

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 長谷部育恵

### 学位論文題名

日本人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皮膚バリア機能障害に関する研究

**【背景と目的】** 2006年表皮バリア関連蛋白で、顆粒層のケラトヒアリン顆粒の主成分であるフィラグリンの遺伝子 (*FLG*) 変異がアトピー性皮膚炎 (AD) の重要な発症因子であることが示された。また皮膚バリア機能評価法として TEWL (transepidermal water loss: 経表皮水分蒸散量) および角質水分量が用いられており、各々電気的な湿度測定機器の利用により、生理的な条件下で非侵襲的に表皮バリア機能を測定することができる。本研究の目的は、1) AD患者において *FLG* 変異を有することによる角層バリア機能への影響について調査すること、2) 日本人 AD患者における *FLG* 変異の検索、3) *FLG* 変異が患者皮膚においてどのようにフィラグリンの生成に関係するかを調べることである。

**【対象と方法】 1. *FLG* 変異を有する患者、有さない患者で皮膚バリア機能障害を測定**  
*FLG* 変異を有するAD患者、同遺伝子変異を有さないAD患者を各12人抽出した。国際的重症度基準OSCORAD (objective severity scoring of AD, score range 0-83) を重症度の判定基準に用いて、各々の患者の臨床的重症度を調べた。加えて詳細な問診と採血による特異アレルゲン検査を施行した。

次に臨床的に皮疹がない前腕屈側、伸側、背部の3か所から TEWL、角質水分量、皮膚厚を3回ずつ測定し、平均をとった。角質水分量と角質厚はCorneometer ASA-M2 (ASAHI BIOMED, Yokohama, Japan) を、TEWL はEvaporimeter AS-TW1 (ASAHI BIOMED, Yokohama, Japan) を用いて測定した。

#### **2. AD患者におけるフィラグリンの発現の検討**

同意の得られた患者には皮膚生検を施行し、filaggrin repeat を検出可能な抗フィラグリン抗体 (mouse mAb 15C10<sup>®</sup>, Novocastra 社) による免疫組織化学染色を行った。

#### **3. 新規変異と日本人AD患者における *FLG* 変異のスクリーニング**

*FLG* の繰り返し配列をシークエンス可能なプライマーを用いて、新たに19人の日本人AD患者 *FLG* 変異をスクリーニングした。計137人の日本人AD患者と134人の一般コントロールの末梢血からDNAを採取し、新たに発見した変異の有無を検索した。

#### **4. 新規 *FLG* 変異を有する患者でのフィラグリン mRNA 量の検討**

新たに発見した *FLG* 変異を有する患者皮膚において、real-time reverse transcription-PCR法を用いて mRNA 発現量を測定した。

#### **【結果】 1. *FLG* 変異を有する群も有さない群も皮膚バリア機能は低下していた。**

*FLG* 変異を有する群も、有さない群も角質水分量は減少していた。そして、角質水分量はフィラグリン変異を有する群は有さない群に比べてわずかに低下していたが、統計学的有意差を認めなかった。それに対して TEWL は変異を有さない群が、変異を有する群よりも有意に上昇していた。

#### **2. *FLG* 変異を有する群のみアトピーの臨床学的重症度と TEWL との間には正の相関を認**

めた。

FLG 変異を有する群では、アトピーの臨床学的重症度 OSCORAD と角質水分量との間には負の相関、アトピーの臨床学的重症度と TEWL との間には正の相関を認めた。しかし、変異を有さない群ではそれらの相関は全く認めなかった。

### 3. FLG 変異を有する患者では角質肥厚と顆粒層の低形成を認めた。

患者皮膚を用いた組織学的な検討では、FLG 変異を有する群では、変異を有さない群よりも皮膚厚の増加を認めた。それと同時に FLG 変異のため、プロフィラグリンを主要な構成成分とするケラトヒアリン顆粒は低形成となっていた。

### 4. FLG 変異を有する群のみ臨床的重症度とダニ、ハウスダスト、ネコ上皮抗原特異 IgE 値は相関していた。

FLG 変異を有する AD では臨床的重症度とダニ、ハウスダスト、ネコ上皮抗原特異 IgE とに正の相関を認めた。この傾向は変異を有さない群では認められなかった。

### 5. 新規 FLG 変異 p. Lys4022X が同定された。

新規の日本人 AD 患者において新規の遺伝子変異 p. Lys4022X を認めた。この変異はフィラグリン遺伝子のリピート配列の最終リピートの 11 番目にあり、現在報告された変異で最も C 末端寄りの変異であった。

### 6. 今回同定した新規変異を含め日本人 AD 患者の 27% に FLG 変異を認めた。

137 人の AD 患者でこの新規変異をスクリーニングしたところ、2.9% に認めた。健常コントロール 134 人には同変異を有する者はいなかった。過去の報告と合わせて、AD 患者の約 27% が FLG 変異を有していた。一般コントロール群と比べアトピー患者群では統計学的に有意に変異の保有率が高いことが示された ( $\chi^2 p = 6.5 \times 10^{-6}$ )。

### 7. 新規変異 p. Lys4022X を有する患者の皮膚から抽出した FLG の mRNA は減少していなかったが、生成されたフィラグリンの量は低下していた。

新規変異を有する患者皮膚から抽出した FLG mRNA はコントロールと比して有意な減少を認めなかった。しかし、組織学的には著明な顆粒層の低形成を認め、またフィラグリン染色では生成されたフィラグリンの量の低下を認めた。

【考察】日本人 AD 患者を FLG 変異の有無によって分け、FLG 変異を有する患者では皮膚のバリア機能と臨床的重症度が相関することを示した。FLG 変異を有さない患者においては、皮膚のバリア機能と臨床的重症度は相関を認めなかった。これらのパラメーターと重症度との相関が、FLG 変異を有する群のみで認められたことは、FLG 変異を有する群では、皮膚のバリア機能障害が基礎にあって、その機能障害が AD の発症に大きく関わっている可能性を示唆する。

また、過去に報告されている中で最も C 末端に近い FLG の新規遺伝子変異を発見した。FLG で報告されている変異は最後のエクソンにあるため nonsense-mediated mRNA decay は起きず、患者の変異アレルからは不完全なプロフィラグリンが生成される。新規変異を有していた患者皮膚による Real-time PCR においても mRNA 量には著変なかった。しかし、免疫組織学的に患者皮膚の顆粒層を形成するフィラグリンタンパクの減少を認めている。理論上、FLG の最も 3' 側に変異を持つアレルから完全なプロフィラグリンに最も近いペプチドが生成され、最も多くのフィラグリンが生成されるはずであるが、今回の研究ではこの変異を持つ患者も重症な AD 臨床像を示しており、変異間での臨床症状の差は特に認められなかった。本研究は C 末端の存在がフィラグリンの生成に不可欠であるという過去の報告を裏付けるものであった。

【結論】FLG 変異を有することは直接に皮膚のバリア機能低下をもたらして、AD の発症と重症化につながることを示された。また、ダニ、ハウスダストなどの経皮的感作も重要であることが示唆された。皮膚のバリア機能を把握することは AD の経過観察にも有用であると同時に、変異のある病児においては特に、早期から保湿剤を使用しスキンケアに努めることで、AD 発症と重症化を予防できる可能性があると考えた。