

201407019A

厚生労働省科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 (2015) 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 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27（2015）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）

2. 重症薬疹における末梢血単核球が産生するサイトカインの検討 …… 8
分担研究者 片山一郎（大阪大学）

3. 重症薬疹の皮膚浸潤 T 細胞の薬剤反応性および
サイトカイン産生性の検討 …… 10
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. 重症薬疹における病期ごとの Th2 サイトカインの検討 …… 17
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 …… 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 31

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。

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(ネクロプトーシス)によって生じることを明らかにした。この細胞死は annexin A1/ formyl peptide receptor 1 の作用にて惹起されることも明らかにした。

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、および 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。

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、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された。一方通常薬疹患者の培養表皮細胞、PBMC においては生じなかった。原因薬剤で刺激された重症薬疹患者 PBMC の培養上清の細胞死を誘導する液性因子を同定するために、重症薬疹患者及び通常薬疹患者の培養上清中のタンパクを質量解析を用いて比較検討する。同定されたタンパクについて、細胞死誘導メカニズムを検討する。

1) TG-GATEs を用いた解析: TG-GATEs に格納されている化合物の中から重症薬疹の報告頻度が高い 18 薬剤を選択した。これらの薬剤について肝障害の併発の有無や、HLA との相関の報告有無などの特徴をもとに分類を行い、各分類において共通して変動す

る遺伝子の抽出を試みた。解析にはヒト肝細胞に *in vitro* で薬剤処理した遺伝子発現データを用いた。

2) 重症薬疹患者サンプルを用いた解析：大学病院にて得られた SJS あるいは DIHS 患者の末梢血単核球から抽出した mRNA 検体を入手した。供与された SJS 患者 6 名、DIHS 患者 3 名分のサンプルについて gene chip 解析に供し、公共の gene chip データベースから得られた健常人の末梢血単核球の遺伝子データと比較して、重症薬疹患者末梢血単核球と健常人末梢血単核球の遺伝子発現の差異を調べた。

3) 患者サンプルから得られた発現変動遺伝子を用いた TG-GATEs の活用：2) の検討で得られた遺伝子と同様の発現を示す薬剤を TG-GATEs を用いて確認した。解析にはラット単回あるいは反復投与した肝細胞の遺伝子発現データを用いた。

(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、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

1. 重症薬疹発症機序関与マーカー検索：収集した重症薬疹サンプルを用い、重症薬疹に特異的に発現が亢進するタンパクを質量分析にて解析を行った。治療後の患者から末梢血細胞を採取し、原因薬剤を添加した末梢血細胞から産生される液性因子を、重症薬疹と通常薬疹を比較した。重症薬疹のみで annexin A1 が亢進していた。Annexin A1 は通常薬疹と比較し、重症薬疹において著明に発現が亢進していた。

2. 細胞死誘導機序解明：

上記 1. のように重症薬疹の表皮細胞死が annexin A1/FPR1 により誘導される機序として、ネクロプトーシスに特異的な細胞内シグナルの RIP1/RIP3 および MLKL を介して起こることを明らかにした。

3. モデルマウスを用いた候補マーカーの確認：

我々が作製した重症薬疹モデルマウスを用いて、ネクロプトーシス阻害剤を用いて重症薬疹モデルマウスの治療実験を行い、この阻害物質は重症薬疹発症を完全に抑制することを見出した。

4. 重症薬疹患者サンプルの収集：

参画施設にてそれぞれ倫理委員会にて承認を得た。現在当初目標 40 症例中、34 症例のサンプルをすでに収集している。

5. 表皮細胞死阻害の検討：

本研究で解明した表皮細胞死メカニズムは、重症薬疹の治療ターゲットになりうる可能性がある。よって annexin A1 または FPR1 をターゲットにした表皮細胞阻害法を検討する。すでに東京大学理学系研究科と協力して、FPR1 のスクリーニング系を確立し、化合物ライブラリーの探索を開始している。

6. 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。

7. SJS/TEN では増殖する CD8 陽性 T 細胞の多くが IFN- γ 産生性の Tc1 細胞であり、Th17 細胞は薬剤反応性の増殖は乏しいことが示された。

8. TG-GATEs を用いた解析：

重症薬疹の報告頻度が高い 18 薬剤を分類して、分類ごとに共通変動遺伝子の探索を試みたが、見出すことは困難であった。

9. 重症薬疹患者サンプルを用いた解析：

SJS あるいは DIES 患者と公共データベースから取得した健常人の遺伝子発現データの比較解析では、それぞれの疾患別に解析した結果、SJS 患者で発現差がみられる 8 遺伝子、DIES 患者で発現差がみられる 3 遺伝子、SJS 及び DIES 患者で発現差がみられる 11 遺伝子を特定した。解析を進めることにより重症薬疹の各疾患における発症あるいは重症化に関与していることが期待される。これらの遺伝子については、現在、発現の局在や機能を文献等により調査中である。

10. 患者サンプルから得られた発現変動遺

伝子を用いた TG-GATEs の活用：

2) の解析で得られた遺伝子について TG-GATEs を用いて同様に変動する薬剤を確認した結果、4 遺伝子は重症薬疹の発症報告がある薬剤が抽出された。

D. 考察

本研究の成果から、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を明らかにした。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

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

研究要旨 重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS) は時に致命的疾患であり、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。

我々は SJS/TEN における表皮細胞死メカニズムについて解明を行い、患者特異的に annexin A1 が産生され、その受容体である formyl peptide receptor 1 が表皮細胞上に発現されることを明らかにした。さらにこの細胞死はネクロプトーシスであることを明らかにした。この細胞死をターゲットにした薬剤として formyl peptide receptor 1 に対するアンタゴニストの探索を行った。さらにこの受容体からの細胞内シグナルの解明を行った。

A. 研究目的

重症薬疹 (中毒性表皮壊死症: TEN、Stevens-Johnson 症候群: SJS) は時に致命的疾患であり、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された。一方通常薬疹患者の培養表皮細胞、PBMC においては生じなかった。原因薬剤で刺激された重症薬疹患者 PBMC の培養上清の細胞死を誘導する液性因子を同定するために、重症薬疹患者及び通常薬疹患者の培養上清中のタンパクを質量解析を用いて比較検討する。同定されたタンパクについて、細胞死誘導メカニズムを検討する。

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にて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

1. 重症薬疹発症機序関与マーカー検索:
収集した重症薬疹サンプルを用い、重症薬疹に特異的に発現が亢進するタンパクを質量分析にて解析を行った。治癒後の患者から末梢血細胞を採取し、原因薬剤を添加した末梢血細胞から産生される液性因子を、重症薬疹と通常薬疹を比較した。重症薬疹

のみで annexin A1 が亢進していた。Annexin A1 は通常薬疹と比較し、重症薬疹において著明に発現が亢進していた。

2. 細胞死誘導機序解明：

上記 1. のように重症薬疹の表皮細胞死が annexin A1/FPR1 により誘導される機序として、ネクロプトーシスに特異的な細胞内シグナルの RIP1/RIP3 および MLKL を介して起こることを明らかにした。

興味深いことに、通常状態の表皮細胞には FPR1 は発現されず、通常薬疹病変皮膚でも発現が見られなかったが、SJS/TEN の病変部皮膚において発現が亢進していた。またネクロプトーシス阻害剤はモデルマウスにおいて、発症抑制効果を示した。

3. モデルマウスを用いた候補マーカーの確認：

我々が作製した重症薬疹モデルマウスを用いて、ネクロプトーシス阻害剤を用いて重症薬疹モデルマウスの治療実験を行い、この阻害物質は重症薬疹発症を完全に抑制することを見出した。

4. 重症薬疹患者サンプルの収集：

参画施設にてそれぞれ倫理委員会にて承認を得た。現在当初目標 40 症例中、40 症例のサンプルを収集した。

5. 表皮細胞死阻害の検討：

本研究で解明した表皮細胞死メカニズムは、重症薬疹の治療ターゲットになりうる可能性がある。よって annexin A1 または FPR1 をターゲットにした表皮細胞阻害法を検討する。すでに東京大学理学系研究科と協力して、FPR1 のスクリーニング系を確立し、化合物ライブラリーの探索を開始している。

6. 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、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を明らかにした。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

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. Saito N, Qiao H, Yanagi T, Shinkuma S, Suto A, Fujita Y, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H, Nagao K, Obuse C, Shimizu H, Abe R.

A novel necroptosis pathway of annexin A1/FPR1 interaction in severe cutaneous adverse drug reactions

Sci Transl Med 16:245ra95.2014.

2. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizaka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N; NORTE Study Group.

Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions.

Hepatol Res (in press)

2. 学会発表

1. Riichiro Abe. Novel pathway of keratinocyte death in SJS/TEN. DHM6, Bern, Switzerland. 2014.4.

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」
分担研究報告書

重症薬疹における末梢血単核球が産生するサイトカインの検討

分担研究者 片山一朗

大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学専攻情報統合医学皮膚学 教授

研究要旨 重症薬疹である Stevens-Johnson 症候群(SJS)、中毒性表皮壊死症(TEN)の患者では T ヘルパー 1 (Th1)細胞が産生するサイトカインの関与が知られている。一方で薬剤性過敏症症候群 (DIHS) 患者ではヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) の再活性化がおこることが知られる。重症薬疹では、薬剤アレルギーのみならずウイルス感染症と関連して起こること場合があることが明らかとなってきたが、実際にどちらの病態が主におこっているか判断が難しい。我々は重症薬疹患者の凍結末梢血単核球を用いて、DIHS 症例の原因薬剤と培養することで、インターフェロン(IFN)- γ の産生について Elispot アッセイを用いて検討した。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群(SJS)/中毒性表皮壊死症(TEN)と薬剤性過敏症症候群 (DIHS) はいずれも重症薬疹である。DIHS は、通常薬疹とことなり、遷延することから、そのバイオマーカーは重要であると考えられる。これらの重症薬疹ではリンパ球とくに T 細胞を中心とした免疫細胞によるサイトカインの産生が病態に重要であると考えられている。インターフェロン- γ (IFN- γ) は重症薬疹の血清で上昇していることが知られているが、薬疹に特異的なバイオマーカーではなく、ウイルス感染症などでも上昇しうる。血清中のサイトカインの測定では、原因薬剤とサイトカインの産生を直接関連づけることが難しく、感染症などとの区別が困難である。近年結核感染症の診断には T-SPOT TB に代表されるように、結核抗原特異的な IFN- γ を Elispot アッセイにより検出する方法が用いられるようになってきている。そこで我々は、ウイルス性発疹症と薬疹との区別が、困難ないわゆる中毒疹の症例や DIHS において、薬疹、薬剤アレルギーにより特異的なバイオマーカーを探すために、薬剤で刺激した細胞が産生する IFN- γ を Elispot アッセイにより検出する方法を検討した。

B. 研究方法

カルバマゼピンが原因薬剤であると考えられた症例を含む DIHS 症例の凍結末梢血単

核球(PBMC)をもちいた。解凍した細胞を、培養液中で刺激し、数日後に、症例ごとの原因薬剤を添加し、24-48時間後に Elispot アッセイをおこなった。

(倫理面への配慮)

中毒疹が疑われた患者を対象にこの臨床研究への参加について説明と同意を得た上で採血を行った。「中毒疹における原因疾患の早期鑑別診断法の開発」という研究課題名で大阪大学医学部附属病院 臨床研究倫理審査委員会より平成 20 年 8 月 25 日より平成 28 年 7 月 31 日までの許可(承認番号 08088-4)を受けた所定の説明書と同意書を用いた。

C. 研究結果

薬剤を添加した PBMC では IFN- γ の産生を dot としてとらえられた症例があったが、薬剤に非特異的な IFN- γ の産生がみられる症例もあり、薬剤特異的な IFN- γ 産生は非特異的な IFN- γ 産生を差し引いた数の dot として検出できる症例があった。また、刺激時間によっては IFN- γ の産生が全く検出できない場合もあった。

D. 考察

薬剤に特異的な免疫細胞として、T細胞を中心としたリンパ球が重要と考えられている。その細胞が産生する IFN- γ を検出することができると考えられるが、DIHSではリン

パ球が活性化した状態がもともとあると考えられ、薬剤非特異的なIFN- γ の産生が無視できない症例もあり、薬剤特異的な反応を区別して検出するには、薬剤無添加のPBMCが産生するIFN- γ を差し引く必要があると考えられた。

E. 結論

ウイルス性発疹症と薬疹とを鑑別することは、現状では困難であり、これらを区別するようなバイオマーカーの開発が必要と考えられるが、ウイルス性発疹症と考えられる症例における原因ウイルスが不明であるため、薬剤特異的な免疫反応を検出する方法をさらに改良することで、有用なバイオマーカーの検出が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashimoto N, Yamaoka T, Koguchi-Yoshioka H, Tanaka A, Tanemura A, Azukizawa H, Murota H, Kang J, Nakagawa Y, Shimazu T, Katayama I. Development of Necrotising Fasciitis in a Patient Treated for Rheumatoid Arthritis with Tocilizumab. *Acta Derm Venereol.* 95:370-71 2015

2. 小豆澤 宏明、横見 明典、谷 守、室田 浩之、中山 貴寛、玉木 康博、野口 眞三郎、片山 一朗 *Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology* 8巻2号 Page109-113 2014.

3. Nishioka M, Tanemura A, Yang L, Tanaka A, Arase N, Katayama I. Possible involvement of CCR4(+)CD8(+) T cells and elevated plasma CCL22 and CCL17 in patients with Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci.* 2015 Mar;77(3):188-90.

4. Maeda Y, Nishikawa H, Sugiyama D, Ha D, Hamaguchi M, Saito T, Nishioka M, Wing JB, Adeegbe D, Katayama I, Sakaguchi S.

Detection of self-reactive CD8⁺ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science.* 2014 Dec 19;346(6216):1536-40.

2. 学会発表

1. 清原 英司, 小豆澤 宏明, 片山 一朗 手掌に繰り返す紅斑と水疱を引き起こしたアセトアミノフェンによる 固定薬疹 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成26年11月22日 仙台

2. 藤盛 裕梨, 吉岡 華子, 小豆澤 宏明, 片山 一朗 スピール膏貼付にて蕁麻疹が誘発されたアスピリン不耐症の1例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成26年11月22日 仙台

3. 出口 彩香, 田中文, 山岡 俊文, 小豆澤 宏明, 片山 一朗, 杉尾 勇太 急性汎発性発疹性膿疱症 (AGEP) 様の皮疹を呈した薬剤過敏症候群 (DIHS) の1例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成26年11月22日 仙台

4. 山賀 康右 (大阪大学), 花房 崇明, 小豆澤 宏明, 片山 一朗, 小林 真紀, 橋本 直哉 ベバシズマブが誘因と考えられた Perforating dermatosis の1例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 平成26年11月22日 仙台

5. Hiroaki Azukizawa, Kenichi Kato, Ichiro Katayama, Analysis of B cell subsets in severe cutaneous adverse reaction The 6th Drug Hypersensitivity Meeting. Bern Switzerland, April 9-12th 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当ございません。

I. 引用論文

なし

厚生労働科学研究費補助金「創薬基盤推進」
分担研究報告書

重症薬疹の皮膚浸潤 T 細胞の薬剤反応性およびサイトカイン産生性の検討

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）は時に死に至る疾患であり、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、重症薬疹の皮膚に浸潤した T 細胞を培養・増幅し、得られた細胞に抗原提示細胞と原因薬剤を添加し、増殖反応を確認した。さらに、増殖した細胞の細胞内サイトカイン染色を行い、薬剤反応性に増殖する細胞の同定を試みた。その結果、SJS/TEN では増殖する CD8 陽性 T 細胞の多くが IFN- γ 産生性の Tc1 細胞であり、Th17 細胞は薬剤反応性の増殖は乏しいことが示された。DIHS における薬剤反応性増殖する細胞は症例により、異なっており現時点で、一定の傾向はつかめていない。

A. 研究目的

浜松医科大学皮膚科教室では、皮膚に浸潤した T 細胞を培養する技術確立し、これまで様々な皮膚疾患に応用を試みてきた。薬疹においては、薬剤反応性の T 細胞が高頻度に皮膚に浸潤していることが予想される。これまでの研究で、重症薬疹の患者さんより採取した皮膚生検組織に浸潤した T 細胞を分離培養し、得られた細胞に原因薬剤を添加することで、細胞が増殖することが確認された。本研究では、重症薬疹より皮膚浸潤細胞を培養増幅し、原因薬剤を添加することで反応増殖する細胞を同定し、その機能を調べることで、重症薬疹の機序解明に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

薬疹における、皮膚に浸潤した細胞がどのような抗原反応性を示し、どのように作用しているかなど、不明な点が多いが、薬剤投与により皮膚に浸潤してきた細胞が薬剤反応性の応答を示す可能性は高い。本研究では、まず重症薬疹患者の皮膚を 4mm パンチで生検しその一部から皮膚組織に浸潤した T 細胞を IL-2 や抗 CD3/CD28 抗体を用いて培養増幅する。増幅した細胞を CFSE で標識し、細胞分裂を確認可能な状態にする。一方、同じ患者の末梢血から分離した単核球を、放射線照射 (30Gy) により増殖能を失わせて、抗原提示細胞として用いる。CFSE で標識した皮膚浸潤 T 細胞と、抗原提示細胞

と被疑薬剤（種々の濃度に希釈したもの）を混合し約 1 週間培養した後に、細胞増殖をフローサイトメトリーで解析する。薬剤を添加することで皮膚に浸潤した T 細胞が増殖すれば、その薬剤が、薬疹の原因薬剤であったと推測でき、同時に薬剤反応性の T 細胞が皮膚に浸潤していることが示される。さらに、ここで増殖する細胞がみられた場合、その細胞を同定するため、増殖の解析をした残りの細胞を PMA およびカルシウムイオノフォアで刺激し、サイトカインの産生性を確認し、薬疹の病型ごとの違いを調べる。

（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、浜松医科大学医の理委員会にて承認を得た。

C. 研究結果

培養皮膚浸潤 T 細胞を CFSE で標識後同患者の単核球と被疑薬を加えて培養すると、約 5 日後に T 細胞の増殖が SLS/TEN および DIHS の複数の重症薬疹の症例で確認できた。ここで増殖した細胞の一部を PMA およびカルシウムイオノフォアで刺激したところ、皮膚浸潤 T 細胞はいずれの疾患でも CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞両方の増殖がみられた。

SJS/TEN の症例では増殖反応を示した

CD8 陽性細胞のほとんどが IFN- γ 産生性の Tc1 細胞であった。一方 CD4 陽性細胞では増殖反応を示した細胞に一定の傾向は見られなかったが、多くの症例で皮膚浸潤 T 細胞は Th17 細胞を含んでおり、この Th17 細胞は原因薬剤添加による増殖はほとんど示さなかった。

DIHS の症例では原因薬剤の添加によって、SJS/TEN と同様に増殖反応を示したが、増殖する細胞の種類は様々で、一部の症例では Th17 細胞の増殖も確認された。

D. 考察

SJS/TEN および DIHS 患者由来の培養皮膚浸潤 T 細胞は原因薬剤添加に反応し増殖することが示された。ここで増殖する細胞が、薬剤特異的クローンなのか、間接的刺激により増殖した細胞なのか、現時点では区別できていない。しかし、その反応パターンは薬疹の病型によって、異なっていることが示された。特に SJS/TEN の症例では Tc1 細胞の増殖が特徴的で、これは本症の病態に Tc1 が深く関わっていることと関連していると考えている。これに対して、DIHS では、現時点では薬剤に反応する細胞の種類は、はっきりと同定できていない。これまでの報告にあるように、DIHS の病態や皮疹で主な役割を担う細胞が、その発症からの時期によって変わっていくことと関連している可能性がある。

E. 結論

皮膚浸潤 T 細胞は薬剤反応性の増殖を示し、その反応パターンは疾患により異なる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito T, Tokura Y: The role of cytokines/chemokines in T cell-mediated autoimmune inflammation: Lessons from hair loss in alopecia areata. *Exp Dermatol* 23: 787-791, 2014.

2. Kasuya A, Tokura Y: Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci* 76: 169-172, 2014.
3. Tokura Y, Yagi H, Yanaguchi H, Majima Y, Kasuya A, Ito T, Maekawa M, Hashizume H: IgG4-related skin disease. *Br J Dermatol* 171: 959-967, 2014.
4. Suzuki T, Hirakawa S, Shimauchi T, Ito T, Sakabe J, Detmar M, Tokura Y: VEGF-A promotes IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cell accumulation in mouse skin and serves as a chemotactic factor for plasmacytoid dendritic cells. *J Dermatol Sci* 74: 116-124, 2014.
5. Ito T, Furukawa F, Iwatsuki K, Matsue H, Shimada S, Takigawa M, Tokura Y: Efficacious treatment of psoriasis with low-dose and intermittent cyclosporine microemulsion therapy. *J Dermatol* 41: 377-381, 2014.
6. Fujiyama T, Oze I, Yagi H, Hashizume H, Matsuo K, Hino R, Kamo R, Imayama S, Hirakawa S, Ito T, Takigawa M, Tokura Y: Induction of cytotoxic T cells as a novel independent survival factor in malignant melanoma with percutaneous peptide immunization. *J Dermatol Sci* 75: 43-48, 2014.
7. Fujiwara M, Sawada M, Kasuya A, Matsushita Y, Yamada M, Fukamizu H, Magata Y, Tokura Y, Sakahara H: Measurement of cutaneous lymphatic flow rates in patients with skin cancer: area extraction method. *J Dermatol* 41: 498-504, 2014.
8. Yoshiki R, Kabashima K, Honda T, Nakamizo S, Sawada Y, Sugita K, Yoshioka H, Ohmori S, Malissen B, Tokura Y, Nakamura M: IL-23 from Langerhans cells is required for the

- development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells. *J Invest Dermatol* 134: 1912-1921, 2014.
9. Fujiyama T, Ito T, Ogawa N, Suda T, Tokura Y, Hashizume H: Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clin Exp Immunol* 177: 110-120, 2014.
 10. Sakabe J, Umayahara T, Hiroike M, Shimauchi T, Ito T, Tokura Y: Calcipotriol increases hCAP18 mRNA expression but inhibits extracellular LL37 peptide production in IL-17/IL-22-stimulated normal human epidermal keratinocytes. *Acta Derm Venereol* 94: 512-516, 2014.
 11. Sakabe J, Kamiya K, Yamaguchi H, Ikeya S, Suzuki T, Aoshima M, Tatsuno K, Fujiyama T, Suzuki M, Yatagai T, Ito T, Ojima T, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *J Allergy Clin Immunol* 134: 957-967.e8, 2014.
 12. Yamaguchi H, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hashizume H, Tokura Y: Psychological aspects of patients with intrinsic atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* 24: 253-254, 2014.
 13. Ito T, Mori T, Fujiyama T, Tokura Y: Dramatic exacerbation of palmoplantar pustulosis following strongly positive nickel patch testing. *Int J Dermatol* 53: e327-329, 2014.
 14. Kasuya A, Sakabe J, Kageyama R, Ikeya S, Fujiyama T, Tokura Y: Successful differentiation of herpes zoster-associated erythema multiforme from generalized extension of herpes by rapid polymerase chain reaction analysis. *J Dermatol* 41: 542-544, 2014.
 15. Sakabe J, Kabashima-Kubo R, Kubo A, Tokura Y: A Japanese case of Mal de Meleda with SLURP1 mutation. *J Dermatol* 41: 764-765, 2014.
 16. Ito T, Suzuki T, Funakoshi A, Tokura Y: Exacerbation of alopecia areata during pegylated interferon alfa-2b therapy possibly due to collapse of hair follicle immune privilege. *Eur J Dermatol* 24: 631-633, 2014.
 17. Hoshino T, Tatsuno K, Shimauchi T, Okada S, Ito T, Ono T, Ohshima K, Tokura Y: Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoproliferative disorder affecting skin and lung in an elderly patient. *J Dermatol* 41: 837-840, 2014.
 18. Kasuya A, Yagyu T, Tokura Y: Recurrent herpes zoster on a fixed thigh site: Its possible association with lymphoma cell invasion to femoral nerve. *J Dermatol* 41: 854-855, 2014.
 19. Tokura Y, Fujiyama T, Ikeya S, Tatsuno K, Aoshima M, Ito T: Biochemical, cytological, and immunological mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci (in press)*
 20. Kamiya K, Aoyama Y, Yamaguchi M, Ukida A, Mizuno-Ikeda K, Fujii K, Hamada T, Tokura Y, Iwatsuki K: Clues to diagnosis for unusual mucosal pemphigus demonstrating undetectable anti-desmoglein 3 serum antibodies by routine tests. *J Dermatol (in press)*
 21. Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama T, Ito N, Sakabe J, 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* (in press)
22. Fujiyama T, Ikeya S, Ito T, Tatsuno K, Aoshima M, Kasuya A, Sakabe J-I, Tokura Y: Melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci* (in press)
 23. Nakazawa S, Niizeki H, Matsuda M, Nakabayashi K, Seki A, Mori T, Tokura Y: Prostaglandin E2 involvement in the first Japanese case of pachydermoperiostosis with HPGD mutation and recalcitrant leg ulcer. *J Dermatol Sci* (in press)
 24. Yamaguchi H, Hirasawa N, Asakawa S, Okita K, Tokura Y: Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. *Allergol Int* (in press)
 25. Ito T, Tatsuno K, Fujiyama T, Sakabe J, Tokura Y: Antihistaminic drug olopatadine downmodulates T cell chemotaxis toward CCL17 in patients with atopic dermatitis. *Allergology Int* (in press)
 26. Kasuya A, Hoshino T, Aoshima M, Fujiyama T, Tokura Y: TGF β /SMAD4 signaling is inhibited in tumor cells and infiltrating lymphocytes of a patient with colon cancer-associated dermatomyositis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (in press)
 27. Asahina A, Kobayashi M, Nakano K, Saito I, Yarita K, Kamei K, Tokura Y: Deep cutaneous infection with *Microspora arundinis*: report of two Japanese cases and literature review. *Acta Derm Venereol* (in press)
 28. Kamiya K, Aoyama Y, Kawata M, Takiguchi T, Mitsui S, Tokura Y, Iwatsuki K: Treatment of a patient with neutrophilic dermatoses with granulocyte and monocyte adsorption apheresis: effects on serum cytokine levels. *Eur J Dermatol* (in press)
 29. Kamiya K, Kamiya E, Kamiya Y, Niwa M, Saito A, Natsume T, Niwa H, Tokura Y: Drug eruption to clavulanic acid with sparing of cellulitis-affecting site. *Allergology Int* (in press)
 30. Aoshima M, Ito T, Tokura Y: Erosive pustular dermatosis of the scalp arising concomitantly with elevation of serum matrix metalloproteinase-3 in a patient with rheumatoid arthritis. *J Dermatol* (in press)
2. 学会発表
1. Suzuki T, Hirakawa S, Shimauchi T, Ito T, Detmar M, Tokura Y: VEGF-A promotes IL-17A-producing $\gamma \delta$ T cell accumulation in mouse skin and serves as a chemotactic factor for plasmacytoid dendritic cells. 2014 Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2014.5.8. Albuquerque, USA
 2. Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Tokura Y: High expression of TSLP receptors in circulating CD4+ T cells in atopic dermatitis. 2014 Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2014.5.9. Albuquerque, USA
 3. Nakajima S, Egawa G, Amano W, Sakabe J, Tokura Y, Miyachi, Kabashima K: Maintenance of cutaneous immune reactions by regulatory T cells in a newly developed murine model of graft-versus-host like skin disease. 2014 Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2014.5.9. Albuquerque, USA

4. Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. 8th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis. 2014.5.22. Nottingham, United Kingdom
 5. Kasuya A, Tokura Y: TIF1 γ -overexpressing, highly progressive endometrial carcinoma in a patient with dermatomyositis positive for malignancy-associated anti-p155/140 autoantibody. 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology. 2014.6.11. Heidelberg, Germany
 6. Tokura Y: Skin manifestations of IgG4-related disease. 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology. 2014.6.12. Heidelberg, Germany
 7. Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Waki M, Tokura Y: TSLPR expressing CD4+ T cells produce enhanced IL-4 by directly responding to TSLP in AD. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.12. Suita, Japan
 8. Fujiyama T, Hashizume H, Umayahara T, Tatsuno K, Ito T, Tokura Y: T cell expansion study using the lesional skin provides evidence for the role of drug-specific Tc1 and Th17 cells in severe drug eruptions. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan
 9. Sakabe J, Kamiya K, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan
 10. Yuki T, Kusaka A, Komiya A, Tobiishi A, Ota T, Tokura Y: IL-17A weakens the tight junction (TJ) barrier in a human-skin-equivalent model: A possible mechanism of impaired TJ in atopic dermatitis. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan
 11. Ito T, Suzuki T, Sakabe J, Funakoshi A, Tokura Y: Plasmacytoid dendritic cells as a key player in the induction of alopecia areata. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.12-13. Suita, Japan
 12. 青島正浩, 坂部純一, 戸倉新樹: クロミプラミンによる光線過敏症型薬疹. 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. 2014.11.21. 仙台市
 13. 藤山俊晴, 橋爪秀夫, 馬屋原孝恒, 龍野一樹, 伊藤泰介, 戸倉新樹: 皮膚湿潤T細胞を用いた薬疹の原因薬剤同定の検討. 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. 2014.11.22. 仙台市
- 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」 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
研究責任者 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。しかし最近研究代表者らのグループ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

本研究の目的は、重症薬疹発症に関与するマーカーを検索し、重症薬疹発症予測マーカーおよび重症度予測マーカーの開発を行うことである。さらに、重症薬疹患者の臨床情報やサンプルを収集し、治療経過と臨床症状、検査値、合併症などとの相関について検討し、モデルマウスにおいて検証を行うことで、より精度の高い診断、治療の試案の作成を目指すことである。

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。最近研究代表者らのグループ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。

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）

本研究は検体の提供を受ける観察研究であり、1回あたりの採血量が10cc程度増加する。また、皮膚採取部位が2ヶ所増え、時に創部感染、出血、潰瘍化などのリスクを伴うことがあるが、通常これらは被験者の症状や治療経過に影響を与えないものと考えられる。実施にあたっては、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

重症薬疹患者 (SJS) と健常人から表皮細胞を採取して培養した。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。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。

D. 考察

本研究の成果から、表皮細胞死において疾患特異的な現象が起こることが明らかになった。これは、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

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。

また、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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kono M, Sugiura K, Sukanuma M, Hayashi M, Takama H, Suzuki T, Matsunaga K, Tomita Y, **Akiyama M**. Whole-exome sequencing identifies ADAM10 mutations as a cause of reticulate acropigmentation of Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease. **Hum Mol Genet.** 2013 Sep 1;22(17):3524-33.
2. 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 Jan 29.

2. 学会発表

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