

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791245

研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎とフィラグリン遺伝子のサイズ多型の関連の解明

研究課題名（英文） Copy number variation analysis of FLG in atopic dermatitis

研究代表者

乃村 俊史（NOMURA TOSHIFUMI）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：50399911

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎の重要な発症因子として知られるフィラグリン遺伝子には copy number variation が存在し、フィラグリン遺伝子のエクソン3は10-12個のほぼ相同な繰り返し配列を含んでいる。今回の研究では、アトピー性皮膚炎患者100名のDNAを用いてこの variation について解析し、copy number が10個、11個、12個のアレルの存在頻度を解明した。

研究成果の概要（英文）：The gene encoding filaggrin (FLG), whose mutations are well known as a predisposing factor for atopic dermatitis, has a copy number variation. The exon 3 of FLG consists of 10-12 highly homologous repeats. In this study, we analyzed the copy number variation using DNAs taken from 100 patients with atopic dermatitis and determined the frequency of each copy number.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎、フィラグリン

## 1. 研究開始当初の背景

フィラグリンは表皮のケラトヒアリン顆粒の重要な構成要素であり、表皮細胞の角化の過程で、角化細胞内を満たし、正常の角化、および、皮膚表面角層のバリア機能に非常に重要な役割を果たしている蛋白である（Nomura T et al, J Allergy Clin Immunol, 2007）。フィラグリンは、フィラグリン遺伝子によりコードされるプロフィラグリンを前駆蛋白とし、角化の終末段階で、脱リン酸化と蛋白分解によりプロフィラグリンからフィラグリンが生成される。フィラグリン遺伝子は、3つのエクソンから成っており、プロフィラグリンはすべてエクソン3にコードされている。このエクソンは、12.7

～14.7kb ととても大きいエクソンであることに加え、filaggrin repeat と呼ばれる、ほぼ相同な 972bp の繰り返し配列（プロフィラグリンが分解されてフィラグリンになる部分に相当する）を10-12個含む特殊な構造をしている（Nomura T et al, J Invest Dermatol, 2008）。

最近、我々は、AD患者の約30%がフィラグリン遺伝子にナンセンス変異やフレームシフト変異を有していることを示した（Nomura T et al, J Invest Dermatol, 2009）。これにより、フィラグリン遺伝子変異が日本人アトピー性皮膚炎の主要な病因であることが示され、表皮におけるフィラグリンの発現の減少により引き起こされる表皮バリア機能

の低下が AD 発症に重要な働きをしていることが明らかになったが、興味深いことに、それらフィラグリン遺伝子変異を持つ患者のほとんどが heterozygote であった。フィラグリン遺伝子変異の heterozygote では、変異を持つアレルからはフィラグリンは全く産生されず、正常なアレルからのみフィラグリンが産生されないため、正常なアレル上のフィラグリン遺伝子の繰り返し配列が 10 個の場合と 12 個の場合では、理論上、後者のほうが前者と比べて 20% 多くのフィラグリンが産生されることになり、後者は前者と比べて皮膚バリア機能が高く AD の重症度も低いという仮説を立てることが可能である。

## 2. 研究の目的

本研究では AD 患者のフィラグリン遺伝子のサイズ多型について解析することを目的とした。これにより、10-20%のフィラグリンの発現量の違いが AD の臨床症状に与える影響を解明することが可能になり、フィラグリンをターゲットにした AD の新しい治療法と予防法の確立につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

(1) フィラグリン遺伝子 repeat7-10 の増幅 AD 患者 100 名の DNA (200 アレル) について、次のプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動にて PCR 産物のサイズを決定した。Forward: 5' CCC AGG ACA AGC AGG AAC T 3' Reverse: 5' CTG CAC TAC CAT AGC TGC C 3' ( 94 ° C, 5 min) x 1; (94 ° C, 30 s; 63.5 ° C, 30 s; 72 ° C, 5 min 30 sec) x 35; (72 ° C, 7 min) x 1)。予想される PCR 産物のサイズは、6224bp、5249bp、4277bp であり、それぞれリピート数が 12 個、11 個、10 個に対応する。

(2) フィラグリン遺伝子 repeat10 の増幅 同様に、AD 患者 100 名の DNA (200 アレル) について、次のプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動にて PCR 産物のサイズを決定した。Forward: 5' GCC CAT GGG CGG ACC AGG A 3' Reverse: 5' CTG CAC TAC CAT AGC TGC C 3' ( 94 ° C, 5 min) x 1; (94 ° C, 30 s; 62 ° C, 30 s; 72 ° C, 1 min 30 sec) x 32; (72 ° C, 5 min) x 1)。

(3) フィラグリン遺伝子 repeat8 と repeat10 の数の決定

(1) (2) から repeat7-10、repeat10 のリピート数を決定し、そこから repeat8 の copy number を決定した。

## 4. 研究成果

(1) フィラグリン遺伝子 repeat7-10 を増幅したところ、リピート数が 10 個、11 個、12 個の頻度は、それぞれ 22%、49%、29%であった。

(2) repeat10 を 2 個持つ variant の頻度は 58%であった。

(3) repeat8 を 2 個持つ variant の頻度は 49%であった。

## 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 11 件)

1. Ito T, Fujita Y, Nomura T, Abe R, Shimizu H:  
Dermoscopy of pseudoxanthoma elasticum-like papillary dermal elastolysis.  
J Am Acad Dermatol (査読有), in press
2. McElroy SP, Nomura T, Torrie LS, Warbrick E, Gartner U, Wood G, McLean WHI:  
A lack of premature termination codon read through efficacy of PTC124 (Ataluren) in a diverse array of reporter assays.  
Plos Biol (査読有), in press
3. Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S, Kihara A:  
Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking the *Elovl1* gene responsible for very long-chain fatty acid production.

- The Molecular Cell Biology (査読有), in press
4. Nomura Y, Nomura T, Sakai K, Sasaki K, Ohguchi Y, Mizuno O, Hata H, Aoyagi S, Abe R, Itaya Y, Akiyama M, Shimizu H: A novel splice site mutation in NCSTN underlies a Japanese family with hidradenitis suppurativa. The British Journal of Dermatology (査読有) 168 巻、2013 年、206-209 頁。doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11174.x.
  5. Pohler E, Mamai O, Hirst J, Zamiri M, Horn H, Nomura T, Irvine AD, Moran BE, Wilson NJ, Smith FJD, Goh CSM, Sandilands A, Cole C, Barton GJ, Evans AT, Shimizu H, Akiyama M, Suehiro M, Konohana I, Shboul M, Teissier, Boussofara L, Denguezli M, Saad A, Gribaa M, Dopping-Hepenstal PJ, McGrath JA, Brown SJ, Goudie DR, Reversade B, Munro CS, McLean WHI. Haploinsufficiency for AAGAB causes clinically heterogeneous forms of punctate palmoplantar keratoderma. Nature Genetics (査読有) 44 巻、2012 年、1272-1276 頁。doi: 10.1038/ng.2444.
  6. Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M, Kitagawa Y, Shimizu H. Type VII Collagen Deficiency Causes Defective Tooth Enamel Formation due to Poor Differentiation of Ameloblasts. The American Journal of Pathology (査読有) 181 巻、2012 年、1659-1671 頁。doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.018.
  7. Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe J, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y: A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: possible immunological state of the intrinsic type. The Journal of Dermatological Science (査読有) 67 巻、2012 年、37-43 頁。doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.04.004.
  8. Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natusuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R, Akiyama M, Shimizu H: The  $\beta 9$  Loop Domain of PA-PLA(1)  $\alpha$  Has a Crucial Role in Autosomal Recessive Woolly Hair/Hypotrichosis. The Journal of Investive Dermatology (査読有) 132 巻、2012 年、2093-5 頁。doi: 10.1038/jid.2012.96.
  9. Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Ujiie H, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H. Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapsone. The European Journal of Dermatology (査読有) 22 巻、2012 年、282-3 頁。doi: 10.1684/ejd.2012.1662.
  10. 乃村俊史: アトピー性皮膚炎とフィラグリン。アレルギーの臨床 (査読有)、41 巻、2011 年、751-757 頁。
  11. 大口由香, 乃村俊史, 清水 宏: 遺伝性角化症, 表皮水疱症。周産期医学 (査読有)、41 巻、2011 年、751-757 頁。
- [学会発表] (計 16 件)
1. 乃村俊史 皮膚バリア障害と皮膚疾患: 特にアトピー性皮膚炎について 学術講演会, 2013. 3. 1, 北海道ホテル (帯広).
  2. Pohler E, Nomura T, Akiyama M, Suehiro M, Shimizu H, Mamai O, Zamiri M, Horn H, Irvine AD, Hirst J, Robinson MS, McGrath JA, Munro CS, McLean WHI:

- Mutations in the AAGAB gene, encoding alpha- and gamma-adaptin binding protein p34, cause punctate palmoplantar keratoderma type 1.  
The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012.12.8, ロワジュールホテル&スパタワー那覇(沖縄).
3. Suzuki S, Nomura T, Umemoto H, Akiyama M, Shimizu H:  
A novel frameshift mutation in the V2 domain of KRT1 causes ichthyosis hystrix Curth-Macklin and may alter keratin organization.  
The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012.12.8, ロワジュールホテル&スパタワー那覇(沖縄).
  4. 乃村俊史  
アトピー性皮膚炎 Up-to-date  
第101回釧路皮膚科医会, 2012.7.21, ふく井ホテル(帯広).
  5. 乃村俊史, Gartner U, McElroy S, Torrie L, Pourreyron C, South A, Wood G, Woodland A, Frearson J, Wyatt P, McLean WHI:  
新規リードスルー治療薬の開発.  
第388回日本皮膚科学会北海道地方会, 2011.12.17, 札幌医科大学(札幌).
  6. Arita K, Nomura T, Nomura Y, Ota M, Shimizu H:  
7q22.1 as a possible gene locus of Michelin tire baby syndrome.  
The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.10, 国立国際京都都会館(京都).
  7. Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Nishie W, Shinkuma S, Ito K, Sawamura D, Uitto J, Kitagawa Y, Shimizu H:  
Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poorly differentiated ameloblasts.  
The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.10, 国立国際京都都会館(京都).
  8. Shinkuma S, Nishie W, Inoue A, Aoki J, Ujiie H, Nomura T, Abe R, Akiyama M, Shimizu H:  
A novel mutation in the  $\beta 9$  loop domain leads to abolition of enzyme activity of PA-PLA1 $\alpha$  in autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis.  
The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.10, 国立国際京都都会館(京都).
  9. Ohguchi Y, Nomura T, Miyamura Y, Ono N, Kosuge H, Okamoto H, McLean W, Akiyama M, Shimizu H:  
Prevalent and rare filaggrin gene mutations in the Japanese population.  
The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.10, 国立国際京都都会館(京都).
  10. Nomura Y, Nomura T, Sakai K, Mizuno O, Hata H, Aoyagi S, Abe R, Itaya Y, Akiyama M, Shimizu H:  
A novel NCSTN gene mutation causing familial acne inversa in a Japanese family.  
The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.10, 国立国際京都都会館(京都).
  11. Nomura T:  
Filaggrin as a novel therapeutic target for atopic dermatitis.  
The 11<sup>th</sup> Annual Meeting of Korean Atopic Dermatitis Association, 2011.11.12, Seoul National University (Korea).
  12. Nomura T:  
Recent advances in skin barrier research.

2011 Regular Seminar of Research  
Institute for Biomedical and  
Pharmaceutical Sciences: Molecular  
Approach in Skin Diseases and Allergy,  
2011.11.11, Chung-Ang University  
(Korea).

13. Nomura Y, Nomura T, Sakai K, Mizuno O,  
Hata H, Aoyagi S, Abe R, Itaya Y,  
Akiyama M, Shimizu H:  
A novel splice site mutation in NCSTN  
underlies familial acne inversa in a  
Japanese family.  
The 41st Annual Meeting of the  
European Society for Dermatological  
Research, 2011.9.8, Barcelona  
International Convention Centre  
(Spain).
14. 乃村俊史:  
(講演) アトピー性皮膚炎と蕁麻疹へ最  
近の話題も含めてへ。  
札幌市西区プライマリーケア勉強  
会, 2011.7.16, ノボテル札幌(札幌市)。
15. Nomura T, Shimizu H:  
Atopic dermatitis and filaggrin gene  
mutations.  
The 22nd World Congress of Dermatology,  
2011.5.24, COEX (Korea).
16. Nomura T, Gartner U, McElroy S, Torrie  
L, Pouretyron C, South AP, Wood G,  
Woodland A, Frearson J, Wyatt P,  
McLean WHI:  
Developing small molecule drugs to  
rescue nonsense mutations in  
disease-causing genes.  
The 71st annual meeting of the Society  
for Investigative Dermatology,  
2011.5.5, JW Marriott Desert Ridge  
Resort and Spa (USA).

[図書] (計1件)

1. 乃村俊史:  
皮膚疾患と遺伝／総論。  
医学書院、今日の皮膚疾患治療指針第4  
版、2012年、971-974頁。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

乃村 俊史 (NOMURA TOSHIFUMI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号: 50399911

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし