

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591665

研究課題名(和文)皮膚バリア関連200遺伝子の網羅的解読による新規アトピー性皮膚炎原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel atopic dermatitis candidate genes with sequencing analysis against skin barrier associated 200 genes.

研究代表者

佐々木 貴史 (Sasaki, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70306843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアトピー性皮膚炎(AD)関連600遺伝子のターゲットリシーケンシング法を確立し日本人AD患者の解読を行った。その結果、自然免疫もしくは上皮細胞増殖シグナル関連因子を含む6遺伝子変異候補を同定した。その中の1つをAD患者約150人で解析した結果、顔面及び首周囲に特徴的なパターンの皮疹を形成する集団で高頻度に同定された。現在、再現性確認のために他集団での解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：We established target resequencing method using next generation DNA sequencer for 600 Atopic Dermatitis (AD) related genes, and analyzed against Japanese AD patients. As a result, we isolated 6 candidate AD related mutations including natural immunity and signal pathway in epithelial cells. We analyzed the one candidate mutation against Japanese 150 AD patients among these candidates. Finally, we found the AD patients who show specific dermatitis at face and neck possess this mutation, frequently, and we currently are confirming this result with other Japanese AD patients.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 エクソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎原因遺伝子フィラグリンの同定

アトピー性皮膚炎(AD)は、寛解・増悪を繰り返すそう痒のある湿疹を主病変とする皮膚疾患として定義される最も頻度発症の高い遺伝性皮膚疾患の一つであり、患者の多くは遺伝的アトピー素因を持つとされる。2006年に尋常性魚鱗癬及びアトピー性皮膚炎の原因遺伝子として皮膚バリア因子であるフィラグリン(FLG)が同定された。最初に報告されたアイルランド集団でのケース-コントロール解析では45.2%のAD患者からFLG変異が同定されたことから、非常に重要なAD原因遺伝子として注目された。日本人AD患者集団からは欧州で同定されたFLG変異が見られなかったため、申請者は、新規FLG遺伝子解読方法“FLG-shotgun”法を開発し、この方法を用いて2種の日本人における新規FLG変異を同定した(*J. Derm. Sci.*, 2008)。その結果、日本人AD患者230人の解析を行った結果、約10~20%の日本人AD患者でFLG変異を同定したが他コホートの報告よりも変異率は比較的低かった。この結果から、すべてのAD患者集団でFLG遺伝子変異率が高いわけではない事が明らかになった。

(2) 上皮顆粒層高発現遺伝子解析による新規AD原因遺伝子候補遺伝子のスクリーニング

FLGがAD原因遺伝子として同定された事により、角層形成異常の原因となる皮膚バリア機能欠損によりADを引き起こす事が疫学的に証明された。角層は皮膚の最外層に存在している細胞が分化して形成するバリアのような構造体であり、外部からの異物の侵入を防ぎ、内部から水分の蒸散を防ぐなど、生命維持に重要な機能を担う重要な臓器である。しかし、人体の最外に存在し解析が困難であるために、角層分化・形成機序や関連

遺伝子などは未知の部分が多い。そこで慶應義塾大学医学部皮膚科では、角層形成機構の解明のために上皮顆粒層で高発現する皮膚バリア関連遺伝子のスクリーニングを行っている。これらの結果と、これまでに層形成に関与していると明らかになっている遺伝子群を合わせて、新規AD原因遺伝子候補遺伝子とする。

2. 研究の目的

ADの原因遺伝子としてフィラグリンFLGが同定された。申請者が開発したFLG変異解析法での解析結果、日本人AD集団では**FLG変異はAD集団での変異率が海外の報告程高くない(10~20%)**事が明らかになった。そこで、

これまでに皮膚形成に関与していると報告されている遺伝子 上皮顆粒層に高発現遺伝子の中から200遺伝子を対象とした**次世代シーケンサーを用いて安価・迅速に解読する方法を開発**し、慶應義塾大学医学部皮膚科学教室で収集した**日本人AD患者のDNA解析**により、**新規AD原因遺伝子の同定**を目指す。

3. 研究の方法

本研究計画は、主に3つのステップからなっていたが、解析技術の進展により解析遺伝子数を大幅に増加させ解析を進めた。

(1) 皮膚バリア関連200遺伝子の抽出とPCR primer作成 (平成24年前期) 遺伝子の抽出とPCR primerの作成

(2) Exon PCR-multiplex sequencing 法の開発 (平成24年前期~25年前期) multiplex ライブラリーの調製法検討と次世代シーケンサーでの解読

(3) 日本人AD患者230人での解析 (平成24~26年) 実際の日本人AD患者230人での解読

4. 研究成果

(1) 皮膚バリア関連200遺伝子の抽出とPCR primer 作成について

Agilent 社から平成24年に発売された Haloplex ターゲットエンリッチメントシステムは、安価に200~300遺伝子を対象とし次世代シーケンサーを用いてターゲットリシーケンシング可能なシステムで、特定領域をPCRで増幅させ次世代シーケンサーで解読するよりも優れていた。そこで方法をターゲットリシーケンシング法に切り替え、解読方法の確立を行った。これにより解析対象遺伝子は、当初の皮膚バリア関連200遺伝子に加え、自然免疫及び獲得免疫関連の遺伝子を加えた**600遺伝子**を対象としたターゲットリシーケンシングが可能となった。

(2) Exon PCR-multiplex sequencing 法の開発 (平成24年前期~25年前期) multiplex ライブラリーの調製法検討と次世代シーケンサーでの解読

平成24年度に Haloplex ターゲットエンリッチシステムを用いたターゲットリシーケンシング法に切り替えたことにより初年度から次世代シーケンサーによる解読が可能となったことから、平成25年度に予定していた、次世代シーケンサーによる解読と、解読結果のコンピューター解析法の確立を行った。

平成24年度には、イルミナ社から小型次世代DNAシーケンサーMiseqが発売され、ターゲットリシーケンシング法を用いて345遺伝子解読方法を確立した。平成25年度は、Miseqの1Runあたりの**解読容量**が増加したことから Haloplex ターゲットエンリッチシステムを用いた約600遺伝子を解読する方法の確立をおこなった。AD患者から抽出したゲ

ノムDNAを用いて、ターゲットリシーケンシング用ライブラリーを作製しMiseq DNAシーケンサーでの解読を行った結果、メーカーから提示された方法では十分量の解読データを得る事ができなかった。そこでライブラリーDNAやプロトコルを検討した結果、解読容量の増加に伴って変更した標準プロトコルのライブラリーDNA変性条件に問題がある事が明らかになり修正を行った。その結果、データが得られる様になり、600遺伝子解読方法が確立できた。

次世代シーケンサーから供出されるデータ量は膨大であることから、解読結果の解析には専用の解析ツールを開発する必要があった。プログラム開発は平成25年から行う予定であったが、ターゲットリシーケンシングに切り替えたことからすぐにデータが産出可能となったことから、初年度には cutadapt Bowtie2 samtools GATK snpEFF SIFT の6種類のプログラムを組み合わせた遺伝子変異同定法を確立した。この方法を用いてAD患者6人の解析を行い、20カ所のミスセンス変異を同定した。

平成25年度には、Haloplex法に特化した解析プログラムが Surecall 開発され、既知病原変異などの情報も簡単に付加可能となったことから、本プログラムを採用して解析を行うこととした。

(3) 日本人AD患者230人での解析 (平成24~26年) 実際の日本人AD患者230人での解読

平成24年度に解読方法まで確立でき、また平成25年度には遺伝子数を600まで拡張できたことから、合計24人のAD患者のターゲットリシーケンシング解読とシーケンズデータ解析を行った。

これまで得られた結果をすべて統合して解析した結果、6つの遺伝子変異候補を同定

した。それらは、自然免疫もしくは上皮細胞増殖シグナル関連因子であった。その中の自然免疫関連膜貫通型レセプター遺伝子変異に対して、1000人ゲノムや日本人多型データベース解析の結果、アジア人に特異的に見られ集団の1～2%存在しレセプター認識部位構造に影響を与える低頻度多型であった。この遺伝子変異をAD患者約150人に対して解析した結果、全体では日本人集団での出現頻度には有意差は見られなかったが、皮疹のパターンによってさらに分類した顔面及び首周囲に特徴的なパターンの皮疹を形成する集団で高頻度に同定され。現在、我々が同定した特徴的なパターンを示す他の日本人AD集団の収集を進め、他の集団での再現性確認を行っている。

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 2件)

1. Sasaki T, Furusyo N, Shiohama A, Takeuchi S, Nakahara T, Uchi H, Hirota T, Tamari M, Shimizu N, Ebihara T, Amagai M, Furue M, Hayashi J, Kudoh J. Filaggrin loss-of-function mutations are not a predisposing factor for atopic dermatitis in an Ishigaki Island under subtropical climate. *J Dermatol Sci.* 76(1):10-15 (2014).
査読有

2. 佐々木 貴史、天谷雅行 フィラグリン (Filaggrin) 分子消化器病 11:89-93 (2014)
査読無

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 貴史 (SASAKI, Takashi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 70306843

(2)研究分担者

久保 亮治 (KUBO, Akiharu)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 70335256