

201023026A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清 水 宏

平成 23 (2011) 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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 宏

平成 23 (2011) 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 |
| 研究分担者 秋山真志 (名古屋大学) | |
| 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 |
| 研究分担者 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 | 15 |
| 研究分担者 戸倉新樹 (浜松医科大学) | |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 17 |
| V. 研究成果の刊行物・別刷 | 25 |

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 | 浜松医科大学医学部 皮膚科学講座 | 教授 | 症例集積、各種治療法の 有効性の検討 |
| | 秋山 真志 | 名古屋大学 大学院医学系研究科 皮膚病態学分野 | 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）に向けて、リードスルー活性を測定するアッセイシステムを確立し、約20,000個のcompoundの購入も行い、来年度に施行予定のdrug screeningの基盤作りを終えることができた。さらに、ADに伴う気管支喘息発症の予防法の確立に向けて、本年度は、喘息を伴いやすい外因性ADと伴いにくい内因性ADの差異について検討した。

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患者の約20%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。本研究では、これらの最新の知見に基づいて、ADに対する新しい治療法として、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、予防法の確立を目指す。

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始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、本年度もさらなる症例の集積とフィラグリン遺伝子変異検索を行った。

本研究では、さらに、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 20%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。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 のみであり、本研究では、薬剤のリードスルー活性を測定可能なレポーター遺伝子アッセイシステムを確立させ、大規模薬剤スクリーニングによる新たなリードスルー薬の開発を目指し、より安全で有効なリードスルー治療を確立する。我々は、昨年度、ルシフェラーゼアッセイを用いて、薬剤のリードスルー活性を測定可能なレポーター遺伝子アッセイシステムを構築し、G418 とゲンタマイシンが高いリードスルー活性を有していることを示した。しかし、最近、ルシフェラーゼアッセイによる偽陽性率の高さが相次いで報告されたため、本年度は、より信頼度の高いアッセイとして、yellow fluorescent protein (YFP)を用いたアッセイシステムを構築し、リード

スルー薬の開発を目指すことにした。

また、AD は、血清 IgE 高値を特徴とするアレルギー性の外因性ADと血清 IgE 値が正常な非アレルギー性の内因性ADに分類することができる。このうち、外因性ADは、2 次性に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 2 次性アレルギー疾患（特に気管支喘息）発症の予防法の確立に向けて、本研究の 2 年目である本年度は、これまで十分に明らかになっていなかった外因性ADと内因性ADの病因の解明を目指し、フィラグリン遺伝子変異、皮膚バリア機能、ヘルパーT細胞局在、金属アレルギーなどに着目し、両者の違いを検討した。

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8種類あり (R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、S2889X、S3296X、K4022X)、当科で収集したAD228 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、制限酵素切断とダイレクトシーケンシングを用いてスクリーニングした。また、新規フィラグリン遺伝子変異同定のため、全国の主要な皮膚科施設に依頼書を送付し、尋常性魚鱗癬患者DNAの収集に関して協力を仰ぎ、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。新規にリクルートした10

人の尋常性魚鱗癬患者については、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。

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)

ケラチン6A遺伝子とYFP遺伝子を融合させたのち、site directed mutagenesisにより、ケラチン6A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融合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、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))にて24時間治療し、Western blot法にてケラチン6A/YFPのタンパク量を比較した。なお、陰性コントロールには、DMSO(1%)を用いた。

3) 外因性ADと内因性ADの差異についての解析

46人の外因性AD患者(age, 30.5±13.2; M 19, F 27; IgE, 8,055±10,373 kU/l; SCORAD, 35.4; LDH, 260 IU/l; eosinophils, 8.8%; and VAS of pruritus, 54.2)と26人の内因性AD患者(age, 31.6±11.6; M 8, F 18; IgE, 125±108 U/ml; SCORAD, 30.2; LDH, 213 IU/l; eosinophils, 6.1%; and VAS of pruritus, 51.9)を対象とした。患者末梢血からDNAを抽出し、日本人でこれまで見

つかっている8種類のフィラグリン遺伝子変異についてスクリーニングした(外因性AD18症例、内因性AD22症例)。バリア機能については、経皮的水分喪失量(TEWL)と角質水分量を測定した。ヘルパーT細胞局在については、フローサイトメトリーを用いて、Th1、Th2、Th17細胞数を測定した。金属アレルギーについては、ニッケル・コバルト・クロムなど17種類の金属についてパッチテストを施行した。

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228人分のDNAサンプルを、前述の既報告変異8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: 11人(約4.8%)、③S1695X: 0人、④Q1701X: 3人(約1.3%)、⑤S2554X: 12人(約5.3%)、⑥S2889X: 26人(約11.4%)、⑦S3296X: 7人(約3.1%)、⑧K4022X: 5人(約2.2%)であった。一方、コン

トロール群での各変異の保有人数、保有率は、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、⑧K4022X : 0 人であった。また、新規尋常性魚鱗癬患者のシーケンスにより、これまで未報告の新規変異 X (repeat 5 に存在するナンセンス変異) を同定することに成功し、この変異は AD 患者でも 1 人が保有していた。

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)

ルシフェラーゼアッセイでは、G418 投与前後でルシフェラーゼによる発光に数十倍の差が認められ、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。一方、今回新たに確立した YFP アッセイでは、G418 投与群では、高いリードスルー活性を認めたが、ゲンタマイシン投与群と PTC124 投与群ではほとんどリードスルー活性を認めなかった。

3) 外因性 AD と内因性 AD の差異についての解析

a. フィラグリン遺伝子変異

外因性 AD 患者 18 人のうち、8 人がフィラグリン遺伝子変異を有していた (44.4%)。一方、内因性 AD 患者では、22 人中 2 人しか変異を有しておらず (9.1%)、両者の間には統計学的に有意な差を認めた ($P=0.0246$)。

b. 皮膚バリア機能

外因性 AD では、内因性 AD と比べ、TEWL が有意に高く、角質水分量も前

者のほうが有意に低かった。

c. 末梢血ヘルパー T 細胞局在
内因性 AD では、外因性 AD と比して、IFN- γ 陽性 Th1 細胞が増加していた。

d. 金属アレルギー

内因性 AD のほうが、外因性 AD と比べて、コバルトに対する金属アレルギー陽性率が有意に高かった (52.9% vs 10.5%)。

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 25%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、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)。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、8 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。

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)

我々は、昨年度、リードスルー治療の開発に向けて、ルシフェラーゼアッセイを用いて、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構築することに成功し、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した。しかし、今回新たに作成した YFP アッセイではゲンタマイシンによるリードスルー活性をほとんど認めず、ゲンタマイシンに代わる新たなリードスルー薬の開発が必要であることが示唆された。また、我々が今回確立した早期終止コドン (TGA) を持つ細胞株は、極めて微量の YFP 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 YFP の発現が大幅に増すことを確認した。我々はすでに約 2 万種類の compound library を購入しており、このアッセイ系を用いて、来年度、リードスルー薬の開発に向けた大規模スクリーニングを行う予定である。

3) 外因性 AD と内因性 AD の差異についての解析

我々は外因性 AD と内因性 AD の差異を明らかにすることに成功した。内因性 AD は外因性 AD と異なり、フィラグリン遺伝子変異の頻度が低く、バリア機能も正常である。また、IFN- γ 陽性 Th1 細胞が増加し、金属アレルギー陽性率が高い。これらの事実は、内因性 AD では皮膚バリア機能は正常で

あり、タンパク抗原が皮膚に侵入し、AD の病変を形成している可能性は低く、金属などの非タンパク抗原が病態に関与している可能性を強く示唆している。

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 2 年目として、AD および尋常性魚鱗癬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、尋常性魚鱗癬患者の一部に新規フィラグリン遺伝子変異を同定することに成功し、AD 患者の、既知の変異を含めた 9 種類のフィラグリン遺伝子変異保有率は、約 26%であった。本研究 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。

リードスルー治療については、現時点では、リードスルー活性を持ちヒトへの投与が可能な薬剤はゲンタマイシンと PTC124 しか知られていないが、両者ともにリードスルー活性が低い上に、前者は副作用の点から患者への長期投与が困難である。我々は、より安全で効果の高い新規リードスルー薬の開発を目指し、今回確立したレポータージーンアッセイシステムを用いて、約 20,000 種類の compound のスクリーニングを予定している。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ものと確信している。

AD に伴う気管支喘息発症の予防法の確立に向けては、本年度は、喘息を

伴いやすい外因性ADと伴いにくい内因性ADの差異について、興味深い知見を得ることに成功した。来年度は、外因性ADと喘息について、さらなる検討を加える予定である。

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 名古屋大学大学院医学系研究科・皮膚病態学分野 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227人から得られたDNAをシーケンスし、今回新たに同定した変異も含め、その約25%にフィラグリン遺伝子変異を同定した。今後も引き続き、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すと同時に、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25%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、本年度も引き続き、AD症例の集積とフィラグリン遺伝子変異検索を行った。また、フィラグリンは尋常性魚鱗癬の原因遺伝子であり、尋常性魚鱗癬患者は、なんらかのフィラグリン変異を有している。そこで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も明らかにするため、家族歴を有する尋常性魚鱗癬患者の全国調査を開始し、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。

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8種類あり(R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、S2889X、S3296X、K4022X)、当科で収集したAD227検体と一般コントロール134検体を、こ

これらの変異について、制限酵素切断とダイレクトシーケンスを用いてスクリーニングした。また、新規フィラグリン遺伝子変異同定のため、全国の主要な皮膚科施設に依頼書を送付し、尋常性魚鱗癬患者 DNA の収集に関して協力を仰いだ。新規にリクルートした 10 人の尋常性魚鱗癬患者については、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ケンスした。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

北海道大学病院皮膚科を中心に収集した AD 患者 228 人分の DNA サンプルを、前述の既報告変異 8 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 : 11 人 (約 4.8%)、③S1695X : 0 人、④Q1701X : 3 人 (約 1.3%)、⑤S2554X : 12 人 (約 5.3%)、⑥S2889X : 26 人 (約 11.4%)、⑦S3296X : 7 人 (約 3.1%)、⑧K4022X : 5 人 (約 2.2%) であった (図 1)。一方、コントロール群での各変異の保有人数、保有率は、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、⑧K4022X : 0 人であった (図 1)。また、新規尋常性魚鱗癬患者のシーケンスにより、これまで未報告の新規変異 X (repeat 5 に存在するナンセンス変異) を同定することに成功し、この変

異は AD 患者でも 1 人が保有していた (図 1)。

D. 考察

AD 患者のフィラグリン変異保有率は約 25%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、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、8 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 9 種類のフィラグリン遺伝子変異の保有率は、約 26%であった。本研究 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)

Akiyama M:
 FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics.
 Br J Dermatol, 162: 472-477, 2010.

論文 2)

Osawa R, Konno S, Akiyama M, Nemoto-Hasebe I, Nomura T, Nomura Y, Abe R, Sandilands A, McLean WH, Hizawa N, Nishimura M, Shimizu H:
 Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients

suffering from atopic eczema and asthma.

J Invest Dermatol, 130:2834-2836, 2010.

論文 3)

Osawa R, Akiyama M, Shimizu H:
 Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders.
 Allergol Int (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 | | MutationX | | Combined | |
|-----------|-------|-----|----------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|-----------|-----|----------|-----|
| | Con | AD | Con | AD | Con | AD | Con | AD | Con | AD | Con | AD | Con | AD | Con | AD | Con | AD | Con | AD |
| AA | 134 | 228 | 133 | 217 | 133 | 228 | 134 | 225 | 134 | 216 | 132 | 202 | 134 | 221 | 134 | 223 | 113 | 227 | 129 | 169 |
| Aa | 0 | 0 | 1 | 11 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 | 12 | 2 | 26 | 0 | 7 | 0 | 5 | 0 | 1 | 5 | 53 |
| aa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| total | 134 | 228 | 134 | 228 | 134 | 228 | 134 | 228 | 134 | 228 | 134 | 228 | 134 | 228 | 134 | 228 | 113 | 228 | 134 | 228 |

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 25%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、また、約20,000種類のcompound libraryを購入し、来年度に施行予定のdrug screeningの基盤作りをほぼ完了することができた。

A. 目的

最近、我々のグループは、アトピー性皮膚炎患者の約20%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。そこで、まず我々は、リードスルー治療に使用できる薬剤を同定するため、昨年度、ルシフェラーゼアッセイを用いて、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構築し、G418とゲンタマイシンが高いリードスルー活性を有していることを示し

た。しかし、最近、ルシフェラーゼアッセイによる偽陽性率の高さが相次いで報告されたため、より信頼度の高いアッセイとして、yellow fluorescent protein (YFP)を用いたアッセイシステムを構築し、リードスルー薬の開発を目指すことにした。

B. 研究方法

ケラチン6A遺伝子とYFP遺伝子を融合させたのち、site directed mutagenesisにより、ケラチン6A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融合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、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))にて24時間治療し、Western blot法にてケラチン6A/YFPのタンパク量を比較した。なお、陰性コ

ントロールには、DMSO (1%) を用いた。

C. 研究成果

ルシフェラーゼアッセイでは、G418 投与前後でルシフェラーゼによる発光に数十倍の差が認められ、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。一方、今回新たに確立した YFP アッセイでは、G418 投与群では、高いリードスルー活性を認めたが、ゲンタマイシン投与群と PTC124 投与群ではほとんどリードスルー活性を認めなかった (図 2)。

D. 考察

昨年度、我々は、ルシフェラーゼアッセイの結果から、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したが、今回新たに作成した YFP アッセイではゲンタマイシンによるリードスルー活性をほとんど認めなかった。この結果は、ゲンタマイシンに代わる新たなリードスルー薬の開発が必要であることを示している。我々が今回確立した早期終止コドン (TGA) を持つ細胞株は、

極めて微量の YFP 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、YFP の発現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

我々は、リードスルー活性を検出可能な新たなレポータージーンアッセイシステムを確立した。約 2 万種類の compound library も購入済みであり、本研究の 3 年目では、これらのアッセイを用いて、新規リードスルー薬の大規模スクリーニングを行い、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。

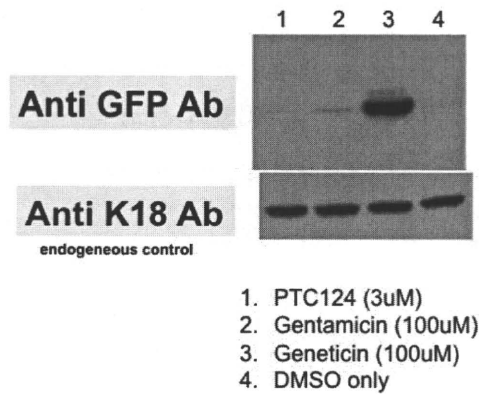
G. 研究発表

論文の投稿準備中。

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

Geneticinは強いリードスルー活性を有する



一方、PTC124やGentamicinはほとんどリードスルー活性を持たない

図2. YFP アッセイを用いたリードスルー活性の検出

G418 は高いリード活性を有するが、ゲンタマイシンと PTC124 はほとんどリードスルー活性を示さなかった。

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 浜松医科大学医学部皮膚科学講座 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を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、外因性 AD と内因性 AD の病因の解明を目指し、両者の差異を明らかにした。

A. 目的

アトピー性皮膚炎（AD）は、血清 IgE 高値を特徴とするアレルギー性の外因性 AD と血清 IgE 値が正常な非アレルギー性の内因性 AD に分類することができる。このうち、外因性 AD は、2 次性に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 2 次性アレルギー疾患（特に気管支喘息）発症の予防法の確立に向けて、本研究の 2 年目である本年度は、これまで十分に明らかになっていなかった外因性 AD と内因性 AD の病因の解明を目指し、フィラグリン遺伝子変異、皮膚バリア機能、ヘルパー T 細胞局在、金属アレルギーなどに着目し、両者の違いを検討した。

B. 研究方法

46 人の外因性 AD 患者 (age, 30.5±13.2; M 19, F 27; IgE, 8,055±10,373 kU/l; SCORAD, 35.4; LDH, 260 IU/l; eosinophils, 8.8 %; and VAS of pruritus, 54.2) と 26 人の内因性 AD 患者 (age, 31.6±11.6; M 8, F 18; IgE, 125±108

U/ml; SCORAD, 30.2; LDH, 213 IU/l; eosinophils, 6.1%; and VAS of pruritus, 51.9) を対象とした。患者末梢血から DNA を抽出し、日本人でこれまで見つかっている 8 種類のフィラグリン遺伝子変異についてスクリーニングした（外因性 AD18 症例、内因性 AD22 症例）。バリア機能については、経皮的水分喪失量（TEWL）と角質水分量を測定した。ヘルパー T 細胞局在については、フローサイトメトリーを用いて、Th1、Th2、Th17 細胞数を測定した。金属アレルギーについては、ニッケル・コバルト・クロムなど 17 種類の金属についてパッチテストを施行した。

C. 研究結果

① フィラグリン遺伝子変異

外因性 AD 患者 18 人のうち、8 人がフィラグリン遺伝子変異を有していた（44.4%）。一方、内因性 AD 患者では、22 人中 2 人しか変異を有しておらず（9.1%）、両者の間には統計学的に有意な差を認めた（ $P=0.0246$ ）。

② 皮膚バリア機能