

201126003A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清 水 宏

平成 24 (2012) 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 宏

平成 24 (2012) 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. 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の確立	11
分担研究者 戸倉新樹 (浜松医科大学)	
2. 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検索	13
分担研究者 秋山真志 (名古屋大学)	
3. 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)	16
分担研究者 有田 賢 (北海道大学)	
4. フィラグリン遺伝子変異の有無を指標にしたアトピー性皮膚炎に対する テラーメイド治療の確立	18
分担研究者 乃村俊史 (北海道大学)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
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	浜松医科大学医学部 皮膚科学	教授	リードスルー治療薬の 開発
	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
	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
	乃村 俊史	北海道大学・北海道大 学病院・皮膚科学	助教	テーラーメイド治療の 確立へ向けた介入試験 の企画と実施

## 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。

前年度に引き続き、AD患者の収集と、フィラグリン遺伝子変異検索を行ったところ、約250例のAD患者のリクルートに成功し、新規変異を含む、10種類のフィラグリン遺伝子変異を同定することに成功した。これらの結果をもとに、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介入試験を企画し、北海道大学病院倫理委員会の承認を得ることに成功した。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、リードスルー活性の測定システムを確立し、このシステムを用いて約2万種類の化合物をスクリーニングした。結果、興味深いことに、約50個の化合物が強いリードスルー活性を示した。

これらの結果は、ADの病因に基づいた新しい治療法の確立に寄与するのとも期待される。

**研究分担者**

戸倉新樹（浜松医科大学医学部皮膚科学教授）

秋山真志（名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授）

有田 賢（北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野助教）

乃村俊史（北海道大学・北海道大学病院・皮膚科助教）

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。ステロイドに代わる新規治療薬の開発が強く求められる中、我々は日本人AD患者の少なくとも20%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持つことを明らかにした（[Nomura T et al. J Allergy Clin Immunol 2007.](#), [Nomura T et al. J Invest Dermatol 2008.](#)）。さらに、AD患者群において皮膚バリア機能を評価し、フィラグリン遺伝

**A. 研究目的**

アトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis; AD）は、小児の約15%が罹患する、極めて頻度の高い疾患である。ADの病因は長らく不明であ

子変異を有する群では表皮バリア障害の程度が皮膚炎の臨床重症度と有意に相関していることを示した (Nemoto-Hasebe I et al. J Invest Dermatol 2009.)。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。

本研究は、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、新しい仮説のもとに、世界で初の試みとなる、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ものである。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した。また、ADの病因に直接的に基づいた初めての画期的な治療の試みとして、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療法を開発する予定である。これまでも、ADにおける皮膚バリア機能の重要性は指摘されてきたが、本研究は、リードスルー治療を用い、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を目指すものである。

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）発症の病態解明に向けて、本研究では、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) AD患者におけるフィラグリン遺伝子変異検索

フィラグリン遺伝子変異の有無を指標としたテーラーメイド治療の確立には、変異を持つAD患者と変異を持たないAD患者を多数収集する必要がある。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)、当科で継続的に収集したAD238検体と一般コントロール113検体を、これらの変異について、制限酵素切断とシーケンシングを



用いてスクリーニングした。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。全国の皮膚科・小児科指導病院にアンケート調査票を送付し、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、新規に30人以上の尋常性魚鱗癬患者をリクルートした。遺伝子解析の同意が得られた患者DNAを用いて、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、フィラグリン遺伝子のすべてのエクソンについてシークエンスし、新規遺伝子変異の同定を試みた。

## 2) フィラグリン遺伝子変異の有無を指標にしたADに対するテーラーメイド治療の確立

16歳未満の小児AD患者を対象に、ADに対する介入試験を企画した。介入研究の円滑な遂行のため、必要な患者数を減らす目的で、分割実験のデザインを用いることとし、1人の患者につき、両肘窩、両膝窩の4箇所を独立した実験箇所として採用した。フィラグリン遺伝子変異の有無で第1段階目の分割をし、それに対して保湿剤の使用の有無で第2段階目の割り付けをし、さらに治療の種類を割り付けた。治療の割り付けは、6種類の塗り分け方法（無外用、保湿剤のみ、ステロイドのみ、タクロリムスのみ、保湿剤+ステ

ロイド、保湿剤+タクロリムス）の中から1人の患者につき4種類が、統計解析・デザインソフトのJMP9.01により作成された割り付け表に従って割り振られる。これにより、変異保有群、非保有群各15人の計120実験箇所、両群の治療効果の差（スコア改善度%）が10%の時、統計学的に十分な有意差を検出可能である。臨床的重症度の評価には、Severity Scoring of Atopic Dermatitis (SCORAD)で採用される皮疹評価スコアや、経皮的水分喪失量、角質水分量、掻痒の程度（VAS scale）を用い、4週間にわたり、毎週、臨床的重症度の経時的変化（治療効果）を判定する。以上の介入研究についての基本計画を作成し、北海道大学病院倫理委員会に提出、審議が行われた。

## 3) 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の確立

pGL4.20ベクターのルシフェラーゼ遺伝子 (*luc2*) 内に、site directed mutagenesisにより、人工的に早期終止コドン (TAA) を作成した (Y179X)。制限酵素を用い、同変異を有する *luc2* 遺伝子を pcDNA5/FRT ベクター内の CMV プロモーターの下流にクローニングした。変異 *luc2* 遺伝子を挿入した同ベクターと pOG44 を 293FlpIn 細胞に co-transfection し、ハイグロマイシンで選択後に得られたコロニーから、stable cell line を作成した。それぞれのコロニーから得られたクローンについて、ルシフェラーゼアッセイによる characterization を行った。同様に、GFP 遺伝子内に、site direct mutagenesis を用い、人工的に早期終

止コドン (TAA) を作成した (Y40X)。pcDNA5/FRT ベクターにクローニングし、ルシフェラーゼと同様の方法で stable cell line を作成した。この細胞株についても、得られた複数のクローンについて、Western blot 法を用いて characterization を行った。

#### 4) 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)

3) で作成した変異 *Luc2* 遺伝子を持つ stable cell line を、19,992 種類の化合物で 24 時間治療し、発光量を計測した。なお、アミノグリコシド系抗生物質の一つである G418 (注: 重大な副作用を持ち、人体には投与不可能) を用いた治療によりこの細胞株は強い発光を示したため、G418 を陽性コントロールとして用い、陰性コントロールには、DMSO (1%) を用いた。また、すべての実験で細胞数自動カウント装置や分注機を用いることなるべくマニュアルでの作業を減らし、再現性の高い実験になるよう工夫を凝らした。

#### 5) 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機関での倫理委員会の承認を得た上で施行した。

### C. 研究結果

#### 1) AD 患者におけるフィラグリン遺伝子変異検索

まず、新規フィラグリン遺伝子変異を同定するために、当科及び全国調査でリクルートした尋常性魚鱗癬患者 DNA をシーケンスし、これまで未報告の新規変異を 2 つ同定した (Q1790X, 欠失変異 X)。北海道大学病院皮膚科を中心に収集した AD 患者 238 人分の DNA サンプルを、これらの新規変異を含む 9 つ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ところ、各変異の保有人数、保有率は、(1)R501X: 0 人、(2)3321delA: 11 人 (約 4.6%)、(3)S1695X: 0 人、(4)Q1701X: 3 人 (約 1.3%)、(5)Q1790X: 1 人 (約 0.4%)、(6)S2554X: 12 人 (約 5%)、(7)S2889X: 28 人 (約 11.8%)、(8)S3296X: 7 人 (約 2.9%)、(9)K4022X: 7 人 (約 2.9%) 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、(1)R501X: 0 人、(2)3321delA: 1 人 (約 0.9%)、(3)S1695X: 1 人 (約 0.9%)、(4)Q1701X: 0 人、(5)Q1790X: 0 人、(6)S2554X: 1 人 (約 0.9%)、(7)S2889X: 2 人 (約 1.8%)、(8)S3296X: 0 人、(9)K4022X: 0 人であった。

#### 2) フィラグリン遺伝子変異の有無を指標にした AD に対するテーラーメイド治療の確立

実験デザイン、患者数、統計学的信頼度、安全性などすべての点で基準をクリアし、北海道大学病院倫理委員会から小児 AD 患者を対象とした本介入試験の承認を得ることに成功した。承諾の得られた症例ではすでに介入を開始した。

### 3) 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の確立

ダイレクトシーケンスにより、*Luc2* 遺伝子内に Y179X が、*GFP* 遺伝子内に Y40X が、それぞれ作成されていることを確認した。変異 *Luc2* 遺伝子を持つ stable cell line は、無治療ではルシフェラーゼアッセイにおいて極めて低い発光しか示さないのに対し、強力なリードスルー薬である G418 (ヒトには使用不可能なアミノグリコシド系抗生剤) で 24 時間治療後には強い発光を示した。一方、変異 *GFP* 遺伝子をトランスフェクションした stable cell line は、抗 GFP 抗体を用いた Western blot で目的のバンドが確認できなかった。そこで、同ベクターを AD293 細胞に transient transfection し、同様の方法で Western blot を施行したところ、G418 の濃度依存性に GFP の発現量も増加していた。その後、変異 *Luc2* 遺伝子を持つ stable cell line を用いて、細胞数など種々の条件を変えてルシフェラーゼアッセイを行い、96 ウェルプレートに 5,000 個の細胞を播き、500mg/ml の G418 で 24 時間治療した場合に、最も精度の高いデータ (%CV、Z' factor) が得られることを確認した。

### 4) 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)

3) で作成した変異 *Luc2* を持つ stable cell line を用いて、primary screening を行ったところ、陰性コントロールと比べ約 4 倍以上の発光を示した化合物が、130 個同定された (全化合物の約 0.65%)。最も強い発光を示

した化合物は、陰性コントロールと比べ、約 60 倍の発光増加を認めた。なお、陽性コントロールの %CV は 7.9%、陰性コントロールの %CV は 14.8% であり、Z' factor は 0.77 と良好な値を示した。130 個の化合物について、ルシフェラーゼアッセイを用い、retest screening を施行したところ、約 40% の化合物が再度、強い発光増加を示した。

## D. 考察

### 1) AD 患者におけるフィラグリン遺伝子変異検索

我々は、多数の日本人尋常性魚鱗癬患者を遺伝子解析し、これまで 10 個の新規フィラグリン遺伝子変異を他のグループに先駆けて同定することに成功した。我々は、他のグループが有していないフィラグリン遺伝子変異情報を持っているため、他のグループと比べより正確な AD 患者のフィラグリン遺伝子変異解析が可能であり、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を、約 5% が欠失変異を有していることを明らかにした。本研究を開始前には AD の約 25% であったフィラグリン遺伝子変異の保有率が、新規変異の同定により、約 30% にまで増加した。

### 2) フィラグリン遺伝子変異の有無を指標にした AD に対するテーラーメイド治療の確立

我々は、すでに 240 人近くの AD 患者についてフィラグリン遺伝子変異検索を終了しており、介入試験への参加依頼の可能なフィラグリン遺伝子変異保有患者と非保有患者を多数有している。今回、北海道大学病院倫理

委員会で承認された介入試験により、これまで全く不明であった、フィラグリン遺伝子変異の有無による AD の治療効果の差異が明らかになり、テーラーメイド治療の確立に繋がるものと期待される。

### 3) 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の確立

AD に対するリードスルー治療の開発に向けては、我々の保有する約 2 万種類の化合物を用いた大規模スクリーニングを企画し、ルシフェラーゼアッセイを用いて、drug screening に不可欠な、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た。また、GFP を用いたアッセイシステムも構築した。ルシフェラーゼアッセイは感度が高い一方、疑陽性が多いことが知られているが、我々が今回作成した GFP アッセイと併用することで、これらの欠点を克服することが可能である。また、今回のスクリーニングで、%CV、Z' factor とともに良好な値を示し、今回我々が確立したアッセイがリードスルー活性測定において精度と質の高いものであることを確認した。

### 4) 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)

3) で作成した、良質なアッセイシステムを用い、我々は約 50 個のヒット化合物を同定した。これらの化合物は、強いリードスルー活性を持つことが予想され、今後アトピー性皮膚炎や種々の遺伝性疾患への臨床応用につながることを期待される。また、今後、

これらのヒット化合物について、GFP など他のレポータージーンアッセイを用いた評価を進めるとともに、フィラグリン遺伝子にナンセンス変異を持つ AD 患者由来の培養細胞を治療し、フィラグリンの発現が回復するか検討を行う予定である。また、ナンセンス変異を持つモデル動物への投与により、*in vivo* での効果と副作用についても詳細な検討を行う予定である。

## E. 結語

AD のテーラーメイド治療の確立に向けて、240 例近くの日本人 AD 患者を集積し、各種外用剤を用いた介入試験を計画、北海道大学病院倫理委員会で承認を得ることに成功した。テーラーメイド治療が確立されれば、従来の画一的な治療と比べて、治療効果の向上や不必要な投薬の減少、それに伴う医療費の削減等が期待される。介入試験へのエントリーについて患者の意思確認後に、速やかに介入試験を開始することが可能であり、すでに一部の症例では介入を開始した。

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アミノグリコシド系抗生剤（ゲンタマイシンなど）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く、前者は副作用の点から患者への長期投与が困難である。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として、ルシフェラーゼと GFP を用いたアッセイを確立し、約 2 万種類の化合物をスクリーニングし、約 70 個のリードスルー活性の高い化合物を同定することに成功した。これらの化合物は、AD の治療や

予防のみならず、種々の遺伝性疾患の治療にも有効である可能性があり、今後、モデル動物を用い、効果と安全性を検討して行く予定である。また、今回我々が確立したスクリーニングシステムはリードスルー化合物の検索に有用であったため、追加で化合物ライブラリーを購入し、さらなる drug screening を行うことも可能である。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。

#### 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

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教授

**研究要旨** 最近の我々の研究により、アトピー性皮膚炎(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持っていることが明らかになった。ナンセンス変異をターゲットにしたADに対する新規治療法の開発を目指し、リードスルー活性を測定可能な *in vitro* システムの構築を試みた。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として、ルシフェラーゼと GFP を用いたアッセイを確立し、大規模スクリーニングに向けたアッセイ条件の至適化に成功した。これらのアッセイを用いて、化合物ライブラリーのスクリーニングが可能であり、新規リードスルー薬の開発が期待できる。

**A. 目的**

我々は、日本人の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有することをこれまで明らかにしてきた。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している。そこで、リードスルー治療に使用できる薬剤を同定するため、ルシフェラーゼと GFP を用いた、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の構築を目指した。

**B. 研究方法**

pGL4.20 ベクターの *Luc2* 遺伝子内に、site directed mutagenesis により、人工的に早期終止コドン (TAA) を作成した (Y179X)。制限酵素を用い、同変異を有する *Luc2* 遺伝子を pcDNA5/FRT ベクター内の CMV プロモーターの下流にクローニングした。変

異 *Luc2* 遺伝子を挿入した同ベクターと pOG44 を 293FlpIn 細胞に co-transfection し、ハイグロマイシンで選択後に得られたコロニーから、stable cell line を作成した。それぞれのコロニーから得られたクローンについて、ルシフェラーゼアッセイによる characterization を行った。同様に、GFP 遺伝子内に、site direct mutagenesis を用い、人工的に早期終止コドン (TAA) を作成した (Y40X)。pcDNA5/FRT ベクターにクローニングし、ルシフェラーゼと同様の方法で stable cell line を作成した。この細胞株についても、得られた複数のクローンについて、Western blot 法を用いて characterization を行った。

**C. 研究結果**

ダイレクトシーケンスにより、*Luc2* 遺伝子内に Y179X が、*GFP* 遺伝子内に Y40X が、それぞれ作成されていることを確認した。変異 *Luc2* 遺伝子を持つ stable cell line は、無治療

ではルシフェラーゼアッセイにおいて極めて低い発光しか示さないのに対し、強力なリードスルー薬である G418 (ヒトには使用不可能なアミノグリコシド系抗生剤) で 24 時間治療後には強い発光を示した。一方、変異 *GFP* 遺伝子をトランスフェクションした stable cell line は、抗 GFP 抗体を用いた Western blot で目的のバンドが確認できなかった。そこで、同ベクターを AD293 細胞に transient transfection し、同様の方法で Western blot を施行したところ、G418 の濃度依存性に GFP の発現量も増加していた。その後、変異 *luc2* 遺伝子を持つ stable cell line を用いて、細胞数など種々の条件を変えてルシフェラーゼアッセイを行い、96 ウェルプレートに 5,000 個の細胞を播き、500mg/ml の G418 で 24 時間治療した場合に、最も精度の高いデータ (%CV、Z' factor) が得られることを確認した。

#### D. 考察

我々が保有する約 2 万種類の化合物を用いた drug screening に不可欠な、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た。また、GFP を用いたアッセイシステムも構築した。ルシフェラーゼアッセイは感度が高い一方、偽陽性が多いことが知られているが、我々が今回作成した GFP アッセイと併用することで、これらの欠点を克服することが可能である。

#### E. 結論

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として、ルシフェラーゼと GFP を用いたアッセイを確立し、大規模スクリーニングに向けたアッセイ条件の至適化を行った。これらのアッセイを用いて、化合物ライブラリーのスクリーニングが可能である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

特になし。

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

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

アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子変異検索

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教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎（AD）の一部はフィラグリン遺伝子変異により発症する。我々は、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を目指し、介入試験を企画した。介入試験においては、フィラグリン遺伝子変異を指標にしたAD患者の正確な振り分けが最も重要であり、AD患者と尋常性魚鱗癬患者のフィラグリン遺伝子変異検索を施行した。結果、日本人には新規変異を含む10個のフィラグリン遺伝子変異が存在することが明らかになり、日本人AD患者の約30%が同変異を有することを示すことができた。

**A. 目的**

アトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis; 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25-30%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、介入試験に不可欠な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、AD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行い、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）、北海道大学病院皮膚科を中心に収集したAD238検体と一般コントロール113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。

### C. 研究結果

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 Q1790X と新規変異 X (欠失変異) を同定することに成功した。AD 患者 238 人を、前述の既報告変異と Q1790X の 9 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 4.6%)、③S1695X: 0 人、④Q1701X: 3 人 (約 1.3%)、⑤Q1790X: 1 人 (約 0.4%)、⑥S2554X: 12 人 (約 5%)、⑦S2889X: 28 人 (約 11.8%)、⑧S3296X: 7 人 (約 2.9%)、⑨K4022X: 7 人 (約 2.9%) 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 0.9%)、③S1695X: 1 人 (約 0.9%)、④Q1701X: 0 人、⑤Q1790X: 0 人、⑥S2554X: 1 人 (約 0.9%)、⑦S2889X: 2 人 (約 1.8%)、⑧S3296X: 0 人、⑨K4022X: 0 人であった。

### D. 考察

AD 患者のフィラグリン変異保有率は約 30% 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

介入試験に必要な十分な症例数を確保することが可能であると考えられる。これまで、積極的にフィラグリン遺伝子変異関連 AD 症例の集積し、介入試験に向けての基盤を固めることに成功した。また、フィラグリン遺伝子の変異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、9 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

日本人 AD 患者における 9 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。また、新規フィラグリン遺伝子変異を同定した。これにより介入試験に向けての基盤はほぼ固まったといえる。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

特になし。

#### 2. 学会発表

Goto-Ohguchi Y, Nomura T, Miyamura Y, Ono N, Kosuge H, Okamoto H, McLean WHI, Akiyama M, Shimizu H. Prevalent and rare filaggrin gene mutations in the Japanese population. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting

of the Japanese Society for  
Investigative Dermatology, Kyoto,  
Japan. December 9-11, 2011.

H. 知的財産の出願・登録状況  
特になし。

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用いて約2万種類の化合物をスクリーニングし、約50個の有望なヒット化合物を同定した。これらの化合物は、アトピー性皮膚炎の治療や予防のみならず、種々の遺伝性疾患の治療に有効である可能性があり、今後、モデル動物を用い、効果と安全性を検討して行く予定である。

#### 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22%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、リードスルー治療に使用できる薬剤を同定するため、約2万種類の化合物から成るライブラリー (diversity set) を用いて、リードスルー薬の開発を目指すことにした (drug screening)。

#### B. 研究方法

ホタルルシフェラーゼ遺伝子内に site directed mutagenesis により人工的に作成された早期終止コドン (TAA) を持つ stable cell line を、19,992 種類の化合物で 24 時間治療し、発光量を計測した。なお、アミノグリコシド系抗生物質の一つである G418 (注：重大な副作用を持ち、人体には投与不可能) を用いた治療によりこの細胞株は強い発光を示したため、G418 を陽性コントロールとして用い、陰性コントロールには、DMSO (1%) を用いた。

#### C. 研究成果

Primary screening では、陰性コントロールと比べ約4倍以上の発光を示した化合物が、130 個同定された (全化合物の約 0.65%)。最も強い発光を示した化合物は、陰性コントロールと比べ、約 60 倍の発光増加を認めた。なお、陽性コントロールの%CV は 7.9%、