

201126003B

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～ 23 年度 総合研究報告書

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 21 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 清水 宏

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 班員構成	1
II. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

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	症例集積、各種治療法の 有効性の検討、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、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
	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. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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。

フィラグリン遺伝子変異の有無を指標としたADのテラーメイド治療の確立に向けて、まずは症例の集積とフィラグリン遺伝子変異検索を行った。これにより約250例のAD患者のリクルートに成功した。さらに、3つの新規フィラグリン遺伝子変異を同定し、それらの変異をAD患者の約30%が保有していることを明らかにした。フィラグリンをターゲットにしたADの新規治療法（リードスルー治療）の開発に向けては、ルシフェラーゼとGFPを用いたリードスルー活性の測定システムを確立した。このシステムを用い、約2万種類の化合物から成る化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、リードスルー活性を持つ約50個の化合物を同定することに成功した。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い、フィラグリン遺伝子変異が気管支喘息のリスクファクターとなること、フィラグリン遺伝子変異が外因性ADの病態に大きく関与していることを解明した。

これらの研究成果は、これまで対症療法しか存在しなかったアトピー性疾患に対する新しい予防法・治療法の解明に大きく寄与するものと期待される。

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）

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、リードスルー療法を用い、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7種類あり (R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、S2889X、S3296X)、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クエ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つけた。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293F1pIn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) 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 7 種類のフィラグリン遺伝子変異 (R501X、3321delA、S1695X、Q1701X、S2554X、

S2889X、S3296X) と我々が新規に同定した変異について、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 (4 人) と内因性 AD (3 人) 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 (IFN- γ 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。

6) 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 \pm 13.2; M 19, F 27; IgE, 8,055 \pm 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 \pm 11.6; M 8, F 18; IgE, 125 \pm 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た 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。

7) 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をシークエンスし、これまで未報告の新規変異を3つ同定した(Q1790X, K4022X, 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

ダイレクトシークエンスにより、*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。

5) 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。

6) 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) 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 に対するテララメイド治療の確立

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、テララ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。

5) 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。

6) 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、やはり、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遺伝子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。

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

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予定である。

これらの研究成果は、これまで対症療法しか存在しなかったアトピー性疾患に対する新しい予防法・治療法の解明に大きく寄与するものと期待される。

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

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	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Osawa R, Konno S, <u>Akiyama M.</u> Nemoto-Hasebe I, <u>Nomura T.</u> , Nomura Y, Abe R, Sandilands A, McLean WH, Hizawa N, Nishimura M, <u>Shimizu H</u>	Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients suffering from atopic eczema and asthma.	J Invest Dermatol	130	2834-2836	2010
Nomura Y, <u>Akiyama M.</u> , <u>Nomura T.</u> , Nemoto-Hasebe I, Abe R, McLean WH, <u>Shimizu H</u>	Chromosome 11q13.5 variant: No association with atopic eczema in the Japanese population.	J Dermatol Sci	59	210-212	2010
Hsu CK, <u>Akiyama M.</u> , <u>Shimizu H</u>	Update on filaggrin mutations and atopic dermatitis.	Expert Rev Dermatol	5	315-323	2010
<u>Akiyama M</u>	FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema; spectrum of mutations and population genetics. (Review article)	Br J Dermatol	162	472-477	2010
<u>Tokura Y.</u>	Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis.	J Dermatol Sci	58	1-7	2010
Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Matsuoka H, Kubo A, <u>Tokura Y.</u> , Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K	Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with Dermatophagoides pteronyssimus extract.	Am J Pathol	176	2385-2393	2010
<u>Nomura T.</u> , <u>Akiyama</u> <u>M.</u> , Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, Palmer CN, Smith FJ, McLean WH, <u>Shimizu H</u>	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
Nemoto-Hasebe I, <u>Akiyama M.</u> , <u>Nomura</u> <u>T.</u> , Sandilands A, McLean WH, <u>Shimizu H</u>	FLG mutation p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese patients with atopic eczema.	Br J Dermatol	161	1387-1390	2009
Nemoto-Hasebe I, <u>Akiyama M.</u> , <u>Nomura</u> <u>T.</u> , Sandilands A, McLean WH, <u>Shimizu H</u>	Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-related eczema.	J Invest Dermatol	129	682-689	2009

Watanabe M, Ujiie H, Iitani MM, Abe R, <u>Shimizu H</u>	Psoriatic onycho-pachydermo periostitis that progressed to generalized pustular psoriasis.	Clin Exp Dermatol			in press
Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Qiao H, <u>Shimizu H</u>	Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4(+) T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model.	Clin Immunol			in press
Sasaki K, <u>Akiyama M</u> , Yanagi T, Sakai K, Miyamura Y, Satok M, <u>Shimizu H</u>	CYP4F22 is highly expressed at the site and onset of keratinization during human skin development.	J Dermatol Sci			in press
Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, <u>Akiyama M, Shimizu H</u>	Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome.	Br J Dermatol			in press
Mizuno O, Yanagi T, Baba K, Yamane N, Inokuma D, Ito K, <u>Akiyama M, Shimizu H</u>	Sweet's syndrome presenting with vegetative nodules on the hands: relationship to neutrophilic dermatosis of the dorsal hands.	Int J Dermatol			in press
Koguchi H, <u>Arita K</u> , Yamane N, Shinkuma S, <u>Shimizu H</u>	Erythema annulare centrifugum-like neutrophilic dermatosis: Effects of potassium iodide.	Acta Derm Venereol			in press
Izumi K, Yanagi T, <u>Akiyama M</u> , Moriuchi R, <u>Arita K, Shimizu H</u>	Intractable erythematous plaques on the hands: palmoplantar eosinophilic pustular folliculitis.	Int J Dermatol			in press
Homma E, Aoyagi S, Baba K, Iitani M, Hata H, <u>Shimizu H</u>	Angiosarcoma on the lower abdominal wall associated with chronic lymphedema in an obese woman.	Int J Dermatol			in press
Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, <u>Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H</u>	Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapson.	Eur J Dermatol			in press
Hayashi I, Shinkuma S, Shimizu S, Natsuga K, Ujiie H, Yasui C, Tsuchiya K, Nishie W, <u>Shimizu H</u>	Mucous membrane pemphigoid with generalized blisters: IgA and IgG autoantibodies target both laminin-332 and type XVII collagen.	Br J Dermatol			in press
Hamada Y, <u>Arita K</u> , Toyonaga E, Inokuma D, Hamasaka K, <u>Shimizu H</u>	Lichen Planus in Childhood Showing Various Cutaneous Features.	Acta Derm Venereol			in press

Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, <u>Shimizu H</u>	Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors.	Clin Exp Dermatol			in press
Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, Caux F, Marinovic B, Sinha AA, Hertl M, Bernard P, Sirois D, Cianchini G, Fairley JA, Jonkman MF, Pandya AG, Rubenstein D, Zillikens D, Payne AS, Woodley D, Zambruno G, Aoki V, Pincelli C, Diaz L, Hall RP, Meurer M, Mascaro JM, Jr., Schmidt E, <u>Shimizu H</u> , Zone J, Swerlick R, Mimouni D, Culton D, Lipozencic J, Bince B, Bystryk JC, Werth VP	Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: Recommendations by an international panel of experts.	J Am Acad Dermatol			in press (Published online Nov.5)
Yoshihisa Y, Makino T, Matsunaga K, Honda A, Norisugi O, Abe R, <u>Shimizu H</u> , Shimizu T	Macrophage migration inhibitory factor is essential for eosinophil recruitment in allergen-induced skin inflammation.	J Invest Dermatol	131	925-931	2011
Yanagi T, <u>Akiyama M</u> , Nishihara H, Miyamura Y, Sakai K, Tanaka S, <u>Shimizu H</u>	AKT has an anti-apoptotic role in ABCA12-deficient keratinocytes.	J Invest Dermatol	131	1942-1945	2011
Umamoto H, <u>Akiyama M</u> , Yanagi T, Sakai K, Aoyama Y, Oizumi A, Suga Y, Kitagawa Y, <u>Shimizu H</u>	New insight into genotype/phenotype correlations in ABCA12 mutations in harlequin ichthyosis.	J Dermatol Sci	61	136-138	2011
Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, <u>Shimizu H</u> , Nishimura EK	Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells	Cell Stem Cell	8	177-187	2011
Suga H, Tsunemi Y, Sugaya M, Shinkuma S, <u>Akiyama M</u> , <u>Shimizu H</u> , Sato S	Hair shaft abnormalities in localized autosomal recessive hypotrichosis 2 and a review of other non-syndromic human alopecias.	Acta Derm Venereol	91	486-488	2011

Shinkuma S, McMillan JR, <u>Shimizu H</u>	Ultrastructure and molecular pathogenesis of epidermolysis bullosa.	Clin Dermatol	29	412-419	2011
Osawa R, <u>Akiyama M</u> , Izumi K, Ujiie H, Sakai K, Nemoto-Hasebe I, Yanagi T, Koizumi H, <u>Shimizu H</u>	Extremely severe palmoplantar hyperkeratosis in a generalized epidermolytic hyperkeratosis patient with a keratin 1 gene mutation.	J Am Acad Dermatol	64	991-993	2011
Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Matsushima Y, Tatsuta A, Komine M, <u>Shimizu H</u>	Expression of exon-8-skipped kindlin-1 does not compensate for defects of Kindler syndrome.	J Dermatol Sci	61	38-44	2011
Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, <u>Arita K</u> , Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, <u>Akiyama M</u> , <u>Shimizu H</u>	A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing.	Exp Dermatol	20	74-76	2011
Nakamura H, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Sawamura D, <u>Akiyama M</u> , <u>Shimizu H</u>	DNA-based prenatal diagnosis of plectin-deficient epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia.	Int J Dermatol	50	439-442	2011
Nakajima K, Sano S, Uchida Y, <u>Akiyama M</u> , Morita Y, <u>Shimizu H</u>	Altered lipid profiles in the stratum corneum of Sjogren-Larsson syndrome.	J Dermatol Sci	63	64-66	2011
Lin HY, Yanagi T, <u>Akiyama M</u> , Iitani MM, Moriuchi R, Natsuga K, Shinkuma S, Yamane N, Inokuma D, <u>Arita K</u> , <u>Shimizu H</u>	Childhood subepidermal blistering disease with autoantibodies to type VII collagen and laminin-332.	Br J Dermatol	164	452-454	2011
Li Q, Frank M, <u>Akiyama M</u> , <u>Shimizu H</u> , Ho SY, Thisse C, Thisse B, Sprecher E, Uitto J	Abca12-mediated lipid transport and Snap29-dependent trafficking of lamellar granules are crucial for epidermal morphogenesis in a zebrafish model of ichthyosis.	Dis Model Mech	4	777-785	2011
Kusajima E, <u>Akiyama M</u> , Sato M, Natsuga K, <u>Shimizu H</u>	Type XVII collagen ELISA indices significantly decreased after bullous pemphigoid remission.	Int J Dermatol	50	238-240	2011