

200934039A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

アトピー性皮膚炎の予防・治療法の開発及び  
確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清 水 宏

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

アトピー性皮膚炎の予防・治療法の開発及び  
確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 宏

平成 22 (2010) 年 3 月

# 目次

I. 班員構成	1
II. 総括研究報告	
アトピー性皮膚炎の予防・治療法の開発及び確立に関する研究	3
研究代表者 清水 宏 (北海道大学)	
III. 分担研究報告	
1. フィラグリン変異を指標としたアトピー性皮膚炎 (AD) のテーラーメイド治療の確立	9
分担研究者 秋山真志 (北海道大学)	
2. フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発 (リードスルー治療)	12
分担研究者 有田 賢 (北海道大学)	
3. アトピー性皮膚炎に伴う気管支喘息発症の予防法の確立	16
分担研究者 戸倉新樹 (産業医科大学)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
V. 研究成果の刊行物・別刷	27

## I. 班員構成

## I 班員構成

研究者名		研究実施場所	職名	主な研究分担
研究代表者	清水 宏	北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科学分野	教授	研究の総括、症例集積、 各種治療法の有効性の 検討
研究分担者	戸倉 新樹	産業医科大学医学部 皮膚科学	教授	症例集積、各種治療法の 有効性の検討
	秋山 真志	北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科学分野	准教授	フィラグリン遺伝子変 異検索、各種治療法の有 効性の検討
	有田 賢	北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科学分野	助教	薬剤のリードスルー活 性の検索、モデルマウス 作成

## II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
総括研究報告書

アトピー性皮膚炎の予防・治療法の開発及び確立に関する研究

研究代表者 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 教授

**研究要旨** 近年の我々の研究によって、フィラグリン遺伝子変異が日本人アトピー性皮膚炎（以下、AD）の主要な病因であることが明らかになった。本研究は、この事実に基づき、①フィラグリン遺伝子変異の有無を指標としたADのテーラーメイド治療の確立、②フィラグリンをターゲットにしたADの新しい治療法（リードスルー治療）、予防法の開発を目指すものである。

本年度は、フィラグリン遺伝子変異の有無を指標としたADのテーラーメイド治療の確立に向けた症例集積を行った。また、フィラグリンをターゲットにしたADの新規治療法の開発（リードスルー治療）の第一段階として、G418、ゲンタマイシンの2薬剤を使い、リードスルー活性の測定システムを確立した。さらに、ADに伴う気管支喘息発症の予防法の開発のため、フィラグリン遺伝子変異と気管支喘息、ADとの相関、外因性ADとフィラグリン遺伝子変異との相関の調査を行った。

#### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎（Atopic dermatitis；以下、AD）は、極めて頻度の高い疾患でありながら、その病因は長らく不明であり、その治療はこれまでステロイド剤外用を中心とした対症療法に頼らざるを得ず、難治例では皮膚萎縮などのステロイドの副作用を高率に生じ、大きな社会問題となってきた。しかし、最近、我々のグループは、日本人AD患者の25%がフィラグリン遺伝子にナンセンス変異を、5%がフレームシフト変異を有していることを報告した。フィラグリンは表皮バリア機能に重要なタンパクであることから、フィラグリン変異による皮膚バリア機能の破綻が表皮への慢性抗原刺激を引き起こし、ADを発症させるものと推測されており、これまで未知であったADの病因の一部が初めて

明らかになった。

ADの病因の一部がフィラグリン遺伝子変異に伴う皮膚バリア機能の破綻であることが明らかにされた今、フィラグリン遺伝子変異保有群と非保有群の間に、外用ステロイドや保湿剤を初めとした種々の既存のAD治療薬に対する反応性の違いがある可能性があり、AD患者へその患者の状態に即したより効果的な治療を提供するという目的から、病因に応じたテーラーメイド治療への期待が高まっている。そこで、本研究では、ADの主要な病因の一つであるフィラグリン遺伝子変異の有無を指標としてADのテーラーメイド治療の確立を目指すこととし、本研究の1年目である本年度は、まず、症例のさらなる集積とフィラグリン遺伝子変異検索を行った。

さらに、本研究では、世界で初めて

の試みとして、フィラグリンをターゲットとしたアトピー性皮膚炎の新しい治療法として、AD患者の約25%が持つフィラグリン遺伝子に生じたナンセンス変異を読み飛ばすリードスルー治療の確立も目指す。リードスルー活性を持ち、現時点でヒトに投与可能な薬剤は、アミノグリコシド系抗生剤であるゲンタマイシンと、非抗生剤系で、現在米国で治験中の PTC124 がある。本研究では、まず、薬剤のリードスルー活性を測定可能なレポータージーンアッセイシステムを確立させ、*in vitro* で両剤のリードスルー活性を測定し、薬剤の至適濃度を決定することで、より安全で有効なリードスルー治療を確立することを目指す。本年度は、レポータージーンアッセイシステムの確立と、両剤のリードスルー活性の測定を行った。

また、AD は、血清 IgE 高値を特徴とする通常の外因性 AD と血清 IgE 値が正常な内因性 AD に分類することができる。このうち、外因性 AD は、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患を伴いやすいことが知られている。AD に伴うこうしたアレルギー疾患（特に気管支喘息）発症の予防法の確立に向けて、本研究の1年目である本年度は、外因性 AD の病因の解明と、気管支喘息とフィラグリン遺伝子変異との関連性の解明を目指した。

## B. 研究方法

1) フィラグリン遺伝子変異の有無を指標とした AD のテーラーメイド治療の確立

これまで日本人で同定されたフィラグリン遺伝子変異は、ナンセンス変

異とフレームシフト変異を合わせて7種類あり (R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、S2889X、S3296X)、当科で収集した AD192 検体と一般コントロール 134 検体を、これらの変異について、制限酵素切断とシークエンシングを用いてスクリーニングした。また、新規にリクルートした 19 人の AD 患者については、当科と英国ダンディー大学のグループで開発した独自のプライマーにより、すべてのエクソンについてシークエンスした。また、さらなる新規の日本人フィラグリン遺伝子変異を見出し、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との関連をより詳細に明らかにするため、家族歴を有する尋常性魚鱗癬患者の全国調査を開始した。フィラグリンは尋常性魚鱗癬の原因遺伝子であり、患者はほぼ 100%、フィラグリン変異を有している。具体的にはアンケート調査票を作成し、全国の皮膚科・小児科指導病院に対し、調査の依頼状を送付し、日本人におけるフィラグリン遺伝子変異の全体像の把握を目指した。

2) フィラグリンをターゲットにした AD の新規治療法の開発(リードスルー治療)

Site directed mutagenesis により、firefly luciferase 遺伝子に人工的に早期終止コドン (TGA) を作り、CMV プロモーターの下流に同遺伝子を組み込んだベクターを作成した。次に、同ベクターを AD293 細胞に transient transfection させ、ルシフェラーゼによる発光の度合いを検討、その後、同ベクターを用いて stable cell line を作成した。さらに、この細胞株を用



いて、リードスルー活性を持つ既知の薬剤 (G418 (注: 重大な副作用を持ち、人体には投与不可能)、ゲンタマイシン、PTC124 (米国で治験中の新規リードスルー薬剤)) について、その効果を評価した。

### 3) AD に伴う気管支喘息発症の予防法の確立

#### a. フィラグリン遺伝子変異と気管支喘息、AD との関連

これまで日本人で同定された 8 種類のフィラグリン遺伝子変異 (R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、S2889X、S3296X、K4022X) について、105 人の気管支喘息患者の DNA サンプルと一般コントロール 134 検体を、制限酵素切断とシーケンシングによりスクリーニングした。

#### b. 外因性 AD とフィラグリン遺伝子変異との関連

血清 IgE 値を指標に、7 人の AD 患者を外因性 AD と内因性 AD に分け、フィラグリン遺伝子変異の有無を①と同様の方法を用いて検討した。また、末梢血中の Th1 (interferon- $\gamma$  産生細胞)、Th2 細胞 (IL-4 産生細胞)、Th17 細胞 (IL-17 産生細胞) の割合の測定も合わせて行った。

### 4) 倫理面に対する配慮

本研究はヒト遺伝子解析、皮膚の生検、治療研究が行われるので、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益や危険性の排除、説明と理解 (インフォームドコンセント) に係わる状況を鑑み、患者、家族からの強い希望、同意があったときのみ施行した。また、すべての研究は実施期間での倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

#### 1) フィラグリン遺伝子変異の有無を指標とした AD のテーラーメイド治療の確立に向けた症例集積

北海道大学病院皮膚科を中心に収集した AD 患者 192 人分の DNA サンプルを、前述の既報告変異 7 種についてスクリーニングしたところ、各変異の保有人数、保有率は、①R501X : 0 人、②3321delA : 9 人 (約 5%)、③S1695X : 0 人、④Q1701X : 3 人 (約 2%)、⑤S2554X : 9 人 (約 5%)、⑥S2889X : 23 人 (約 12%)、⑦S3296X : 7 人 (約 4%) であった。一方、コントロール群では、①R501X : 0 人、②3321delA : 1 人 (約 0.75%)、③S1695X : 1 人 (約 0.75%)、④Q1701X : 0 人、⑤S2554X : 1 人 (約 0.75%)、⑥S2889X : 2 人 (約 1.5%)、⑦S3296X : 0 人であった。また、新規 AD 患者のシーケンスにより、これまで未報告の新規変異 K4022X の同定に成功した。この変異は AD 患者 148 人中 3 人 (約 2%) が有しているのに対し、コントロール群では誰も有していなかった。確実にフィラグリン変異を有している尋常性魚鱗癬家系については現在全国から収集中であり、適宜解析を行う予定である。

#### 2) フィラグリンをターゲットにした AD の新規治療法の開発 (リードスルー治療)

ベクターをトランスフェクションさせたところ、強力なリードスルー薬である G418 投与前にはルシフェラーゼによる発光がほとんど見られないのに対し、投与後には投与前と比べて数十倍の発光を認め、G418 の濃度依存性にシグナルの増加を認めた。同ベクターを恒常的に組み込んだ細胞株でも

同様の結果が得られ、G418 投与前と投与後では、ルシフェラーゼによる発光に数十倍の差が認められた。また、ゲンタマイシンでは約 10 倍弱、PTC124 では約 2 倍弱の発光の増加を認めた。

### 3) AD に伴う気管支喘息発症の予防法の確立

#### a. フィラグリン遺伝子変異と気管支喘息、AD との相関

105 人の気管支喘息患者のうち、13 人が AD を有しており、そのうちの 2 人がフィラグリン遺伝子変異を有していた (約 15.4%)。また、AD を持たない 92 人の気管支喘息患者のうち、5 人がフィラグリン遺伝子変異を有していた (約 5.4%)。

#### b. 外因性 AD とフィラグリン遺伝子変異との相関

4 人の外因性 AD 患者のうち 3 人がフィラグリン遺伝子変異 (患者 1: heterozygous for S2889X、患者 2: compound heterozygous for 3321delA and S2889X、患者 3: heterozygous for S3296X、患者 4: 変異なし) を有していたのに対し、3 人の内因性 AD 患者はいずれのフィラグリン遺伝子変異も有していなかった。末梢血中 Th2 細胞、Th17 細胞割合は、外因性と内因性間で有意差は無かったが、Th1 細胞割合は内因性 AD 患者で増加していた。

## D. 考察

### 1) フィラグリン遺伝子変異の有無を指標とした AD のテーラーメイド治療の確立

AD 患者のフィラグリン変異保有率は約 30%であり、今後、AD の症例 (特にフィラグリン遺伝子変異関連 AD) を

さらに蓄積することで、AD のテーラーメイド治療の開発に向けた各種治療の介入試験に必要な症例数を確保することが可能であると考えられる。現在、全国の主要な皮膚科及び小児科施設の協力の下、積極的にフィラグリン遺伝子変異関連 AD 症例の集積を進めており、介入試験に向けての基盤は着実に固まりつつある (万一、症例数が不足した場合に備えて、札幌市内の小学児童を対象としてサンプルを収集することも既に検討している)。

### 2) フィラグリンをターゲットにした AD の新規治療法の開発 (リードスルー治療)

AD に対する新しい治療の開発に向けては、ゲンタマイシン投与により、約 10 倍弱のリードスルー活性の増加が認められ、ゲンタマイシン外用がフィラグリン遺伝子にナンセンス変異を持つ AD への新しい治療法になりうることを示唆された。また、我々の確立した早期終始コドン (TGA) を持つ細胞株は、極めて微量のルシフェラーゼしか発現していない一方、G418 による読み飛ばし (リードスルー) により、ルシフェラーゼによる発光が大幅に増すことを確認した。よって、このアッセイ系は、リードスルー効果の検出に有用であり、G418 をポジティブコントロールとして、今後、薬剤の大規模スクリーニングを行うことが可能である。

### 3) AD に伴う気管支喘息発症の予防法の確立

AD に続発する気管支喘息とフィラグリン遺伝子変異との間に有意な相関関係が認められた。また、現時点で

の症例数は少ないものの、外因性 AD とフィラグリン遺伝子変異との間に正の相関関係がある可能性が高く、これはフィラグリン遺伝子変異に伴う表皮バリア障害が、アレルギー性である外因性 AD の発症に大きく関わっていることを示唆している。さらに、Th2 細胞と Th17 細胞をアレルギー発症の主体とする外因性 AD はバリア障害に基づく蛋白抗原の曝露が関与し、Th1 細胞がより関わる内因性 AD では蛋白抗原以外の抗原、例えば金属等が発症に関わっている可能性も示唆された。

## E. 結語

AD のテーラーメイド治療の確立を目指し、本年度は 3 年計画の 1 年目として、AD 症例の集積とフィラグリン遺伝子変異検索を精力的に行った。結果、AD 患者の一部に新規フィラグリン遺伝子変異を同定し、既知の変異を含めた 8 種類のフィラグリン遺伝子変異の保有率は、約 30%であった。来年度から計画している介入試験の実施に向けて、全国の皮膚科・小児科施設の協力の下、現在、症例のさらなる集積を積極的に進めている。

AD に対する新しい治療の開発に向けては、ゲンタマイシンが *in vitro* で高いリードスルー活性を有することを明らかにした。本研究の 2 年目では、ゲンタマイシンのリードスルー効果を *in vivo* で検討していく。また、我々は、リードスルー活性を検出可能なレポータージーンアッセイシステムを確立した。ゲンタマイシンの *in vivo* での効果が不十分な場合、このレポータージーンアッセイを用いて、英国ダンディー大学のグループと共同で新規リードスルー薬剤の大規模ス

クリーニングを行うことも可能であり、より安全かつより強力なリードスルー薬の開発を引き続き目指していく。これにより、AD 患者皮膚でのフィラグリンの発現そのものを増やすことで正常な角層形成を促し、バリア機能を是正するという、従来の治療法とは全く異なる独創的な治療法の開発が可能となることが期待される。

また、日本人 AD 患者に続発する気管支喘息がフィラグリン遺伝子変異と有意に相関することを本邦で初めて示すことができた。この事実は、フィラグリン遺伝子変異に伴う表皮バリア機能を改善することで AD のみならず、AD に続発する気管支喘息の発症を予防できる可能性が高いことを示唆しており、同症の予防に向けた介入試験に備えて、今後、症例のさらなる集積を継続していく。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

## H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

### Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

フィラグリン変異を指標としたアトピー性皮膚炎（AD）の  
テーラーメイド治療の確立

研究分担者 秋山真志 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 准教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎(AD)患者を、フィラグリン遺伝子変異関連アトピーとフィラグリン遺伝子非関連アトピーに分け、既存の治療による効果に差が見られるかどうか検討することで、ADに対するテーラーメイド治療の確立が可能である。我々は、AD患者192人から得られたDNAをシークエンスし、その26%にフィラグリン遺伝子変異を同定した。また、新規変異の同定にも成功した。この結果をもとに、来年度以降、介入試験を行う予定である。

**A. 目的**

ADは、大変頻度の高い疾患でありながら、その病因は長らく不明であり、その治療はこれまでステロイド剤外用を中心とした対症療法に頼らざるを得ず、難治例では皮膚萎縮などのステロイドの副作用を高率に生じ、大きな社会問題となってきた。しかし、最近、我々のグループは、日本人AD患者の約20-30%がフィラグリン遺伝子にナンセンス変異、フレームシフト変異を持つことを報告した。この研究結果により、フィラグリン遺伝子変異による皮膚バリア機能の破綻がADの主要な病因の一つであることが明らかになり、ADを病因に基づいて分類することが初めて可能となった。そこで、本研究では、皮膚バリア機能の破綻に伴う慢性抗原刺激がADの主要な病因であるという、新しい知見をもとに、世界で初の試みとなる、フィラグリン遺伝子変異の有無を指標としたADのテーラーメイド治療の確立を目指すこととし、本年度はまず症例の集積とフィラグリン遺伝子変異検索を行っ

た。

**B. 研究方法**

これまで日本人で同定されたフィラグリン遺伝子変異は、ナンセンス変異とフレームシフト変異を合わせて7種類あり（R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、S2889X、S3296X）、当科で収集したAD192検体と一般コントロール134検体を、これらの変異について、制限酵素切断とシークエンスを用いてスクリーニングした。また、新規にリクルートした19人のAD患者については、当科と英国ダンディー大学のグループで開発した独自のプライマーにより、すべてのエクソンをシークエンスした。なお、本研究は、ヒト遺伝子解析を含むため、倫理的配慮と研究対象者に対する十分なインフォームドコンセントの下、施行した。

**C. 研究結果**

AD患者192人を、前述の既報告変異7種についてスクリーニングしたところ、各変異の保有人数、保有率は、①

R501X:0人、②3321delA:9人(約5%)、③S1695X:0人、④Q1701X:3人(約2%)、⑤S2554X:9人(約5%)、⑥S2889X:23人(約12%)、⑦S3296X:7人(約4%)であった。一方、コントロール群では、①R501X:0人、②3321delA:1人(約0.75%)、③S1695X:1人(約0.75%)、④Q1701X:0人、⑤S2554X:1人(約0.75%)、⑥S2889X:2人(約1.5%)、⑦S3296X:0人であった(図1)。また、新規AD患者のシーケンスにより、これまで未報告の新規変異K4022Xを同定することに成功した。この変異はAD患者192人中4人(約2%)が有しているのに対し、コントロール群では誰も有していなかった。

#### D. 考察

AD患者のフィラグリン変異保有率は約26%であり、今後、AD症例(特にフィラグリン遺伝子変異関連AD)をさらに蓄積することで、ADのテーラーメイド治療の開発に向けた各種治療の介入試験に必要な症例数を確保することが可能であると考えられる。現在、全国の主要な皮膚科及び小児科施設の協力の下、積極的にフィラグリン遺伝子変異関連AD症例の集積を進めており、介入試験に向けての基盤は着実に固まりつつある。また、フィラグリン遺伝子の新規変異の同定は、フィラグリン遺伝子変異関連AD患者を非関連ADと誤診するのを防ぐことから、フィラグリン遺伝子変異を指標としたAD患者の正確な振り分けに極めて重要である。日本人では極めて稀なR501Xを除く、7つのフィラグリン遺伝子変異すべてが当科で初めて同定されており、今後も新規変異の同定を精力的に進めていく予定である。

#### E. 結論

AD患者の一部に新規フィラグリン遺伝子変異を同定した。既知の変異を含めた8種類のフィラグリン遺伝子変異の保有率は、約30%であった。本研究2-3年目での介入試験の実施に向けて、現在、症例のさらなる集積を積極的に進めている。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

論文1)

Hasebe-Nemoto I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean WH, Shimizu H:

Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-related eczema.

J Invest Dermatol, 129: 682-689, 2009.

論文2)

Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, Palmer CN, Smith FJ, McLean WH, Shimizu H:

Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis.

J Invest Dermatol, 129: 1302-1305, 2009.

論文3)

Hsu CK, Akiyama M,

Nemoto-Hasebe I, Nomura T,

Sandilands A, Chao SC, Lee JYY,

Sheu HM, McLean WHI, Shimizu H:

Analysis of Taiwanese ichthyosis vulgaris families further demonstrates differences in FLG mutations between European and Asian populations.  
Br J Dermatol, 161: 448-451, 2009.

論文 4)

Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean WH, Shimizu H:  
FLG mutation p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese patients with

atopic eczema.  
Br J Dermatol, 161: 1387-1390, 2009.

論文 5)

Akiyama M:  
FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics.  
Br J Dermatol (in press)

H. 知的財産の出願・登録状況  
特になし

Genotypes	R501X		3321delA		S1695X		Q1701X		S2554X		S2889X		S3296X		K4022X		Combined		AD (total)
	Con	AD	Con	AD	Con	AD	Con	AD	Con	AD	Con	AD	Con	AD	Con	AD	Con	AD	
AA	134	192	133	183	133	192	134	189	133	183	132	169	134	185	134	188	129	142	
Aa	0	0	1	9	1	0	0	3	1	9	2	23	0	7	0	4	5	45	
aa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
total	134	192	134	192	134	192	134	192	134	192	134	192	134	192	134	192	134	192	

AD, atopic dermatitis; Con, general controls; AA, wild type for any FLG mutations; Aa, heterozygous; aa, homozygous.

図1. 日本人AD患者とフィラグリン遺伝子変異  
日本人AD患者の約26%がフィラグリン遺伝子変異を有する。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

フィラグリンをターゲットにした  
アトピー性皮膚炎の新規治療法の開発（リードスルー治療）

研究分担者 有田 賢 北海道大学大学院医学研究科・皮膚科学分野 助教

**研究要旨** アトピー性皮膚炎(AD)患者の約4人に1人がフィラグリン遺伝子にナンセンス変異を持つことから、このナンセンス変異をターゲットに、フィラグリンの発現を増やす、「リードスルー治療」を考案した。我々は、リードスルー活性を客観的に定量化できるレポータージーンアッセイシステムを確立し、ゲンタマイシンがTGA終止コドンに対し、*in vitro*で高いリードスルー活性を持つことを明らかにした。

#### A. 目的

最近、我々のグループは、AD患者の約25%がフィラグリン遺伝子にナンセンス変異を、約5%がフレームシフト変異を有していることを明らかにした。フィラグリンは表皮バリア機能に重要なタンパクであることから、フィラグリン遺伝子変異による皮膚バリア機能の破綻が表皮への慢性抗原刺激を引き起こし、アトピー性皮膚炎を発症させるものと推測されている。本研究では、フィラグリンをターゲットとしたアトピー性皮膚炎の新しい治療として、フィラグリン遺伝子に生じたナンセンス変異を読み飛ばすリードスルー治療の確立を目指す。現時点で、リードスルー活性を持ち、ヒトに投与可能な薬剤は、アミノグリコシド系抗生剤であるゲンタマイシンと、非抗生剤系で、現在米国で治験中のPTC124があり、本研究では、まず、薬剤のリードスルー活性を測定可能なレポータージーンアッセイシステムを確立させ、*in vitro*で両者のリードスルー活性を測定し、薬剤の至適濃度を決定

することで、より安全で有効なリードスルー治療を確立することを目指す。

#### B. 研究方法

Site directed mutagenesisにより、firefly luciferase 遺伝子に人工的に早期終止コドン(TGA)を作り、CMVプロモーターの下流に同遺伝子を組み込んだベクターを作成した。次に、同ベクターをAD293細胞にtransient transfectionさせ、ルシフェラーゼによる発光の度合いを検討、その後、同ベクターを用いてstable cell lineを作成した。さらに、この細胞株を用いて、リードスルー活性を持つ既知の薬剤(G418(注:重大な副作用を持ち、人体には投与不可能)、ゲンタマイシン、PTC124(米国で治験中の新規リードスルー薬剤))について、その効果を評価した。

#### C. 研究成果

ベクターをトランスフェクションさせたところ、強力なリードスルー薬であるG418投与前にはルシフェラー



ゼによる発光がほとんど見られないのに対し、投与後には投与前と比べて数十倍の発光を認め、G418 の濃度依存性にシグナルの増加を認めた。同ベクターを恒常的に組み込んだ細胞株でも同様の結果が得られ、G418 投与前と投与後では、ルシフェラーゼによる発光に 100 倍以上の差が認められた (図 2)。また、ゲンタマイシンでは約 10 倍弱 (図 3)、PTC124 では約 2 倍弱 (図 4) の発光の増加を認めた。

#### D. 考察

ゲンタマイシン投与により、約 10 倍弱のリードスルー活性の増加が認められ、ゲンタマイシン外用がフィラグリーン遺伝子にナンセンス変異を持つ AD への新しい治療法になりうる事が示唆された。また、我々の確立した早期終始コドン (TGA) を持つ細胞株は、極めて微量のルシフェラーゼしか発現していない一方、G418 による読み飛ばし (リードスルー) により、ルシフェラーゼによる発光が大幅に増すことを確認した。よって、このアッセイ系は、リードスルー効果の検出に有用であり、G418 をポジティブコントロールとして、今後、薬剤の大規模ス

クリーニングを行うことが可能である。

#### E. 結論

ゲンタマイシンが *in vitro* で高いリードスルー活性を有することを明らかにした。本研究の 2 年目では、ゲンタマイシンのリードスルー効果を *in vivo* で検討していく。また、我々は、リードスルー活性を検出可能なレポーター遺伝子アッセイシステムを確立した。ゲンタマイシンの *in vivo* での効果が不十分な場合、このレポーター遺伝子アッセイを用いて、英国ダンディー大学のグループと共同で新規リードスルー薬剤の大規模スクリーニングを行うことも可能であり、より安全かつより強力なリードスルー薬の開発を引き続き目指していく。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

論文の投稿準備中。

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

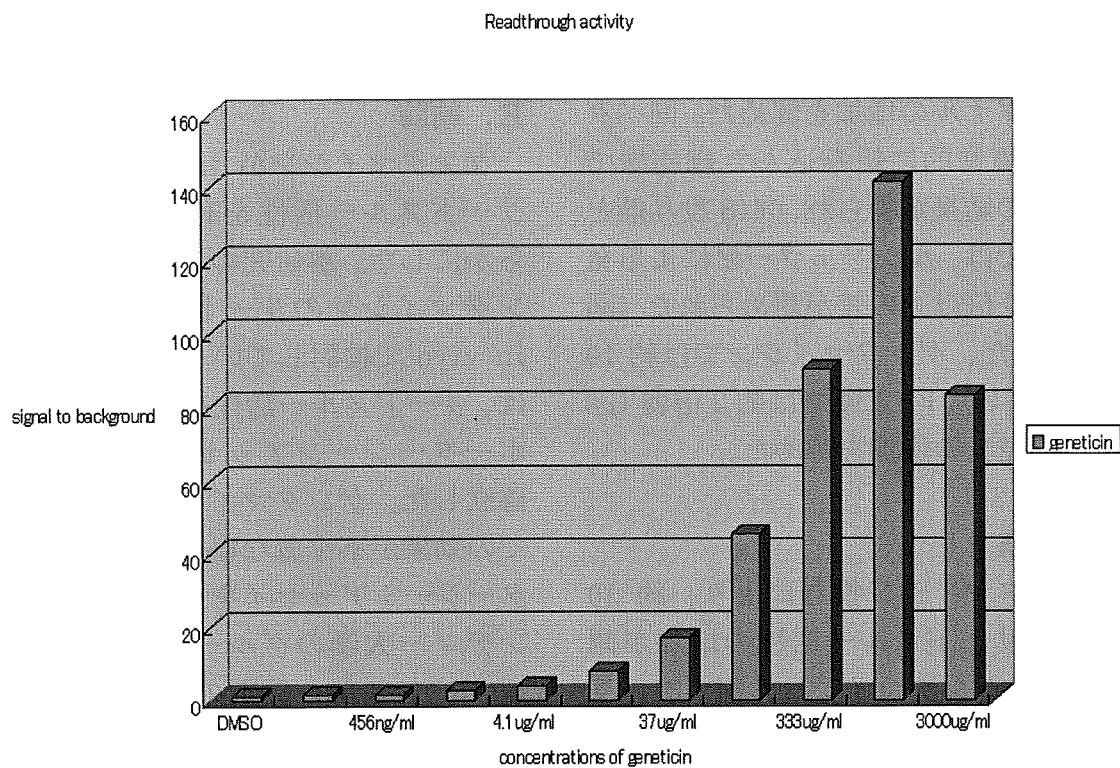


図 2. G418(geneticin)のリードスルー活性  
G418 は最大で 100 倍以上の高いリード活性を有する。

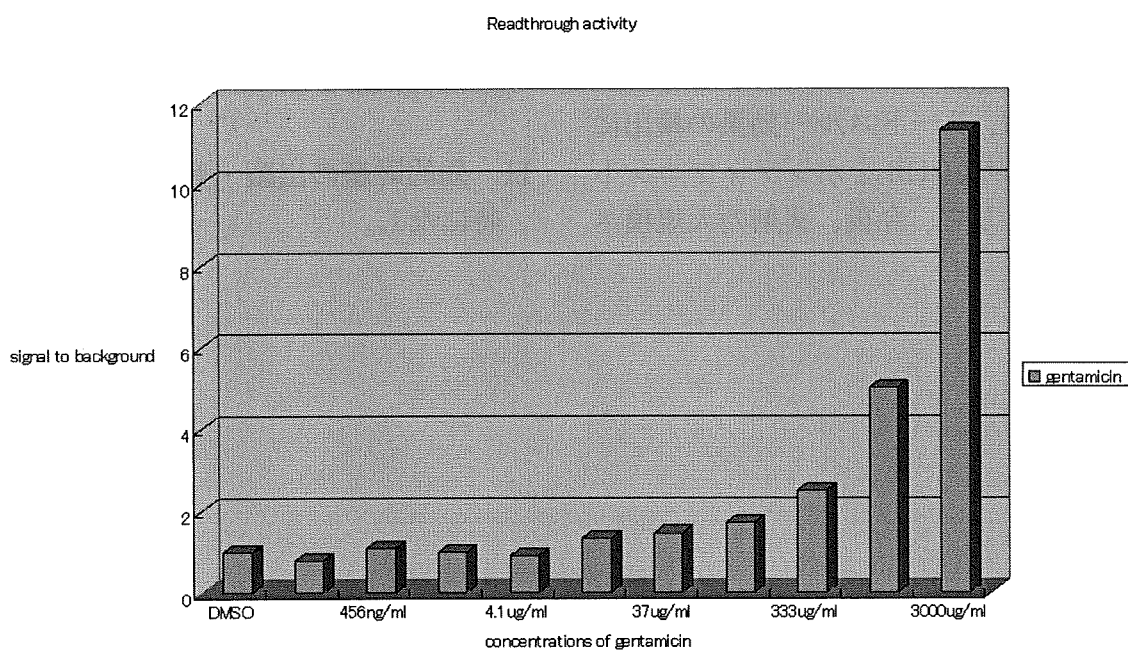


図 3. ゲンタマイシンのリードスルー活性  
ゲンタマイシンは最大で約 10 倍のリード活性を有する。

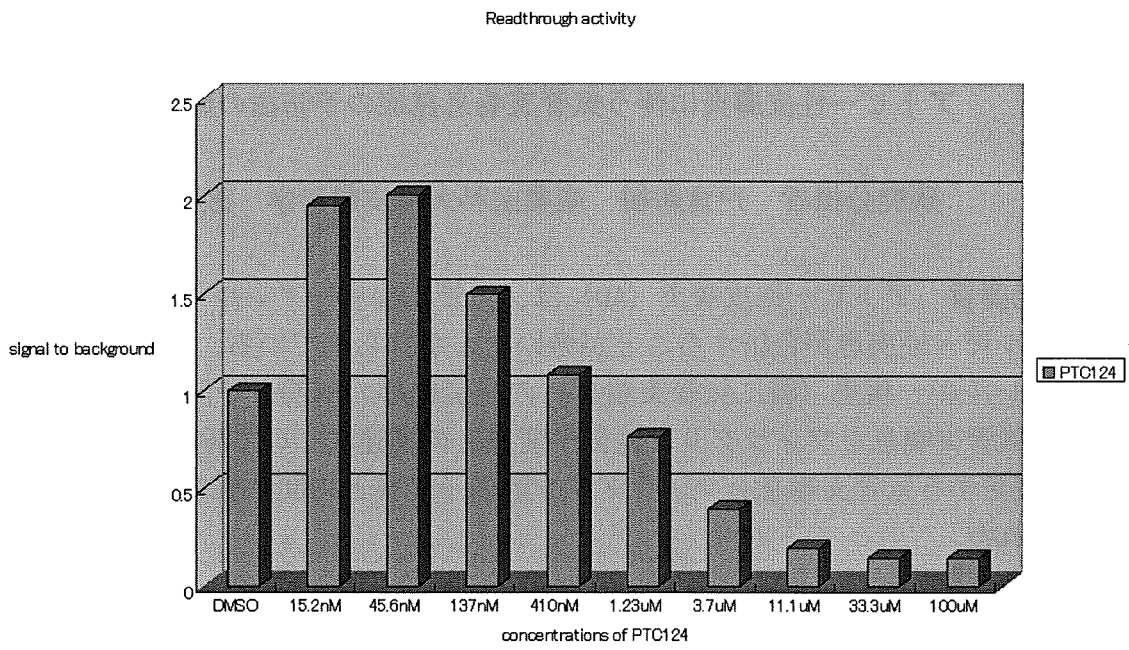


図4. PTC124 のリードスルー活性

PTC124 は最大でも約2倍弱の弱いリード活性しか有さない。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

アトピー性皮膚炎に伴う気管支喘息発症の予防法の確立

研究分担者 戸倉新樹 産業医科大学皮膚科学 教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎（AD）は、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患が合併することが多いことが知られている。ADに伴うこれらのアレルギー疾患（特に気管支喘息）の発症機序の解明と予防法の確立に向けて、気管支喘息とフィラグリン遺伝子変異との関連について検討したところ、ADに続発する気管支喘息とフィラグリン遺伝子変異との間に有意な相関関係が認められた。

**A. 目的**

ADは、血清IgE高値を特徴とする通常の外因性ADと血清IgE値が正常な内因性ADに分類することができる。このうち、外因性ADは、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患を伴いやすいことが知られている。ADに伴うこうしたアレルギー疾患（特に気管支喘息）発症の予防法の確立に向けて、本研究の1年目である本年度は、外因性ADの病因の解明と、気管支喘息とフィラグリン遺伝子変異との関連性の解明を目指した。

**B. 研究方法**

1) フィラグリン遺伝子変異と気管支喘息、AD  
これまで日本人で同定された8種類のフィラグリン遺伝子変異（R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、S2889X、S3296X、K4022X）について、105人の気管支喘息患者のDNAサンプルと一般コントロール134検体を、制限酵素切断とシーケンシングによりスクリーニングした。

2) 外因性ADとフィラグリン遺伝子変異

血清IgE値を指標に、7人のAD患者を外因性ADと内因性ADに分け、フィラグリン遺伝子変異の有無を①と同様の方法を用いて検討した。また、末梢血中のTh1（interferon- $\gamma$ 産生細胞）、Th2細胞（IL-4産生細胞）、Th17細胞（IL-17産生細胞）の割合の測定も合わせて行った。

**C. 研究結果**

1) フィラグリン遺伝子変異と気管支喘息、AD

105人の気管支喘息患者のうち、13人がADを有しており、そのうちの2人がフィラグリン遺伝子変異を有していた（約15.4%）。また、ADを持たない92人の気管支喘息患者のうち、5人がフィラグリン遺伝子変異を有していた（約5.4%）。

2) 外因性ADとフィラグリン遺伝子変異

4人の外因性AD患者のうち3人がフィラグリン遺伝子変異（患者1：