
皮膚病巣部の発現変動遺伝子情報に基づいたアトピー性皮膚炎の原因遺伝子の
解析研究

16591096

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年6月6日

研究代表者 杉浦 久嗣

滋賀医科大学医学部非常勤講師



2005014897

<はしがき>

アトピー性皮膚炎皮膚病巣部で発現変動の高い遺伝子159個のうち、発症に関連する機能を保有する発現変動遺伝子、ならびにこれまでの linkage study でアトピーとの連が推定されている重要な chromosome 1q21, 2q33, 3q21, 5q31, 7q15, 7q33, 8p21-23, 9q22, 12q13-24, 12q22-24 等に位置する発現変動遺伝子を Web 上で検索し、アトピー性皮膚炎の原因遺伝子の可能性がきわめて高いと評価された候補遺伝子の特定の部位の SNPs を検索した。

研究組織

研究代表者	杉浦 久嗣	滋賀医科大学医学部非常勤講師
研究分担者	佐藤 浩	滋賀医科大学医学部教授
研究分担者	山本 和雄	滋賀医科大学医学部非常勤講師
研究分担者	植西 敏浩	滋賀医科大学医学部講師

交付決定学(配分額)

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	1,800,000	0	1,800,000
平成 17 年度	1,200,000	0	1,200,000
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総計	3,000,000		3,000,000

研究発表

(1) 学会誌等

Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, Kikuchi K, Kimura Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br J Dermatol* 152-1, 2005

Bingxue Bai, Keiko Tanaka, Takahiro Tazawa, Naoko Yamamoto, Hisashi Sugiura Association between RANTES promoter polymorphism -401A and enhanced RANTES production in atopic dermatitis patients. *J Dermatol Sci* 39 2005

杉浦久嗣、中野雅子 アトピー性皮膚炎の治療マーカー：皮膚乾燥とフィラグリン *皮膚の科学* 4巻増刊5号 2005

Bingxue Bai, Kazuo Yamamoto, Hroshi Satou, Hisashi Sugiura, Toshihiro Tanaka. Combined effect 25-hydroxycholesterol and IL-1β on IL-18 production in human colon carcinoma cell line (Caco-2) Inflammation, in press, 2006

Tazawa T, Sugiura H, Sugiura Y, Uehara M. Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 2004 Apr;295(11):459-64.

(2) 口頭発表

H. Sugiura, T. Ebise*, T.Tazawa, K. Tanaka, Y Sugiura**, M. Uehara, K.Kikuchi*, T. Kimura* Microarray analysis of atopic skin lesions International symposium on atopic dermatitis September 16, 2005

(3) 出版物 なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況 なし

アトピー性皮膚炎における Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 8 のSNPの
関与

要旨

アトピー性皮膚炎には、遺伝的要因が関与することが報告されている。近年、ジッターゲティング法により、アトピー性皮膚炎に関連する複数の候補遺伝子座が報告されている。本研究では、同候補遺伝子座に存在し、さらにケラチノサイトにも発現する分子を中心に遺伝子多形の解析を行いアトピー性皮膚炎の遺伝的要因の解明を試みた。健常ボランティア96人、アトピー性皮膚炎128人より末梢血液を採取しDNAの抽出を行った。PCRダイレクトシーケンス法により、塩基配列の解析を行った。SERPINB8 (Serpine peptidase inhibitor, clade B, member 8) の遺伝子解析では、RFLP(制限酵素断片多形)法も行った。7遺伝子に関して、アトピー性皮膚炎16検体、健常コントロール16検体をデータベース上で確認されているSNPに関してスクリーニングした。SERPINB8以外の6遺伝子(CP-2, NDST-1, Gli-1, TRK-A, SERPINB5, MCM2)では、コントロールと比較して有意な差は、見られなかった。SERPINB8の多形(G203A, R68Q)では、アトピー性皮膚炎と健常コントロールの間に差がみられたため、RFLP(制限酵素断片多形)法により多数の解析を行い合計214検体の解析を行った。203Aの遺伝子頻度はコントロールが0.177、アトピー性皮膚炎で0.285、A/Aのホモが、コントロールは0.075、アトピー性皮膚炎で0.094と頻度に差があった。SERPINB8の遺伝子多形による同分子の機能異常がケラチノサイトの最終分化過程に影響しアトピー性皮膚炎に関与している可能性が考えられる。しかしながら、SERPINB8の生理機能の解明等の今後更なる検討が必要である。

【目的】

アトピー性皮膚炎には、遺伝的要因が関与することが報告されている。近年、ジッターゲッティング法により、1q21、3q21、5q31～33、12q13、18q21等のアトピー性皮膚炎に関連する複数の候補遺伝子座が報告されている(1, 2)。1q21には、TRK-A(neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1)が存在する。CP-2(転写因子)とGli-1(glioma-associated oncogene homolog 1)は、12q13に存在する。5q33には、NDST1(N-deacetylase/N-sulfotransferase 1)、3q21にMCM2(minichromosome maintenance deficient 2)が存在する。SERPINB5(Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 5)とSERPINB8(Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 8)は18q21に存在する。これらは、上皮に発現しておりアトピー性皮膚炎と関連が疑われる。

さらに本年、フィラグリンの遺伝子変異がアトピー性皮膚炎の発症に関与していることが報告されている(3)。しかしながら、同変異はアトピー性皮膚炎の一部にしか見られず、日本人にはこの変異が存在しない(3)。従って、アトピー性皮膚炎の、遺伝的要因の全体像を解明する為には、更なる研究が必要であると考えられる。本研究では、アトピー性皮膚炎の候補遺伝子座に存在する上記7遺伝子(CP-2, NDST-1, Gli-1, TRK-A, MCM2, SERPINB5, SERPINB8)の遺伝子多形でJSNPのデータベース上で報告されている変異の解析を行いアトピー性皮膚炎の遺伝的要因の解明を試みた。

【方法】

滋賀医科大学倫理委員会の承認を受けた上で、インフォームドコンセントの得られた、健常ボランティア 96 人、アトピー性皮膚炎 128 人より末梢血液を採取し DNA の抽出を行った。7 遺伝子 (CP-2, NDST-1, Gli-1, TRK-A, MGLL, SERPINB5、SERPINB8) の SNP に関して、アトピー性皮膚炎 16 検体、健常コントロール 16 検体を表 1 に示すプライマーを利用し、PCR ダイレクトシーケンス法により、塩基配列の解析を行った。SERPINB8 の遺伝子解析では、RFLP(制限酵素断片多形)法も行った。すなわち、20 μ l 中 PCR 産物 1 μ l EcoT141 を含む溶液を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。(プライマーの一部、遺伝子頻度の一部は、JSNP のデータを参考とした。)

【結果】

7 遺伝子に関して、データベース上で確認されている SNP にアトピー性皮膚炎 16 検体、健常コントロール 16 検体をスクリーニングした。SERPINB8 以外の 6 遺伝子 (CP-2, NDST-1, Gli-1, TRK-A, SERPINB5, MCM2) では、コントロールと比較して有意な差は、見られなかった (表 2)。SERPINB8 の多形 (G203A, R68Q) は (図 1 a)、アトピー性皮膚炎と健常コントロールの間に差がみられたため、RFLP(制限酵素断片多形)法により多数の解析を行い合計 224 検体の解析を行った。RFLP では、203G のホモは 1334 b p のバンドが見られ、203A では、748bp と 586bp のバンドとなった (図 1 b)。203A の遺伝子頻度はコントロールが 0.177、アトピー性皮膚炎で 0.285 と差が見られた (表 3)。遺伝子型では、A/A のホモが、コント

ロールは7.5%、アトピー性皮膚炎で9.4%と頻度に差があった(表3)。

【考察】

SERPINB8 は、セリンプロテアーゼ阻害作用があり、分化したケラチノサイトに強く発現していることが報告されている(4)。生理的役割は、いまだ不明であるが、基底層の細胞には存在せず分化した細胞に分布することよりケラチノサイトの最終分化過程に関与していることが予想される(4)。アトピー性皮膚炎には、おいては、ケラチノサイトの最終分化過程における障害が疾患の発症に関与している可能性が示唆されている(5)。さらに、SERPINB8 は18q21 に存在し、この遺伝子座は、アトピー性皮膚炎の感受性遺伝子座として報告されている(6)。この遺伝子多形は、アミノ酸置換を伴う変異で SERPINB8 の機能に影響する可能性ある。これらより、SERPINB8 の遺伝子多形による同分子の機能異常がケラチノサイトの最終分化過程に影響しアトピー性皮膚炎に関与している可能性が考えられる。しかしながら、SERPINB8 の生理機能の解明等の今後更なる検討が必要である。

参考文献

- 1) Nat Genet. 2001 Apr;27(4):372-3.
- 2) Nat Genet. 2000 Dec;26(4):470-3.
- 3) Nat Genet. 2006 Apr;38(4):441-6. Epub 2006 Mar 19.
- 4) J Histochem Cytochem. 2002 Nov;50(11):1443-54.
- 5) Arch Dermatol Res. 1996 Jul;288(8):442-6.
- 6) Hum Mol Genet. 2002 Jun 15;11(13):1539-48.

表 1

Gene name	Primer sequence	
CP-2	Forward	5'-GAAGACGCCAGCCTAAAC-3'
	Reveres	5'-GCTGCTTTTGCACCTTTT-3'
NDST-1	Forward	5'-CAGGCGTCCAGGTTGACATAC-3'
	Reveres	5'-TGGTCAGTGGACGATTCTCG-3'
Gli-1	Forward	5'-CACCTCAGGATGACCACAGC-3'
	Reveres	5'-TCTGACTCCACAGGACTGGC-3'
SERPINB5	Forward	5'-GCTCCTTCATTCTCCTCTGCTG-3'
	Reveres	5'-GGCCTCTGGATTCTGGCTC-3'
TRK-A	Forward	5'-GTGGCTGCACTAACCCATCC-3'
	Reveres	5'-CTGAGCTTCCTCAAATCCCG-3'
SERPINB8	Forward	5'-TGGGATCCAGAGTCACCTTC-3'
	Reveres	5'-TTGCCACCAATATCAGGAGTG-3'
MCM2	Forward	5'-AATCAGGGCGACTTCTGGAC-3'
	Reveres	5'-GTTGGTCTCAGCAGCGAATG-3'

表 2

Gene name	AD/ Control	Allele1/ Allele2	Amino acid change	Resion	Allele frequency		Flanking seuence
CP-2	AD	A/G		Promoter	0.50	0.50	CAA「A/G」
	Control				0.52	0.48	AGT
NDST1	AD	C/A		5'UTR	0.67	0.33	AGA「C/A」
	Control				0.76	0.23	CTT
Gli-1	AD	T/C	G933D	CDS	0.56	0.44	GAA「T/C」
	Control				0.52	0.48	CCC
TRK-A	AD	G/A		Promoter	0.96	0.04	GGG「G/A」
	Control				0.94	0.06	AAG
SERPIN5	AD	G/C	V189L	CDS	0.81	0.24	AGA「G/C」
	Control				0.76	0.18	TCA
MCM2	AD	C/T	V667M	CDS	0.97	0.03	CCA「C/T」
	Control				0.97	0.03	GGT

表 3 Allele and genotype frequencies of 203G/A in SERPINB8 coding sequence.

Subjects (n)	Allele		Genotype		
	G (%)	A (%)	G/G (%)	G/A (%)	A/A (%)
AD (128)	183 (71.5%)	73 (28.5%)	67 (52.3%)	49 (38.3%)	12 (9.4%)
Control (96)	158 (82.3%)	37 (17.7%)	67 (69.8%)	24 (25.0%)	5 (7.5%)

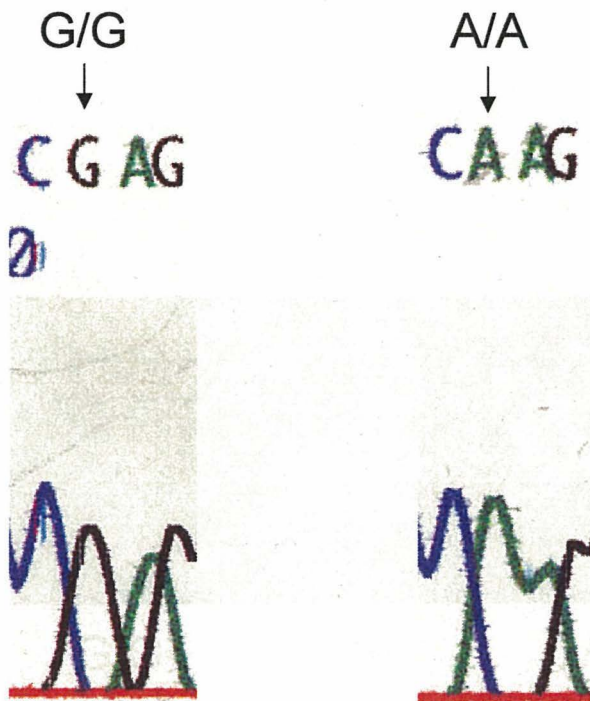


図1a SERPINB8のSNP (G203A, R68Q)
PCRダイレクトシーケンス

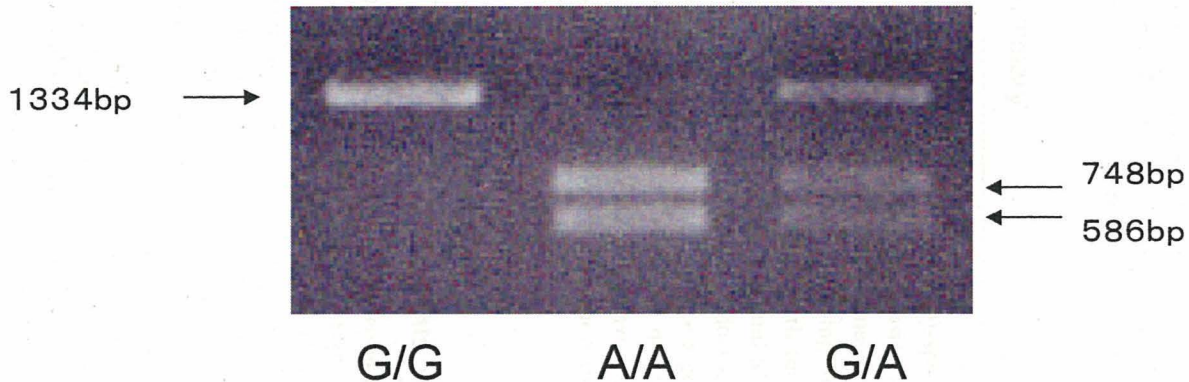


図1b SERPINB8のSNP (G203A, R68Q)
EcoT141によるRFLP(制限酵素断片多形)