蛋白质的分析结果可对呈现多种症状的特应性皮炎的诊断、治疗起作用。

[0109] 本发明也提供用于判定特应性皮炎的试剂盒。本发明的试剂盒包含对于皮肤细胞及/或皮肤组织中的特定蛋白质, 测定伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的所述特定蛋白质表达的试剂。

[0110] 例如, 本发明的试剂盒中包含可特异性识别伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的特定蛋白质的抗体的试剂。

[0111] 特定蛋白质优选从载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、FABP-4、FABP-5、波形蛋白(Vimentin)、Rho GDI、膜联蛋白 II(Annexin II)、烯醇酶 1(Enolase1)、半乳糖凝集素-1(Galectin-1)、半乳糖凝集素-3(Galectin-3)、半乳糖凝集素-4(Galectin-4)、半乳糖凝集素-7(Galectin-7)、半乳糖凝集素-8(Galectin-8)、PARK7、结蛋白(Desmin)、膜突蛋白(Moesin)、埃兹蛋白(Ezrin)、根蛋白(Radixin)、HSP70、HSP90、血清白蛋白(Serum albumin)、免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G)、精氨酸酶 I(Arginase I) 及尿嘧啶 DNA 糖基化酶(Uracil DNA glycosylase) 所组成的组中选择。

[0112] 试剂盒中还可包含用于采集皮肤组织的胶带、免疫化学方法检测胶带上的蛋白质的全套试剂、使用说明书等。使用说明书中除记载试剂盒的使用方法以外, 还可记载特应性皮炎的判定标准等。

[0113] 另外还有一例, 例如, 本发明的试剂盒包含作为试剂的可与伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的特定蛋白质的 mRNA 特异性杂交的核酸探针。

[0114] 特定蛋白质优选从载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、FABP-4、FABP-5、波形蛋白(Vimentin)、Rho GDI、膜联蛋白 II(Annexin II)、烯醇酶 1(Enolase1)、半乳糖凝集素-1(Galectin-1)、半乳糖凝集素-3(Galectin-3)、半乳糖凝集素-4(Galectin-4)、半乳糖凝集素-7(Galectin-7)、半乳糖凝集素-8(Galectin-8)、PARK7、结蛋白(Desmin)、膜突蛋白(Moesin)、埃兹蛋白(Ezrin)、根蛋白(Radixin)、HSP70、HSP90、血清白蛋白(Serum albumin)、免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G)、精氨酸酶 I(Arginase I) 及尿嘧啶 DNA 糖基化酶(Uracil DNA glycosylase) 所组成的组中选择。

[0115] 试剂盒中还可包括用于采集皮肤组织的胶带、用于从胶带上的皮肤组织中提取 RNA 的试剂类、用 Northern 印迹法分析 RNA 的试剂类、使用说明书等。使用说明书中, 除记载试剂盒的使用方法以外, 还记载特应性皮炎的判定标准等。

[0116] 还有一例, 本发明的试剂盒包含作为试剂的可与伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变的特定蛋白质的 mRNA 特异性杂交的核酸引物、及可与以所述 mRNA 为模板合成的 cDNA 特异性杂交的核酸引物所组成的一对核酸引物。

[0117] 特定蛋白质优选从载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、FABP-4、FABP-5、波形蛋白(Vimentin)、Rho GDI、膜联蛋白 II (Annexin II)、烯醇酶 1(Enolase1)、半乳糖凝集素-1(Galectin-1)、半乳糖凝集素-3(Galectin-3)、半乳糖凝集素-4(Galectin-4)、半乳糖凝集素-7(Galectin-7)、半乳糖凝集素-8(Galectin-8)、PARK7、结蛋白(Desmin)、膜突蛋白(Moesin)、埃兹蛋白(Ezrin)、根蛋白(Radixin)、HSP70、HSP90、血清白蛋白(Serum albumin)、免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G)、精氨酸酶 I(Arginase I) 及尿嘧啶 DNA 糖基化酶(Uracil DNA glycosylase) 所组成的组中选择。

[0118] 试剂盒中还可包括用于采集皮肤组织的胶带、用于从胶带上的皮肤组织中提取 RNA 的试剂类、用 RT-PCR 法分析 RNA 的试剂类、使用说明书等。使用说明书中,除记载试剂盒的使用方法以外,还记载特应性皮炎的判定标准等。

[0119] 本发明还提供鉴定具有治疗及 / 或预防特应性皮炎作用的物质的方法,此方法包括以下工序:

[0120] (a) 使皮肤细胞及 / 或皮肤组织与被测物质接触的工序,

[0121] (b) 在规定时间内培养工序 (a) 中与被测物质接触过的皮肤细胞及 / 或皮肤组织的工序,

[0122] (c) 测定工序 (b) 中培养的皮肤细胞及 / 或皮肤组织中特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达的工序,所述工序中,所述特定蛋白质伴随特应性皮炎的炎症其表达发生改变,以及

[0123] (d) 通过比较工序 (c) 中测定的特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达和对照的皮肤细胞及 / 或皮肤组织中特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达,评价被测物质对于皮肤细胞及 / 或皮肤组织中特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达的作用的工序。

[0124] 被测物质可以是任何物质,可列举为蛋白质、肽、维生素、激素、多糖、低聚糖、单糖、低分子化合物、核酸(DNA、RNA、寡核苷酸、单核苷酸等)、脂质、除上述以外的天然化合物、合成化合物、植物提取物、植物提取物的分离物、上述物质的混合物等。

[0125] 皮肤细胞及皮肤组织如上所述。

[0126] 被测物质与皮肤细胞及 / 或皮肤组织的接触,可使用任何方法,例如,可以是将被测物质添加到皮肤细胞及 / 或皮肤组织的培养液中的方法、在涂布或固定有被测物质的培养容器或培养板(sheet)上培养皮肤细胞及 / 或皮肤组织的方法等。也可以是使用人或人以外的哺乳动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猪等)等的生物体,将被测物质直接涂布于皮肤上的方法、经口投给被测物质的方法。

[0127] 皮肤细胞及 / 或皮肤组织的培养时间无特别限制,只要是可确认出被测物质对皮肤细胞及 / 或皮肤组织中特定蛋白质的表达及 / 或其基因表达有无效果的时间即可。

[0128] 例如,皮肤细胞使用人体正常表皮角化细胞时,以 12 ~ 48 小时为宜,优选为 12 ~ 24 小时。此处,“培养皮肤细胞及 / 或皮肤组织”是指使皮肤细胞及 / 或皮肤组织生长发育·增殖之意,其中,除了使单离后的皮肤细胞及 / 或皮肤组织生长发育·增殖以外,还包括使具有皮肤细胞、皮肤组织的生物体自身生存、饲养和养殖具有皮肤细胞、皮肤组织的生物体等。

[0129] 作为比较对照的皮肤细胞及 / 或皮肤组织,可为与被测物质接触前的皮肤细胞及 / 或皮肤组织,也可为除不与被测物质接触以外、进行相同处理的皮肤细胞及 / 或皮肤组

织。

[0130] 特定蛋白质优选从载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、FABP-4、FABP-5、波形蛋白 (Vimentin)、Rho GDI、膜联蛋白 II (Annexin II)、烯醇酶 1(Enolase1)、半乳糖凝集素 -1(Galectin-1)、半乳糖凝集素 -3(Galectin-3)、半乳糖凝集素 -4(Galectin-4)、半乳糖凝集素 -7(Galectin-7)、半乳糖凝集素 -8(Galectin-8)、PARK7、结蛋白 (Desmin)、膜突蛋白 (Moesin)、埃兹蛋白 (Ezrin)、根蛋白 (Radixin)、HSP70、HSP90、血清白蛋白 (Serum albumin)、免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G)、精氨酸酶 I(Arginase I) 及尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil DNA glycosylase) 所组成的组中选择。

[0131] 作为本发明的一例,与被测物质接触过的皮肤细胞及 / 或皮肤组织中,载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、FABP-5、波形蛋白 (Vimentin)、Rho GDI、膜联蛋白 II (Annexin II)、烯醇酶 1(Enolase1)、血清白蛋白 (Serum albumin) 或免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G) 中任一个的表达量与对照相比减少,可评价为被测物质具有使上述任一种蛋白质的表达减少的作用时,此被测物质即可鉴定为是具有治疗及 / 或预防特应性皮炎作用的物质。

[0132] 此外,本发明的另外一例,与被测物质接触过的皮肤细胞及 / 或皮肤组织中, FABP-4、半乳糖凝集素 -1(Galectin-1)、半乳糖凝集素 -3(Galectin-3)、半乳糖凝集素 -4(Galectin-4)、半乳糖凝集素 -7(Galectin-7)、半乳糖凝集素 -8(Galectin-8)、PARK7、结蛋白 (Desmin)、膜突蛋白 (Moesin)、埃兹蛋白 (Ezrin)、根蛋白 (Radixin)、HSP70、HSP90、精氨酸酶 I(Arginase I) 或尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil DNA glycosylase) 的表达量与对照相比增加,可评价为被测物质具有使上述任一种蛋白质的表达增加的作用时,此被测物质即可鉴定为是具有治疗及 / 或预防特应性皮炎作用的物质。

[0133] 实施例

[0134] 以下,根据实施例详细说明本发明,但本发明不限于下述实施例。

[0135] 实施例 1

[0136] 材料和实验方法

[0137] 1. 特应性皮炎模型小鼠 (NC/Nga 小鼠) 的半抗原处理

[0138] 特应性皮炎模型小鼠 (NC/Nga 小鼠),购入 6 周龄的雄性小鼠 [NC/Nga slc, Sankyo Labo Service Corporation(日语原名「三協ラボサービス株式会社」)],在常规条件下饲养。NC/Nga 小鼠有多个系统,本研究使用的系统是只在常规环境下饲养时特应性皮炎不发病,通过 DNFB(二硝基氟苯:Dinitrofluorobenzene) 等免疫诱导剂处理后才使特应性皮炎发病的系统。因此,将 0.1% 的 DNFB 溶液(半抗原)按每周 1 次共计 4 周涂布于两耳及左右背部皮肤上。

[0139] 同时,将可缓和特应性皮炎炎症的乳铁蛋白以 $1 \mu\text{g/ml}$ 溶解于饮料水中投给小鼠。

[0140] 小鼠的实验条件为 (1) 半抗原 (-)/乳铁蛋白 (-)、(2) 半抗原 (-)/乳铁蛋白 (+)、(3) 半抗原 (+)/乳铁蛋白 (-)、(4) 半抗原 (+)/乳铁蛋白 (+),各使用 3 只。

[0141] 2. 特应性皮炎模型小鼠皮肤组织中蛋白质的提取

[0142] 切取用半抗原 / 乳铁蛋白处理 4 周的小鼠的皮肤组织,将组织片用刀切碎,移入预先测定了皮重的离心管中测定组织重量。加入组织重量 $\times 0.85\text{mg}$ 尿素(urea)、组织重量 $\times 0.1 \mu\text{l}$ 18.5% SDS、组织重量 $\times 0.1 \mu\text{l}$ 18.5% 曲拉通 X-100 (Triton X-100)、

组织重量 $\times 0.05 \mu\text{l}$ 2-ME 的缓冲液, 用 HG30 均质器 (homogenizer) (HITACHI 公司) 均质。15,000rpm (15,000xg)、10 °C 离心 30 分钟, 回收上清后, 再将其上清用 50,000rpm (100,000xg)、10 °C 离心 1 小时, 将其上清作为样品。通过点印迹法对蛋白质的量定量。

[0143] 3. 特应性皮炎患者皮肤组织中蛋白质的提取

[0144] 在特应性皮炎患者发生炎症的部位 (主要是腕部) 和炎症部位附近未发生炎症的部位粘贴角质测试仪 [AsahiBiomed Co., Ltd (日语原名「アサヒバイオメッド社」)], 取得角质层。作为对照, 从特应性皮炎未发病的人身上回收样品。角质测试仪, 针对一个部位, 在相同部位所使用 3 片进行回收。每 1 片膜片在 50 μl 的 1 \times 样品缓冲液 (sample buffer) [83mM Tris-HCl (pH6.8)、2.7% SDS、28% 甘油 (glycerin)] 中, 用细胞刮从膜片上刮取样品。用 15000rpm (15,000xg)、4 °C、10 分钟离心后回收上清, 使用 DC 蛋白测定 (DC protein assay) (BIO-RAD 公司) 进行蛋白质定量。

[0145] 4. 二维凝胶电泳 (2-DE)

[0146] 4-1 第一维等电点电泳

[0147] 将 60 μg 的蛋白质与凝胶膨胀液 [5M 尿素 (urea)、2M 硫代尿素 (thiourea)、0.5% 两性电解质 (ampholytes) (pH3.5 ~ 10) (Amersham Biosciences 公司)、0.0025% 橙黄 G (Orange G)、2.5mM TBP、1% 曲拉通 X-100 (Triton X-100)] 混合, 使总量为 340 μl 后, 在 Immobiline 干胶条 (Immobiline Dry-Strip gel) (18cm、pH3-10、NL) (Amersham Biosciences 公司) 20 °C 膨胀一夜。使用 Anatech 公司的装置, 第一维用 20 °C、500V-2 小时、700V-1 小时、1000V-1 小时、1500V-1 小时、2000V-1 小时、3000V-1 小时、3500V-10 小时的程序进行等电点电泳。电泳后, 将凝胶浸入 SDS 平衡缓冲液 [5.8M 尿素 (urea)、0.06M 硫代尿素 (thiourea)、0.5% dithiothreitol (DTT) (w/v)、25% 丙三醇 (glycerol)、0.0025% BPB] 中, 室温下平衡 1 小时。

[0148] 4-2 第二维 SDS-PAGE

[0149] 第二维使用 Tris-三(羟甲基)甲基甘氨酸 (tricine) 系统的缓冲液 [阴极缓冲液: 0.05M Tris、0.05M 三(羟甲基)甲基甘氨酸 (tricine)、0.05% SDS、阳极缓冲液: 1M Tris-HCl (pH8.8)], 通过 18cm \times 18cm、7.5% 丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE。

[0150] 4-3 电泳印迹法

[0151] 将结束 SDS-PAGE 后的凝胶使用半干式转移装置 [Nihon Eido Co., Ltd. (日语原名「日本エイドー社」)], 在 20cm \times 20cm 的 PVDF 膜 [ProBlott Membranes (Applied Biosystemus 公司)] 上用 150mA 的恒定电流转移 2 小时。转移缓冲液使用阳极 1 液: 0.3M Tris-HCl (pH10.4)、20% 甲醇 (methanol), 阳极 2 液: 25mM Tris-HCl (pH10.4)、20% 甲醇 (methanol), 阴极液: 25mM Tris-HCl (pH10.4)、20% 甲醇 (methanol)、40mM 6-氨基己酸 (6-amino hexanoic acid) (和光纯药工业)。转移后用 TTBS 缓冲液 [20mM Tris-HCl (pH7.5) (BIO-RAD 公司)、500mM NaCl、0.3% 吐温-20 (Tween-20) (BIO-RAD 公司)] 20 分钟洗涤 3 次后, 用 MQW 2 分钟洗涤 3 次。然后将膜封好后浸满 50ml 的胶体金溶液 [Colloidal Gold Total Protein Stain (BIO-RAD 公司)], 振荡 1 ~ 2 小时后使蛋白质染色。膜染色后, 去除胶体金溶液, 用纯水洗 1 分钟、洗涤 5 次后, 使其干燥。

[0152] 5. 蛋白质的鉴定

[0153] 5-1PVDF 膜上蛋白质的还原 S- 烷基化和蛋白酶酶切

[0154] 切取转移到 PVDF 膜上的蛋白质点,放入试管中,加入 100 ~ 300 μ l 的还原用缓冲液 [8M 盐酸胍(guanidine-HCl) (pH8.5)]、0.5M Trisbase、0.3%EDTA-2Na(w/v)、5% 乙腈]。在还原用缓冲液中加入溶解的相当于 1mg 的 DTT(dithiothreitol),将试管内置换为氮气,室温静置 1 小时,还原蛋白质。反应结束前,加入在 1M NaCl 中溶解的相当于 3mg 的碘乙酸(Monoiodoacetic Acid),在遮光状态下持续搅拌 15 ~ 20 分钟进行 S- 羧甲基化。结束后取出 PVDF 膜,用纯水搅拌洗涤 5 分钟后,在 2% 乙腈中同样方法搅拌。取出 PVDF 膜,移至装有 Lys-C 酶切缓冲液 [70% 乙腈 /20mMTris-HCl (pH9.0)] 的试管内清洗 2 ~ 3 次后,完全浸入 Lys-C 酶切缓冲液,酶切 1 小时。

[0155] 5-2 质量分析和肽质量指纹谱

[0156] 将蛋白酶酶切的溶液稀释 7 倍使乙腈浓度为 10%。作为前处理,为了活化 Zip Tipc18 移液器吸头 (MILLIPORE 公司) 的充填剂部分,反复用 50% 乙腈 /0.1%TFA(三氟乙酸:trifluoro-acetic acid) 多次、用 2% 乙腈 /0.1%TFA(三氟乙酸:trifluoro-acetic acid) 多次吸入、排出。然后用经活化的 Zip Tipc18 移液器吸头将蛋白酶酶切液多次吸入、排出,使片段化后的肽吸附在充填部分上。再将 2% 乙腈 /0.1%TFA(三氟乙酸:trifluoro-acetic acid) 多次吸入、排出,去除盐类。吸入在 50% 乙腈 /0.1%TFA(三氟乙酸:trifluoro-acetic acid) 中溶解的饱和基质溶液 0.5 ~ 1 μ l,放置 10 秒左右后,滴入到质谱仪附属的靶探针中。使样品干固,用质谱仪 (MALDI-TOF MS) 测定。基于得到的质量值,参照在数据库 (MS-Fit, Mascot Search) 登录的蛋白质进行鉴定。

[0157] 6. Western 印迹法

[0158] 使用用于 Western 印迹法的样品,通过 Laemmli 的 Tris-Glycin 系统进行 SDS-PAGE。进行 SDS-PAGE 后,将凝胶用每 1cm20.8mA 的恒定电流转移至 PVDF 膜 (MILLIPORE 公司),然后使用 5% 脱脂奶 /PBS(-) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。将 PVDF 膜用 0.1% 吐温 20 (Tween20) /PBS(-) 洗涤 3 次后,与 1 次抗体在室温下反应 1 小时。其次,2 次抗体用生物素化抗羊 IgG(Biotinylated anti-goat IgG) (Vector Laboratories 公司) [1:1000 稀释 (dilution)] 振荡 1 小时,与碱性磷酸酶共轭的抗生物素蛋白 D(Alkalinephosphatase-conjugated avidin D) (Vector Laboratories 公司) (1:1000 稀释) 反应 1 小时,用 0.6mg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸 (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)、1.2mg/ml 硝基四氮唑蓝 (nitrobluetetrazolium)、0.1M Tris-HCl (pH9.5)、5mM MgCl₂ 显色。且 2 次抗体使用辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgG (HRP labeled anti-mouse IgG) (Amersham Bioscience 公司) (1:1000 稀释),辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG (HRP labeled anti-rabbit IgG) (Amersham Bioscience 公司) (1:1000 稀释),辣根过氧化物酶标记抗大鼠 IgG (HRP labeled anti-rat IgG) (Amersham Bioscience 公司) (1:1000 稀释),辣根过氧化物酶标记抗羊 IgG (HRP labeled anti-goat IgG) (Santa Cruz 公司) (1:1000 稀释) 时,使用增强化学发光 (Enhanced chemiluminescence) (ECL) (Amersham Bioscience 公司) 试剂盒,通过荧光显色检测。使用的 1 次抗体的种类和稀释度如下所示:小鼠抗-HSP70 单克隆抗体 (mouse anti-HSP70 monoclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、兔抗-膜联蛋白 II 多克隆抗体 (rabbit anti-annexin II polyclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-HSP90 单克隆抗体 (mouse

anti-HSP90 monoclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、大鼠抗-GRP94 单克隆抗体 (rat anti-GRP94 monoclonal antibody) (Stressgen 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-半乳糖凝集素-1 单克隆抗体 (mouse anti-galectin-1 monoclonal antibody) (R&D Systems 公司) (1:1000 稀释)、大鼠抗-半乳糖凝集素-3 单克隆抗体 (rat anti-galectin-3 monoclonal antibody) (R&D Systems 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-半乳糖凝集素-4 单克隆抗体 (mouse anti-galectin-4 monoclonal antibody) (R&D Systems 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-半乳糖凝集素-7 单克隆抗体 (mouse anti-galectin-7 monoclonal antibody) (R&D Systems 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-半乳糖凝集素-8 单克隆抗体 (mouse anti-galectin-8 monoclonal antibody) (R&D Systems 公司) (1:1000 稀释)、羊抗-半乳糖凝集素-9 多克隆抗体 (goat anti-galectin-9 polyclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、兔抗-结蛋白多克隆抗体 (rabbit anti-desmin polyclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、羊抗-波形蛋白多克隆抗体 (goat anti-vimentin polyclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、兔抗-烯醇酶-1 多克隆抗体 (rabbit anti-enolase-1 polyclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、兔抗-埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白多克隆抗体 (rabbit anti-ezrin/radixin/moesin polyclonal antibody) (Chemicon 公司) (1:1000 稀释)、羊抗-FABP-4 多克隆抗体 (goat anti-FABP-4 polyclonal antibody) (G-T research 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-载脂蛋白 A1 单克隆抗体 (mouse anti-apolipoprotein Al monoclonal antibody) (ICN biomedical 公司) (1:1000 稀释)、羊抗-载脂蛋白 A1 (goat anti-apolipoprotein A1) (Abcom 公司) (1:1000 稀释)、羊抗-PARK7 多克隆抗体 (goat anti-PARK7 polyclonal antibody) (Abcom 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-Rho GDI 单克隆抗体 (mouse anti-Rho GDI monoclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、羊抗-FABP-5 多克隆抗体 (goat anti-FABP-5 polyclonal antibody) (R&D Systems 公司) (1:1000 稀释)、小鼠抗-SCCA2 单克隆抗体 (mouse anti-SCCA2 monoclonal antibody) (Santa Cruz Biotechnology 公司) (1:1000 稀释)、兔抗-FABP-5 多克隆抗体 (rabbit anti-FABP-5 polyclonal antibody) (BioVendor 公司) (1:5000 稀释)、兔抗-人血白蛋白多克隆抗体 (rabbit anti-human albumin polyclonal antibody) (Inter-Cell 公司) (1:1000 稀释)。

[0159] 7. 角质细胞面积减少度的测定

[0160] 将角质测试仪按压在患病部位, 剥离角质层细胞。将采集了角质层细胞的角质测试仪用 1% 亮绿、0.5% 龙胆紫水溶液染色后, 使用数码显微镜 (VHX-100, KEYENCE Co, Ltd., Japan) (改变檀渊等的方法, JSCCJ, 23, 1, 1989。日语原文: 檀渊らの方法を改变, JSCCJ, 23, 1, 1989。)观察。所得到的图像的角质细胞面积通过专业判定员的目测评价分 5 级别 (1 分: 小, 2 分: 稍小, 3 分: 一般, 4 分: 稍大, 5 分: 大) 评分。

[0161] 8. 经皮水分丧失量的测定

[0162] 使用市售的皮肤水分流失测试仪 (Tewameter) (TEWAMETER TM210, Courage+Khazaka electronic GmbH 公司制) 测定。其测定原理是假定从皮肤表面向空气中散失的水分根据 Fick 法则扩散, 测量皮肤上数 mm 的 2 点的蒸气压, 算出从表皮蒸发的水

分量。

[0163] 9. 通过ELISA(酶联免疫吸附测定法 :enzyme-linked immunosorbent assay) 的标记物蛋白质的测定

[0164] 在 96-well ELISA 板中,将用磷酸缓冲溶液 (PBS) 稀释到 $0.2 \mu\text{l}/\mu\text{l}$ 的角质层蛋白质溶液以 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 添加, 4°C 吸附 18 小时。除去角质层蛋白质溶液后,浸入封闭溶液 { 含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS } 中, 37°C 、封闭 1 小时。用洗涤液 { 含有 0.05% 的聚氧乙烯 (20) 失水山梨醇单月桂酸酯 (和光纯药) 的 PBS } 洗涤后,将 1 次抗体溶液 { 用洗涤液制成 $5\text{mg}/\text{ml}$ 的各种抗体 } 分别以 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 添加, 37°C 、反应 2 小时。洗涤后,将 2 次抗体溶液 { 用洗涤液制成 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的 HRP (辣根过氧化物酶 :Horseradish peroxidase) 化抗小鼠免疫球蛋白 G (VECTOR LABORATORIES) 或用洗涤液制成 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的 HRP (辣根过氧化物酶 :Horseradish peroxidase) 化抗兔免疫球蛋白 G (VECTOR LABORATORIES) } 分别以 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 添加, 37°C 、反应 1 小时。洗涤后,使用增强化学发光 (Enhanced chemiluminescence) (ECL) (Amersham Bioscience 公司) 试剂盒进行化学发光反应,通过化学发光检测仪 (SpectraMax Lmax II 384, Molecular devices) 检测,进行数值化。

[0165] 实验结果

[0166] 1. 特应性皮炎模型小鼠的半抗原处理

[0167] 本研究中使用的特应性皮炎模型小鼠 (NC/Nga 小鼠) 在常规环境下经半抗原

[0168] 处理后饲养时,半抗原处理 4 周后,用肉眼可确认出酷似特应性皮炎的皮肤炎发病。本研究将对特应性皮炎有效果的乳铁蛋白 (与唾液、血液中所含有的铁离子结合的分子量为 8 万的蛋白质) 混入饮用水中使其饮用。半抗原及乳铁蛋白处理后饲养的结果,在半抗原涂布处理的小鼠的背部发现有酷似人体特应性皮炎的炎症,而半抗原涂布处理后,进一步饮用了混入乳铁蛋白的水的小鼠与只进行半抗原涂布处理的小鼠相比,炎症受到了抑制 (图 1)。通过半抗原处理,伴随特应性皮炎发病其表达发生改变的蛋白质如通过乳铁蛋白处理,特应性皮炎症状得到缓和而恢复到与无处理时同等的水平,则可认为其蛋白质是有希望的标记物。

[0169] 2. 使用特应性皮炎模型小鼠的皮肤组织进行二维电泳分析

[0170] 为鉴定与特应性皮炎有关的蛋白质,将半抗原涂布处理或未处理、乳铁蛋白处理或未处理的小鼠的皮肤用二维电泳对变化的蛋白质进行分析。

[0171] 取出无处理 (对照) 小鼠、半抗原涂布小鼠、作为对照饮用乳铁蛋白的小鼠以及涂布半抗原后进一步饮用乳铁蛋白的小鼠的皮肤 (半抗原涂布时有炎症的部位),根据重量添加样品缓冲液,用 Polytron 型均质器破碎后, 15000rpm ($15,000\text{xg}$)、30 分钟离心,然后回收上清液。将其上清用 $100,000\text{xg}$ 、1 小时超离心,将上清作为样品使用。二维电泳,其第一维用 pH3-10 的胶条 (strip gel)、第二维用 7.5% 丙烯酰胺凝胶进行。使用胶体金溶液染色,检测变化的蛋白质,对能看出变化的蛋白质使用质谱仪 (MALDI-TOF MS) 进行分子鉴定 (图 2(a) (b))。其结果,在分析的 49 个蛋白质中鉴定出 43 个蛋白质。鉴定出的蛋白质中,半抗原处理的小鼠 (产生特应性皮炎炎症的小鼠) 中表达增加的蛋白质鉴定出 FABP-5、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、波形蛋白 (Vimentin) 等,未知蛋白质有 4 种。另一方面,在半抗原处理的小鼠中,表达减少的蛋白质鉴定出半乳糖凝集素 -3 (Galectin-3)、结蛋白 (Desmin)、PARK7 等。且鉴定出的蛋白质的大多数是角蛋白 5 (keratin5)、角蛋白 16

(keratin16)、结蛋白 (Desmin)、波形蛋白 (Vimentin)、膜突蛋白 (Moesin) 等的骨架蛋白。

[0172] 3. 使用特异性皮炎模型小鼠发生改变的蛋白质的抗体进行确认

[0173] 为确认上述所示的因特异性皮炎发病而改变的蛋白质的表达,使用各种抗体,通过 Western 印迹法进行分析。首先,因由二维电泳的结果鉴定的蛋白质中含有半乳糖凝集素-3(Galectin-3),所以着眼于半乳糖凝集素家族进行确认。半乳糖凝集素是糖蛋白质的一种,不具有通常的信号序列,但受免疫反应等的刺激或不受刺激而向细胞外释放。有报道指出,各半乳糖凝集素分子显示不同的组织分布,参与免疫调节、细胞·基质间粘着、细胞间粘着、创伤治愈等种种不同的生理现象(参照 J. Biol. Chem. 264:1310-1316(1989), J. Biochem. 104:1-4(1988), Proc. Natl Acad. Sci. USA. 87:7324-7328(1990), Eur. J. Biochem. 248:225-230(1997), Dev. Biol. 168:259-271(1995), J. Biol. Chem. 270:5823-5829(1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:7252-7257(1996))。

[0174] 因此,除半乳糖凝集素-3(Galectin-3)以外,还使用半乳糖凝集素(Galectin)家族中所包含的半乳糖凝集素-1、-3、-4、-7、-8、-9(Galectin-1、-3、-4、-7、-8、-9)的抗体,分析特异性皮炎模型小鼠皮肤中表达量的变化(图3)。其结果,对于半乳糖凝集素-1、-3、-4、-7、-8(Galectin-1、-3、-4、-7、-8)来说,半抗原处理的小鼠与未处理的小鼠(对照小鼠)相比表达量减少。而另一方面,对于半乳糖凝集素-1、-4、-7、-8(Galectin-1、-4、-7、-8)来说,还可知即使是半抗原处理的小鼠,在使其饮用乳铁蛋白后,小鼠的表达量仍恢复到接近半抗原未处理的小鼠(对照小鼠)的水平。半乳糖凝集素-9(Galectin-9)未因半抗原处理而发生变化,所以认为其与特异性皮炎的相关性低。

[0175] 对于细胞骨架蛋白结蛋白(Desmin)、膜突蛋白(Moesin)/埃兹蛋白(Ezrin)/根蛋白(Radixin)、波形蛋白(Vimentin)也进行了同样的分析(图4)。半抗原处理的小鼠与未处理的对照小鼠相比,结蛋白(Desmin)的表达量减少,膜突蛋白(Moesin)/埃兹蛋白(Ezrin)/根蛋白(Radixin)(50KDa切割型)及波形蛋白(Vimentin)的表达量增加。特别是膜突蛋白(Moesin)/埃兹蛋白(Ezrin)/根蛋白(Radixin)通过半抗原处理,其低分子量的切割型明显增加,通过乳铁蛋白给药后也未减少。且膜突蛋白(Moesin)/埃兹蛋白(Ezrin)/根蛋白(Radixin)属于同一家族的蛋白质,通过二维电泳分析,鉴定为膜突蛋白(Moesin)。因此次使用的抗体是识别此3种的抗体,所以认为由于炎症,膜突蛋白(Moesin)或其他蛋白质单独或多数高表达。

[0176] 对于热休克蛋白质 HSP70、HSP90、GRP94,半抗原处理的小鼠与未处理的小鼠(对照小鼠)相比,HSP70、HSP90 的表达量减少,但 GRP94 的表达与半抗原处理、无处理无关,没有变化(图4)。

[0177] 而且,对于 FABP-4(脂肪酸结合蛋白-4:fatty acid binding protein-4)、FABP-5(脂肪酸结合蛋白-5:fatty acid binding protein-5)、烯醇酶 1(Enolase1)、PARK7(DJ-1)、膜联蛋白 II (Annexin II)、载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、Rho GD I 来说,通过 Western 印迹法进行了分析(图5)。其结果,对于膜联蛋白 II (Annexin II)、烯醇酶 1(Enolase1)、FABP-4、PARK7,半抗原处理的小鼠与未处理小鼠(对照小鼠)相比表达量减少。且除 FABP-4 以外,即使是半抗原处理的小鼠,在使其饮用乳铁蛋白后,小鼠的表达量仍恢复到了接近半抗原未处理的小鼠(对照小鼠)的水平。另一方面,对于 Rho GDI、FABP-5、载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1) 来说,半抗原处理的小鼠与未处理的小鼠(对照

小鼠)相比表达增加(图5)。已知 Rho GDI 减弱细胞间的粘着,所以,因特应性皮炎发病此蛋白质的表达增加可能与其参与特应性皮炎中的皮肤脱离有关。

[0178] 4. 使用特应性皮炎患者的皮肤组织进行 SDS-PAGE 分析

[0179] 从上述结果中,筛选使用特应性皮炎模型小鼠的候选特应性皮炎标记物,但需调查这些蛋白质能否成为人体特应性皮炎的标记物。因此,实际从特应性皮炎发病者的炎症部位(图6、A.P.)和非炎症部位(Control)、特应性皮炎未发病的志愿者的相同部位(Control)使用称为角质测试仪的膜片状物品采集样品。从人体皮肤的相同部位回收3片膜片的样品,然后使用1×SDS样品缓冲液溶解皮肤组织。其后,使用特应性皮炎发病者(2人)和非发病者(3人)的样品进行 SDS-PAGE,使用质谱仪(MALDI TOF-MS)对特应性皮炎发病的样品中表达增加的蛋白质进行鉴定。其结果表明,膜联蛋白 II (Annexin II)、鳞状细胞癌抗原 1 (squamous cell carcinoma antigen-1) (SCCA1)、鳞状细胞癌抗原 2 (squamous cell carcinoma antigen-2) (SCCA2)、脂肪酸结合蛋白-5 (fatty acid binding protein-5) (FABP-5)、血清白蛋白 (Serum albumin) 及免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G) 的表达随特应性皮炎发病而增加(图6)。另一方面,也表明精氨酸酶 I (Arginase I) 及尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (Uracil-DNA glycosylase) 的表达在特应性皮炎发病者中减少(图6)。

[0180] 5. 通过使用特应性皮炎患者皮肤组织的各种抗体进行分析

[0181] 使用特应性皮炎模型小鼠通过 Western 印迹法的分析时,发现有 17 种蛋白质发生了变化。测定这些蛋白质在人体特应性皮炎的炎症发病时是否有同样的变化(图7)。同时通过使用特应性皮炎患者的皮肤组织的 SDS-PAGE 分析,对发生变化的蛋白质进行探讨。

[0182] 对于膜联蛋白 II (Annexin II) 来说,特应性皮炎发病者的发病部位(图7、A.P.)与非发病部位(Control)相比表达增加,且与特应性皮炎非发病者的条带相比分子量略小。此原因尚不明确,但认为此分子水平差异可能与特应性皮炎发病者和非发病者的体质不同有关。

[0183] 对于烯醇酶 1 (Enolase1)、鳞状细胞癌抗原 2 (squamous cell carcinoma antigen2) (SCCA2) 来说,在 1 名特应性皮炎发病者的发病部位上增加。

[0184] 对于 PARK7 来说,因特应性皮炎发病者不同其表达的增减也不一定,但与特应性皮炎非发病者相比,特应性皮炎发病者中仍全部显示减少趋势。

[0185] 此外,对于载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1) 来说,特应性皮炎非发病者及特应性皮炎发病者的非发病部位完全没有表达,而只在特应性皮炎发病部位表达增加。

[0186] 将以上结果归纳在表 1 中。

[0187] 表 1

[0188]

〈伴特应性皮炎的炎症其表达增加〉		〈伴特应性皮炎的炎症其表达减少〉	
特应性皮炎模型小鼠			
载脂蛋白 AI	+	+	+
FABP-5	+	+	+
波形蛋白	+	+	+
Rho GDI	+	+	+
特应性皮炎人体皮肤组织			
载脂蛋白 AI	+	+	+
FABP-5	+	+	+
SCCA2 [注2]	+	+	+
膜联蛋白 II [注2]	+	+	+
烯醇酶 1 [注2]	+	+	+
		半乳糖凝集素 1-1, -3, -7	+
		PARK7	+
		结蛋白	+
		膜联蛋白 II	+
		FABP-4	+
			+
		PARK7 [注3]	+

注1) +表示用Western印迹法的表达水平。
 注2) 因特应性皮炎患者不同表达也不同。
 注3) 在特应性皮炎患者的非炎症部位减少。在患者的炎症部位增减变化不同。

[0189] 6. 通过使用患者皮肤组织的各种抗体进行分析

[0190] 为确认从特应性皮炎模型小鼠及少数特应性皮炎患者的皮肤组织中检测出的特应性皮炎标记物候选的实用性,使用接受皮肤科医生诊疗的特应性皮炎患者志愿者 17 名(男性 7 名、女性 10 名)和非发病志愿者 15 名(男性 10 名、女性 5 名)的皮肤样品,测定其与特应性皮炎严重度的相关性。根据特应性皮炎患者的严重度(日本皮肤科学会特应性皮炎治疗方针 2004 改订版,[日语原名:「日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2004 改訂版」])分类,严重度为 1 的 1 名,严重度为 2 的 7 名,严重度为 3 的 6 名,严重度为 4 的 3 名。从特应性皮炎志愿者 17 名中,收集已知与特应性皮炎的严重度相关的血液中嗜酸性白细胞、IgE、LDH 等的的数据。皮肤样品用角质测试仪采集,通过 Western 印迹法分析 6 种蛋白质的表达(图 8(a) (b))。

[0191] 对于烯醇酶 1(Enolase1),未能从特应性皮炎非发病者的皮肤中检测出烯醇酶 1,但在特应性皮炎患者的皮肤中发现有大量表达。在患者中,与非炎症部位相比,炎症部位表达多的患者 17 人中有 12 人。相反,减少的患者有 2 人。

[0192] 对于脂肪酸结合蛋白-5 (Fatty acid binding protein-5) (FABP-5),在非发病者皮肤中,除 1 人以外基本上都未能检测出,而在特应性皮炎患者的炎症部位,均发现有与严重度相应的强表达。与非炎症部位相比,在炎症部位表达多的患者 17 人中有 13 人。

[0193] 对于鳞状细胞癌抗原 2 (Squamous cell carcinoma antigen2) (SCCA2),非发病者中 1 人为弱表达,但非常明显在特应性皮炎患者皮肤中表达增加。与非炎症部位相比,在炎症部位表达多的患者 17 人中有 9 人,相反,减少的患者为 1 人。与 FABP-5 相比,可看出表达发生了偏差。

[0194] 对于载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1),非发病者皮肤中 1 人为弱表达,在特应性皮炎患者的特定的患者中,检测出有强表达的趋势。与非炎症部相比,在炎症部表达多的患者 17 人中有 9 人,减少的患者为 1 人。

[0195] 血清白蛋白 (Serum albumin),在全体特应性皮炎患者中均检测出有较强的表达,全部的炎症部和非炎症部之间的差很小。非发病者中,除 1 名以外,表达均很弱。

[0196] 对于膜联蛋白 II (Annexin II),表达虽然弱,但在特应性皮炎患者的皮肤中检测出有大量表达,在非发病者中基本未检测出表达。与非炎症部相比,在炎症部表达多的患者 17 人中有 6 人,减少的患者也有 6 人。

[0197] 除了表达强度低的膜联蛋白 II (Annexin II),对烯醇酶 1 (Enolase1)、FABP-5、SCCA2、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、血清白蛋白 (Serum albumin) 的各 5 种标记物蛋白质的各样品的表达强度定量。将其结果按患者的严重度归纳,如图 9(a) (b) 所示。

[0198] 因 FABP-5、血清白蛋白 (Serum albumin)、烯醇酶 1 (Enolase1) 显示了与患者皮肤特应性皮炎严重度有高的相关性,所以可用于判定患者特应性皮炎的严重度。即使从非炎症部位也能检测出血清白蛋白 (Serum albumin),所以其可反映与特应性皮炎发病有关的患者的体质。载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1) 和 SCCA2 在表达上发生偏差,且膜联蛋白 II (Annexin II) 具有在非炎症部位表达高的特征。这些标记物的表达也可能反映患者的特质。

[0199] 将以上结果归纳于表 2。

[0200] 表 2

[0201]

◀伴随特应性皮炎的炎症其表达增加▶ ◀伴随特应性皮炎的炎症其表达减少▶

特应性皮炎人体皮肤组织

载脂蛋白 A1	++	无相应结果
FABP-5	++	
SCCA2	++	
膜联蛋白 II	++	
烯醇酶 1-1	++	
白蛋白	+++	
半乳糖凝集素-7	+++	

注) +表示用Western印迹法的表达水平

[0202] 7. 在有特应性皮炎病史的人中标记物有效性的验证

[0203] 因特应性皮炎而有常去医院体验的人约为 634 万人, 呈现特应性皮炎症状的过敏性皮肤的人约可推测为 1200 万人。对特应性皮炎来说, 不仅通过药剂治疗, 通过保湿剂护肤也很有效 (田上八朗, *Fragrance Journal*, p13-19, 2003 年 6 月), 用医药保健品、化妆品进行护肤的人也大有人在。由以上可认为, 本研究中发现的标记物的用途, 不仅可用于皮肤科医生对特应性皮炎的诊断上, 还可用于咨询店的皮肤诊断、自家中的皮肤诊断上。因此, 以曾经有过特应性皮炎发病, 有过接受皮肤科医生治疗体验的有特应性皮炎病史的人为对象, 确认特应性皮炎标记物候选的实用性。

[0204] 作为特应性皮炎的特征性变化, 已很清楚的有因角质层屏障功能下降而引起的经皮水分丧失量 (TEWL) 亢进、因角质化不全引起的角质细胞面积的减少及有核细胞在角质中的存在 (Tagami H. et al., *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 6, 1, 87 ~ 94, 2001)。因此, 以 TEWL 的亢进度及角质细胞面积的减少度为特应性皮炎炎症程度的指标, 检测候选标记物的有效性。

[0205] 以健康者 11 名、有特应性皮炎病史的人 10 名的志愿者为对象进行评价。健康者及有特应性皮炎病史的人的正常部位使用上臂内侧部, 有特应性皮炎病史的人的炎症部位使用发生炎症的部位 (肘内侧部 7 名、脖子 1 名、手指缝部 1 名、膝盖内侧部 1 名), 测定 TEWL 的亢进度及角质细胞面积的减少度与 6 种候选标记物 [FABP-5、半乳糖凝集素 -7 (Galectin-7)、烯醇酶 1 (Enolase1)、SCCA2、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、膜联蛋白 II (Annexin II)] 的表达度之间的相关性。角质细胞面积的减少度通过剥离角质层染色法, TEWL 的亢进度通过皮肤水分流失测定仪 (Tewameter) 测定。6 种候选标记物的表达度, 健康者及有特应性皮炎病史的人的正常部位使用上臂内侧部, 有特应性皮炎病史的人的炎症部使用发生炎症的部位, 通过角质测试仪采集角质层, 从中提取蛋白质通过 ELISA 法测定。

[0206] 测定 TEWL 的亢进度和 6 种候选标记物 [FABP-5、半乳糖凝集素 -7 (Galectin-7)、Enolase1、SCCA2、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、膜联蛋白 II (Annexin II)] 的表达度之间的相关性的结果如图 10 所示。图 10 的 X 轴表示的 TEWL 在健康者和有特应性皮炎病史的人的正常部位基本相等, 但在有特应性皮炎病史的人的炎症部位表现出亢进。图 10(a) ~ (c) 的 Y 轴表示的 FABP-5、半乳糖凝集素 -7 (Galectin-7)、烯醇酶 1 (Enolase1) 的 3 种标记物的表达, 与健康者及有特应性皮炎病史的人的正常部位相比, 有特应性皮炎病史的人的炎症部位与 TEWL 的亢进呈相关性的亢进。另一方面, 图 10(d) ~ (f) 的 Y 轴表示的 SCCA2、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、膜联蛋白 II (Annexin II) 的 3 种标记物的表达度, 为健康者 < 有特应性皮炎病史的人的正常部位 < 有特应性皮炎病史的人的炎症部位, 对特应性皮炎发病的危险度的诊断非常有效。

[0207] 测定角质细胞面积的减少度与 6 种候选标记物 [FABP-5、半乳糖凝集素 -7 (Galectin-7)、烯醇酶 1 (Enolase1)、SCCA2、载脂蛋白 A1 (Apolipoprotein A1)、膜联蛋白 II (Annexin II)] 的表达度之间的相关性的结果如图 11 所示。图 11 的 X 轴表示的角质细胞面积, 在健康者和有特应性皮炎病史的人的正常部位基本相等, 但在有特应性皮炎病史的人的炎症部位减少。图 11(a) ~ (c) 的 Y 轴表示的 FABP-5、半乳糖凝集素 -7 (Galectin-7)、烯醇酶 1 (Enolase1) 的 3 种标记物的表达量, 与角质细胞面积

的减少相关,与健康者及有特应性皮炎病史的人的正常部位相比,在有特应性皮炎病史的人的炎症部位显示亢进。另一方面,图 11(d) ~ (f) 的 Y 轴表示的 SCCA2、载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1)、膜联蛋白 II (Annexin II) 的 3 种标记物的表达度,为健康者 < 有特应性皮炎病史的人的正常部位 < 有特应性皮炎病史的人的炎症部位,对特应性皮炎发病的危险度的诊断非常有效。

[0208] 本发明找到了伴随特应性皮炎的炎症程度及特应性皮炎发病的危险度其表达增加的蛋白质及减少的蛋白质。通过检测这些蛋白质的表达变化,可根据与特应性皮炎的原因、症状的关系,进行更正确的诊断和对发病危险度的判定。且可将这些标记物用于特应性皮炎的治疗药物的开发、敏感皮肤用化妆品及健康食品的开发等。

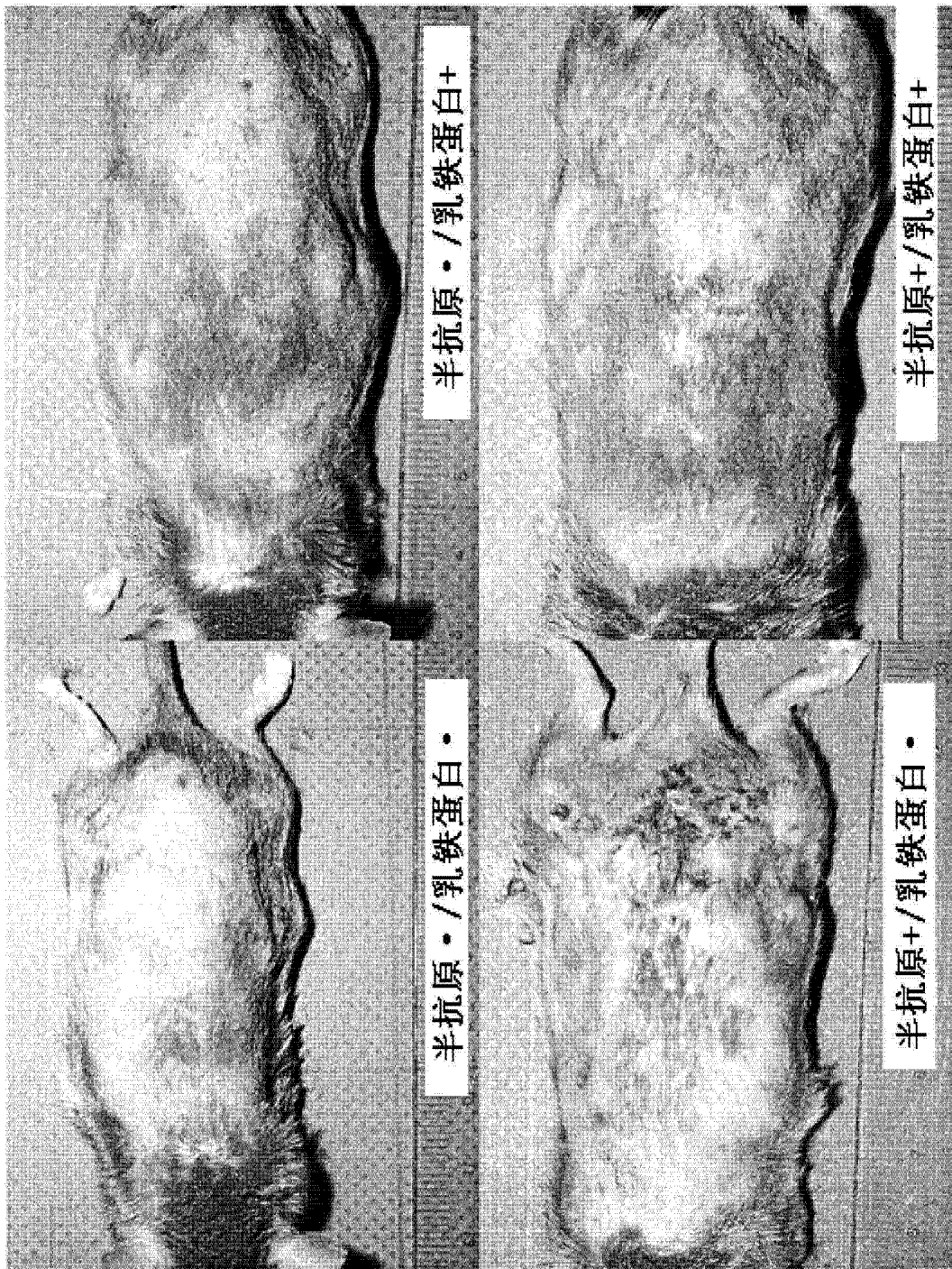


图 1

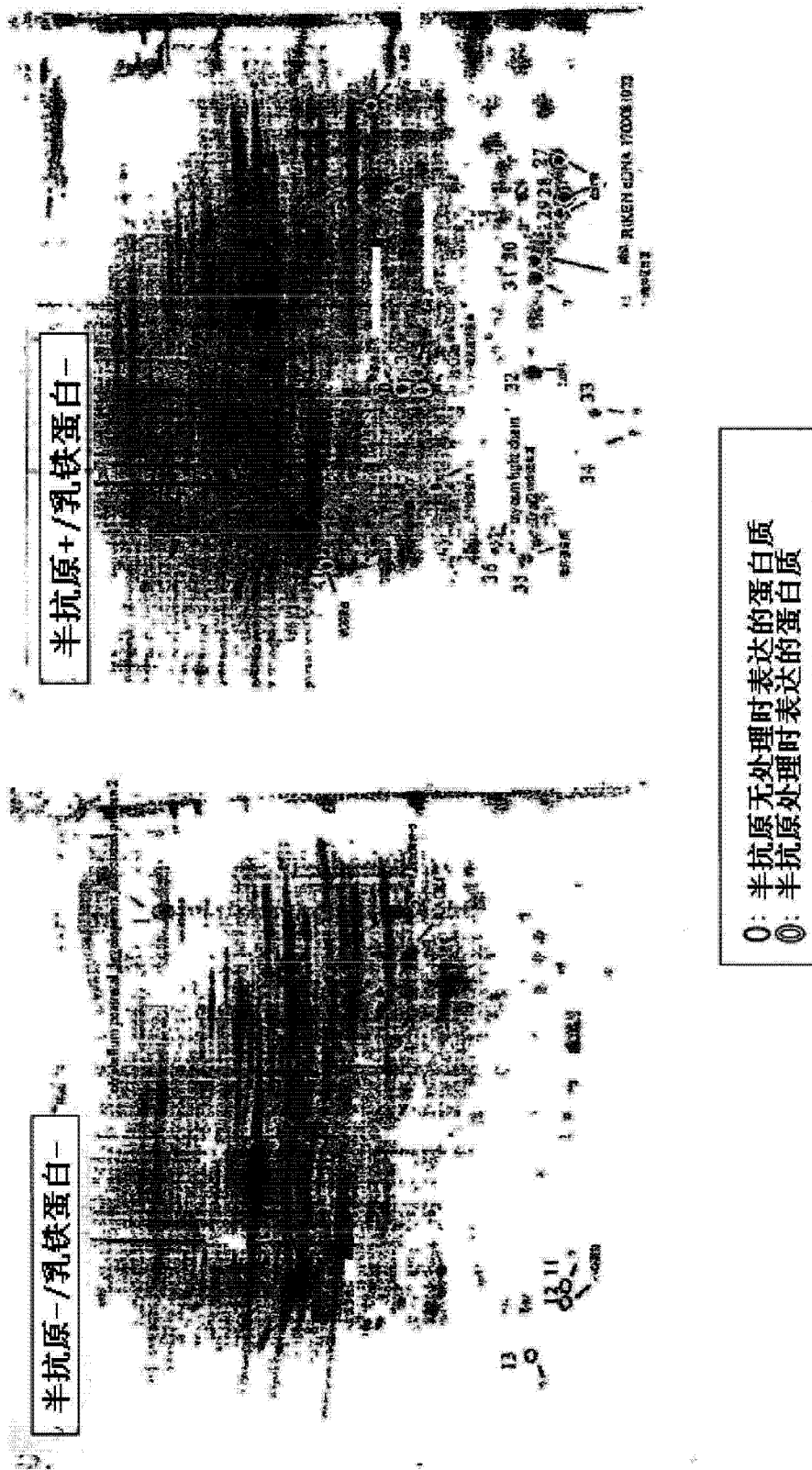


图 2(a)

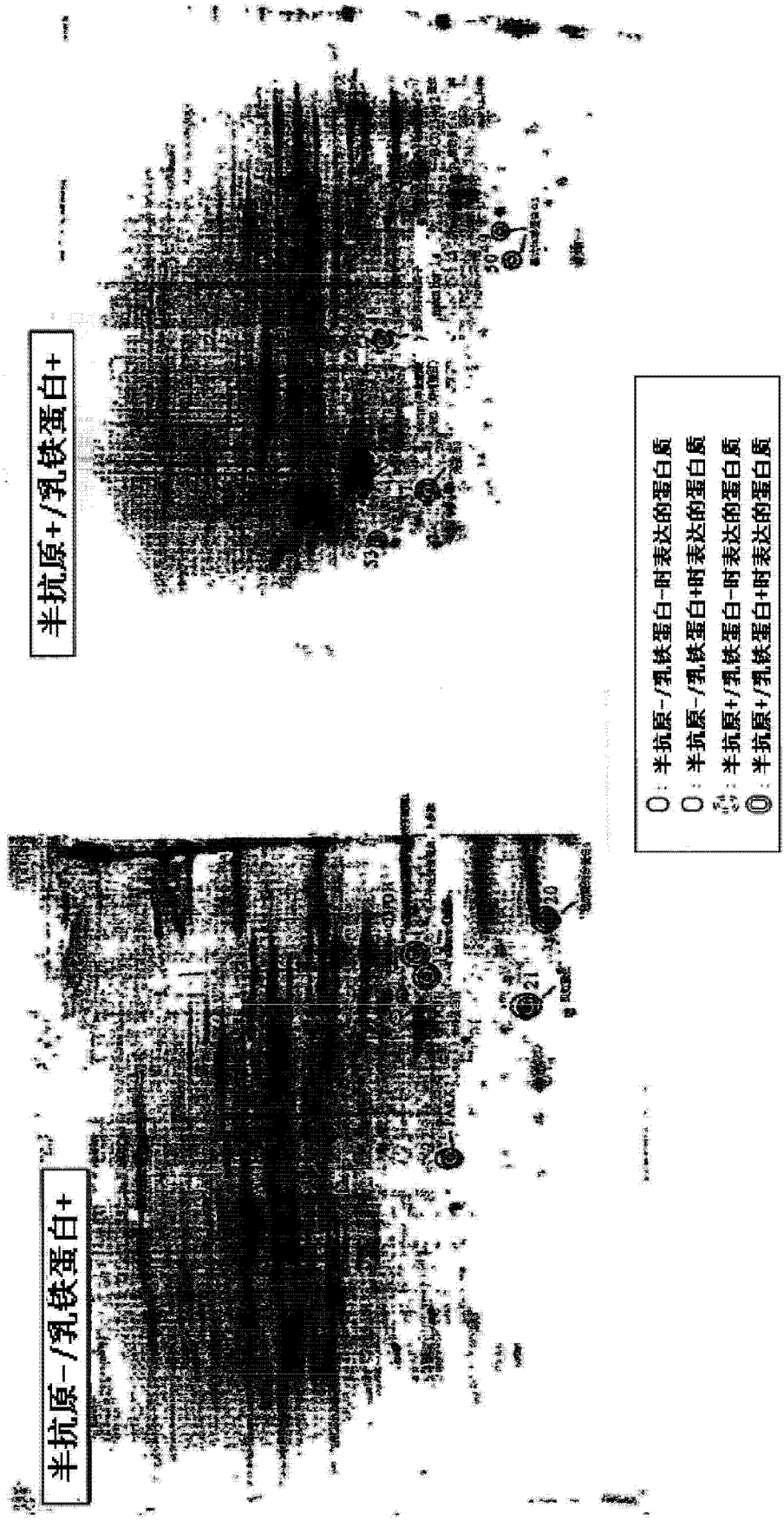


图 2(b)

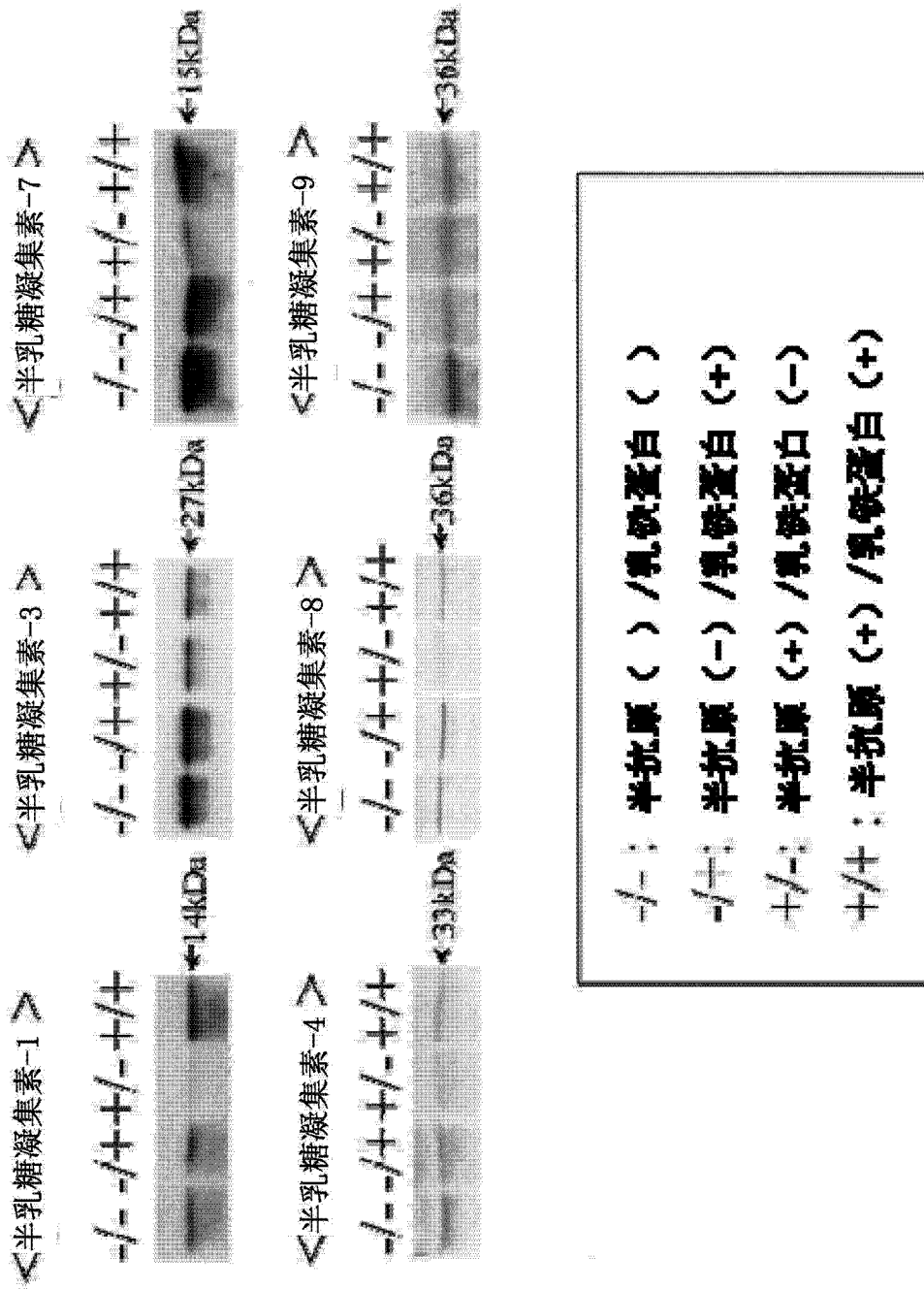


图 3

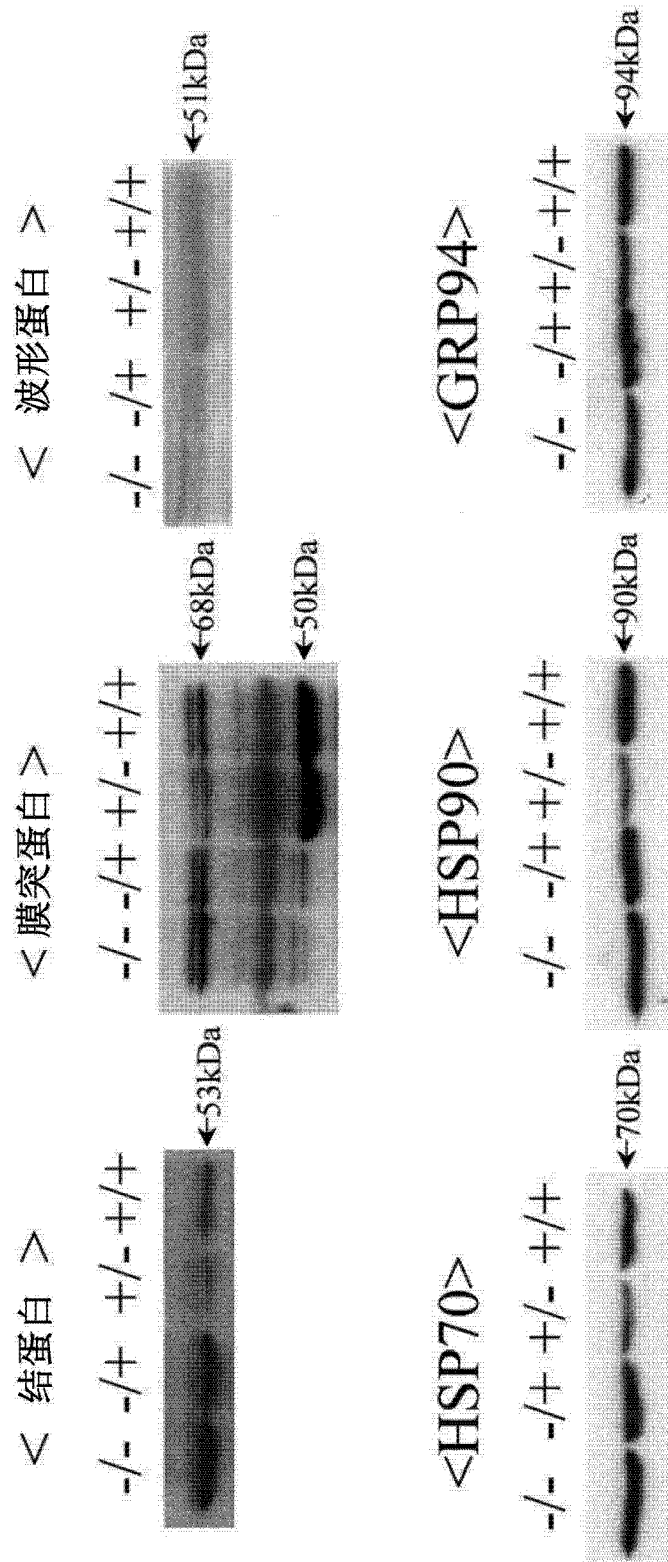


图 4

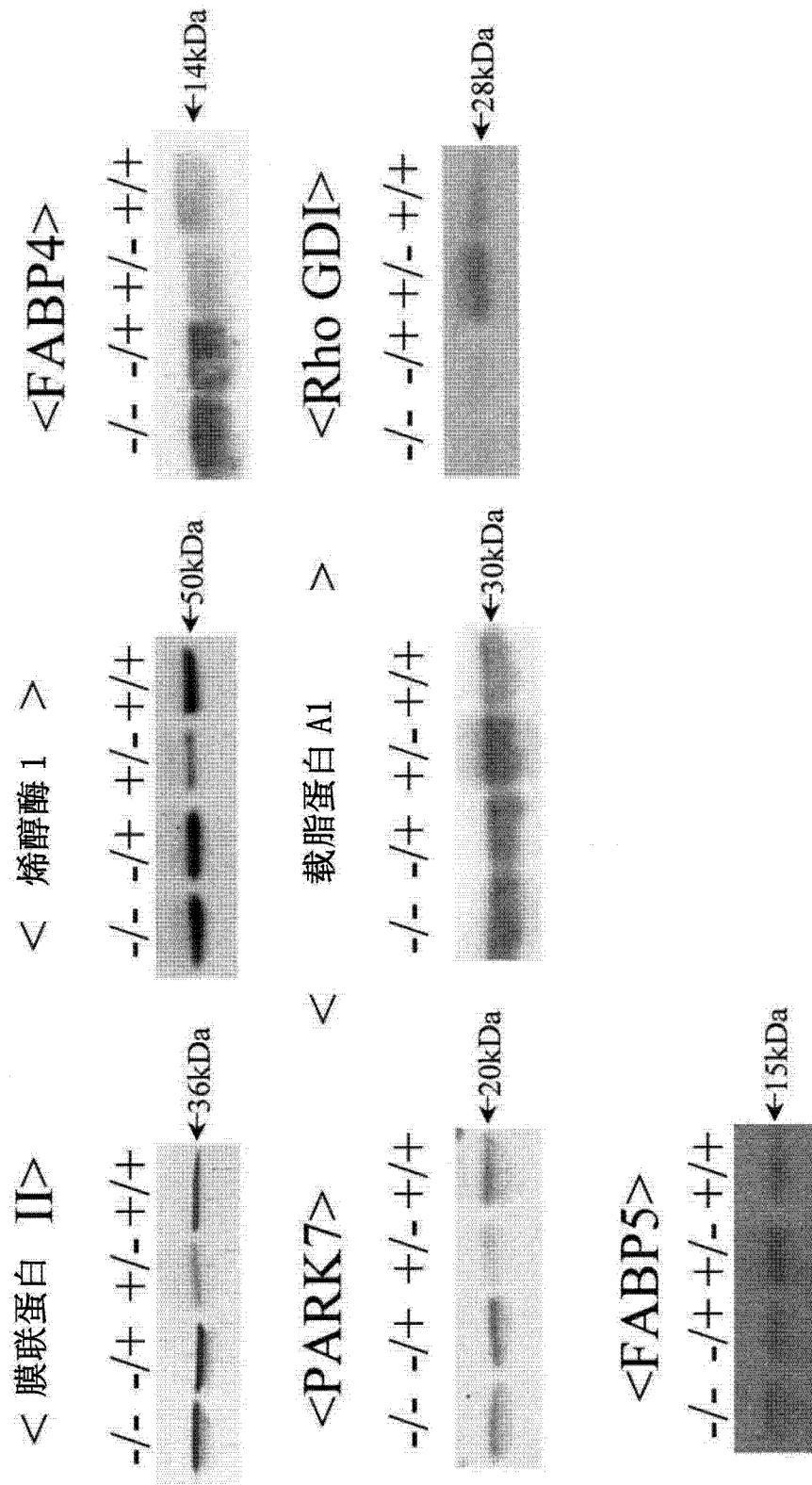


图 5

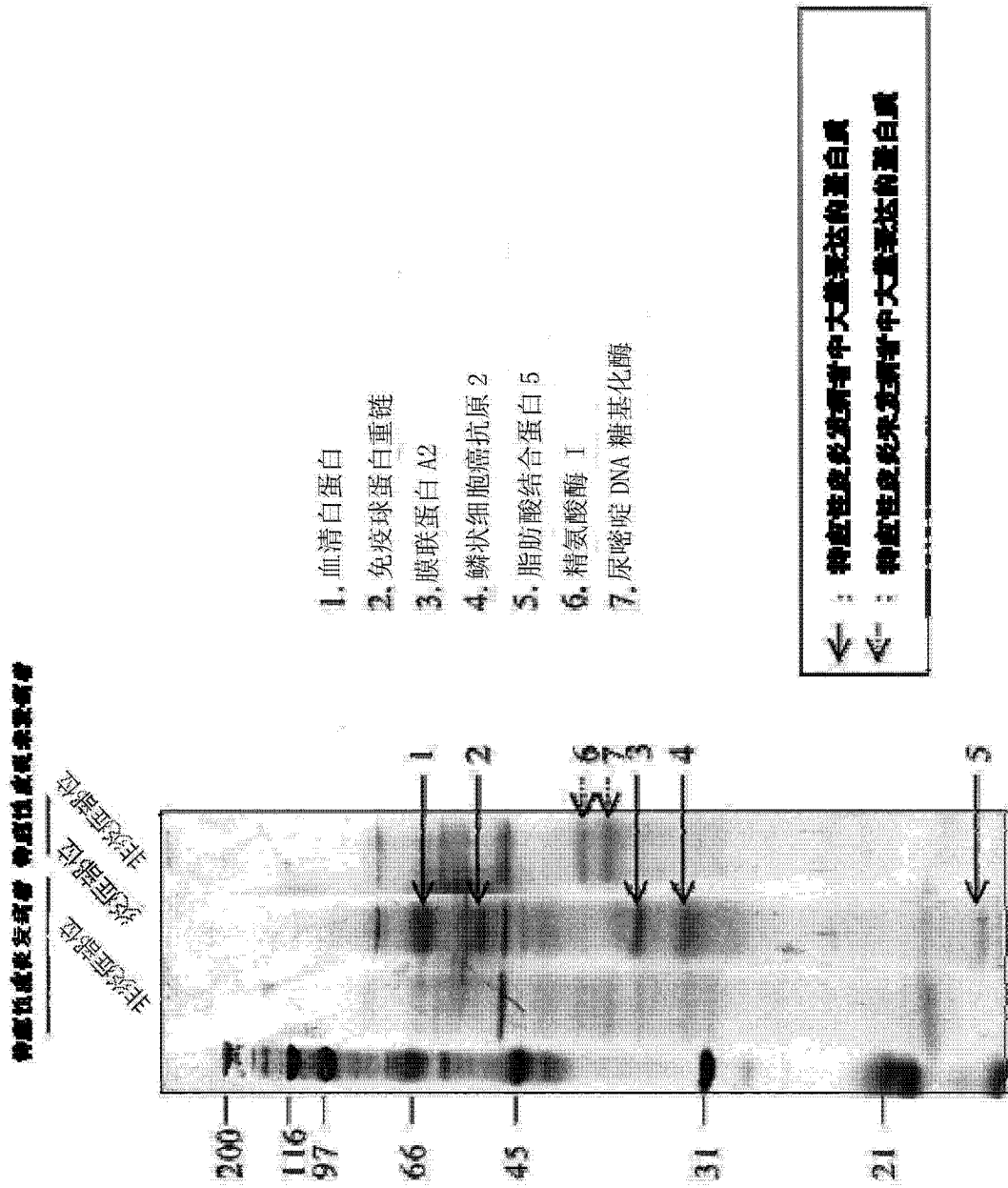


图 6

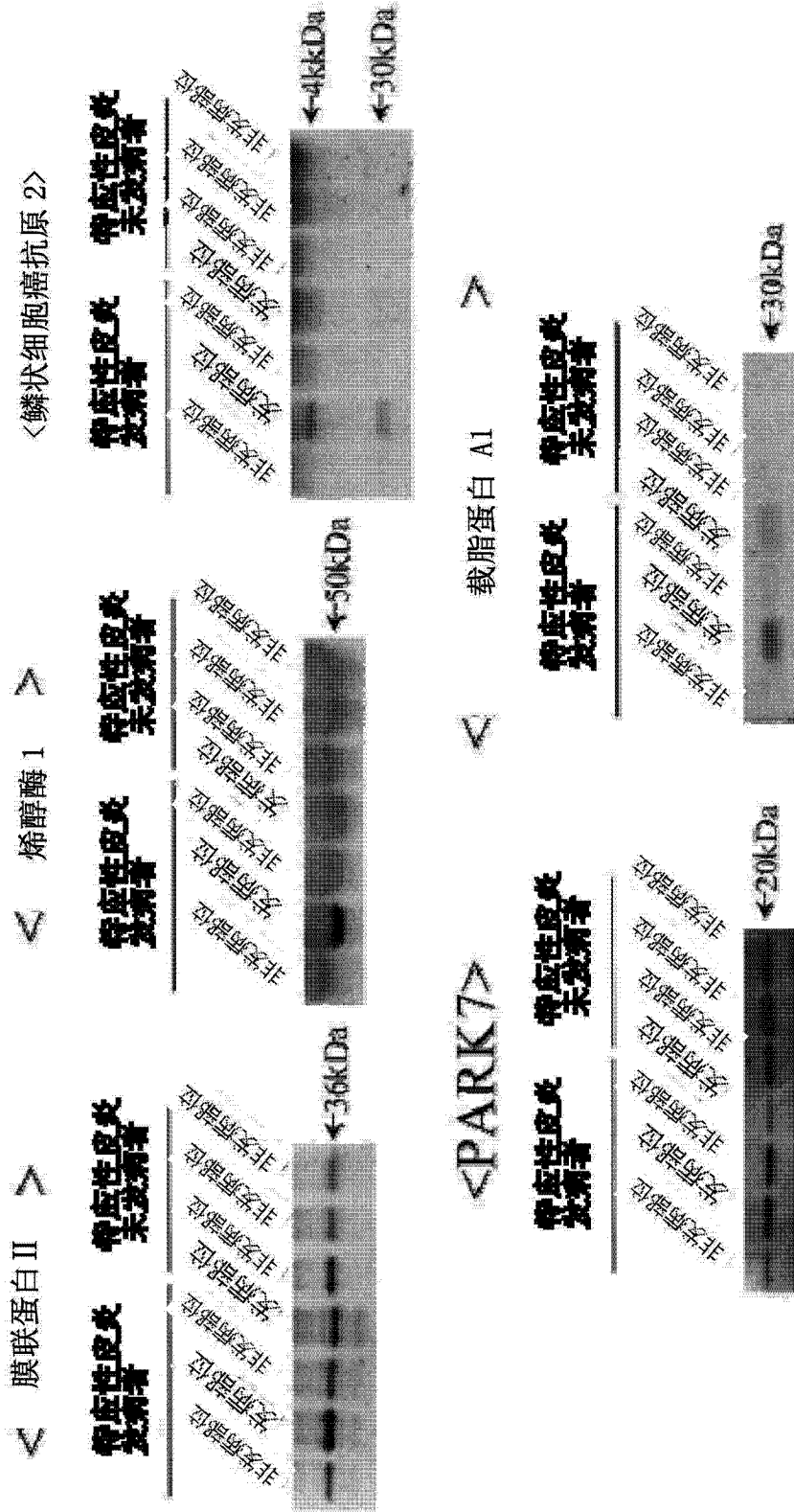


图 7

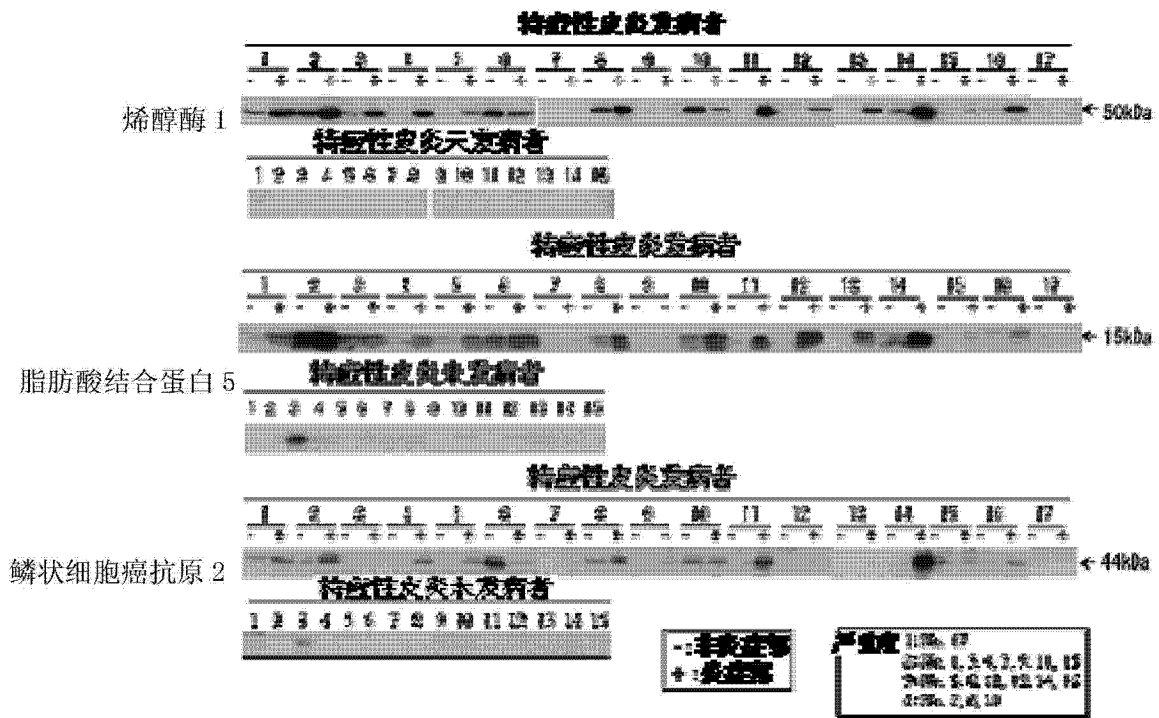


图 8(a)

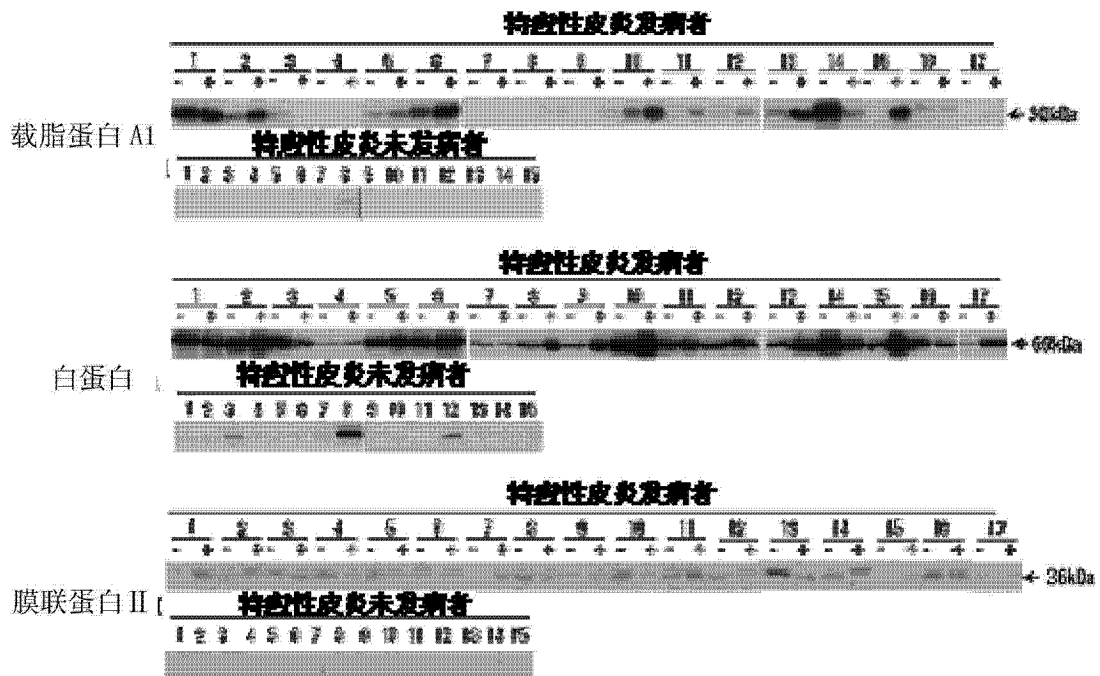


图 8(b)

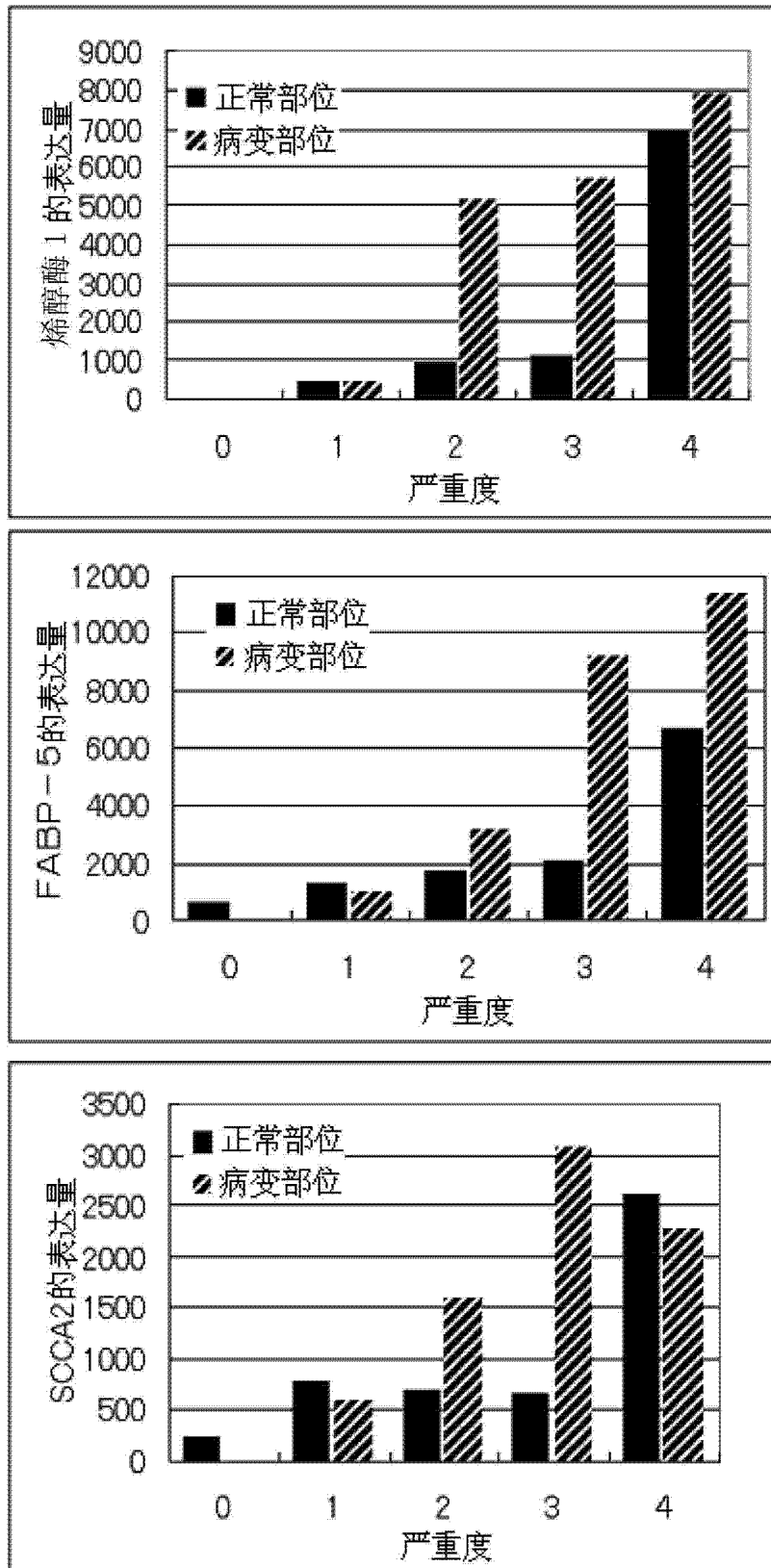


图 9(a)

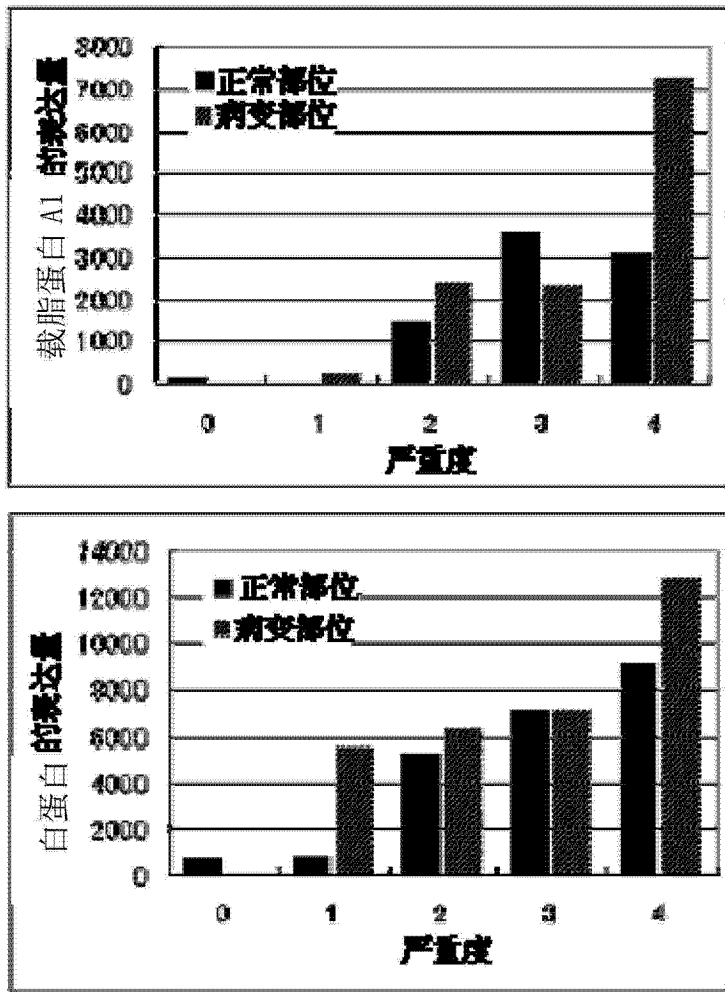


图 9(b)

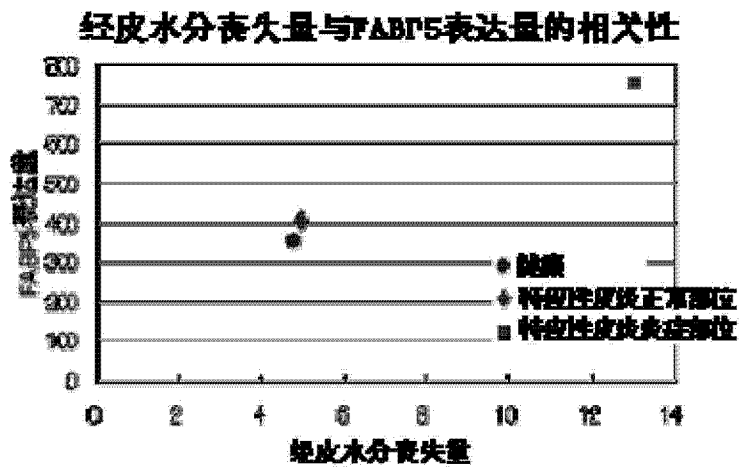


图 10(a)

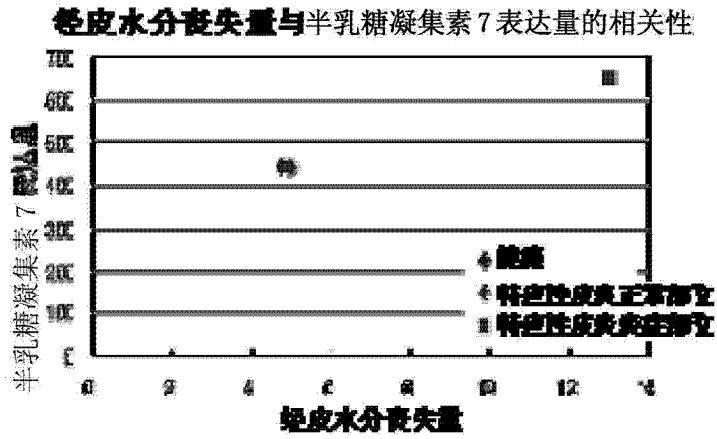


图 10(b)

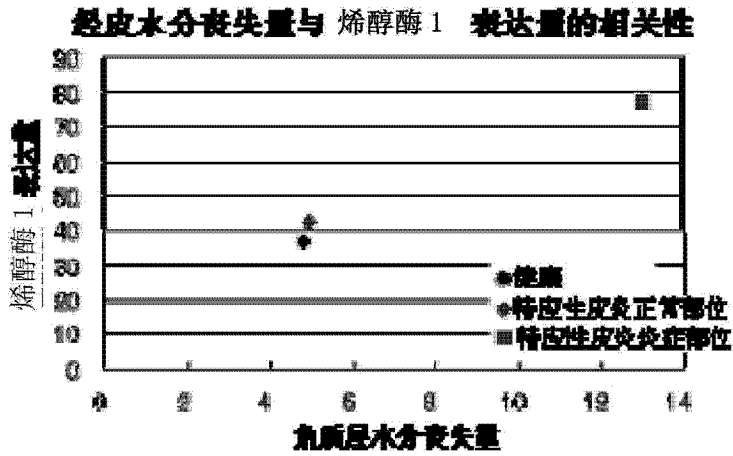


图 10(c)

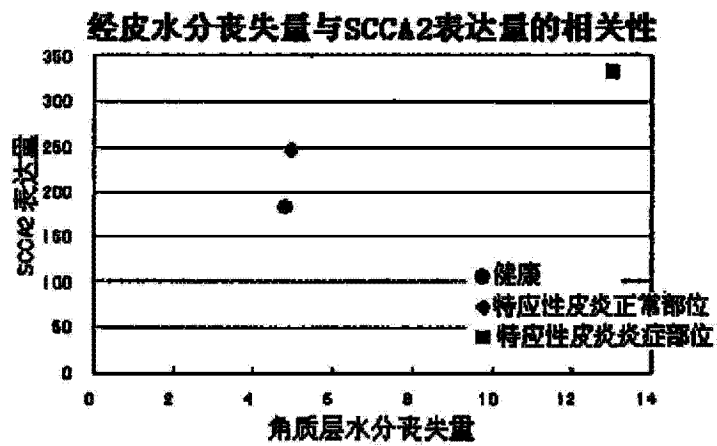


图 10(d)

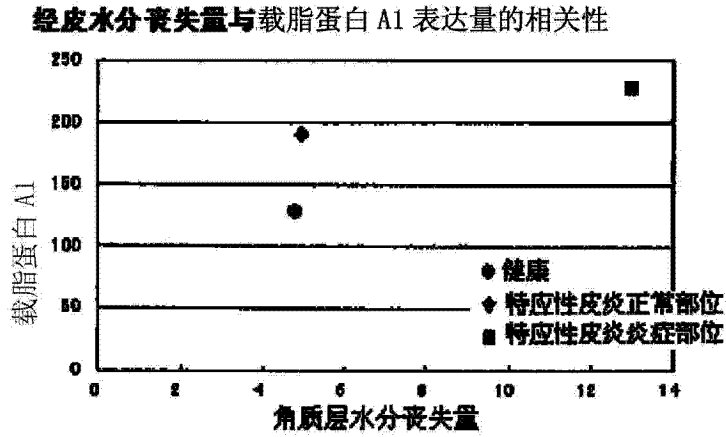


图 10(e)

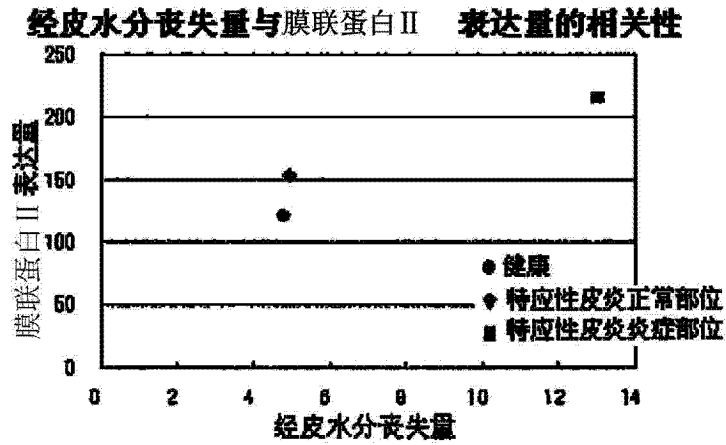


图 10(f)

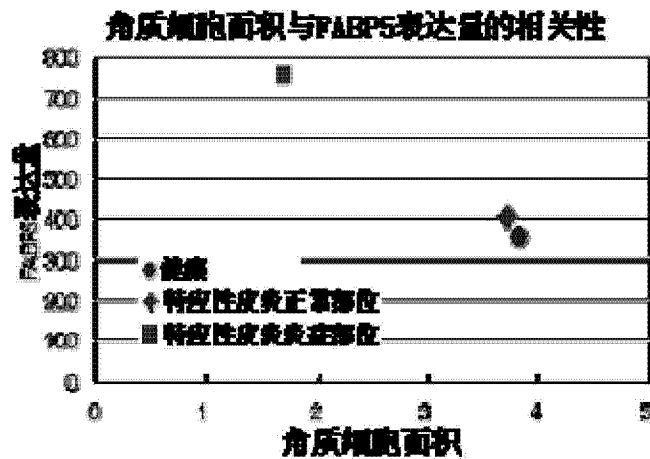


图 11(a)

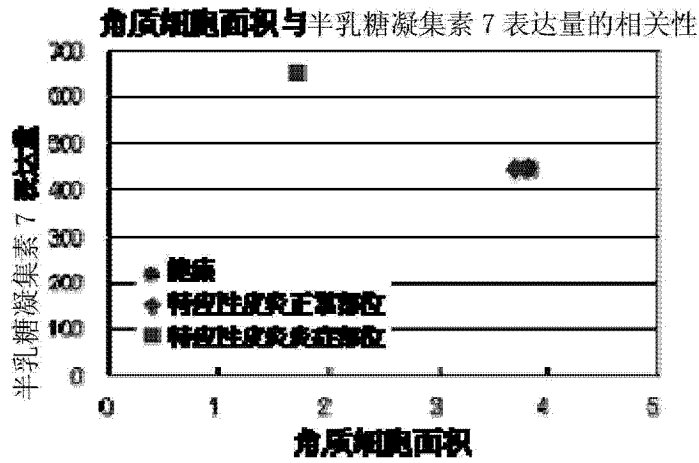


图 11(b)

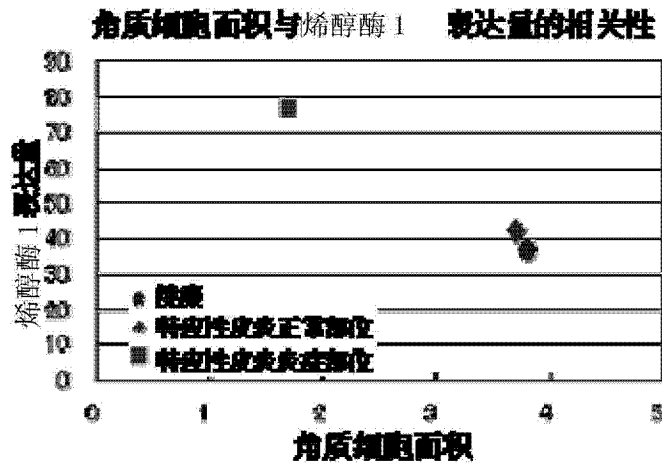


图 11(c)

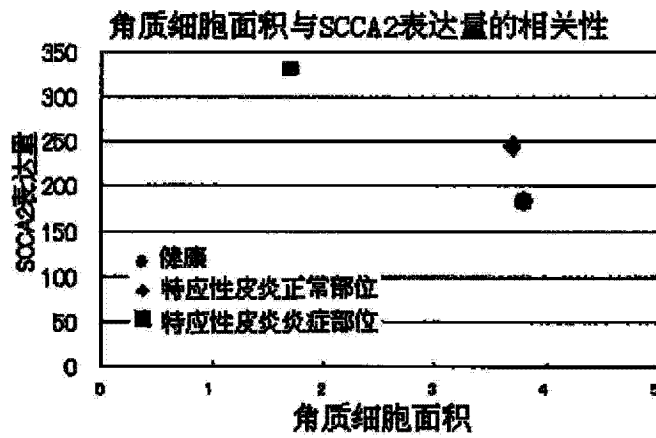


图 11(d)

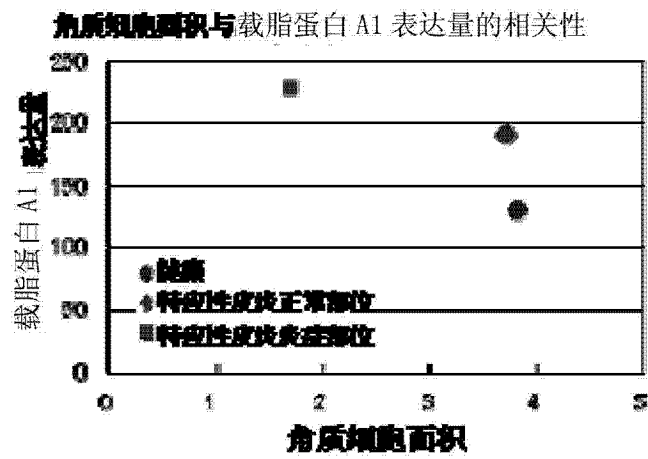


图 11(e)

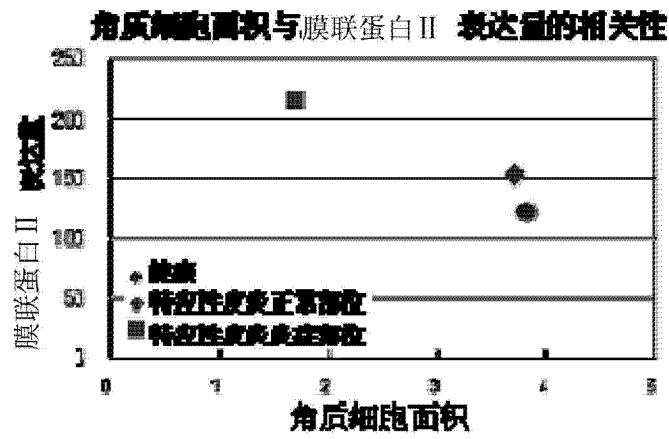


图 11(f)