

厚生労働科学研究

創薬基盤推進研究事業

アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 有波 忠雄

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書

アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究	1
有波 忠雄	

II. 分担研究報告書

網羅的遺伝子タンパク質発現解析によるアレルギー疾患関連遺伝子の同定	8
---	---

内田和彦

藤枝重治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	13
-----------------------	----

厚生労働化学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究

主任研究者 有波忠雄 筑波大学 大学院人間総合研究科

社会環境医学専攻遺伝医学分野 教授

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症の患者家系および症例対照サンプルを用いて、全ゲノム網羅的解析により疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。アトピー性皮膚炎についてはSNPによる全ゲノム連鎖解析により日本人アトピー性皮膚炎家系において見出された連鎖領域のうち、15番染色体長腕連鎖領域内に存在するSMAD3のSNPがアトピー性皮膚炎家系、症例対照研究においても関連が認められることを見いだした。また花粉症のゲノム解析については10万SNPによる一次解析および独立したサンプルにおける二次、三次解析が終了し、関連の認められた1遺伝子について機能解析を進めている。網羅的遺伝子タンパク質発現解析については花粉暴露および舌下免疫療法関連遺伝子・タンパク質を同定しており、そのうち1つのタンパク質については好塩基球におけるヒスタミン遊離抑制作用がみとめられており、有力なアレルギー治療薬候補と考えられた。

分担研究者

野口恵美子 筑波大学人間総合科学研究科
遺伝医学分野 講師

玉利真由美 理化学研究所アレルギー体質
関連遺伝子研究チーム チームリーダー

藤枝重治 福井大学医学部感覚運動医学講
座・耳鼻咽喉科頭頸部外科学 教授

内田和彦 筑波大学人間総合科学研究科生
化学分野 准教授

斎藤博久 国立成育医療センター研究所免
疫アレルギー研究部 部長

鈴木洋一 千葉大学大学院医学研究院環境
医学講座公衆衛生学 准教授

大塚藤男 筑波大学人間総合科学研究科皮
膚病態医学分野 教授

柴崎正修 筑波技術大学小児科 教授

荒川浩一 群馬大学小児生態防御学 講師

前仲勝実 九州大学生体防御医学研究所ワ
クチン開発構造生物学分野 准教授

A. 研究目的

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究ではアトピー性皮膚炎と花粉症の日本人の患者家系および症例対照サンプルを用いて、全ゲノム網羅的解析により疾患感受性遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

日本人アトピー性皮膚炎家系および症例対照サンプル、花粉症家系および症例対照サンプルを用いてSNPによる全ゲノム連鎖解析を行い、続いて、連鎖領域のデンスマッピングを行い、関連の認められた

SNPsを検出する。関連が見られたSNPsについては独立したケースコントロールサンプルを用いて、結果を追認する。さらに疾患特異的な組織を用いた網羅的発現解析を加え疾患発症のパスウェイを同定する。

(倫理面への配慮)

本研究の検体提供者にはすべて文書および口頭により説明し、書面によるインフォームドコンセントを得られた検体のみ解析に使用する。本研究は当該施設における倫理委員会の承認を得た上で行われている。

C. 研究結果

本研究では日本人アトピー性皮膚炎、花粉症の患者家系と症例対照サンプルを用いて関連遺伝子多型を発見し、別のパネルで関連を追認することにより、より確かな疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。さらに疾患特異的な組織を用いた網羅的発現解析を加え疾患発症のパスウェイを同定する。

アトピー性皮膚炎：イルミナタイピングシステムを使用して77家系111罹患同胞対287人の全ゲノム連鎖解析が終了し、1番および15番染色体に連鎖領域を見いだした(Enomoto et al., BMC Dermatol, 2007)。連鎖領域のデンスマッピングを111家系384人、さらに症例対照研究による三次解析を行い15番染色体連鎖領域のSMAD3遺伝子に存在するSNPとアトピー性皮膚炎との関連を見出した。患者サンプル16名のDNAを用いたプロモーターおよびエクソン領域のresequencingが終了し、複数のSMAD3遺伝子

領域内のSNPがアトピー性皮膚炎と関連していることを発見した。現在はSMAD3遺伝子の機能解析が進行中である。

また1番染色体連鎖領域近傍の有力候補遺伝子であるフィラグリンの機能喪失型変異とアトピー性皮膚炎発症との関連について報告した。フィラグリンの機能喪失型変異は、他にアトピー性疾患を合併しない皮膚炎のみの群で特に発症リスクが高まることを見出した(Enomoto et al., J Hum Genet, in press)。さらに、フィラグリン遺伝子のresequenceにより新たなSNPを同定し、また、既知の機能喪失型変異とあわせると、アトピー性皮膚炎患者の約12%程度がフィラグリンの機能喪失型変異を有することが判明した(unpublished data)。

花粉症：スギ花粉症患者を対象に10万SNP(イルミナ社)を使用した一次解析および独立したサンプルによる二次解析、三次解析によりが終了した(総サンプル数 症例700:対照420)。対照はアレルギー疾患および花粉症の症状がなく、かつ、スギおよびダニに対するIgE抗体が陰性である健康成人を対象とした。三次解析が終了した時点で遺伝子Xとスギ花粉症との関連が認められた($P < 0.001$)。この遺伝子は補体関連遺伝子であり、さらにウイルスレセプターとしても機能していることが知られている。また、不死化B細胞による網羅的SNP発現データベースによる解析では花粉症との関連が認められたSNPは発現調節に強く関わっていることが示唆されており($\text{LOD score} = 12, P < 3 \times 10^{-14}$)、さらにスギ花粉暴露の時期には患者において遺伝子発現が低下していることが見出されている。現在はプロモーター領域のresequenceとルシフェラーゼアッセイによ

る発現解析が進行中である。

タンパク質遺伝子発現解析については血漿プロテオームにおいて花粉症暴露により変動する4タンパク質、舌下免疫療法により変動する2タンパク質を同定し、現在はELISA法による測定法の確立のための標準化作業を行っている。舌下免疫療法により特異的に増加するタンパク質はヒト好塩基球におけるヒスタミン遊離抑制作用があることを確認した。末梢血単核球における網羅的遺伝子発現解析では、花粉暴露により変動する遺伝子群および舌下免疫療法関連遺伝子を同定した。特に花粉飛散時にスギ花粉症患者7割程度で著増・著減している遺伝子群を同定しており、花粉症患者において免疫反応の異なる群が存在することが示唆された。

D. 考察

1) 達成度について

アトピー性皮膚炎についてはSNPによる全ゲノム連鎖解析および疾患感受性遺伝子同定終了したため、当初の目的を達成することができた。

花粉症については、SNPによる全ゲノム関連解析による遺伝子同定が終了したので当初の目的を達成することができた。網羅的遺伝子タンパク質発現解析については遺伝子タンパク質の同定はできたが、臨床検査法を目指したELISA法の確立を終了できなかった。また、疾患感受性遺伝子同定が平成19年度であったため構造解析(前仲分担)について着手することができなかった。

分担研究者の斎藤、鈴木、大塚、柴崎、については平成18年度までに当初の目的としていた検体収集が終了している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

過去に白人家系を用いたアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析が4つ報告されている

(Lee et al, 2000, Cookson et al, 2001, Bradly et al, 2002, Haagerup et al, 2004) が、これらの連鎖領域は一致していない。本邦においてはアトピー性皮膚炎と候補遺伝子の症例対照研究が散見されるのみで家系を用いた研究は申請者らの報告のみである。アジア人におけるアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析は行われていないため、本研究の全ゲノム連鎖解析はアジア人初であり、さらに疾患感受性遺伝子としてSMAD3遺伝子が同定された。この遺伝子は遺伝子改変マウスにおいてアトピー性皮膚炎との関連が示唆されているが、ヒトの病態における役割については解明されていない。また、1番染色体連鎖領域近傍のフィラグリン遺伝子については、機能喪失型変異が日本人においてもsub-major geneとしてアトピー性皮膚炎の易罹病性に関わっていることを確認した。

花粉症についてはスギ花粉症の特化した全ゲノム関連解析は行われておらず、複数の報告で追認されているものはない。疾患感受性遺伝子として同定された遺伝子については、遺伝子多型がその発現に影響を与えている可能性が高いことが示唆されており、また補体および感染関連遺伝子であることを考えると新たなスギ花粉症発症機序の解明につながることを期待される。また発現解析から、花粉症治療候補タンパク質が同定されており(特願2008-053768)、臨床試験などで確認されれば新たな治療薬開発につながることを期待される。

3) 今後の展望について

アトピー性皮膚炎: 疾患感受性遺伝子として同定されたSMAD3遺伝子については、ヒトにおける役割解明を行うことによりアトピー性皮膚炎発症の病態解明に寄与することができることを期待される。

花粉症: 花粉症患者の一部(7割程度)において花粉飛散時に共通して大きく変動する遺伝子群が同定されている。このような個体差は疾患感受性のみならず、薬効性にも影響を与えている可能性が高いことから、このような遺伝子発現を指標とした臨床試験を行う必要があると考えられる。花粉症舌下免疫療法特異的たんぱく質の一つはヒスタミン遊離抑制作用があることが確かめられているため(特願2008-053768)、今後ヒトにおける有効性を確かめていきたい。

E. 結論

アトピー性皮膚炎についてはSNPによる全ゲノム連鎖解析により日本人アトピー性皮膚炎家系において1番および15番染色体に連鎖領域を見だし、15番染色体連鎖領域のSMAD3遺伝子とアトピー性皮膚炎との関連を発見した。

スギ花粉症については全ゲノム解析により、補体関連遺伝子が花粉症発症と関連していることを見出した(P<0.001)。網羅的遺伝子タンパク質発現解析については花粉暴露および舌下免疫療法関連遺伝子・タンパク質を同定し、舌下免疫療法関連タンパク質の一つはヒスタミン遊離抑制機能があることが証明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E: Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population, family and case-control study. *J Hum Genet* 2008. in press
2. Suzuki T, Arakawa H, Mizuno T, Muramatsu K, Tadaki H, Takizawa T, Mochizuki H, Tokuyama K, Matsukura S, Morikawa A: Differential Regulation of Eotaxin Expression by Dexamethasone in Normal Human Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, in press
3. Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H: Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice: effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. *Eur J Pharmacol* 2008, 578:87-96.
4. Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M: Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 121:769-770.

5. Sugiyama M, Arakawa H, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A: Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year. *Pediatrics* 2007, 119:e716-723.
6. Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya A, Takahashi S: Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol* 2007, 178:605-612.
7. Hamajima Y, Fujieda S, Sunaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S: Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 2007, 34:49-56.
8. Enomoto H, Noguchi E, Iijima S, Takahashi T, Hayakawa K, Ito M, Kano T, Aoki T, Suzuki Y, Koga M, Tamari M, Shiohara T, Otsuka F, Arinami T: Single nucleotide polymorphism-based genome-wide linkage analysis in Japanese atopic dermatitis families. *BMC Dermatol* 2007, 7:5.

2. 学会発表

1. 玉利真由美: 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析. 第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 大阪 2008.
2. 玉利真由美: アレルギー疾患と感染症. 中国地区上気道アレルギー研究会 広島 2008.

3. 野口恵美子: アレルギー疾患の遺伝子配列解析研究の進歩と現状. 第44回日本小児アレルギー学会 名古屋 2007.
4. 野口恵美子: 小児気管支喘息の発症機序 遺伝学的アプローチを中心に. つくば地区小児喘息学術講演会 茨城 2007.
5. 野口恵美子: アレルギー性疾患の遺伝研究: 全ゲノム解析から. 第17回小児気道アレルギー研究会 東京 2007.
6. 牧野友香, 内田和彦, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治ら: プロテオーム解析による花粉症関連タンパク質の同定. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
7. 藤本政弥, 野口恵美子ら: 全ゲノム関連解析による気管支喘息疾患感受性遺伝子の同定 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
8. 藤枝重治: スギ花粉症に対する治療: 抗ヒスタミン薬の大規模試験から舌下免疫療法まで. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
9. 青木健, 牧野友香, 内田和彦, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治ら: 網羅的遺伝子発現解析による喘息および花粉症関連遺伝子の同定. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
10. 坂下雅文, 玉利真由美, 藤枝重治ら: 成人スギ花粉症の遺伝背景についての解析. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
11. 高橋昇, 鈴木弟, 藤枝重治: 環境化学物質と鼻アレルギー. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
12. 荒川浩一ら: 気道上皮細胞の粘液分泌に対するインターフェロン γ の影響とその機序の検討. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
13. 荒川浩一ら: 増悪を来たす外因: 小児. 第27回六甲カンファレンス (シンポジウム)、京都 2007.
14. 荒川浩一ら: 小児喘息治療における薬剤の組み合わせ. 第19回日本アレルギー学会春季学術集会(シンポジウム)、横浜 2007.
15. 荒川浩一: 脂質メディエーターと小児アレルギー疾患. 2007.3.17.東京. 第4回東日本メディエーター研究会 (シンポジウム) 東京 2007.
16. 荒川浩一: 気道炎症の評価の実際と問題点. 第16回小児気道アレルギー研究会(シンポジウム) 東京 2007.
17. 玉利真由美ら: SOCS1遺伝子多型と成人気管支喘息発症との相関. 日本人類遺伝学会第52回大会 東京 2007.
18. 玉利真由美ら: 成人スギ花粉症の疫学および遺伝学的解析-福井大学におけるボランティア1042人の検討-. 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 横浜 2007.
19. 玉利真由美: 遺伝子多型を用いた気管支喘息の病態解析. 第26回大和アレルギー研究会 奈良 2007.
20. 玉利真由美: アレルギー体質と遺伝子多型について アレルギー性鼻炎治療研究会第7回セミナー 東京 2007.

21. 玉利真由美: アレルギー性疾患の最新の研究から患者教育まで. 第17回小児気道アレルギー研究会 2007.
22. 玉利真由美: 気管支喘息の遺伝要因と薬剤の効果について. 第19回藤沢市内科医学会 横浜 2007.
23. 玉利真由美: SNPから疾患遺伝子解明へ アレルギー体質と感染症、SNPsを使ったアプローチ. 独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センターシンポジウム 東京 2007.
24. 榎本久子, 有波忠雄, 野口恵美子ら: 日本人アトピー性皮膚炎家系を用いた全ゲノム連鎖解析. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
25. Tamari M: Polymorphisms of RIG-I

are associated with adult bronchial asthma. Annual meeting of American Society of Human Genetics, SanDiego 2007.

26. Tamari M: San Francisco Functional Polymorphism in the Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) Gene Associated with Adult Asthma. The American Thoracic Society's International Conference 2007.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 野口恵美子、有波忠雄、藤枝重治ら 特願2008-053768 アレルギー疾患の治療薬且つ治療効果のマーカー
出願人 国立大学法人福井大学、国立大学法人筑波大学 出願日 平成20年3月4日

厚生労働化学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

網羅的遺伝子タンパク質発現解析によるアレルギー疾患関連遺伝子の同定

分担研究者 内田和彦 筑波大学人間総合科学研究科生化学分野 准教授
藤枝重治 福井大学医学部感覚運動医学講座・耳鼻咽喉科頭頸部外科学 教授

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。網羅的タンパク質発現解析については血漿プロテオームにおいて花粉症暴露により変動する4タンパク質、舌下免疫療法により変動する2タンパク質を同定し、ウエスタンブロットおよびELISA法による確認を行っている。舌下免疫療法特異タンパク質の1つはその発現量が臨床症状と逆相関を示し、また、ヒト好塩基球のヒスタミン遊離抑制作用があることが確認できた。末梢血単核球における網羅的遺伝子発現解析では、花粉症患者の一部（7割程度）で花粉飛散時の有症状時において著増および著減する遺伝子群を同定し、ヒト花粉症患者免疫応答に個人差があることが示唆された。

A. 研究目的

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では網羅的遺伝子タンパク質発現解析によりアトピー関連遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

プロテオーム：スギ離散前後のペア血清（舌下免疫療法15例：プラセボ9例）および花粉暴露室における暴露前後の血漿（17ペア）を用いて蛍光二次元電気泳動と飛行時間型質量分析(TOF-MAS)を行い、花粉暴露および治療により変動するタンパク質を同定した。

トランスクリプトーム：スギ離散前後の末梢血単核球由来のペアRNA（舌下免疫療法11例：プラセボ10例）を用いて花粉暴露および治療により変動する遺伝子をイルミナ発現解析システム（Human-6 Expression Chip, 48000遺伝子を網羅）により同定した。また同様の方法を用いて花粉症患者（10名）およびコントロール(7名)の下鼻甲介由来線維芽細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。

C・研究結果

網羅的タンパク質発現解析については血漿プロテオームにおいて花粉症暴露により変動する4タンパク質、舌下免疫療法により変動する2タンパク質を同定し、ウエス

タンブロットおよびELISA法による確認が進行中である。舌下免疫療法特異タンパク質の1つはその発現量が臨床症状と逆相関を示し、また、ヒト好塩基球のヒスタミン遊離抑制作用(平均 43%の抑制作用)があることが確認できた。末梢血単核球にお

ける網羅的遺伝子発現解析では、花粉暴露により変動する遺伝子群および舌下免疫療法関連遺伝子を同定した。花粉症患者の一部(7割程度)で花粉飛散時の有症状時において著増および著減する遺伝子群を同定し、ヒト花粉症患者免疫応答に個人差があることが示唆された。

花粉症患者、健常者由来の線維芽細胞において花粉症患者とコントロールにおいて発現に2倍の変化がみとめられ、かつ統計解析で有意となる($P<0.05$) 8 遺伝子(*PSG1*, *DNALI1*, *SERPINC1*, *TMEM119*, *ARMCX4*, *VAMP1*, *SCARA3*, *MAPK8IP3*) を検出した。このうち *PSG1* は花粉症患者の線維芽細胞で発現が上昇していた。*PSG1* は妊娠中に血清中で上昇がみられるタンパク質として同定されたが、IL-10、IL-6、TGF β 1 などのサイトカイン産生を単球から誘導し自然免疫機構の調節を行っている遺伝子であると報告されている。

D. 考察

報告者は網羅的タンパク質遺伝子発現解析により、花粉症発症、花粉暴露および舌下免疫療法関連タンパク質・遺伝子を同定した。舌下免疫療法関連タンパク質の一つについては抗アレルギー効果があることが判明し、有望な花粉症治療薬候補タンパク質であると考えられる。

E. 結論

網羅的タンパク質・遺伝子発現解析により花粉症関連および舌下免疫療法関連タンパク質・遺伝子を同定した。

1. 論文発表

1. Nishioka T, Uchida K, Meno K, Ishii T, Aoki T, Imada Y, Makino Y, Hirata K, Matsumoto Y, Arinami T, Noguchi E: Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *Proteomics Clin Appl* 2008, 2:46-54.
2. Uchida K: Gene expression profiling for biomarker discovery. In *BioArrays: From Basics to Diagnostics* edited by Appasani, K Humana Press, Totowa, NJ 2007:95-106.
3. Hamajima Y, Fujieda S, Sunaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S: Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 2007, 34:49-56.
4. Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E: Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population, family and case-control study. *J Hum Genet* 2008.

5. 藤枝重治, 山田武千代, 小島章弘: スギ花粉症における第2世代抗ヒスタミン薬の臨床効果. 日鼻誌 2007, 46:18-28.
 6. 大澤陽子, 高橋昇, 藤枝重治: 舌下免疫療法. Medical Science Digest 2007, 33:940-944.
 7. 大澤陽子, 伊保澄子, 藤枝重治: 花粉症に対するDNAワクチン療法. アレルギーの臨床 2007, 27:965-969.
 8. 山田武千代, 高橋昇, 藤枝重治: シグナル伝達系に対するアレルギー性鼻炎の治療. アレルギーの臨床 2007, 27:42-47.
 9. 山田武千代, 窪誠太, 藤枝重治: IgE抗体産生とB細胞のシグナル. アレルギー・免疫 2007, 14:159-167.
2. 学会発表
1. 牧野友香, 内田和彦, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治ら: プロテオーム解析による花粉症関連タンパク質の同定. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
 2. 藤枝重治: スギ花粉症に対する治療: 抗ヒスタミン薬の大規模試験から舌下免疫療法まで. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
 3. 青木健, 牧野友香, 内田和彦, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治ら: 網羅的遺伝子発現解析による喘息および花粉症関連遺伝子の同定. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
 4. 坂下雅文, 玉利真由美, 藤枝重治ら: 成人スギ花粉症の遺伝背景についての解析. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 横浜 2007.
 5. 内田和彦: オミックス医療を支える基盤構築に向けて—臨床プロテオミクスを支える基盤構築に向けて. 第4回ゲノム・オミックス医療情報シンポジウム, 東京 2007.
 6. 内田和彦: 非標識定量 2D-LC MALDI-TOF MS による低分子量プロテオミクス解析. 第4回千葉疾患プロテオミクス研究会, 千葉 2007.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E	Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population, family and case-control study.	J Hum Genet		In press	2008
Suzuki T, Arakawa H, Mizuno T, Muramatsu K, Tadaki H, Takizawa T, Mochizuki H, Tokuyama K, Matsukura S, Morikawa A	Differential Regulation of Eotaxin Expression by Dexamethasone in Normal Human Lung Fibroblasts	Am J Respir Cell Mol Biol		In press	2008
Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H	Repeated instillations of Dermatophagoides farinae into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice: effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate	Eur J Pharmacol	578	87-96	2008
Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M	Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (Saccharomyces cerevisiae) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population	J Allergy Clin Immunol	121	769-770	2008

Sugiyama M, <u>Arakawa H</u> , Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A:	Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year.	Pediatrics	119	716-23	2007
Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya A, Takahashi S	Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis	J Immunol	178	605-612	2007
Hamajima Y, <u>Fujieda S</u> , Sunaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S:	Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis.	Auris Nasus Larynx	116	49-56.	2007
Enomoto H, Noguchi E, Iijima S, Takahashi T, Hayakawa K, Ito M, Kano T, Aoki T, Suzuki Y, Koga M, Tamari M, Shiohara T, Otsuka F, Arinami T	Single nucleotide polymorphism-based genome-wide linkage analysis in Japanese atopic dermatitis families..	BMC Dermatol	7	5(8 ページ)	2007
野口恵美子	花粉症は遺伝するのか？ 花粉症と周辺アレルギー疾患	診断と治療社		151-153	2007

Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population, family and case-control study

Hisako Enomoto^{1,2}, Kenji Hirata¹, Kenta Otsuka¹, Toshiharu Kawai¹, Takenori Takahashi², Tomomitsu Hirota³, Yoichi Suzuki⁴, Mayumi Tamari³, Fujio Otsuka², Shigeharu Fujieda⁵, Tadao Arinami¹ Emiko Noguchi¹

¹Department of Medical Genetics, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Japan

²Department of Dermatology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Japan

³Laboratory of Genetics of Allergic disease, RIKEN SNP Research Center, Yokohama, Japan

⁴Department of Public Health, Chiba University Graduate School of Medicine, Japan

⁵Departments of Otorhinolaryngology and Immunology, University of Fukui Faculty of Medical Sciences, Fukui, Japan

Address for correspondence:

Emiko Noguchi, Department of Medical Genetics, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba-city, Ibaraki, Japan, Tell 81-29-853-3352, Fax 81-29-853-3333, Email address enoguchi@md.tsukuba.ac.jp

Key words

Filaggrin

Atopic dermatitis

Null mutations

Ichthyosis vulgaris

IgE

Abstract Filaggrin (*FLG*) plays an important role in the barrier function of the skin. Several loss-of-function mutations in *FLG* have been identified in patients with ichthyosis vulgaris, and these null mutations are associated with development of atopic dermatitis (AD). In the present study, we examined tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) and null mutations in *FLG* for possible associations with AD and atopic phenotypes in a Japanese population. Transmission disequilibrium test of 105 AD families showed that the null allele of the S2554X variant of *FLG* tended to be overtransmitted to AD-affected offspring; however the *P* value did not reach statistical significance. In a case-control comparison of 376 AD cases and 923 non-allergic controls, the null allele of S2554X was significantly associated with AD ($P = 0.0012$), and the association was strengthened in subjects with AD alone ($P = 0.000024$). 3321delA and S2554X were also associated with elevated levels of IgE. Combined null mutation carriers were observed more in AD patients and in the subjects with high IgE than in control subjects. The combined *P* value for the family and case-control data was significant for the S2554X and combined null mutations. Our data further support the importance of *FLG* in the development of AD.

Introduction

Atopic dermatitis (AD) is an itchy, chronic inflammatory skin disease that is categorized as an atopic disease along with atopic asthma and rhinitis. The prevalence of AD has been studied in a wide variety of populations, and its reported frequency ranged from 0.73% to 23% (Levy et al. 2003). The 12-month prevalence of symptoms of atopic eczema in Japanese children 6 to 7 years of age was 16.9%, the second highest after Sweden (Williams et al. 1999). Twin and family studies have indicated that predisposition for AD is highly heritable (Larsen et al. 1986), with a heritability value of 0.72 (Nystad et al. 2005). However, the details regarding inheritance of AD remain unclear.

To identify susceptibility genes for AD, genome-wide linkage studies and candidate gene approaches have been used. To date, 5 genome-wide linkage studies have been performed in Caucasian populations (Lee et al. 2000; Cookson et al. 2001; Bradley et al. 2002; Haagerup et al. 2004) and a Japanese population (Enomoto et al. 2007), and evidence for linkage to AD was obtained for several chromosomal regions. Several candidate genes, mainly immune-related genes including interleukin (IL)-4 (*IL4*), *IL13*, *IL5*, *IL12B*, and serine protease inhibitor Kazal-type 5 (*SPINK5*) have been examined for possible association with development of AD (Morar et al. 2006).

Recent studies have emphasized the importance of skin barrier function in the development of AD. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene (*FLG*) were found to be associated with AD in independent populations (Irvine 2007). *FLG* protein is present in the granular layers of the epidermis, and the keratohyalin granules in the granular layers are predominantly composed of the 400-kDa polyprotein, profilaggrin (Dale et al. 1985; Listwan and Rothnagel 2004; Candi et al. 2005). On the differentiation of keratinocytes, profilaggrin is dephosphorylated and cleaved into 10 to 12 essentially identical 37-kDa filaggrin peptides. *FLG* proteins aggregate the keratin cytoskeleton system to form a dense protein-lipid matrix that is crosslinked by transglutaminases to form the cornified cell envelope (Candi et al. 2005). This structure prevents epidermal water loss and impedes the entry of allergens, toxic chemicals, and infectious organisms. Therefore, *FLG* is a key protein in terminal differentiation of the epidermis and skin barrier function (Gan et al. 1990).

FLG is located on human chromosome 1q21 (Compton et al. 2002) for which a previous genome-wide linkage study found evidence of linkage with AD (Cookson et al. 2001). The chromosome 1q21 region harbors the epidermal differentiation complex (EDC), which is a dense cluster of genes involved in the terminal differentiation of the epidermis and formation of the stratum corneum, the

outermost dead cell compartment of the skin where the main skin barrier function occurs (Mischke et al. 1996). *FLG* is located in the EDC. Recently, we performed a genome-wide linkage analysis of Japanese families with AD and found weak evidence for linkage on 1q24 (Enomoto et al. 2007) near 1q21.

FLG was initially identified as a susceptibility gene for ichthyosis vulgaris (Smith et al. 2006), a disorder of keratinization, and Palmer et al. (Palmer et al. 2006) reported that two nonsense mutations in *FLG*, R501X and 2282del4, were associated with development of AD in a Caucasian population. These mutations showed a combined allele frequency of ~4% in populations of European ancestry, and the variants were greatly overrepresented in the cohort with AD, indicating a highly significant dominant risk of AD (Palmer et al. 2006). *FLG* null alleles, X501 and 2282del4, occur at higher frequency in individuals with both asthma and AD than in individuals with asthma alone (Palmer et al. 2006). The R501X and 2282del4 variants were absent in non-European populations, such as those of Asian or African origin.

The associations of *FLG* null alleles with development of AD have been replicated in several European populations (Marenholz et al. 2006; Ruether et al. 2006; Sandilands et al. 2006; Weidinger et al. 2006; Barker et al. 2007; Stemmler et al. 2007; Weidinger et al. 2007). *FLG* null alleles were also found to be associated with elevated