

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15546

研究課題名(和文) IL-36とToll様受容体4に着目した関節症性乾癬の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapies and elucidation of pathomechanisms for psoriatic arthritis with focusing on IL-36 and TLR-4

研究代表者

杉浦 一充 (SUGIURA, Kazumitsu)

藤田保健衛生大学・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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：関節症性乾癬(PsA)では約半数の症例に発症から2年以内に骨びらんや関節変形が出現する。PsAの約7割は皮膚症状が先行するため、皮膚科医は本症を早期診断、治療介入する責務がある。しかし、PsAの病態は未解明のままである。本研究ではToll様受容体4(TLR-4)に着目した。そのリガンドであるリポ多糖(LPS)をIL36RN欠損マウスの後足に皮下投与した。その結果、野生型に比べ、著明な腫脹・肥厚(付着部炎)を認めた。即ち、IL36RN欠損マウスの後足にTLR-4リガンドを注入することによってPsAの病態を誘導することに成功した。さらにTLR-4阻害薬治療効果があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bone erosion or joint deformity emerges in 2 years in 50% of patients with psoriatic arthritis (PsA). Dermatologist should make diagnosis and treat early PsA because 70% of patients with PsA shows skin lesions preceding arthritis. But pathomechanisms of PsA remains unknown. In this study, we focused on Toll-like receptor-4(TLR-4) for the pathomechanisms. Lipopolysaccharide (LPS), a TLR-4 ligand, was injected on a foot pad of IL36RN knock out (KO) mouse. Then, outstanding swelling and thickness of foot was observed in the IL36RN KO mouse compared in the wild mouse. In conclusion we made a PsA model using the IL36RN KO mouse with TLR-4 ligand injection on the food pad. Furthermore, we proved that TLR-4 inhibitor ameliorates the symptom of the PsA model.

研究分野：皮膚科学

キーワード：関節症性乾癬 IL-36 TLR-4 リポ多糖 IL36RNノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

2015年、本邦でも乾癬全体の14%に関節症性乾癬(PsA)患者がいることが報告された(Ohara Y et al, J Rheumatol 2015)。PsAの約半数の症例に発症から2年以内に骨びらんや関節変形が出現することもわかってきた。PsAの約7割は皮膚症状が先行するため、皮膚科医は本症を早期診断、治療介入する責務がある。しかし、PsAの病態は未解明のままである。生物学的製剤が有効な症例がある一方、難治例も多く、病態解明とさらなる新規治療法の開発が期待されていた。

ところで、膿疱性乾癬(GPP)の患者もしばしばPsAを併発する。一方、関節リウマチ(RA)とPsAの関節液中にIL-36が高濃度に存在する(Frey S et al, Ann Rheum Dis 2013)。また、2014年に研究代表者らはIL36RN変異(劣性)の成人GPP患者(IL-36受容体拮抗因子(IL-36RN)が機能しないため、IL-36-IL-36受容体を介する炎症を引き起こすシグナルが亢進しやすい)では半数以上がPsAを併発することを報告した(Sugiura K et al, J Invest Dermatol 2014)。しかし、RAモデルの研究の集積により「IL-36は関節炎に関与していない」という考えが定説となっていた(Dietrich D et al, Nat Rev Rheumatol 2014)。

2. 研究の目的

同一ケージで複数匹のマウス(雄)を飼育するとよくファイティングするが、研究代表者らはIL36RN欠損マウス(雄)では、ファイティングによって関節の腫脹が生じるとい

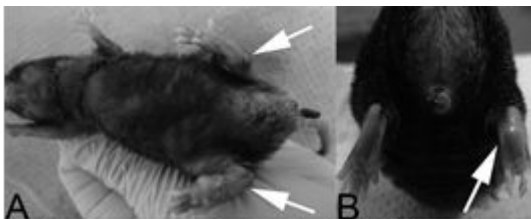


図1. IL36RNホモ欠損(A)とヘテロ欠損(B)のファイティングによる関節の腫脹(矢印)。

う驚くべき現象を観察した(図1)(野生型マウスではこの現象は生じない)。「IL-36は関節炎に関与していない」という上記定説に一見逆説的にも思われるこの現象について、外傷に伴う感染から自然免疫が賦活化し関節の腫脹が起こった可能性があるかと考察し研究を進めた。具体的には、Toll様受容体4(TLR-4)に着目し、そのリガンドであるリポ多糖(LPS)をIL36RN欠損マウスの後足に皮下投与した。その結果、野生型に比べ、著明な腫脹・肥厚(付着部炎)を認めた。即ち、IL36RN欠損マウスの後足にTLR-4リガンドを注入することによってPsAの病態を誘導することができているかどうか観察することが本研究の目的の起点である。具体的にはPsAモデルの詳細な病態解明をすることと、TLR4-阻害

薬による治療効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1. PsAモデルの詳細な病態解明をする。後足の腫脹・肥厚の有無又は程度、腫脹・肥厚が認められるまでの時間、IL-36、IL-36を含む炎症性サイトカインの量、病変部と所属リンパ節の炎症細胞プロファイル(好中球数、マクロファージ数、樹状細胞数、T細胞数、T細胞数、IL-17A陽性T細胞数)、脾臓の重さを比較した。また、PsAモデルでは特異的に肝臓に多数の白色組織の付着を観察しているため、血管炎による壊死組織が疑われるこの組織についても検討した(図2)。肉眼的観察、病理組織、

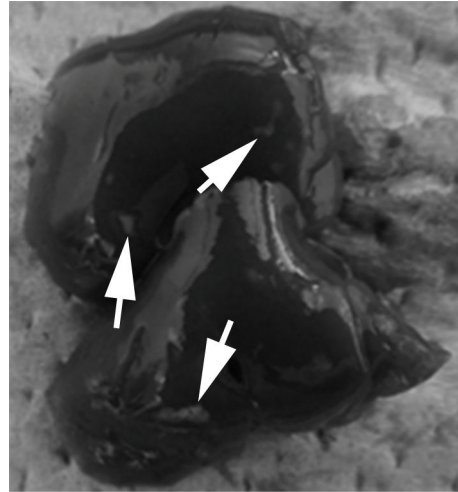


図2:PsAモデルの肝臓で観察できる白色組織(矢印)

足の厚みの計測、フローサイトメトリー、免疫組織化学、ELISA、リアルタイムPCR、重量測定などによって、病態を解明する。上述した方法と同様に後足の所見、炎症細胞プロファイルなどを解析し各種治療薬のそれぞれのPsAモデルの病態への影響を解析し、治療

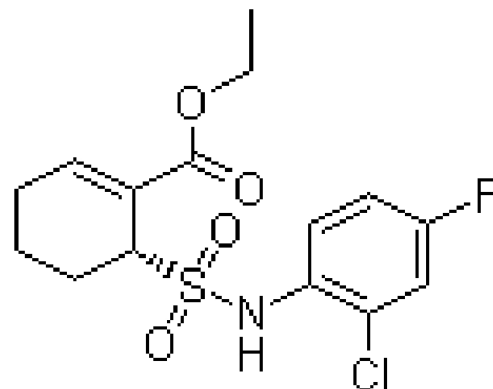


図3:TAK-242の構造式

効果の優劣を検討した。

2. Toll 様受容体 4 (TLR-4) 阻害薬による治療効果を検討した。

LPS が TLR-4 を介して付着部炎を発症していることの確認のために、TLR-4 の特異的阻害薬である市販の TAK-242 (図 3) で付着部炎が発症しないことを確認する。実際に、脂肪細胞から放出される遊離脂肪酸 (FFA) や PsA の患者の血中で高濃度に存在する低分子ヒアルロン酸などは TLR4 のリガンドであり、このような物質が PsA の患者で TLR4 のリガンドとして炎症を引き起こしている可能性が考えられる。さらに、TAK-242 は既に治験で安全性が確認された薬剤であるので PsA の治療薬として使用できる可能性は十分にある。

4. 研究成果

野生型に比べ、著明な腫脹・肥厚(付着部炎)を認めた。即ち、*IL36RN* 欠損マウスの後足に TLR4 リガンドを注入することによって PsA の病態を誘導することに成功した(図 4)。



図4: PsAモデルの表現型

左; 野生型にLPS 右; *Il36rn*KOにLPS

病理組織学的にも付着部炎が観察された

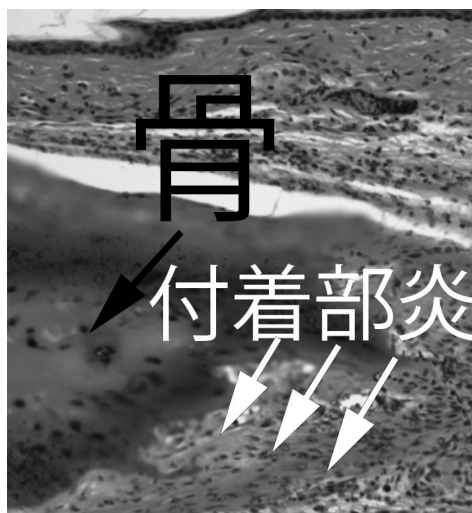


図5: PsAモデルの付着部炎の病理組織

(図 5)。

後足の腫脹・肥厚は *IL36RN* 欠損マウスに TLR4 リガンドを注入することにより、野生型と比較して有意に腫脹・肥厚していた。炎症性サイトカインの量では、*IL36RN* 欠損マウスに TLR4 リガンドを注入することにより、野生型と比較して CXCL1 と CXCL13 が有意に上昇していた。脾臓の解析では、*IL36RN* 欠損マウスに TLR4 リガンドを注入することにより、野生型と比較して B 細胞が有意に上昇していた。肝臓に多数の白色組織がみられたが、病理組織学的に好中球性の胆管炎が観察された。さらに、TAK-242 による阻害実験は、表現型、病理組織学的観察、上記メディエーターの観察全てにおいて、治療効果があることが明らかになった。

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 11 件)

1. Takeichi T, Katayama C, Tanaka T, Okuno Y, Murakami N, Kono M, Sugiura K, Aoyama Y, Akiyama M. A novel *IFIH1* mutation in the pincer domain underlies the clinical features of both Aicardi-Goutières and Singleton-Merten syndromes in a single patient. *Br J Dermatol* 2018;178:e111-e113.
2. Akiyama M, Takeichi T, McGrath JA, Sugiura K. Autoinflammatory keratinization diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:1545-1547.
3. 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* 2017;177:1732-1736.
4. Takeichi T, Torrelo A, Lee JYW, Ohno Y, Lozano ML, Kihara A, Liu L, Yasuda Y, Ishikawa J, Murase T, Rodrigo AB, Fernández-Crehuet P, Toi Y, Mellerio J,

- Rivera J, Vicente V, Kelsell DP, Nishimura Y, Okuno Y, Kojima D, Ogawa Y, Sugiura K, Simpson MA, McLean WHI, Akiyama M, McGrath JA. Biallelic mutations in *KDSR* disrupt ceramide synthesis and result in a spectrum of keratinization disorders associated with thrombocytopenia. *J Invest Dermatol* 2017;137:2344-2353.
5. 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* 2017;177:1122-1126.
 6. 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* 2017;177:e133-e135.
 7. Takeichi T, Nomura T, Takama H, Kono M, Sugiura K, Watanabe D, Shimizu H, Simpson MA, McGrath JA, Akiyama M. Deficient stratum corneum intercellular lipid in a Japanese patient with lamellar ichthyosis by a homozygous deletion mutation in *SDR9C7*. *Br J Dermatol* 2017;177:e62-e64.
 8. Takeichi T, Tanahashi K, Taki T, Kono M, Sugiura K, Akiyama M. Mutational analysis of 29 patients with autosomal recessive woolly hair and hypotrichosis: *LIPH* mutations are extremely predominant in autosomal recessive woolly hair and hypotrichosis in Japan. *Br J Dermatol* 2017;177:290-292.
 9. 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* 2017;80:28-38.
 10. 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* 2017;153:66-70.
 11. Kono M, Matsumoto F, Suzuki Y, Suganuma M, Saitsu H, Ito Y, Fujiwara S, Matsumoto K, Moriwaki S, Matsumoto N, Tomita Y, Sugiura K, Akiyama M. Dyschromatosis symmetrica hereditaria and Aicardi-Goutières syndrome 6 are phenotypic variants caused by *ADAR1* mutations. *J Invest Dermatol* 2016;136:875-8.
- [学会発表](計3件)
1. Kazumitsu Sugiura, Genetic background of pustular psoriasis, 12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2016.10.15, 東京都文京区(東京医科歯科大学)
 2. Kazumitsu Sugiura, Genetic background of pustular psoriasis, Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference, 2016.8.27, Noosa in Australia (Sofitel Pacific Resort Noosa Hotel)
 3. Kazumitsu Sugiura, Genetic background of generalized pustular psoriasis, International congress of human genetics, 2016.4.6, 京都市(京都国際会館)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 一充 (藤田保健衛生大学・医学部・
教授)

研究者番号：70335032