

日本人における接触皮膚炎とバリア機能に関与する遺伝子変異の解析 および 3D スキンモデルを用いた接触皮膚炎の最適な治療法の探索

新潟大学医歯学総合病院皮膚科

林 良太

Contact allergy (CD) is an allergy reaction caused by exposure to a substance and the patients with CD is suffer from pain and itchy. We usually perform patch test to identify cause of CD. However, there are many causes of CD including metal, detergent and flavoring. While it take a lot of time to perform patch test and it is difficult to perform it in all clinic. If we can predict a risk of CD, the patients with CD may be decreased. Recent study demonstrated that the genes of barrier function including *FLG* were related with CD. However, it is not clear the relationship between CD and genes of barrier function in Japanese population.

Therefore, we performed mutation analysis of the genes related with barrier function including *FLG*, *FLG2* and *TGM5*. We could not perform sufficient number of cases, and it was difficult to conclude the relationship between CD and genes of barrier function in Japanese population at this point. While the mutations in the *FLG2* gene were identifies in several patients with CD. We need further studies to clear the relationship between *FLG2* gene and CD.

We also tried to establish 3D skin model of CD. It was difficult to use cells of the patients with CD, and we tried to make 3D skin models using normal keratinocytes, cytokines including IL-4, and metal.

1. 緒言

接触皮膚炎は外界の刺激、物質に対するアレルギー反応によって生じる。かゆみや疼痛といった症状の他、見た目
の問題から精神的苦痛を生じる場合もある。症状が酷い患者では、パッチテストにより原因物質を特定し、原因物質を除去することで症状の緩和を目指している。しかし、接触皮膚炎の原因は金属アレルギー、洗剤、ハンドクリームなどの使用品、香料など多岐にわたり、原因となるアレルゲンを調べるためには検査を行う人数の確保、多大な時間の確保が必要であるため全ての施設で行うことは難しい。よって、事前に接触皮膚炎のリスクとなる原因物質が分かれば、接触皮膚炎の患者数を減少することが可能となる。皮膚バリア機能に関与する遺伝子の代表例がフィラグリンをコードする *FLG* 遺伝子であり、日本人のアトピー性皮膚炎患者の 30% 程度に *FLG* 遺伝子変異が同定される。また、近年 *FLG* 遺伝子とニッケルなどの金属アレルギーの関与が指摘されている¹⁾。

しかし、日本人における *FLG* 遺伝子とアレルゲンの関連を検討した論文はなく、*FLG* 遺伝子以外のバリア機能に関与する遺伝子の変異とアレルゲンの関連は明らかでない。本研究の第一の目的は、日本人における接触皮膚炎の原因物質とバリア機能に関与する遺伝子変異/多型との関

連を特定することを最大の目的とした。この関連性を明らかにすることでパッチテストを行わずに原因物質を予想し、原因物質を除去することで症状が改善する可能性がある。

申請者は遺伝性皮膚疾患患者の皮膚を用いた 3D スキンモデルの作製を行っており、様々な皮膚疾患の患者細胞を用いた 3D スキンモデルの作製を試みている。この手法を用いて、3D スキンモデルに様々な薬剤を添加することで患者に最適な治療の探索を目指している。本研究では、バリア機能に関与する遺伝子に変異/多型が同定された接触皮膚炎患者の皮膚を用いた 3D スキンモデル作製を試みた。

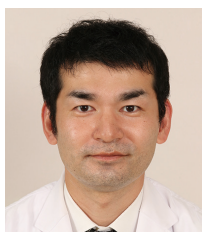
2. 方法

2. 1. 遺伝子解析による病的変異および遺伝子多型の検索

遺伝子解析に関して同意説明を行い、同意いただいた接触皮膚炎患者の血液 2mL を用いて DNA を抽出した。患者 DNA を用いて *FLG* 遺伝子、*TGM5* 遺伝子、*LOR* 遺伝子など皮膚のバリア機能に関与する遺伝子を Polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅し、direct sequence 法により全エクソンおよびエクソン・イントロン境界部を解析し、病的変異/多型の有無を確認した。一部の患者においてはエクソーム解析によりこれらの遺伝子の変異の有無を確認した。

2. 2. 接触皮膚炎 3D スキンモデルの作製

接触皮膚炎患者の表皮細胞および線維芽細胞を用いて 3D スキンモデルを作製することが理想的ではあるが、接触皮膚炎において皮膚生検を行う機会が少ないため、接触皮膚炎患者組織を用いて 3D スキンモデルを作製することが難しい。よって、健常皮膚を用いた 3D スキンモデルを



Mutation analysis for the genes related with contact dermatitis and barrier function in the Japanese population, and analysis for the optimal treatment of contact dermatitis using 3D skin model

Ryota Hayashi

Niigata University Medical and Dental Hospital, Division of Dermatology

作製し、サイトカインなどを添加することにより接触皮膚炎の3Dスキンモデル作製を目指した。健常人由来の皮膚を用いた3Dスキンモデル作製法は以下の通りである。

健常人由来の線維芽細胞と1型コラーゲン、Fetal Bovine Serum (FBS)、 NaHCO_3 などの混合液を混和し、培養容器に入れ、真皮成分のコンストラクトを作製した。数日間、線維芽細胞用培養液で培養を行い。数日後に健常人に由来の表皮細胞を真皮成分のコンストラクト上層に添加した。以後は Ca^{2+} 非含有ケラチノサイト用培養液で培養を行った。3-5日後に Ca^{2+} 含有のケラチノサイト用培養液に変更し、培養を行うことで3Dスキンモデルを作製した。さらに培養液中にIL-4などのサイトカインの他、様々な金属を表皮側に添加することにより接触皮膚炎様の3Dスキンモデルが再現出来るかどうかについて検討した。

3. 結果

3.1. 接触皮膚炎患者の遺伝子解析

現段階では遺伝子解析を施行した患者数が少なく、日本人におけるバリア機能に関与する遺伝子と接触皮膚炎の関連を明確に言えるほど明らかにすることは出来なかった。接触皮膚炎の原因が同定された患者で*FLG* 遺伝子、*TGM5* 遺伝子、*LOR* 遺伝子などのバリア機能関連遺伝子に変異が同定されなかった患者がいる一方で、若年で金属アレルギーを有する難治性手湿疹の患者においては*FLG* 遺伝子に病的変異を有する症例も存在した。*TGM5* 遺伝子、*LOR* 遺伝子に明らかな病的変異をもつ症例はなかった。

一方、一部の患者において*FLG2* 遺伝子にナンセンス変異がみられたが、現段階では接触皮膚炎と関与するかどうかは症例数が少ないため不明である。

3.2. 接触皮膚炎患者細胞を用いた3Dスキンモデルの作製

本来は、接触皮膚炎患者の生検検体の余剰皮膚を用いた表皮細胞、線維芽細胞を用いて3Dスキンモデルを作製することが理想ではあったが、接触皮膚炎患者において皮膚

生検を行うことが少ない点からも、残余健常皮膚を用い、サイトカインを添加することにより接触皮膚炎3Dモデルの作製を行う方針とした。健常人由来の細胞を用いた検体の作製法は上記の通りであり、作製した3DスキンモデルのHematoxyrin Eosin (HE) 染色は図のように正常な角層、顆粒層、有棘層、基底層を有する表皮構造となった。一方、真皮成分はある程度構成はされているものの、我々が普段見慣れている健常皮膚のHE染色よりも細胞密度が乏しく、更なる改善をする必要があると思われる。

過去の報告では、HaCaT細胞で作成した3DスキンモデルにIL-4、IL-13を添加することによりアトピー性皮膚炎様の表皮変化を伴う3Dスキンモデルが出来ることが明らかになっている⁴⁾。申請者も健常人皮膚を用いた3Dスキンモデルの培養液中にIL-4やIL-13もしくは両サイトカインを添加した。IL-4、IL-13の濃度による影響もあるかもしれないが、現段階では安定してアトピー性皮膚炎様の表皮変化を伴う3Dスキンモデルを作製することが出来なかった。

4. 考察

アトピー性皮膚炎において皮膚のバリア機能は極めて重要であるが、アトピー性皮膚炎患者では接触皮膚炎を合併することが多いこと、アトピー性皮膚炎患者の30%程度が*FLG* 遺伝子に変異を有すること、*FLG* 遺伝子変異とニッケルなどの金属アレルギーの関与があること、などから接触皮膚炎と*FLG* 遺伝子などのバリア機能関連遺伝子との関連があると考えられる¹⁾。一方で、日本人においては接触皮膚炎患者で遺伝子解析を行われることは多くないと想定され、研究自体がほとんどないのが現状である。

我々が行っている研究も検体数が少ないため、現段階で日本人における接触皮膚炎患者とバリア機能関連遺伝子の変異の有無については明らかなことがいえる状況ではない。一方、若年の難治性手湿疹で当初acral peeling skin syndromeの可能性も考え、原因遺伝子である*TGM5* 遺伝子を解析したが変異が同定されなかった患者が後に金属ア

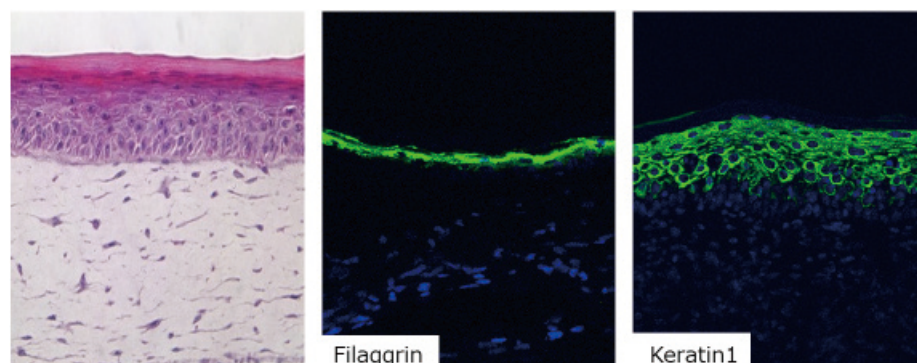


図 健常人細胞を用いた3Dスキンモデル

レルギーを有していることが明らかになった。この患者は *FLG* 遺伝子に機能喪失型変異を有しており、*FLG* 遺伝子変異が金属アレルギーの発症に関与していた可能性は否定できない。今後、症例数を増やすことにより日本人における *FLG* 遺伝子と金属アレルギーの関連が明らかになる可能性があり、研究を継続したいと考えている。

一方、今回の解析で接触皮膚炎を有した患者に一定数 *FLG2* 遺伝子にナンセンス変異を有していることが明らかになった。*FLG* 遺伝子と同様に *FLG2* 遺伝子もバリア機能に関与することが知られており、アトピー性皮膚炎との関連や皮膚が剥脱しやすくなる Peeling Skin Syndrome の原因遺伝子として報告されているが^{2, 3)}、*FLG* 遺伝子と違い、皮膚のバリア機能との関連がはっきりとしている訳ではない。実際に、今回の研究とは関連しないが申請者が以前に他疾患の診断確定のためにエクソーム解析を施行した際にも *FLG2* 遺伝子に変異が同定されることも多く経験している。*FLG2* 遺伝子が接触皮膚炎の疾患感受性遺伝子であるかどうかについては大規模な症例検討を行う必要がある。

3D スキンモデル作製に関しては元々予定をしていた接触皮膚炎患者細胞を用いることは難しく、健常人の細胞および IL-4 や IL-13、金属を添加することにより接触皮膚炎類似の 3D スキンモデルを作製した。前述の通り健常人の細胞を用いて作製した 3D スキンモデルの真皮成分はやや疎な印象はあるが、表皮に関しては我々が皮膚病理組織を観察する正常の表皮と類似している。しかし、健常人の細胞を用いた場合には表皮はややアトピー性皮膚炎様に肥厚する場合があり、IL-4 や IL-13 を添加した場合とそれほど差が出ない場合もあることから安定して接触皮膚炎様の表皮変化を伴う 3D スキンモデルの作製が出来ていない。今後は *FLG* 遺伝子に変異を有する患者細胞を用いること

でより安定した 3D スキンモデルを作製することが出来るかどうかについて検討を重ねていく。

5. 総括

本研究の最大の目的である日本人におけるバリア機能関連遺伝子と接触皮膚炎の関連および接触皮膚炎モデルとなり得るについてはまだ結論が出ていない状態である。しかし、コーセーコスメトロジー研究財団の助成により、本研究の活動を開始することが出来た。これからも本研究のテーマを継続し、最終的には目的を達成したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Lagrelius M, Wahlgren CF, Bradley M et al. Filaggrin gene mutations in relation to contact allergy and hand eczema in adolescence. *Contact Dermatitis* 82: 147-152, 2020.
- 2) Margolis DJ, Gupta J, Apter AJ, et al. Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects. *J Allergy Clin Immunol*; 133: 784-9, 2014.
- 3) Mohamad J, Sarig O, Godsel LM, et al. Filaggrin 2 Deficiency Results in Abnormal Cell-Cell Adhesion in the Cornified Cell Layers and Causes Peeling Skin Syndrome Type A. *J Invest Dermatol*; 138: 1736-1743, 2018.
- 4) Clarysse K, Pfaff CM, Marquardt Y et al. JAK1/3 inhibition preserves epidermal morphology in full-thickness 3D skin models of atopic dermatitis and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 33: 367-375, 2019.