

平成 21 年 4 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2007-2008  
課題番号：19591324  
研究課題名(和文)  
日本人アトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子異常の解析  
研究課題名(英文)  
Mutation analysis of filaggrin gene in Japanese patients with atopic dermatitis  
研究代表者 深井 和吉(FUKAI KAZUYOSHI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：20244642

## 研究成果の概要：

日本人アトピー性皮膚炎の患者について、フィラグリン遺伝子変異解析を行い、新しく4種類のナンセンス変異を同定した。それらは **Q835X** (2503C>T), possibly **Q3122X** (9364C>T), **R1998X** (5992A>T), probably **G2200X** (6598G>T)であった。日本人アトピー性皮膚炎患者において、フィラグリン遺伝子変異は高頻度(26%)に見られることが明らかとなった。今回の研究により、フィラグリンは日本人アトピー性皮膚炎患者の原因遺伝子として、極めて重要なものであることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎、フィラグリン、魚鱗癬

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎にまつわる医療の混乱は、日本皮膚科学会の努力によって収束しつつあるように見えるものの、依然としてステロイドを忌避する *steroidphobia* は根強く存在しており、一旦刷り込まれた誤解を解くことは容易ではありません。皮膚科医は

アトピー性皮膚炎の本態を究明し、それを治療に還元していく方向で努力するべきであると考えます。アトピー性皮膚炎の本質を解明する努力の方向性として、その遺伝的背景を明らかにすることは、「アトピー」が「奇妙な」という言葉で語られる曖

味さを払拭することのできる、最も有効な方法論であると考えています。

私は 1994-1996 年にウィスコンシン大学の遺伝学教室に留学し、分子生物学の手技と分子遺伝学に必要な統計学をマスターしました。Hermasky-Pudlak 症候群の遺伝子マッピングに成功し、また引き続いてポジショナルクローニングにも成功しました。また、Chekiak-Higashi 症候群の遺伝子マッピングにも成功、常染色体劣性遺伝の眼白皮症の原因も突き止め、*Nature Genetics* 2 編、*Human Molecular Genetics* 2 編、*Am J Hum Genet* 2 編など一流の学術雑誌に成果を発表することができました。日本に帰国した際に、アトピー性皮膚炎の臨床が非常に混乱していることにショックを受けました。特にステロイド外用剤の副作用を忌避する患者が多く、患者が混乱しているだけでなく、少なからず皮膚科医のサイドにも混乱が見られたことには驚きました。このような状況を打開するには、「アトピー性皮膚炎とは何か」という基本的な問いに答えることが肝要であると考え、1996 年よりアトピー性皮膚炎の遺伝を研究することにいたしました。

まず、はじめに研究を行ったのは *Interleukin-4 receptor* で、1997 年に *New Engl J Med* にコード領域の多型がアトピー性皮膚炎と相関すると報告されました。日本人アトピー性皮膚炎でも同じ多型が相関するのかを検討し、日本人成人アトピーでも相関していることを報告致しました (Oiso N et al. *Br J Dermatol* 2000)。さらに、*Interleukin-4 receptor* のプロモーター領域を検討し、新しく多型を 6 つ発見し、それらの多型がアトピー性皮膚炎と相関することを発表しました (Hosomi N et al. *J Invest Dermatol* 2004)。また、これ

らの多型は、乾癬患者においては、アトピー性皮膚炎とは逆のパターンで相関することを見いだしました (Fukai K et al. *J Dermatol Sci* 2004)。

次に、Netherton 症候群の原因遺伝子 *SPINK5* がクローニングされ、その E420K 多型がイギリス人での普通にみられるアトピー性皮膚炎と相関することが報告されました。日本人でのアトピー性皮膚炎ではどのようになっているかを検討するために、日本人における *SPINK5* 遺伝子のエクソン 13 と 14 及びその隣接するイントロン配列を詳細に検討し、E420K のみならず、新しく発見した多型も日本人アトピー性皮膚炎と相関することを見出しました (Kato A et al. *Br J Dermatol* 2003)。Netherton 症候群はきわめてまれな疾患ではあるものの、その多型はありふれたもので、アトピー性皮膚炎と相関することは、セリンプロテアーゼがアトピー性皮膚炎と関連することを示しており、アトピー性皮膚炎の病態を考えると、外来性の酵素、すなわち細菌、花粉、カビ、ダニなどが持っているセリンプロテアーゼが皮膚炎を悪化させている要因であることを示すものです。

ゲノムスキャンとよばれる手法は、染色体のどのあたりに多因子遺伝の疾患感受性遺伝子が存在するのかを、客観的に知るよい手段です。これまでにアトピー性皮膚炎に関して 4 つのゲノムスキャンが行われ、1q21 16p 17q25 20p の 4 カ所にアトピー性皮膚炎疾患感受性遺伝子座があることがわかってきています。おどろくべきことにこれらの場所は先に解析が進んでいた尋常性乾癬の遺伝子座とオーバーラップするもので、アトピー性皮膚炎と、乾癬の遺伝子は共通したものである可能性が高く

なってきました。17q25 に存在する RUNX1 結合部位の多型が乾癬と関連するという報告がありましたので、日本人アトピー性皮膚炎と関連するかどうかを検討致しました。しかし、結果として、関連はみられないことがわかりました(Hosomi N et al. Clin Exp Dermatol 2005)。

ゲノムスキャンで同定された 1q21 という場所には、皮膚の角化に関連した遺伝子が数十個集まって存在します。そのうちの一つであるフィラグリンは、以前より尋常性魚鱗癬で発現が低下していることが知られており、原因遺伝子であることが推測されていました。スコットランドの McLean らのグループが、今年 3 月に尋常性魚鱗癬がフィラグリン遺伝子の病的変異で生じることを証明しました。さらに同じ病的変異が、アトピー性皮膚炎患者に普通に認められることを Nature Genetics に発表しました。これらの 2 つの病的変異は、白人にのみ認められ、モンゴロイドや黒人には認められないと書いています。そこで、私は日本人アトピー性皮膚炎患者における、フィラグリン遺伝子の変異解析を行うことにいたしました。

## 2. 研究の目的

日本人アトピー性皮膚炎患者における、フィラグリン遺伝子の変異を網羅的に解析

## 3. 研究の方法

アトピー性皮膚炎患者ゲノム遺伝子よりエクソン 3 繰り返し配列のシーケンス

エクソン 3 は大きさが 10 キロ塩基ほどあるので、全体を一度に増幅することができません。部分的に分解して増幅することを通常では行うこととなりますが、10 回以上の繰り返し配列があるために、部分的 PCR 増幅は不可能です。したがって、972 塩基の繰り返し配列そのものを、PCR で増

幅し、それを TA-cloning vector にクローニングし、おのおののクローンをシーケンスいたしました。

具体的には、繰り返し配列の両端 20 塩基をプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを合成しました。

FLGrepF

5'-TCCTCTACCAGGTGAGCACTCA-3'

FLGrepR

5'-AGACCCTGAACGTCCAGACCTT-3'

アトピー性皮膚炎患者のゲノム遺伝子を template として、proof reading 活性の高い酵素である、platinum Taq high-fidelity DNA polymerase を使用して、PCR を行いました。アガロースゲルに流して、バンドをカットし、それを GFX PCR DNA & Gel Band purification Kit (Amersham Biosciences) を用いて、PCR product を精製した。精製したプロダクトを TA-cloning vector にクローニングした。得られたクローンを、一検体につき 36 クローンについて、Qiagen Plasmid Mini Kit を用いて mini-preparation を行いました。Plasmid DNA を template として、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用い、シーケンス反応を行いました。反応産物は、310 キャピラリーシーケンサーに流して、塩基配列を解読しました。長い配列を読む (600 塩基) ように、シーケンサーを設定し、TA-cloning vector の M13-forward primer および M13-reverse primer により、972 塩基のすべてを前から後ろから解読しました。得られた塩基配列は、DNASTAR 遺伝子解析ソフトで alignment を行い、前から読んだ配列と後ろから読んだ配列を、一本化しました。一本化した配列は同じソフトを使用して、コ

ンピューター上で翻訳し、ナンセンス変異や、挿入変異、欠失変異がないかを確認しました。一本化されたシーケンスを、データベース上のフィラグリン遺伝子配列とアラインメントを解析ソフトにて行い、何番目の繰り返し配列に相当するかを確認した。

#### 4. 研究成果

アトピー性皮膚炎の患者について、エクソン3の繰り返し配列部分について解析を行い、新しく4種類のナンセンス変異をみとめた。それらは Q835X (2503C>T), possibly Q3122X (9364C>T), R1998X (5992A>T), probably G2200X (6598G>T)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9件、すべて査読あり)

1: Umekoji A, Fukai K, Hosomi N, Ishii M, Tanaka A, Murakami K, Kamoi H, Mizoguchi M, Utani A.

Vascular type of Ehlers-Danlos syndrome associated with mild haemophilia A. Clin Exp Dermatol. 2009 Jan;34(1):101.

2: Yanagihara S, Tsuruta D, Fukai K, Ishii M.

Severe dermatitis mimicking deep vein thrombosis caused by hexyldecanol. Contact Dermatitis. 2008 Sep;59(3):177-8.

3: Hosomi N, Fukai K, Nakanishi T, Funaki S, Ishii M.

Caspase-1 activity of stratum corneum and serum interleukin-18 level are increased in patients with Netherton syndrome. Br J Dermatol. 2008 Sep;159(3):744-6.

4: Oshimo T, Fukai K, Higashi N, Kitano T, Imai Y, Shintaku H, Ishii M.

A novel LMX1B nonsense mutation in a family with nail-patella syndrome. J Dermatol Sci. 2008 Oct;52(1):57-60.

5: Umekoji A, Fukai K, Ishii M.

A case of mosaic-type bullous congenital

ichthyosiform erythroderma successfully treated with topical maxacalcitol, a vitamin D3 analogue.

Clin Exp Dermatol. 2008 Jul;33(4):501-2.

6: Hosomi N, Fukai K, Tanaka A, Fujita H, Ishii M.

Fluorescence in situ hybridization analysis is useful for the diagnosis of the carrier state of X-linked ichthyosis.

Int J Dermatol. 2008 May;47(5):529-30.

7: Umekoji A, Fukai K, Kasama T, Yokoi T, Saito M, Tsuruhara A, Ishii M.

High 8-dehydrocholesterol level in a typical case of Conradi-Hunermann-Happle syndrome with a novel H76Y missense mutation.

J Dermatol Sci. 2008 Jul;51(1):62-5.

8: Kawakami T, Fukai K, Sowa J, Ishii M, Teramae H, Kanazawa K.

Case of cheilitis granulomatosa associated with apical periodontitis.

J Dermatol. 2008 Feb;35(2):115-9.

9: Kajimoto A, Oiso N, Fukai K, Ishii M.

Bilateral segmental neurofibromatosis with gastric carcinoma.

Clin Exp Dermatol. 2007 Jan;32(1):43-4.

[学会発表] (計16件)

1 強皮症様皮膚硬化を合併した多発性骨髄腫に伴うALアミロイドーシス 細見尚子、石川 欣司、中野学、小林晏、深井和吉、曾和順子、石井正光、金子仁臣 第107回日本皮膚科学会総会 2008年4月18日~20日(京都市)

2 Conradi-Hunermann-Happle syndromeの1例 梅香路綾乃、深井和吉、石井正光、横井俊明、斉藤美佳、鶴原昭史、笠間健嗣 第107回日本皮膚科学会総会 2008年4月18日~20日(京都市)

3 Congenital guttate leukoderma, a new clinical entity? Kazuyoshi Fukai, Atsuko Kadoya, Hiroyuki Teramae and Masamitsu Ishii 第20回国際色素細胞会議, 第5回国際メラノーマ研究学会 2008年5月7日~12日(札幌市)

4 Human piebaldism : a novel mutation of KIT gene and relationship between phenotype and site of the mutation Naoki Oiso, Tamio Suzuki, Ryoji Tsuboi, Yoshihiko Mitsuhashi, Tadamichi Shimizu,

Terihiko Makino, Kazuyoshi Fukai, Naoko Hosomi, Roberto L.Rezende, Ana P. Manzoni, Fernanda Laueremann, Shigeru Kawara and Akira Kawada 第5回国際メラノーマ研究学会 2008年5月7日~12日 (札幌市)

5 Trypsin, PAR-1 and PAR-2 mediated IL-8 releases were increased in SPINK5 knock-downed HaCaT cells Naoko Hosomi, Kazuyoshi Fukai, Naoki Oiso, Hiroyuki Kunitomo, Masamitsu Ishii and Koichi Nakajima 第5回国際研究皮膚科学会 2008年5月14日~17日 (京都市)

6 歯科治療にて軽快した肉芽腫性口唇炎の1例 川上倫子、深井和吉、小野恵理、曾和順子、石井正光、寺前浩之、金沢甲哲 第400回日本皮膚科学会大阪地方会 2007年3月17日 (大阪市)

7 Interferon regulatory factor2(IRF2) プロモーター多型は若年発症の尋常性乾癬と相関する 細見尚子、深井和吉、大磯直毅、加藤敦、石井正光 日本研究皮膚科学会第32回年次学術大会・総会 2007年4月18日~20日 (横浜市)

8 VCXA遺伝子プロモーター上流領域の欠損はX連鎖性魚鱗癬に伴う境界域精神発達遅滞に相関する 細見尚子、大磯直毅、深井和吉、花田一志、藤田弘子、石井正光 第106回日本皮膚科学会総会 2007年4月20日~22日 (横浜市)

9 Nested PCR法により診断を確定した猫ひっかき病の一例 梅香路綾乃、深井和吉、柳原茂人、黒岡定浩、小野恵理、曾和順子、石井正光 第106回日本皮膚科学会総会 2007年4月20日~22日 (横浜市)

10 尋常性乾癬患者における Interferon regulatory factor 2 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析 細見尚子、深井和吉、大磯直毅、吉良良美、藤田弘子、石井正光 第3回加齢皮膚医学研究会 2007年6月16日~17日 (大阪市)

11 尋常性乾癬患者における Interferon regulatory factor 2 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析 細見尚子、深井和吉、大磯直毅、吉良良美、石井正光 第29回臨床細胞分子遺伝研究会 2007年6月30日(西宮市)

12 Conradi-Hunermann-Happle Syndrome の一例 梅香路綾乃、深井和吉、石井正光第

22回角化症研究会 2007年8月4日(東京都)

13 Analysis of methylation status in the promoter of interferon regulatory factor-2 gene in patients with late-onset psoriasis Naoko Hosomi, Kazuyoshi Fukai, Naoki Oiso, Yoshimi Kira, Tomoko Oshimo and Masamitsu Ishii 57th Annual Meeting American Society of Human Genetics 2007年10月23日~27日 (San Diego, California, USA)

14 皮膚症状を契機に診断された多発性骨髄腫に伴う全身性アミロイドーシス 細見尚子、石川欽司、中野学、小林晏、深井和吉、曾和順子、石井正光、金子仁臣 第400回日本皮膚科学会大阪地方会 2007年12月1日(奈良市)

15 LMX1B遺伝子にフレームシフト変異を認めた Nail-Patella症候群 大霜智子、深井和吉、石井正光、東 禹彦、北野利夫、今井祐記、新宅治夫 第400回日本皮膚科学会大阪地方会 2007年12月1日 (奈良市)

16 アトピー性皮膚炎に対するオーダーメイド医療 深井和吉 大阪市立大学(OCU)ニューテックガイド 2007 次世代ニーズに向けた新材料・新技術紹介 2007年1月19日(大阪市)

〔図書〕(計 3件)

1 アレルギー (アレルギーの発症機序、アナフィラキシー、アナフィラキシー様反応の発症機序) 深井和吉、曾和順子 「局所麻酔薬中毒・アレルギー」編集：浅田章、西川精宣、克誠堂出版、東京p.127-143, 2008

2 アトピー性皮膚炎の看護 深井和吉 「整形外科看護」メディカ出版、吹田、13巻、8号、p83-87, 2008

3 尋常性白斑、フォークトー小柳ー原田病、老人性白斑 深井和吉、石井正光 「看護のための最新医学講座第19巻皮膚科疾患」編集：中川秀巳(第2版)中山書店、東京、p245-250, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井和吉 (Fukai Kazuyoshi) : 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 研究者番号 20244642

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし