

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860943

研究課題名(和文)好中球性皮膚症に対する顆粒球吸着療法の奏功機序の解明

研究課題名(英文)The study on the mechanisms for efficacy of granulocyte adsorption apheresis in neutrophilic dermatosis

研究代表者

藤澤 智美(FUJISAWA, TOMOMI)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20585583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：壊疽性膿皮症、膿疱性乾癬(GPP)など好中球性皮膚症に有用である顆粒球吸着療法(GMA)の作用メカニズムを検討した。GMA治療の前後におけるリンパ球、樹状細胞をフローサイトメトリーを用いて解析し、これらの細胞がサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。活動期GPPではCD14+CD16+ proinflammatory monocyte/CD14+ monocyte比が非活動期や健常人に比べて有意に増加し、血中CXCL8, CCL3, CCL4濃度も有意に上昇していることを示した。またGMAはproinflammatory monocyte比を減少させ、サイトカイン産生を制御する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms for efficacy of granulocyte adsorption apheresis(GMA) in neutrophilic dermatosis including pyoderma gangrenosum and generalized pustular psoriasis(GPP) were studied. We investigated the effects of GMA on the ratio of CD14+CD16+ proinflammatory monocytes/CD14+ monocytes and cytokine/chemokine production by these leukocytes before and after GMA sessions. Consequently, CD14+CD16+ monocytes were significantly increased, and the serum levels of CXCL8, CCL3 and CCL4 were elevated in patients with active GPP compared to healthy control and patient with quiescent GPP. GMA markedly reduced the CD14+CD16+/CD14+ ratio together with improvement of patients' clinical symptoms. Based on these results, we believe that in addition to neutrophils, elevated CD14+CD16+ proinflammatory monocytes are part of the immune pathology in GPP. Accordingly, selective depletion of CD14+CD16+ monocytes by GMA should be a therapeutic target in this condition.

研究分野：好中球性皮膚症

キーワード：顆粒球単球吸着療法 膿疱性乾癬 抗中球性皮膚症 樹状細胞 制御性T細胞 ケモカイン サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 膿疱性乾癬(GPP)は稀少難治性皮膚疾患の一つで、急激な発熱・全身倦怠感・関節痛とともに全身皮膚が紅潮し無菌性小膿疱が多発、融合する、好中球性皮膚症である。その免疫病態には主に Th1 や Th17 が関与しており、骨髄由来の白血球から炎症性サイトカイン、ケモカインが産生され、好中球・単球の遊走、表皮細胞の増殖、持続的な炎症などを誘導する。さらに好中球、単球/マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、T細胞を含む免疫細胞が Th 細胞の分化を誘導すると考えられているが、GPP の免疫病理の全体像は判明していない。単球には CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> classical phenotype と約 8% を占める CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> proinflammatory phenotype があり、後者は刺激によって TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカインを大量に放出することが知られている。

(2) 顆粒球吸着療法 (GMA) は GPP など好中球性皮膚症に効果を示す治療法であるが、除去される単球の性状などについては不明である。そのメカニズムはセルロースアセテートビーズ充填カラム内で活性化顆粒球および単球を選択的に除去することによる。しかし、実際の除去は顆粒球が約 30%、単球は約 15%にとどまり、これらのみで GMA の有効性を説明することは困難である。他のメカニズムとして、カラム内のビーズとの接触による接着分子発現の変化、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8) の低下および産生能の低下の関与が考えられているが、GPP における作用機序は不明である。

2. 研究の目的

今回、活動期の GPP において CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte/CD14<sup>+</sup> monocyte 比(proinflammatory monocyte 比)が増加しているか、GMA を施行後の proinflammatory monocyte 比の変化、GMA の臨床効果、GMA による血清サイトカインの変化、GPP 患者末梢血中の monocyte のサイトカイン産生能の評価、GMA が monocyte のサイトカイン産生能に与える影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 本学医学系研究科医学研究等倫理審査委員会において承認を得、研究を開始した。健常人 16 名、GPP 患者 11 名を対象として採血した。活動期 GPP (aGPP) 患者に GMA を施行し、治療前後で血液サンプルを得た。GMA 前後の臨床評価には日本皮膚科学会の膿疱性乾癬重症度分類を使用した。

(2) 末梢血中の proinflammatory monocyte 比を解析するため、anti-human CD14 と anti-human CD16 monoclonal antibody を使用し、フローサイトメトリーを用いて測定した。

(3) 健常人および GPP 患者末梢血より末梢血単核細胞 (PBMC) を遠心分離し、さらに MACS

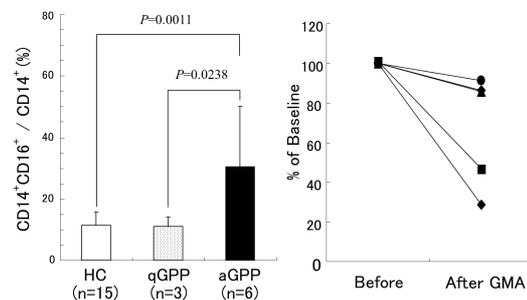
を使用して CD14<sup>+</sup> monocyte を得た。CD14<sup>+</sup> monocyte 培養液に LPS (1  $\mu$ g/mL) を加え 37  $^{\circ}$ C、18 時間培養した後、培養上清中のサイトカイン・ケモカイン濃度を cytometric bead array を使用して測定した。測定項目は TNF- $\alpha$ 、CXCL8 (IL-8)、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )、CCL4 (MIP-1 $\beta$ )、CCL5 (RANTES) とし、paired *t*-test にて有意差検定を行った。

(4) 末梢血中サイトカイン・ケモカイン濃度も cytometric bead array を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) aGPP 群では非活動期 GPP 群および健常人群に比べて proinflammatory monocyte 比が著しく増加していた。また GMA を 1 回施行後の末梢血中では著しく低下した。(図 1)

図1: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte phenotype  
HC: 健常人 qGPP: 非活動期 GPP aGPP: 活動期 GPP



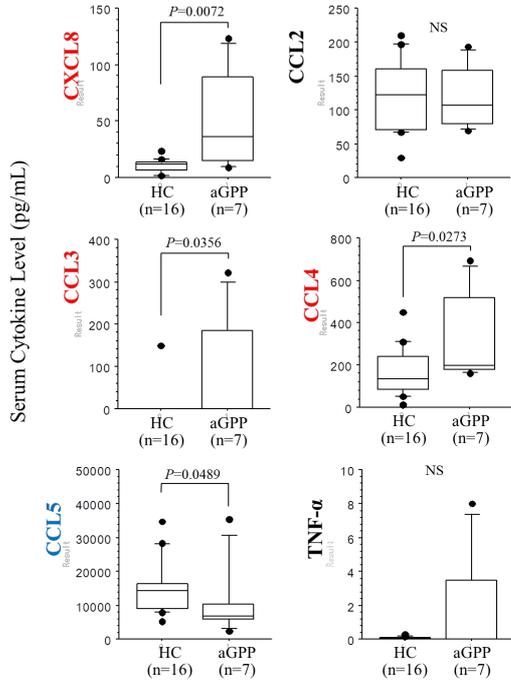
(2) GMA 5 回 (週 1 回計 5 回) 1クールを施行後、臨床症状は重症度分類で 3 点以上軽快し、proinflammatory monocyte 比は 5 名中 4 名で低下した。(表 1)

表1: The CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup> monocyte and clinical score

Patient ID	Before GMA		After 5 GMA sessions	
	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> / CD14 <sup>+</sup> (%)	Clinical Score	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> / CD14 <sup>+</sup> (%)	Clinical Score
GPP 1	14.6	7	11.5	3
GPP 2	16.3	10	22.5	7
GPP 3	44.8	12	15.6	7
GPP 4	63.9	15	43.1	10
GPP 5	22.3	10	9.5	7

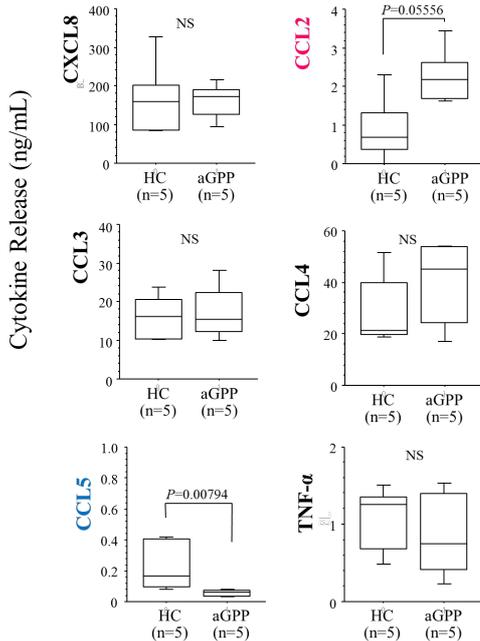
(3) 血清中のサイトカイン測定では、aGPP 群は健常人群に比べ CXCL8、CCL3、CCL4 は有意に増加していたが、CCL5 は逆に有意に低下していた。CCL2、TNF- $\alpha$  に有意な差は見られなかった。(図 2)

図2: 活動期膿疱性乾癬(aGPP)と健常人(HC)における血清中ケモカイン測定



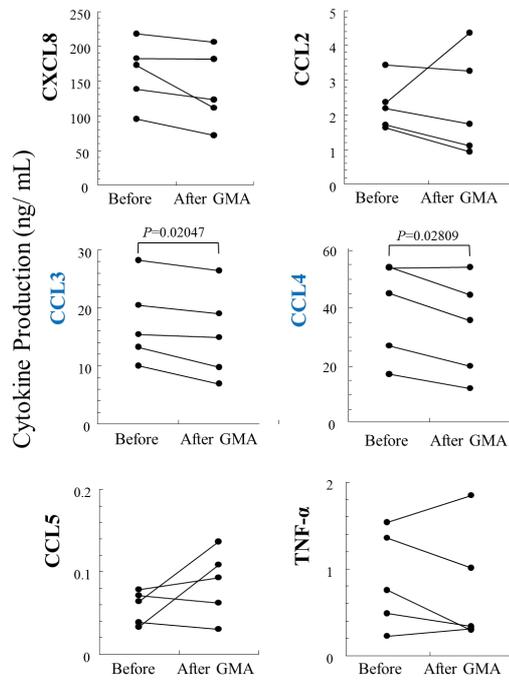
(4) LPS を添加後の CD14<sup>+</sup> monocyte 培養上清では, aGPP 群は健常人群に比べ CCL5 は有意に低下した。CXCL8, CCL3, CCL4, TNF- は不変であり, CCL2 は増加傾向にあった。(図3)

図3: 活動期膿疱性乾癬(aGPP)と健常人(HC)におけるLPS刺激によるリンパ球のサイトカイン・ケモカイン産生能。



(5) 1クール施行前後の CD14<sup>+</sup> monocyte を LPS で刺激した後の培養上清中の CCL3, CCL4 は有意に低下した。CXCL8 は全例で低下したが有意差はなく, CCL2, CCL5, TNF- は変化がなかった。(図4)

図4: 活動期膿疱性乾癬患者における1回のGMA治療前後でのサイトカイン産生能の変化。



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)

1. Tokuzumi M, Fujisawa T, Shu E, Kanoh H, Saigo C, Miyazaki T, Hamaguchi Y, Seishima M. Anti-SRP Antibody-positive Myopathy with Universal Alopecia and Multiple Vitiligo. *Acta Derm Venereol.* 15: 497-498. (2015) doi: 10.2340/00015555-1985. (査読有)
2. Fujisawa T, Tawada C, Mizutani Y, Doi T, Yoshida S, Ogura S, Seishima M. Efficacy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for treatment of palmoplantar pustulosis. *Ther Apher Dial.* 18: 238-243. (2014) doi: 10.1111/1744-9987.12210. (査読有)
3. Fujisawa T, Fukao T, Shimomura Y, Seishima M. A novel TRPS1 mutation in a family with tricho-rhino-phalangeal syndrome type 1. *J Dermatol.* 41: 514-517. (2014) doi: 10.1111/1346-8138.12511. (査読有)
4. Tawada C, Kanoh H, Nakamura M, Mizutani Y, Fujisawa T, Banno Y, Seishima M. Interferon- decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol.* 134: 712-718. (2014) doi: 10.1038/jid.2013.364. (査読有)
5. Fujisawa T, Okumura Y, Shibuya Y, Kato G, Seishima M. Squamous cell carcinoma

possibly originating from a granuloma following vaccination with Bacille Calmette-Guérin. Eur J Dermatol. 23: 706-707. (2013) doi: 10.1684/ejd.2013.2137. (査読有)

6. Fujisawa T, Moriya C, Shibuya Y, Kanoh H, Seishima M. Combination therapy of infliximab and granulocyte/monocyte adsorption apheresis for refractory pustular psoriasis with psoriatic arthritis. Acta Derm Venereol. 93: 364-365. (2013) doi: 10.2340/00015555-1463. (査読有)

〔学会発表〕(計 8件)

1. 藤澤智美, 清島真理子 「皮膚疾患に対するアフエーシス-現在と未来-」皮膚疾患における好中球・単球吸着療法-掌蹠膿疱症を中心として, 第 35 回日本アフエーシス学会, 東京ドームホテル(東京都, 文京区), 2014.9.26-28
2. 藤澤智美, 生物学的製剤の新たなステージと岐阜大学における乾癬治療の実際, 岐阜乾癬カンファレンス, じゅうろくプラザ(岐阜県, 岐阜市), 2014.10.16
3. Seishima M, Fujisawa T, Mizutani Y, Moriya C, Suzuki T, The change in clinical data of palmoplantar pustulosis in Gifu University Hospital, The 3<sup>rd</sup> Eastern Asia Dermatology Congress, Jeju, Korea 2014.9.24-26
4. 藤澤智美, 太和田知里, 水谷陽子, 土井智章, 吉田省造, 小倉真治, 清島真理子, 掌蹠膿疱症に対するGMAの有効性の検討, 第113回日本皮膚科学会総会, 国立京都国際会館(京都府, 京都市), 2014.5.30-6.1
5. 藤澤智美, 守屋智枝, 水谷陽子, 鈴木智子, 清島真理子, 乾癬に対する生物学的製剤変更および増量の検討, 第 29 回日本乾癬学会, 高知市文化プラザ かるぽーと(高知県, 高知市), 2014.9.19-20
6. 藤澤智美, 岐阜大学における乾癬治療を生物学的製剤の使用状況, 第 72 回岐阜市皮膚科医会, 岐阜会館(岐阜県, 岐阜市), 2013.6.13
7. 藤澤智美, 清島真理子, 顆粒球吸着療法による膿疱性乾癬の維持療法: 最近の皮膚科アフエーシスの話題, 第 34 回日本アフエーシス学会, 軽井沢プリンスホテル(長野県, 軽井沢町), 2013.11.1-3
8. 藤澤智美, 顆粒球吸着療法のエビデンス: 膿疱性乾癬に対するアダカラムの最適化を求めて, 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学会, 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市) 2013.11.2-3

〔図書〕(計 1件)

藤澤智美, 顆粒球吸着療法: 章 最近のトピックス2) 冊でわかる最新皮膚科治療 皮膚科サブスペシャリティーズ, 五十嵐敦之編,

文光堂, 東京, 279-281, 2013

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤澤 智美 (TOMOMI FUJISAWA )  
岐阜大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 20585583

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: