

Tsukita S, Furuse M, Tsukita S: Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight junction proteins. *Mol. Cell Biol* 29:2372-2389, 2009.

【日本語論文】

1. 森脇一将, 古瀬幹夫. クローデインに関わる分子間相互作用. *生体の科学* 58 (5), 424-425, 2007.
 2. 岩本典子, 古瀬幹夫. 細胞生物学 細胞間接着装置タイトジャンクションと上皮透過性. *生体の科学* 59 (5), 336-337, 2008
 3. 古瀬幹夫, 岩本典子: 細胞間をシールする分子メカニズム. *最新医学* 64:2450-2455, 2009.
2. 学会発表
1. Furuse M: Epithelial and endothelial tight junctions. **4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery**, Kanazawa, Japan, 2007.6.20-22.
 2. Furuse M: Identification of novel protein components of the junctional complex by the fluorescence localization-based expression cloning (FL-REX) method. **10th International Symposium on "Signal transduction in the blood-brain barriers"**, Potsdam, Germany, 2007.9.13-16.
 3. 古瀬幹夫: タイトジャンクションと皮膚のバリア機能, **第32回日本化粧品学会(特別講演)**, 東京, 2007. 6. 8.
 4. 古瀬幹夫: タイトジャンクションとバリア障害. **第71回日本皮膚科学会東部支部学術大会シンポジウム**, 札幌, 2007. 9. 23.
 5. 古瀬幹夫: タイトジャンクションの分子構築と機能発現のメカニズム. **第32回角膜カンファランス・第24回日本角膜移植学会フェアウェルセミナー**, 東京, 2008.3.1.
 6. Furuse M. Internalization of claudins from tight junctions. **International conference Berlin 2008 "Molecular structure and Function of the tight junction"**, Berlin, Germany. 2008.4.24-27
 7. Furuse M. The role of tight junctions in epithelial barrier function. **Post IID 2008 Satellite international Meeting on Autoimmune Disease**, Otsu, Japan. 2008 5.17-19.
 8. Furuse M. Remodeling of claudin-based tight junctions. **NAIST Global COE Symposium on Cell Signaling**, Ikoma, Japan. 2008.11.13-14.
 9. Furuse M, Takahashi S, Iwamoto N. Internalization and degradation of claudins during the remodeling of tight junctions. **CSHL Meeting on Blood/Brain Barrier Physiology: Neural Boundary and the Molecular Mechanisms of CNS Protection**, Cold Spring Harbor, USA. 2008.12.1-4.
 10. 古瀬幹夫. 細胞間隙をシールする分子機構. **第56回ウイルス学会学術集会 特別講演**, 岡山, 2008. 10. 15.
 11. 古瀬幹夫. タイトジャンクション: 細胞間隙をシールする分子機構. **日本薬学会第129回年会 シンポジウム**, 京都, 2009.3.26.
 12. Furuse M: Claudin downregulation by an E3 ligase. **Gordon Research Conference "Cell Contact & Adhesion"**, Waterville Valley, USA, 2009. 6. 28- 7. 3.
 13. Furuse M: Molecular basis for the barrier function of tight junctions. **The 7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology**. Seoul, Korea, 2009. 8. 20- 21.
 14. Furuse M: Formation of tricellular tight junctions: How the extracellular space is plugged where three epithelial cells meet. **ASCB/JSCB/RIKEN Meeting. Building the Body Plan: How Cell Adhesion, Signaling, and Cytoskeletal Regulation Shape Morphogenesis**. Kyoto, Japan, 2009. 9. 21- 23.
 15. 古瀬幹夫: Molecular organization of tight junctions in endothelial cells. **第32回日本分子生物学会年会(ワークショップ血管多様性が生み出す生体機能と疾患)**, 横浜, 2009. 12. 12.
- G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

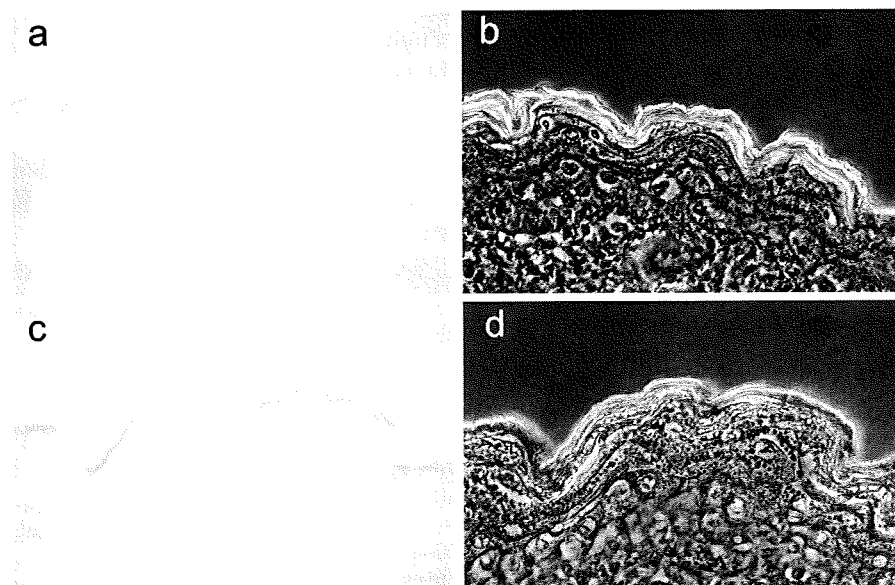


図1 生後1日目の野生型マウス(a, b)、クローディン1欠失マウス(c, d)表皮の外から投与した基質に対する内在性 beta-galactosidase 活性(X-gal の発色 a, c)と位相差像(b, d)。クローディン1欠失マウスの角質層に強い beta-galactosidase 活性がみられる

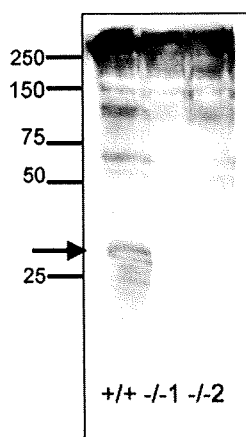


図2 クローディン1遺伝子欠失マウス角質層におけるフィラグリンの発現(ウェスタンブロット) 左より野生型(+/+), ノックアウトマウス2個体(-/-1, -/-2), 分子量 kD. 矢印はフィラグリンモノマー。

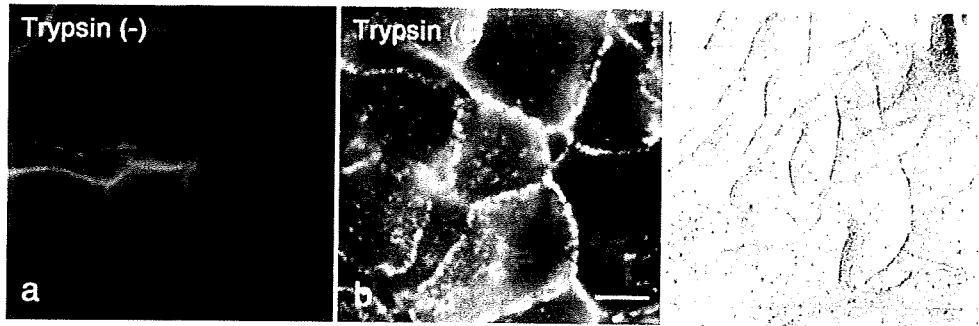


図3 (a)間接蛍光抗体法によるA431細胞のクロードイン1の細胞内局在。クロードイン1は細胞膜全体に分散して存在する。(b)0.025%トリプシンを無血清培地に添加して37度15分後のA431細胞におけるクロードイン1の局在。クロードイン1が細胞間に強く濃縮し、TJ形成が示唆される。(c)bの細胞の凍結切断レプリカ像。TJが形成されている。スケールバー：a, b 10 μ m, c 100 nm.

経皮的抗原感作と喘息

研究者分担 浅野 浩一郎 慶應義塾大学医学部呼吸器内科 准教授

研究要旨 バリア機能が破綻した皮膚からの抗原感作により、ハプテンなしでも感作の強度に応じた Th2 型免疫応答と好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進をきたすマウスモデルを作成した。皮膚バリアの傷害方法のうち、脱毛クリームを塗布してから物理的に擦過する方法が最も再現性良く好酸球性気道炎症を誘導し、テープによる傷害はかえって気道炎症を抑制した。また C57BL/6 マウスと BALB/c マウスでは経皮感作によって生じる表現型に違いがあり、C57BL/6 マウスでは抗原特異的血清 IgE 値の上昇が見られないものの、気管支洗浄液液中の Th2 サイトカイン濃度上昇、メサコリン気道過敏性亢進をとまなうことから、Balb/c マウスよりも経皮感作モデルに適していると判断した。気道炎症、サイトカイン濃度は最終暴露翌日では全身感作>経皮感作であったが、暴露 7 日目には全身感作群における気道炎症、気道過敏性亢進はほぼ完全に終息するのに対して、経皮感作群では暴露翌日とほぼ同程度の気道炎症、気道過敏性亢進が持続していた。これらの検討により、フィラグリンの異常によって生じた皮膚バリア機能の障害が喘息の発症ならびに慢性化・重症化に関与する可能性を検討するためのモデルが完成した。

研究協力者

小熊 剛（慶應義塾大学医学部呼吸器内科 共同研究員）

樹神元博（慶應義塾大学医学部呼吸器内科）

A. 研究目的

重症のアトピー性皮膚炎を発症した乳幼児が喘息を併発した場合、しばしば気道炎症の難治化をきたし最終的にはリモデリングによる不可逆性気流閉塞にいたることが多い。これは経皮的な抗原感作が気道病変の病態に影響する可能性を示唆している。実際、皮膚バリア機構を司るフィラグリンの遺伝子異常がある場合、喘息とアトピー性皮膚炎を伴うことが多いとの疫学的データがある。

従来のマウス喘息モデルでは抗原をハプテンとともに全身投与しなければ感作が成立せず、抗原のみを経気道的に曝露しても感作が生じない。バリアが傷害されている皮膚からの抗原感作によってハプテンなしでも喘息様の気道炎症を発症するマウスモデルを作成し、全身感作と経皮感作による気道炎症の質的な違い（慢性化）をより明確とすることを目的とした。

B. 研究方法

C57BL/6 および BALB/c マウスの背部に卵白アルブミン (OVA) をしみこませたパッチを貼付（週 1 回、1-3 回）した後、OVA 吸入曝露を行った。対照として、(1) ハプテンであるとともにアラムと OVA を腹腔内に投与した動物、(2) ガムテープにより物理的に障害した皮膚に OVA をしみこませたパッチを貼付した動物を用いた。曝露は卵白アルブミンエアロゾル（2%）吸入によって行った。曝露翌日、4 日目、7 日目、14 日目に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、BAL 液中の炎症細胞数およびその分画、インターロイキン 13 (IL-13) 濃度を評価した。感作成立および気道炎症の指標として血清中の OVA 特異的免疫グロブリンを評価した。メサコリン気道過敏性は FlexiVent 法で測定した。

C. 結果

アラムとともに腹腔内感作したマウスでは BAL 中好酸球数の著明な増加を認め、組織学的にも気道周囲の好酸球数の集積と気道上皮の杯細胞化生を認めた（図 1A、D）。一方、バリアを傷害した皮膚への感作モデルでも腹腔内感作マウスに比

して程度は軽いものの同様のBAL中好酸球数の増加と気道周囲の好酸球数の集積、気道上皮の杯細胞化生を認めた(図1C、F)。対象としてリン酸緩衝食塩水を吸収させたパッチを貼付した後に卵白アルブミンエアロゾルを吸入させた群では、このような好酸球性気道炎症、気道リモデリングは全く認められなかった(図1B、E)。皮膚バリアの傷害方法のうち、脱毛クリームを塗布してから物理的に擦過する方法が最も再現性良く好酸球性気道炎症を誘導し、テープによる傷害はかえって気道炎症を抑制した。

C57BL/6およびBALB/cマウス両系統とも3回の経皮感作によって血清中のOVA特異的IgG1値の上昇、OVA暴露後の気道好酸球数の増加・気道上皮の杯細胞化生をきたした(図2)。この作用は感作強度依存性であり、感作の回数を1-2回に減らすことにより、OVA特異的抗体価上昇や気道好酸球集積は減少した(図2)

Balb/cマウスではそれに加えてOVA特異的IgE値の上昇が確認された。BAL液中のTh2サイトカイン濃度はBalb/cマウスでは全身感作群のみ上昇し、経皮感作では変化が認められなかったのに対し、C57BL/6マウスでは経皮感作群でもIL-4、IL-5などの上昇が認められた。気道過敏性亢進については、全身感作ではいずれの系統でも認められたが、経皮感作ではC57BL/6マウスでのみ認められた。そこで、以降の検討はC57BL/6マウスを用いて行った。

全身感作の方が経皮感作よりも暴露翌日の血清中のOVA特異的IgG1値、BAL液中IL-13濃度はより高値となり、BAL液中の炎症細胞数・好酸球数も全身感作群の方が高い傾向を呈した。しかし、メサコリン気道過敏性については両群とも亢進が見られ、感作経路によって差を認めなかった。全身感作群における気道炎症、気道過敏性亢進は暴露7日目にはほぼ完全に終熄した。これに対し、経皮感作群では暴露7日目でも暴露翌日とほぼ同程度の気道炎症、気道過敏性亢進が持続していた(図3)。BAL液中IL-13濃度の上昇も経皮感作でのみ暴露7日目まで持続した。暴露14日目には経皮感作群においても気道炎症、BAL液中IL-13濃度とも正常化した。

D. 考察

従来は喘息動物モデルとして抗原をハプテンとともに全身投与することで強力なTh2型免疫応答

を誘導する方法が使用されてきたが、これでは喘息患者にみられるような持続的な気道炎症を誘導できなかった。今回、経皮的な抗原感作が遷延性の好酸球性気道炎症を誘導することが明らかとなり、フィラグリン遺伝子変異により生じた皮膚バリアの異常が喘息の慢性化につながる可能性が示唆された。現在、その仮説を証明するためにフィラグリンノックアウトマウスを用いた解析を進めている。

E. 結論

経皮抗原感作によってハプテンなしでも感作の強度に応じたTh2型免疫応答と好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進をきたすマウスモデルを作成できることが明らかになり、さらに経皮感作は遷延性の好酸球性気道炎症・気道過敏性亢進につながることを証明した。皮膚バリアを維持して経皮的な抗原の侵入を回避することで喘息の慢性化・重症化を予防できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(平成19-21年度)

論文発表

1. Niimi K, Asano K, Shiraishi Y, Nakajima T, Wakaki M, Kagyo J, Takihara T, Suzuki Y, Fukunaga K, Shiomi T, Oguma T, Sayama K, Yamaguchi K, Natori Y, Matsumoto M, Seya T, Yamaya M, Ishizaka A: TLR3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J Immunol*, 178 (1): 489-495, 2007.
2. Shiraishi Y, Asano K, Niimi K, Fukunaga K, Wakaki M, Kagyo J, Takihara T, Ueda S, Nakajima T, Oguma T, Suzuki Y, Shiomi T, Sayama K, Kagawa S, Ikeda E, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Miyasho T, Ishizaka A: Cyclooxygenase-2/prostaglandin D2/CRTH2 pathway mediates double-stranded RNA-induced enhancement of allergic airway inflammation. *J Immunol*, 180 (1): 541-549, 2008.
3. Suzuki Y, Asano K, Niimi K, Miyata J, Shiraishi Y, Fukunaga K, Shiomi T, Nakajima T, Oguma T, Sayama K, Ishizaka A: TP receptor-mediated release of eosinophil chemotactic activity from human bronchial smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 600 (1-3): 133-139, 2008.

4. Asano K, Ishizaka A: Pharmacogenetics of anti-leukotriene drugs. **Clin Exp Allergy Rev** 8: 45-49, 2008.
 5. Oguma T, Asano K, Ishizaka A: Role of prostaglandin D(2) and its receptors in the pathophysiology of asthma. **Allergol Int**, 57 (4): 307-312, 2008.
 6. Asano K, Nakade S, Shiomi T, Nakajima T, Suzuki Y, Fukunaga K, Oguma T, Sayama K, Fujita H, Tanigawara Y, Ishizaka A: Impact of pharmacokinetics and pharmacogenetics on the efficacy of pranlukast in Japanese asthmatics. **Respirology**, 14 (6): 822-827, 2009.
 7. Asano K, Suzuki H: Silent acid reflux and asthma control (editorial). **New Engl J Med** 360: 1551-1553, 2009.
 8. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD: The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. **J Immunol**, 184 (2): 836-843, 2010.
 9. Kodama M, Asano K, Oguma T, Kagawa S, Tomomatsu K, Wakaki M, Takihara T, Ueda S, Ohmori N, Ogura H, Miyata J, Tanaka K, Kamiishi N, Fukunaga K, Sayama K, Ikeda E, Miyasho T, Ishizaka A: Strain-specific phenotypes of airway inflammation and bronchial hyper-responsiveness induced by epicutaneous allergen sensitisation in BALB/c and C57BL/6 mice. **Int Arch Allergy Immunol Suppl.** (in press)
 10. Asano K, Yamada-Yamasawa W, Kudoh H, Matsuzaki T, Nakajima T, Hakuno H, Hiraoka R, Fukunaga K, Oguma T, Sayama K, Yamaguchi K, Nagabukuro A, Harada Y, Ishizaka A: ADRB2 variants associated with relative response to β_2 -agonists and anticholinergics in Japanese asthmatics. **Respirology** (in press)
- of Sao Paulo and Keio University. Sao Paulo, Brasil. 2008.8.
4. Asano K, Nakade S, Oguma T, et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of pranlukast in Japanese adult patients with asthma. **64rd AAAAI Annual Meeting**, Washington DC, USA. 2009 .3.

学会発表

1. Asano K, Shiraishi Y, Niimi K, et al.: Double-stranded RNA- induced exacerbation of allergic airway inflammation. **World Asthma Meeting**, 2007. 6.
2. Asano K, Shiraishi Y, Kagawa S, et al: Enhanced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in response to TLR3 ligand in murine models of asthma. **63rd AAAAI Annual Meeting**, 2008.3.
3. Asano K. Susceptibility genes for allergic diseases. **International symposium**. University

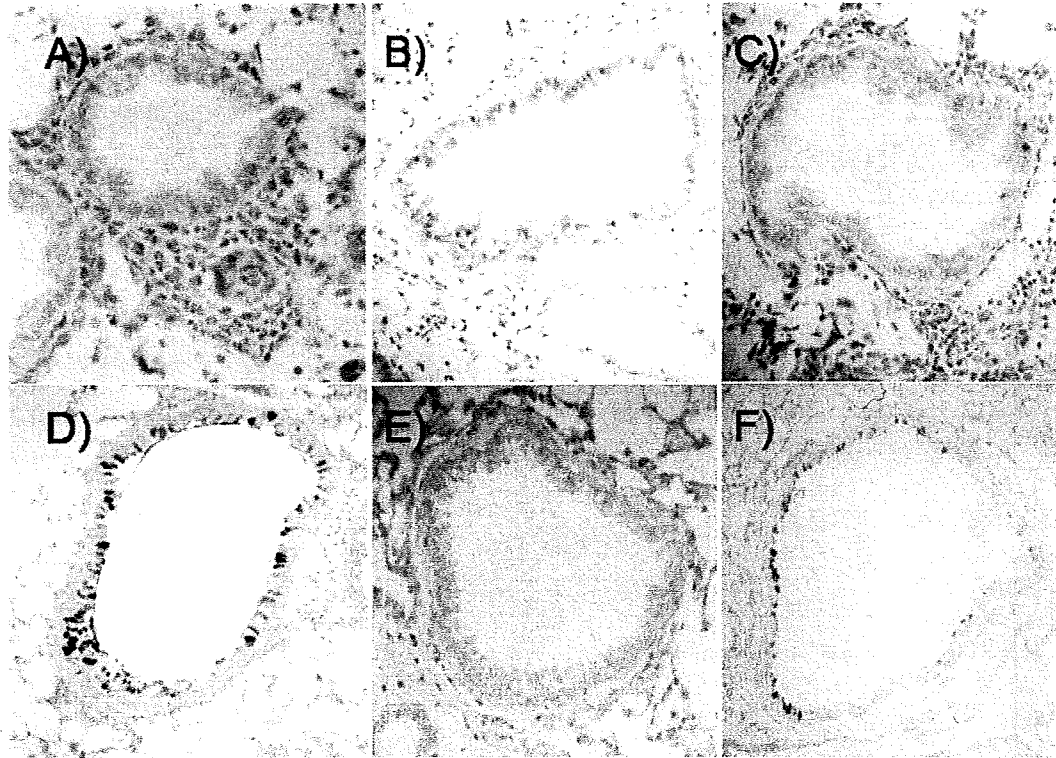


図1. 腹腔内あるいは経皮抗原感作マウスにおける気道炎症
 卵白アルブミンをハプテン（アラム・百日咳菌ワクチン）とともに腹腔内投与（A、D）、
 正常皮膚に卵白アルブミンのみを吸収させたパッチを貼付（B、E）、バリアを傷害した
 皮膚に卵白アルブミンのみを吸収させたパッチを貼付（C、F）して感作を行い、3週目
 に2%卵白アルブミンを吸入させた。OVA吸入24時間後に肺を摘出し、ギムザ染色（A
 - C）、PAS-アルシアン青染色（D - F）を行った。

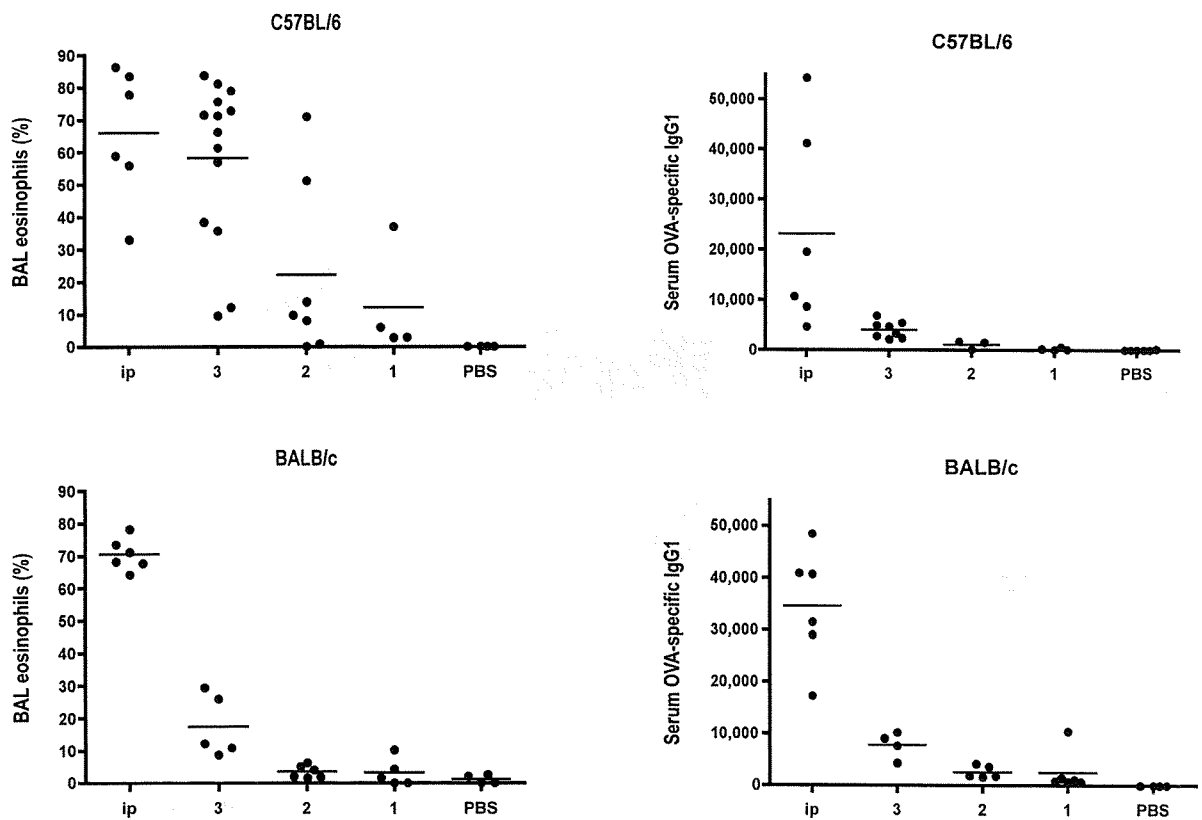


図2. 腹腔内あるいは経皮抗原感作マウスにおける気道炎症と抗原特異的抗体産生
 卵白アルブミン (OVA) をハプテン (アラム・百日咳菌ワクチン) とともに腹腔内投与 (ip) するか、正常皮膚に卵白アルブミンのみを吸収させたパッチを1～3週間貼付(1, 2, 3)、あるいはPBSのみを吸収させたパッチを3週間貼付(PBS)したマウス(C57BL/6あるいはBALB/cマウス)に2%卵白アルブミンを吸入させた。OVA吸入24時間後に気管支肺胞洗浄と採血を行い、BAL細胞中好酸球比率と血清OVA特異的IgG1の測定を行った。

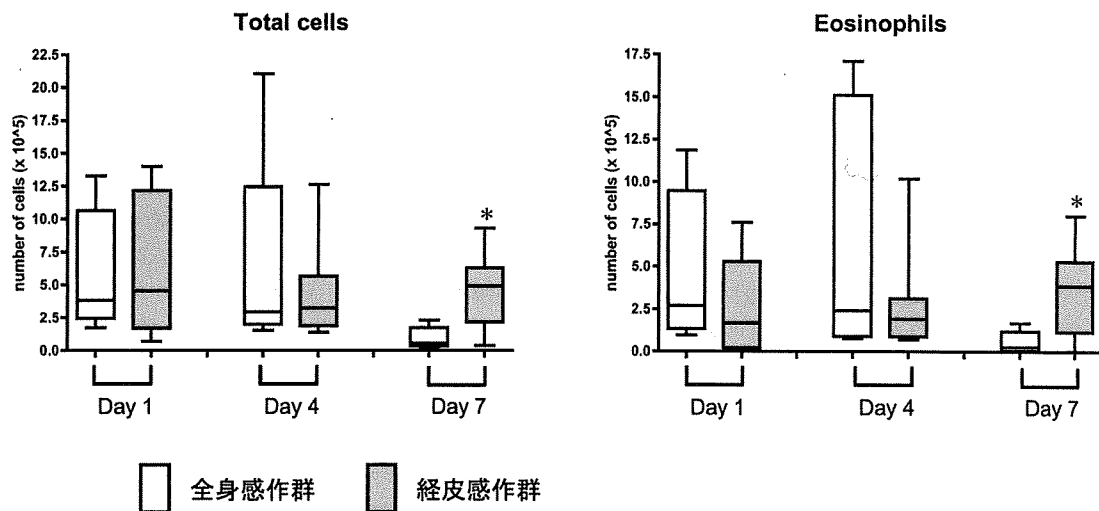


図3. 全身あるいは経皮抗原感作マウスにおける気道炎症の経時変化

全身感作群にはハプテンであるアラムと卵白アルブミン (OVA) をともに腹腔内に投与し、経皮感作群ではマウスの背部に OVA をしみこませたパッチを貼付した。OVA エアロゾル (2%) 吸入暴露翌日、4 日目、7 日目に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、BAL 液中の総炎症細胞数および好酸球分画を測定した。n = 6-8、* p < 0.05、全身感作群と比較。

アトピー性皮膚炎患者および flaky tail マウスにおける皮膚バリア機能蛋白遺伝子の解析

研究分担者 工藤 純 慶應義塾大学医学部生命情報学センター 教授

研究要旨 欧州のアトピー性皮膚炎(AD)患者の約50%にフィラグリン(FLG)遺伝子の変異が発見され、FLGの減少による皮膚バリア機能の障害がADの発症原因の一つとして注目されている。そこで、日本人AD患者群におけるFLG遺伝子変異の寄与を評価するために、配列決定がきわめて困難なFLG遺伝子の新規解読法FLG-shotgun法を開発し、フィラグリン遺伝子の変異同定および多型解析を行なった。その結果、2種類の新規ナンセンス変異(8666-8667CC>GAと9887C>A)を新たに同定した。また、日本人AD患者105人に対し、この変異を含む合計7種のFLG変異の解析を行った結果、7人からFLG変異を同定した。この結果から、日本人AD患者におけるFLG変異率は、欧州などの結果と比較し低い事が明らかになった。この事から、日本人AD患者ではFLG遺伝子以外の他のバリア機能蛋白遺伝子に変異がある可能性も考えられたため、FLG2遺伝子の解読を試みたが、全長決定までにはいたらなかった。

プロフィラグリンの低分子量化とFlgタンパク質の極度な減少が知られているAD自然発症マウスflaky tail(*ft*)の*Flg*遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、マウスでもFlg繰り返し配列中に1塩基欠失(5303delA)を同定した。この変異は、ヒトFLG遺伝子変異と類似しており、アトピー性皮膚炎発症モデルの研究対象となることを明らかにした。また、データベースに登録されているC57BL/6由来の*Flg*遺伝子の塩基配列が極めて信頼性が低いことから、C57BL/6由来の*Flg*遺伝子の高精度塩基配列決定も行った。

研究協力者
慶應義塾大学医学部皮膚科特任講師
佐々木 貴史
渋谷 和憲
慶應義塾大学医学部分子生物学特別研究助教
宮本 憲一
慶應義塾大学総合医科学研究センター特別研究講師
久保亮治
慶應義塾大学医学部皮膚科学特別研究助教
河野 通良
慶應義塾大学医学部皮膚科学大学院生
川崎 洋

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)患者からフィラグリン(FLG)遺伝子の変異が発見され、皮膚バリア機能の障害がアトピー性皮膚炎の発症原因の一つとして注目されている。そこで、日本人AD患者群における皮膚バリア機能遺伝子の変

異や、疾患モデルとして用いるマウスにおける皮膚バリア機能遺伝子の変異解析を行い、これらの遺伝子とADとの関連解明を目的とした。

B. 研究方法

ヒト及びマウスFLG遺伝子は700~1000bpを単位とする繰り返し配列並列していることから、通常のDNA配列決定法では解読が困難である。そこで我々は、ヒトFLG遺伝子の新規解読法FLG-shotgun法を開発し、この方法を用いて、日本人AD患者集団のFLG遺伝子配列を同定した。同定した変異及び報告されている変異に対し、PCRや制限酵素を用いた簡便解析法を確立した。これらの方法を用いて、日本人AD患者105人に対して変異の有無を解析した。

マウス*Flg*遺伝子配列は、C57BL/6マウス及び*ft*マウスから構築したBACライブラリーから*Flg*遺伝子を含むクローンを選択し、*Flg*遺伝子のexon3を含む領域をRed/ET法を用いて

サブクロニングした後、Tn5 トランスポゾンのランダムな挿入を用いたシーケンシング法で、塩基配列を決定した。

ヒト FLG2 遺伝子は2種類の繰り返し配列を含んでいることから、FLG 遺伝子と同様に特異的プライマーを用いた PCR 直接シーケンシングによる変異解析は困難である。そこで exon 3 を丸ごと PCR で増幅させた後、物理的に剪断し、shotgun 法による塩基配列の決定と変異解析を試みた。

C. 研究結果

日本人アトピー性皮膚炎患者 24 人のフィラグリン遺伝子の全コーディング領域の配列を解析した結果、繰り返し配列の数の違い (11~13 個) と配列の類似性によって、長さの異なる 4 つの主要な遺伝子型 (A, B, Bs, C) に分類された。さらに 2 種類の新規ナンセンス変異をそれぞれ 2 症例ずつから発見した (図 1)。この 8666-8667CC>GA と、9887C>A の 2 種類および 5 種類の既知変異 (7661C>G, 3321delA, 1537C>T, 3702delG, 2282del4) の有無を簡便検出法 (表 1、図 2) を用いて日本人アトピー性皮膚炎患者 105 人で調べたところ、計 7 人 (8666-8667CC>GA 2 人、9887C>A 3 人、7661C>G 2 人) に変異がみられた (表 2)。

次に、*ft* マウスが *Flg* 遺伝子変異を有しているか否かを明らかにするために、FLG-shotgun 法を応用して解析を試みた。*ft* マウスから Flg リピートを増幅し、576 サンプル (1152 リード) の塩基配列を決定したところ、4 組のプライマー由来の PCR 産物で同一の 1 塩基欠失 (delA) を検出したが、700bp 以上の同一配列を含む領域が複数箇所存在したため、全体の再構築は不可能であった (図 3)。そこで、*ft* マウス由来ゲノムライブラリーからスクリーニングした BAC クローンからクロニングした exon 3 を含む約 13kb のサブクローンに対し、Tn5 トランスポゾンを利用したシーケンシング法で解析を行った。その結果、平均重複度 8.7 リードでカバーする完全な *Flg^{ft}* 遺伝子の塩基配列を決定した (図 4)。同様の方法を用いて、C57BL/6 マウスの *Flg^{C57}* 遺伝子の塩基配列も決定した (図 5)。比較した結果、*Flg^{ft}* 遺伝子は *Flg^{C57}* 遺伝子と比較して Flg リピートの数が 1 単位少ないことが明らかになったが、これは *Flg^{ft}* 遺伝子の起源が C3H マウスであるためで単なる多型とみなしている。前述の 1 塩基欠失の位置は、6

番目のリピートに含まれる 5303delA と確定し、フレームシフトの結果、154 コドン下流に終止コドンが出現し、205kDa の短いプロフィラグリンが生成することが示唆された。

ヒト FLG2 遺伝子の塩基配列解析については、患者 DNA から増幅させた FLG2 遺伝子の exon 3 を含む DNA 断片から shotgun ライブラリーを構築し、まず 48 クローン (96 リード) について塩基配列の決定と、データのアセンブリーを行った。しかし、他の染色体領域由来の DNA が混ざっていたり、有効なデータが得られなかったものもあり、実際にアセンブリーに寄与したのは 65 リードしかなく、exon 3 の配列を完全に決定するには至らなかった。

D. 考察

今回、変異の出現頻度解析を行った 7 種類の FLG 遺伝子変異のうち 3 種類 (1537C>T, 3702delG, 2282del4) は欧州人患者から発見された主要な変異であり、欧州においては AD 患者の 50% が、いずれかの変異を有する事が報告されているが、日本人 AD 患者 105 人中では 1 人も有しておらず、人種によって FLG 変異遺伝子の起源が全く異なる事が示された (表 2)。FLG 変異のうち、既知の 4 種の変異については、日本人 AD 患者群 105 人中計 7 名 (6.7%) しか有していなかった (表 2)。欧州で報告されている頻度と顕著な違いが生じた原因として (1) 日本人においては、皮膚バリア機能の障害が原因となる患者が少ない (2) 日本人においてはフィラグリン以外の皮膚バリア機能蛋白の欠損が主要な原因となっている等の可能性も示唆されたが、(3) 日本人フィラグリン遺伝子変異の主要なものをまだ検出していない可能性も否定できず、さらなる検討が必要である。

マウス Flg は約 500kDa のプロフィラグリンとして発現し、その後プロセッシングを受け、約 30kDa の Flg となり、皮膚バリアを形成する。しかし *ft* マウスでは、フィラグリンの C 末端領域を認識する抗体では検出されない約 215kDa のプロフィラグリンが発現し、また約 30kDa のフィラグリンはほとんど発現していないことが知られていた。今回同定した変異 (5303delA) から予想されるプロフィラグリンのサイズは 205kDa であり、観察されるサイズとよく一致した。また、C 末端領域が欠失した結果プロセッシングが受けられなくなると推定

され、類似の変異を有するアトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン減少の原因を解明する為にも重要なモデルとなることが示唆された。

また、ヒトFLG2遺伝子の exon 3 の shotgun シーケンシングは上記の理由による絶対的なリード数不足のため配列決定に至らなかったが、データベースに登録されている配列とは一致しない配列が見つかったことから、繰り返し配列の数に多型の存在が示唆された。この問題はリード数を増やすことによって解決されると思われる。

E. 結論

日本人アトピー性皮膚炎患者においてもフィラグリン遺伝子の変異は存在し、欧州の患者と同様にアトピー性皮膚炎発症の一因となっている事が示唆された。しかし、欧州とは変異の起源も変異保有率も全く異なっていた。今後はフィラグリン以外の皮膚バリア機能蛋白遺伝子の解析も含めて、皮膚バリア機能障害の原因となる遺伝的要因のさらなる追究が必要である。

さらなる遺伝的要因の候補としてヒトFLG2の解析を行ったが、ゲノム構造の複雑さから解読法の確立までには至らなかった。これは、ヒトFLG2遺伝子の exon 3 の変異解析は shotgun 法でリード数を増やすことによって解決されることが期待される。その後対象患者の数を増やして変異解析の完了を目指す。

また、*ft* マウスの *Flg* 遺伝子の塩基配列を決定し、アトピー性皮膚炎患者の FLG 遺伝子変異と類似の 5303delA 変異を同定した。これにより、*ft* マウスをフィラグリン遺伝子変異によるアトピー性皮膚炎発症モデルとして研究対象とすることに対する科学的根拠を固めることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 19-21 年度)

1. 論文発表

英語論文

1. Sasaki T, Kudoh J, Ebihara T, Shiohama A, Asakawa S, Shimizu A, Takayanagi A, Dekio I, Sadahira C, Amagai M, Shimizu N: Sequence analysis of filaggrin gene by novel shotgun method in Japanese atopic dermatitis. **J Dermatol Sci**, 51 (2): 113-120, 2008.
2. Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, Sundberg JP, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, McLean WH: A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. **Nat Genet**, 41 (5): 602-608, 2009.

2. 学会発表

1. 佐々木貴史, 工藤純, 海老原全, 塩濱愛子, 浅川修一, 高柳淳, 清水厚志, 渋谷和憲, 天谷雅行, 清水信義: アトピー性皮膚炎原因遺伝子フィラグリンの新規解読法の確立及び日本人集団におけるフィラグリン遺伝子変異の同定. **第14回日本遺伝子診療学会大会**, 松山, 2007年7月
2. 佐々木貴史, 工藤純, 海老原全, 塩濱愛子, 浅川修一, 高柳淳, 清水厚志, 渋谷和憲, 天谷雅行, 清水信義: アトピー性皮膚炎原因遺伝子フィラグリンの shotgun 法による変異解析. **BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)**, 横浜, 2007年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

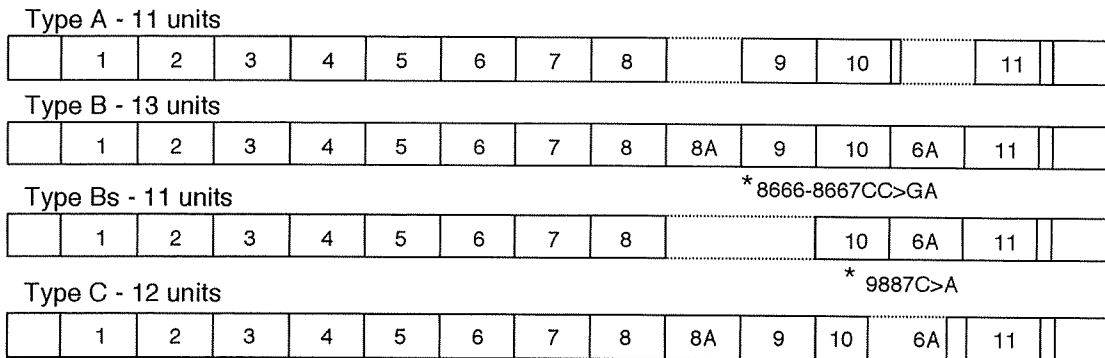


図1 日本人フィラグリン遺伝子の4種の遺伝子型と2種の新規ナンセンス変異
 日本人アトピー性皮膚炎患者24人のフィラグリン遺伝子の全コーディング領域の配列を解析した結果、繰り返し配列の数の違い(11~13個)と配列の類似性によって、長さの異なる4つの主要な遺伝子型(A, B, Bs, C)に分類した。さらに2種類の新規ナンセンス変異(B型遺伝子の10番目の繰り返し配列にS2899Xをもたらす8666-8667CC>GAと、Bs型遺伝子の9番目の繰り返し配列にS3296Xをもたらす9887C>A)を2症例ずつ発見した。

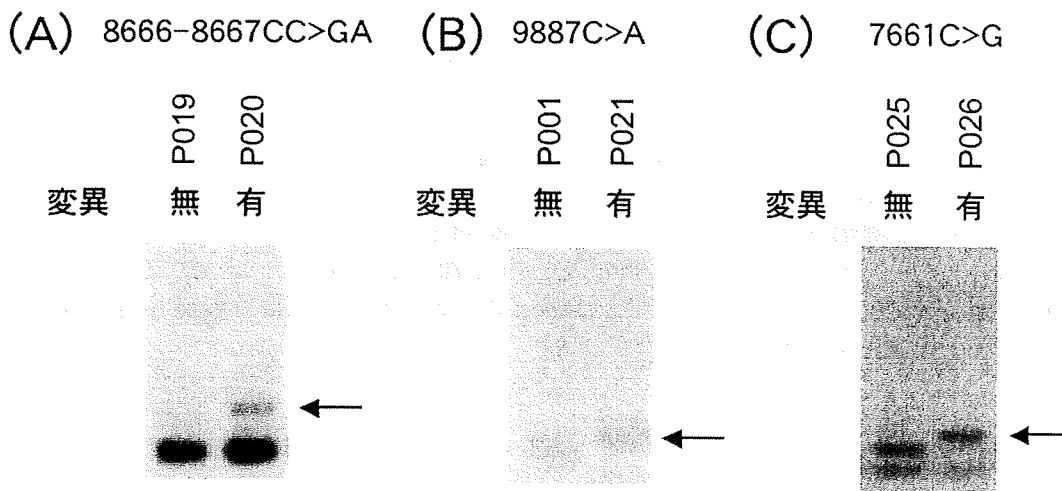


図2 日本人フィラグリン遺伝子の4種の遺伝子型と2種の新規ナンセンス変異
 日本人アトピー性皮膚炎患者24人のフィラグリン遺伝子の全コーディング領域の配列を解析した結果、繰り返し配列の数の違い(11~13個)と配列の類似性によって、長さの異なる4つの主要な遺伝子型(A, B, Bs, C)に分類された。さらに2種類の新規ナンセンス変異(B型遺伝子の10番目の繰り返し配列にS2899Xをもたらす8666-8667CC>GAと、Bs型遺伝子の9番目の繰り返し配列にS3296Xをもたらす9887C>A)を2症例ずつ発見した。

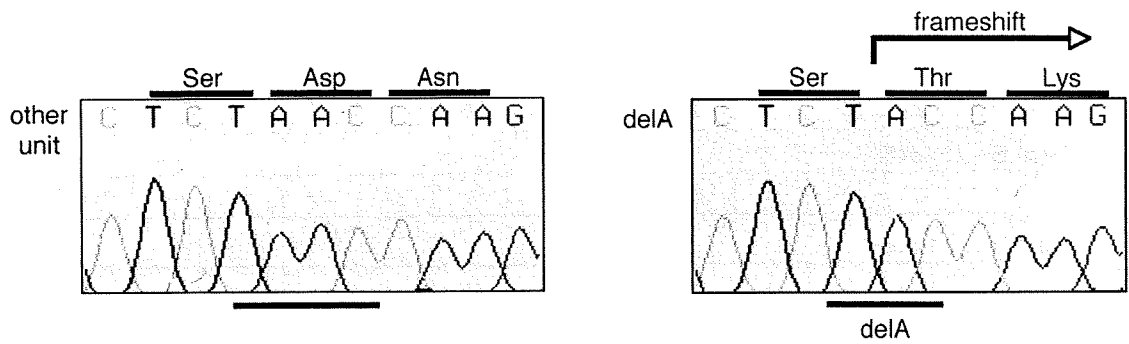


図3 マウス FLG-shotgun 法による *ft* マウスの *Flg^{ft}* 遺伝子変異の検出
ft マウスから Flg リピートを増幅し、576 サンプル(1152 リード)の塩基配列を決定した。その結果、4 組のプライマー由来の PCR 産物で同一の 1 塩基欠失(delA)を検出した。

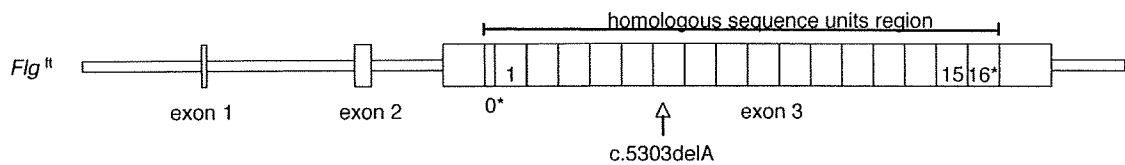


図4 *ft* マウスの *Flg^{ft}* 遺伝子の構造と変異の検出
ft マウスから作成された BAC クローン由来 *ft* マウス *Flg* 遺伝子 exon3 の配列と *ft* マウスゲノムから増幅されたエクソン 1、2 の配列を元に決定した *ft* マウスの *Flg^{ft}* 遺伝子構造。第 3 エクソンに 738~765bp からなる繰り返し配列を 15 単位(1~15)とその前後に不完全なリピート(0*及び 16*)を含んでいる。また、6 番目の繰り返し配列に 1 塩基欠失 (5303delA) を含んでいた。

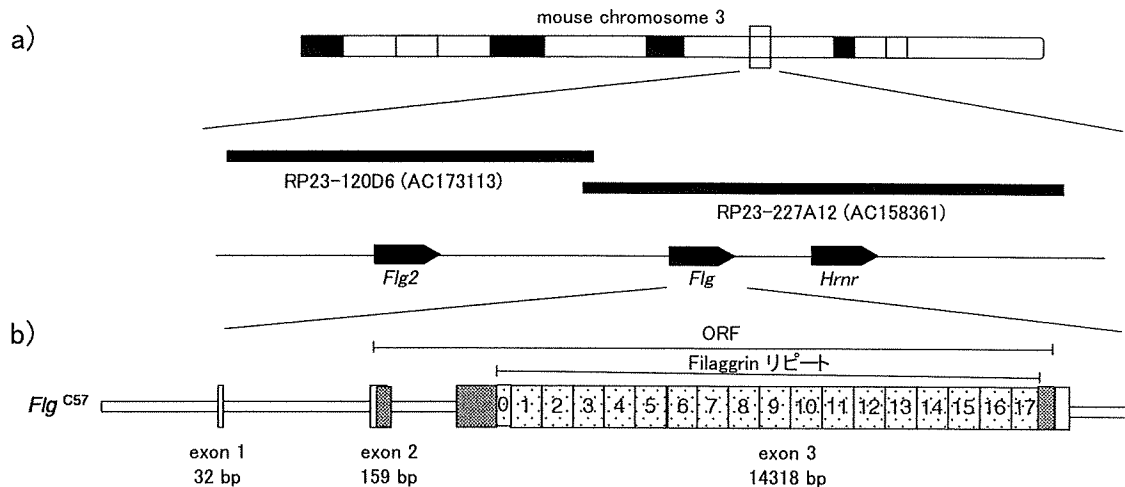


図5 C57BL/6 マウス *Flg* 遺伝子の構造解析

a) C57BL/6 マウス *Flg* 遺伝子はヒトと同様にマウス EDC 内の *Flg2* 遺伝子と *Hnrn* 遺伝子の間に位置し、BAC クローン RP23-227A12 の挿入断片中に存在する。

b) *Flg* 遺伝子は、3 エキソンから成る。エキソン 3 に *Flg* リピートが存在し、16 単位の 738-765bp の *Flg* リピート (1-16) と 2 単位の不完全な *Flg* リピート (0 及び 17) を含む。マウス BAC クローン RP23-227A12 からサブクローニングしたエキソン 3 のコーディング領域の塩基配列をトランスポゾンランダム挿入法を用いて決定した。データベースに登録された RP23-227A12 の塩基配列 (AC158361) と全体をひとつながりで比較すると非常に多くの塩基置換や欠失、挿入があり、結果としてエキソン 3 は 7bp 長くなり、14,318bp となった。

表1 FLG変異解析で用いたPCRプライマーと判定方法

FLG変異	PCRプライマー名	PCRプライマー塩基配列	判定方法
8666-8667CC>GA	FLGREPU8-841F	AGAAGTGAAGCAGAACAACAC	<i>Bam</i> HI切断
	FLGREP-215R	CCTGATTGTCTGGAGCTGTCTGCAGAGTGCC	
9887C>A	FLGREPU10-119F	TTCAGGAGCAGTCAAGGCAC	<i>Sau</i> 3AI切断
	FLGREPU10B-368R	GATGAAGCCTGTCTGCGCCGG	
7661C>G	FLGREPU7-849F	AAGCAGACAAACTCGTAACGAT	<i>Hpy</i> 188I切断
	FLGREPU8-46R	GTCCTGGCTAAAAGTGGATCCCCA	
3321delA, 3702delG	FLGREPU3-327F	CAGCTCCAGACACTCAGGCATTCC	DNA 配列決定
	FLGREP-965R1	CCCTGGCCCACCTGTGAGTGTCTAGA	
1537C>T	FLGREPU1-465F	CCACGGAAAGGCTGGGCTGAGA	<i>Nla</i> III 切断
	FLGREP-965R1	CCCTGGCCCACCTGTGAGTGTCTAGA	
2282del4	RPT1P7	AATAGGTCTGGACACTCAGGT	<i>Dra</i> III 切断
	RPT2P1	GGGAGGACTCAGACTGTTT	

表2 日本人AD患者 105人における7種のFLG変異解析結果

mutation	8666-8667CC>GA	9887C>A	7661>C/G	3321delA
簡便検出法	PCR/ <i>Bam</i> HI	PCR/ <i>Sau</i> 3AI	PCR/ <i>Hpy</i> 188I	PCR/Seq.
日本人AD患者	2/105 1.9%	3/105 2.9%	2/105 1.9%	0/105 0.0%

mutation	1537C>T	3702delG	2282del4
簡便検出法	PCR/ <i>Nla</i> III	PCR/Seq.	PCR/ <i>Dra</i> III
日本人AD患者	0/105 0.0%	0/105 0.0%	0/105 0.0%

簡易同定法によるアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析

研究分担者 海老原全 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師

研究要旨 本研究では日本人アトピー性皮膚炎患者 DNA を用いて、日本人特有のフィラグリン遺伝子変異のデータ蓄積を目指し、さらにそれらの臨床的な特徴に相関して高頻度に認められる遺伝子変異部位の傾向との関係(genotype-phenotype co-relation)について調べることを目的としている。これまでに我々はアトピー性皮膚炎患者 194 名の臨床データ、遺伝子解析データを蓄積しており、それらの比較検討を行った。フィラグリン遺伝子解析の結果、遺伝子タイプについては A/B 型が 43% (194 名中 83 名) と最多で、アレルとしては B type アレルが 59% (228/388) と最多であった。遺伝子変異解析では 4 種類すべてのアジア型遺伝子変異が認められ、ヨーロッパ型変異は見られず、その比率は患者全体のうちのおよそ 1 割で、8.8% (194 名中 17 名) であった。臨床型との相関についての解析を行った結果、皮疹の重症度、血液検査値、家族歴においては差が見られなかったが、喘息を含むアレルギー性疾患の既往が遺伝子変異群においてやや高い傾向にあること、遺伝子変異群において成人発症例が見られず、比較的早期に発症する傾向にあることがわかった。以上の結果から、日本人におけるアトピー性皮膚炎の発症にはフィラグリン遺伝子変異はある程度関与しているが、イングランド、アイルランドを中心としたヨーロッパ人種におけるアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異頻度と比較して、その頻度はそれほど高くなく、日本人におけるアトピー性皮膚炎の発症には、ヨーロッパ人種とは異なり、その他の因子がより深く関与しているのではないかと考えられた。

研究協力者

河野通良 日本予防医学協会リサーチレジデント

慶應義塾大学医学部皮膚科 共同研究員

工藤 純 慶應義塾大学医学部生命情報学センター 教授

佐々木貴史 慶應義塾大学医学部皮膚科 特任講師

川崎 洋 慶應義塾大学医学部皮膚科 大学院生

定平知江子 慶應義塾大学医学部皮膚科助教

れる遺伝子変異は欧米患者のものとは異なることが報告されており (J Allergy Clin Immunol 2007)、同じアジア系民族である中国人や韓国人の遺伝子解析結果においても同様の遺伝子変異が報告されている。異なる民族で見られる遺伝子変異部位の違いと病型の違いを解析することにより、皮膚バリア機能関連遺伝子変異とアトピー性皮膚炎の病態との関連についての研究が可能となると考えられるが、これまで日本人を含むアジア民族での大規模な遺伝子解析はいまだなされておらず、新たなデータの蓄積が望まれる。本研究では日本人特有のフィラグリン遺伝子変異のデータ蓄積を目指し、さらにアトピー性皮膚炎患者のうち乳幼児期から発症している症例、気管支喘息を併発している症例、成人発症例など臨床型の違いや、血清 IgE 値、好酸球数などと、それらの臨床的な特徴に相関して高頻度に認められる遺伝子変異部位の傾向との関係 (genotype-phenotype

A. 研究目的

これまでに McLean らにより、欧米の多くのアトピー性皮膚炎患者および気管支喘息患者がフィラグリン遺伝子に変異を持つことが明らかにされた (Nat Genet, 2007)。一方、野村らにより、日本人のアトピー性皮膚炎に見ら

co-relation)について調べることを目的としている。

B. 研究方法

フィラグリン遺伝子は972bp または975bpを一単位とする11~13回の繰り返し配列を持ち、その繰り返し配列の数により3つの主要な遺伝子型であるA type(11 repeats)、B type(13 repeats)、C type(12 repeats)に分類される。また、これまでにアトピー性皮膚炎患者において3種類のヨーロッパ型、4種類のアジア型遺伝子変異が同定されている。我々は、これまで慶應義塾大学病院皮膚科を受診されたアトピー性皮膚炎患者194名から採取された末梢血DNAを用いて、PCR、制限酵素処理、sequencingを組み合わせることで確立した簡易同定法により、フィラグリン遺伝子の主要な3種類の遺伝子型分類、および3種類のヨーロッパ型変異(R501X, 2282del14, 3702del1G)、4種類のアジア型遺伝子変異(S2899X, S3296X, S2554X, 3321del1G)についての解析を行った。さらに、これらの遺伝子型、遺伝子変異と患者の臨床型(発症時期や臨床経過、他のアレルギー疾患併発の有無、および血清IgE値、好酸球数、LDH値などの血液学的検査所見)との関連について検討を行った。

C. 研究結果

遺伝子型の解析結果では3つの主要な遺伝子型のうち、A/B型が43%(194名中83名)と最多で、アレルとしてはB typeアレルが59%(228/388)と最多であった(表1)。また、遺伝子変異の解析では4種類すべてのアジア型遺伝子変異が認められ、その比率は患者全体のおよそ1割で、8.8%(194名中17名)であった(表2)。ヨーロッパ型変異は認められなかった。全ての遺伝子変異群がB typeアレルを有していた。

次に遺伝子変異が認められた群と、認められなかった群との臨床型の違いについて検討を行った(表3)。発症時期に関する調査の結果、いずれの群でも乳幼児期の発症が最多で全体の7割以上を占め、両者に差は見られなかったが、大学生以降からの発症については、遺伝子変異をもたない群で15%(177名中26名)に認められたのに対し、遺伝子変異を有する群では6%(17名中1名)しか認められなかった(表3A)。既往歴について、喘息およびアレルギー性鼻炎、

結膜炎、蕁麻疹、薬剤または食物アレルギーなどのアレルギー性疾患の有無に関する検討したところ、遺伝子変異群では喘息、アレルギー性疾患ともにその頻度が若干高い傾向にあると考えられた(表3B)。家族歴に関する調査の結果、アトピー性皮膚炎、喘息の家族内発症頻度に差は見られなかった(表3C)。また、遺伝子変異が認められた群と、認められなかった群との間で、皮疹の重症度、血清IgE値、好酸球数、LDH値については大きな差は認められなかった(表4)。

D. 考察

現在までに194名のアトピー性皮膚炎患者の遺伝子解析を行った結果、全体の8.8%にあたる17名の患者に遺伝子変異が認められた。検出された変異はアジア型のみであり、ヨーロッパ型変異は認められなかった。アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子変異の有無と、臨床型との相関についての解析を行った結果、皮疹の重症度、血液検査値、家族歴においては差が見られなかったが、喘息を含むアレルギー性疾患の既往が遺伝子変異群においてやや高い傾向にあること、遺伝子変異群において成人発症例が見られず、比較的早期に発症する傾向にあることがわかった。

これまでに報告されてきたアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析は、おもにアイルランド、イングランドにおいて行われており、その頻度はおよそ半数近くであるとされてきた。一方、ドイツ、デンマークにおいて行われた解析結果ではいずれも1~2割程度の頻度であり、人種間によってその頻度にばらつきが見られる。また、2009年には日本人以外のアジア人種である中国人患者の遺伝子解析報告がなされており、それらの遺伝子変異頻度はいずれも1割程度であった。日本人患者の遺伝子解析は我々以外に国内の2つの施設で行われているが、それらの報告においてもその頻度はそれほど高くはなく、最も高いものでも27%であった。

以上のことから、日本人を含めたアジア人種におけるアトピー性皮膚炎の発症、臨床型の違いについてフィラグリン遺伝子変異はある程度関与しているが、アイルランド、イングランドを含むヨーロッパ人種とは異なり、その他の因子がより深く関与しているのではないかと考えられる。それを踏まえて、染色体1q21に

存在する遺伝子群である epidermal differentiation complex (EDC) にあるフィラグリン以外の皮膚バリア機能関連分子についての解析も行ったが、これまでのところロリクリン遺伝子に変異を持つ症例を1例認めているのみである。日本人のアトピー性皮膚炎発症の鍵となる分子はいまだ同定し得ていないが、これまでの研究報告から皮膚バリア機能とアトピー性皮膚炎発症との相関については疑いの余地はなく、これまでに蓄積したデータのさらなる解析により人種間の違いに関わる新たな皮膚バリア機能関連分子の同定を目指したいと考えている。

E. 結論

日本人アトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析の結果、アジア人種特有の変異のみが認められた。日本人のアトピー性皮膚炎の発症、臨床型の違いについてフィラグリン遺伝子変異はある程度関与しているが、その頻度はヨーロッパ人種と比較して低く、日本人を含むアジア人種ではアトピー性皮膚炎発症に関わるフィラグリン以外の因子がある可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 19-21 年度)

論文発表

1. Sasaki T, Kudoh J, Ebihara T, Shiohama A, Asakawa S, Shimizu A, Takayanagi A, Dekio I,

Sadahira C, Amagai M, Shimizu N: Sequence analysis of filaggrin gene by novel shotgun method in Japanese atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 51 (2): 113-120, 2008.

学会発表

1. 佐々木貴史, 工藤純, 海老原全, 塩濱愛子, 浅川修一, 高柳淳, 清水厚志, 渋谷和憲, 天谷雅行, 清水信義: アトピー性皮膚炎原因遺伝子フィラグリンの新規解読法の確立及び日本人集団におけるフィラグリン遺伝子変異の同定. 第14回日本遺伝子診療学会大会, 松山, 2007年7月
2. 佐々木貴史, 工藤純, 海老原全, 塩濱愛子, 浅川修一, 高柳淳, 清水厚志, 渋谷和憲, 天谷雅行, 清水信義: アトピー性皮膚炎原因遺伝子フィラグリンのshotgun法による変異解析. **BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)**, 横浜, 2007年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1

遺伝子型	人数	頻度
A/A	18/194	9%
A/B	83/194	43%
A/C	8/194	4%
B/B	63/194	32%
B/C	19/194	10%
C/C	3/194	2%

表 2

遺伝子変異		人数	頻度
Asian type	S2899X	8/194	4.1%
	S3296X	6/194	3.1%
	S2554X	2/194	1.0%
	3321delA	2/194	1.0%
European type	R501X	0/194	0%
	2284del4	0/194	0%
	3702delG	0/194	0%
total		17/194	8.8%

遺伝子型	アレル数	頻度
A	127/388	33%
B	228/388	59%
C	33/388	8%

表 1 上段：アトピー性皮膚炎患者 129 名のフィラグリン遺伝子型の分類

下段：A, B, C type 各アレルの頻度

表 2 アトピー性皮膚炎患者 129 名のフィラグリン遺伝子におけるアジア型、ヨーロッパ型変異の頻度