

201126009B

厚生労働省科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成  
および発症機序の解明

平成 21 年度～ 23 年度 総合研究報告書

平成 24 (2012) 年 3 月

研究代表者 阿 部 理一郎



厚生労働科学研究費補助金  
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成  
および発症機序の解明

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

平成 24 (2012) 年 3 月

研究代表者 阿部理一郎

# 目 次

I. 班員構成 .....	1
II. 総合研究報告	
患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成および発症機序の解明···	3
研究代表者 阿部理一郎（北海道大学）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	7
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	21

## I. 班員構成

## I 班員構成

研究者名		研究実施場所	職名	主な研究分担
研究代表者	阿部理一郎	北海道大学 大学院医学研究科 皮膚科	准教授	研究の総括、患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの皮膚症状の解析および早期診断のための血清マーカー検索
研究分担者	尾崎 倫孝	北海道大学 大学院医学研究科 分子制御外科	教授	患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの肝症状の解析
	北市 信義	北海道大学 大学院医学研究科 眼科	客員准教授	患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの眼症状の解析

## II. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
総合研究報告書

患者末梢血を用いた重症薬疹モデルマウスの作成および発症機序の解明

研究代表者 阿部理一郎 北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 准教授

**研究要旨** 本研究の目的は、時に致死性の疾患で、重篤な後遺症を残す重症薬疹（中毒性表皮壊死症、Stevens-Johnson 症候群）のモデルマウスを作成・樹立し、さらに重症薬疹の発症機序を解明することである。重症薬疹患者末梢血を、同患者皮膚移植をした免疫不全マウスに静注し、経時的に原因薬剤を経口投与することで、重症薬疹と類似する症状（結膜の浮腫および出血、結膜・角膜上皮のアポトーシス）を惹起することに成功した。

さらに早期診断のための血清マーカーを同定し、迅速診断キットの作成に成功した。

**研究分担者**

尾崎 倫孝（北海道大学大学院医学研究科分子制御外科教授）

北市 信義（北海道大学大学院医学研究科眼科客員准教授）

**A. 研究目的**

本研究の目的は、重症薬疹モデルマウスを作成・樹立し、さらに重症薬疹の発症機序を解明することである。

重症薬疹（中毒性表皮壊死症、Stevens-Johnson 症候群）は時に致死性の疾患であり、加えて重篤な後遺症を残す。特に TEN はいまだ致死率が 20-30%と高率であり、SJS においては失明または重度の視力障害を残す。また肝障害も高率に合併する。重症薬疹の発症機序についてはいまだ不明なことが多いが、それは適切なモデルマウスがなく、具体的な *in vivo* における研究が行えないためである。よって、重症薬疹モデルの作成は逼迫した必要性がある。

これまでに報告されている重症薬疹モデルマウスは、たとえば表皮細胞に外来タンパクを発現させた遺伝子改変マウスにそのタンパク特異的反応リンパ球を移入するモデルなどがあつた。しかし、これらは実際ヒト生体における薬疹発症機序とは多くの点で異なっていた。本研究課題で作成するモデルマウスは、治癒した重症薬疹患者から末梢血単核球を採取し、免疫不全マウス（NOG マウス）に静注し、その後連日薬疹原因薬剤を経口投与することにより重症薬疹を発症させる。このようにヒトにおける薬疹発症機序と極めて同一の反応が惹起されるので、真の意味でのモデルマウスとなる。

重症薬疹のモデルマウスとして適切であるか、皮膚症状、粘膜症状、眼症状および肝障害が類似するかを詳細に検討し、適切なモデルを確立する。さらに、それぞれの症例ごとに静注細胞数、薬剤投与量などを検討し、安定

したモデルマウスを作成する。さらにこの重症薬疹モデルマウスを用いて、発症機序におけるリンパ球サブセットやサイトカインの関与について検討し、病態解明を行う。

一方、重症薬疹の臨床的問題点の一つとして、水疱・びらん、または粘膜炎出現以前では、通常の薬疹との鑑別が非常に困難であることが挙げられる。そのため適切な治療開始が遅れ、結果として重篤な後遺症を残し、致死率の上昇につながると考えられる。我々はこれまで、水疱・びらん、または粘膜炎出現前に sFasL は上昇し、その後速やかに低下する (Murata, Abe. J Allergy Clin Immunol 2008., Abe, Am J Pathol 2003) ことを報告してきた。本研究において sFasL 以外の早期診断マーカーも同定し、迅速診断テストを開発する。

これまで、重症患者末梢血細胞静注と経口原因薬剤投与した免疫不全マウスにおいて、重症薬疹、特に Stevens-Johnson 症候群 (SJS) に非常に類似した症状および組織所見を得ることができ、SJS モデルマウス作成に成功した。また、重症薬疹発症早期に特異的に上昇する granulysin の迅速測定キットの作成にも成功した (Abe. Ann Intern Med 2009., Fujita, Abe, J Am Acad Dermatol 2011)。

## B. 研究方法

### 1) 重症薬疹モデルマウスの作成

マウスについて：免疫不全マウス (NOG マウス) は T 細胞、B 細胞に加え NK 細胞も欠損し、特にヒト細胞に対して免疫反応を起こしにくい特徴を持つ。重症薬疹患者について：現在

当病院には 10 名以上のすでに治癒した重症薬疹患者が定期通院し、その多くは原因薬剤を同定しており、例数を多く検討できる状況である。

研究計画：NOG マウス (週令 6 週) に、すでに治癒している重症薬疹患者の末梢血単核球を尾静脈から静注する ( $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  個)。静注当日から連日患者それぞれの原因薬剤を経口的にマウスに投与する。投与は 1 週間、2 週間、3 週間、死亡までをそれぞれ行う。投与中以下の項目を経時的に解析する。他覚所見 (皮膚症状、粘膜症状、眼症状、体重)、末梢血 FACS 解析 (血液像、T 細胞サブセットなど)、生化学検査 (肝酵素など)。さらにそれぞれの観察期間終了後、皮膚・眼・肝臓などの組織を採取し、病理組織 (HE 染色)、免疫組織染色 (TUNEL 含む) を行う。

さらに、よりヒト疾患病態に近い重症薬疹モデルマウス作成を行う。免疫不全マウス (NOG) に、すでに治癒している重症薬疹患者の皮膚を移植し、正着後、同患者の末梢血単核球を同マウスに静注し、さらに連日原因薬剤を経口的にマウスに投与する。臨床所見、末梢血 FACS 解析、皮膚病理組織、免疫組織染色を行う。

### 2) 重症薬疹早期診断のための血清マーカー検索

これまで我々は早期診断マーカーとなりうる granulysin を同定した。さらにイムノクロマト法を用いて、granulysin の迅速測定キットの作成に成功した。本年度においては、引き続き実際の臨床における有効性を検討するために多施設において、重症薬疹への進展が予想される薬疹患者、または通常の薬疹患者において測定を



行う。

## C. 研究結果

### 1) 重症薬疹モデルマウスの作成

我々は NOG マウスに健常人末梢血単核球を静注すると約 3 週以降に末梢血中にヒト血球の増加が始まり約 6～7 週間後に GVHD により死亡することを確認した。そのため、GVHD の反応を起こす前の期間 (3 週以前) に解析を行った。

患者末梢血単核球を NOG マウスに静注し、原因薬剤投与群、非投与群とで比較検討した。非投与群および投与群の血中のヒト CD45 陽性細胞の増加は 2 週間まではともに非常にわずかであったが、マウス末梢血細胞を用いた薬剤特異的細胞の活性化検討において、投与群マウスのみ薬剤特異的細胞増殖がみられた。

臨床症状として薬剤投与 10 日目以降眼症状 (結膜下出血、眼瞼炎症) が肉眼的に確認できたが、非投与群ではみられなかった。一方皮膚においては、淡い紅斑は認めたが顕著な皮膚症状はみられなかった。病理組織所見 (HE 染色) では原因薬剤投与群の皮膚には有意な所見はみられなかったが、眼部、特に結膜に著明な浮腫が認められた。しかし投与群の皮膚において、表皮細胞のアポトーシス (TUNEL 陽性) の顕著な増加はみられなかった。加えて肝臓においては、多数のヒト細胞の浸潤に加え、多くの肝細胞のアポトーシスが見られた。重症薬疹において肝機能障害をきたす頻度は高く、ヒト疾患と一致した所見と考えた。

また同モデルマウスの結膜病変部にはヒト由来細胞の浸潤がほとんどみられなかった。一方 GVHR を生じた

マウスの結膜には主に CD8 陽性である、多数のヒト細胞の浸潤がみられた。このことから本モデルにおける結膜上皮のアポトーシスは直接的なヒト細胞の interaction ではなく、おそらくは液性因子により惹起されると考えられた。実際、アポトーシス誘導因子の一つである granulysin を新生仔マウスに投与すると、結膜上皮にのみアポトーシスが生じた。

さらにヒト疾患病態に近い重症薬疹モデルマウスの作成を行った。患者皮膚を NOG マウスに移植し生着後、患者末梢血単核球を静注し、経口的に原因薬剤を投与した。同マウスにおいて、移植部に一部淡褐色が見られた。組織学的にも同部位に表皮細胞のアポトーシスが確認できた。一方健常人の皮膚および末梢血単核球を用いたマウスでは非常にわずかのアポトーシスしかみられなかった。さらに TUNEL および caspase-3 染色でアポトーシスを確認した。加えて植皮部において、ヒト CD4 および CD8 細胞の浸潤を認めたが、浸潤の程度は比較的軽度であった。

以上から本モデルマウスは重症薬疹、特に Stevens-Johnson 症候群に非常に類似した臨床症状を呈すると思われる。

### 2) 重症薬疹早期診断のための血清マーカー検索

我々はこれまで sFasL 以外に TNF $\alpha$ 、IL-6、IFN $\gamma$ 、sCD40L などを検討したが、通常薬疹との鑑別でき、かつ早期重症薬疹で上昇するものはなかった。一方、最近アポトーシス誘導蛋白の一つである granulysin は重症薬疹において病変形成に関与することが報告された。我々は重症薬疹患者血清中の

granulysin 濃度を測定したところ、水疱・びらん、または粘膜疹出現の4～2日前に80%の患者において有意に上昇し、その後速やかに減少傾向を示した。一方通常薬疹では94%の患者で正常域であった。以上から sFasL と同様に重症薬疹早期診断に有用であることを見出した (Abe, Ann Intern Med 2009)。加えて granulysin の正常上限は10ng/ml と sFasL に比べ100倍の濃度であり、迅速判定テストの作成が可能と考え検討を開始している。

現在15施設において、重症薬疹を疑わせる症例に対して実際の検査を行なっている施設が蓄積中である。

#### D. 考察

患者皮膚を用いた重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。今後の問題点、検討課題として、1) 実際のヒト重症薬疹病態との差異を明確にする。マウスを用いているためすべてにおいて免疫反応を含めた病態を模倣することは困難である。今後のモデルマウス活用の際に際しての利点を明らかにする。2) 同モデルを用いて、重症薬疹特異的現象が生じているか詳細に確認する。通常薬疹患者サンプルを用いた植皮モデルとの比較を行う。さらに本研究で検討している granulysin の発現なども検討する。

さらに本研究課題での結果から、特にマウス結膜は液性因子により誘導されるアポトーシスに対して、ほかの表皮などの細胞に比べ感受性が高いことが予想される。これは一部のSJS

患者では眼症状しか生じないこと、また皮膚にくらべ眼症状が重篤である症例も多いこと、からマウスのみならずヒトにおいても同様のことが予想される。今後結膜上皮と表皮とのアポトーシス感受性の際について検討を行う。

一方早期診断テストに関しては免疫クロマトグラフィーを用いた granulysin 判定テストをさらに実施施設を増やし臨床検討を引き続き行う。

#### E. 結語

本研究で早期診断判定テストの多施設における有用性の検討を行い、加えてモデルマウスを用いた重症薬疹病態解明を行った。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特許：特願 2009-140830 「重症薬疹易罹患性診断用マーカー、重症薬疹易罹患性の診断方法および重症薬疹易罹患性診断用キット」

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌）

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Saito N, <b>Abe R</b> , Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Shimizu H	Prolonged elevation of serum granulysin in drug-induced hypersensitivity syndrome.	<b>Br J Dermatol</b>			in press
Hirata Y, <b>Abe R</b> , Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H	Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapsone.	<b>Eur J Dermatol</b>			in press
Fujita Y, Inokuma D, <b>Abe R</b> , Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H	Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors.	<b>Clin Exp Dermatol</b>			in press
Hayashi I, <b>Abe R</b> , Yanagi T, Abe Y, Shimizu H	Yellow nail syndrome: Nail change reflects disease severity.	<b>J Dermatol</b>	39	415-6	2012
Kikuchi K, <b>Abe R</b> , Shinkuma S, Hamasaka E, Natsuga K, Hata H, Tateishi Y, Shibata M, Tomita Y, Abe Y, Aoyagi S, Mukai M, Shimizu H	Spontaneous remission of solitary-type infantile myofibromatosis.	<b>Case Rep Dermatol</b>	3	181-5	2011
Fujita Y, Yoshioka N, <b>Abe R</b> , Murata J, Hoshina D,	Rapid immunochromatographic test for serum granulysin is useful for the	<b>J Am Acad Dermatol</b>	65	65-8	2011

Mae H, Shimizu H	prediction of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis.				
Yoshihisa Y, Makino T, Matsunaga K, Honda A, Norisugi O, <b>Abe R</b> , Shimizu H, Shimizu T	Macrophage migration inhibitory factor is essential for eosinophil recruitment in allergen-induced skin inflammation.	<b>J Invest Dermatol</b>	131	925-31	2011
Funakoshi T, Yamashita K, Ichikawa N, Fukai M, Suzuki T, Goto R, Oura T, Kobayashi N, Katsurada T, Ichihara S, <b>Ozaki M</b> , Umezawa K, Todo S	A novel NF- $\kappa$ B inhibitor, dehydroxymethylepoxy quinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice.	<b>J Crohns Colitis</b>	6	215-25	2012
Kamiyama T, Takahashi M, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Kobayashi N, <b>Ozaki M</b> , Todo S	$\alpha$ -fetoprotein, vascular endothelial growth factor receptor-1 and early recurrence of hepatoma.	<b>World J Gastroenterol.</b>	28; 18	340-8	2012
Shibasaki S, Yamashita K, Goto R, Oura T, Wakayama K, Hirokata G,	NK026680 inhibits T-cell function in an IL-2-dependent manner and prolongs cardiac allograft survival in rats.	<b>Transpl Immunol</b>	26	42-9	2012

Shibata T, Igarashi R, Haga S, <b><u>Ozaki M</u></b> , Todo S					
Einama T, Kamachi H, Nishihara H, Homma S, Kanno H, Takahashi K, Sasaki A, Tahara M, Okada K, Muraoka S, Kamiyama T, Matsuno Y, <b><u>Ozaki M</u></b> , Todo S	Co-expression of mesothelin and CA125 correlates with unfavorable patient outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma.	<b>Pancreas</b>	40	1276-82	2011
Takeiri M, Tachibana M, Kaneda A, Ito A, Ishikawa Y, Nishiyama S, Goto R, Yamashita K, Shibasaki S, Hirokata G, <b><u>Ozaki M</u></b> , Todo S, Umezawa K.	Inhibition of macrophage activation and suppression of graft rejection by DTCM-glutarimide, a novel piperidine derived from the antibiotic 9-methylstreptimidone.	<b>Inflamm Res</b>	60	879-88	2011
Mino K, <b><u>Ozaki M</u></b> , Nakanishi K, Haga S, Sato M, Kina M, Takahashi M,	Inhibition of nuclear factor-kappaB suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer by blocking cancer cell adhesion.	<b>Cancer Sci</b>	102	1052-8	2011



Takahashi N, Kataoka A, Yanagihara K, Ochiya T, Kamiyama T, Umezawa K, Todo S.					
Lennikov A, <b><u>Kitaichi N,</u></b> Fukase R, Murata M, Noda K, Ando R, Ohguchi T, Kawakita T, Ohno S, Ishida S.	Amelioration of ultraviolet-induced photokeratitis in mice treated with astaxanthin eye drops.	<b>Mol Vis</b>	18	455-64	2012
Horie Y, Meguro A, <b><u>Kitaichi N,</u></b> Lee EB, Kanda A, Noda K, Song YW, Park KS, Namba K, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ishida S, Ohno S	Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behcet's disease in a Korean population.	<b>Rheumatology</b>			in press
Iwata D, Namba K, Mizuuchi K, <b><u>Kitaichi N,</u></b> Kase S, Takemoto Y, Ohno S, Ishida S	Correlation between elevation of serum antinuclear antibody titer and decreased therapeutic efficacy in the treatment of Behçet's disease with infliximab.	<b>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.</b>			in press
Jin XH, Aoki K, <b><u>Kitaichi N,</u></b>	Genome variability of human adenovirus type 8	<b>Mol Vis.</b>	17	3121-7	2011

Ariga T, Ishida S, Ohno S	causing epidemic keratoconjunctivitis during 1986-2003 in Japan.				
Saito M, Yoshida K, Saito W, Fujiya A, Ohgami K, <b><u>Kitaichi N</u></b> , Tsukahara H, Ishida S, Ohno S.	Astaxanthin increases choroidal blood flow velocity.	<b>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol</b>	250	239-45.	2012
Kaneko H, Aoki K, Ishida S, Ohno S, <b><u>Kitaichi N</u></b> , Ishiko H, Fujimoto T, Ikeda Y, Nakamura M, Gonzalez G, Koyanagi KO, Watanabe H, Suzutani T.	Recombination analysis of intermediate human adenovirus type 53 in Japan by complete genome sequence.	<b>J Gen Virol</b>	92	1251-9	2011
Horie Y, Saito W, <b><u>Kitaichi N</u></b> , Miura T, Ishida S, Ohno S.	Evaluation of NLRP1 gene polymorphisms in Vogt-Koyanagi-Harada disease.	<b>Jpn J Ophthalmol.</b>	55	57-61	2011
Ando R, Kase S, Ohashi T, Dong Z, Fukuhara J, Kanda A, Murata M,	Tissue factor expression in human pterygium.	<b>Mol Vis.</b>	17	63-9.	2011

Noda K, <b><u>Kitaichi N,</u></b> Ishida S.					
Fujita Y, <b><u>Abe R,</u></b> Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H	Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice.	<b>Proc Natl Acad Sci USA</b>	107	14345-50	2010
<b><u>Abe R,</u></b> Yamagishi SI, Fujita Y, Hoshina D, Sasaki M, Nakamura K, Matsui T, Shimizu T, Bucala R, Shimizu H	Topical application of anti-angiogenic peptides based on pigment epithelium-derived factor can improve psoriasis	<b>J Dermatol Sci</b>	57	183-91	2010
Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, <b><u>Abe R,</u></b> Ito K, Nakamura H, Ujii H,	Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis.	<b>Hum Mutat</b>	31	602-10	2010

Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H					
Hamasaka A, Yoshioka N, <b>Abe R</b> , Kishino S, Umezawa K, Ozaki M, Todo S, Shimizu H	Topical application of dehydroxymethylepoxyquinomicin improves allergic inflammation via NF-kappaB inhibition.	<b>J Allergy Clin Immunol</b>	126	400-3	2010
Nomura Y, Akiyama M, Nomura T, Nemoto-Hasebe I, <b>Abe R</b> , McLean WH, Shimizu H	Chromosome 11q13.5 variant: No association with atopic eczema in the Japanese population.	<b>J Dermatol Sci</b>	59	210-2	2010
Osawa R, Konno S, Akiyama M, Nemoto-Hasebe I, Nomura T, Nomura Y, <b>Abe R</b> , Sandilands A, McLean WH, Hizawa N, Nishimura M, Shimizu H	Japanese-Specific Filaggrin Gene Mutations in Japanese Patients Suffering from Atopic Eczema and Asthma.	<b>J Invest Dermatol</b>	130	2834-6	2010
Iitani MM, <b>Abe R</b> , Yanagi T,	Aleukemic leukemia cutis with extensive bone involvement.	<b>J Am Acad Dermatol</b>	63	539-41	2010

Hamasaka A, Tateishi Y, Abe Y, Ito M, Kondo T, Kubota K, Shimizu H.					
Takahashi T, Matsumoto S, Matsushita M, Kamachi H, Tsuruga Y, Kasai H, Watanabe M, <b><u>Ozaki M,</u></b> Furukawa H, Umezawa K, Todo S	Donor pretreatment with DHMEQ improves islet transplantation.	<b>J Surg Res</b>	163	e23-34	2010
Tomioka N, Morita K, Kobayashi N Tada M, Itoh T, Saitoh S, Kondo M, Takahashi N, Kataoka A, Nakanishi K, Takahashi M, Kamiyama T, <b><u>Ozaki M,</u></b> Hirano T, Todo S.	Array comparative genomic hybridization analysis revealed four genomic prognostic biomarkers for primary gastric cancers.	<b>Cancer Genet Cytogenet</b>	201	6-14	2010
Kaneko H, Suzutani T, Aoki K, <b><u>Kitaichi N,</u></b> Ishida S,	Epidemiological and virological features of epidemic keratoconjunctivitis due to new human adenovirus	<b>Br J Ophthalmol</b>	95	32-6	2010

Ishiko H, Ohashi T, Okamoto S, Nakagawa H, Hinokuma R, Asato Y, Oniki S, Hashimoto T, Iida T, Ohno S.	type 54 in Japan.				
Iwata D, Kitamura M, <b><u>Kitaichi N</u></b> , Saito Y, Kon S, Namba K, Morimoto J, Ebihara A, Kitamei H, Yposhida K, Ishida S, Ohno S, Uede T, Onoe K, Iwabuchi K.	Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA.	<b>Exp Eye Res</b>	90	41-8	2010
Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB, <b><u>Kitaichi N</u></b> ,	Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci.	<b>Nat Genet</b>	42	703-6	2010