

日本人における尋常性魚鱗癬と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に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

尋常性魚鱗癬は、四肢伸側を中心とした白色粒糠様、褐色鱗状の鱗屑とドライスキン、そして掌蹠の皮膚紋理増強を特徴とする、最も頻度の高い遺伝性魚鱗癬である。その病因は長らく不明であったが、2006年、欧州人家系の解析を通じ、同疾患がフィラグリン遺伝子変異により発症することが報告された。フィラグリンは、表皮顆粒層に豊富に存在するケラトヒアリン顆粒の主要構成成分であるプロフィラグリンを前駆タンパクとし、プロフィラグリンが脱リン酸化とプロテアーゼ処理を受けることで、フィラグリンが生成される。フィラグリンは、角化に際して、ケラチン線維を凝集させることで角層の形成に働くほか、その分解産物が天然保湿因子として働くため、皮膚バリア機能の維持と保湿に重要なタンパク質である。

従って、フィラグリン遺伝子の変異によりフィラグリンの産生が減少すると皮膚バリア機能の破綻とドライスキンをきたすようになり、尋常性魚鱗癬を発症する。

フィラグリン遺伝子は、1番染色体、1q21上のepidermal differentiation complexと呼ばれる、角化に関わる多くの遺伝子がコードされている領域に存在する。フィラグリン遺伝子は、3つのエクソンから成っており、プロフィラグリンはすべてエクソン3にコードされている。

このエクソンは、12.7-14.7kbととても大きいエクソンであることに加え、filaggrin repeatと呼ばれるほぼ100%相同な972bpの繰り返し配列(プロフィラグリンが分解されてフィラグリンになる部分に相当する)を10~12個含んでいる。そのため、フィラグリン遺伝子の、あるrepeatを増幅しようとPCRをしても、別のrepeatも増幅されてしまうことになり、理論上シーケンシングが非常に困難であった。そこで、フィラグリン遺伝子のほぼ相同な繰り返し配列の中に含まれる、数少ないrepeat固有の塩基配列を見出し、プライマーを作成することで、現在ではフィラグリン遺伝子の全長をシーケンシングすることが可能になった。

この手法を用い、欧州人ではこれまでに13種類のフィラグリン遺伝子変異が同定され、さらに興味深いことに、アトピー性皮膚炎の欧州人患者の約半数がこれらのフィラグリン遺伝子変異を有することも報告された。

しかしながら、これまでのところ、欧州人以外でのフィラグリン遺伝子変異解析はなされておらず、本研究では、まず、尋常性魚鱗癬の日本人患者家系についてフィラグリン遺伝子変異の同定を試み、さらにその後、そこで得られた遺伝子変異を、アトピー性皮膚炎患者群とコントロール群の両群についてスクリーニングし、フィラグリン遺伝子変異が日本人においてもアトピー性皮膚炎の重要な発症因子であるのかどうか検討することを目的とした。

【対象と方法】

日本人尋常性魚鱗癬患者の11家系からDNAを採取し、ダイレクトシーケンス法にて、フィラグリン遺伝子変異検索を行った。次に、102人の日本人アトピー性皮膚炎患者と133人の一般コントロールからDNAを採取し、尋常性魚鱗癬患者で同定された変異について、

ダイレクトシーケンス法と制限酵素処理法を用いてスクリーニングし、 χ^2 検定を用いて、統計学的な検討を加えた。

【結果】

尋常性魚鱗癬家系の解析を通じ、3321delA、S2554X、S2889X、S3296X という、欧州人とは異なる、日本人に固有の4つの新規フィラグリン遺伝子変異を同定した。また、日本人のアトピー性皮膚炎患者を、これら4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、患者の約20%が変異を有し、一般人口（変異の保有率は約3%）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（ $\chi^2 p = 8.4 \times 10^{-6}$; オッズ比 7.57, 95%信頼区間= 2.84-23.03）。

【考察】

今回我々は、4つの新規フィラグリン遺伝子変異を同定することに成功し、それら4つの変異が、欧州人の場合と同様に、アトピー性皮膚炎の重要な発症因子であることを示した。これらの結果は、従来、免疫学的な異常をもとに論じられることの多かったアトピー性皮膚炎の多くが、実は皮膚バリア機能の破綻を発端に発症している可能性を強く示唆するものであり、また同時に、アトピー性皮膚炎の病因が従来から言われていたように heterogeneous であることを強く示唆している。なお、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の保有率は約20%であり、欧州人のそれ（約50%）と比べ、やや低率であった。

この差が単純に人種差を反映している可能性も否定はできないが、日本人ではさらなる新規変異が隠れている可能性が考えられ、この点を明らかにするために、今後のさらなる症例の集積とフィラグリン遺伝子変異検索が必要である。

今回我々は、日本人尋常性魚鱗癬患者の11家系について検討したが、興味深いことに同じ家系内でも、変異の homozygote や compound heterozygote の患者は heterozygote の患者と比べ、明らかにより重症の臨床症状を呈しており、欧州からの報告と同様、その遺伝形式が autosomal semidominant であることが示唆された。また、前述の通り、今回の研究にて4つのフィラグリン遺伝子変異を同定したが、それらの変異間での臨床症状の差は特に認めなかった。これら4つの早期終止コдонはいずれもフィラグリン遺伝子の最後のエクソンに存在するため、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。理論上、フィラグリン遺伝子の最も3'側に変異（S3296X）を持つアレルから最も大きなプロフィラグリンが生成され、最も多くのフィラグリンが生成されるはずであるが、今回の研究では変異間での臨床症状の差は特に認められなかった。過去の報告では、プロフィラグリンからフィラグリンへの分解にプロフィラグリンのC末部分が重要である可能性が示唆されているものの、現時点ではその詳細は不明であり、今後の解明が待たれる。

また、興味深いことに、欧州人で同定された13種類の変異は、日本人では1例も同定されず、変異のスペクトラムに大きな人種差があることも併せて示唆された。現在、先進国では小児の約15-20%がアトピー性皮膚炎に罹患しているとされており、アトピー性皮膚炎は世界的に大きな社会問題の一つになっている。欧州人や日本人以外の人種については、未だその詳細は明らかになっておらず、それらの人種についても今後の早急なフィラグリン遺伝子解析が望まれる。

【結論】

尋常性魚鱗癬の日本人患者には、欧州人とは異なる、日本人固有のフィラグリン遺伝子変異が存在することが示された。また、欧州と同様、本邦においても、アトピー性皮膚炎患者群では、コントロール群と比べ、フィラグリン遺伝子変異を有意に高率に有していることが示され、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アトピー性皮膚炎発症において重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 清 水 宏

学位論文題名

日本人における尋常性魚鱗癬と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に関する研究

本申請者は、尋常性魚鱗癬の病因として、また、アトピー性皮膚炎の重要な発症因子として注目を集めているフィラグリン遺伝子変異について、日本人患者の検体を用いて解析を行い、3321delA、S2554X、S2889X、S3296X という4つの新規フィラグリン遺伝子変異を同定した。また、日本人のアトピー性皮膚炎患者を、これら4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、患者の約20%が変異を有し、一般人コントロール群（変異の保有率は約3%）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を示した（ $\chi^2 p = 8.4 \times 10^{-6}$; オッズ比 7.57, 95%信頼区間 = 2.84-23.03）。また、さらに興味深いことに、本申請者が今回報告した変異は、欧州人にもシンガポール人にも1例も見つかっておらず、人種によって変異のスペクトラムが異なることも示された。

本発表に対しては、フィラグリン遺伝子変異と臨床症状との相関関係（genotype-phenotype correlation）についての質問が複数なされ、①尋常性魚鱗癬とアトピー性皮膚炎の臨床的な違い、②フィラグリン遺伝子変異保有患者に見られやすい臨床的特徴、③各フィラグリン遺伝子変異の翻訳停止部位の違いによる臨床症状の差異、④フィラグリン遺伝子変異と気管支喘息との関係、⑤日常診療でのドライスキンの重症度の評価法、⑥変異に人種間で大きな差異がある理由、⑦フィラグリンの外用による尋常性魚鱗癬の治療の実現性、などが主な質問であった。質問①に対しては、尋常性魚鱗癬もアトピー性皮膚炎もドライスキンを生じ、両者が合併することも多いが、前者単独では皮膚炎を起こさず、尋常性魚鱗癬患者では掌紋増強が見られやすいとの回答であった。質問②に対しては、フィラグリン遺伝子変異を有するアトピー性皮膚炎患者は、2才未満での発症が多く、また成人型アトピーへの移行が多いこと、血清IgEが高値になりやすいこと、アトピーマーチに移行しやすいこと、掌紋増強が見られやすいことなどが知られているとの回答であった。質問③に対しては、患者皮膚のウェスタンブロット法を用いた評価では、より3'側の変異を有するアレルからはより5'側の変異を有するアレルと比べて大きな truncated profilaggrin が合成されるが、プロフィラグリンの分解産物であるフィラグリンはいずれの場合も検出されず、おそらくフィラグリン遺伝子の3'側の塩基配列が、プロフィラグリンからフィラグリンへの分解に必要な脱リン酸化に影響しているのではないかとの回答であった。質問④に対しては、アトピー性皮膚炎を有する気管支喘息患者ではフィラグリン遺伝子変異の保有率が有意に高いとの報告があり、気道粘膜にはフィラグリンが存在しないという事実と合わせると、そのような患者では皮膚での感作が気管支喘息発症に重要な働きをしているものと推察されるとの回答であった。さらに、申請者は、気管支喘息についてのスタディーの数自体が少なく、フィラグリン遺伝子変異と気管支喘息が本当に有意に相関するのかどうかについては

今後さらに詳細に検討する必要があるとコメントを加えた。質問⑤に対しては、ドライスキンの客観的な評価法としては TEWL（経皮的水分喪失量）の測定が代表的であるが、やや煩雑な手順を必要とするため、日常診療でルーティーンに行うのは難しいとの回答であった。質問⑥に対しては、これまで変異が報告されている欧州人、日本人、シンガポール人はいずれも異なる変異を持ち、未発表ではあるが、アフリカ人、中東人でもそれぞれ異なる変異が存在することがわかっていることから、それらが比較的最近生じた変異であることは推測できるものの、各人種にそれぞれ異なった固有のフィラグリン遺伝子変異が存在する理由の詳細はわかっていない、との回答であった。質問⑦に対しては、すでにフィラグリン含有クリームが市販されているが、その有効性の証明は十分にはなされていないとの回答であった。このように、本申請者は、主査、副査の質問に対し、これまでに得られた知見に基づいて、適切に応答していた。

この論文は、日本人固有のフィラグリン遺伝子変異を明らかにした点、フィラグリン遺伝子変異に伴う皮膚バリア機能異常が欧州人だけではなく日本人においてもアトピー性皮膚炎の重要な発症因子であることを示した点、そして、これまで免疫学的な観点から語られることの多かったアトピー性皮膚炎の少なくとも一部が皮膚バリア機能異常を背景に発症している可能性を示した点で高く評価され、今後の研究のさらなる発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。