

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

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野

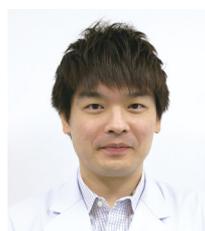
乃村 俊史

Filaggrin plays a crucial role in epidermal barrier formation. Recently, loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin (*FLG*) have been shown to predispose to atopic dermatitis. Since most of the *FLG* mutations identified are a nonsense mutation, we, in this study, aimed to develop novel therapeutic strategies for atopic dermatitis targeting at nonsense mutations in *FLG*. First, we performed mutation analysis of *FLG* to clarify the mutation frequency in the Japanese population and showed that 10% of the population carry one or more *FLG* mutations. Subsequently, we established reporter gene assays that can detect readthrough efficacy and performed compound screening by using these assays. Notably, we identified about 50 potential hits from the compound libraries. These results would open a new avenue for developing more effective and specific therapies for this intractable disease.

緒言

アトピー性皮膚炎は、小児の約10 - 20%が罹患する極めて頻度の高い疾患である。しかし、アトピー性皮膚炎の病因は長らく不明であり、その治療は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、申請者は最近、日本人アトピー性皮膚炎患者の比較的小さな集団を解析し、その約30%がフィラグリン遺伝子変異を持つことを明らかにした¹⁻³⁾ (図1)。フィラグリンは、皮膚バリア機能に必須のタンパク質であり、遺伝子変異により皮膚バリア機能が低下すると種々の抗原に易感作性となり、アトピー性皮膚炎を発症しやすくなると推測されている。

そこで本研究では、まず、サンプルサイズの大きな集団を用いてフィラグリン遺伝子変異の保有率を解析し、さらに皮膚バリアの破綻に伴う慢性抗原刺激がアトピー性皮膚炎の主要な病因であるという新しい仮説のもとに、アトピー性皮膚炎の病因に直接的に基づいた初めての治療の試みとして、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療法の開発を目指すことにした (図2)。通常、ナンセンス変異により早期終止コドンができるとそこでリボソームはタンパク質の翻訳を中止するため、機能性タンパク質が産生されず、疾患を発症する。本研究では、リボソームによるmRNA翻訳時にナンセンス



Development of novel therapeutic strategies for atopic dermatitis targeting at filaggrin

Toshifumi Nomura

Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

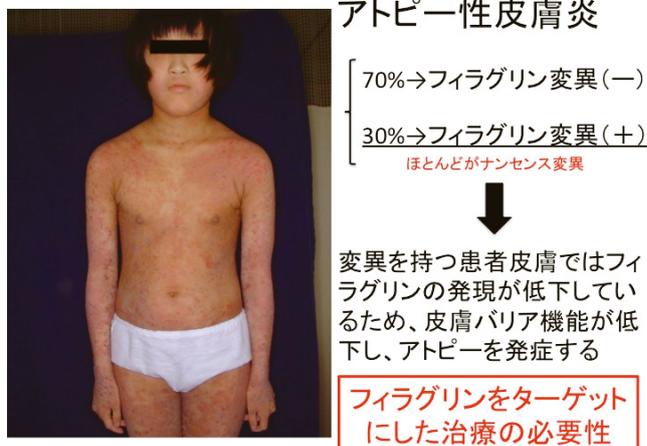


図1 アトピー性皮膚炎患者の一部はフィラグリン遺伝子に生じたナンセンス変異により発症する。

変異を読み飛ばしタンパク質合成をし続ける「リードスルー」という現象を使い、フィラグリン遺伝子のナンセンス変異を読み飛ばすことを目指す。日本人アトピー性皮膚炎患者で同定されたフィラグリン遺伝子変異の80%以上がナンセンス変異であるため³⁾、リードスルー活性を持つ薬剤を用いれば多くの患者で正常の機能を持つフィラグリンの産生増加が見込める。本研究では、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 (図2)。

実験

1. フィラグリン遺伝子変異保有率解析

環境と子供の健康に関する北海道研究 (通称: 北海道スタディ) は、平成13年からリクルートを開始し、現在、北海道内の約2万人の児が登録している出生コホート研究であり、一般集団を対象にしている。今回の研究では、そのうち、7歳に到達した児1,065名を対象にフィラグリン

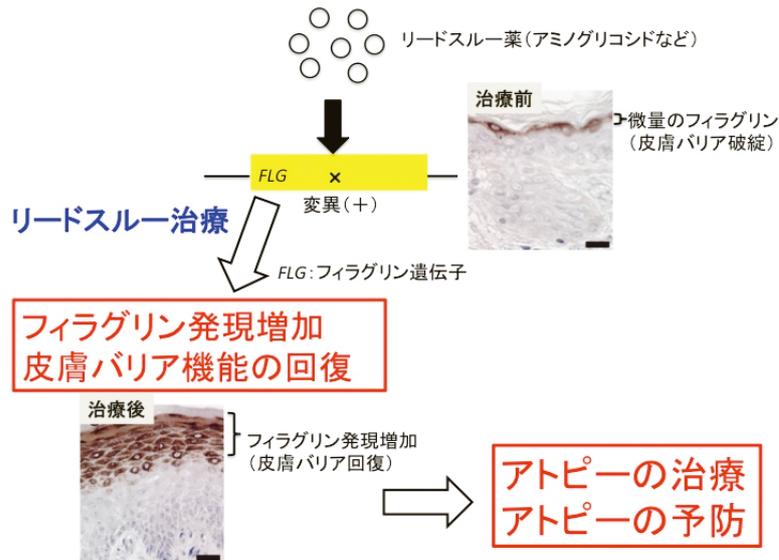


図2 フィラグリン遺伝子に生じた変異を読み飛ばす(「リードスルー」)ことで皮膚バリア機能が回復し、アトピー性皮膚炎の治療と予防につながる事が期待される。

遺伝子変異(臍帯血)とアトピー疾患の発症率などについて解析した。フィラグリン遺伝子変異については、これまで我々が同定した11種類の変異のうち、頻度の高い8種類のフィラグリン遺伝子変異(3321delA, S1695X, Q1701X, S2554X, S2889X, S3296X, K4022X, 新規変異1つ)についてSanger法を用いたダイレクトシーケンズでスクリーニングした。アレルギー疾患(アトピー性皮膚炎、気管支喘息)の有無と重症度については、International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)の間診票を用いて、2歳時、4歳時、7歳時に判定した。

2. 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

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(図3)。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

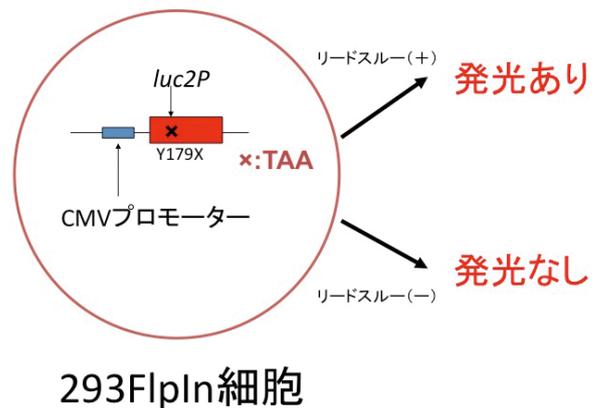


図3 この細胞株はリードスルーが起こったときのみ発光強度が増すため、薬剤のリードスルー活性測定に有用である。

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。

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)

2. 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。

結果

1. フィラグリン遺伝子変異保有率解析

1065人中96人にフィラグリン遺伝子変異を認め (heterozygote が 93 人、compound heterozygote が 3 人)、解析集団の 9.3%がフィラグリン遺伝子変異を有していた (図4)。変異の内訳は、3321delA : 15 人、S1695X : 0 人、Q1701X : 2 人、S2554X : 11 人、S2889X : 38 人、S3296X : 7 人、K4022X : 27 人、新規変異 : 2 人であった (図4)。フィラグリン遺伝子変異とアトピー性皮膚炎の関連について解析したところ、2歳時、4歳時では、オッズ比がそれぞれ 1.55 (95%信頼区間 : 1.08-2.22)、1.47 (95%信頼区間 : 1.03-2.09) であり有意差を認めしたが、7歳時ではオッズ比が 1.34 (95%信頼区間 : 0.95 - 1.90) であり、有意差を認めなかった。また、アトピー性皮膚炎の重症度については、フィラグリン遺伝子変異保有群のほうが非保有群と比べて有意に高かった (4歳時)。しかしながら、変異の種類と重症度の間には明らかな相関は認めなかった。フィラグリン遺伝子変異やアトピー性皮膚炎の有無と気管支喘息の発症率には有意差を認めなかった。

2. 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、同ベクターをアトピー性皮膚炎 293 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。

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)

2. 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

日本人の9.3%がフィラグリン遺伝子変異を持つ

1065名を8種類のフィラグリン変異についてダイレクトシーケンスでスクリーニング

Wild type: 969人
Heterozygote: 96人 **9.3%が変異を保有**
Homozygote: 3人

変異の内訳

3321delA: 15人	S2554X: 11人	K4022X: 27人
S1695X: 0人	S2889X: 38人	新規変異: 2人
Q1701X: 2人	S3296X: 7人	

図4 日本人の一般人口の約 10% がフィラグリン遺伝子変異を有している。

ルシフェラーゼアッセイを用いたスクリーニング

Raw signal	No. of compound
0~100	18505
101~200	1357
201~300	62
301~400	29
401~500	11
501~600	5
601~700	11
701~ 800	2
801~ 900	4
901~ 1000	3
1001~	3
Total	19992

Positive control signal average
4618

Negative control signal average
53.8

Signal>200
No. of compound=130

図5 ルシフェラーゼアッセイを用いた 1 次スクリーニングにより、130 個の hit compound を同定した。

た (全化合物の約 0.65%) (図5)。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。

考察

1. フィラグリン遺伝子変異保有率解析

1.1. フィラグリン遺伝子変異の保有率について

英国の学童調査では変異の保有率は 13.8% であり⁴⁾、北海道八雲町の成人を対象にした八雲スタディでの変異の保有率は 11.1% であった⁵⁾。今回の我々の結果でも対象集団の約 10% 弱が変異を保有しており、フィラグリン遺伝子変異の保有率は日本でも英国でも約 10% 程度と推測される。人口の少なくとも 1 割は遺伝的に皮膚バリア機能が低

下しており、経皮的に易感作性でアトピー性皮膚炎を発症しやすいことが予想される。

1.2. フィラグリン遺伝子変異とアトピー性皮膚炎について

欧米のスタディでは、フィラグリン遺伝子変異はアトピー性皮膚炎の重要な発症因子であることが示されており(オッズ比: 2.13~4.78)^{6,7)}、日本人でも両者に有意な相関は認められたが、欧米のデータと比するとオッズ比はやや低めであった。

2. 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

アトピー性皮膚炎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。

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)

上述の実験2. 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アトピー性皮膚炎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。

総 括

本研究により、日本人の約10%がフィラグリン遺伝子変異を持ち、アトピー疾患を発症しやすい状態であることが明らかになった。これは、アトピー性皮膚炎の治療にフィラグリンの発現を増やすことが重要であることを示唆するとともに、アトピー性皮膚炎を発症するから保湿剤の使用などにより皮膚バリア機能を回復させることでアトピー

疾患を予防できる可能性を示唆する重要な知見である。

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50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、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いく予定である。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、アトピー性皮膚炎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。

(引用文献)

- 1) Nomura T, Sandilands A, Akiyama M, et al. Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 119: 434-440, 2007.
- 2) Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al. Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and significantly associated with atopic dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol* 128: 1436-1441, 2008.
- 3) Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al. 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.
- 4) Brown SJ, Relton CL, Liao H, et al. Filaggrin haploinsufficiency is highly penetrant and is associated with increased severity of eczema: further delineation of the skin phenotype in a prospective epidemiological study of 792 school children. *Br J Dermatol* 161: 884-889, 2009.
- 5) Kono M, Nomura T, Ohguchi Y, et al. Comprehensive screening for a complete set of Japanese-population-specific filaggrin gene mutations. *Allergy* 69: 537-540, 2014.
- 6) Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin

mutations associated with skin and allergic diseases. N Engl J Med 365: 1315-1327, 2011.

7) Cramer C, Link E, Horster M, et al. Elder siblings enhance the effect of filaggrin mutations on childhood

eczema: results from the 2 birth cohort studies LISApplus and GINIplus. J Allergy Clin Immunol 125: 1254-1260, 2010.