

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461695

研究課題名(和文)膿疱性乾癬の発症機構の分子遺伝学的研究

研究課題名(英文)Molecular genetics of pustular psoriasis

研究代表者

武藤 正彦(MUTO, Masahiko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40175625

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)：膿疱性乾癬はわが国の指定難病となっており、その病因・病態の解明は新規治療法開発にとっても極めて重要である。我々は、全国レベルで本症患者を収集し、そのDNA遺伝子を用いて、発症に寄与する原因遺伝子を単離・同定することを企画し、研究を遂行した。

その結果、本症の発症は、遺伝学的には二つの遺伝子(IL36RNおよびCARD14)が別々に関与することを突きとめた。これらの研究成果は世界的にも高く評価され、本症の新規治療法の開発に貢献出来た。

研究成果の概要(英文)：Generalized pustular psoriasis(GPP) is characterized by widespread sterile pustules and erythematous skin, in addition to acute onset high-grade fever. GPP is a rare intractable disease affecting less than 2,000 individuals in Japan. GPP is classified as a variant of psoriasis vulgaris which is the most common form of psoriasis? In 2011, a homozygous loss-of-function mutation in IL36RN was first identified in GPP patients. So we investigated multiple genes including IL36RN, using exome sequencing and SNPs on 31 unrelated individuals and 2 multiplex families with GPP. The results showed that genetic mutations on CARD 14 as well as IL36RN were found. Moreover, CARD14 variant was more frequently observed in the GPP patients suffering from preceding psoriasis vulgaris, whereas IL36RN variants were often found in the GPP patients without psoriasis vulgaris. Thus, we concluded that these mutations of IL36RN and CARD14 might play a causal role in the development of GPP.

研究分野：皮膚科学

キーワード：膿疱性乾癬 原因遺伝子の同定 環境要因の推定 発症メカニズムの解明

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性疾患であり、しかもわが国の指定難病になっている膿疱性乾癬は、乾癬の大半を占める尋常性乾癬のバリエーションと理解すればよいのか、その病因・病態の解明が遅れていたために、本症の根治的治療法の開発も遅れている。わが国における本症の罹患患者数は、厚生労働省の臨床調査個人票データベースによれば、約 1,800 人と推計されている。

(2) 2011 年に入って、膿疱性乾癬の原因遺伝子の一つは、好中球の遊走能を支配するサイトカイン IL8 の分泌抑制に關与する IL36RN 遺伝子の遺伝子変異に由来することが海外で初めて報告され、炎症の制御の根幹に係る発見の報告であり、本症の新規治療法開発に向けた病因・病態の解析が、国際レベルで急速に進展し始めることとなった。

(3) 乾癬の発症に關する遺伝要因と相互作用する環境要因に關するこれまでの研究から、上気道感染や妊娠などが推測されていたが、我々は、それ以外に、真菌(マラセチア)が発症に關与し得ることを 2007 年に英国の皮膚科専門誌に報告した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、膿疱性乾癬の原因遺伝子とされる IL36RN 遺伝子の日本人集団における変異データベースを作成し、本症の遺伝子診断の開発につなげる。加えて、本症発症の原因遺伝子は IL36RN 遺伝子単独なのか、それ以外にも存在するのかを網羅的にゲノム探索する。

(2) 本症の発症に寄与する環境要因(病原微生物)にはどのようなものが候補になりうるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膿疱性乾癬の孤発例および多発家系を多施設共同研究の形態を採り全国レベルで収集し、静脈血から分離抽出した DNA を用いて IL36RN 遺伝子、ヒト主要組織適合抗原遺伝子(HLA)その他、我々が利用できる遺伝子群に關する変異および多形解析を PCR 法により検討した。DNA は、マイナス 80 で冷凍保存した。

(2) 本症の発症に關する環境要因(今回の研究では真菌に限定)を特定するために、乾癬患者から書面による同意を得た上で、患者の病変部皮膚の鱗屑を採取して、真菌 DNA を抽出した後、次世代シーケンサーを利用して解析した(本学倫理審査委員会承認済)。

4. 研究成果

(1) 収集出来た検体数は、孤発例が 31 例

であり、多発家系が 2 家系であった。

なお、今回の収集で 3 年間の研究を終えた余剰の生体試料の一部を、被験者の同意を得た上で、研究代表者が統括している厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業「稀少難治性皮膚疾患に關する調査研究班」生体試料バンク共同事業(<https://www.bsbank.jp>)に寄託した。これにより、わが国における本症の解明に向けた研究の一層の推進に少なからず貢献することが出来た。

(2) 臨床的に、最初から膿疱性乾癬の形態をとるタイプ(I型)と尋常性乾癬が先行し、次いで膿疱性乾癬を発症してくるタイプ(II型)の二つのタイプがあることから、おそらく両者の発症メカニズムは異なっているに違いないとの仮説のもとに、遺伝子解析を行った。その結果、I型では IL36RN 遺伝子変異が、II型に比べて優位に多く、反対に II型ではやはり好中球の遊走能に影響を与える IL8 の分泌抑制に關与するとされる CARD14 遺伝子変異が優位に多く観られた。これらの事実から、臨床的には、同じ膿疱性乾癬の態様をとってはいるが、その発症の遺伝学的なメカニズムは異なっていることが明らかとなった。

特記すべきことは、IL36RN 遺伝子の変異解析の結果を、日本人集団と白人その他の集団と比較検討してみると、変異部位は IL36RN 遺伝子内に 10 か所たらずしかなく、集団により変異部位が異なることが判明した。遺伝様式を調べてみると、劣性遺伝様式をとることが判った。例えば、父親からは IL36RN 遺伝子の変異を生じた A アリル(p.Arg10X と表記)をもらい、母親からは同じ IL36RN 遺伝子の変異 B アリル(p.Arg10ArgfsX1 と表記)をもらってきたと仮定する。そうすると、膿疱性乾癬に罹患した子供は、IL36RN 遺伝子に關して、両親から傷のついた A アリルと B アリルを同時にもらったことになる。すなわち、IL36RN 遺伝子全体としてみると、2 個の傷ついた遺伝子をもったことになり、その意味で劣性遺伝様式に従っていると表現できるのである。同様に、両親からいずれも変異 A アリルをもらう場合、あるいは、変異 B アリルをもらってくる場合も当然ありうる。IL36RN 遺伝子は、変異の数が少ないので、本症に罹患するかしらないか、を事前に遺伝子診断することも不可能ではない。加えて、多発家系分析から、IL36RN 遺伝子の変異は HLA ハプロタイプ(HLA-A、-B、-C、および-DR の組み合わせをいう)と連動して親子間あるいは罹患同胞間と患者間でセットとして伝達されることも判った。

我々の一連の研究成果は、*Journal of Investigative Dermatology*, 133 : 2503, 2013 で高く評価された。CARD14 遺伝子の異常は、関節リウマチに似た臨床像を呈する関節症性乾癬でも観られることを確認することが

出来た (Rheumatology, 54:197-199, 2015)。日本皮膚科学会から出版される膿疱性乾癬(汎発型)診療ガイドライン 2014 年度版に上記研究成果は記載されることとなった(日本皮膚科学会雑誌、査読有、125 巻、2015、2211 - 2257)。

CARD14 遺伝子の構造解析から、膿疱性乾癬の原因遺伝子 (p.Asp176His) であることが判ったわけであるが、実はこの遺伝子には尋常性乾癬そのものを発症させる変異部位 (p.Arg820Trp)、さらには乾癬の類縁疾患である毛孔性紅色靴糠疹の原因遺伝子 (p.Leu156pro) も乗っていることが判った。このことは、皮膚の角化異常を伴う炎症性皮膚疾患の基盤を解明していく手掛かりが、転写因子である NF- B の制御をしている CARD14 遺伝子の構造内に潜んでいる可能性を示すものであり、今後の研究の展開に繋がる成果といえよう。

次の研究プロジェクトに向けて、現在酵母を利用して、IL36RN 遺伝子、IL36 のリガンド遺伝子および IL36 受容体遺伝子を共発現させる実験系の共同開発を進めている。予備的実験結果から、IL36RN 遺伝子の変異の違いがリガンドと受容体との結合能の違いに反映されている可能性が高いことが判ってきた。IL36RN 遺伝子変異の効果の違いを確認することが出来れば、近い将来、乾癬の診断・治療のための DNA 遺伝子チップ開発は現実のものとなるであろう。

(3) 他方、次世代シーケンサーを用いた真菌の菌叢解析の結果より、乾癬の病変部では健常者に比べて、脂質好性の特定の马拉セチア菌種 (*Malassezia restricta*) が増加していることが判明した (60% vs 42%)。反対に、別の马拉セチア菌種 (*Malassezia globosa*) は、健常者に比べて乾癬患者ではむしろ減少していた (15% vs 25%)。このことは、病変部に局在する特定の马拉セチア菌種が皮膚局所でのサイトカイン分泌を介した免疫制御に関わっていることを示唆するものである。なお、乾癬皮疹の重症度を示すスコアと菌量との間の相関関係は観られなかった。

その他、膿疱性乾癬の発症が、爪白癬の治療のために投与されていた抗真菌内服薬で誘発された症例を経験する機会があった。この患者本人由来の IL36RN 遺伝子には、上述の変異部位は認められなかった。ということは、尋常性乾癬が先行しない膿疱性乾癬の発症には、IL36RN 遺伝子異常以外の原因で発症してしまう症例が存在することを証明したことになる。因みに、IL36RN 遺伝子の異常で説明ができる本症の割合は、およそ、30パーセント前後である。

結論として、今回の3年間におよぶ研究を遂行することにより、膿疱性乾癬の発症に寄与する原因遺伝子の一部を解明することができ、临床上重要な膿疱性乾癬の診療ガイド

ラインの更新に繋げることができた。

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6件)

武藤正彦、HLA からみた乾癬発症理論の現代的課題 乾癬研究 30 年の軌跡、西日本皮膚科、査読有、78 巻、2016、101-110

DOI: なし

Takemoto, A., Cho, O., Morohoshi, Y., Sugita, T. and Muto, M.: Molecular characterization of the skin fungal microbiome in patients with psoriasis. J. Dermatol., 査読有、42:2015, 166-170. DOI:10.1111/1346-8138.12739

Sugiura, K., Kitoh, T., Watanabe, D., Muto, M. and Akiyama, M.: Childhood-onset PsA in Down syndrome with psoriasis susceptibility variant CARD 14 rs11652075.

Rheumatology, 査読有、54:2015, 197-199.

DOI:10.1093/rheumatology/keu397

Sugiura, K., Muto, M. and Akiyama, M.: Card 14 c.526G>C (p.Asp176His) is a significant risk factor for generalized pustular psoriasis with psoriasis vulgaris in the Japanese cohort.

J. Invest. Dermatol., 査読有、134:2014, 1755-1757.

DOI:10.1038/jid.2014.46

Sugiura, K., Takemoto, A., Yamaguchi, M., Takahashi, H., Shoda, Y., Mitsuma, T., Tsuda, K., Nishida, E., Togawa, Y., Nakajima, K., Sakakibara, A., Kawachi, S., Shimizu, M., Ito, Y., Takeichi, T., Kono, M., Ogawa, Y., Muro, Y., Ishida-Yamamoto, A., Sano, S., Matsue, H., Morita, A., Mizutani, H., Iizuka, H., Muto, M. and Akiyama, M.: The majority of generalized pustular psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist.

J. Invest. Dermatol., 査読有、133:2013, 2514-2521.

DOI:10.1038/jid.2013.230

[学会発表](計4件)

Matsumoto, K., Nakamura, A., Wakamatsu, K., Nakamura, Y., Yamaguchi, M., Okuda, M., Ichimiya, M., Nakamura, H. and Muto, M.: A case of codominant psoriasis vulgaris and sarcoidosis. 23rd World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, 2015年6月8-13日

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40175625

武藤正彦：乾癬とHLA進化学、日本皮膚科学会第377回新潟記念地方会、新潟市、2015年4月25日 ホテルオークラ新潟

Muto, M. et al.: Searching for disease susceptibility gene to generalized pustular psoriasis. 3rd Eastern Asia Dermatology Congress, Jeju, Korea, 2014年9月24-26日

Muto, M. et al.: Genetic factors related to Japanese patients affected with generalized pustular psoriasis. 2013 International Investigative dermatology Meeting, Edinburgh, U.K., 2013年5月8-11日

〔図書〕(計2件)

武藤正彦、南江堂、掌蹠角化症、『皮膚疾患 最新の治療 2015-2016』、2015、145

武藤正彦、南江堂、魚鱗癬、『皮膚疾患 最新の治療 2013 - 2014』、2013、143

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所との共同事業の形態を採り、膿疱性乾癬を含む9種類の皮膚難病のDNA試料を寄託・管理・分譲する業務を運営している。

以下のアドレスにアクセスすれば、生体試料バンクの概要ならびに当該疾患に関する臨床情報を閲覧することが出来る。

<https://www.bsbank.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 正彦 (MUTO, Masahiko)