

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860890

研究課題名(和文)プロテアソーム阻害剤による皮膚障害におけるPSMB8の変異解析

研究課題名(英文)Analysis of PSMB8 mutations in cases with skin damage by a proteasome inhibitor

研究代表者

国本 佳代(KAYO, KUNIMOTO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10438278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソーム阻害薬は皮膚障害を高率に引き起こし、中條-西村症候群(NNS)に類似した組織像を呈する。その背景にNNSの原因遺伝子であるPSMB8遺伝子の変異が存在する可能性を検索するため、プロテアソーム阻害薬による皮膚障害の皮膚生検組織8例からゲノムDNAを抽出して遺伝子検索を行ったが、変異は認められなかった。また9例について組織を検討したところ、NNSと同様にリンパ球、好中球、組織球の浸潤がみられ、付属器や浸潤細胞中心にユビキチンが陽性であった。プロテアソーム阻害薬による皮疹ではCD4陽性細胞がみられたのに対し、NNSではCD8陽性細胞が浸潤しており、その相違については検討を要する。

研究成果の概要(英文)：It is known that a proteasome inhibitor induces cutaneous adverse reaction with a high probability. The histopathology of the skin eruption is similar to that of Nakajo-Nishimura syndrome(NNS). PSMB8 mutation was not detected by direct sequence method using the genome DNA extracted from 8 skin biopsy specimens of proteasome inhibitor-induced cutaneous eruption because the PSMB8 mutation might present as genetic background. Slides were obtained from the 9 reported cases of proteasome inhibitor-induced to compare the histology. The hematoxylin-eosin and immunohistochemical findings of both cases were similar. In both cases, the histology showed mononuclear infiltrate in the dermis to adipose tissue and around adnexal tissue. The dermal infiltrate was positive for myeloperoxidase, CD68, ubiquitin. In 9 patients with proteasome inhibitor-induced cutaneous eruption, the dermal infiltrate was positive for CD4. On the other hand, the infiltrate was positive for CD8 in NNS.

研究分野：autoinflammation

キーワード：proteasome Nakajo-Nishimura proteasome inhibitor skin eruption

1. 研究開始当初の背景

ボルテゾミブ(ベルケード)は26Sプロテアソームの特異的阻害剤(分子標的薬)であり、腫瘍細胞に強力にアポトーシスを誘導する新しい抗腫瘍剤として、国内外の多発性骨髄腫患者に数多く使用されているが、その副作用として、毛嚢炎様丘疹や紫斑、浸潤性紅斑などの皮疹がみられ、組織学的に血管周囲のリンパ球、好中球浸潤、壊死性血管炎などが認められると報告されている。NNSにおいては凍瘡様皮疹や結節性紅斑様皮疹が特徴的であるが、組織学的に真皮全層から脂肪織もしくは筋組織にいたる血管周囲性のリンパ球や組織球の浸潤を認め、核塵を伴う好中球や好酸球の浸潤が見られることもある。ボルテゾミブでは注射後一過性に皮疹が出現する例が多いが、新しい経口薬ではその効果が持続することによって持続的な皮疹が誘発されるようである。多発性骨髄腫の治療にボルテゾミブを投与した全ての症例で皮疹がみられているわけではなく、NNS患者の両親や兄弟はPSMB8変異ヘテロ接合を持ち、プロテアソーム機能は患者と健常者の中間値まで減少しているにもかかわらず、何ら臨床症状をきたさないことを考え併せると、炎症性皮疹が出現した患者にはプロテアソーム機能低下をきたす何らかの遺伝的背景が存在している可能性が推測される。

さらに、もしプロテアソーム阻害剤誘発炎症性皮疹にPSMB8変異などの存在が明らかになれば、PSMB8変異ヘテロ接合を持つNNS患者家族由来細胞にプロテアソーム阻害剤を添加することで、プロテアソーム阻害剤誘発炎症を*in vitro*で再現できる可能性がある。

2. 研究の目的

プロテアソーム阻害剤投与によって炎症性皮疹を生じた多発性骨髄腫患者の遺伝的背景を検索し、細胞や組織の変化を詳細に検討すること、さらにPSMB8ヘテロ変異をもつNNS患者家族由来細胞にプロテアソーム阻害剤を添加した時の変化を検討することで、NNS様炎症性皮疹発症におけるプロテアソーム機能低下の詳細とその意義を明らかにする。さらに、健常者由来細胞とNNS患者由来細胞に各種プロテアソーム阻害剤を添加した時の変化を比較検討することで、変異β5i選択的阻害薬を検索し、NNS患者由来細胞に対して選択的に有効性を発揮するか検証する。

3. 研究の方法

文献検索により報告されているボルテゾミブ投与によって炎症性皮疹を呈した症例に対してインフォームドコンセントを得て血液、組織標本の提供を依頼する。また、当院血液内科において多発性骨髄腫にボルテゾミブを投与する症例をプロスペクティ

ブにフォローし、皮疹の出現前後の血液サンプルを収集する。

集めた検体を用い、IL-6やIP-10などの血清中サイトカイン・ケモカイン値をELISAで、末梢血単核球のプロテアソーム活性をキットで、ユビキチン蓄積をウェスタンブロットや免疫染色によって測定・検討し、NNSとの類似点と相違点を明らかにする。病理組織については、CD4、CD8、CD68、MPOなどの免疫染色を行って浸潤細胞を明らかにし、NNS症例と比較検討する。

血液あるいは病理組織からゲノムDNAを単離し、PSMB8をはじめとするプロテアソーム関連遺伝子の変異検索を行い、その遺伝的背景を明らかにする。

作成済みのPSMB8ヘテロ変異を持つNNS患者家族由来B細胞にボルテゾミブなどのプロテアソーム阻害剤を添加し、前後でのプロテアソーム活性の変化や産生誘導されるサイトカイン・ケモカインを検討し、プロテアソーム阻害剤誘発炎症性皮疹を来した症例やNNS症例での解析結果と比較検討する。

健常者由来不死化B細胞に各種プロテアソーム阻害剤を添加した時のプロテアソーム活性を検討し、キモトリプシン活性のみを低下させるβ5i選択的阻害薬がないか検索する。β5i選択的阻害薬が見出されれば、NNS患者由来不死化B細胞に添加した時のプロテアソーム活性、サイトカイン・ケモカイン産生を検討し、健常者由来細胞での結果と比較することで、NNS患者由来細胞に対して選択的に、プロテアソーム活性をむしろ改善しサイトカイン・ケモカイン産生を抑制できないか検証する。

4. 研究成果

中條-西村症候群(NNS)は、免疫プロテアソームβ5iサブユニットをコードするPSMB8遺伝子の機能喪失型ホモ変異によってユビキチン蓄積を来す遺伝性自己炎症疾患である(Arima K, et al. PNAS 2011)。しかし、原因遺伝子が同定されたものの、プロテアソーム機能不全症の病態には解明されていない点も多く、いまだ有効な治療法はない。そこで我々は新規プロテアソーム阻害剤イクサゾミブ(日本未承認)の投与によって誘発された皮膚障害を経験したハーバード大学の症例について皮疹部の組織所見の検討を行ったところ、真皮浅層から深層にかけての血管、付属器周囲、脂肪織にまで至る炎症細胞浸潤がみられる、好中球浸潤はあるが、白血球核破砕性血管炎はみられない、間質への浸潤細胞は主に組織球とリンパ球浸潤であるなど、NNSに類似した組織像を呈していた。2症例のパラフィン切片を取り寄せ、ゲノムDNAを抽出してダイレクトシーケンス法によって

PSMB8 遺伝子の変異を検索したが、いずれも問題となるような変異は認められなかった。

プロテアソーム阻害薬のボルテゾミブも多発性骨髄腫の治療薬として臨床応用されているが、高頻度に皮膚障害を起こすことが知られている。プロテアソーム阻害薬により出現する皮疹と NNS の皮疹の異同を検討するため、本邦で報告されたボルテゾミブによる皮疹の組織を 9 例集め、ユビキチン蓄積と浸潤細胞について免疫組織化学的に検討し、NNS 患者 2 例の皮疹の組織と比較検討した。ボルテゾミブによる皮疹の HE 標本では血管周囲性あるいは真皮上層のリンパ球浸潤を主体としていたが、中には壊死性血管炎や Sweet 病様あるいは壊疽性膿皮症様の好中球浸潤を認める症例もあった。免疫組織化学染色では浸潤細胞においてミエロペルオキシダーゼ (MPO) は 7 例で陽性、CD4 は 7 例で陽性、CD8 は 7 例で陰性、CD68 は 8 例で陽性、ユビキチンは付属器や浸潤細胞を中心に 9 例で陽性であった。一方、NNS の皮疹では MPO、CD68、ユビキチンについては 2 例とも陽性であったが、CD4 は陰性、CD8 は陽性の結果であった。プロテアソーム阻害剤による皮疹と NNS の皮疹における浸潤細胞の CD4、CD8 の染色性の違いについては検討を要するが、組織への炎症細胞浸潤と炎症細胞の種類については両者の類似性が確認された。

ボルテゾミブによる皮疹が発症する症例において遺伝的背景に PSMB8 遺伝子の G201V ヘテロ変異が存在する可能性を検討するため、組織から抽出したゲノム DNA をもとに PSMB8 変異について検索したが、調べ得た 6 例に G201V 変異はなかった。

当院血液内科において多発性骨髄腫にボルテゾミブを投与した症例に皮疹の出現がなく、皮疹前後の血液サンプルの採取は行っていない。

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 1 件)

1. Kanazawa N, Kunimoto K, Ishii N, Inamo Y, Furukawa F: Is CANDLE the best nomenclature? Br J Dermatol 171:659-660, 2014 査読有
DOI:10.1111/bjd.12962

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Kayo Kunimoto, Fumiko Ozaki, Fukumi Furukawa, Nobuo Kanazawa: Analysis of the ROS production in neutrophils of Nakajo-Nishimura syndrome patients.

The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec.11-13, 2015, Okayama, Japan

2. Kayo Kunimoto, Fumiko Ozaki, Fukumi Furukawa, Nobuo Kanazawa: Beneficial effect of methotrexate on a case of Nakajo-Nishimura syndrome. The 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases, Sep. 30 - Oct. 3, 2015, Dresden, Germany
3. Nobuo Kanazawa, Yumi Nakatani, Yutaka Inaba, Kayo Kunimoto, Fukumi Furukawa: Temporal changes of serum cytokine/chemokine levels in patients with Nakajo-Nishimura syndrome treated with tocilizumab. The 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases, Sep. 30 - Oct. 3, 2015, Dresden, Germany
4. 国本佳代、稲葉 豊、古川福実、金澤伸雄: メトトレキサートの追加投与が有効であった中條-西村症候群の小児例、第 39 回日本小児皮膚科学会学術大会、2015.7.18-19、鹿児島
5. 国本佳代、稲葉 豊、古川福実、金澤伸雄: プロテアソーム機能不全症~中條-西村症候群とその類症~、第 114 回日本皮膚科学会総会、2015.5.29-31、横浜
6. 金澤伸雄、中谷友美、稲葉 豊、国本佳代、古川福実: 中條 西村症候群患者血中サイトカインの経時的解析、第 438 回日本皮膚科学会京滋地方会 宮地良樹教授退官記念地方会、2014.12.19、京都
7. Nobuo Kanazawa, Yutaka Inaba, Kayo Kunimoto, Fukumi Furukawa: Nakajo-Nishimura syndrome: a hereditary proteasome disability syndrome sharing the genetic origin with JMP and CANDLE syndrome. The 11th Meeting of the GJSD, June 11-14, 2014, Heiderberg, Germany

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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

国本 佳代 (KUNIMOTO KAYO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：10438278