

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461671

研究課題名(和文) 乾癬の重症度に相関する新たな分子LRGの役割：乾癬及びマウスモデルでの解析

研究課題名(英文) The Role of LRG, new molecule associated with the severity of psoriasis: Analysis in psoriasis patients and mouse model.

研究代表者

中島 英貴 (Nakajima, Hideki)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：70314995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬に対する治療効果や病勢の評価として、従来の血中CRPは、我々の検討では皮疹重症度との相関は見られず、特に中等症と軽症患者の間において有意な差は認められなかった。今回我々は、血中のロイシンリッチ-2グリコプロテインLeucine-rich-2 glycoprotein (LRG)が乾癬の重症度と相関すること、さらに患者血中の好中球においてLRGの発現が上昇し、乾癬の皮疹および肝臓においてLRGが産生されること、加えて乾癬モデルマウスにおいてLRG遺伝子をノックアウトすることにより乾癬様皮疹の軽減を認めたことから、バイオマーカーとしてLRGが有用であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：We assessed whether LRG could be a biomarker and any pathogenic of psoriasis. Serum LRG levels were significantly increased in psoriasis patients, and well correlated with PASI score. Moreover, serum LRG levels showed superior sensitivity over CRP in patients with mild to moderate psoriasis based on receiver operating characteristic curve analysis. Furthermore, RT-PCR analysis revealed that psoriasis patients showed increased LRG in peripheral mononuclear cells and neutrophils, the latter of which expressed LRG marginally in normal controls, suggesting that neutrophils are relevant to be LRG source in psoriasis. We also showed that LRG was up-regulated in both human psoriatic skins and psoriasis-like lesions of K5.Stat3C transgenic mice. To elucidate functional roles of LRG in psoriasis development, we crossed K5.Stat3C with LRG KO mice. LRG gene ablation attenuated the psoriatic features. In conclusion, LRG may be a useful biomarker.

研究分野：皮膚科

キーワード：CRP PASI 好中球 肝臓 乾癬モデルマウス LRG KO マウス

1. 研究開始当初の背景

ロイシンリッチ -2 グリコプロテイン leucine-rich -2 glycoprotein (LRG) は、1977 年に Haupt らにより同定された -2 グロブリンで、かつ全アミノ酸配列の約 20% がロイシンであるロイシンリッチリピート構造を持つ糖蛋白である。

2002 年に O' Donnell らによりヒト好中球に LRG mRNA が存在し、マウスにおいては肝臓に最も LRG mRNA が発現していると報告され、2009 年に Shirai らによってヒト培養肝細胞において、IL-6, IL-1, TNF により LRG が誘導されることが明らかにされたが、生体における LRG の機能は不明であった。

2010 年 Serada らにより、関節リウマチ患者血清で LRG が上昇し、血清 LRG は関節リウマチおよびクローン病の活動性と関連することが見いだされ、Th-17 細胞が関連した自己免疫疾患において LRG が何らかの役割を担っていることが推測された。

我々は、Th-17 細胞関連皮膚疾患である乾癬において、血清 LRG が健常人の約 2 倍高値であり、特に重症型の関節症性乾癬あるいは膿疱性乾癬では著明高値となることを本年報告した。乾癬においては、皮疹が重症であっても C-reactive protein (CRP) はほとんどの場合陰性であり、治療の指標となるバイオマーカーは存在していないが、CRP 陰性の症例でも LRG は治療による皮疹の改善とともに低下することが認められた。このことから LRG は乾癬における新たなバイオマーカーとなりうる可能性があり、更に多くの症例において治療による LRG の推移を検討し、なおかつマウスモデルを用いて LRG を標的とする乾癬治療の研究を開始したいと考えた。

2. 研究の目的

乾癬の治療薬としてシクロスポリンなどの免疫抑制薬や、近年使用可能になった生物学的製剤があるが、これらの治療前および治療経過において血清 LRG を測定し、治療効果との関連を検討する。現在までの検討で、生物学的製剤が二次無効となる症例において、早期に血清 LRG が上昇してくることが認められているために、治療効果判定のバイオマーカーとして有用かを検討する。

我々は、乾癬モデルマウスである K5-Stat3C トランスジェニックマウスにおける検討で、LRG は主に肝臓で産生されていると推測しているが、乾癬病変部においても LRG mRNA および LRG 蛋白の発現が上昇していることを認めており、皮膚病変と肝臓とのフィードバック機構の存在に注目している。

乾癬モデルマウスと LRG ノックアウトマウスを交配させることにより、皮膚、リンパ節および肝臓における Th-17 関連サイトカインの発現およびリンパ球サブセットを検討して、LRG の Th-17 細胞に対する影響を検討する。更に交配マウスにおいて、乾癬病変の出現が抑制もしくは消失することが認めら

れば、LRG が Stat3 シグナル伝達に関与しており、LRG 制御による乾癬治療の可能性が示唆される。

3. 研究の方法

乾癬患者血清を治療前および治療経過中に採取し、ELISA により LRG および Th-17 関連サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-21, IL-22, IL-23)、アディポカイン (レプチン、アディポネクチン、レジスチン、ケマリン、レチノール結合蛋白) を測定し、皮疹の重症度との関連を統計学的に検討する。治療前の LRG の値により、治療反応性の違いや生物製剤投与後の二次無効や paradoxical reaction の出現に関連性があるかを調査する。患者の体重や Body Mass Index (BMI)、糖尿病、高血圧、心血管病変などのメタボリックシンドロームの因子との関連も検討する。

乾癬モデルマウスである K5-Stat3C トランスジェニックマウスと独立行政法人医薬基盤研究所から供与される LRG ノックアウトマウスを交配させ、テープストリッピングやフォルボールエステル塗布により乾癬病変が誘導されるか検討する。

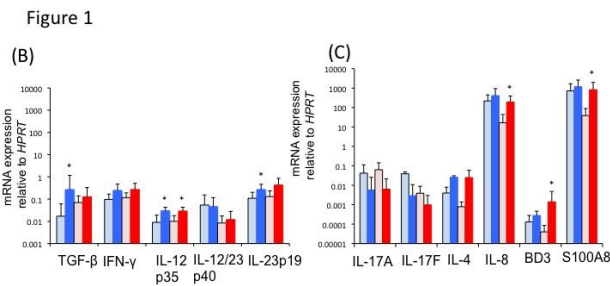
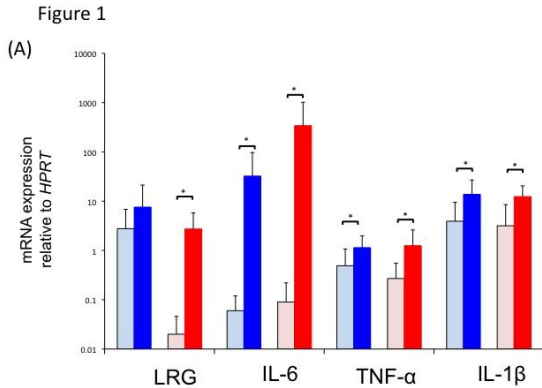
K5-Stat3C トランスジェニックマウスと LRG ノックアウトマウスの交配マウスにおける皮膚、リンパ節、肝臓において Th-17 関連サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-21, IL-22, IL-23) の発現を免疫染色、RT-PCR、サザンブロットにより検討し、フローサイトメトリーによりリンパ球サブセットの割合を各臓器別に検討する。

4. 研究成果

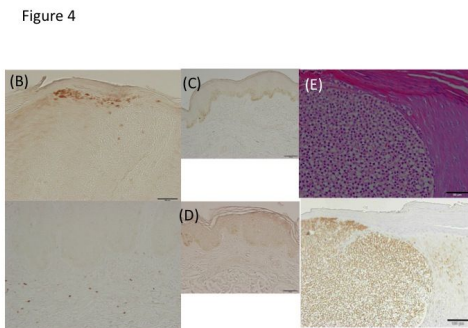
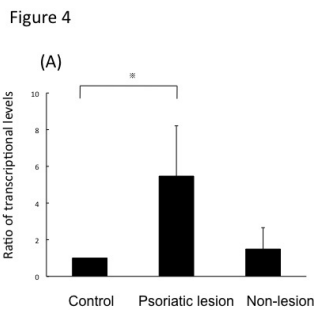
尋常性乾癬に対する治療効果の判定や病勢の評価として、従来のバイオマーカーとして血中 CRP が挙げられるが、我々が検討したところ皮疹の重症度との相関は見られず、特に中等症患者と軽症患者の間において有意な差は認められなかった。今回我々は、血中のロイシンリッチ -2 グリコプロテイン Leucine-rich -2 glycoprotein (LRG) が乾癬の重症度と関連すること、さらに乾癬患者血中の好中球において LRG の発現が上昇し、乾癬の皮疹局所および肝臓において LRG が産生されること、加えて乾癬モデルマウスにおいて LRG 遺伝子をノックアウトすることにより乾癬様皮疹の軽減を認めたことから、乾癬のバイオマーカーとして LRG が有用であることを実証した。以下に内容を詳述する。

乾癬患者および健常人末梢血から単核球と好中球を分離し、LRG の遺伝子発現を検討したところ、単核球は患者群と健常人において同程度の発現を認めたが、好中球は乾癬患者において有意な発現の上昇を認めたことから、乾癬患者における LRG 産生は好中球と関連があると考えられる。さらに LRG 産生を促進する IL-6, TNF- α , IL-1 と乾癬関連サイトカインの遺伝子発現が、乾癬患者にお

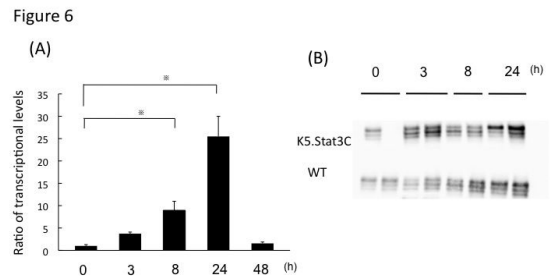
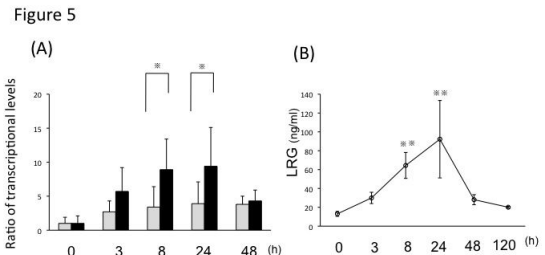
いて増加していたことから、乾癬患者における末梢血細胞は LRG を産生しやすい状況にあることが示唆された (Fig1A-C)。(図の説明：青；単核球、赤；好中球、薄い色；正常人、濃い色；乾癬患者)



乾癬患者血中 LRG は健常人よりも有意に上昇し、従来の炎症マーカーの CRP と強い正の相関を示した。さらに乾癬皮膚部において LRG の遺伝子発現上昇 (Fig4A)ならびに免疫染色により LRG 陽性細胞の存在 (Fig4B-E)を認めた。(図の説明：A；乾癬皮膚部での LRG 遺伝子発現、B, C, D, E(下)；LRG 免疫染色、B；乾癬皮膚部、C；正常皮膚、D；乾癬患者無疹部、E；膿疱性乾癬、E(上)；膿疱性乾癬の HE 染色)



乾癬モデルである K5.Stat3C マウスにおいて乾癬様皮疹を誘導すると、皮疹部 (Fig5A)ならびに肝臓において LRG の遺伝子および蛋白発現の上昇 (Fig6A, B)と、血中 LRG の上昇 (Fig5B)を確認した。(図の説明：Fig5 A；テープストリッピング刺激後の時間経過に伴う皮膚病変における LRG 遺伝子発現 灰色：Wild type マウス、黒：K5.Stat3C マウス. Fig5 B；テープストリッピング刺激後の時間経過に伴う血中 LRG 濃度. Fig6 A；テープストリッピング刺激後の時間経過に伴う肝臓での LRG 遺伝子発現. Fig6 B；テープストリッピング刺激後の時間経過に伴う肝臓での LRG 蛋白発現)



K5.Stat3C マウスと LRG ノックアウトマウスを交配させ、乾癬様皮疹形成における LRG の影響を検討すると、LRG 除去により皮疹は軽減し (Fig7A)、皮疹部での炎症性サイトカインの遺伝子発現減少 (Fig8A)と浸潤細胞である好中球とマクロファージの減少を認めた。

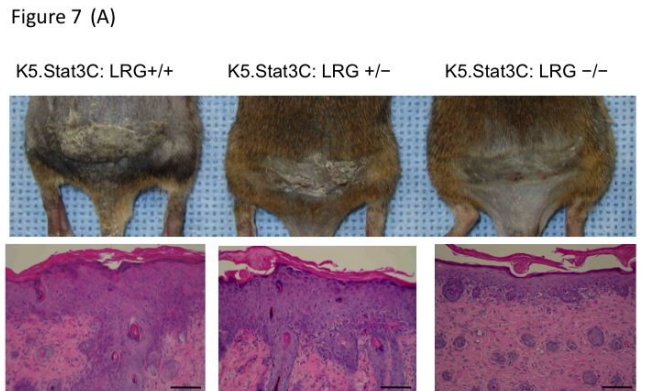
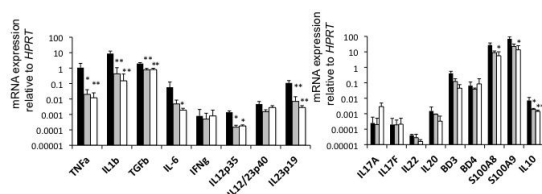


Figure 8 (A)



結論として、乾癬において血中 LRG は CRP よりも病勢を反映するバイオマーカーであり、さらに LRG は皮膚病変の形成を促進することから治療効果の判定にも有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Fujimoto N, Nakanishi G, Kabuto M, Nakano T, Eto H, Nakajima H, Sano S, Tanaka T. Merkel cell carcinoma showing regression after biopsy. Evaluation of programmed cell death1-positive cells. *J Dermatol*. 42: 496-499, 2015, 査読有.
DOI:10.1111/1346-8138.12805

Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Nakajima H, Sano S, Hayashi K. Comparison of ASK1/mTOR/4E-BP1 pathway signal activation and mutation of PIK3CA in Merkel cell polyomavirus-positive and Merkel cell polyomavirus-negative carcinomas. *Hum Pathol*. 46: 210-216, 2015, 査読有.
DOI:10.1016/j.humpath.2014.07.025

Nakajima H, Matsushima T, Sano S. Primary cutaneous adenoid cystic carcinoma arising from folliculitis decalvans. *J Dermatol*. 42: 741-743, 2015, 査読有.
DOI:10.1111/1346-8138.12880

Tomoko Okino, Ai Fujioka, Hideki Nakajima, Masahito Tarutani, Taro Shuin, Shigetoshi Sano. Effective treatment of metastatic renal cell carcinoma with topical imiquimod therapy. *Journal der Dermatologischen Gesellschaft* 12: 155-157, 2014, 査読有.
DOI:10.1111/d d g .12221

Tomoko Okino, Hideki Nakajima, Masahito Tarutani, Yoshio Kiyohara, Shigeyuki Murayama, Shigetoshi Sano. Effective therapy with proton irradiation for oral melanoma. *Journal of Dermatology* 40:945-946, 2013, 査読有.
DOI:10.1111/1346-8138.12291

[学会発表](計 10 件)

中島英貴, 辻 由貴子, 寺石美香, 佐野栄紀. インフリキシマブにより末梢浮腫が生じた膿疱性乾癬. 第 169 回日本皮膚科学会山口地方会. 2016.3.27. ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口県・宇部市)

中島英貴. Association between metabolic syndrome and bone markers in psoriatic arthritis. 第 40 回日本研究皮膚科学会. 2015.12.11-13. 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

中島英貴, 高橋 綾, 佐野栄紀. 難治性関節リウマチと診断されていた関節症性乾癬にインフリキシマブが奏功した 1 例. 第 30 回日本乾癬学会. 2015.9.4-9.5. ウェスティンナゴヤキャッスル (愛知県・名古屋)

中島英貴, 石元達士, 本田由美, 高田智也, 佐野栄紀. ベムラフェニブ投与中に疣贅状結節が多発した悪性黒色腫. 日本皮膚科学会第 373 回福岡地方会. 2015.7.4-7.5. 久留米医師会ホール (福岡県・久留米市)

中島英貴, 高石樹郎, 藤本 穰, 仲 哲治, 佐野栄紀. 乾癬病変形成におけるロイシンリッチ -2 グリコプロテインの昨日解析. 第 114 回日本皮膚科学会総会. 2015.5.29-5.31. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

中島英貴. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is an innovative biomarker for psoriasis linked to systemic inflammation. 第 39 回日本研究皮膚科学会. 2014.12.12-12.14. ホテル阪急エキスポパーク (大阪市・吹田市)

中島英貴. マウスモデルにおけるロイシンリッチ 2-グリコプロテインの乾癬皮膚形成への関与. 第 29 回日本乾癬学会学術大会. 2014.9.19-9.20. 高知市文化プラザかるぽーと. (高知県・高知市)

中島英貴. 乾癬の病態におけるメタボリック症候群. 第 65 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. 2013.11.9-11.10. かがしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

中島英貴. ヘルペス感染に続発した尋常性膿瘡. 第 77 回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 2013. 9. 21-9. 22. 大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)

中島英貴. ペントラキシン 3. 乾癬のバイオマーカーとしての有用性. 第 28 回日本乾癬学会学術大会. 2013. 9. 6-9. 7. 東京ドームホテル (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 英貴 (Nakajima, Hideki)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師
研究者番号：70314995

(2) 研究分担者

佐野 栄紀 (Sano, Shigetoshi)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授
研究者番号：80273621

中島 喜美子 (Nakajima, Kimiko)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授
研究者番号：20403892