

201442015A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

重症薬疹における特異的細胞死誘導受容体をターゲットにした
新規治療薬開発に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

平成 27（2015）年 3 月

業務主任者 阿 部 理一郎

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）による委託業務として、国立大学法人北海道大学が実施した平成 26 年度「重症薬疹における特異的細胞死誘導受容体をターゲットにした新規治療薬開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

重症薬疹における特異的細胞死誘導受容体をターゲットにした
新規治療薬開発に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

平成 27（2015）年 3 月

業務主任者 阿 部 理一郎

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

重症薬疹における特異的細胞死誘導受容体をターゲットにした 新規治療薬開発に関する研究	1
阿部 理一郎	

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. FPR1に対するアンタゴニスト検索・スクリーニング用細胞の樹立・ FPR1アンタゴニストのリード化合物の探索	5
阿部理一郎	
2. 重症薬疹における単球と制御性T細胞の相互作用	7
塩原哲夫	
3. FPR1に対するアンタゴニスト検索・スクリーニング用細胞の樹立・ FPR1アンタゴニストのリード化合物の探索	10
小澤岳昌	
4. 重症薬疹モデルマウスの作成と病態機序の解析	12
椛島健治 中島沙恵子	
5. 重症型薬疹のバイオマーカーの検討および薬剤とHLAの結合親和性についての検討	15
渡辺秀晃	
6. 中毒性表皮壊死症の表皮壊死におけるhyperthermiaとサイトカインの役割	18
藤山幹子	
7. 重症薬疹における病期ごとのTh1サイトカインの検討	21
小豆澤宏明	
8. 重症薬疹における病因的T細胞の解析	24
高橋勇人	
9. 重症薬疹治療薬の実用化において留意すべき事項	26
荒戸照世	

III. 学会等発表実績	29
--------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	41
-----------------------	----

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
総括研究報告書

重症薬疹における特異的細胞死誘導受容体をターゲットにした新規治療薬開発
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く、そのため疾患特異的な薬剤の開発は皆無である。

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うため、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行った。

加えて発症機序解明の検討から、新たな診断および治療のターゲットとなるものの候補が見出されている。さらなる本研究課題の発展ができると思う。

研究分担者

塩原哲夫(杏林大学・医学部・皮膚科学 教授)

小澤岳昌(東京大学・大学院理学系研究科・分析化学 教授)

梶島健治(京都大学・医学研究科・皮膚科学 准教授)

渡辺秀晃(昭和大学・医学部・皮膚科学 准教授)

藤山幹子(愛媛大学・医学系研究科・皮膚科学 講師)

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)

高橋勇人(慶應義塾大学・医学部・皮膚科学 助教)

荒戸照世(北海道大学・大学院医学研究科・レギュラトリーサイエンス部門 教授)

A. 研究目的

重症薬疹(Stevens-Johnson 症候群: SJS、中毒性表皮壊死症: TEN)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。

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、新規の治療法の開発に結びつけることを目的とする。

さらに重症薬疹の発症機序解明に対する検討も行う。

B. 研究方法

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した。さらに細胞死を誘導する液性因子について検索を行い、その細胞死機序について検討した。

FPR1 に対するアンタゴニスト検索において、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの化合物ライブラリー(およそ 20 万種類)から FPR1 阻害剤を探索するために、

段階的スクリーニングによる化合物の絞り込みを行った。

重症薬疹発症機序解明において、1) 重症薬疹における Tregs、Th17 の変動、Tregs の subpopulation の解析、2) 表皮特異的自己抗原発現による SJS/TEN 動物モデル作成、3) 薬剤と HLA の結合親和性についての検討、4) TNF- α と IFN- γ による表皮細胞死機構の解明、5) 重症薬疹血清におけるサイトカイン変動、6) 薬剤特異的 T 細胞の単離、解析、7) 重症薬疹モデル動物を用いて治療薬を開発の検討、をそれぞれ行う。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、ヒト試料を用いる際は、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、それぞれの機関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

SJS/TEN における表皮細胞死はアポトーシスであるとされてきた。しかしながら、以前から、超微細構造の観察からアポトーシスよりもむしろネクローシスの形態を呈するとの報告があった。私たちも、病変部表皮細胞死はアポトーシスとネクローシスが混在することを見いだした。さらにネクローシスの形態をとる細胞死は、特定の受容体 (formyl peptide receptor 1: FPR1) とそのリガンド (annexin A1) の interaction によるシグナルで誘導されることも明らかにし、この SJS/TEN における表皮細胞死は、プログラムされた、ネクローシス形態をとる細胞死 (ネクロプトーシス) であることを示した。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。

FPR1 に対するアンタゴニストの探索を行

った。探索のためのアッセイ系の開発は小澤分担研究者が行った。カルシウムアッセイおよび β アレスチンアッセイを樹立し、スクリーニングを行っている。今後は 10 万種類以上の化合物のスクリーニングに展開する計画である。

重症薬疹発症機序解明において、1) classical monocyte は Tregs と関連し、patrolling monocytes は Tregs と逆相関する一方、Th17 と相関すること、2) モデルマウスの作製に成功し、さらに Treg が発症に関与すること、3) 薬疹の頻度の高いジアフェニルスルフォンは、HLA-B*1301 にのみ存在する結合ポケットにレクチゾールが結合すること、4) TNF- α 、IFN- γ および hyperthermia により表皮細胞死はネクローシスを誘導されること、5) IFN- γ は急性期に、TNF- α は回復期に上昇がみられること、6) T 細胞クローン株樹立の系を確立した、7) モデルを用いた非臨床試験において、臨床試験及び文献報告で検討されていた項目 (死亡、眼病変など) に関して十分評価するとともに適切な対照群において検討する必要性を明確にした。

D. 考察

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。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。

加えて発症機序解明の検討から、新たな診断および治療のターゲットとなるものの候補が見出されている。さらなる本研究課題の発展ができると考える。

E. 結論

重症薬疹における新規の細胞のメカニズムは、疾患発症機序の解明に大きく寄与した。さらにこの知見に基づく重症薬疹特異的治療法の開発を行った。

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. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

疾患発症機序解明

FPR1 に対するアンタゴニスト検索・スクリーニング用細胞の樹立

FPR1 アンタゴニストのリード化合物の探索

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ことが多く、そのため疾患特異的な薬剤の開発は皆無である。

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）は時に致死性の疾患であり、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、健康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、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

SJS/TEN における表皮細胞死はアポトーシスであるとされてきた。しかしながら、以前から、超微細構造の観察からアポトーシスよりもむしろネクローシスの形態を呈するとの報告があった。私たちも、病変部表皮細胞死はアポトーシスとネクローシスが混在することを見いだした。さらにネクローシスの形態をとる細胞死は、特定の受容体 (formyl peptide receptor 1: FPR1) とそのリガンド (annexin A1) の interaction によるシグナルで誘導されることも明らかにし、この SJS/TEN における表皮細胞死は、プログラムされた、ネクローシス形態をとる細胞死 (ネクロプトーシス) であることを示した。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。

分担研究者の東京大学小澤教授と共同で、FPR1 に対するアンタゴニストの探索を行った。探索のためのアッセイ系の開発は小澤分担研究者が行った。一方、FPR1 から誘導される表皮細胞ネクロプトーシスの細胞内シグナルの解析のため、表皮細胞 cell line に FPR1 を恒常的に発現する細胞の作製を行った。

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。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、疾患発症機序の解明に大きく寄与し

た。さらにこの知見に基づく重症薬疹特異的治療法の開発を行った。

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.

Hepatology (in press)

2. 学会発表

1. Riichiro Abe. Novel pathway of keratinocyte death in SJS/TEN. Drug Hypersensitivity Meeting 6, 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

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

重症薬疹における単球と制御性 T 細胞の相互作用
分担研究者 塩原 哲夫 杏林大学皮膚科 教授

研究要旨 重症薬疹である中毒性表皮壊死症 (TEN)、Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と薬剤性過敏症症候群 (DiHS) は、その経過、合併症、予後など極めて対照的な疾患である。SJS/TEN、DiHS では抑制機能を有する制御性 T 細胞 (Tregs) の機能が急性期および回復期で異なるのみでなく、自己抗体産生を伴う DiHS 回復期では Tregs から Th17 へのシフトが生じていることが明らかになった。さらにこの Tregs/Th17 のシフトを制御しているのは単球分画である patrolling monocytes (pMOs) からの IL-6 であることを明らかにした。重症薬疹の病態には pMOs と Tregs/Th17 の相互作用は極めて重要であるとともに、新たな治療のターゲットとなりえると考えた。

A. 研究目的

中毒性表皮壊死症 (TEN)、Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と薬剤性過敏症症候群 (DiHS) は、同系統の薬剤が引き起こす重症薬疹でありながら、その経過、合併症、予後など極めて対照的な疾患である。我々は以前より重症薬疹における制御性 T 細胞 (Tregs) の機能を急性期から回復期にかけて経時的に検討してきた。著明な表皮傷害を認める SJS/TEN では急性期には Tregs の機能低下を認める一方、DiHS 急性期では免疫抑制機能を有する Tregs が増大し、ヘルペスウイルスの再活性化を生じる。さらに DiHS 回復期には Tregs は退縮するとともに機能低下を示し、自己抗体産生を認めるようになる。このような Tregs の推移と自己抗体産生に至る過程を長期間検討された報告は DiHS 以外には認められない。

Th17 は自己抗体産生に重要な役割を果たすことが知られ、Tregs/Th17 のバランスは様々な疾患の病態に関与していることが報告されている。上記の経過をあわせて考えると、回復期 DiHS では Tregs の減少に伴い Th17 細胞が増加し、Tregs から Th17 へのシフトが生じていると予測される。この Tregs から Th17 へのシフトを制御する一つの候補として単球分画の関与が示唆されている

が、疾患の長い経過における Tregs から Th17 へのシフトと単球の関与を明らかにした報告は認められない。そこで、本研究では SJS/TEN および DiHS における急性期から回復期の検体における Tregs から Th17 へのシフトに対する単球の作用を明らかにしようと考えた。

B. 研究方法

対象は 2008 年 4 月から 2014 年 3 月まで杏林大学医学部付属病院皮膚科で入院加療を行った、DiHS 患者 (急性期 31 例、回復期 21 例)、SJS/TEN 患者 (急性期 18 例、回復期 15 例) と健常人対照 17 例から得た末梢血リンパ球 (PBMC) を用いた。DiHS、SJS/TEN の診断は、平成 17 年度厚生労働科学研究補助金 難治性疾患克服研究事業 橋本公二研究班の診断基準に基づいて行い、急性期は発症から 11 日以内で治療開始前、回復期は臨床的に治癒に近く発症から 35 日以上経過した状態と定義した。原因薬は主に抗てんかん薬であった。

各々の PBMC を用いて、急性期から回復期におけるリンパ球分画および Tregs、Th17 の変動、Tregs の subpopulation をフローサイトメーターを用いて解析を行った。

単球は CD14 と CD16 の発現により

patrolling monocytes (pM0s ; CD14^{dim}CD16⁺) と classical monocyte (cM0s; CD14⁺CD16⁻) に分画し解析した。

単球と Tregs の関係を明らかにするために、まず DiHS 急性期 PBMC より Tregs、CD3⁺T 細胞と pM0s、cM0s 各分画を分取し、CD3、CD28 刺激下で共培養を行った。その際、単球由来のサイトカインの関与を明らかにするために共培養条件下で抗 IL-10 抗体を添加し、抑制効果を検討した。また、DiHS 回復期の pM0s が IL-6 産生を介して Th17 への分化を促進することを確認するため、DiHS 回復期 PBMC より pM0s、CD3⁺T 細胞を分取し、CD3、CD28 刺激下で共培養を行い、CFSE ラベル法にて Th17 分画の増殖を検討した。

(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、杏林大学医学研究科医の倫理委員会にて承認を得た(承認番号 125-06)。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. DiHS 急性期における iTregs の増加と、回復期における non-Tregs と Th17 の増加

SJS/TEN、DiHS の急性期および回復期の Tregs の推移を subpopulation ごとに検討すると、DiHS では Tregs の増加、なかでも抑制機能を有する iTregs 分画が急性期に著増していた。一方で、DiHS の回復期と SJS/TEN の急性期には iTregs は減少し抑制機能のない non-Tregs が増大しており、これは既に我々が報告した Tregs の機能低下を認めるタイミングとも一致していた。さらに iTregs の変動と相反するように、DiHS 回復期には Th17 の有意な増加を認めた。DiHS 回復期に認められる自己抗体産生は、non-Tregs の増加と Th17 の増加が関与していると考えられた。

2. pM0s と Th17、pM0s と Tregs の相関関係

pM0s 分画は proinflammatory cytokines である IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 を産生することにより、Treg/Th17 のシフトに重要な役割を果たしている可能性があり、DiHS にお

ける pM0s 分画と Tregs、Th17 の関係を明らかにしようと考えた。pM0s は DiHS 急性期ではほぼ消失しているが、回復期には健康人と同様のレベルに回復していた。このような pM0s の消失は、病変部皮膚においても確認された。pM0s の消失は SJS/TEN では認めず、DiHS 急性期に特徴的な所見と考えられた。Tregs、Th17、pM0s の相関を明らかにするために、急性期、亜急性期、回復期の各時期で各々の相関を検討した。pM0s と Th17 は正の相関を、pM0s と Tregs は負の相関を示し、pM0s がこれらのシフトに関与している可能性が示唆された。

3. DiHS 急性期 Tregs 増大における cM0s 由来の IL-10 および DiHS 回復期の Th17 へのシフトにおける pM0s 由来の IL-6 の関与

pM0s、cM0s が Tregs、Th17 にどのように作用しているかを明らかにするために、Tregs と pM0s、cM0s を共培養した。pM0s、cM0s はともに iTregs を増大させうるが、cM0s は pM0s と比較し有意にその能力が高かった。さらに、抗 IL-10 抗体は、DiHS 由来 cM0s による iTregs 分画の増大を有意に減少させることがわかったが、健康人由来の cM0s では、抗 IL-10 抗体による増大の抑制は殆どみられなかった。

DiHS 回復期には、pM0s の回復が認められると同時に Tregs から Th17 へのシフトが認められる。そこで、DiHS 回復期 pM0s と CD3⁺T 細胞を共培養し、T 細胞分画の CFSE^{low} 分画における Th17 の頻度を検討した。DiHS 回復期の pM0s は Th17 を増殖させる能力が健康由来 pM0s より高く、この増殖は抗 IL-6 抗体により抑制されることが明らかになった。この結果は DiHS 回復期の pM0s から産生される IL-6 が Tregs から Th17 へのシフトを誘導している可能性を示唆していると考えた。

D. 考察

SJS/TEN と DiHS で認められる様々な臨床的な違いがなぜ生じるのかは明確にはされていない。我々は今までの検討で、両者の違いは Tregs の機能の違いに起因することを明らかにしてきた。しかし、このような Tregs の違いが primary か secondary かを

明確にすることこそが重要であると考え、単球が Tregs および Th17 へ及ぼす作用の検討を行った。今回の検討で、cM0s は Tregs と相関し、pM0s は Tregs と逆相関する一方、Th17 と相関することが明らかになり、各 M0s 分画の動態の変化こそが重症薬疹の臨床型を決める重要な因子であると考えられた。

今回の我々の検討で興味深いのは、DiHS 回復期 pM0s からの IL-6 の産生が Tregs から Th17 へのシフトを誘導させる可能性が示唆されたことである。IL-6 は様々な疾患で炎症を誘導し、我々が行った血清サイトカインの検討においても、SJS/TEN では上昇している。これらの結果は、IL-6 を抑制する治療（抗 IL-6 抗体など）が今後の治療の選択肢のひとつになり得ることを示している。これからの治療は、Tregs/Th17 のバランスをターゲットとした治療を選択していく必要があると考えられた。

E. 結論

重症薬疹の病態には患者の PBMC 中の pM0s と Tregs/Th17 の相互作用が極めて重要である。

DiHS, SJS/TEN などの重症薬疹では、Tregs/Th17 の相互作用が時間経過とともに大きく変動するため、治療のターゲットはこれらの相互作用ではないかと考えた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiohara T, Ushigome Y, Kano Y, Takahashi R: Crucial role of viral reactivation in the development of severe drug eruptions: a comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol 2014 (Epub ahead of print).

2. Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, Khan DA, Lang DM, Park HS, Pichler W, Sanchez-Borges M, Shiohara T, Thong BY: International consensus on drug allergy.

Allergy 69: 420-437, 2014.

3. Ishida T, Kano Y, Mizukawa Y, Shiohara T: The dynamics of herpesvirus reactivation during and after severe drug eruptions: their relation to the clinical phenotype and therapeutic outcome. Allergy 69:798-805, 2014.

4. Shiohara T, Takahashi R, Ushigome Y, Kano Y: Regulatory T cells in severe drug eruptions. Curr Immunol Rev 10: 41-50, 2014.

5. Shiohara T: Fixed drug eruption. Up To Date. 2014.10.16

2. 学会発表

1. Shiohara T: Monocytes control treg in severe drug eruptions. Drug Hypersensitivity Meeting 6, 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

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

FPR1 に対するアンタゴニスト検索・スクリーニング用細胞の樹立

FPR1 アンタゴニストのリード化合物の探索

分担研究者 小澤岳昌 東京大学大学院理学系研究科 教授

研究要旨 スティーブンジョンソン症候群 (SJS) や中毒性表皮壊死症 (TEN) 等の重症薬疹は、表皮細胞死により引き起こされる疾患である。その発症は、液性因子の Annexin と、表皮細胞の G タンパク共役型受容体 (GPCR) の 1 種である Formyl Peptide Receptor 1 との相互作用により引き起こされることが知られている。本研究では、化合物ライブラリーからスクリーニングにより FPR1 阻害剤を開発することを目的とした。FPR1 阻害剤探索には、2 段階スクリーニングによる化合物の絞り込みを計画した。FPR1 を発現する蛍光・発光スクリーニング用細胞を樹立し、アッセイ法のプロトコルを確立した。9600 化合物をモデルとしてパイロットスクリーニングを行い、10 種の FPR1 特異的阻害剤を同定した。

A. 研究目的

スティーブンジョンソン症候群 (SJS) や中毒性表皮壊死症 (TEN) 等の重症薬疹は、表皮細胞死により引き起こされる疾患である。その発症メカニズムは、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が、その詳細は未だ不明である。北海道大学医学部皮膚科の阿部准教授らは、表皮細胞死のメカニズムがアポトーシスではなく、ネクロトーシス性細胞死であり、その発症には、液性因子の Annexin と、表皮細胞の G タンパク共役型受容体 (GPCR) の 1 種である Formyl Peptide Receptor 1 (FPR1) との相互作用により引き起こされることを見出している。このような背景をふまえ本研究では、化合物ライブラリーからスクリーニングにより FPR1 阻害剤を開発することを目的とした。そして最終的には、SJS、TEN に対する治療薬を北海道大学の阿部准教授との共同研究により開発することを目的とした。

B. 研究方法

東京大学創薬オープンイノベーションセンターに貯蔵されている化合物ライブラリー (およそ 20 万種類) から FPR1 阻害剤を探索するために、段階的スクリーニングによる化合物の絞り込みを計画した。第一段階のスクリーニングでは、FPR1 活性により

惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を指標として、FPR1 阻害剤候補となる化合物を数%に絞り込む。次に、FPR1 と β アレスチンタンパク質との相互作用を指標として、化合物の更なる絞り込みを計画した。第一段階、第二段階のスクリーニングを遂行するにあたり、安定したスクリーニング用細胞を樹立し、スクリーニング方法のバリデーションを行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令を遵守し、東京大学の機関承認を得て、組換え DNA 実験を遂行した。なお、建物改修にともない、第二種遺伝子組み換え承認を申請中である。

C. 研究結果

FPR1 は G_i 共役型 GPCR であり、通常は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を惹起しない。しかし G16 タンパク質を発現することにより、FPR1 活性化に伴い、細胞内小胞から Ca^{2+} が放出される。そこで HEK293 細胞に、FPR1 と G16 を安定発現する細胞株を樹立した。細胞をアネキキンで刺激すると、細胞内 Ca^{2+} が一過的に上昇し、10 分程度でベースラインに戻ることを蛍光顕微鏡により確認した。次

に、384 穴マイクロプレートに細胞を播種し、各 well 間の蛍光シグナルの偏差を評価した。その結果、偏差は 10%以内であることを確認した。開発したスクリーニング系を用いて、化合物ライブラリー中の 9600 化合物について、パイロットスクリーニング実験を行った。阻害効率は 0%を中心としたガウス分布を示し、その偏差(σ)は 16.1%であった。 $+3\sigma$ 以上の化合物 119 種類をヒット化合物として、第二段階のスクリーニングに供することとした。

第二段階のスクリーニングには、独自の技術である分割ルシフェラーゼ再構成法を用いた FPR1- β アレスチン相互作用による評価系を確立した。分割ルシフェラーゼプロローブを連結した FPR1 と β アレスチンタンパク質を安定発現する HEK293 細胞株を樹立した。リガンド刺激にともない、ルシフェラーゼ発光強度が 75 倍上昇することを確認した。この HEK293 細胞株を 96 穴マイクロプレートに播種し、リガンド存在化における阻害剤実験を行った。第一段階のスクリーニングで得られた 119 種類の化合物を用いて、スクリーニングを行った。再現性ならびに FPR1 選択性を評価した結果、最終的に 10 種類のヒット化合物を取得した。

D. 考察

化合物ライブラリーから FPR1 阻害剤を探索するために、2 種類の HEK293 安定発現細胞株を樹立した。9600 種類の化合物をモデルライブラリーとしてスクリーニング方法のバリデーションを行い、優れた精度で化合物のスクリーニングが可能であることを実証できた意義は大きい。精密な実験プロトコルを確立することにより、プレート間のデータのばらつきを極力抑えることができた。今後は 10 万種類以上の化合物のスクリーニングに展開する計画である。

E. 結論

表皮細胞に発現する GPCR の 1 種 FPR1 の阻害剤探索を目的として、2 種類のスクリーニング用細胞株を樹立した。9600 種類のモデル化合物ライブラリーを用いて、方法のバリデーションを行い、安定したスクリーニングプロトコルを確立した。9600 種類の化合物から 10 種類の FPR1 に選択性を有

する阻害剤を取得した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bioluminescent tools for the analysis of G-Protein-Coupled receptor and arrestin Interactions. M. Hattori and T. Ozawa, RSC Adv., in press.

2. Cell-Based assays and animal models for GPCR drug screening. H. Takakura, M. Hattori, M. Tanaka and T. Ozawa, Methods Mol. Biol., 1272, 257-270 (2015).

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

重症薬疹モデルマウスの作成と病態機序の解析

分担研究者 梶島健治 京都大学大学院医学研究科皮膚科学 准教授
研究協力者 中島沙恵子 京都大学大学院医学研究科皮膚科学 研究員

研究要旨 SJS/TEN (Stevens johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis) といった重症薬疹は、いまだに高率な死亡率を有する重篤な疾患であるにもかかわらず、その進行の急速さや患者数の少なさから病態機序に関する十分な検討を患者サンプルを用いて行うことは困難である。これら疾患の動物モデルの開発と解析は SJS/TEN の病態機序解析に非常に重要である。我々は、Involucrin プロモーター下にモデル自己抗原を発現する遺伝子改変マウス (Ivl-mOVA マウス) を作成し、重症薬疹モデルマウスとして有用であることを確認した。このマウスを用いて、抗体投与により Foxp3 陽性細胞を除去出来る Ivl-mOVA マウスを作製し、FoxP3 陽性細胞の除去により臨床症状が悪化することから、重症薬疹において Foxp3 陽性制御性 T 細胞が重要な役割を果たす可能性が示された。

A. 研究目的

重症薬疹である Stevens-Johnson 症候群 (SJS) や中毒性表皮壊死症 (TEN) はいまだに高率な死亡率を有する重篤な疾患であるにもかかわらず、その進行の急速さや患者数の少なさから病態機序に関する検討を患者サンプルを用いて行うことは困難である。これら疾患の動物モデルの開発と解析は病態機序の解析に重要である。

制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) は重症薬疹の病態に関与することが示唆されている (Azukizawa et al., *E J Immunol*, 2005; Takahashi et al., *J Immunol*, 2009) が、その詳細な機序については未だ不明である。

そこで、我々は、Involucrin プロモーター下にモデル自己抗原を発現する遺伝子改変マウス (Ivl-mOVA マウス) を作成し、SJS/TEN 動物モデルとしての有用性を検討した。さらに、このマウスを用いて本モデルにおける FoxP3 陽性 Treg の重要性についても検討を行った。

B. 研究方法

表皮ケラチノサイトにモデル自己抗原を発現する遺伝子改変マウス (Involucrin プロモーター下にニワトリの卵白アルブミン <ovalbumin (OVA)> を膜結合蛋白として発現する Ivl-mOVA マウス) と CD8⁺T 細胞

が OVA に特異的な T 細胞受容体を持つ遺伝子改変マウス (OT-I マウス) の 2 種類のマウスを用いた。

Ivl-mOVA マウスに、OT-I マウスの脾臓・リンパ節から採取した CD8⁺T 細胞を経静脈的に移入し、皮膚への細胞浸潤や浮腫を耳介厚の変化により評価した。また、発症前・発症早期・発症後・治癒後の皮膚・血清のサンプリングを行った。皮膚サンプルは Hematoxylin & Eosin (HE) 染色で表皮浮腫や表皮細胞の好酸性壊死および細胞浸潤の程度の評価を行い、TUNEL 染色により表皮細胞の壊死の評価を行った。

さらに、Treg が本モデルにおいて果たす役割を検討するために、Ivl-mOVA マウスと Foxp3 遺伝子の制御下で hCD2 を発現するノックインマウス (hCD2-Foxp3 マウス) を交配し、hCD2 抗体投与により全身的に FoxP3 陽性 Treg を除去しうる Ivl-mOVA マウス (Ivl-mOVA;hCD2-Foxp3 マウス) を作製した。

(倫理面への配慮)

研究内容は、「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に従い、京都大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の審議をへて承認を受けており、法令

を遵守して行う。また動物実験については、京都大学の動物実験委員会の審議を経て承認を受けており、施設が定める規則に従い、最大限に動物愛護に配慮した方法で行われる。

なお、本研究は遺伝子治療研究や臨床研究は含まない。

C. 研究結果

Ivl-mOVA マウスに OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞を経静脈的に移入すると、移入後 7 日目より眼瞼皮膚の落屑や体幹皮膚の潮紅が出現した。これらの皮膚症状は移入後 14 日目前後まで増悪を続けた。ケブネル現象陽性所見も認めた。皮膚炎症状と合致して、耳介腫脹は移入後 14 日目をピークに推移し、移入後 28 日目には皮膚炎症状・耳介腫脹ともに改善を示した (図 1)。経過中、一部のマウスでは衰弱・死亡するものもあったが、生存したマウスでは軽度の体重減少と衰弱は認めるものの、移入後 21 日以降は症状の改善とともに衰弱・体重減少ともに回復を認めた。C57BL/6 マウス由来の CD8⁺T 細胞を移入した Ivl-mOVA マウスでは皮膚炎を発症しなかった。HE 染色では、皮疹発症の 7 日目より表皮ケラチノサイトの好酸性壊死を散見し、14 日目には SJS/TEN と同様の表皮の全層性壊死が認められた。TUNEL 染色では、皮疹出現前の 5 日目より TUNEL 陽性細胞を表皮内に認め、7 日目・14 日目とその数は増加を認めた。フローサイトメーターによる浸潤細胞の表面マーカー解析では、OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞の浸潤を認めた。

Ivl-mOVA;hCD2-Foxp3 マウスに OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞を経静脈的に移入したところ、Ivl-mOVA マウスと同様に SJS/TEN 様の皮膚炎を誘導することが可能であった。次に、このマウスの Foxp3 陽性制御性 T 細胞を全身的に除去する目的で、hCD2 抗体を CD8⁺T 細胞移入の 1 日前、移入後 2 日目、5 日目、8 日目、11 日目に経静脈的に投与したところ、hCD2 抗体投与群は、非投与群と比較して皮膚炎症状の著しい増悪を認めた (図 2)。

D. 考察

今回我々は、重症薬疹モデルとして有用な Ivl-mOVA マウスを作製した。さらに、この

マウスを用いて hCD2 抗体の投与により Foxp3 陽性制御性 T 細胞を全身的に除去しうる Ivl-mOVA;hCD2-Foxp3 マウスを作製した。このマウスに OT-I マウス由来の CD8⁺T 細胞を移入し、さらに hCD2 抗体投与により Foxp3 陽性制御性 T 細胞を全身的に除去すると、SJS/TEN 様皮膚炎の著しい増悪を認めた。この結果から、Foxp3 陽性制御性 T 細胞が SJS/TEN の病態に関与していることが示されたが、実際にどのようにその病態を制御しているかは不明である。次年度以降、制御性 T 細胞がどのような機序で SJS/TEN の病態に関与しているか検討を行っていく予定である。

E. 結論

Ivl-mOVA マウスを作製し、マウス重症薬疹モデルとして有用であることを確認した。Foxp3 陽性制御性 T 細胞除去によりマウス SJS/TEN 様皮膚炎は増悪した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda T, Hishizawa M, Kataoka TR, Ohmori K, Takaori-Kondo A, Miyachi Y, Kabashima K. Stevens-Johnson Syndrome Associated with Mogamulizumab-induced Deficiency of Regulatory T cells in an Adult T-cell Leukaemia Patient. *Acta Derm Venereol*. 2014 Nov 26.

2. Shibuya R, Tanizaki H, Nakajima S, Koyanagi I, Kataoka TR, Miyachi Y, Kabashima K. DIHS/DRESS with Remarkable Eosinophilic Pneumonia Caused by Zonisamide. *Acta Derm Venereol*. 2015 Jan 15;95(2):229-230.

2. 学会発表

1. Saeko Nakajima, Kenji Kabashima. Regulation of cutaneous immune homeostasis, by balance between regulatory T cells and effector T cells in a newly developed GVHD-like model, 43th Annual meeting of Japanese society for immunology, Kyoto, December 2014

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

図1 OT-ICD8⁺T細胞移入後の耳介腫脹の経時的変化(移入細胞数: 1×10^6 /head)

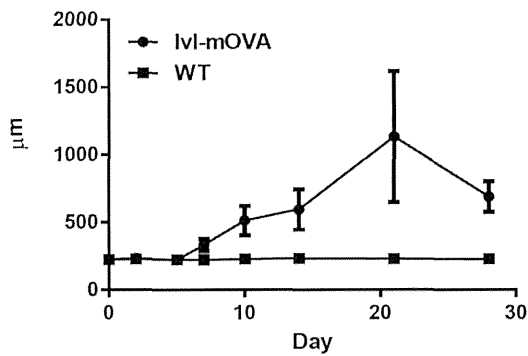
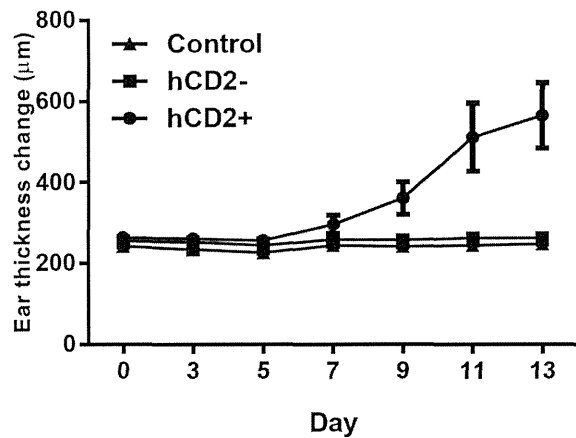


図2 hCD2抗体投与による耳介腫脹の変化(移入細胞数: 1×10^5 /head)



厚生労働科学研究委託費「難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)」
委託業務成果報告書

重症型薬疹のバイオマーカーの検討および薬剤と HLA の結合親和性についての検討
分担研究者 渡辺秀晃 昭和大学医学部皮膚科 准教授

研究要旨 重症型薬疹 (Stevens-Johnson 症候群 : SJS、中毒性表皮壊死症 : TEN) は死亡率 10-20%と予後が悪い。しかしながらこれらの薬疹に関して病勢を反映するバイオマーカーが未だ見つかっておらず、早期確定診断や治療の指標として発見が望まれる。我々は SJS/TEN の発症前後の患者血液から RNA を分離しマイクロアレイを行い 4 つの遺伝子に注目して検討を開始した。

また、近年ジアフェニルスルフォンによる重症型薬疹と HLA-B*1301 の関連が報告されている。そこで HLA-B*1301 と HLA-B*1302 のホモロジーモデルを構築後、HLA-B*1301、HLA-B*1302 とジアフェニルスルフォンの結合様式を解析し、結合部位での結合親和性を評価した。その結果、計算上ジアフェニルスルフォンが HLA-B*1302 よりも HLA-B*1301 と結合親和性が高いことを明らかにした。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群 (以下 SJS)、中毒性表皮壊死症 (以下 TEN) は死亡率が SJS で 4%、TEN では 20%と予後が悪い疾患である。さらに皮疹軽快後も失明や呼吸器障害など重篤な後遺症を残す。SJS/TEN のバイオマーカーとして代表的なものに Granulysin や AFas/sFasL、HMGB1 が報告されている。Granulysin と Fas/sFasL は発症早期では上昇を認めるが、その持続期間が短い点で、HMGB1 は他の薬疹でも増多がみられる点で Biomarker としては未だ不十分な点がある。

一方、近年、重症型薬疹を起こす薬剤と HLA の関係が次々と報告されている。ジアフェニルスルフォンによる薬疹に関しては HLA-B*1301 との強い相関関係が最近報告された。

B. 研究方法

SJS/TEN 患者および軽症の薬疹患者から全血を採取し、RNA を抽出した後マイクロアレイ法を行った。クラスター解析で比較し高変動している遺伝子、および北海道大学の Abe らが報告したネクロプトーシスに関する遺伝子で SJS/TEN で 1.3 倍以上発現変動している遺伝子、SJS/TEN および軽症

型薬疹両群で Raw Data で 100 以上発現している遺伝子で絞り込みを行った。そのなかで特に高発現を認めた遺伝子を SJS/TEN 患者と軽症型薬疹の患者の血液を用い real time PCR 法で発現を確認する。

また、ジアフェニルスルフォンによる薬疹と HLA-B*1301 に関しては次の様に検討を行った。現在までに HLA-B*1301 および HLA-B*1302 の立体構造は明らかになっていないため、まず初めに HLA-B*1301 および HLA-B*1302 と配列が類似し、かつ立体構造が明らかになっている分子を参考に HLA-B*1301 および HLA-B*1302 の立体構造モデルを構築した。次に、Glide の SP モードを利用した精密分子ドッキング計算に基づいて、HLA-B*1301 および HLA-B*1302 とレクチゾールの結合様式を解析し、その結合部位での結合する強さを、MM-GBSA 法 (一点計算) を用いた結合自由エネルギー (ΔG_{bind}) に基づいて評価した。

(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、昭和大学医学部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