

ERATO (末松ガスバイオロジープロジェクト) JST さきがけ (炎症の慢性化機構の解明と制御) 慶應義塾大学医学部医化学教室 共同講演会: 質量分析で何が出来るか? - 生命科学研究での有用性 -, 東京, 2012年9月

21. 久保亮治. 皮膚から全身へ ~ 免疫・アレルギー感作に関わる皮膚表面のバリア機構 ~. 第1回創薬イノベーション懇話会, 東京, 2012年11月

英語学会発表

1. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Yoshida K, Sasaki H, and Amagai M. Langerhans cell dendrites penetrate through epidermal tight junction barrier during foreign antigen uptake. 70th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology, Atlanta, Georgia, USA, 2010.
2. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, and Amagai M. Filaggrin-null Mice Exhibit Altered Skin Barrier Formation and Enhanced Percutaneous Immune Responses The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, Japan, 2010.
3. Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, and Amagai M. Maintenance of intact epidermal tight junction barriers in filaggrin-deficient mouse models. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, Japan, 2010.
4. Kubo A, Yokouchi M, Atsugi T, Ohyama M, and Amagai M. Investigation of the tight junction

barrier in hair follicles and sebaceous glands. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011.12.9-10

5. Ishizaki I, Kubo A, Ohashi Y, Yamamoto A, Hammond J, Fisher G, and Bryan S. High Resolution TOF-SIMS Imaging of the Multi-Layered Barrier Structure of Mouse Skin. American Vaccume Society 58th International Symposimu & Exhibition, Nashville, Tennessee, 2011.10.30-11.4
6. Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, and Amagai M. Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. Langerhans Cell Meeting 2011, Innsbruck, 2011.10.4-6
7. Ishizaki I, Hammond J, Bryan S, Kubo A, and Yamamoto A. TOF-SIMS Characterization of In Vivo and Transdermally Treated Mouse Skin. 18th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, Riva del Garda, Trentino, Italy, 2011.9.18-23
8. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, and Amagai M. Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Barcelona, 2011.9.8-10
9. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Ohashi Y, and Amagai M. High-resolution TOF-SIMS

- imaging and sequential immunofluorescent analysis of multi-layered barrier structure of the mouse skin stratum corneum. 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, Colorado, 2011.6.9
10. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, and Amagai M. Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites. 71th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology, Phoenix, Arizona, 2011.5.5
  11. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, and Amagai M. Impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin knockout mice. 71th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology, Phoenix, Arizona, 2011.5.5
  12. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Ohashi Y, and Amagai M. 2012. The stratum corneum comprises three layers with distinct barrier properties, as revealed by TOF-SIMS imaging. In 62nd Montagna Symposium on the Biology of Skin. Portland, Oregon. 2012.10.12
  13. Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, and Amagai M. 2012. Dendritic cells penetrate epidermal tight junction barriers to uptake external antigens: a possible involvement in atopic dermatitis. In Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia. Melida, Mexico. 2012.11.2

日本語学会発表

1. 久保亮治, 永尾圭介, 横内麻里子, 吉田和恵, 川崎洋, 佐々木博之, 天谷雅行. Langerhans cell dendrites penetrate through epidermal tight junction barrier during foreign antigen uptake. 第 62 回日本細胞生物学会大会, 大阪 2010 年 5 月.
2. 石崎逸子, Hammond J S, Bryan S R, 久保亮治, 山本公. TOF-SIMS によるマウス皮膚組織の深さ方向分析. 第 59 回日本質量分析学会, 大阪, 2011.9.13
3. 横内麻里子, 古瀬幹夫, 天谷雅行, 久保亮治. 皮膚 (重層上皮) におけるタイトジャンクションバリア恒常性維持機構の解析. 第 23 回高遠シンポジウム, 高遠, 2011.8.25
4. 久保亮治, 石崎逸子, 久保亜紀子, 川崎洋, 大橋善治, 天谷雅行. High-resolution time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging and sequential immunofluorescent analysis of multi-layered barrier structure of the mouse skin stratum corneum. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 北海道, 2011.6.27
5. 川崎洋, 永尾圭介, 久保亮治, 畑毅, 清水篤, 水野秀昭, 山田健人, 天谷雅行. フィラグリン欠損マウスにおける角質バリア機能異常と経皮免疫応答の亢進. 第 19 回分子皮膚フォーラム, 青森, 2012 年 4 月
6. 吉田和恵, 横内麻里子, 石井健, 永尾圭介, 天谷雅行, 久保亮治. ヒト表皮におけるタイトジャンクションバリアの解析. 皮膚かたち研究学会, 東京, 2012 年 7 月

## H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

### 《国際特許》

国際出願番号：PCT/JP2009/002161

(国際出願日：2009年5月15日)

基礎出願番号：特願2008-303926

(出願日：2008/11/28)

国際公開番号：W02009/139191

(国際公開日：2011年4月14日)

米国特許出願番号：12/736,800)

(登録日：2013年1月8日)

特許番号：US2011/0088103

特許出願日：2009年5月15日

国内段階移行日：2010年11月10日

出願人：Keio University

発明者：Masayuki Amagai, Akiharu Kubo,

Keisuke Nagao

発明の名称：Allergic Disease Model

Animals

### 《国内特許》

公開番号：W02009/139191

(公開日：2009年11月19日)

優先権主張：特願2008-129597

(2008年5月16日)

特願2008-303926

(2008年11月28日)

出願人：学校法人慶應義塾

発明者：天谷雅行、久保亮治、永尾圭介

発明の名称：アレルギー疾患モデル動物

図とその説明

図 1

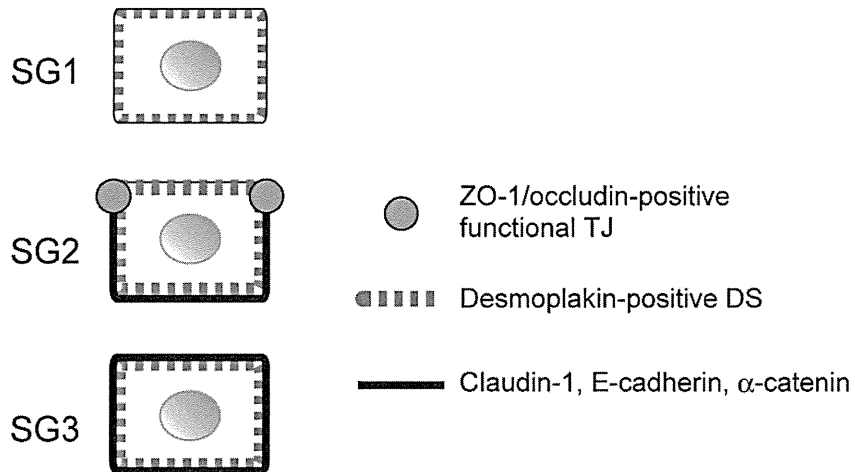


図 1：表皮顆粒層において、表面から 3 層の細胞（表面から順に SG1, SG2, SG3）はそれぞれ特徴的な細胞接着構造の分布を示す。

図 2

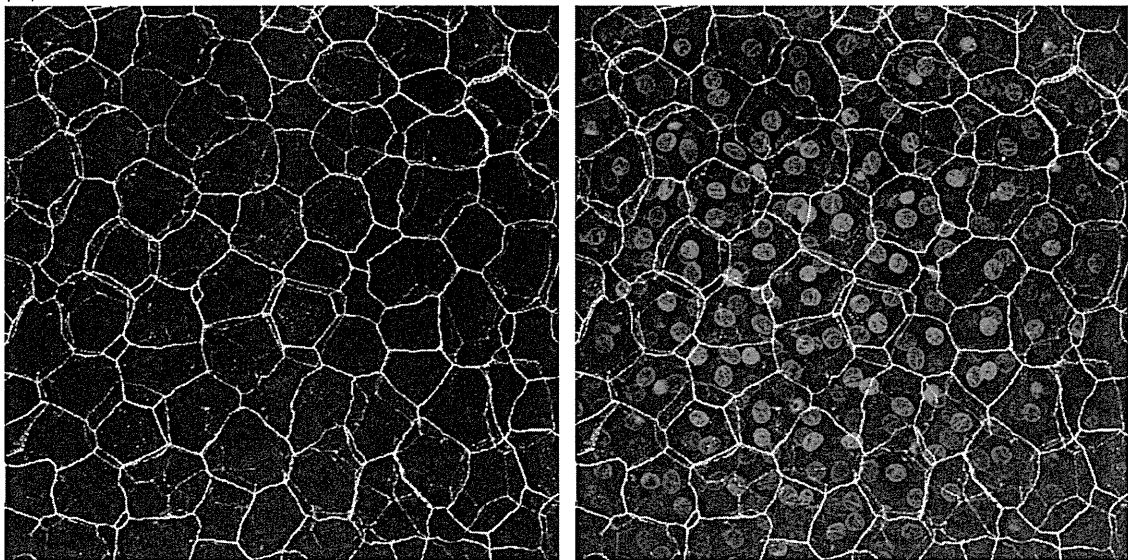


図 2 ヒト皮膚の TJ バリア。ヒト皮膚の TJ バリアを三次元可視化することに成功した。

図 3

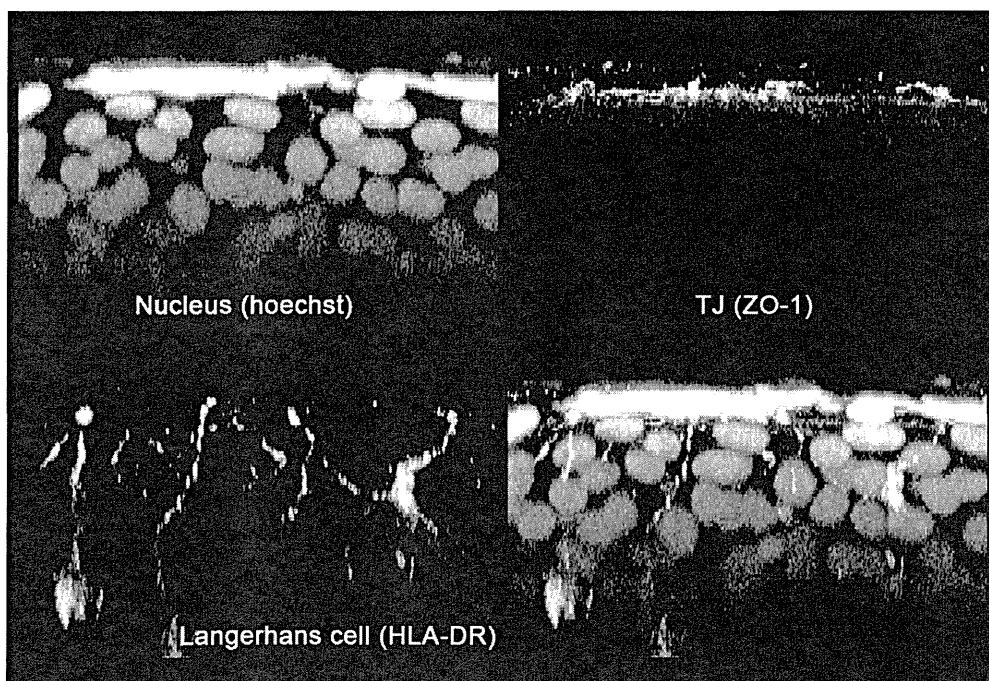


図3 ヒト皮膚における TJ バリアとランゲルハンス細胞樹状突起のドッキング  
ヒト皮膚における TJ バリアとランゲルハンス細胞の同時三次元可視化。定常状態においては、ランゲルハンス細胞は樹状突起を皮膚表面に向けて投射しているが、TJ バリアの内側に留まっているのに対し、活性化したランゲルハンス細胞は樹状突起を延長して TJ バリアとドッキングする。

## 皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

研究分担者 工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授

**研究要旨** 近年アトピー性皮膚炎 (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、AD の発症原因の一つとして注目されている。本研究では、FLG を含めた皮膚バリア機能関連蛋白における遺伝子変異と AD 発症との関連を解明するために (1) FLG2 遺伝子の変異解析を行い、新規変異 6828del17 を発見したが、AD 患者 237 人中 1 人 (0.4%)、健常対照者 84 人中 2 人 (2.4%) しか保因者がおらず、有意差は認められなかった。また、(2) 次世代シーケンサー (NGS) を用いた簡便かつ安価な FLG 遺伝子の新規全解読法として NGS FLG-shotgun 法を開発し、AD 患者 120 人の解析を行ったところ、7 種の新規ナンセンス及びフレームシフト変異を検出し、FLG 変異保有率が 10.8% (13/120) から 16.7% (20/120) と大幅に増えた。この結果、日本人集団にはこれまで見落とされていた頻度の低い FLG 変異が多く存在する事が明らかになった。さらにイヌのアトピー性皮膚炎 (cAD) と FLG 遺伝子の関連を検討するために (3) イヌの FLG 蛋白の検出法を確立し、イヌ FLG 遺伝子の構造決定法を開発した。

研究協力者  
佐々木貴史  
慶應義塾大学医学部総合医科学研究  
センター特任講師  
塩濱愛子  
慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究  
室特任助教  
神田聡子  
慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究  
室共同研究員  
宮本憲一  
慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究  
室特任助教

### A. 研究目的

近年アトピー性皮膚炎 (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、AD の発症原因の一つとして注目されているが、本研究では、FLG を含めた皮膚バリア機能関連蛋白における遺

伝子変異と AD 発症との関連を解明するために (1) FLG 遺伝子を含む多数の角化重層上皮関連蛋白質遺伝子が並んでいる 1q21.3 の Epidermal differentiation complex (EDC) 領域に存在する遺伝子の中から、FLG に次いで皮膚に高発現しており、FLG 様リピート (FLGL) とホルネリン様 (HRNRL) リピートを有する FLG2 遺伝子について変異解析を行う。また、(2) FLG 遺伝子は相同性の高い 10~12 ユニットの FLG リピートを含む長大なコーディング領域 (12~14kb) からなり、解析対象者全員の全解読が困難であったため、次世代シーケンサー (NGS) を用いた簡便で安価な FLG 遺伝子の全解読法の開発と日本人 AD 患者群における新規 FLG 変異の発見を目指した。さらにイヌのアトピー性皮膚炎 (cAD) と FLG 遺伝子の関連を検討するために (3) イヌの FLG 蛋白の検出法を確立

し、イヌ FLG 遺伝子の構造決定法を開発した。

## B. 研究方法

(1) ヒト FLG2 遺伝子は 3 個のエキソンからなり、exon 1 (51bp) と exon 2 (160bp) は短い、exon 3 (8907bp) は長い上、ホルネリン様 (HRNRL) リピート (10.5 個) と FLG 様 (FLGL) リピート (15 個) の繰り返し配列を含んでいる (図 1 A)。詳細な FLG2 リピート配列の解析から、FLG 遺伝子の FLG リピートよりもリピート間の相同性が低い事に着目し、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を試みた。

(2) FLG 遺伝子は相同性の高い 10~12 ユニットの FLG リピートを含む長大なコーディング領域 (12~14kb) からなり (図 4 A)、解析対象者全員の全解読が困難であったため、2008 年に発表した FLG-shotgun 法を改良して、次世代シーケンサー (NGS) を用いた全解読法として NGS FLG-shotgun 法を開発した。FLG リピート領域は FLG-shotgun 法と同じ 4 種の PCR Primer セットで増幅した。FLG リピート以外の領域は、exon 2 全域、exon 3 FLG リピート前領域、FLG リピート後領域の 3 種の PCR Primer セットで増幅した (図 4 B)。これらの PCR 産物を適当なモル比で混合し、FLG 全長をカバーする PCR 増幅産物を得た。次に、この増幅産物に対し Tn5 transposon を用いて 300~500bp 程度に断片化及びシーケンスタグを導入した NGS 用ライブラリーを作製した。シーケンスタグとして 96 種類のタグを用い、96 サンプルを等量混合したサンプルを作製し、パーソナル次世代シーケンサー (イルミナ、MiSeq) により解読を行った。得られた配列はシーケンスタグごとに分配し、それぞれを bwa プログ

ラムを用いて FLG 遺伝子標準配列 (A 型) にマッピングした。マッピングした配列の中から GATK プログラムを用いて DNA 変異を抽出し、snpEFF プログラムを用いて DNA 変異に対応する FLG アミノ酸変異を抽出した。これらのアミノ酸変異の中からナンセンス及びフレームシフト変異を抽出し、これらの変異の有無を IGV ビューアーを用いて確認した。

FLG 遺伝子の全解読は、慶應義塾大学医学部皮膚科で収集した日本人 AD 患者 120 人を対象とした。このうち 23 人は以前に FLG-s 確率 hotgun 法で全解読を行った患者である。また、120 人全員について TaqMan 法による既知変異のスクリーニングもすべて行っている。

(3) イヌの FLG については、皮膚の角層をテープストリップあるいは鋭匙で採取し、尿素入り緩衝液で可溶化し、ウェスタンブロット法で FLG 蛋白を検出する系の確立を試みた。イヌ FLG のアミノ酸配列の一部を含む合成ペプチドを免疫原として、抗イヌ FLG ウサギ抗体を作成し、ウェスタンブロット法と免疫組織化学染色で得られた抗体の特異性を評価した。また、イヌ FLG 遺伝子変異の解析のため、FLG-shotgun 法によるイヌ FLG 遺伝子の塩基配列解析法を確立した。

## C. 研究結果

(1) FLG2 遺伝子の解析 FLG2 の全 ORF 領域を 4 本の PCR 断片で増幅し、18 種類のプライマーで解読する方法を確立した (図 1 B)。この方法を用いて AD 患者及び健常人対照 DNA を 16 人ずつ解析した結果、データベースに登録されている FLG2 の配列とは異なる 11 カ所の多型を同定し、データベースと一致する FLG2-A 型、HRNRL リピートが 1 単位 (78 アミノ酸残基) 少なくナンセンス変異 S2377X を含む 7 種の多

型を有する FLG2-B 型、そして2種の多型を有する FLG2-C 型に分類する事ができた (図 2A, B)。このうち、C 末端の 15 アミノ酸が欠失する S2377X は FLG2-B 型に普遍的に見られる多型であった。また、6828del17 変異は AD 患者 16 人のうち 1 人のみが有していた。6828del17 変異については、さらに AD 及び健常人 16 人ずつについて解析を行った結果、1 人の健常人からも同定された。何れの 6828del17 変異共、FLG2-C 型アレルに存在していた。次に、FLG2 変異 6828del17 を検出する TaqMan probe を作成し、慶應大学皮膚科で収集した日本人 AD 患者 237 人と健常対照者 84 人に対して解析を行った結果、AD 患者 237 人中 1 人 (0.4%)、健常対照者 84 人中 2 人 (2.4%) しか保因者がおらず、有意差は認められなかった (図 3、表 1)。

(2) FLG-shotgun 法を改良し、NGS を用いた NGS FLG-shotgun 法を開発した。次世代シーケンサーが解読した塩基配列を FLG 遺伝子標準配列 (A 型) へマッピングした結果、FLG コーディング領域全域をカバーする配列を得る事ができ、標準配列と異なる箇所を抽出する事ができた (図 4C)。抽出した配列を snpEFF で解析し、ナンセンス及びフレームシフト変異を抽出した。その結果、解析対象の AD 患者が有していると判明していた既知の FLG 変異はすべて検出し (図 5)、さらにこれまでに日本人集団から報告されていない7種の新規 FLG 変異を検出した (図 6、表 1)。

(3) イヌ FLG 遺伝子の配列をヒトやマウス FLG 遺伝子と比較した結果、イヌ FLG のモノマー数は4つとヒト (10~12) やマウス (15~16) に比べて少なく、また FLG モノマーのサイズは 59、54kDa とヒト (37kDa) やマウス (26kDa) に比べて大きいことが予想された。新たに作成した抗イヌ FLG 抗体を用い、

ウェスタンブロット法でイヌ表皮抽出タンパクを解析した結果、予想された 59、54kDa 付近にバンドを確認した。免疫組織化学染色でも表皮顆粒層の細胞質内顆粒を染色し、イヌ FLG を特異的に認識していると判定した (図 7)。

次にイヌ FLG 遺伝子塩基配列の解明のために、FLG リピート外領域の多型解析により同じ遺伝子型のホモ接合体と思われる個体に対して、FLG-shotgun 法を行った。その結果、イヌ FLG 遺伝子塩基配列を矛盾なく再構築できた (図 8)。

#### D. 考察

(1) FLG2 蛋白質の C 末端側に存在する2つの変異 S2377X と 6828del17 の内 S2377X は、多くの人種で見られる多型であるが、AD と健常人でアレル頻度に顕著な差がなかったことから、AD の原因とは考えにくい。一方、6828del17 は FLG2 リピート内の 7 塩基欠失であり、フレームシフトにより 2252 番目のアミノ酸残基から C 末端側に 147 アミノ酸残基からなるまったく異なる配列が付加される。FLG では C 末端側の同様の変異 (K4022X など) が AD 患者で有意に多く見つかることから、FLG の機能欠損をもたらす病因変異と考えられており、FLG2 の 6828del17 変異も同様に FLG2 の機能に影響を与える変異であると推測されるが、AD 患者 237 人中 1 人 (0.4%)、健常対照者 84 人中 2 人 (2.4%) と出現頻度が非常に低く、有意差は認められなかった。

(2) ランニングコストが安価なパーソナル次世代シーケンサーを用いた NGS-FLG shotgun 法を開発した。これまでに検出した FLG 変異をすべて検出できたことから、解読法として信頼できると考えられ、さらに7種の新規 FLG 変異も検出する事ができた。このうち2種類の新規変異 (S783\*、Q3365\*)



は以前に FLG-shotgun 法で全解読した際には見落とししていたものであり、NGS FLG-shotgun 法は、従来法に比べて簡便で低コストであるばかりか検出精度も上がっていることが実証された。本方法の問題点としては、

1) FLG は genotype ごとに FLG repeat 数が異なっているが、その点を考慮したマッピングをしておらず、マッピングを間違えている可能性があり、元のアレルの完全な再構築は行えない。

2) bwa プログラムは相同性配列が複数箇所存在する場合、該当するリードを均等に割り振るため、相同性の高い FLG リピートに存在する多型/遺伝子変異は複数箇所に割り振られたため、頻度が低下する。新たに発見した 7 種の変異のうち、2 種は相同性の高い FLG リピートに存在するため、現在までのところ、変異を含む領域の特定ができていない。

3) 本方法では、PCR 増幅時のエラーやキメラ PCR 産物の形成により、人工的な配列が解読される可能性がある。しかし、PCR 増幅時のエラーの頻度以上で検出される遺伝子多型・変異は、元の配列に存在していることが予想される。

これらのことから、NGS FLG-shotgun 法では、完全な配列の再構築は困難であるが、FLG 遺伝子に存在するナンセンス及びフレームシフト変異は、見逃す事なく、検出が可能であった。

また、NGS FLG-shotgun による 120 人の解析結果から、新たに 7 種の FLG 変異を検出する事ができ、FLG 変異をもつ AD 患者も 10.8% から 16.7% となった。これらの結果から、日本人集団には、頻度の高い数種の FLG 変異と非常に頻度の低い数多くの FLG 変異が存在し、そのため欧州の様に代表的な FLG 変異だけの解析では、FLG 変異保

有率に関して、間違えた結論を導く可能性がある事が示唆された。

(3) 本研究で作成した抗イヌ FLG 抗体はウエスタンブロット法、免疫組織化学染色からイヌ FLG を特異的に認識していると考えられる。そこで、作成した抗体を用いて表皮顆粒層の減少・消失しているイヌをスクリーニングした上で、今回開発したイヌ FLG-shotgun 法で FLG 遺伝子解析を行い、イヌ FLG 変異の有無を検討することを予定している。

## E. 結論

FLG2 遺伝子の塩基配列解析法を確立し、機能欠損をもたらすと推定される 6828del17 変異を含む 11 カ所の多型を発見したが、AD 発症との関連については未解決である。また、次世代シーケンサーを用いた安価な FLG 遺伝子全解読法として新たに NGS FLG-shotgun 法を開発し、AD 患者 120 人の解析から、新たに 7 種の FLG 変異を検出する事ができ、FLG 変異をもつ AD 患者が 10.8% から 16.7% と大幅に増加した。さらに、抗イヌ FLG 抗体を作成し、イヌ FLG タンパク質の検出が可能となった。また、FLG-shotgun 法によるイヌ FLG 遺伝子配列解読法を確立した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表 (平成 22~24 年度) 論文発表

1. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M. SASPase regulates stratum corneum hydration through

- profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Molecular Medicine*, 3 (6), 320-333, 2011.
2. Sandilands A, Brown SJ, Goh CS, Pohler E, Wilson NJ, Campbell LE, Miyamoto K, Kubo A, Irvine AD, Thawer-Esmail F, Munro CS, McLean WHI, Kudoh J, Amagai M, Matsui T. Mutations in the SASPase gene (*ASPRV1*) are not associated with atopic eczema or clinically dry skin. *J. Invest. Dermatol.*, 132 (5), 1507-1510, 2012.
  3. Kanda S, Sasaki T, Shiohama A, Nishifuji K, Amagai M, Iwasaki T, Kudoh J. Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. *Vet. Dermatol.*, 24 (1), 25-31.e7, 2013.
- の水分量を調節する、第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
2. 塩濱 愛子, 佐々木 貴史, 川崎 洋, 清水 厚志, 岡野 栄之, 天谷 雅行, 工藤 純、皮膚炎自然発症モデルマウス flaky tail の皮膚炎原因遺伝子の解明、第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
  3. S. Kanda, T. Sasaki, A. Shiohama, K. Nishifuji, M. Amagai, J. Kudoh, T. Iwasaki. Characterization of dog filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. 7<sup>th</sup> World Congress of Veterinary Dermatology, Vancouver, Canada, July 24-28, 2012
  4. 工藤 純、ゲノム解析による遺伝性疾患の原因解明、第16回九州基礎皮膚科研究会 特別講演、福岡、2012年11月17日

#### 学会発表

1. 松井 毅, 宮本 憲一, 久保 亮治, 川崎 洋, 海老原 全, 畑 和也, 市野瀬 志津子, 井本 逸勢, 稲澤 譲治, 工藤 純, 天谷 雅行、陸上脊椎動物において獲得された皮膚表皮顆粒層特異的なレトロウイルス型プロテアーゼ SASPase は、角質層

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

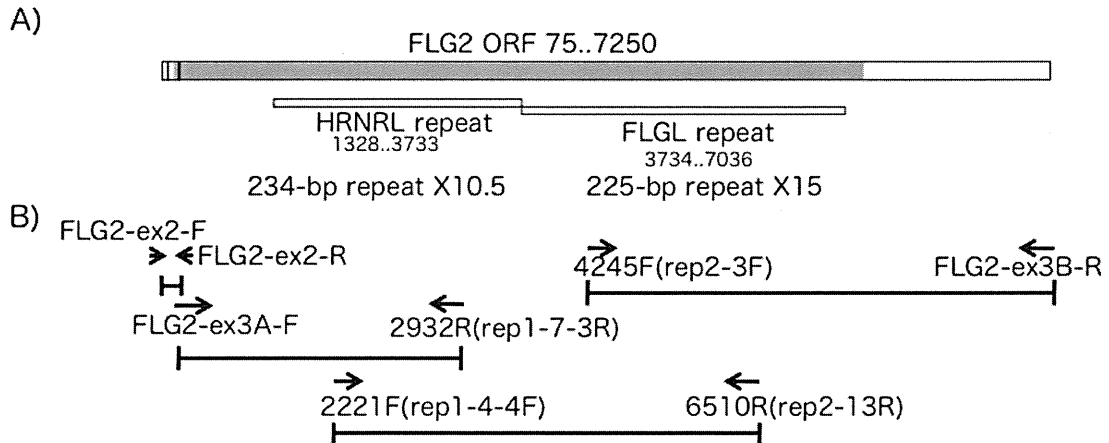


図1 FLG2 のコーディング領域の構造と解読方法の確立 A) FLG2 遺伝子の ORF 及びリピート。B) 本研究で確立した DNA 増幅に用いる PCR primer セット。FLG2 のコーディング領域を含む exon 2 及び exon 3 領域を 4 本の PCR で増幅し、18 本の primers で解読する方法を確立した。

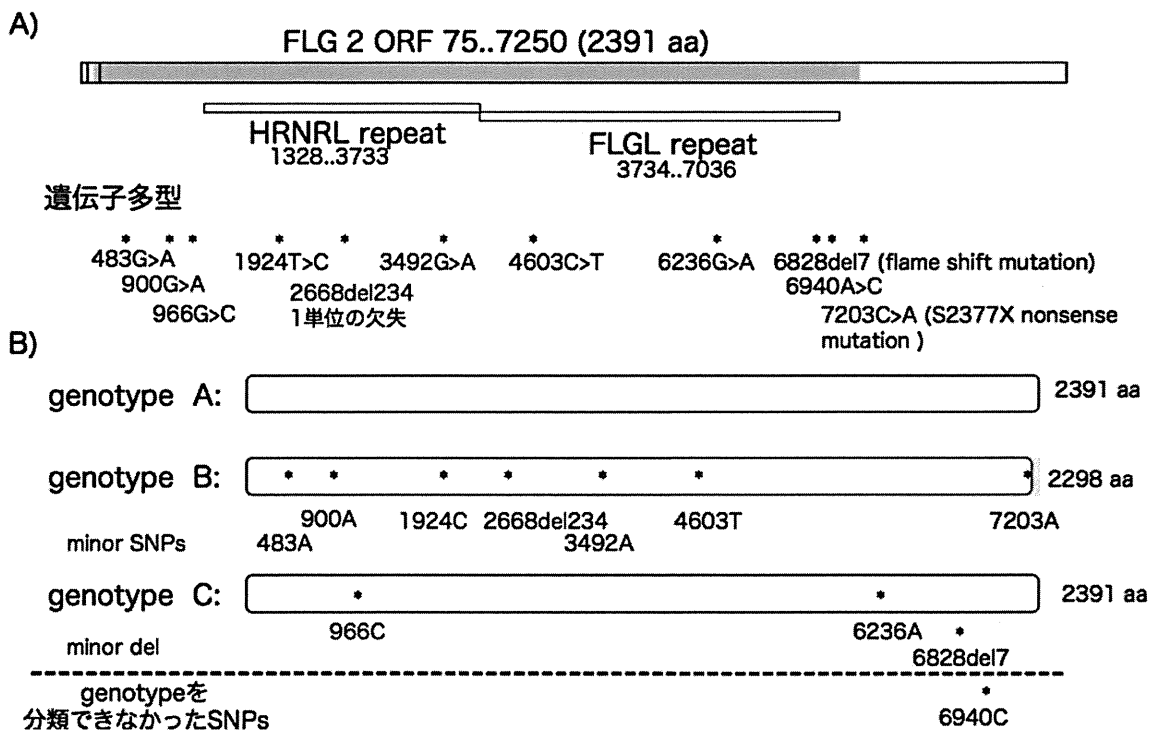


図2 A) FLG2 遺伝子のコーディング領域内の 11 カ所の遺伝子多型と B) 日本人集団における 3 種類の遺伝子型

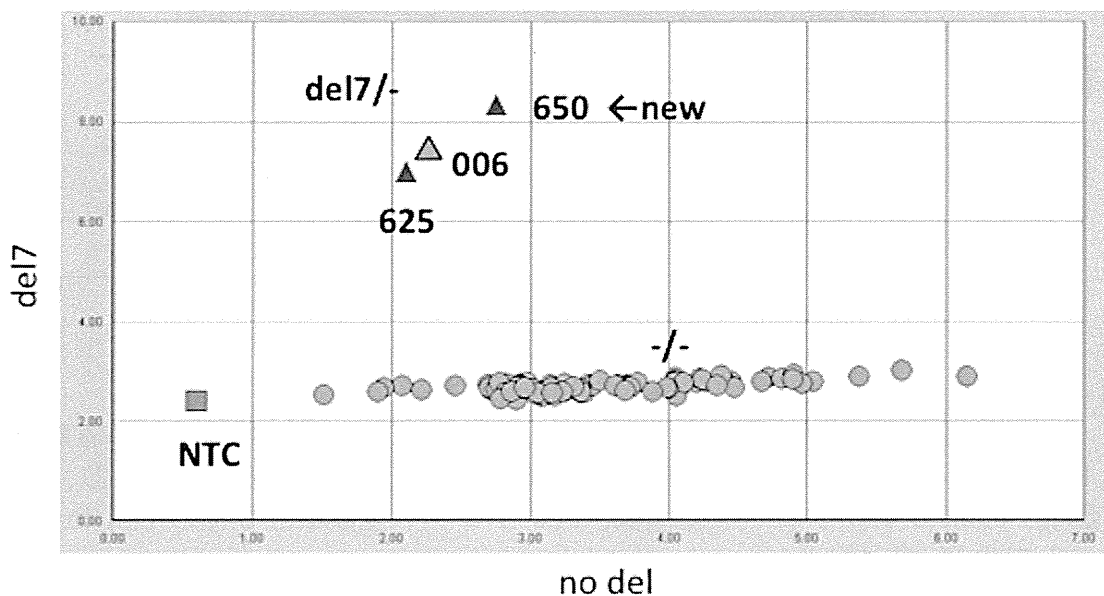


図3 FLG2 6828del17 変異の TaqMan による解析

AD 患者 No.006 と健常対照者 No.625 は、64 人のシーケンシングで 6828del17 変異を検出済み。さらに 257 人を追加した計 321 人を対象として TaqMan による解析を実施したが、新たに 6828del17 変異を検出したのは、健常対照者 No.650 の一人のみであった。

表1 AD 患者での FLG2 6828del17 変異の頻度解析

FLG2 6828del17		
AD	1/237	(0.4%)
none AD	2/84	(2.4%)

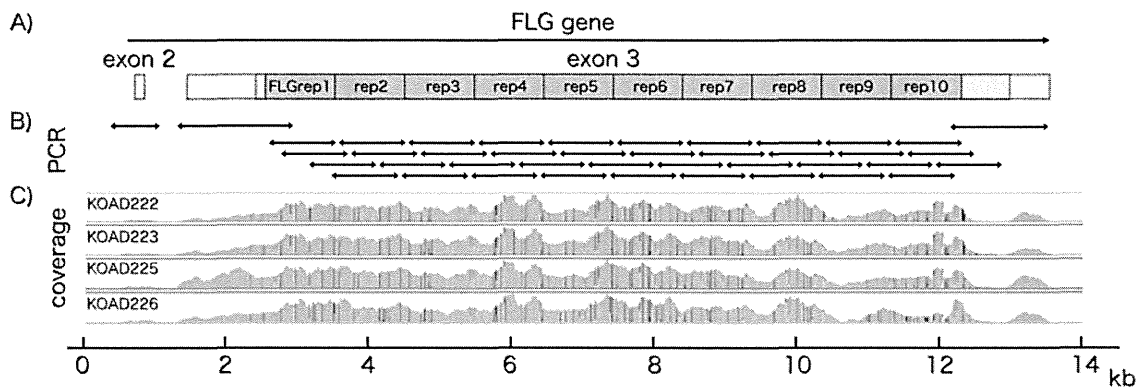


図4 NGS FLG-shotgun 法による解読結果

- A) FLG 遺伝子構造と FLG リピート exon 1 はコーディング領域外のため省略  
 B) PCR 領域 FLG リピート領域は、4 種の Primer セットで全域をカバーし、exon 2 全域、exon 3 FLG リピート前領域、FLG リピート後領域は 3 種の PCR Primer セットでカバーした。  
 C) NGS FLG-shotgun の結果 濃いグレーの箇所は、標準配列と異なる箇所を示す。

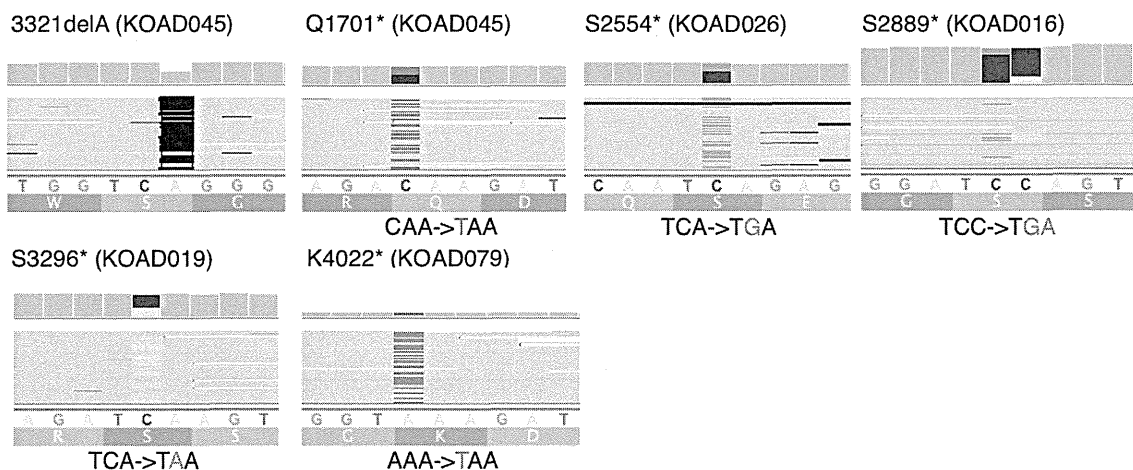


図5 NGS FLG-shotgun 法による既知日本人 FLG 変異の検出

TaqMan 法で検出した既知の 6 種類の変異をすべて検出する事ができた。

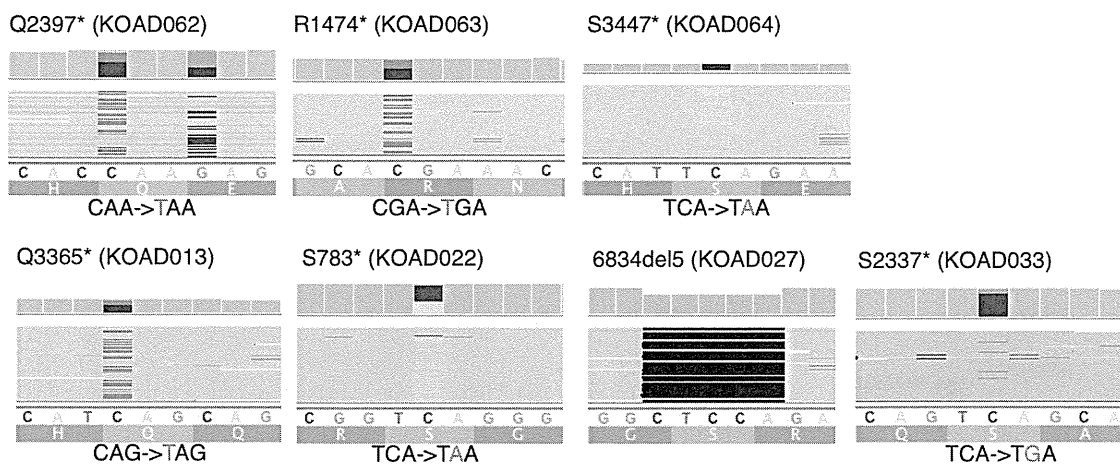


図6 NGS FLG-shotgun 法による新規の日本人 FLG 変異の検出  
7 種の新規日本人 FLG 変異を検出した。

表2 日本人 AD 患者に対する FLG 解析結果

FLG 遺伝子型*	TaqMan での解析	NGS FLG-shotgun での解析
AA	107 (89.1%)	100 (83.3%)
Aa	13 (10.8%)	18 (15.0%)
aa	0 (0%)	2 (1.7%)
合計	120	120

\*A、a はそれぞれ、正常遺伝子、変異遺伝子を表す。

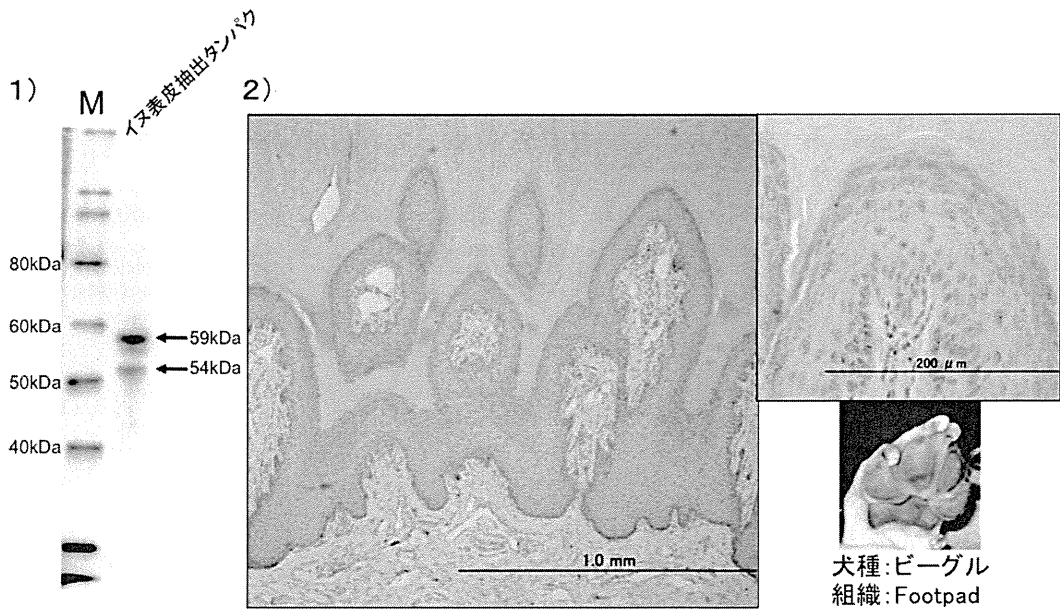


図7 抗イヌ FLG 抗体によるイヌ FLG の検出

- 1) 抗イヌ FLG 抗体を用いたウェスタンブロット解析 イヌ表皮抽出タンパク質から FLG に相当する 2 本のバンドが検出された。
- 2) 抗イヌ FLG 抗体を用いた免疫組織化学染色 表皮顆粒層の細胞質内顆粒が特異的に染色された。

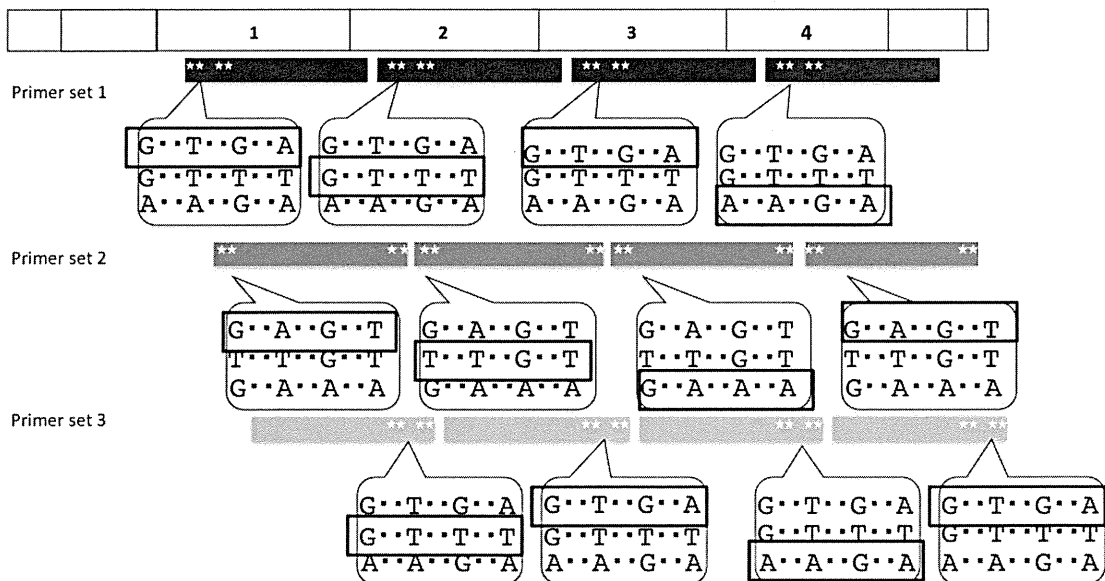


図8 FLG-shogun 法によるイヌ FLG リpeat配列の再構築

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業 (免疫アレルギー疾患等予防・治研究事業) )  
総合分担研究報告書

## 日本人 AD 患者における FLG 変異解析及び新規 AD 原因遺伝子同定の試み

研究分担者 海老原全 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室准教授

**研究要旨** フィラグリン(FLG)遺伝子変異はアトピー性皮膚炎(AD)の危険因子であり、これまでに日本人では8種のナンセンス及びフレームシフト変異が報告されている。我々は臨床症状と FLG 変異の相関を明らかにするために、PCR-DNA sequencing 法及び Taqman 法による日本人 AD 患者 FLG 変異同定法を確立した。これらの方法を用いて日本人 AD 集団の解析を行った結果、AD 患者では 11.3%(27/240)、非 AD コントロールでは 7.6%(8/105)が日本人集団から同定された 8 種の FLG 変異を有している事を明らかにした。しかし、他の集団と比較し FLG 変異を有する日本人 AD 患者は少ない事から、他の遺伝的もしくは後天的な要因の関与が考えられた。そこで、新規 AD 原因遺伝子の同定を目指し、①ドイツ AD 集団の GWAS により同定された 11q13 領域解析との相関解析、②AD に関連している可能性の高い遺伝子群の全 ORF 領域の解読法を確立した。

また AD 診療向上のために行っているアトピー教室の治療への有用性について解析・検討した。

### 研究協力者

佐々木貴史 慶應義塾大学医学部総合医  
科学研究センター  
特任講師  
塩濱愛子 慶大 MSD アレルギー研究  
寄附講座 特任助教  
定平知江子 都立小児総合医療センター  
皮膚科  
川崎洋 日本予防医学協会  
リサーチ・レジデント  
大山 学 慶應義塾大学医学部  
皮膚科学教室 専任講師  
工藤 純 慶應義塾大学医学部  
遺伝子医学研究室 教授  
天谷雅行 慶應義塾大学医学部  
皮膚科学教室 教授

が障害されることがアトピー性皮膚炎の発症の根底の 1 つにあることが明らかになった。我が国のアトピー性皮膚炎患者群における FLG 遺伝子変異の寄与度を評価するために FLG 変異の解析法確立を行った。この方法で慶應大を受診した AD 患者 230 人に対して解析したが、FLG 変異を有する AD 患者は欧州集団と比較すると決して高くなく、他の遺伝的もしくは後天的な要因の関与が考えられた。そこで、新規 AD 原因遺伝子の同定を目指し、①ドイツ AD 集団の GWAS により同定された 11q13 領域解析との相関解析、②日本人 AD 患者に対し AD に関連している可能性の高い遺伝子群の全 ORF 領域の解読を試みた。

### A. 研究目的

現在までに多くの集団でアトピー性皮膚炎(AD)とフィラグリン(FLG)遺伝子変異との関連が報告されており、FLG 蛋白の減少により皮膚バリア機能

成人の AD 患者を対象にした外来教育プログラム(アトピー教室)を 2009 年より行ってきたが、その有用性を検討した。



## B. 研究方法

FLG 遺伝子は 972bp あるいは 975bp を単位とする配列が 11~13 回繰り返す FLG リピート領域を含んでおり、FLG 変異を含む領域を特異的に解析する必要がある。そこで、日本人で報告されている 8 種の FLG 変異 (R501X, 3321delA, S1695X, Q1701X, S2554X, S2889X, S3296X, K4022X) に対して、PCR-DNA シーケンシングもしくは Taqman 法を用いて解読法を確立し、日本人 AD 患者集団 240 人、非 AD コントロール集団 105 人に対して解析を行った。

また、ドイツ AD 集団から同定された AD と相関する SNPs rs7927894 は、欧州集団ではマイナーアレル頻度が 0.424 と高いが日本では 0.167 と低い。そのため、日本人集団で rs7927894 と AD との相関を解明することは難しい。そこで、rs7927894 と同一の連鎖不平衡ブロックに含まれる SNPs rs3740778 の解析を行った。

また、AD 関連遺伝子群の全 ORF 領域の解読は、特徴的な症状を示す AD 集団として、最初の解析対象は AD に脱毛症 (Alopecia areata: AA) を併発している 6 患者を選択し、AD に関連している可能性の高い遺伝子群として 365 遺伝子を Haloplex (Agilent 社) を用いて解読を行った。

慶應義塾大学病院皮膚科アトピー教室を受講した中等度以上の AD 患者 20 人に関して、受講前後で、指導内容の理解度・生活への反映度についてのアンケート調査、皮疹の重症度 (Severity Scoring of Atopic Dermatitis: SCORAD) を比較検討した。

## C. 研究結果

日本人で報告されている 8 種の FLG 変異解析法として、PCR-DNA

sequencing 法を確立した。また、近接 SNPs のために probe の設計が困難な S1695X を除く 7 種の FLG 変異に対して Taqman 法による変異解析法を確立した (図 1)。これらの方法を用いて AD 患者集団 240 人及び非 AD コントロール集団 105 人に対して解析を行った。その結果、11.3% の AD 患者集団 (27/240)、7.6% の非 AD コントロール集団 (8/105) から FLG 変異を同定した (表 1)。

また、SNPs rs3740778 の解析を行った結果、マイナーアレル (G) の頻度は、AD 集団で 34.2%、コントロール集団で 32.7% と差が見られなかったが、G/A の頻度は AD 集団で 49.6%、コントロール集団で 44.0% とドイツ集団の GWAS で見られた程度の差であった (図 2、表 2)。

また、AD と AA を併発している患者 6 人を対象としライブラリーを作製した。これらのサンプルを等量混合し、次世代シーケンサー Mizeq を用いて解読した。得られた配列を標準配列にマッピングした結果、対象とした遺伝子配列に対し、平均重複度 22.0~35.4 の配列を得た (表 3、図 3)。これらの解読した配列から、アミノ酸変異を伴う変異を抽出し、dbSNP135 データベース中に登録されている多型を除外し、遺伝子変異候補を抽出した。その結果、6 人から 20 カ所のミスセンス変異を同定した。そのうち、6 変異が予測ソフトによりシビアな変異と予測された (表 4)。

アトピー教室に関するアンケート結果からは、指導内容の中では皮膚のバリア機能に関する知識が新たに得られた知識であり、生活の中では、スキンケア、住環境、衣服、紫外線対策が有意に反映されていた。また、受講前後で SCORAD は平均 36.2 から 24.0

に有意に低下していた。

#### D. 考察

本研究により、日本人で同定された8種のFLG変異同定が可能となった。日本人AD患者集団240人の解析の結果、11.3%が変異を有していた。しかし、この数値は他の集団解析の結果と比較して低く、他の因子の関与が示唆される。

ドイツ人集団のGWASで報告されたADと関連しているSNPsは、日本人集団では明確な関連が見られなかった。

シーケンシング技術の向上により、ここの患者の全てのエキソン解読が可能となったが(exome解読)、ADの様に患者数が多い場合、全ての患者の全解読は、まだまだ現実的ではない。そこで、関与が疑われる遺伝子を300~600程度の絞り込み、それらを全て解読する方法を確立した。今後は、これらの方法を用いて、新たなAD関連遺伝子の同定を行う。

アトピー教室は外来プログラムであるために、簡便かつ患者の時間的な負担が少なく、より多くの患者の理解を深める有用な手段となり得ると考えられた。

#### E. 結論

PCR-DNA sequencing法及びTaqman法を用いた日本人既知FLG変異8種のFLG変異解析法を確立した。これらの方法を用いて日本人AD集団の解析を行った結果、AD患者では11.3%(27/240)、非ADコントロールでは7.6%(8/105)が日本人集団から同定された8種のFLG変異を有している事を明らかにした。ドイツ集団で関連が報告された領域は、日本人AD集団

では関連が見られなかった。ADに関連している可能性の高い365遺伝子の全ORF領域の解読法を確立し、6人の解析を行った。

外来教育プログラムは、疾患に対する理解を深め、皮疹の改善につながる事が示唆された。今後も継続していく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (平成22~24年度) 論文発表

1. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. **EMBO Mol Med**, 3 (6): 320-333, 2011.
2. Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Noguchi E, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M: Variants of C-C Motif Chemokine 22 (CCL22) Are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. **PLoS One**, 6 (11): e26987, 2011.
3. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M: Genome-wide association study identifies eight new susceptibility

loci for atopic dermatitis in the Japanese population. **Nat Genet**, 44 (11): 1222-1226, 2012.

#### 学会発表

1. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, Amagai M: Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites. **The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Phoenix, Arizona, USA, 2011. 5. 4-7.
2. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. **Gordon Research Conferences on Epithelial Differentiation & Keratinization**, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, 2011. 7. 3- 8.
3. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. **Heidelberg-Kyoto Joint Symposium "Crossing Boundaries: Stem Cells, Materials, and Mesoscopic Sciences"**, Heidelberg, Germany, 2011. 7. 21- 23.
4. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. **The 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research**, Barcelona, Spain, 2011. 9. 7- 10.
5. Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. **12th International Workshop on Langerhans Cells**, Innsbruck, Tyrol, Austria, 2011. 11. 3- 6.
6. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. **The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.
7. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: Mammalian skin-specific retroviral-like aspartic protease, SASPase is a key modulator of skin moisturization. 第45回発生生物学会 / 第64回日本細胞生物合同大会, 神戸, 2012. 5. 28- 31.
8. Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Dendritic cells penetrate epidermal tight junction barriers to uptake external antigens: a possible involvement in atopic dermatitis. **Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia 2012**, Melida, Mexico, 2012. 10. 30- 11. 7.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

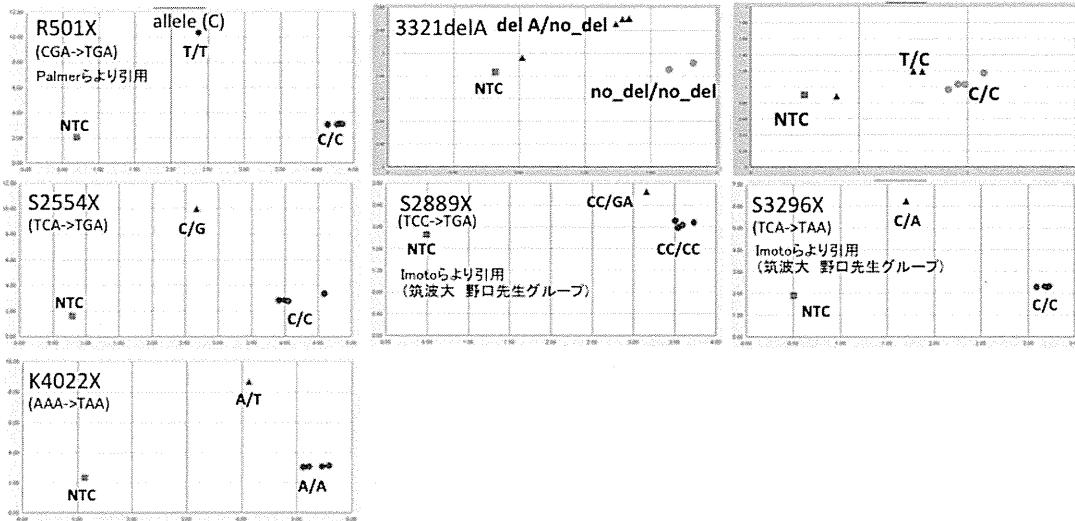


図1 Taqman 法による日本人 FLG 変異解析

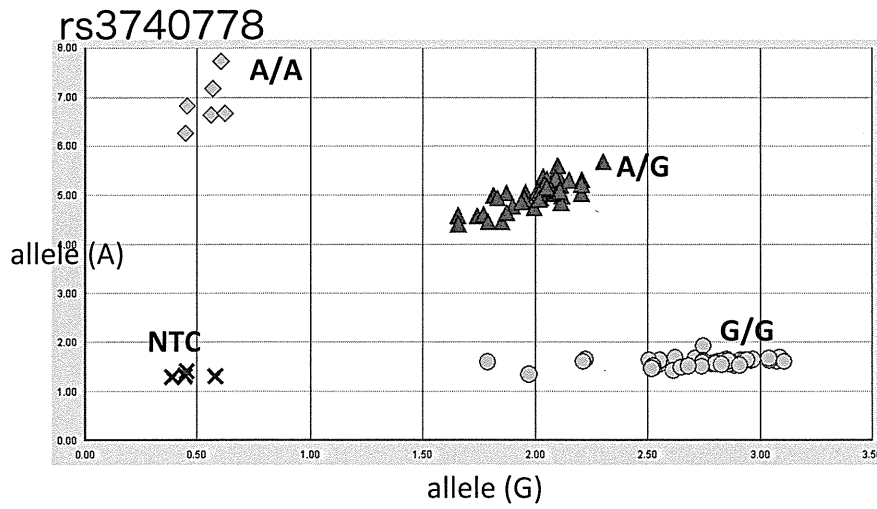


図2 rs3740778 の日本人多型解析