

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（業務項目）

膿疱性乾癬のターゲットリシーケンスによる未知変異同定

担当責任者 梅澤 明弘 国立成育医療研所センター研究所副所長

研究要旨

本研究の目的は、膿疱性乾癬の新たな病因の解明である。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。しかし、*IL36RN*遺伝子以外の病因遺伝子は解明されていなかった。本研究では新たな病因遺伝子を解明し、さらなる膿疱性乾癬の病因の解明を目的とした。*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*遺伝子を発見し報告した。膿疱性乾癬の病因・病態の解明むけて新規病因遺伝子の同定などの成果を得たさらなる新規病因遺伝子の探索を続けていく。

A. 研究目的

本研究の目的は、膿疱性乾癬の新たな病因の解明である。

汎発性膿疱性乾癬に対する病因解明に関する研究は、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。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、*IL36RN*遺伝子以外の病因遺伝子は解明されていなかった。本研究では新たな病因遺伝子を解明し、さらなる膿疱性乾癬の病因の解明を目的とした。

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。

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GPPについて、次世代シーケンサーで解析をした。

(倫理面への配慮)

全エクソームシーケンス法については、名古屋大学医学部と国立成育医療研究センター研究所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。

C. 研究結果

ターゲットリシーケンシング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。

D. 考察

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

膿疱性乾癬の病因・病態の解明むけて新規病因遺伝子の同定などの成果を得たさらなる新規病因遺伝子の探索を続けていく。

G. 研究発表

1.論文発表

1. 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.
2. 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.

2.学会発表

なし。

H. 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。
2. その他
なし。

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（業務項目）

DITRAモデルマウスの作成

担当責任者 小川 靖 名古屋大学医学部附属病院助教

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。

A.研究目的

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。上記のことを明らかにするためには、*Il1f5* ノックアウトマウスの作成と DITRA モデルマウスの作成が必要である。本年度はこれらのマウスの作成を目的とした。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

Il1f5^{+/+}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。

その他の成果

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。

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・病態の解明に向けて、順調に研究は進んでいる。

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。

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に成功した。病態解明と前臨床研究を進めていく。

G.研究発表

1.論文発表

1. 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.

2. 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.

H.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。

III. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「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」

機関名 名古屋大学、国立成育医療研所センター研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Biomarkers for generalized pustular psoriasis and related disease（口頭）	杉浦一充	名古屋国際会議場（第88回日本薬理学会年会）	2015年3月20日	国内
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（ポスター）	杉浦一充、小川靖、梅澤明弘	東京コンベンションホール（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）	2015年3月13日	国内
<i>IL36RN</i> mutations underlie impetigo herpetiformis and <i>CARD14</i> c.526G>C is a risk factor for pustular psoriasis with psoriasis vulgaris（口頭）	Sugiura K, Oiso N, Iinuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida-Yamamoto A, Akira Kawada A, Iizuka H, Muto M, Akiyama M	ホテル阪急エキスポパーク（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	国内
膿疱性乾癬の免疫遺伝学（口頭）	杉浦一充	仙台国際センター（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	国内
膿疱性乾癬の病態と治療（口頭）	杉浦一充	愛知県医師会館（平成26年度（第34回）難病講習会）	2014年11月5日	国内
遺伝性の炎症性角化症： <i>IL36RN</i> 遺伝子と <i>CARD14</i> 遺伝子（口頭）	杉浦一充	ザ クラウンパレス新阪急高知（第6回高知乾癬フォーラム）	2014年10月25日	国内
乾癬の免疫遺伝学的病態について（口頭）	杉浦一充	京王プラザホテル（第42回日本臨床免疫学会総会）	2014年9月26日	国内
汎発性膿疱性乾癬の病因遺伝子（口頭）	杉浦一充	高知市文化プラザかるぼーと（第29回日本乾癬学会学術大会）	2014年9月19日	国内
膿疱性乾癬の新知見（口頭）	杉浦一充	オークラアクトシティホテル浜松（第12回遠州皮膚科医会）	2014年9月17日	国内
意外な遺伝性皮膚疾患（口頭）	杉浦一充	国立京都国際会館	2014年5月30日	国内
膿疱性乾癬の責任遺伝子（口頭）	杉浦一充	国立京都国際会館	2014年5月30日	国内

様式第 19

学会等発表実績

委託業務題目「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」

機関名 名古屋大学、国立成育医療研所センター研究所

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
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	Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama N, Ito N, Sakabe JI, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y	Br J Dermatol	2015. Jan doi: 10.1111/bjd.13 590.	国外
Acute generalized exanthematous pustulosis caused by dihydrocodeine phosphate in a psoriasis vulgaris patient with a heterozygous <i>IL36RN</i> mutation	Nakai N, Sugiura K, Akiyama M, Kato N	JAMA Dermatol	2015 Mar;151(3):311 -5.	国外
Darier' s Disease: A novel ATP2A2 missense mutation at one of the calcium-binding residues	Kaibuchi- Noda K, Sugiura K, Takeichi T, Miura S, Kagami S, Takama H, Hino H, Akiyama M	Acta Derm Venereol	2015 Mar;95(3):362- 3	国外
A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples	Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N	Lab Invest	2015 Jan;95 (1):4-13.	国外
Successful treatment with infliximab of sibling cases with generalized pustular psoriasis caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist	Sugiura K, Endo K, Akasaka T, Akiyama M	J Eur Acad Dermatol Venereol	2014 Jun. doi: 10.1111/jdv.12 590.	国外
Disappearance of circulating autoantibodies to RNA polymerase III in a patient with systemic sclerosis successfully treated with corticosteroid and methotrexate	Tanahashi K, Sugiura K, Muro Y, Akiyama M	J Eur Acad Dermatol Venereol	2014 Jun. doi: 10.1111/jdv.12 512.	国外

Generalized pustular psoriasis caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis	Sugiura K, Haruna K, Suga Y, Akiyama M	J Eur Acad Dermatol Venereol	2014 Dec;28(12):1835-6.	国外
Varicella zoster virus-induced generalized pustular psoriasis in a baby with heterozygous IL36RN mutation	Sugiura K, Uchiyama R, Okuyama R, Akiyama M	J Am Acad Dermatol	2014 Nov;71(5):e216-8.	国外
遺伝性の炎症性角化症	杉浦一充, 秋山真志	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.	国内
A palindromic motif in the -2084 to -2078 upstream region is essential for ABCA12 promoter function in cultured human keratinocytes	Shimizu Y, Ogawa Y, Sugiura K, Takeda J, Sakai-Sawada K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H, Akiyama M	Sci Rep	2014 Oct;4:6737.	国外
Dorfman-Chanarin syndrome without mental retardation caused by a homozygous ABHD5 splice site mutation that skips exon 6	Sugiura K, Suga Y, Akiyama M	J Dermatol Sci	2014 Sep;75(3):199-201	国外
Solitary organizing pneumonia in systemic sclerosis mimicking lung adenocarcinoma	Sugiura K, Muro Y, Akiyama M	Arthritis Rheumatol	2014 Sep;66(9):2648	国外
<i>IL36RN</i> Mutations Underlie Impetigo Herpetiformis	Sugiura K, Oiso N, Inuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida-Yamamoto A, Kawada A, Iizuka H, Akiyama M	J Invest Dermatol	2014 Sep;134(9):2472-4.	国外

Novel <i>TGM1</i> missense mutation p.Arg727Gln in β -barrel 2 domain in a case of self-healing collodion baby	Tanahashi K, Sugiura K, Asagoe K, Aoyama Y, Iwatsuki K, Akiyama M	Acta Derm Venereol	2014 Sep;94 (5) :589-90.	国外
<i>CARD14</i> c.526G>C (p.Asp176His) is a Significant Risk Factor for Generalized Pustular Psoriasis with Psoriasis Vulgaris in the Japanese Cohort	Sugiura K, Muto M, Akiyama M	J Invest Dermatol	2014 Jun;134:1755-7.	国外
Annular erythema associated with Sjögren's syndrome preceding overlap syndrome of rheumatoid arthritis and polymyositis with anti-PL-12 autoantibodies	Sugiura K, Muro Y, Akiyama M	Acta Derm Venereol	2014 Jun;94 (4) :470-1.	国外
Symmetrical giant facial plaque-type juvenile xanthogranuloma persisting beyond 10 years of age	Sugiura K, Hasegawa Y, Shimoyama Y, Hashizume H, Akiyama M	Acta Derm Venereol	2014 Jun;94 (4) :465-6.	国外
The genetic background of generalized pustular psoriasis: <i>IL36RN</i> mutations and <i>CARD14</i> gain-of-function variants	Sugiura K	J Dermatol Sci	2014 Jun;74 (3) :187-92.	国外
Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability	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	Sci Rep	2014 Jun;4:5421.	国外

<p>Revertant Mutation Releases Confined Lethal Mutation, Opening Pandora's Box: A Novel Genetic Pathogenesis</p>	<p>Ogawa Y, Takeichi T, Kono M, Hamajima N, Yamamoto T, Sugiura K, Akiyama M.</p>	<p>PLoS Genet</p>	<p>2014 May;10(5):e1004276.</p>	<p>国外</p>
<p>A case of Björnstad syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the BCS1L gene</p>	<p>Yanagishita T, Sugiura K, Kawamoto Y, Ito K, Marubashi Y, Taguchi N, Akiyama M, Watanabe D</p>	<p>Br J Dermatol</p>	<p>2014 Apr;170(4):970-3.</p>	<p>国外</p>

IV. 研究成果の刊行物・別刷

These articles have been accepted for publication in the *British Journal of Dermatology* and are currently being edited and typeset. Readers should note that articles published below have been fully refereed, but have not been through the copy-editing and proof correction process. Wiley-Blackwell and the British Association of Dermatologists cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these articles; nor do the views and opinions expressed necessarily reflect those of Wiley-Blackwell or the British Association of Dermatologists

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Received Date : 09-Aug-2014

Revised Date : 12-Nov-2014

Accepted Date : 22-Nov-2014

Article type : Correspondence

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

T. Ito,^{1*} M. Aoshima,^{1*} K. Sugiura,² T. Fujiyama,¹ N. Ito,¹ J.I. Sakabe,¹ M. Akiyama,² M. Maekawa,³ Y. Tokura¹

Departments of ¹Dermatology and ³Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine. 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan

²Department of Dermatology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Correspondence to: Taisuke Ito

Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine

1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Tel: +81-435-2303; Fax: +81-435-2368; E-mail: itoutai@hama-med.ac.jp

*These authors contributed equally to this work.

Key words: LDH M-subunit deficiency, pustular psoriasis, LDH

DEAR EDITOR, Lactate dehydrogenase (LDH) is a key enzyme that catalyzes interconversion of pyruvate and lactate in the final step of anaerobic glycolysis and is present in almost all cells.

It exists as five isozymes composed of tetramers with two different subunits of H (heart) and M (muscle).¹ The isozymes composed mainly of the M subunit (LDH4 and LDH5) are predominant in tissues that undergo anaerobic metabolism such as the skin, liver, and muscle.

LDH M-subunit deficiency, first reported in two Japanese families,² is characterized by fatigability and myalgia with myoglobinuria and high creatine kinase (CK) after strenuous exercise. The diagnosis of LDH M-subunit deficiency is usually based on the electrophoretic pattern of LDH that shows only the band of LDH1. Erythematous skin lesions were first documented,³ and several types of eruptions have been reported thereafter, such as desquamating erythematous lesions⁴ and annular erythematous plaques with desquamating borders.⁵ Here, we report two patients of LDH M-subunit deficiency with generalized pustular psoriasis (GPP) like lesions including immunological aspects in the

This article is protected by copyright. All rights reserved.

long-term follow-ups. One of them (case 2) is the identical patient previously reported by Yoshikuni *et al.* in 1986.³

Case 1. A 64-year-old man was initially referred to us in October 2006 for evaluation of annular erythematous plaques (Fig. 1a) with pustules on the peripheries (Fig. 1b). He had suffered from asymptomatic scaly papules and erythematous patches on the elbows and knees since childhood with exacerbations in summer. Laboratory tests revealed an increased a moderately elevated AST (70 U/l; normal, 10-35 U/l) and ALT (79 U/l; normal, 5-40 U/l). The electrophoretic pattern of LDH showed 100% LDH1 and 0% LDH2–LDH5. Skin biopsy taken from abdominal skin showed a subcorneal infiltrate of neutrophils in the psoriasiform epidermis with spongiform pustules of Kogoj like pattern (Fig. 1c). He had been treated intermittently with oral cyclosporine at 3.5 mg/kg/day and with topical corticosteroid and calcipotriol for 3 years. In order to avoid the adverse effects of cyclosporine, the cessation period of cyclosporine treatment was supposed during this treatment. However, his pustular lesions got worsen. Therefore, intravenous infliximab at 5 mg/kg was followed that showed marked therapeutic effectiveness.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Case 2. A 50-year-old woman had suffered from small follicular erythematous papules with scales and large desquamating erythematous plaques on the elbows and legs since early childhood with myalgia after exercise (Fig. 1d).³ At the age of 56, pustules emerged on large desquamating erythematous plaques (Fig. 1e). A skin biopsy revealed spongiform pustules of Kogoj and a lymphocytic infiltrate in the upper dermis (Fig. 1f).

Genomic DNA was prepared from peripheral blood with written informed consent in the two cases. Seven fragments containing 7 exons and exon-intron junctions were amplified and subjected to direct DNA sequencing for *LDHA* gene. Exon 6 of the *LDHA* gene showed a 20 bp deletion in both cases, which is the most common mutation in LDH M-subunit deficiency (Fig. 2a), resulting in frame shift and premature termination. Six of 8 patients who suffered from LDH-M subunit deficiency analyzed in Japan had the same mutation (Table S1).

Intracytoplasmic cytokine expression was analyzed in case 1. Peripheral blood mononuclear cells collected upon appearance of pustules were stained with mouse monoclonal antibodies to human IL-17A, IL-22, and interferon (IFN)- γ (BD Bioscience,

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Franklin Lakes, NJ), as reported previously.⁶ Since CD4 expression on T cells is downregulated with the stimulants, Th17 cells were expressed as IL-17A⁺CD3⁺ and IL-17A⁺CD8⁻ cells. The percentages of IL-17A⁺CD8⁻ T cells and IL-22⁺CD8⁻ T cells were 23.2% (Fig. 2b; normal, 0.4%) and 15.4% (Fig. 2c; normal, <1%), respectively. Even in a comparison with drug eruptions,⁶ which show high frequencies of Th17 cells, the percentage of Th17 cells in this case was extremely high.

IL-8 is a well-known chemokine for neutrophil, and chemerin attracts plasmacytoid dendritic cells in relation to the pathogenesis of psoriasis.⁷ In case 2, the serum levels of IL-8 (Fig. 2d; $P = 0.022$) and chemerin (Fig. 2e, $P = 0.015$) were significantly higher than those in healthy subjects (n=3) as assessed by ELISA.

Recent study revealed that majority of GPP alone is caused by deficiency of the interleukin-36 receptor antagonist (IL-36RN) due to *IL36RN* mutations.⁸ Our cases showed no mutation of *IL-36RN*.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

LDH catalyzes interconversion of pyruvate and lactate in the final step of anaerobic glycolysis.⁹ Therefore, the lack of LDH activity might affect the keratinocyte metabolism *via* impaired ATP production in the anaerobic stage. Recent studies revealed that physical and chemical damage induce the extracellular release of ATP, followed by production of cytokines and chemokines.¹⁰ In association with this change, keratinocytes might release various psoriatic pathogenic factors, such as IL-8, cathelicidin LL-37 and vascular endothelial growth factor. Moreover, inflammatory and/or plasmacytoid dendritic cells can be stimulated to produce IL-23 or tumor necrosis factor- α , and IFN- α , respectively.⁷ It is possible that these alterations induce pustular lesions in the patient with LDH M-subunit deficiency. Our study suggests that abnormal LDH activity is involved in the pathogenesis of GPP.

REFERENCES

1. Uitto J, Turto H, Lindy S. A assay of lactate dehydrogenase in human skin: total activity and isoenzyme composition. *Clin Chim Acta* 1972; 36: 43-50.
2. Kanno T, Sudo K, Takeuchi I, Kanda S, Honda N, Nishimura Y, Oyama K. Hereditary deficiency of lactate dehydrogenase M-subunit. *Clin Chim Acta* 1980; 180: 267–276.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

3. Yoshikuni K, Tagami H, Yamada M, Sudo K, Kanno T. Erythematous skin lesions in hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency. *Arch Dermatol* 1986; 122: 1420–1424.
4. Takayasu S, Fujiwara S, Waki T. Hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: lactate dehydrogenase activity in skin lesions and in hair follicles. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 339–342.
5. Nazzari G, Crovato F. Annually recurring acroerythema and hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 262–263.
6. Fujiyama T, Kawakami C, Sugita K, Kubo-Kabashima R, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Shimauchi T, Ito T, Kabashima K, Hashizume H, Tokura Y. Increased frequencies of Th17 cells in drug eruptions. *J Dermatol Sci* 2014; 73: 85–88.
7. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 2007; 109: 3625-3632.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

8. Sugiura K, Takemoto A, Yamaguchi M, 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: 2514-2521.
9. Kanno T, Sudo K, Kitamura M, Miwa S, Ichiyama A, Nishimura Y. Lactate dehydrogenase A-subunit and B-subunit deficiencies: comparison of the physiological roles of LDH isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1983; 7: 131–150.
10. Dixon CJ, Bowler WB, Littlewood-Evans A, Dillon JP, Bilbe G, Sharpe GR. Regulation of epidermal homeostasis through P2Y2 receptors. *Br J Pharm* 1999; 127: 1680-1686.

Figure legends

Fig. 1 (a and b) Case 1: erythematous plaques with pustules on the trunk and extremities. (c)

Case 1: biopsy specimen, showing subcorneal infiltration of neutrophils (spongiform pustules of Kogoj) in a psoriasiform epidermis with perivascular infiltration of lymphocytes and a few neutrophils in the dermis. (d) Case 2: initial skin lesions, showing small follicular erythematous papules with scales and large desquamating erythematous plaques on her elbows and legs. (e) Case 2: skin lesions at the age of 56, which spread to the lower extremities with pustules. (f). Case 2: biopsy specimen, showing subcorneal infiltration of neutrophils (spongiform pustules of Kogoj) and lymphocyte infiltration in the upper dermis.