

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08281

研究課題名(和文) IL-36受容体拮抗因子欠損症の革新的治療法開発に向けた病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathomechanisms of deficiency of interleukin-36 receptor antagonist to develop innovative therapies for the disease

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはIL-36受容体拮抗因子(IL-36Ra)欠損症を病因とした膿疱性乾癬(GPP)などの皮膚疾患について研究を行っている。本研究では(1)好中球細胞外トラップ(NETs)阻害薬のIL-36Ra欠損によるGPPモデルに対する治療効果(2)IL-36Ra欠損による接触皮膚炎悪化の病態(3)IL-36Ra欠損による皮膚潰瘍治癒遅延化の病態を目的とした。研究成果として、NETsはDITRAにおいて新たな治療標的となることを提示した。さらに、TAK-242によるTLR4シグナルの阻害が接触皮膚炎と創傷治癒の新たな治療薬となる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-36Ra欠損症のGPP様の皮疹ではNETsが亢進していることを証明し、GPPの新たな知見を提供した。さらに、NETsはDITRAにおいて新たな治療標的となることを提示した。さらに、IL-36Ra欠損が、好中球炎症を引き起こし、接触性皮膚炎と創傷治癒を増悪させることを示した。TAK-242によるTLR4シグナルの阻害が接触皮膚炎と創傷治癒の新たな治療薬となる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The principal investigators found that the majority of the etiology of the designated intractable pustular psoriasis (generalized) (GPP) was IL-36 receptor antagonist (IL-36Ra) deficiency (DITRA). We investigate the pathophysiology of various skin disorders in DITRA. The purpose of this studies are follows; (1) to analyzed therapeutic effect of DITRA of neutrophil extracellular traps (NETs) inhibitors on GPP model (2) to elucidate pathophysiology of exacerbation of contact dermatitis due to IL-36Ra deficiency (3) to elucidate pathophysiology of prolong the healing of skin ulcers due to IL-36Ra deficiency. As a result of the research, NETs have been shown to be new therapeutic targets in DITRA. It was revealed that IL-36Ra deficiency can be an exacerbating factor for contact dermatitis and wound healing. Furthermore, it was suggested that inhibition of TLR4 signal by TAK-242 may be a new therapeutic agent for contact dermatitis and wound healing.

研究分野：皮膚科学

キーワード：IL-36受容体拮抗因子欠損症 IL36RN 膿疱性乾癬 好中球細胞外トラップ ノックアウトマウス 接触皮膚炎 創傷治癒 TLR4

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは、指定難病の膿疱性乾癬(汎発型)(generalized pustular psoriasis: GPP)の20-80%の症例の病因がIL-36受容体拮抗因子(IL-36Ra)欠損症(deficiency of interleukin-36 receptor antagonist: DITRA)であることを解明した( )。さらにIL-36Ra欠損マウスにリポ多糖を皮下注射してGPPモデルマウスを開発し特許登録した(第6654773号)。さらにイミキモドでもGPPと類似の病態を作成することに成功していた( )。その後in vitroで、IL-36、IL-36、IL-36、IL-36Raが好中球由来のプロテアーゼにより活性化される機構が解明された。しかし、in vivoでは、IL-36Ra欠損に関連する疾患の病態解明の研究は緒に就いたばかりであった。GPP既存の治療では難渋する症例があるので、革新的治療法の開発が待ち望まれていた。

(2) IL36RN遺伝子機能欠失変異は日本人の約2%、中国人の約4%にこの機能欠失変異の保因者が存在している。そのため、この機能欠失変異が皮膚疾患に及ぼす影響について解明することは臨床的に意義がある。IL-36受容体欠損に関連するGPPをはじめとした疾患ではどのような病態が形成されているのかが不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) 好中球細胞外トラップ(NETs)阻害薬のIL-36Ra欠損によるGPPモデルに対する治療効果を検討する。

(2) IL-36Ra欠損による接触皮膚炎悪化の病態を解明する。

(3) IL-36Ra欠損による皮膚潰瘍治癒遷延化の病態を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) IL36RN遺伝子をノックアウトしたIL36rn<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの背面の毛を除去し、3日間IMQを塗布し、4日目に、PASI(psoriasis and area severity index)スコア、病理学的検討や免疫組織学的手法を用いてGPP様の皮疹を評価した。IL36rn<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの組織中のサイトカイン、ケモカインを評価するためにリアルタイムRT-PCRを行った。PAD4を阻害する効果を持つ、Cl-amidineをIL36rn<sup>-/-</sup>マウスに投与し、GPP様の皮疹に与える影響について検討した。

(2) IL36rn<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの耳介に0.5%2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)を塗布して感作させ、その5日後に0.2%DNFBを再度耳介に塗布して接触皮膚炎反応を惹起させた。惹起後24時間と48時間で耳介の厚さを測定し、病理学的検討も含めて接触皮膚炎反応の程度を評価した。更に浸潤している細胞数について検討も行った。IL36rn<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの組織中のサイトカイン、ケモカインを評価するためにRT-PCRを行った。TLR4阻害薬であるTAK-242をそれぞれのマウスに投与し、接触皮膚炎反応に与える影響について検討した。

(3) IL36rn<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの背中に6mmトレパンで潰瘍を作り、創傷の3日後および7日後に潰瘍面積を測定し、病理学的検討も含めて創傷治癒の程度を評価した。更に浸潤している細胞数について検討も行った。IL36rn<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの組織中のサイトカイン、ケモカインを評価するためにRT-PCRを行った。病変部のヒアルロン酸の存在を確認し、培養ケラチノサイト細胞株HaCaTを用いてヒアルロン酸がTLR4のリガンドに働きIL-36の分泌をさせることを検討した。TAK-242をそれぞれのマウスに投与し、創傷治癒過程において与える影響について検討した。

### 4. 研究成果

(1) IL36rn<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスと比較して、イミキモド(IMQ)を3日間の連続塗布で、GPP様の皮疹が有意に増強した(図1)。また、病理学的に、IL36rn<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスと比較し、表皮肥厚の程度、浸潤する好中球数、好中球細胞外トラップ(Neutrophil extracellular traps:NETs)形成の有意な増加を認めた。

(2) 組織中のサイトカイン、ケモカインを評価したところ、IL36rn<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスと比較して、TNF- $\alpha$ 、CXCL1、CXCL2、IL-1 $\beta$ 、IL-17A、およびIL-36の有意な増加を認めた。

(3) Cl-amidineの投与により、IL36rn<sup>-/-</sup>マウスにおける乾癬様皮疹は抑制され、病理学的にも、

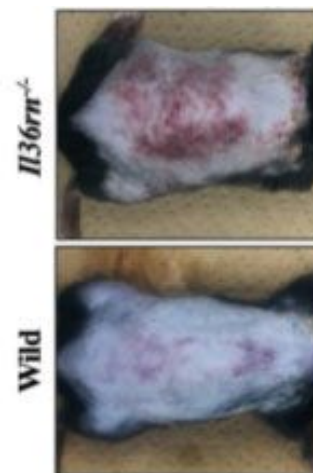


図1

表皮肥厚、浸潤する好中球数、NETs 形成は抑制された。以上の結果から、 $IL36rn^{-/-}$  マウスにおける GPP 様の皮疹では、NETs が重要な役割を担っていることが示唆された。つまり DITRA では、IL-36R を介した持続的な炎症性シグナル伝達の活性化により、浸潤する好中球数は増加し NETs 形成は促進されることにより GPP が発症すると考えられる。以上より、NETs は DITRA において新たな治療標的となることを提示した。

(4)  $IL36rn^{-/-}$  マウスは野生型マウスと比較して 24 時間と 48 時間の両時点において接触皮膚炎反応が有意に増強していることが示された(図 2)。また、病理学的な検討を行った結果、 $IL36rn^{-/-}$  マウスは野生型マウスと比較して浸潤する好中球、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の数の有意な増加を認めた。

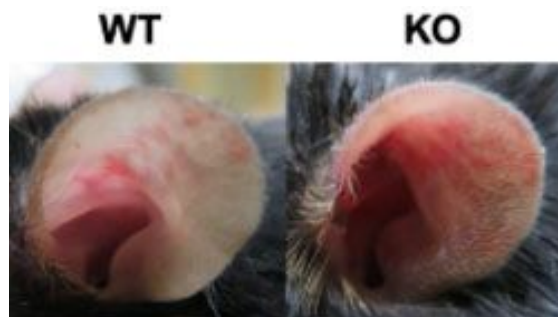


図2

(5) 組織中のサイトカイン、ケモカインの評価では  $IL36rn^{-/-}$  マウスは野生型マウスと比較して IL-1、IL-17A、TNF- $\alpha$ 、CXCL1、CCL4、IL-36、IL-36、IL-23p19、EBI3 の有意な増加を認めた。

(6) 病変部において  $IL36rn^{-/-}$  マウスが野生型マウスより有意な好中球浸潤を認めたことから、このモデルにおける接触皮膚炎反応には抗原非特異的な自然免疫系が中心的な役割を果たしていると考えた。そこで我々は、自然免疫系の上流である TLR4 を阻害することで好中球を中心とした接触皮膚炎反応を抑制することに成功した。さらに、TLR4 を阻害することで  $IL36rn^{-/-}$  マウスにおける接触皮膚炎反応の抑制だけではなく、野生型マウスにおいても接触皮膚炎反応が抑制されることを明らかにした。以上より、IL-36Ra の機能欠損が接触皮膚炎の増悪因子となりえることを明らかにした。さらに、TAK-242 による TLR4 シグナルの阻害が接触皮膚炎の新たな治療薬となる可能性を示唆した。

(7)  $IL36rn^{-/-}$  マウスは野生型マウスと比較して 3 日目と 7 日目の両時点において創傷治癒遅延が有意に増強していることが示された(図 3)。また、病理学的な検討を行った結果、 $IL36rn^{-/-}$  マウスは野生型マウスと比較して浸潤する好中球とマクロファージの数の有意な増加を認めた。

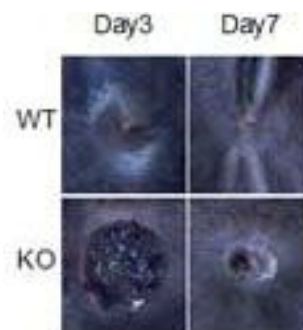


図3

(8) 組織中のサイトカイン、ケモカインの評価では  $IL36rn^{-/-}$  マウスは野生型マウスと比較して IL-36、TGF- $\beta$ 、CXCL1 の有意な増加を認めた。ヒアルロン酸が病変部にあること確認した。TAK-242 は、角化細胞におけるヒアルロン酸による誘発性の IL-36 の発現を減少させ

(9) 病変部において  $IL36rn^{-/-}$  マウスが野生型マウスより有意な好中球とマクロファージの浸潤を認め、創傷治癒の遅延を認めたことから、このモデルにおける創傷治癒の過程には抗原非特異的な自然免疫系が重要な役割を果たしていると考えた。TAK242 により好中球浸潤を抑制し、創傷治癒を正常化させた。以上より、IL-36Ra の機能欠損は、IL-36 が創傷皮膚の炎症細胞を過剰に誘導し、創傷治癒の遅延をもたらす、TLR4 シグナルの阻害が、この創傷遅延を正常化することを提示した。

#### <引用文献>

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* 2013;133:2514-21.

Shibata A, et al. Toll-like receptor 4 antagonist TAK-242 inhibits autoinflammatory symptoms in DITRA. *J Autoimmun* 2017;80:28-38.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計34件（うち査読付論文 34件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe S, Iwata Y, Fukushima H, Saito K, Tanaka Y, Hasegawa Y, Akiyama M, Sugiura K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Neutrophil extracellular traps are induced in a psoriasis model of interleukin-36 receptor antagonist-deficient mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 20149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76864-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito K, Iwata Y, Fukushima H, Watanabe S, Akiyama M, Sugiura K.	4. 巻 10
2. 論文標題 IL-36 receptor antagonist deficiency resulted in delayed wound healing due to excessive recruitment of immune cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 14772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71256-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima H, Iwata Y, Watanabe S, Saito K, Tanaka Y, Hasegawa Y, Akiyama M, Sugiura K.	4. 巻 10
2. 論文標題 TAK-242 ameliorates contact dermatitis exacerbated by IL-36 receptor antagonist deficiency.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57550-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 21件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazumitsu Sugiura
2. 発表標題 Pathophysiology of generalized pustular psoriasis and possibility of personalized medicine for the future
3. 学会等名 JSPR-IPC Joint Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazumitsu Sugiura
2. 発表標題 Autoinflammatory keratinization diseases.
3. 学会等名 International Psoriasis Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazumitsu Sugiura
2. 発表標題 The Genetics of Pustular Psoriasis
3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 山本俊幸	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 -
3. 書名 乾癬・掌蹠膿疱症	

1. 著者名 戸倉新樹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 -
3. 書名 新しい薬疹 薬剤による皮膚有害事象の新タイプ	

1. 著者名 出光俊郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 -
3. 書名 皮膚症状110症例でみる内科疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

藤田医科大学医学部皮膚科学ホームページ <a href="http://info.fujita-hu.ac.jp/~hifuka/">http://info.fujita-hu.ac.jp/~hifuka/</a>  プレスリリース <a href="https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv0000004h2d.html">https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv0000004h2d.html</a> <a href="https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv0000007619.html">https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv0000007619.html</a> <a href="https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv0000007zmf.html">https://www.fujita-hu.ac.jp/news/j93sdv0000007zmf.html</a>
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------