

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860972

研究課題名(和文)皮膚におけるインターロイキン36の活性化に関する研究

研究課題名(英文)Research on activation of interleukin 36 in skin

研究代表者

山本 雅章 (Yamamoto, Masaaki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60624640

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)：インターロイキン36 (IL-36)の Maus ホモログである I11f9 を表皮特異的に発現する Maus を作出し、その表現型解析を行った。系統樹立できた Maus 系列 I11f9tg では、イミキモドで誘導される皮膚炎のスコアは野生型と比較して約20%程度高い傾向であった。しかし、SPF飼育条件下では、I11f9tg は皮膚疹を自然発症することなく、IL-33 を表皮特異的に発現する Maus と交配しても、乾癬様皮膚炎の発症はみられなかった。また、膿疱性乾癬患者11例を対象に IL-36RN 遺伝子の塩基配列を解析した。解析した内で2症例において既知の IL-36RN 遺伝子の変異を検出し、1例は最高齢での発症例であった。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice in which interleukin 36 gamma is over-expressed specifically in epidermis were generated. A mouse line, I11f9tg, was established from those mice. When imiquimod was applied on the skin of I11f9tg F1 mice, the cutaneous inflammation scores of those mice were exacerbated by about 20% in comparison with wild-type mice. In SPF condition, I11f9tg mice developed no spontaneous eruption. Even in I11f9tg mice crossed with I133tg mice, which overexpresses IL-33 in the epidermis, showed no psoriasis-like inflammation of the skin. In addition, 11 patients with pustular psoriasis were subjected to analysis of IL36RN mutations. Of those, a known mutation in IL36RN was found in 2 cases including an oldest case ever reported.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 皮膚炎 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

IL-36ファミリーはIL-1ファミリーのサイトカインとして同定されていたタンパクで、IL-1 / と同様の立体構造を有し、第2番染色体にクラスターとして存在するIL36A、B、Gの3つの異なる遺伝子にコードされている。乾癬の病態にはIL-17やTNF-などのサイトカインが重要な役割を果たしているが、最近、乾癬表皮でIL-36ファミリーの高発現が見いだされ、培養角化細胞においてIL-36ファミリーはIL-22/TNF- /IL-17によって誘導されることが明らかにされている。一方で、IL-36RNの変異で膿疱性乾癬が発症することが報告されており、IL-36RNの活性の低下がIL-36ファミリーの活性化に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

(1) IL-36ファミリーのトランスジェニックマウスについては、IL-36を表皮特異的に発現させたマウスが作製されており、IL-36RN (I11f5)欠損マウスとの交配によって皮膚炎の症状が誘導されること、ホルボールエステルの塗布によって乾癬様の皮膚病変が誘導されることが示されている。しかし、乾癬病変で最も発現量の多いIL-36の役割についても、まだ十分には明らかにはなっていない。そこで、本研究では、IL-36のマウスホモログであるI11f9を表皮特異的に発現するマウスを作成し、その表現型解析から皮膚におけるIL-36高発現の病態解明を目的とした。

(2) IL-36RNの変異は、一般的に尋常性乾癬の先行がない若年発症の膿疱性乾癬患者に検出される頻度が多いと報告されている。しかし、これまでにIL-36RN遺伝子解析が行われた対象者数は限られており、実際には膿疱性乾癬の表現型と遺伝子型の関連については不明な点が多い。そこで本研究では、多様な表現型を示す膿疱性乾癬におけるIL-36RN遺伝子型の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 兵庫医科大学遺伝子組換え実験(課題番号23012;29007;214012)および動物実験計画の承認(承認番号B09-251;13-001)のもとに、RIKEN FANTOM clone C130076J06から入手したI11f9 cDNAをケラチンK14プロモーターの下流にもつトランスジーンをマウスの受精卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作成し、表現型を解析した。

(2) 遺伝子倫理委員会の承認(倫ヒ第32号)のもとに、膿疱性乾癬におけるIL-36RN遺伝子変異をダイレクトシーケンシングお

よび次世代シーケンシングにより解析した。また、血中サイトカインの測定は、倫理審査委員会承認(第212号)のもとに実施した。

4. 研究成果

(1) 得られたマウスは、雄36匹、雌37匹(死亡2匹)で、その内11マウスにトランスジーンが存在を確認した。各F0マウスの皮膚におけるI11f9遺伝子の発現をTaqMan probe Mm00463327_m1 (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて解析した。その結果、6マウスにおいてトランスジーンの10倍以上の発現が確認できた(図1)。

まず、これらのマウスの背部皮膚を除毛し、翌日からホルボールエステルをBlumbergら(文献)に従って皮膚に塗布したが、野生型との差はみられなかった。一方、イミキモドをRollerら(文献)の方法に従って5日間連続で外用し、6日目に同部位の観察を行った。その結果、82-2のマウスにおいて、対照と比較して肉眼的に鱗屑と表皮の肥厚の増強が観察された。そこで、このマウスから系統樹立を行った(hK14mIL1F9tg#1)(HCM-0375)。このマウス系統のF1と対照の野生型マウスを用いて、イミキモド外用の実験を再度実施した。マウスの皮膚炎の所見は紅斑、鱗屑、硬さ、肥厚の4項目について5段階のスコア(0,1,2,3,4)で評価した。その結果、野生型(WT)に比較してhK14mIL1F9tg#1(I11f9tg)の方がスコアは約20%程度高い傾向であった(図2)。

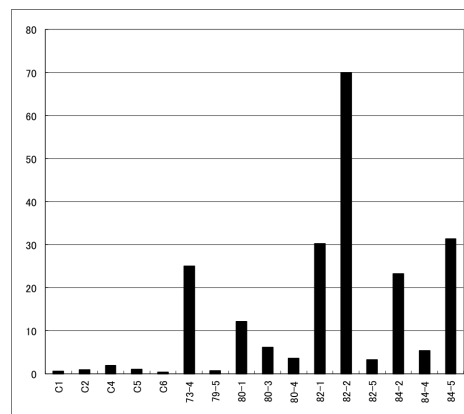


図1 F0マウスにおけるI11f9遺伝子の発現

次に、IL-33を表皮特異的に発現するマウスhK14mIL33#1はIL-33を表皮特異的に発現するマウスで、SPF条件下での飼育でも2型自然リンパ球が誘導されアトピー性皮膚炎に酷似した皮膚炎を自然発症する。ヒトでは、IL-33は乾癬表皮において発現が増加することが報告されている(文献)。そこで、IL-33を表皮特異的に発現するマウスhK14mIL33#1とhK14mIL1F9tg#1を交配し、IL-33とIL-36の両方の遺伝子を表皮特異的に発現するマウスhK14mIL33#1IL1F9#1tg(HCM-0469)を作成した。このマウスを30週までSPF条

件下で飼育し、皮膚炎の発症を観察した。hK14mIL33#1 は既報のとおり8週齢頃までに皮膚炎が発症したが、hK14mIL1F9tg#1 は皮膚炎の自然発症はみられなかった。また、hK14mIL33#1IL1F9#1tg の皮膚炎の程度と経過は、hK14mIL33#1 とほとんど差が無かった。従って、表皮における IL1F9 の発現のみでは皮膚炎は誘発できず、また、IL-33 の作用を増強する作用もみられなかった。

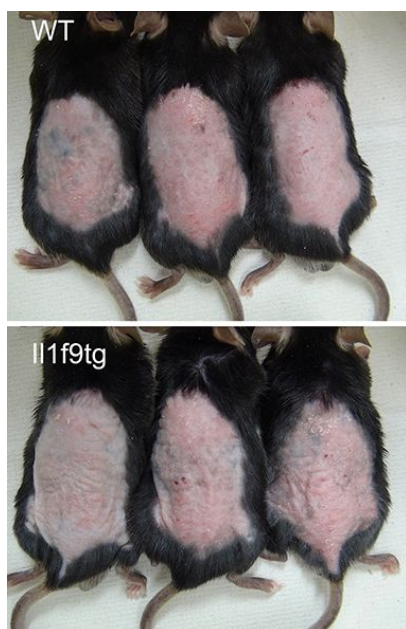


図2 イミキモド誘導性皮膚炎の比較

(2) 膿疱性乾癬患者11例を対象に IL-36RN 遺伝子の解析を実施した結果、2例において IL-36RN 遺伝子の変異を検出した。1例は兄弟にも同症があり、他の1例は尋常性乾癬が先行し、高齢になって初めて膿疱性乾癬を発症した。後者は、IL-36RN 遺伝子が検出された報告としては最高齢であり、顆粒球吸着療法(GMA)が奏効した。血中サイトカインを測定した結果、GMAによって IL-6、IL-8 の改善がみられた。

<引用文献>

Blumberg H, Dinh H, Dean C Jr, Trueblood ES, Bailey K, Shows D, Bhagavathula N, Aslam MN, Varani J, Towne JE, Sims JE. IL-1RL2 and its ligands contribute to the cytokine network in psoriasis. *J Immunol.* 2010; 185(7): 4354-62.

Roller A, Perino A, Dapavo P, Soro E, Okkenhaug K, Hirsch E, Ji H. Blockade of phosphatidylinositol 3-kinase PI3K or PI3K reduces IL-17 and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis. *J Immunol.* 2012; 189(9): 4612-20.

Meephansan J, Tsuda H, Komine M,

Tominaga S, Ohtsuki M. Regulation of IL-33 expression by IFN- and tumor necrosis factor- in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(11): 2593-600.

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2件)

Tominaga C, Yamamoto M, Imai Y, Yamanishi K. A Case of old age-onset generalized pustular psoriasis with a deficiency of IL-36RN (DITRA) treated by granulocyte and monocyte apheresis. *Case Rep Dermatol.* 2015; 7(1): 29-35. doi:10.1159/000380876. (査読有)

Yamamoto M, Imai Y, Sakaguchi Y, Haneda T, Yamanishi K. Serum cytokines correlated with the disease severity of generalized pustular psoriasis. *Dis Markers.* 2013;34(3):153-61. doi:10.3233/DMA-120958. (査読有)

[学会発表](計2件)

富永 千春, 山本 雅章, 永井 諒, 今井 康友, 山西 清文. 顆粒球吸着療法が奏効した水疱性類天疱瘡を合併した超高齢者膿疱性乾癬の1例. 第30回日本乾癬学会学術大会 2015.9.4 ウェスティンナゴヤキャッスル (愛知県名古屋市)

富永 千春, 山本 雅章, 今井 康友, 山西 清文. IL36RN 欠損症における高齢発症の膿疱性乾癬 第29回日本乾癬学会学術大会 2014.9.19 高知市文化プラザ かるぼーと (高知県高知市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/drm/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅章 (YAMAMOTO, MASA AKI)
兵庫医科大学・医学部・助手
研究者番号: 60624640

(2) 研究協力者

山西 清文 (YAMANISHI, KIYOFUMI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10182586

今井 康友 (IMAI, YASUTOMO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10529514

羽田 孝司 (HANEDA, TAKASHI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：90580035

富永 千春 (TOMINAGA, CHIHARU)
兵庫医科大学・医学部・病院助手

坂口 祥子 (SAKAGUCHI, YOSHIKO)
兵庫医科大学・医学部・実験補助

實川 織江 (JITSUKAWA, ORIE)
兵庫医科大学・医学部・実験補助