

令和元年6月9日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04886

研究課題名(和文) 無菌性の膿疱性疾患の包括的病態解明と新規治療戦略の開拓

研究課題名(英文) Elucidation of pathomechanisms and Development of new treatment strategies for aseptic pustuloses

研究代表者

杉浦 一充 (SUGIURA, Kazumitsu)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：70335032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本人ではAP1S3は膿疱性疾患の病因でないということを明らかにした。常染色体優性遺伝の膿疱性乾癬(GPP)の家系で従来毛孔性紅色靴糠疹で報告されていたCARD14の変異を同定した。劣性遺伝のGPP家系で新規IL36RN変異を同定した。Il36rnノックアウトマウスにイミキモドで誘導しGPPモデルマウスを作製した。このマウスに皮疹に対して抗IL-17抗体と好中球の遊走を阻害するCXCR2阻害薬に治療効果があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膿疱性乾癬の病因について、さらに解明された。具体的には、AP1S3は欧州の膿疱性乾癬には関連がある遺伝子であるが、日本人の膿疱性乾癬では無関係であることが明らかになった。日本人の膿疱性乾癬の病的変異を明らかにした。具体的には、CARD14c.349+1G>Aでは毛孔性紅色靴糠疹のみならず、GPPの病因であることを解明し、常染色体優勢遺伝のGPPの家系を日本で初めて明らかにした。さらにIL36RN新規遺伝子変異c.125T>Aを昇にした。さらに、膿疱性乾癬の治療薬として好中球遊走を抑制するCXCR2阻害薬が有効である可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：We showed that AP1S3 was not causative gene of pustuloses in Japanese. In addition, we found an autosomal dominant pedigree of generalized pustular psoriasis (GPP) associated with a CARD14 mutation, which was previously reported in a patient with pityriasis rubra pilaris. We also found a previously unreported homozygous IL36RN missense mutation in the two siblings with. Moreover, we established imiquimod (IMQ)-induced psoriasiform dermatitis in Il36rn knock out mice by topical application of IMQ to the back skin. We then treated IMQ-induced GPP model Il36rn/ mice with the anti-IL-17a antibody and the CXCR2 inhibitor. The anti-IL-17a antibody and the CXCR2 antagonist attenuated the clinical symptoms.

研究分野：炎症性角化症

キーワード：膿疱症 膿疱性乾癬 IL36RN CARD14 IL-36受容体拮抗因子欠損症 CARD14関連乾癬 AP1S3 CXCR2阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

*IL36RN*の遺伝子産物はインターロイキン36受容体阻害因子 (IL-36RN)である。皮膚のみならず上皮系の組織で誘導され発現する。IL-36RNはIL-36、IL-36、IL-36と拮抗し細胞膜上のIL-36受容体 (IL-36R)に結合し、下流のシグナルを抑制する。

IL-36RN欠損症(deficiency of interleukin-36 receptor antagonist: DITRA)では、IL-36、IL-36、IL-36とIL-36R

の結合を介する炎症を惹起するシグナルが持続的にオンになり病態が形成されると考えられている(図1)。DITRAは当初、汎発性膿疱性乾癬(GPP)の病因として同定されたが、急性汎発性発疹性膿疱症(AGEP)の一部

などのいくつかの無菌性の膿疱性疾患(以下膿疱性疾患)の病因であることが分かってきた(表1)。DITRAによる膿疱性疾患は常染色体劣性遺伝型式と考えられていたが、*IL36RN*ヘテロ接合体変異でも発症することがわかってきた。GPPやAGEPではしばしば敗血症や呼吸窮迫症候群(ARDS)などの重症内臓障害を併発する。日本人では*IL36RN*の2つの主要な病的創始者変異のうちの一つをもつ頻度が人口の2%(約260万人)に達する(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>)というデータがある。他方、*CARD14*は表皮角化細胞のNF- κ B活性化因子である。*CARD14*は多型・変異のアミノ酸の部位によりGPPや尋常性乾癬(PV)と関連している。*AP1S3*は転写因子AP1S3をコードしていて、その多型はアロポー稽留性肢端皮膚炎、GPPと関連している。以上のように病因遺伝子1つと疾患感受性遺伝子2つが解明された。しかし膿疱性疾患の分子レベルの病態解明に向けての取り組みは緒に就いたばかりであった。

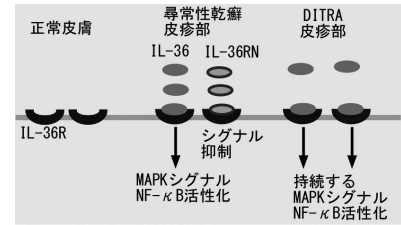


図1: 正常皮膚、尋常性乾癬とDITRAの皮膚部におけるIL-36R(受容体)、IL-36(アゴニスト)、IL-36RN(アンタゴニスト)の関係の模式図。IL-36Rは表皮角化細胞と真皮樹状細胞の細胞膜上に存在する。皮膚のみならず、肺や腎臓にも存在する。

	変異	多型
汎発性膿疱性乾癬 (尋常性乾癬を伴わない)	<i>IL36RN</i> , <i>LDHB</i>	<i>AP1S3</i>
汎発性膿疱性乾癬 (尋常性乾癬を伴う)	<i>IL36RN</i>	<i>CARD14</i>
急性汎発性発疹性膿疱症 (AGEP)	<i>IL36RN</i>	
アロポー稽留性肢端皮膚炎 (ACH)	<i>IL36RN</i>	<i>AP1S3</i>
掌跖膿疱症 (PPP)	<i>IL36RN</i>	

表1: 膿疱性疾患と遺伝子変異・多型; 太字は高頻度 *LDHB*は未発表

2. 研究の目的

本研究では膿疱性疾患の包括的病態解明を目指し、新規治療法開発に直結する基礎的データを得ることを目的とする。研究期間内に以下の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 日本人の膿疱性疾患における*AP1S3*の遺伝子変異・多型の役割について明らかにする。
- (2) 常染色体優性遺伝が推測されるGPPの家系と、劣性遺伝が推測されるGPPの家系の病因遺伝子を同定する。
- (3) 各種治療薬によるDITRAモデルマウスの病態への影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 日本人の膿疱性疾患の*AP1S3*の遺伝子変異解析

日本人の*IL36RN*変異も*CARD14*多型もないGPPを含む膿疱性疾患53症例のDNAを用いて*AP1S3*のエクソンすべてを直接シークエンス法で変異解析をした。

(2) 病因遺伝子が明らかにされていない家族性のGPPの家系において、全エクソームシークエンス法で病因遺伝子を同定する

既存の病因遺伝子変異のない GPP で常染色体優性遺伝が推測される家系と、劣性遺伝が推測される家系の、患者と非罹患者の DNA を収集していた(劣性遺伝の家系については Sugiura K, et al. J Invest Dermatol 2013 133:2514-21. に記載していた)。常染色体優性遺伝の家系、常染色体劣性遺伝の家系それぞれの DNA を用いて全エクソームシーケンス法等で病因遺伝子を同定した。

(3) 各種治療薬による DITRA モデルマウスの病態への影響を解析する。

申請者らは *IL36rn* のコンベンショナル KO マウス(*IL36rn*^{-/-}マウス)を作製した。理化学研究所変異マウス開発ユニット (<http://www.cdb.riken.jp/arg/index.html>) と共同開発した (ID#116703)。DITRA モデルマウスの作製と解析は以下のように実施する。

IL36rn^{-/-}マウスの背中を除毛後に 5%イミキモド含有クリームを 5 日間塗布した。皮膚所見、病理所見、real time PCR によりサイトカインプロファイルを検討した。野生型への誘発薬剤塗布群との比較も実施した。その後各種治療薬の病態への影響を解析した。上記イミキモド誘発モデルマウスに、抗 IL-17 抗体、好中球の遊走を抑制する CXCR2 阻害薬などによる治療実験を実施した。上述した方法と同様にサイトカインプロファイルなどを解析モデルマウスの病態への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 日本人の膿疱性疾患の *AP1S3* の遺伝子変異解析

日本人の *IL36RN* 変異も *CARD14* 多型もない GPP を含む膿疱性疾患 53 症例の *AP1S3* には 1 例も変異がなかった。この結果は欧州において *AP1S3* 変異が膿疱性疾患に認められるという結果と異なり、日本人では *AP1S3* は膿疱性疾患の病因でないということを示唆している。

(2) 病因遺伝子が明らかにされていない家族性の GPP の家系において、全エクソームシーケンス法で病因遺伝子を同定する

GPP で常染色体優性遺伝が推測される家族例 1 家系では、*CARD14c.349+1G>A* の変異が病因であることを明らかにした。この変異は今まで GPP や尋常性乾癬では報告がなかったが毛孔性紅色糠疹の病因として報告されたことのある変異であった。このことより、*CARD14c.349+1G>A* では毛孔性紅色糠疹のみならず、GPP の病因であることを解明し、常染色体優勢遺伝の GPP の家系を日本で初めて明らかにした (Takeichi T, et al. Br J Dermatol 2017;177:e133-e135.)。さらに、常染色体劣性遺伝の家系では全エクソームシーケンス法で *IL36RNc.125T>A* が病因であることを明らかにした。この変異は今までに報告のない変異であり、*IL36RN* 変異の日本人での拡がりを示した (Takeichi T, et al. J Dermatol Sci 2017 85:58-60.)。

(3) 各種治療薬による DITRA モデルマウスの病態への影響を解析する。

IL36rn^{-/-}マウスの背中を除毛後に 5%イミキモド含有クリームを 5 日間塗布したところ、野生型マウスと比較して紅斑と鱗屑が増強していた。さらに、病理組織学的にも、より表皮の肥厚がみられた。サイトカインプロファイルでは IL-17A 上昇がみられた。抗 IL-17A 抗体と CXCR2 阻害薬による検討では、両方の薬剤で皮疹の改善と病理組織の改善とサイトカインプロファイルの改善を観察した。このことから、DITRA では IL-17A 抗体や好中球の遊走を抑制する CXCR2 阻害薬が治療薬として有効であることが推定された (Shibata A, et al. J Autoimmun 2017;80:28-38.)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- ① Yamashita T, Hamada T, Maruta Y, Kajita A, Hirai Y, Morizane S, Watanabe S, Sugiura K, Iwatsuki K. An effective and promising treatment with adalimumab for impetigo herpetiformis with postpartum flare-up. *Int J Dermatol* 査読あり 2019;58:350-353.
- Komatsuda S, Kamata M, Chijiwa C, Namiki K, Fukaya S, Hayashi K, Fukuyasu A, Tanaka T, Ishikawa T, Ohnishi T, Abe K, Yamamoto T, Aozasa N, Sugiura K, Tada Y. Gastrointestinal bleeding with severe mucosal involvement in a patient with generalized pustular psoriasis without IL36RN mutation. *J Dermatol* 査読あり 2019;46:73-75.
- Kinoshita M, Okamoto T, Sano S, Mitsui H, Takeichi T, Sugiura K, Akiyama M, Shimada S, Kawamura T. Deficiency of the interleukin-36 receptor antagonist dramatically improved by secukinumab. *J Dermatol* 査読あり 2018;45:e280-e281.
- Akiyama M, Takeichi T, McGrath JA, Sugiura K. Autoinflammatory keratinization diseases: an emerging concept encompassing various inflammatory keratinization disorders of the skin. *J Dermatol Sci* 査読あり 2018;90:105-111.
- Akiyama M, Takeichi T, McGrath JA, Sugiura K. Autoinflammatory keratinization diseases. *J Allergy Clin Immunol* 査読あり 2017;140:1545-1547.
- Koike Y, Okubo M, Kiyohara T, Fukuchi R, Sato Y, Kuwatsuka S, Takeichi T, Akiyama M, Sugiura K, Utani A. Granulocyte and monocyte apheresis can safely control juvenile generalised pustular psoriasis with mutation of the IL36RN gene. *Br J Dermatol* 査読あり 2017;177:1732-1736.
- Takeichi T, Kobayashi A, Ogawa E, Okuno Y, Kataoka S, Kono M, Sugiura K, Okuyama R, Akiyama M. Autosomal dominant familial generalized pustular psoriasis caused by a CARD14 mutation. *Br J Dermatol* 査読あり 2017;177:e133-e135.
- Iwata Y, Kobayashi T, Kuroda M, Mizoguchi Y, Arima M, Numata S, Watanabe S, Yagami A, Matsunaga K, Sugiura K. Case report of multiple pustules of the bilateral lower limbs caused by a granulocyte colony-stimulating factor-producing solid pseudopapillary tumour of the pancreas. *Br J Dermatol* 査読あり 2017;177:1122-1126.
- Shibata A, Sugiura K, Furuta Y, Mukumoto Y, Kaminuma O, Akiyama M. Toll-like receptor 4 antagonist TAK-242 inhibits autoinflammatory symptoms in DITRA. *J Autoimmun* 査読あり 2017;80:28-38.
- Takeichi T, Togawa Y, Taniguchi R, Okuno Y, Kono M, Matsue H, Sugiura K, Akiyama M. A newly revealed IL36RN mutation in sibling cases complements our IL36RN mutation statistics for generalized pustular psoriasis. *J Dermatol Sci* 査読あり 2017;85:58-60.
- Koizumi H, Tokuriki A, Oyama N, Ido H, Sugiura K, Akiyama M, Hasegawa M. Certolizumab pegol, a pegylated anti-TNF- α antagonist, caused de novo-onset palmoplantar pustulosis followed by generalized pustular psoriasis in a patient with rheumatoid arthritis. *J Dermatol* 査読あり 2017;44:723-724.
- Saito-Sasaki N, Izu K, Sawada Y, Hino R, Nakano R, Shimajiri S, Nishimura I, Nakamura H, Sugiura K, Nakamura M. Impetigo Herpetiformis Complicated with Intrauterine Growth Restriction Treated Successfully with Granulocyte and Monocyte Apheresis. *Acta Derm Venereol* 査読あり 2017;97:410-411.
- Takeichi T, Sugiura K, Nomura T, Sakamoto T, Ogawa Y, Oiso N, Futei Y, Fujisaki A, Koizumi A, Aoyama Y, Nakajima K, Hatano Y, Hayashi K, Akemi Ishida-Yamamoto A, Fujiwara S, Sano S, Iwatsuki K, Kawada A, Suga Y, Shimizu H, McGrath JA, Akiyama M. Pityriasis rubra pilaris type V as an auto inflammatory disease by CARD14 mutations. *JAMA Dermatol* 査読あり 2017;153:66-70.
- Sugiura K, Nakasuka A, Kono H, Kono M, Akiyama M. Impetigo herpetiformis with IL36RN mutations in a Chinese patient: A founder haplotype of c.115+6T>C in East Asia. *J Dermatol Sci* 査読あり 2015;79:319-20.
- Miyake T, Umemura H, Doi Y, Kousogabe J, Tsuji K, Hamada T, Sugiura K, Aoyama Y, Akiyama M, Iwatsuki K. annular pustular psoriasis with heterozygous IL36RN mutation. *Eur J Dermatol* 査読あり 2015;25:349-50.
- Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama N, Ito N, Sakabe JI, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y. Pustular psoriasis like lesions associated with hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: Long-term follow-ups of two cases. *Br J Dermatol* 査読あり 2015;172:1674-6.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① Sugiura K. The Genetics of Pustular Psoriasis. International Investigative Dermatology 2018 2018年5月17日 オランダ、フロリダ、アメリカ
- Sugiura K. Genetic background of pustular psoriasis. 12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology 2016年10月15日 東京都文京区

Sugiura K. Genetic background of pustular psoriasis. Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference 2016 年 8 月 27 日 ニューサ、クイーンズランド、オーストラリア

Sugiura K. Genetic background of generalized pustular psoriasis. International congress of human genetics 2016 2016 年 4 月 6 日 京都市

〔図書〕(計 3 件)

① 杉浦一充：紅皮症：皮膚疾患最新の治療 2019-2020；古川福実・佐伯秀久 編集，南江堂，p53-54，2019

杉浦一充：疱疹状膿痂疹：皮膚症状 110 症例でみる内科疾患；出光俊郎 編集，日本医事新報社，p218-219，2018

杉浦一充：乾癬・角化症（1）膿疱性乾癬の免疫遺伝学：
WHAT'S NEW in 皮膚科学 2016-2017；宮地良樹，鶴田大輔 編集，メディカルレビュー社 66，2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~hifuka/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：藤猪英樹

ローマ字氏名：FUJII Hideki

所属研究機関名：徳島大学大学院医歯薬学研究部

部局名：口腔微生物学分野

職名：教授

研究者番号(8桁)：50356250