

201207013A

厚生労働省科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（創薬バイオマーカー探索研究事業）

重症薬疹の病態解明および発症予測、
重症度予測マーカーの検索

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

平成 25（2013）年 3 月

研究代表者 阿 部 理一郎

厚生労働省科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（創薬バイオマーカー探索研究事業）

重症薬疹の病態解明および発症予測、
重症度予測マーカーの検索

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

平成 25（2013）年 3 月

研究代表者 阿 部 理一郎

目 次

I. 総括研究報告

- 重症薬疹の病態解明および発症予測、重症度予測マーカーの検索 …… 1
研究代表者 阿部理一郎（北海道大学）

II. 分担研究報告

1. 重症薬疹の病態解明および発症予測、重症度予測マーカーの検索 …… 5
研究代表者 阿部理一郎（北海道大学）
分担研究者 藤原道夫（アステラス製薬株）
分担研究者 串間清司（同上）
2. 重症薬疹における B 細胞分画の解析 …… 8
分担研究者 片山一朗（大阪大学）
3. 薬疹における皮膚浸潤 T 細胞の解析 …… 11
分担研究者 戸倉新樹（浜松医科大学）
研究補助者 藤山俊晴（同上）
4. 重症薬疹の病態解明および発症予測、重症度予測マーカーの検索 …… 15
分担研究者 秋山真志（名古屋大学）
研究補助者 松本高明（同上）
5. 重症薬疹患者の T 細胞受容体レパートリー解析 …… 20
分担研究者 小豆澤宏明（大阪大学）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 37

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (創薬バイオマーカー探索研究事業))
総括研究報告書

重症薬疹の病態解明および発症予測、重症度予測マーカーの検索
代表研究者 阿部理一郎 北海道大学医学研究科皮膚科 准教授

研究要旨 重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS) は時に致死性疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。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。特に重症薬疹のモデル動物がなく、研究のほとんどが患者サンプルを用いてしか行えず、病態解明が進んでいない。最近我々は重症薬疹患者末梢血を免疫不全マウスに静注することによって重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。

一方、重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかし最近我々は本症発症における表皮細胞死はアポトーシス以外のメカニズムによって生じることを明らかにした。

さらに包括的検討として、薬疹患者の末梢血単核球を用いて B 細胞分画の解析とともに、遺伝子導入によるトランスジェニックマウスで樹立しえた TEN の動物モデルをもとに、従来注目されてきた薬剤特異的 T 細胞の誘導メカニズムのみならず、それを抑制している regulatory T cell の重要性についても検討した。さらに種々の薬疹において皮膚に浸潤した T 細胞の形質とサイトカイン産生などの機能を解析した。

研究分担者

片山一朗 (大阪大学・医学系研究科・分子病態医学皮膚科学 教授)

戸倉新樹 (浜松医科大学医学部・皮膚科学 教授)

秋山真志 (名古屋大学・大学院医学系研究科・皮膚病態学分野 教授)

小豆澤宏明 (大阪大学・医学系研究科・分子病態医学皮膚科学 助教)

藤原道夫 (アステラス製薬 (株)・安全性研究所 室長)

串間清司 (アステラス製薬 (株)・安全性研究所 主任研究員)

A. 研究目的

重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS) は時に致死性疾患であり、高率に眼障害などの重篤な

後遺症を残す。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。特に重症薬疹のモデル動物がなく、研究のほとんどが患者サンプルを用いてしか行えず、病態解明が進んでいない。最近我々は重症薬疹患者末梢血を免疫不全マウスに静注することによって重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。

一方、重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかしその詳細は未だ不明な点が多い。

本研究課題において、重症薬疹モデルマウス、患者サンプルあるいは TG-GATEs を用いて病態発症のメカニズムを解明し、新規の早期診断および治療法の開発に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

これまでの重症薬疹発症機序に対する研究では、薬剤特異的 cytotoxic T cell が表皮細胞死を誘導することから、重症薬疹で引き起こされる表皮細胞死は apoptosis であるとされてきた。しかし、実際の患者由来表皮細胞を用いた検討はほとんどみられない。本研究課題において、重症薬疹患者からの培養表皮細胞に、同患者の末梢血単核球 (PBMC) を原因薬剤で刺激した培養の上清を添加することで、表皮細胞死が生じるか観察する。同様に通常薬疹患者の培養表皮細胞、PBMC においても検討する。原因薬剤で刺激された重症薬疹患者 PBMC の培養上清が、重症薬疹患者のみならず、健常人由来表皮細胞の細胞死を誘導するならば、重症薬疹患者 PBMC の培養上清中に細胞死を誘導する液性因子が含まれていることを示唆する。一方重症薬疹患者由来表皮細胞は、重症薬疹患者 PBMC の培養上清のみならず、通常薬疹患者 PBMC 培養上清添加にても細胞死を誘導されるのであれば、重症薬疹患者表皮細胞に細胞死感受性の高い特徴があることが示唆される。

その他、TG-GATEs を活用して重症薬疹の発症に関連する遺伝子変動を解析していくために、TG-GATEs に収集されている薬剤リストを整理し、SJS あるいは TEN の発症頻度の高い薬剤のリストアップを行う。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、試料提供者に危害を加える可能性は皆無であるが、研究の目的と概要を詳細に説明し、北海道大学医学研究科医の倫理委員会にて承認を得た。試料提供者からは本委員会で検討、承認された説明文書に準じて、同意を得た上で試料を採取・収集した。

C. 研究結果

表皮細胞は重症薬疹患者 (SJS) または健常人から採取し培養した。培養上清は SJS および通常薬疹 PBMC から得て、それぞれの組み合わせで添加し、細胞死を観察した (右図)。SJS 表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添

加にて細胞死が誘導された。しかし予想に反して健常人表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添加にて細胞死は誘導されなかった。さらに SJS 表皮細胞は通常薬疹 PBMC 培養上清添加では細胞死は誘導されなかった。以上の結果から重症薬疹の表皮細胞死には、PBMC から産生される液性因子と、表皮細胞の細胞死感受性がいずれも不可欠であると考えられる。

現在、SJS-PBMC および通常薬疹 PBMC の培養上清を質量分析にて比較し、細胞死誘導液性因子の同定を行っている。また SJS ならびに健常人表皮細胞を microarray にて解析し、細胞感受性を規定する因子の同定も行っている。加えて、TG-GATEs に収集されている SJS, TEN の報告が多い薬剤についても共通して変動する遺伝子の抽出を開始した。

・薬疹患者の末梢血単核球を用いて B 細胞分画の解析：播種状紅斑丘疹型 2 例、多形紅斑型 3 例、SJS 疑い 1 例、TEN 1 例、DIHS 疑い 5 例について、末梢血単核球の保存と血清保存をおこなった。本年度は DIHS の診断基準をほぼ満たす患者においてヒトヘルペスウイルス 6 型 IgG 抗体価の有意な上昇をみとめる症例はなかった。凍結末梢血単核球のうち、B 細胞の細胞分画を染色する蛍光抗体の組み合わせについて検討し、染色パターンを確立した。

・モデルマウスを用いた regulatory T cell の検討：OT-I 細胞が認識する SIINFEKL および改変ペプチドリガンドを OT-I 細胞に添加し、培養することで細胞分裂がみられることは、確認できたが、インターフェロンの産生を検出する方法については検討が必要であった。

凍結末梢血単核球から、磁気ビーズを用いて CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を精製し、mRNA を抽出後、cDNA を作成した。これを用いて T 細胞レパートリーを解析するため、CDR3 スペクトロタイピングを行っている。

薬疹において皮膚に浸潤した T 細胞の形質とサイトカイン産生などの機能の解析：浮腫性紅斑を主徴とした DIHS では、CD4 陽性 T 細胞が優位であるのに対して、浸出性紅斑を主徴とした多型紅斑型の薬疹では CD8 陽性 T 細胞が優位であった。統計学的有意差はなかったが、DHIS の皮膚浸潤 T 細胞は多型紅斑型薬疹の皮膚浸潤 T 細胞に比して IL-4 をはじめとした Th2 サイトカインを多く分泌していた。Th1、Th17 サイトカインの分泌においては、両群に明らかな差は認められなかった。

DIHS の皮膚浸潤 T 細胞は健常人の末梢血より分離した T 細胞と比較して高率に CLA、CCR10 といった皮膚に親和性を示す分子を発現していた。また DIHS 患者由来皮膚浸潤 T 細胞は CCR7 も高率に発現していた。

DIHS、多型紅斑型共に一部の症例では、皮膚浸潤 T 細胞が大量の IL-17 を産生しており、特に DHIS では、皮疹出現 10-20 日前後に皮膚生検を施行した症例で多くの IL-17 が産生されていた。

D. 考察

本研究の成果から、重症薬疹モデルマウスを用いて治療法効果を検討することができ、モデルマウス病変部の解析で発症メカニズムを明らかにすることができた。特に表皮細胞死において疾患特異的な現象が起こることはこれまで全く報告もなく、極めて画期的知見である。この細胞死のメカニズムを解明できれば、発症誘導する遺伝的背景の存在が予想されることから発症予見因子を明らかにすることも期待できる。さらに細胞死の機序の一部を阻害することで新規治療法の開発が可能になる。

その他、TG-GATEs の解析からは、患者サンプルのデータと比較することで有用な発症マーカーを得られると考える。

さらに包括的検討の成果を、TG-GATEs の解析に対して応用する。

E. 結論

新規に開発した重症薬疹モデルマウスは様々な病態解析に加え、治療研究などに用

いることもでき、臨床への応用が期待できる。

重症薬疹における新規の細胞のメカニズムは、重症薬疹特異的治療法の開発に直接結び付くと期待される。さらに重症薬疹 j の発症因子としても応用できることが予想される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業(創薬バイオマーカー探索研究事業))
分担研究報告書

重症薬疹の病態解明および発症予測、重症度予測マーカーの検索
代表研究者 阿部理一郎 北海道大学医学研究科皮膚科 准教授
分担研究者 藤原道夫 アステラス製薬株式会社安全性研究所 室長
分担研究者 串間清司 アステラス製薬株式会社安全性研究所 主任研究員

研究要旨 重症薬疹(中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS)は時に致死性疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。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。特に重症薬疹のモデル動物がなく、研究のほとんどが患者サンプルを用いてしか行えず、病態解明が進んでいない。最近我々は重症薬疹患者末梢血を免疫不全マウスに静注することによって重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。

一方、重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかし最近我々は本症発症における表皮細胞死はアポトーシス以外のメカニズムによって生じることを明らかにした。

A. 研究目的

重症薬疹(中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS)は時に致死性疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。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。特に重症薬疹のモデル動物がなく、研究のほとんどが患者サンプルを用いてしか行えず、病態解明が進んでいない。最近我々は重症薬疹患者末梢血を免疫不全マウスに静注することによって重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。

一方、重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかしその詳細は未だ不明な点が多い。

本研究課題において、重症薬疹モデルマウス、患者サンプルあるいはTG-GATEsを用いて病態発症のメカニズムを解明し、新規の早期診断および治療法の開発に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

これまでの重症薬疹発症機序に対する研究では、薬剤特異的 cytotoxic T cell が表皮細胞死を誘導することから、重症薬疹で引き起こされる表皮細胞死は apoptosis であるとされてきた。しかし、実際の患者由来表皮細胞を用いた検討はほとんどみられない。本研究課題において、重症薬疹患者からの培養表皮細胞に、同患者の末梢血単核球(PBMC)を原因薬剤で刺激した培養の上清を添加することで、表皮細胞死が生じるか観察する。同様に通常薬疹患者の培養表皮細胞、PBMC においても検討する。原因薬剤で刺激された重症薬疹患者 PBMC の培養上清が、重症薬疹患者のみならず、健常人由来表皮細胞の細胞死を誘導するならば、重症薬疹患者 PBMC の培養上清中に細胞死を誘導する液性因子が含まれていることを示唆する。一方重症薬疹患者由来表皮細胞は、重症薬疹患者 PBMC の培養上清のみならず、通常薬疹患者 PBMC 培養上清添加にても細胞死を誘導されるのであれば、重症薬疹

患者表皮細胞に細胞死感受性の高い特徴があることが示唆される。

その他、TG-GATEs を活用して重症薬疹の発症に関連する遺伝子変動を解析していくために、TG-GATEs に収集されている薬剤リストを整理し、SJS あるいは TEN の発症頻度の高い薬剤のリストアップを行う。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、試料提供者に危害を加える可能性は皆無であるが、研究の目的と概要を詳細に説明し、北海道大学医学研究科医の倫理委員会にて承認を得た。試料提供者からは本委員会で検討、承認された説明文書に準じて、同意を得た上で試料を採取・収集した。

C. 研究結果

表皮細胞は重症薬疹患者 (SJS) または健常人から採取し培養した。培養上清は SJS および通常薬疹 PBMC から得て、それぞれの組み合わせで添加し、細胞死を観察した (右図)。SJS 表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添加にて細胞死が誘導された。しかし予想に反して健常人表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添加にて細胞死は誘導されなかった。さらに SJS 表皮細胞は通常薬疹 PBMC 培養上清添加では細胞死は誘導されなかった。以上の結果から重症薬疹の表皮細胞死には、PBMC から産生される液性因子と、表皮細胞の細胞死感受性がいずれも不可欠であると考えられる。

現在、SJS-PBMC および通常薬疹 PBMC の培養上清を質量分析にて比較し、細胞死誘導液性因子の同定を行っている。また SJS ならびに健常人表皮細胞を microarray にて解析し、細胞感受性を規定する因子の同定も行っている。加えて、TG-GATEs に収集されている SJS, TEN の報告が多い薬剤についても共通して変動する遺伝子の抽出を開始した。

D. 考察

本研究の成果から、重症薬疹モデルマウ

スを用いて治療法効果を検討することができ、モデルマウス病変部の解析で発症メカニズムを明らかにすることができた。特に表皮細胞死において疾患特異的な現象が起こることはこれまで全く報告もなく、極めて画期的知見である。この細胞死のメカニズムを解明できれば、発症誘導する遺伝的背景の存在が予想されることから発症予見因子を明らかにすることも期待できる。さらに細胞死の機序の一部を阻害することで新規治療法の開発が可能になる。

その他、TG-GATEs の解析からは、患者サンプルのデータと比較することで有用な発症マーカーを得られるかもしれない。

E. 結論

新規に開発した重症薬疹モデルマウスは様々な病態解析に加え、治療研究などに用いることもでき、臨床への応用が期待できる。

重症薬疹における新規の細胞のメカニズムは、重症薬疹特異的治療法の開発に直接結び付くと期待される。さらに重症薬疹 j の発症因子としても応用できることが予想される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
1. Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H. Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. Clin Exp Dermatol 37:658-64. 2012.
2. Saito N, Abe R, Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Shimizu H. Prolonged elevation of serum granulysin in drug-induced hypersensitivity syndrome. Brit J Dermatol 167:452-3. 2012.
3. Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R,

Akiyama M, Shimizu H.

The $\beta 9$ loop domain of PA-PLA1 α has a crucial role in autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis.

J Invest Dermatol 132:2093-5. 2012.

4. Nomura Y, Nomura T, Sakai K, Sasaki K, Ohguchi Y, Mizuno O, Hata H, Aoyagi S, Abe R, Itaya Y, Akiyama M, Shimizu H.

A novel splice site mutation in NCSTN underlies a Japanese family with hidradenitis suppurativa.

Br J Dermatol 168:206-9. 2013.

5. Saito N, Yoshioka N, Abe R, Qiao H, Fujita Y, Hoshina D, Suto A, Kase S, Kitaichi N, Ozaki M, Shimizu H.

Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients.

J Allergy Clin Immunol 131:434-441. 2013.

6. Hoshina D, Abe R, Yoshioka N, Saito N, Hata H, Fujita Y, Aoyagi S, Shimizu H.

Role of VEGF signaling in angiosarcoma: newly established experimental model and VEGF-targeting therapeutic experiment.

J Dermatol Sci. in press

2. 学会発表

1. Abe R. Production of SJS/TEN model mice using patients samples. The 5th International Drug Hypersensitivity Meeting, Munich, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (創薬バイオマーカー探索研究事業))
分担研究報告書

重症薬疹における B 細胞分画の解析

分担研究者 片山一郎 大阪大学大学院医学研究科皮膚科 教授

研究要旨 Stevens-Johnson 症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN) や薬剤性過敏症症候群 (DIHS) などの重症薬疹は、薬剤特異的 CD8 陽性 T 細胞の活性化がおこると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。DIHS では、ヒトヘルペスウイルス 6 型の活性化がおこり、IgG の低下がみられることから B 細胞の機能にも影響があることが示唆される。それだけではなく、DIHS においては、発症後数ヶ月で糖尿病や自己免疫性甲状腺炎といった自己免疫疾患を発症することが知られ、薬疹がきっかけで、B 細胞が関連する免疫異常が誘導されるのではないかと考えられる。そこで我々は、これまでに凍結保存した薬疹患者の末梢血単核球を用いて B 細胞分画の解析を行っている。

A. 研究目的

重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS、薬剤性過敏症症候群: DIHS) は、ときに生命を脅かす重篤な疾患であるが、発症機序についていまだ不明な部分が多い。遅延型過敏反応が関与する薬疹では、とくに SJS や TEN では T 細胞により表皮障害が引き起こされると考えられている。一方、DIHS では、ヒトヘルペスウイルス 6 型の活性化がおこり、IgG の低下がみられることから B 細胞の機能にも影響があることが示唆される。DIHS の病態は、薬剤アレルギーによる病態と再活性化したヒトヘルペスウイルス (ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6)、7 (HHV-7)、サイトメガロウイルス (CMV)) による病態が複合したものであることが特徴である。通常の薬剤アレルギーでは、原因薬剤の中止後、比較的速やかに病態が終息することが多いが、DIHS では皮疹や肝障害などの症状が 2 峰性あるいは 3 峰性にみられ、発症から 2-6 週間程度遷延した状態となる。それだけでなく 1 型糖尿病や自己免疫甲状腺疾患、さらには発症後 1 年以上経過してから全身性エリテマトーデスや全身性強皮症

などの自己免疫疾患を発症する症例があり、薬剤投与がきっかけでウイルスの再活性化や自己免疫反応という免疫の変調がおこる病態と考えられている。以上の点から重症薬疹、とくに DIHS において B 細胞の細胞分画の変化、その機能の解析することで、発症機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

重症薬疹患者の末梢血を採取し、末梢血単核球を分離し、凍結保存を行った。同時に血清保存をおこなった。

凍結末梢血単核球を B 細胞表面マーカーで染色することで細胞分画について解析をおこなった。ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞、その他の少数の B 細胞を CD20、CD27、CD43 などの抗体で染色した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、試料提供者に、研究の目的と概要を詳細に説明し、大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会にて承認を得た。試料提供者からは本委員会で検討、承認された説明文書に準じて、同意を得た上で試料を採取・収集する。

C. 研究結果

播種状紅斑丘疹型 2 例、多形紅斑型 3 例、SJS 疑い 1 例、TEN 1 例、DIHS 疑い 5 例について、末梢血単核球の保存と血清保存をおこなった。本年度は DIHS の診断基準をほぼ満たす患者においてヒトヘルペスウイルス 6 型 IgG 抗体価の有意な上昇をみとめる症例はなかった。凍結末梢血単核球のうち、B 細胞の細胞分画を染色する蛍光抗体の組み合わせについて検討し、染色パターンを確立した。

D. 考察

薬疹の病態には、T 細胞免疫の関与が重要であるため、その解析を中心に研究が行われてきたが、薬疹が自己免疫疾患発症のきっかけになることは、薬疹のみならず、自己免疫疾患の発症機序を解明するうえでも大変意義があり、B 細胞機能の解析は重要と考えられる。ヘルペスウイルスの再活性化においても、ウイルスに対する抗体産生が、誘導されており、それが、自己抗体の産生とどのようにかかわるのか、興味深い。B 細胞には、IL-10 の産生により、T 細胞免疫を抑制する制御性 B 細胞があり、それらについても検討を行う必要があると考える。

E. 結論

薬疹がおこるメカニズムとして T 細胞の関与が臨床研究から明らかとなっているが、薬剤によって T 細胞が活性化し、皮膚障害性を誘導すると同時に、自己免疫疾患が誘導される免疫異常を起こしていることから、B 細胞の解析は薬疹の発症機序を考える上で貴重な情報をもたらすと考える。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 片山一朗 薬疹・中毒疹の最近の話題
薬疹を疑う臨床症状、検査成績の診か

たとえ方 日本臨床皮膚科医会雑誌
29巻6号 778-781 2012

2. Yamaoka T, Azukizawa H, Tanemura A, Murota H, Hirose T, Hayakawa K, Shimazu T, Wada N, Morii E, Katayama I. Toxic epidermal necrolysis complicated by sepsis, haemophagocytic syndrome, and severe liver dysfunction associated with elevated interleukin-10 production. *Eur J Dermatol.* 2012 Nov-Dec;22(6):815-7.
3. Hanafusa T, Azukizawa H, Matsumura S, Murakami Y, Tanaka A, Kurachi K, Katayama I. Non-pigmenting fixed drug eruption caused by an over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory drug: drug-specific CD8+ T lymphocytes identified in peripheral blood. *Eur J Dermatol.* 2012 Sep-Oct;22(5):680-2.

学会発表

1. 中山 育徳, 中野 真由子, 山岡 俊文, 小豆澤 宏明, 種村 篤, 玉井 克人, 片山 一朗, 古賀 浩嗣, 橋本 隆, 三浦 宏之, 崎元 和子 呼吸困難と急激な体重減少を伴い、腫瘍随伴性天疱瘡が疑われた、抗デスモコリン1、2、3IgG 抗体陽性の粘膜型水疱症の1例 大阪地方会 5月19日大阪
2. 原 伸輔, 山本 智也, 門脇 裕子, 竹上 学, 大石 雅子, 三輪 芳弘, 小豆澤 宏明, 種村 篤, 片山 一朗, 黒川 信夫がん化学療法に伴う手足症候群に関する実態調査 日本薬学会 3月28日 札幌。
3. 横見 明典, 種村 篤, 小豆澤 宏明, 片山 一朗 TNF α 阻害薬により誘発されたと考えられる乾癬、掌蹠膿疱症の4例 日本皮膚科学会総会 6月1日 京都
4. Hiroaki Azukizawa, Takaaki Hanafusa, Noriko Arase, Ichiro Katayama

Erythema multiforme induced by
sorafenib Drug hypersensitivity
meeting, 4月14日 ミュンヘン

5. 小豆澤 宏明、横見 明典、谷 守、
室田 浩之、片山 一郎 パクリタキ
セル投与中にみられた顔面紅斑の2例
日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会
総会 7月14日 甲府

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (創薬バイオマーカー探索研究事業))
分担研究報告書

薬疹における皮膚浸潤 T 細胞の解析

分担研究者 戸倉新樹 浜松医科大学皮膚科 教授
研究補助者 藤山俊晴 浜松医科大学皮膚科 助教

研究要旨 重症薬疹(中毒性表皮壊融解死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS、薬剤性過敏症症候群: DIHS) は時に致死の疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。重症薬疹の発症機序についてはいまだ不明な点が多いが、多くの症例で皮膚には T 細胞を中心とした、白血球が浸潤している。我々の施設では組織に浸潤した T 細胞を、培養し解析する手法を開発した。本手法を用いて、種々の薬疹において皮膚に浸潤した T 細胞の形質とサイトカイン産生などの機能を解析した。

A. 研究目的

重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS)、薬剤性過敏症症候群 (Drug induced hypersensitivity syndrome; DIHS) は時に致死の疾患であり、時に後遺症を残す。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、通常病変部の皮膚には T 細胞を中心とした炎症細胞浸潤がみられる。我々の施設では、皮膚に浸潤した T 細胞を培養し解析する手技を確立し、様々な皮膚疾患で組織に浸潤した T 細胞の機能を解析している。本法を用いて、様々な病型、重症度の薬疹の症例で解析することで、組織浸潤 T 細胞の形質や機能と重症薬疹の関連性を明らかにし、病態解明と早期診断につながる予後不良因子を見出す。

B. 研究方法

様々なタイプの薬疹の患者で診断用に採取した皮膚生検組織の一部を、IL-2 および CD3/CD28 抗体存在下に刺激・培養し、解析に十分な数の皮膚浸潤 T 細胞を得た。得られた T 細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。また、得られた細胞を CD3 抗体で刺激し、培養上清中の Th1、

Th2、Th17 サイトカイン量を CBA にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、試料提供者に危害を加える可能性は皆無であるが、研究の目的と概要を詳細に説明し、浜松医科大学医の倫理委員会にて承認を得た。試料提供者からは本委員会にて検討、承認された説明文書に準じて、同意を得た上で試料を採取・収集した。

C. 研究結果

浮腫性紅斑を主徴とした DIHS では、CD4 陽性 T 細胞が優位であるのに対して、浸出性紅斑を主徴とした多型紅斑型の薬疹では CD8 陽性 T 細胞が優位であった。統計学的有意差はなかったが、DIHS の皮膚浸潤 T 細胞は多型紅斑型薬疹の皮膚浸潤 T 細胞に比して IL-4 をはじめとした Th2 サイトカインを多く分泌していた。Th1、Th17 サイトカインの分泌においては、両群に明らかな差は認められなかった。

DIHS の皮膚浸潤 T 細胞は健常人の末梢血より分離した T 細胞と比較して高率に CLA、CCR10 といった皮膚に親和性を示す分子を

発現していた。また DIHS 患者由来皮膚浸潤 T 細胞は CCR7 も高率に発現していた。

DIHS、多型紅斑型共に一部の症例では、皮膚浸潤 T 細胞が大量の IL-17 を産生しており、特に DIHS では、皮疹出現 10-20 日前後に皮膚生検を施行した症例で多くの IL-17 が産生されていた。

D. 考察

DIHS と多型紅斑型薬疹ではそれぞれ Th2、細胞障害性 T 細胞が多く浸潤しており、その T 細胞の動態の違いが、各薬疹における皮疹の臨床的特徴と関連している可能性が考えられた。また、DIHS においては特定の時期に Th17 細胞が皮膚に多く浸潤してきていると考えている。

E. 結論

薬疹の病型により、皮膚浸潤 T 細胞のフェノタイプ・機能は異なっており、そのパターンを詳細に検討することで、重症薬疹の発症予測や重症度予測マーカーとなりうる可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 総説

1. Sugaya M, Hamada T, Kawai K, Yonekura K, Ohtsuka M, Shimauchi T, Tokura Y, Nozaki K, Izutsu K, Suzuki R, Setoyama M, Nagatani T, Koga H, Tani M, Iwatsuki K. Guidelines for the management of cutaneous lymphomas (2011): A consensus statement by the Japanese Skin Cancer Society - Lymphoma Study Group. *J Dermatol* 40: 2-14, 2013.
2. Bito T, Sawada Y, Tokura Y: Pathogenesis of cholinergic urticaria in relation to sweating. *Allergol Int* 61: 539-544, 2012.
3. Fujiyama T, Tokura Y: Clinical and histopathological differential diagnosis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Dermatol* (in

press).

原著

1. Sawada Y, Shimauchi T, Hama K, Yoshioka H, Ohmori S, Yamada S, Tajiri M, Kubo-Kabashima R, Yoshioka M, Sugita K, Yoshiki R, Hino R, Kobayashi M, Izu K, Nakamura M, Tokura Y: Combination of skin-directed therapy and oral etoposide for smoldering adult T-cell leukemia/lymphoma with skin involvement. *Leuk Lymphoma* 54: 520-527, 2013.
2. Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y: CXCL10 produced from hair follicles induces infiltrates of Th1 and Tc1 cells in the acute phase of alopecia areata followed by sustained accumulation of Tc1 cells in the chronic phase. *J Dermatol Sci* 69: 140-147, 2013.
3. Ito T, Shimomura Y, Farooq M, Suzuki N, Sakabe J-I, Tokura Y: Trichorhinophalangeal syndrome with low expression of TRPS1 on hair follicles. *J Dermatol* (in press).
4. Hiroike M, Sakabe JI, Kobayashi M, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Inoh A, Tokura Y: Acicular, but not globular, titanium dioxide nanoparticles stimulate keratinocytes to produce pro-inflammatory cytokines. *J Dermatol* (in press).
5. Takigawa M, Tokura Y, Shimada S, Furukawa F, Noguchi N, Ito T, The Acne Study Group: Clinical and bacteriological evaluation of adapalene 0.1% gel plus nadifloxacin 1% cream versus adapalene 0.1% gel in patients with acne vulgaris. *J Dermatol* (in press).
6. Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinishita S, Tokura Y, Katoh N: Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 181: 2217-2224, 2012.
7. Atarashi K, Takano M, Kato S, Kuma H,

Nakanishi M, Tokura Y: Addition of UVA-absorber butyl methoxy dibenzoylmethane to topical ketoprofen formulation reduces ketoprofen-photoallergic reaction. *J Photochem Photobiol* 113:56-62, 2012.

8. Fukamizu H, Fujiwara M, Kim T, Matsushita Y, Tokura Y: Development of a Three-Microneedle Device for Hypodermic Drug Delivery and Clinical Application. *Plastic Reconstr Surgery* 130: 451-455, 2012.

9. Nagase H, Nakachi Y, Ishida K, Kiniwa M, Takeuchi S, Katayama I, Matsumoto Y, Furukawa F, Morizane S, Kaneko S, Tokura Y, Takenaka M, Hatano Y, Miyachi Y: IL-4 and IL-12 Polymorphisms are Associated with Response to Suplatast Tosilate, a Th2 Cytokine Inhibitor, in Patients with atopic Dermatitis. *Open Dermatol* 6: 42-50, 2012.

10. Sawada Y, Nakamura M, Kabashima-Kubo R, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Defective epidermal innate immunity and resultant superficial dermatophytosis in adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 18: 3772-3779, 2012.

11. Ohmori S, Hino R, Nakamura M, Tokura Y: Heparin serves as a natural stimulant of the inflammasome and exacerbates the symptoms of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Dermatol Sci* 66: 82-84, 2012

研究小報告 (レター)

1. Kasuya A, Moriki M, Tatsuno K, Hirakawa S, Tokura Y: Clearance Efficacy of Autoantibodies in Double Filtration Plasmapheresis for Pemphigus Foliaceus. *Acta Derm Venereol* 93: 181-215, 2013.

2. Shimauchi T, Yagi H, Sasada K, Kito Y, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: Characterization of malignant T-cell line established from a rare case of CD8+ CD56+ Sézary syndrome. *Br J Dermatol* 168: 885-887. 2013.

3. Sawada Y, Nakamura M, Kabashima-Kubo

R, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Defective epidermal induction of S100A7/psoriasis associated with low frequencies of skin-infiltrating Th17 cells in dermatophytosis-prone adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Immunol* (in press).

症例報告

1. Ito T, Shimada S, Mori T, Tokura Y: Alopecia areata possibly induced by autoimmune reaction in a patient with HTLV-I-associated myelopathy. *J Dermatol* (in press).

2. Yamaguchi H, Tatsuno K, Sakabe J, Tokura Y: Second report of FLG R501X mutation in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* (in press).

3. Ito T, Mori T, Fujiyama T, Tokura Y: Dramatic exacerbation of palmoplantar pustulosis following strongly positive nickel patch testing. *Int J Dermatol* (in press).

4. Kasuya A, Ikawa T, Hirakawa S, Hashizume H, Tokura Y: Granulocyte-colony stimulating factor-producing cutaneous anaplastic large cell lymphoma with cerebral metastasis. *Acta Derm Venereol* 93: 87-88, 2013.

5. Shimauchi T, Sasada K, Kito Y, Mori T, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: CD8+ Sezary syndrome with IL-22 production modulated by bacterial sepsis. *Br J Dermatol* 168: 881-883, 2013.

6. Umayahara T, Shimauchi T, Fujiyama T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: A pediatric case of acute generalized exanthematous pustulosis induced by acetaminophen with high serum levels of IL-8 and IL-22: *Acta Derm Venereol* (in press).

7. Ito T, Shimomura Y, Ogai M, Sakabe J-I, Tokura Y: Identification of a novel heterozygous mutation in the first Japanese case of Marie Unna hereditary hypotrichosis. *J Dermatol* 40: 278-280, 2013.

8. Majima Y, Yagi H, Tateishi C, Groth S, Schmidt E, Zillikens D, Koga H, Hashimoto T,

Tokura Y: A successful treatment with ustekinumab in a case of anti-laminin- γ 1 pemphigoid associated with psoriasis. Br J Dermatol (in press).

9. Ikeya S, Urano S, Sakabe J-I, Ito T, Tokura Y: Erythrokeratoderma variabilis: First Japanese case documenting GJB3 mutation. J Dermatol (in press).

10. Suzuki T, Moriki M, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Yokura Y: Subcutaneous granuloma annulare following influenza vaccination: Case report and review of the literature. Dermatologica Sinica (in press).

その他

1. Tokura Y. New Year Greetings. J Dermatol 40: 1, 2013.

2. 学会発表

1. Tokura Y: Mechanism of Photo-Allergic Contact Dermatitis from Ketoprofen 11th Congress of The European Society of Contact Dermatitis Malmo, Sweden, 2012.

2. Tokura Y: Innate immunity of the epidermis toward bacterial and fungal infection : lessons from Th17-dysregulated conditions. The 10th Symposium of the Cutaneous Biology Research Institute, Yonsei University College of Medicine. Seoul, Korea, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業 (創薬バイオマーカー探索研究事業))
分担研究報告書

重症薬疹の病態解明および発症予測、重症度予測マーカーの検索
代表分担者 秋山真志 名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚病態学分野 教授
研究補助者 松本高明 名古屋大学医学部附属病院 皮膚科 助教

研究要旨 重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS) は時に致死性疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。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。特に重症薬疹のモデル動物がなく、研究のほとんどが患者サンプルを用いてしか行えず、病態解明が進んでいない。最近我々は重症薬疹患者末梢血を免疫不全マウスに静注することによって重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。

一方、重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかし最近我々は本症発症における表皮細胞死はアポトーシス以外のメカニズムによって生じることを明らかにした。

A. 研究目的

重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS) は時に致死性疾患であり、高率に眼障害などの重篤な後遺症を残す。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。特に重症薬疹のモデル動物がなく、研究のほとんどが患者サンプルを用いてしか行えず、病態解明が進んでいない。最近我々は重症薬疹患者末梢血を免疫不全マウスに静注することによって重症薬疹モデルマウスの作成に成功した。

一方、重症薬疹発症における重要な現象の表皮細胞死の発生メカニズムについて、これまでアポトーシスによる細胞死であると考えられてきた。しかしその詳細は未だ不明な点が多い。

本研究課題において、重症薬疹モデルマウスおよび患者サンプルを用いて病態発症のメカニズムを解明し、新規の早期診断および治療法の開発に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

これまでの重症薬疹発症機序に対する研究では、薬剤特異的 cytotoxic T cell が表皮細胞死を誘導することから、重症薬疹で引き起こされる表皮細胞死は apoptosis であるとされてきた。しかし、実際の患者由来表皮細胞を用いた検討はほとんどみられない。本研究課題において、重症薬疹患者からの培養表皮細胞に、同患者の末梢血単核球 (PBMC) を原因薬剤で刺激した培養の上清を添加することで、表皮細胞死が生じるか観察する。同様に通常薬疹患者の培養表皮細胞、PBMC においても検討する。原因薬剤で刺激された重症薬疹患者 PBMC の培養上清が、重症薬疹患者のみならず、健常人由来表皮細胞の細胞死を誘導するならば、重症薬疹患者 PBMC の培養上清中に細胞死を誘導する液性因子が含まれていることを示唆する。一方重症薬疹患者由来表皮細胞は、重症薬疹患者 PBMC の培養上清のみならず、通常薬疹患者 PBMC 培養上清添加にても細胞死を誘導されるのであれば、重症薬疹患者表皮細胞に細胞死感受性の高い特徴が

あることが示唆される。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、試料提供者に危害を加える可能性は皆無であるが、研究の目的と概要を詳細に説明し、名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会にて承認を得た。試料提供者からは本委員会で検討、承認された説明文書に準じて、同意を得た上で試料を採取・収集した。

C. 研究結果

表皮細胞は重症薬疹患者 (SJS) または健康人から採取し培養した。培養上清は SJS および通常薬疹 PBMC から得て、それぞれの組み合わせで添加し、細胞死を観察した (右図)。SJS 表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添加にて細胞死が誘導された。しかし予想に反して健康人表皮細胞は SJS-PBMC 培養上清添加にて細胞死は誘導されなかった。さらに SJS 表皮細胞は通常薬疹 PBMC 培養上清添加では細胞死は誘導されなかった。以上の結果から重症薬疹の表皮細胞死には、PBMC から産生される液性因子と、表皮細胞の細胞死感受性がいずれも不可欠であると考えられる。

現在、SJS-PBMC および通常薬疹 PBMC の培養上清を質量分析にて比較し、細胞死誘導液性因子の同定を行っている。また SJS ならびに健康人表皮細胞を microarray にて解析し、細胞感受性を規定する因子の同定も行っている。

D. 考察

本研究の成果から、重症薬疹モデルマウスを用いて治療法効果を検討することができ、モデルマウス病変部の解析で発症メカニズムを明らかにすることができた。特に表皮細胞死において疾患特異的な現象が起こることはこれまで全く報告もなく、極めて画期的知見である。この細胞死のメカニズムを解明できれば、発症誘導する遺伝的背景の存在が予想されることから発症予見因子を明らかにすることも期待できる。さ

らに細胞死の機序の一部を阻害することで新規治療法の開発が可能になる。

E. 結論

新規に開発した重症薬疹モデルマウスは様々な病態解析に加え、治療研究などに用いることもでき、臨床への応用が期待できる。

重症薬疹における新規の細胞のメカニズムは、重症薬疹特異的治療法の開発に直接結び付くと期待される。さらに重症薬疹 j の発症因子としても応用できることが予想される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muro Y, Sugiura K, Hoshino K, **Akiyama M.**

Disappearance of anti-MDA-5 autoantibodies in clinically amyopathic dermatomyositis/interstitial lung disease during disease remission.

Rheumatology (Oxford) 51: 800-4, 2012.

2. Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, **Akiyama M.**, Shimizu H.

Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome.

Br J Dermatol 166: 903-5, 2012.

3. Yasuda K, Sugiura K, Ishikawa R, Kihira M, Negishi Y, Iwayama H, Ito K, Kimura H, Kosugi I, **Akiyama M.**

Perinatal cytomegalovirus-associated bullae in an immunocompetent infant.

Arch Dermatol 148: 770-2, 2012.

4. Sasaki K, **Akiyama M***, Yanagi T, Sakai K, Miyamura Y, Sato M, Shimizu H.

CYP4F22 is highly expressed at the site and onset of keratinization during human skin development.