

201442027A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業

IL-36RN欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた
病態解明と診療（診断及び治療）ガイドラインの作成

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 杉浦 一充

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患実用化研究事業による委託業務として、濱口道成が実施した平成26年度「IL-36RN欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病態解明と診療（診断及び治療）ガイドラインの作成」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
IL-36RN欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病態解明と診療（診断及び治療）ガイドラインの作成-----	1
杉浦一充	
（資料）IL-36RN欠損症の説明、研究の進め方、本年度の成果についての図	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. DITRAの迅速遺伝子診断法の開発と診療実態のさらなる解明-----	11
杉浦一充	
2. 膿疱性乾癬のターゲットリシークエンスによる未知変異-----	16
梅澤明弘	
3. DITRAモデルマウスの作成 -----	18
小川 靖	
III. 学会等発表実績 -----	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	27

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業
委託業務成果報告（総括）

IL-36RN欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病態解明と診療
（診断及び治療）ガイドラインの作成

業務主任者 杉浦 一充 名古屋大学大学院医学系研究科准教授

研究要旨

本研究の目的は、IL-36RN 欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病因・病態の解明と診療ガイドラインを確立することである。汎発性膿疱性乾癬に対する病因解明に関する研究は IL-36RN の遺伝子の欠損または変異が原因で起こることが明らかにされてきたが病態の解明はなされていない。業務主任者は、尋常性乾癬を伴わない汎発性膿疱性乾癬 の 8 割は IL36RN という単一遺伝子変異が原因の独立した疾患であることを初めて明らかにした(Sugiura K, et al. JID 2013)。本研究を遂行することで、迅速遺伝子診断を開発し、本邦の IL-36 欠損症の患者の診療実態を明らかにすることができる。また、疾患モデルマウスを作製することで、皮疹部における炎症細胞プロファイルなどの病態解明が可能となる。既存薬剤の作用点の解明に寄与し、新たな革新的医薬品の開発につなげることができる。新たな診療指針の確立を行うことは、難治性疾患診療の均てん化と予後の飛躍的改善が見込まれ、病気に苦しむ患者及びその家族への大きな希望となり、医療福祉経済的にも厚生労働行政に大きく貢献するものである。本年度、迅速遺伝子診断法の開発、モデルマウスの作成、症例を集積することによる診療実態の解明、新規病因遺伝子の同定などの成果を得た。

業務項目の担当責任者

杉浦一充・名古屋大学大学院医学系研究科
准教授

梅澤明弘・国立成育医療研所センター研究
所副所長

小川靖・名古屋大学医学部附属病院助教

A.研究目的

本研究の目的は、膿疱性乾癬に対する革

新的医薬品の開発に向けた病因・病態の解明と診療ガイドラインを確立することである。

膿疱性乾癬は汎発性膿疱性乾癬（GPP）と限局性膿疱性乾癬に大別される。GPPは、急激な発熱とともに全身の皮膚が紅潮し、無菌性膿疱が多発し、再発を繰り返す。また、全身性炎症に伴う臨床検査異常を示し、粘膜症状、関節炎を合併する。汎発性膿疱

性乾癬に対する病因解明に関する研究は、世界中でなされており、IL-36RN の遺伝子 (*IL36RN* 遺伝子) の欠損または変異が原因で起こることが明らかにされてきた。しかし、原因遺伝子は解明されたが、皮疹部における炎症細胞プロファイルなどの病態の解明はなされていない。さらに、表皮角化細胞あるいは真皮樹状細胞からの IL-36 の産生分泌が膿疱をきたすトリガーとなると考えられるが、従来から汎発性膿疱性乾癬の誘発因子として知られるウイルス感染、細菌感染、薬剤、妊娠あるいは炎症性のサイトカインが生体内でどのようにして IL-36 の産生分泌を引き起こすのかという極めて重要なテーマについては殆ど明らかになっていない。さらに、これまでの治療法は全て対症療法であり治療抵抗性の症例も存在する。これらの問題を克服し、根治を目指した迅速で簡便な新規治療法及び診断法の開発が強く望まれている。難病の GPP は病因が不明であった。しかし GPP のなかではごく希少な病型であると考えられていた、家族性汎発性膿疱性乾癬(familial generalized pustular psoriasis: FGPP)は *IL36RN* 遺伝子が原因遺伝子である常染色体劣性遺伝を背景とした疾患であることが解明された (*N Engl J Med* 2011)。*IL36RN* は表皮角化細胞から分泌されるインターロイキン 36 受容体アンタゴニスト (IL-36RN) をコードしている。IL-36RN は IL-36 と拮抗し細胞膜上の IL-36 受容体(IL-36R)に結合し下流のシグナルを抑制する。FGPP では IL-36RN の機能が欠損する。FGPP は別名 IL-36RN 欠損症 (deficiency of interleukin-36 receptor antagonist: DITRA)とも呼ばれるようにな

った。業務主任者は、尋常性乾癬を伴わない汎発性膿疱性乾癬の 8 割は DITRA であることを初めて明らかにした(Sugiura K, et al. *J Invest Dermatol* 2013)。

B.研究方法

DITRA を始めとする汎発性膿疱性乾癬の革新的治療法の開発に向けて、下記を軸に研究を進めた。既に 30 例以上の DITRA の患者の診療実態を把握している。さらなる DITRA の患者の集積を目指して、近い将来のトランスレーショナルリサーチを明確に視野にいれている。

迅速*IL36RN*遺伝子変異診断法の確立と遺伝子診断

申請者らは日本人の*IL36RN*遺伝子変異はc.28C>Tとc.115+6T>Cの2つにほぼ集約されることを明らかにした(Sugiura K, et al. *J Invest Dermatol* 2013)。タックマンプローブを用いたリアルタイムPCR法でこの2つの変異解析を迅速に同定することができる診断法が確立できるかどうか検討をした。2つの変異についてはヘテロ、ホモの変異いずれもDNA検体を保持していたのでその検体をサンプルとして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究の遺伝子診断と全エクソームシーケンス法については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を受けた。具体的には、本研究では血液あるいは口腔粘膜より抽出した DNA を用いて遺伝子変異解析や全エクソームシーケンス法などを施行した。資料と臨床情報、及び得ら

れたデータは連結可能匿名化の上で管理され、一時データのみでは個人の特定は出来ないよう取り扱った。連結可能にした個人を特定できるデータは紙媒体のみに記入し、施錠可能な保管庫の中で申請者が管理した。

ガイドライン作成のためのDITRAの診療実態の把握

日本各地から紹介されてくるGPPの患者について*IL36RN*遺伝子の変異解析を実施した。

Il1f5(ヒト*IL36RN*に相当) ^{+/+}マウスの作成

*Il1f5*のコンベンショナルノックアウト(KO)マウス (*Il1f5*^{+/+}マウス) を作成した。*Il1f5*のエクソン1-3にわたる領域をネオマイシン耐性遺伝子で置き換えた。共同開発(ID# 116703)として理化学研究所変異マウス開発ユニット(<http://www.cdb.riken.jp/arg/index.html>)にて作成した。Geno-typingはマウスの尾を切断し、genomic DNAを精製し、これをテンプレートとして、特異的プライマーを用いたPCRを行うことにより確認した。最終的なgeno-typingはSouthern blot法、Western blot法にて確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋大学動物実験委員会部局委員会の承認を受けた。名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程に沿って、研究を実施した。

DITRA モデルマウスの作成

Il1f5^{+/+}マウスの背部にイミキモドを外用して、DITRAモデルマウスを作成した。皮膚症状、病理所見を検討した。

新規疾患感受性遺伝子多形の同定

集積されたGPPの症例の*CARD14*遺伝子の全エクソンのシークエンスを行い、疾患感受性遺伝子多形の存在を検討した。

ターゲットリシークエンスによる未知変異同定

*IL36RN*変異のなかったGPPについて、次世代シーケンサーで解析をした。

C.研究結果

*IL36RN*遺伝子変異の迅速遺伝子診断法の開発

タックマンプローブを用いて、*IL36RN*遺伝子変異の迅速遺伝子診断法を開発した。日本人の *IL36RN* 変異は c.28C>T と c.115+6T>C の 2 つにほぼ集約される (Sugiura K, et al. *J Invest Dermatol* 2013)。タックマンプローブを用いたリアルタイムPCR法でこの2つの変異解析を迅速に同定することができる診断法を確立した。

ガイドライン作成のためのDITRAの診療実態の把握

2014年2月から12月末までに膿疱性乾癬40症例を収集した。本邦における膿疱性乾癬の年間登録数は80強である。申請時点と合わせて110症例の膿疱性乾癬の診療実態を収集し、遺伝子診断を完了した。

GPP と異同が不明であった妊婦に発症する疱疹状膿痂疹の少なくとも一部は遺伝学的に全く同一の疾患であることを明らかにした(Sugiura K et al, *J Invest Dermatol* 2014;134:2472-4)。

ヘテロ接合体の IL36RN 変異であっても GPP になることを明らかにしてきた。さらに、水痘ウイルスが膿疱性乾癬の原因となることを明らかにした(Sugiura K et al, *J Am Acad Dermatol* 2014;71:e216-8.)。

リン酸コデインによる急性汎発性発疹性膿疱症に IL-36RN 欠損があった症例を報告した(Nakai N, Sugiura K et al, *JAMA Dermatol* 2015;151:311-5.)。

IL-36RN 欠損症による GPP で、顆粒球単球吸着療法(GMA)、抗 TNF- α 抗体療法が有効である症例があることを明らかにした(Sugiura K et al, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28:1835-6. Sugiura K et al, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 doi: 10.1111/jdv.12590)。

III β ^{+/+}マウスの作成

ジェノタイピングでノックアウトマウスの作成の成功を確認した。

DITRA モデルマウスの作成

DITRA モデルマウスの作成の成功を確認した。

新規疾患感受性遺伝子多形の同定

CARD14 p.Asp176His 多型が尋常性乾癬を伴う GPP の疾患感受性多型であることを発見し報告した(Sugiura K, et al, *J Invest Dermatol* 2014;134:1755-7.)。

ターゲットリシーケンスによる未知変異同定

IL36RN 変異のなかった GPP50 例について、次世代シーケンサーで解析中である。

2 例について、膿疱性乾癬の新規病因遺伝子 LDHA 遺伝子を見出し報告した(Ito T, Aoshima M, Sugiura K, et al, *Br J Dermatol* 2015 doi: 10.1111/bjd.13590.)。

その他の成果

患者の皮膚を用いて iPS 細胞化することで、疾患の細胞モデルを樹立して、患者皮膚の特性を同定することに成功した。DITRA マウスモデルの皮膚を用いての研究にも着手している。

遺伝性皮膚疾患における、新しい病的遺伝発症方式を解明した。遺伝性皮膚疾患の病因遺伝子のプロモータ解析をして、報告をした。

その他、遺伝性皮膚疾患と炎症性皮膚疾患における新知見を得て報告をした。

D. 考察

膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病因・病態の解明と診療ガイドラインを確立にという目的に向けて、順調に研究は進んでいる。具体的には、以下のとおりである。

IL36RN 遺伝子変異の迅速診断法を確立したことにより、従来よりも短時間で遺伝子診断をすることができ、日常診療に大いに貢献できるようになった。

ガイドライン作成のための DITRA の診療実態の把握したことにより、次年度に IL36RN 遺伝子変異解析の情報を盛り込ん

だ GPP のガイドライン作成を作成する準備が整った。

Il1f5^{+/+}マウスと DITRA モデルマウスを作成することにより、次年度に DITRA の病態解明と革新的治療薬開発のための準備が整った。

CARD14 p.Asp176His 多型が尋常性乾癬を伴う GPP の疾患感受性多型であること、膿疱性乾癬の新規病因遺伝子 *LDHA* 遺伝子であることを報告したことにより、膿疱性乾癬の病因の解明に貢献をした。

難治性疾患実用化研究・腎疾患実用化研究・慢性の痛み解明研究に関連する研究開発管理の実施・評価に関する研究（研究代表者：福島雅典博士）疾病対策課関連事業事務局の指導の下、名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センターと連携をとり、新規治療法開発に向けた取り組みを始めている。

E.結論

本年度、本研究により膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病因・病態の解明と診療ガイドラインを確立にむけて、モデルマウスの作成、症例の集積による診療実態の解明、新規病因遺伝子の同定などの成果を得た。患者の福音と、医療経済の抑制のための、革新的新規治療法の開発と診療ガイドライン作成の準備は整いつつある。将来的な医師主導治験を目指した、前臨床研究、さらなる新規病因遺伝子の探索と症例の集積を進めていく。

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

1.論文発表

1. Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama N, Ito N, Sakabe JI, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y. Pustular psoriasis like lesions associated with hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: Long-term follow-ups of two cases. *Br J Dermatol* 2015.Jan doi: 10.1111/bjd.13590.
2. Nakai N, Sugiura K, Akiyama M, Katoh N. Acute generalized exanthematous pustulosis caused by dihydrocodeine phosphate in a psoriasis vulgaris patient with a heterozygous *IL36RN* mutation. *JAMA Dermatol* 2015 Mar;151(3):311-5.
3. Kaibuchi-Noda K, Sugiura K, Takeichi T, Miura S, Kagami S, Takama H, Hino H, Akiyama M. Darier's Disease: A novel *ATP2A2* missense mutation at one of the calcium-binding residues. *Acta Derm Venereol* 2015 Mar;95(3):362-3
4. Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N. A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest* 2015 Jan;95(1):4-13.
5. Sugiura K, Endo K, Akasaka T, Akiyama M. Successful treatment with infliximab of sibling cases with generalized pustular psoriasis caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 Jun. doi: 10.1111/jdv.12590.
6. Tanahashi K, Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Disappearance of circulating autoantibodies to RNA polymerase III in a patient with

- systemic sclerosis successfully treated with corticosteroid and methotrexate. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 Jun. doi: 10.1111/jdv.12512.
7. Sugiura K, Haruna K, Suga Y, Akiyama M. Generalized pustular psoriasis caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 Dec;28(12):1835-6.
8. Sugiura K, Uchiyama R, Okuyama R, Akiyama M. Varicella zoster virus-induced generalized pustular psoriasis in a baby with heterozygous *IL36RN* mutation. *J Am Acad Dermatol* 2014 Nov;71(5):e216-8.
9. 杉浦一充, 秋山真志. 遺伝性の炎症性角化症. 別冊Bio Clinica, 慢性炎症と疾患 皮膚における炎症性疾患 2014年11月;3(2):104-8.
10. Shimizu Y, Ogawa Y, Sugiura K, Takeda J, Sakai-Sawada K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H, Akiyama M. A palindromic motif in the -2084 to -2078 upstream region is essential for ABCA12 promoter function in cultured human keratinocytes. *Sci Rep* 2014 Oct;4:6737.
11. Sugiura K, Suga Y, Akiyama M. Dorfman-Chanarin syndrome without mental retardation caused by a homozygous *ABHD5* splice site mutation that skips exon 6. *J Dermatol Sci* 2014 Sep;75(3):199-201.
12. Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Solitary organizing pneumonia in systemic sclerosis mimicking lung adenocarcinoma. *Arthritis Rheumatol* 2014 Sep;66(9):2648.
13. Sugiura K, Oiso N, Inuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida-Yamamoto A, Kawada A, Iizuka H, Akiyama M. *IL36RN* Mutations Underlie Impetigo Herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2014 Sep;134(9):2472-4.
14. Tanahashi K, Sugiura K, Asagoe K, Aoyama Y, Iwatsuki K, Akiyama M. Novel TGM1 missense mutation p.Arg727Gln in β -barrel 2 domain in a case of self-healing collodion baby. *Acta Derm Venereol* 2014 Sep;94(5):589-90.
15. Sugiura K, Muto M, Akiyama M. *CARD14* c.526G>C (p.Asp176His) is a Significant Risk Factor for Generalized Pustular Psoriasis with Psoriasis Vulgaris in the Japanese Cohort. *J Invest Dermatol* 2014 Jun;134:1755-7.
16. Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Annular erythema associated with Sjögren's syndrome preceding overlap syndrome of rheumatoid arthritis and polymyositis with anti-PL-12 autoantibodies. *Acta Derm Venereol* 2014 Jun;94(4):470-1.
17. Sugiura K, Hasegawa Y, Shimoyama Y, Hashizume H, Akiyama M. Symmetrical giant facial plaque-type juvenile xanthogranuloma persisting beyond 10 years of age. *Acta Derm Venereol* 2014 Jun;94(4):465-6.
18. Sugiura K. The genetic background of generalized pustular psoriasis: *IL36RN* mutations and *CARD14* gain-of-function variants. *J Dermatol Sci* 2014 Jun;74(3): 187-92.
19. Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A. Ataxia telangiectasia derived iPS

cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep* 2014 Jun;4:5421.

20. Ogawa Y, Takeichi T, Kono M, Hamajima N, Yamamoto T, Sugiura K, Akiyama M.

Revertant Mutation Releases Confined Lethal Mutation, Opening Pandora's Box: A Novel Genetic Pathogenesis. *PLoS Genet* 2014 May;10(5):e1004276.

21. Yanagishita T, Sugiura K, Kawamoto Y, Ito K, Marubashi Y, Taguchi N, Akiyama M, Watanabe D. A case of Björnstad syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the BCS1L gene. *Br J Dermatol* 2014 Apr;170(4):970-3.

2.学会発表

1. 杉浦一充. Biomarkers for generalized pustular psoriasis and related disease. (ワークショップ). 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 20 日 名古屋国際会議場
2. 杉浦一充, 小川靖, 梅澤明弘. IL-36RN 欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病態解明と診療 (診断及び治療) ガイドラインの作成. 平成 26 年度厚生労働科学特別研究事業 進捗管理班 (難治性疾患実用化研究・腎疾患実用化研究・慢性の痛み解明研究) 成果報告会 2015 年 3 月 13 日 東京コンベンションホール
3. Sugiura K, Oiso N, Inuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida- Yamamoto A, Akira Kawada A, Iizuka H, Masahiko Muto, Akiyama M. *IL36RN* mutations underlie impetigo herpetiformis and

CARD14 c.526G>C is a risk factor for pustular psoriasis with psoriasis vulgaris.

日本研究皮膚科学会第 39 回年次学術大会・総会 2014 年 12 月 13 日 ホテル阪急エキスポパーク

4. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の免疫遺伝学(モーニングセミナー). 第 44 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2014 年 11 月 23 日 仙台国際センター
5. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の病態と治療. 平成 26 年度(第 34 回)難病講習会 2014 年 11 月 5 日 愛知県医師会館
6. 杉浦一充. 遺伝性の炎症性角化症: *IL36RN* 遺伝子と *CARD14* 遺伝子 (特別講演). 第 6 回高知乾癬フォーラム 2014 年 10 月 25 日 ザ クラウンパレス新阪急高知
7. 杉浦一充. 乾癬の免疫遺伝学的病態について(モーニングセミナー). 第 42 回日本臨床免疫学会総会 2014 年 9 月 26 日 京王プラザホテル
8. 杉浦一充. 汎発性膿疱性乾癬の病因遺伝子 (シンポジウム). 第 29 回日本乾癬学会学術大会 2014 年 9 月 19 日 高知市文化プラザかるぽーと
9. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の新知見(特別講演). 第 12 回遠州皮膚科医会 2014 年 9 月 17 日 オークラアクトシティホテル浜松
10. 杉浦一充. 意外な遺伝性皮膚疾患 (教育講演). 第 113 回日本皮膚科学会総会 2014 年 5 月 30 日 国立京都国際会館
11. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の責任遺伝子 (教育講演). 第 113 回日本皮膚科学

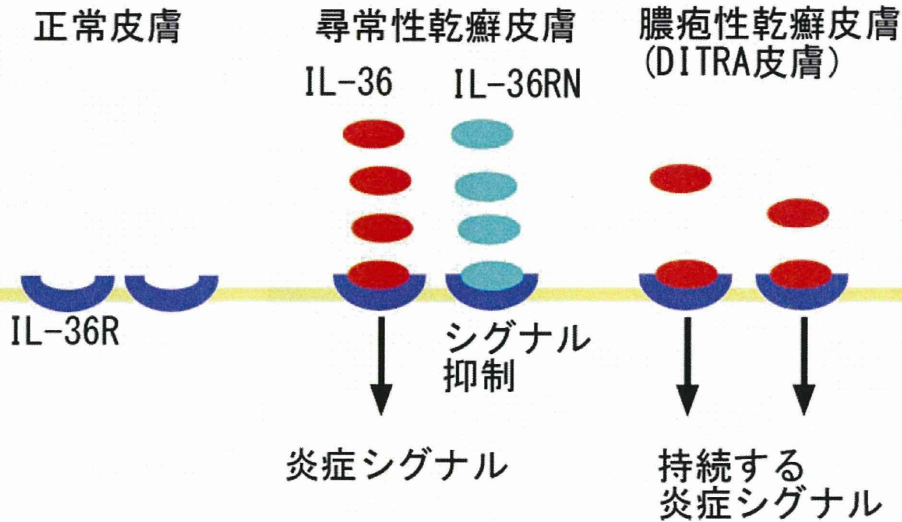
会総会 2014 年 5 月 30 日 国立京都国
際会館

2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。

代表者らは膿疱性乾癬の大半の病因がIL-36RN欠損症であることを解明した



膿疱性乾癬の臨床



臨床研究

- ①膿疱性乾癬の患者を集積し診療実態を調査する。トランスレーショナルリサーチに備える。
- ②診療ガイドラインを作成する。
- ③IL-36RN迅速遺伝子変異解析法を確立する。
- ④IL36RN遺伝子以外の新規病因遺伝子を同定する。

症例集積

診断薬開発
シーズ

診断薬開発

近い将来の
実用化研究

基礎研究

- ①IL-36RNノックアウトマウスを作成する。
- ②上記マウスをもとにモデルマウスを作成する。
- ③モデルマウスの病態解明をする。
- ④モデルマウスの治療研究をする。

治療法開発
シーズ

治療薬開発



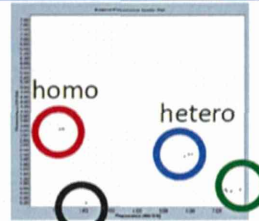
IL-36RN欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病態解明と診療（診断及び治療）ガイドラインの作成

名古屋大学

杉浦一充
皮膚病態学

1. 実態調査と診療指針作成についての進捗

- ① IL36RN変異の迅速遺伝子診断法を開発した。
- ② 総数110例の膿疱性乾癬の診療実態を収集し、遺伝子診断を完了した。



迅速遺伝子診断法



110例集積

2. DITRAモデルマウスの解析の進捗

- ① IL36RNノックアウトマウスを作成した。
- ② DITRAモデルマウスの作成に成功した。
- ③ 治療研究用の試薬を準備した。



IL36RNノックアウトマウス作成



モデルマウス作成

3. 新規病因遺伝子の発見の進捗

- ① CARD14 p.Asp176His多型が疾患感受性多型であることを報告した。
- ② 膿疱性乾癬の新規病因遺伝子LDHAを報告した。

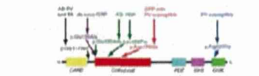
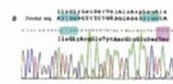


Figure 3. Exon-intron structure of CARD14, member 14 of the NOD2 family. Locations of exons and introns, and location of p.Asp176His mutation. ©2012, all rights reserved.

CARD14多型が膿疱性乾癬の関連があることを同定



新規病因遺伝子LDHAを同定



©Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital.

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業
委託業務成果報告（業務項目）

DITRAの迅速遺伝子診断法の開発と診療実態のさらなる解明

担当責任者 杉浦 一充 名古屋大学大学院医学系研究科准教授

研究要旨

本研究の目的は、IL-36RN 欠損症としての膿疱性乾癬の診療ガイドラインを確立することである。汎発性膿疱性乾癬に対する病因解明に関する研究は IL-36RN の遺伝子の欠損または変異が原因で起こることが明らかにされてきたが病態の解明はなされていない。担当責任者(業務主任者)は、尋常性乾癬を伴わない汎発性膿疱性乾癬 の8割はIL36RN という単一遺伝子変異が原因の独立した疾患であることを初めて明らかにした(Sugiura K, et al. JID 2013)。本研究を遂行することで、迅速遺伝子診断を開発し、本邦の IL-36 欠損症の患者の診療実態を明らかにすることができる。新たな診療指針の確立を行うことは、難治性疾患診療の均てん化と予後の飛躍的改善が見込まれ、病気に苦しむ患者及びその家族への大きな希望となり、医療福祉経済的にも厚生労働行政に大きく貢献するものである。本年度、迅速遺伝子診断法の開発、症例を集積することによる診療実態の解明という成果を得た。

A.研究目的

本研究の目的は、IL-36RN 欠損症としての膿疱性乾癬の診療ガイドラインを確立することである。

担当責任者（業務主任者）は、尋常性乾癬を伴わない汎発性膿疱性乾癬 の8割はDITRA であることを初めて明らかにした(Sugiura K, et al. *J Invest Dermatol* 2013)。しかし、本邦における DITRA としての膿疱性乾癬の診療実態は十分に明らかにされていなかった。従来の直接シーケンス法よりも迅速に遺伝子診断をする方法を確立することにより、迅速な臨床診断と早期治療介入を行うことができる。本研究では、

日本人の DITRA としての膿疱性乾癬の診療実態を解明することと、迅速遺伝子診断法の確立を目的とした。

B.研究方法

迅速IL36RN遺伝子変異診断法の確立と遺伝子診断

担当責任者らは日本人のIL36RN遺伝子変異はc.28C>Tとc.115+6T>Cの2つにほぼ集約されることを明らかにした(Sugiura K, et al. *J Invest Dermatol* 2013)。タックマンプローブを用いたリアルタイムPCR法でこの2つの変異解析を迅速に同定すること

ができる診断法が確立できるかどうか検討をした。2つの変異についてはヘテロ、ホモの変異いずれもDNA検体を保持していたのでその検体をサンプルとして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究の遺伝子診断については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を受けた。具体的には、本研究では血液あるいは口腔粘膜より抽出した DNA を用いて遺伝子変異解析や全エクソームシーケンシング法などを施行した。資料と臨床情報、及び得られたデータは連結可能匿名化の上で管理され、一時データのみでは個人の特定は出来ないよう取り扱った。連結可能にした個人を特定できるデータは紙媒体のみに記入し、施錠可能な保管庫の中で申請者が管理した。

ガイドライン作成のためのDITRAの診療実態の把握

日本各地から紹介されてくるGPPの患者について*IL36RN*遺伝子の変異解析を実施した。

新規疾患感受性遺伝子多形の同定

集積されたGPPの症例の*CARD14*遺伝子の全エクソームのシーケンシングを行い、疾患感受性遺伝子多形の存在を検討した。

C.研究結果

*IL36RN*遺伝子変異の迅速遺伝子診断法の開発

タックマンプローブを用いて、*IL36RN* 遺伝子変異の迅速遺伝子診断法を開発した。日本人の *IL36RN* 変異は c.28C>T と c.115+6T>C の 2 つにほぼ集約される (Sugiura K, et al. *J Invest Dermatol* 2013)。タックマンプローブを用いたリアルタイムPCR法でこの2つの変異解析を迅速に同定することができる診断法を確立した。

ガイドライン作成のためのDITRAの診療実態の把握

2014年2月から12月末までに膿疱性乾癬40症例を収集した。本邦における膿疱性乾癬の年間登録数は80強である。申請時点と合わせて110症例の膿疱性乾癬の診療実態を収集し、遺伝子診断を完了した。

GPPと異同が不明であった妊婦に発症する疱疹状膿痂疹の少なくとも一部は遺伝学的に全く同一の疾患であることを明らかにした (Sugiura K et al, *J Invest Dermatol* 2014;134:2472-4)。

ヘテロ接合体の*IL36RN*変異であってもGPPになることを明らかにしてきた。さらに、水痘ウイルスが膿疱性乾癬の原因となることを明らかにした (Sugiura K et al, *J Am Acad Dermatol* 2014;71:e216-8.)。

リン酸コデインによる急性汎発性発疹性膿疱症に*IL-36RN*欠損があった症例を報告した (Nakai N, Sugiura K et al, *JAMA Dermatol* 2015;151:311-5.)。

*IL-36RN*欠損症によるGPPで、顆粒球単球吸着療法(GMA)、抗TNF- α 抗体療法が有効である症例があることを明らかにした (Sugiura K et al, *J Eur Acad Dermatol*

Venereol 2014;28:1835-6. Sugiura K et al, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 doi: 10.1111/jdv.12590).

新規疾患感受性遺伝子多形の同定

CARD14 p.Asp176His 多型が尋常性乾癬を伴う GPP の疾患感受性多型であることを発見し報告した(Sugiura K, et al, *J Invest Dermatol* 2014;134:1755-7.)。

その他の成果

GPP2 例について、膿疱性乾癬の新規病因遺伝子 *LDHA* 遺伝子を発見し報告した(Ito T, Aoshima M, Sugiura K, et al, *Br J Dermatol* 2015 doi: 10.1111/bjd.13590.)。その他、遺伝性皮膚疾患と炎症性皮膚疾患における新知見を得て報告をした。

D. 考察

膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病因・病態の解明と診療ガイドラインを確立にという目的に向けて、順調に研究は進んでいる。具体的には、以下のとおりである。

IL36RN 遺伝子変異の迅速診断法を確立したことにより、従来よりも短時間で遺伝子診断をすることができ、日常診療に大いに貢献できるようになった。

ガイドライン作成のための DITRA の診療実態の把握したことにより、次年度に *IL36RN* 遺伝子変異解析の情報を盛り込んだ GPP のガイドライン作成を作成する準備が整った。

CARD14 p.Asp176His 多型が尋常性乾癬を伴う GPP の疾患感受性多型であること、膿疱性乾癬の新規病因遺伝子 *LDHA* 遺伝子

であることを報告したことにより、膿疱性乾癬の病因の解明に貢献をした。

E. 結論

膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病因・病態の解明と診療ガイドラインを確立にむけて、症例の集積、新規病因遺伝子の同定などの成果を得ている。患者の福音と、医療経済の抑制のための、革新的新規治療法の開発と診療ガイドライン作成の準備は整いつつある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama N, Ito N, Sakabe JI, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y. Pustular psoriasis like lesions associated with hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: Long-term follow-ups of two cases. *Br J Dermatol* 2015.Jan doi: 10.1111/bjd.13590.
2. Nakai N, Sugiura K, Akiyama M, Katoh N. Acute generalized exanthematous pustulosis caused by dihydrocodeine phosphate in a psoriasis vulgaris patient with a heterozygous *IL36RN* mutation. *JAMA Dermatol* 2015 Mar;151(3):311-5.
3. Kaibuchi-Noda K, Sugiura K, Takeichi T, Miura S, Kagami S, Takama H, Hino H, Akiyama M. Darier's Disease: A novel *ATP2A2* missense mutation at one of the calcium-binding residues. *Acta Derm Venereol* 2015 Mar;95(3):362-3
4. Sugiura K, Endo K, Akasaka T, Akiyama M. Successful treatment with infliximab of sibling

- cases with generalized pustular psoriasis caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 Jun. doi: 10.1111/jdv.12590.
5. Tanahashi K, Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Disappearance of circulating autoantibodies to RNA polymerase III in a patient with systemic sclerosis successfully treated with corticosteroid and methotrexate. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 Jun. doi: 10.1111/jdv.12512.
6. Sugiura K, Haruna K, Suga Y, Akiyama M. Generalized pustular psoriasis caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014 Dec;28(12):1835-6.
7. Sugiura K, Uchiyama R, Okuyama R, Akiyama M. Varicella zoster virus-induced generalized pustular psoriasis in a baby with heterozygous *IL36RN* mutation. *J Am Acad Dermatol* 2014 Nov;71(5):e216-8.
8. 杉浦一充, 秋山真志. 遺伝性の炎症性角化症. 別冊Bio Clinica, 慢性炎症と疾患 皮膚における炎症性疾患 2014年11月;3(2):104-8.
9. Sugiura K, Suga Y, Akiyama M. Dorfman-Chanarin syndrome without mental retardation caused by a homozygous *ABHD5* splice site mutation that skips exon 6. *J Dermatol Sci* 2014 Sep;75(3):199-201.
10. Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Solitary organizing pneumonia in systemic sclerosis mimicking lung adenocarcinoma. *Arthritis Rheumatol* 2014 Sep;66(9):2648.
11. Sugiura K, Oiso N, Inuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida-Yamamoto A, Kawada A, Iizuka H, Akiyama M. *IL36RN* Mutations Underlie Impetigo Herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2014 Sep;134(9):2472-4.
12. Tanahashi K, Sugiura K, Asagoe K, Aoyama Y, Iwatsuki K, Akiyama M. Novel TGM1 missense mutation p.Arg727Gln in β -barrel 2 domain in a case of self-healing collodion baby. *Acta Derm Venereol* 2014 Sep;94(5):589-90.
13. Sugiura K, Muto M, Akiyama M. *CARD14* c.526G>C (p.Asp176His) is a Significant Risk Factor for Generalized Pustular Psoriasis with Psoriasis Vulgaris in the Japanese Cohort. *J Invest Dermatol* 2014 Jun;134:1755-7.
14. Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Annular erythema associated with Sjögren's syndrome preceding overlap syndrome of rheumatoid arthritis and polymyositis with anti-PL-12 autoantibodies. *Acta Derm Venereol* 2014 Jun;94(4):470-1.
15. Sugiura K, Hasegawa Y, Shimoyama Y, Hashizume H, Akiyama M. Symmetrical giant facial plaque-type juvenile xanthogranuloma persisting beyond 10 years of age. *Acta Derm Venereol* 2014 Jun;94(4):465-6.
16. Sugiura K. The genetic background of generalized pustular psoriasis: *IL36RN* mutations and *CARD14* gain-of-function variants. *J Dermatol Sci* 2014 Jun;74(3): 187-92.
17. Yanagishita T, Sugiura K, Kawamoto Y, Ito K, Marubashi Y, Taguchi N, Akiyama M, Watanabe D. A case of Björnstad syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the *BCS1L* gene. *Br J Dermatol*

2014 Apr;170(4):970-3.

1. 学会発表
 1. 杉浦一充. Biomarkers for generalized pustular psoriasis and related disease. (ワークショップ). 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 20 日 名古屋国際会議場
 2. 杉浦一充, 小川靖, 梅澤明弘. IL-36RN 欠損症としての膿疱性乾癬に対する革新的医薬品の開発に向けた病態解明と診療 (診断及び治療) ガイドラインの作成. 平成 26 年度厚生労働科学特別研究事業 進捗管理班 (難治性疾患実用化研究・腎疾患実用化研究・慢性の痛み解明研究) 成果報告会 2015 年 3 月 13 日 東京コンベンションホール
 3. Sugiura K, Oiso N, Iinuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida- Yamamoto A, Akira Kawada A, Iizuka H, Masahiko Muto, Akiyama M. *IL36RN* mutations underlie impetigo herpetiformis and *CARD14* c.526G>C is a risk factor for pustular psoriasis with psoriasis vulgaris. 日本研究皮膚科学会第 39 回年次学術大会・総会 2014 年 12 月 13 日 ホテル阪急エキスポパーク
 4. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の免疫遺伝学(モーニングセミナー). 第 44 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2014 年 11 月 23 日 仙台国際センター
 5. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の病態と治療. 平成 26 年度(第 34 回)難病講習会 2014 年 11 月 5 日 愛知県医師会館
 6. 杉浦一充. 遺伝性の炎症性角化症: *IL36RN* 遺伝子と *CARD14* 遺伝子 (特別講演). 第 6 回高知乾癬フォーラム 2014 年 10 月 25 日 ザ クラウンパレス新阪急高知
 7. 杉浦一充. 乾癬の免疫遺伝学的病態について(モーニングセミナー). 第 42 回日本臨床免疫学会総会 2014 年 9 月 26 日 京王プラザホテル
 8. 杉浦一充. 汎発性膿疱性乾癬の病因遺伝子 (シンポジウム). 第 29 回日本乾癬学会学術大会 2014 年 9 月 19 日 高知市文化プラザかるぽーと
 9. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の新知見(特別講演). 第 12 回遠州皮膚科医会 2014 年 9 月 17 日 オークラアクトシティホテル浜松
 10. 杉浦一充. 意外な遺伝性皮膚疾患 (教育講演). 第 113 回日本皮膚科学会総会 2014 年 5 月 30 日 国立京都国際会館
 11. 杉浦一充. 膿疱性乾癬の責任遺伝子 (教育講演). 第 113 回日本皮膚科学会総会 2014 年 5 月 30 日 国立京都国際会館
- A. 知的財産権の出願・登録状況
 1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。