

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19531

研究課題名(和文) アレルギー性皮膚疾患の発症基盤の解明

研究課題名(英文) Pathomechanisms underlying allergic skin diseases

研究代表者

乃村 俊史(Nomura, Toshifumi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50399911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の一部はフィラグリン遺伝子変異により発症するが、変異がフィラグリンの発現低下を引き起こす機序については未解明の点も多い。これは、フィラグリン遺伝子の既報告変異(ナンセンス変異またはフレームシフト変異)がすべてフィラグリン遺伝子の最後のエキソンに存在し、nonsense-mediated mRNA decay(NMD)を回避すると考えられている。本研究により、変異フィラグリンmRNAがNMDにより分解されている可能性が示唆されたが、今後さらに症例数を増やして解析を進める必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フィラグリン遺伝子変異は、日本人や英国人の約10%が保有していることが知られており、皮膚バリアの破綻がアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の重要な発症因子であることが知られている。そのため、変異によるフィラグリン発現低下機構の詳細を明らかにすることは、アレルギー疾患の治療のみならず予防につながる可能性を秘めており、罹患患者数が減少すれば社会的観点のみならず医療経済の観点からも極めて意義深いと思われる。

研究成果の概要(英文)：Loss-of-function mutations in the filaggrin gene (FLG) are a well known predisposing factor to atopic dermatitis. However, the precise mechanisms how the FLG mutations lead to reduced expression of FLG in the epidermis remain unknown, because all previously reported FLG mutations are located in the last exon of the gene and therefore mutant FLG mRNA is presumably degraded by nonsense-mediated mRNA decay (NMD). In this study, we demonstrated that mutant FLG mRNA may be degraded by NMD. Further studies are warranted to confirm this preliminary finding.

研究分野：皮膚科学

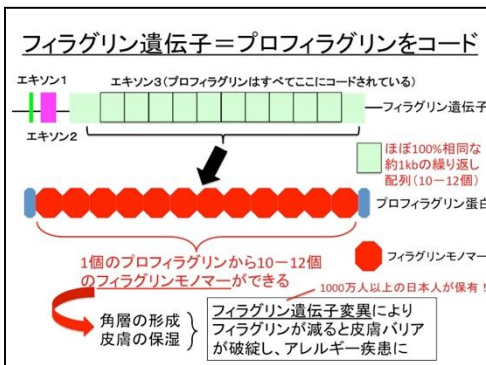
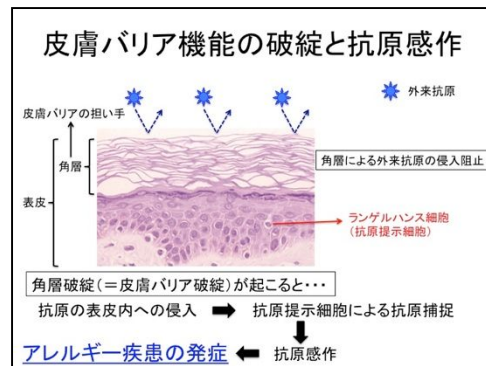
キーワード：アトピー性皮膚炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚の最外層に位置する角層は皮膚バリア機能の要である。角層の破綻は種々の抗原の皮膚内部への侵入を許し、抗原感作(経皮感作)とアレルギー疾患発症を引き起こす。事実、角層形成に必須のタンパク質であるフィラグリンが遺伝子変異により先天的に減少すると、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を発症しやすい<sup>1</sup>。フィラグリン遺伝子(*FLG*)がコードするプロフィラグリンはフィラグリンの前駆タンパク質で、フィラグリンが10-12個直列にリンカーペプチドを介して並んだ構造をしている。プロフィラグリン自体は生理活性を示さないが、そのリンカー部分で切断されて産生されるフィラグリンは角層の形成や保湿など多彩な生理機能を発揮する。*FLG*の機能喪失変異は人口の約10%が保有している<sup>2,3</sup>。

(2) 通常、ナンセンス変異やフレームシフト変異により早期終止コドン(premature termination codon; PTC)ができると、変異 mRNA は nonsense-mediated mRNA decay (NMD) という機構で分解されるため、PTCを持つ変異 mRNA からタンパク質は産生されない。しかし例外的に、PTCをきたす変異が遺伝子の最後のエクソンに存在すると、ほとんどの場合 NMD を回避することが知られている。興味深いことに、*FLG* 変異はすべて最後のエクソンに存在するため、理論上は変異フィラグリン mRNA が患者皮膚に豊富に存在し、中途半端なプロフィラグリンが多量に産生されるはずである。しかし、*FLG* 変異をより上流に持つ個体と下流に持つ個体の間に重症度の差異は特に報告されていない<sup>4,5</sup>。



### 2. 研究の目的

(1) 以上の背景から、どの *FLG* 変異も同じ病原性を持つこと、すなわち、どの変異もフィラグリンの発現低下を同程度きたすことが予想されたので、*FLG* の3'側の PTC をきたす変異を持つ患者でもプロフィラグリン発現が顕著に低下するかどうかを検証する。

(2) 患者におけるフィラグリンの減少が、従来の仮説とは異なり、変異フィラグリン mRNA 分解が原因である可能性、すなわち、変異フィラグリン mRNA が NMD により分解されている可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

(1) *FLG* 変異を持つ患者から得た皮膚生検検体を組織学的に解析し、プロフィラグリンの発現量(=ケラトヒアリン顆粒の発現量)を健常人検体と比較した。

(2) *FLG* は構造的に巨大な遺伝子であり(エクソン3だけでも12,000塩基以上)、クローニングが困難であったため、*FLG* 変異を持つ患者から表皮を採取し、そこからヒトパピローマウイルス遺伝子導入を用いて不死化表皮角化細胞の樹立を行った。その後、患者由来不死化表皮角化細胞を用いて、NMDに必須の因子である UPF1 を siRNA によりノックダウンし、フィラグリン mRNA の定量を行った。

### 4. 研究成果

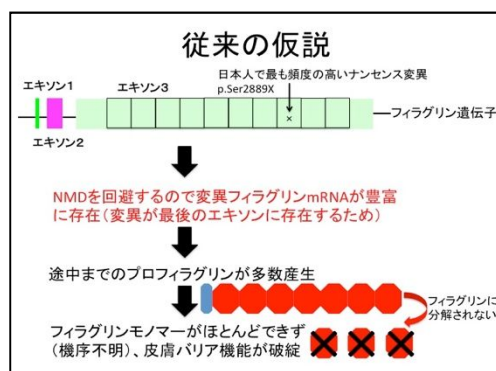
(1) *FLG* の3'側にナンセンス変異をbiallelicに保有する患者皮膚を観察したところ、いずれのサンプルでもケラトヒアリン顆粒が著明に減少しており、プロフィラグリンの形成不全の存在が確認された。

(2) *FLG* 変異を持つ患者からの不死化表皮角化細胞株の樹立に難渋したが、1名の患者からのみ成功し、NMDが起きていることを確認した。しかし、n=1での観察結果であることから、さらに複数の患者サンプルから不死化細胞株を樹立し、評価する必要がある。

(3) NMDはexon-exon junction complex (EJC<sup>\*</sup>; 下の注釈を参照)依存性NMD(=最後のエクソン以外にPTCを持つ変異mRNAが分解される機構)とEJC非依存性NMDに分けられるが、すべての*FLG*変異は最後のエクソンに存在するため、EJC依存性NMDは起こらない。従って、変異フィラグリン mRNA が分解される機構はヒトでほとんど報告のないEJC非依存性NMDと予想された。今後、さらなる分子機構の解明が必要である。

\*注釈：EJCとは、スプライシングによりエキソンが連結され mRNA ができる際にエキソンとエキソンの連結部位近傍に付けられる目印のことである。この目印を用いて、リボソームは PTC が最後のエキソンに存在するか否かを判断する。

(4) 本研究により、従来の仮説(右図)とは異なり、患者でのフィラグリン発現低下が、変異フィラグリン mRNA の分解による可能性が示唆されたが、解析数が少なく、変異間での比較ができていないため、今後のさらなる検討が必要である。



#### <引用文献>

1. Irvine AD, et al. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 265: 1315-1327, 2011.
2. Kono M, et al. Comprehensive screening for a complete set of Japanese population specific filaggrin gene mutations. *Allergy* 69: 537-540 2014.
3. Ait Bamai Y, et al. Association of filaggrin gene mutations and childhood eczema and wheeze with phthalates and phosphorus flame retardants in house dust: The Hokkaido study on Environment and Children's Health. *Environ Int* 121: 102-110, 2018.
4. Nomura T, et al. Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 119: 434-440, 2007.
5. Nomura T, et al. Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly predispose to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 128: 1436-1441, 2008.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Ohguchi Yuka, Nomura Toshifumi, Suzuki Shotaro, Takeda Masae, Miyauchi Toshinari, Mizuno Osamu, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Nemoto Osamu, Ono Kota, McLean W.H. Irwin, Shimizu Hiroshi | 4. 巻<br>138               |
| 2. 論文標題<br>Gentamicin-Induced Readthrough and Nonsense-Mediated mRNA Decay of SERPINB7 Nonsense Mutant Transcripts   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Investigative Dermatology   | 6. 最初と最後の頁<br>836 ~ 843   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jid.2017.10.014  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Kono M., Akiyama M., Inoue Y., Nomura T., Hata A., Okamoto Y., Takeichi T., Muro Y., McLean W.H.I., Shimizu H., Sugiura K., Suzuki Y., Shimojo N.  | 4. 巻<br>179               |
| 2. 論文標題<br>Filaggrin gene mutations may influence the persistence of food allergies in Japanese primary school children  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>British Journal of Dermatology   | 6. 最初と最後の頁<br>190 ~ 191   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/bjd.16375  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Natsuga Ken, Nomura Toshifumi, Hida Tokimasa, Ishikawa Shuku, Nakamura Hideki, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi                              | 4. 巻<br>45                |
| 2. 論文標題<br>Novel COL7A1 mutation in a family with bullous dermolysis of the newborn: Phenotypic variability associated with a COL7A1 mutation within the same family                                   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Dermatology   | 6. 最初と最後の頁<br>e260 ~ e261 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/1346-8138.14287  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Mai Y., Nishie W., Izumi K., Yoshimoto N., Morita Y., Watanabe M., Toyonaga E., Ujiie H., Iwata H., Fujita Y., Nomura T., Sato-Matsumura K.C., Shimizu S., Shimizu H.                        | 4. 巻<br>179               |
| 2. 論文標題<br>Detection of anti-BP180 NC16A autoantibodies after the onset of dipeptidyl peptidase-IV inhibitor-associated bullous pemphigoid: a report of three patients                                 | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>British Journal of Dermatology   | 6. 最初と最後の頁<br>790 ~ 791   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/bjd.16656  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakayama Chihiro, Fujita Yasuyuki, Matsumura Wakana, Ujiie Inkin, Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Nomura Toshifumi, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi | 4. 巻<br>91              |
| 2. 論文標題<br>The development of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem/stromal cells from normal human and RDEB epidermal keratinocytes         | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Dermatological Science   | 6. 最初と最後の頁<br>301 ~ 310 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jdermsci.2018.06.004  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ait Bamai Yu, Araki Atsuko, Nomura Toshifumi, Kawai Toshio, Tsuboi Tazuru, Kobayashi Sumitaka, Miyashita Chihiro, Takeda Masae, Shimizu Hiroshi, Kishi Reiko                                    | 4. 巻<br>121             |
| 2. 論文標題<br>Association of filaggrin gene mutations and childhood eczema and wheeze with phthalates and phosphorus flame retardants in house dust: The Hokkaido study on Environment and Children's Health | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Environment International   | 6. 最初と最後の頁<br>102 ~ 110 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.envint.2018.08.046  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kamaguchi Mayumi, Iwata Hiroaki, Miyauchi Toshinari, Ujiie Hideyuki, Ujiie Inkin, Nomura Toshifumi, Ohga Noritaka, Shimizu Hiroshi, Kitagawa Yoshimasa | 4. 巻<br>48            |
| 2. 論文標題<br>The identification of autoantigens in mucous membrane pemphigoid using immortalized oral mucosal keratinocytes  | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Oral Pathology & Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>60 ~ 67 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jop.12780  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Takeda Masae, Nomura Toshifumi, Sugiyama Takato, Miyauchi Toshinari, Suzuki Shotaro, Fujita Yasuyuki, Shimizu Hiroshi    | 4. 巻<br>45                |
| 2. 論文標題<br>Compound heterozygous missense mutations p.Leu207Pro and p.Tyr544Cys in TGM1 cause a severe form of lamellar ichthyosis | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Dermatology   | 6. 最初と最後の頁<br>1463 ~ 1467 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/1346-8138.14675  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Nomura T., Takeda M., Peh J.T., Miyauchi T., Suzuki S., Fujita Y., Uesugi T., Shimizu H. | 4. 巻<br>33                |
| 2. 論文標題<br>Loss-of-function mutation in DSG1 underlies focal palmoplantar keratoderma              | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology                           | 6. 最初と最後の頁<br>e137 ~ e138 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jdv.15349  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名<br>Suzuki Shotaro, Nomura Toshifumi, Miyauchi Toshinari, Takeda Masae, Fujita Yasuyuki, Nishie Wataru, Akiyama Masashi, Ishida-Yamamoto Akemi, Shimizu Hiroshi | 4. 巻<br>2                |
| 2. 論文標題<br>Somatic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma   | 5. 発行年<br>2019年          |
| 3. 雑誌名<br>Life Science Alliance   | 6. 最初と最後の頁<br>e201800284 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.26508/lsa.201800284  | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>乃村俊史                       |
| 2. 発表標題<br>皮膚バリア異常とアトピー性皮膚炎、魚鱗癬。      |
| 3. 学会等名<br>第82回日本皮膚科学会東部支部学術大会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2018年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Nomura T, Takeda M, Miyauchi T, Suzuki S, Peh JT, Uesugi T, Shimizu H |
| 2. 発表標題<br>Novel DSG1 mutation in focal palmoplantar keratoderma                 |
| 3. 学会等名<br>The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2018 (国際学会)     |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>乃村俊史                      |
| 2. 発表標題<br>アトピー性皮膚炎治療における皮膚バリアケア     |
| 3. 学会等名<br>第70回日本皮膚科学会中部支部学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 6. 研究組織 |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
|         | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|         |                           |                       |    |