

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08298

研究課題名（和文）膿疱症におけるIL-36カスケードの解明

研究課題名（英文）Analysis of IL-36 cascade on pustular diseases

研究代表者

藤本 徳毅 (Fujimoto, Noriki)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50378460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：HaCaT細胞においてqPCRでIL36RN mRNAの発現が増加する条件を探したが、TNF- α +IL-17AやIL-1、LPSなどの刺激では有意な増加はみられなかった。レンチウイルスであるlentiCRISPR v2を用いてIL36RN遺伝子をノックアウトしたHaCaT細胞を作成し、IL-1、Dermcidin-1L、Poly(I:C)、LPSで刺激してTNF-、IL-6、IL-8の発現を通常のHaCaT細胞と比較したが、有意な差はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養表皮角化細胞であるHaCaT細胞におけるIL-36カスケードに注目した限りにおいては、IL-36レセプターアンタゴニストであるIL36RaがTNF-、IL-6、IL-8の産生に果たす役割は大きいとは言えない結果であった。

研究成果の概要（英文）：We looked for various conditions in which qPCR expression of IL36RN mRNA in HaCaT increased, but significant increase was not observed by the stimulation such as TNF- α +IL-17A, IL-1, and LPS. We generated HaCaT cell line in which IL36RN gene was knocked out using lentiCRISPR v2. We stimulated the knocked out HaCaT cell with IL-1, Dermcidin-1L, Poly(I:C), and LPS, and compared the expression of TNF-, IL-6, and IL-8 with normal HaCaT cell, but significant difference was not observed.

研究分野：膿疱症

キーワード：IL-36 IL-36RN HaCaT IL36Ra

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-36 は IL-1 ファミリーに属し、IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL36Ra (IL-36 レセプターアンタゴニスト) の 4 つのアイソフォームが存在する。IL-36 により表皮細胞からの IL-36 産生が増加することが知られており、IL-36 はオートクラインに作用する。また、IL-38 も IL-36Ra と同様に IL-36 受容体のアンタゴニストとして機能することが報告された。IL-36 と膿疱症の関連については、2011 年に IL36RN が家族性汎発性膿疱性乾癬の原因遺伝子であるとの報告がなされた (Marrakchi S., et al. Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N Engl J Med* 365: 620-628, 2011)。さらに、尋常性乾癬を合併しない膿疱性乾癬の大多数が IL36RN の遺伝子変異をもつことが示され、膿疱性乾癬と IL36RN 遺伝子変異の関連が明確にされた (Sugiura K., et al. The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *J Invest Dermatol* 133: 2514-2521, 2013)。一方、膿疱症のもう一つの代表的疾患である掌蹠膿疱症については、我々の本邦 88 例の患者を対象とした IL36RN の mutation analysis (Takahashi T, Fujimoto N., et al. Mutation analysis of IL36RN gene in Japanese patients with palmoplantar pustulosis. *J Dermatol* 44: 80-83, 2017) や、同時期の西洋人掌蹠膿疱症患者を対象とした IL36RN の mutation analysis の結果より、IL36RN 遺伝子変異が主因となっていることは否定的であることが判明した。また、IL36RN 遺伝子がコードする IL-36Ra に関する基礎的な検討としては、Johnston らの報告 (Johnston, A., et al. IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *J Immunol* : 2613-2622, 2011) もあるが、膿疱症との関連や IL-36 カスケードのアンタゴニストとしての観点からの検討は行われていなかった。IL36RN の遺伝子変異により IL-36 系が亢進して IL-8 の産生が増加して膿疱が形成されるという説明が非常に受け入れやすいものであるにも関わらず、膿疱症の中でも膿疱性乾癬と掌蹠膿疱症では IL36RN 遺伝子変異の関与に大きな差異があり、IL36RN 遺伝子変異という genotype と膿疱症発症という phenotype の間に介在する因子の動態は、明らかではなかった。

2. 研究の目的

IL-36 カスケードにおいて IL-36Ra および IL-38 がどの程度関与しているのかという学術的な問いに対して、培養表皮角化細胞 (HaCaT 細胞) を用いてゲノム編集の手法により IL36RN および IL38 の遺伝子変異を有する培養表皮角化細胞を作成し、表皮細胞における IL-36 のオートクラインループにおいて、どのサイトカインやケモカインが実際には最も影響を受けるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

HaCaT を用いて IL36RN もしくは/かつ IL38 を標的とする CRISPR/Cas9 plasmid の transfection により、non homologous end joining による IL36RN もしくは/かつ IL38 のゲノム編集を行う。薬剤選択、限界希釈を行い、IL36RN 遺伝子もしくは/かつ IL38 遺伝子の機能がノックアウトされた HaCaT (機能消失変異株) を作成する。機能消失変異株および遺伝子編集をしていない HaCaT を、尋常性乾癬、汎発性膿疱性乾癬あるいは他の膿疱症との関与が知られる各種の刺激因子により刺激する。この刺激因子には、IL-36 受容体の直接の刺激因子である IL-36 α 、 β 、 γ 、乾癬に関与が深い自然免疫系 (Toll-like receptor 7) を刺激するイミキモド、乾癬と深い関与が考えられている抗菌ペプチド (dermcidine, LL-37, human beta defensin など)、および IL-36 の産生に関与するプロテアーゼ (カテプシン G, エラスターゼ、プロテアーゼ 3) が含まれる。各種刺激による細胞内経路に関与する各種分子産生および下流のサイトカイン産生を比較する。TNF、IL-6、IL-8 などのサイトカイン、CXCL1、CXCL2、CXCL8、CCL3、CCL5 などのケモカイン、および NF- κ B 経路と MAP kinase 経路に関与する分子の動態を、定量的 PCR 法、ウェスタンブロット、ELISA 法を用いて評価する。

4. 研究成果

Cas9 Genome Editing Vector である pD1321 プラスミドを用いて、lipofection 法によりプラスミドをトランスフェクションして IL36RN の遺伝子編集を行った。293T 細胞を用いた実験では、IL36RN がノックアウトされた細胞株を作成できた。ところが、HaCaT を用いたところ感染効率が悪いためか、うまくトランスフェクションができなかった。lipofection 試薬を何種類か変えたりトランスフェクションの条件を変えたが、IL36RN をノックアウトした HaCaT 株を樹立することはできなかった。そこで、レンチウイルスである lentiCRISPR v2 を用いることで、IL36RN 遺伝子をノックアウトした HaCaT 細胞株を作成することができた。平行して、ウェスタンブロットによる IL-36Ra たんぱくの発現を適切に評価するために、HaCaT 細胞において qPCR で IL36RN mRNA の発現が増加する条件を探した。過去の報告では TNF-a + IL-17A の刺激で IL-36Ra タンパクの発現が増加するということがあったが、TNF-a + IL-17A や IL-1、LPS など

の刺激では IL36RN mRNA の発現は増加しなかった。また、EGFR 阻害薬や MEK 阻害薬ではほとんど減少せず、TNF- α 刺激 24 時間後に 2 倍程度の増加がみられたが、実験によるバラツキが大きかった。そのバラツキの原因は、HaCaT 細胞における IL36RN mRNA の発現が角化や分化に大きく影響されているためではないかと考え、培養液のカルシウム濃度を変えるなどして IL36RN mRNA の発現に影響を与える培養条件を探した。しかし、IL36RN mRNA の発現に大きな影響を与える培養条件は見いだせなかった。次に、上記の IL36RN 遺伝子ノックアウト HaCaT 細胞株と通常の HaCaT 細胞を IL-1、Dermcidin-1L、LL-37、-Defensin-2、Poly(I:C)、LPS で刺激して、TNF-、IL-6、IL-8 の発現を比較したが、有意な差は見いだせなかった。IL-38 に関しては、IL-38 遺伝子のノックアウトおよび IL36RN 遺伝子と IL-38 遺伝子をノックアウトした HaCaT 細胞の作成も試みたが、本研究期間内にはそれらの細胞株を樹立することが出来なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiko Yamaguchi, Toshifumi Takahashi, Takashi K. Satoh, Noriki Fujimoto
2. 発表標題 Establishment of in vitro model of IL-36Ra dysfunction in a human keratinocyte cell line by IL36RN knockout using CRISPR/Cas9 system
3. 学会等名 International Societies for Investigative Dermatology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akihiko Yamaguchi, Toshifumi Takahashi, Takashi Satoh, Noriki Fujimoto
2. 発表標題 Elucidation of the role of IL-36 cascade in pustular skin disorders
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第47回年次学術大会・総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 聡文 (Takahashi Toshifumi) (70630862)	滋賀医科大学・医学部・講師 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------