

201407019B

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)

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～平成 26 年度 総合研究報告書

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 24 年度～平成 26 年度 総合研究報告書

平成 27（2015）年 3 月

研究代表者 阿 部 理一郎

# 目 次

I. 班員構成 .....	1
II. 総合研究報告	
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 .....	5
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 .....	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷（抜粋） .....	51

## I. 班員構成

I. 班員構成

研究者名		所属研究機関	職名	主な研究項目
代表	阿部理一郎	北海道大学 医学研究科皮膚科学	准教授	研究の総括 マーカー検索 モデルマウス検討
分担	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	患者サンプル収集 臨床マーカー確認
分担	戸倉 新樹	浜松医科大学 医学部皮膚科学	教授	患者サンプル収集 臨床マーカー確認
分担	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	患者サンプル収集 臨床マーカー確認
分担	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	マーカー検索 モデルマウス検討
分担	藤原 道夫	アステラス製薬 (株)	室長	マーカー検索 モデルマウス検討
分担	串間 清司	アステラス製薬 (株)	主任研究員	マーカー検索 モデルマウス検討

## II. 総合研究報告

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))  
総合研究報告書

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。

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。

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

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。

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- $\gamma$  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

### 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（平成24年度分）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujita Y, Inokuma D, <u>Abe R</u> , 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
Saito N, <u>Abe R</u> , 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
Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, <u>Abe R</u> , Akiyama M, Shimizu H	The 89 loop domain of PA-PLA1 $\alpha$ has a crucial role in autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis.	J Invest Dermatol	132	2093-5	2012

Nomura Y, Nomura T, Sakai K, Sasaki K, Ohguchi Y, Mizuno O, Hata H, Aoyagi S, <u>Abe R</u> , 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
Saito N, Yoshioka N, <u>Abe R</u> , 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
Hoshina D, <u>Abe R</u> , Yoshioka N, Saito N, Hata H, Fujita Y, Aoyagi S, Shimizu H	Establishment of a novel experimental model of human angiosarcoma and a VEGF-targeting therapeutic experiment.	J Dermatol Sci	70	116-122	2013
<u>片山一朗</u>	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考え方	日本臨床皮膚科医会雑誌	29巻 6号	778-781	2012

Yamaoka T, <u>Azukizawa H</u> , Tanemura A, Murota H, Hirose T, Hayakawa K, Shimazu T, Wada N, Morii E, <u>Katayama I</u>	Toxic epidermal necrolysis complicated by sepsis, haemophagocytic syndrome, and severe liver dysfunction associated with elevated interleukin-10 production.	Eur J Dermatol	Nov-Dec; 22(6)	815-7	2012
Sugaya M, Hamada T, Kawai K, Yonekura K, Ohtsuka M, Shimauchi T, <u>Tokura Y</u> , 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
Bito T, Sawada Y, <u>Tokura Y</u>	Pathogenesis of cholinergic urticaria in relation to sweating.	Allergol Int	61	539-544	2012

<u>Fujiyama T,</u> <u>Tokura Y</u>	Clinical and histopathological differential diagnosis of eosinophilic pustular folliculitis.	J Dermatol	40	419-423	2013
Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, <u>Tokura Y</u>	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
Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinishita S, <u>Tokura Y,</u> Kato N	Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis.	Am J Pathol	181	2217-2224	2012

Atarashi K, Takano M, Kato S, Kuma H, Nakanishi M, <u>Tokura Y</u>	Addition of UVA-absorber butyl methoxy dibenzoylmethane to topical ketoprofen formulation reduces ketoprofen -photoallergic reaction.	J Photochem Photobiol	113	56-62	2012
Sawada Y, Nakamura M, Kabashima-Kubo R, Shimauchi T, Kobayashi M, <u>Tokura Y</u>	Defective epidermal innate immunity and resultant superficial dermatophytosis in adult T cell leukemia/lymphoma.	Clin Cancer Res	18	3772-3779	2012
Ohmori S, Hino R, Nakamura M, <u>Tokura Y</u>	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
Kasuya A, Moriki M, Tatsuno K, Hirakawa S, <u>Tokura Y</u>	Clearance Efficacy of Autoantibodies in Double Filtration Plasmapheresis for Pemphigus Foliaceus.	Acta Derm Venereol	93	181-215	2013

Ito T, Shimada S, Mori T, <u>Tokura Y</u>	Alopecia areata possibly induced by autoimmune reaction in a patient with HTLV-I-associated myelopathy.	J Dermatol	40	399-401	2013
Kasuya A, Ikawa T, Hirakawa S, Hashizume H, <u>Tokura Y</u>	Granulocyte-colony stimulating factor-producing cutaneous anaplastic large cell lymphoma with cerebral metastasis.	Acta Derm Venereol	93	87-88	2013
Umayahara T, Shimauchi T, <u>Fujiyama T</u> , Ito T, Hirakawa S, <u>Tokura Y</u>	Paediatric acute generalized exanthematous pustulosis induced by paracetamol with high serum levels of interleukin-8 and -22: a case report.	Acta Derm Venereol	93	362-363	2013
Ito T, Shimomura Y, Ogai M, Sakabe J-I, <u>Tokura Y</u>	Identification of a novel heterozygous mutation in the first Japanese case of Marie Unna hereditary hypotrichosis.	J Dermatol	40	278-280	2013
<u>Tokura Y</u>	New Year Greetings.	J Dermatol	40	1	2013



Muro Y, Sugiura K, Hoshino K, <u>Akiyama M</u>	Disappearance of anti-MDA-5 autoantibodies in clinically amyopathic dermatomyositis/ interstitial lung disease during disease remission.	Rheumatology (Oxford)	51	800-4	2012
Natsuga K, Shinkuma S, Kanda M, Suzuki Y, Chosa N, Narita Y, Setoyama M, Nishie W, <u>Akiyama M</u> , Shimizu H	Possible modifier effects of keratin 17 gene mutation on keratitis-ichthyosis-deafness syndrome.	Br J Dermatol	166	903-5	2012
Yasuda K, Sugiura K, Ishikawa R, Kihira M, Negishi Y, Iwayama H, Ito K, Kimura H, Kosugi I, <u>Akiyama M</u>	Perinatal cytomegalovirus-associated bullae in an immunocompetent infant.	Arch Dermatol	148	770-2	2012
Sasaki K, <u>Akiyama M*</u> , 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.	J Dermatol Sci	65	156-8	2012

Sugiura K, Muro Y, <u>Akiyama M</u>	Autoantibodies to nuclear matrix protein 2 /MJ in adult-onset dermatomyositis with severe calcinosis	J Am Acad Dermatol	67	e167-168	2012
Fukuda S, Hamada T, Ishii N, Sakaguchi S, Sakai K, <u>Akiyama M</u> , Shimizu H, Masuda K, Izu K, Teye K, Tsuruta D, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T	Novel adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette, subfamily A, member 12 (ABCA12) mutations associated with congenital ichthyosiform erythroderma.	Br J Dermatol	166	218-221	2012
Ishikawa A, Muro Y, Sugiura K, <u>Akiyama M</u>	Development of an ELISA for detection of autoantibodies to nuclear matrix protein 2.	Rheumatology (Oxford)	51	1181-7	2012

Kono M, <u>Akiyama M</u> , Kondo T, Suzuki T, Suganuma M, Wataya-Kaneda M, Lam J, Shibaki A, Tomita Y	Four novel <i>ADAR1</i> gene mutations in patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria.	J Dermatol	39	819-821	2012
Ishikawa A, Sugiura K, Sato A, Muro Y, <u>Akiyama M</u>	Drug eruption due to sodium picosulfate.	Eur J Dermatol	22	410-1	2012
Muro Y, Ishikawa A, Sugiura K, <u>Akiyama M</u>	Clinical features of anti-TIF1- $\alpha$ antibody-positive dermatomyositis patients are closely associated with coexistent dermatomyositis -specific autoantibodies and anti-TIF1- $\gamma$ or anti-Mi-2 autoantibodies.	Rheumatology (Oxford)	51	1508-13	2012

Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Shimoyama Y, Muro Y, <u>Akiyama M</u>	A novel IL36RN/IL1F5 homozygous nonsense mutation, p.Arg10X, in a Japanese patient with adult-onset generalized pustular psoriasis.	Br J Dermatol	167	699-701	2012
Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R, <u>Akiyama M</u> , Shimizu H	The $\beta$ 9 loop domain of PA-PLA <sub>1</sub> $\alpha$ has a crucial role in autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis.	J Invest Dermatol	132	2093-2095	2012
Yoshida Y, Sakakibara A, Watanabe T, Noto K, Sakita K, Sakai Y, Amemiya T, <u>Akiyama M</u>	Extraordinarily large protruding accessory breast cancer in a male.	J Am Acad Dermatol	67	e230-231	2012