

厚生労働科学研究費補助金  
「難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）」  
分担研究報告書

複数のバイオマーカーの組合せによる重症薬疹への進展の予測

分担研究者 梶島健治 京都大学大学院医学研究科皮膚科 教授  
研究協力者 野村尚史 京都大学医学部附属病院 iACT 特定講師  
研究協力者 中島沙恵子 日本学術振興会特別研究員

研究要旨

Stevens-Johnson 症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死症(TEN)は、急速に進行し、死亡率が高い重症薬疹である。しかし、SJS / TEN の進展を早期に予測するバイオマーカーが確立されていないという問題がある。我々はこの問題を解決するため、SJS / TEN 動物モデルの解析を通じた研究を遂行している。

SJS / TEN は患者が少なく、急速に進行するため、臨床検体を用いた病態の解析は困難であり、SJS / TEN の動物モデルの開発が重要である。昨年度までに、我々は、Involucrin プロモーター制御下に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、重症薬疹モデルとしての有用性や、制御性 T 細胞の役割、細胞傷害性 T 細胞の末梢リンパ組織でのクローン除去の解明など、免疫システムの動態を検討してきた。

今年度は、末梢リンパ組織においてクローン除去を誘導する細胞について検討した。その結果、移入直後に CD8 陽性 T 細胞のクローン除去を誘導する細胞は、樹状細胞のような professional antigen presenting cells ではなく、間質由来の細胞であることが分かった。本成果は、GVHD や薬疹で増殖する T 細胞を制御する方法の開発につながると期待される。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死症(TEN)はいまだに死亡率が高い重篤な疾患である。しかしその進行の急速さや症例の希少性から、臨床検体を用いた病態機序の研究が難しい。したがって、動物モデルの開発とその解析による重症薬疹の病態解明が望まれている。一方、臨床現場では、重症化を予測するバイオマーカーの確立が強く望まれている。

我々は、これらの課題にこたえるため、実験動物を中心に検討を継続している。SJS / TEN では、細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞が表皮細胞を攻撃することが病態の本態と考えられている。しかし、これらの細胞傷害性 T 細胞の生体内での動態は明らかでない。そこで我々は、Involucrin プロモーター制御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) とモデル自己抗原 (膜型 OVA) 特異的な T 細胞受容体のみを発現する OT-I マウスを用いて検討してきた。

これまでの研究から、OT-I マウス由来 CD8 陽性 T 細胞 (OT-I-CD8) を Ivl-mOVA マウスに移入すると、移入後 5 日目に Ivl-mOVA マウスの皮膚に浸潤し、移入後 7-10 日目に SJS / TEN 様皮膚炎を発症することがわかっている。

昨年度の研究から、移入した OT-I-CD8 は、移入 18 時間後にフローサイトメーターの検出限界以下まで急激に減少し、移入 24 時間から 48 時間後にリンパ節、脾臓、末梢血に再出現することがわかった。さらに、移入 18 時間後の OT-I-CD8 の消失は、リンパ節内でのクローン除去によると考えられた。

そこで今年度は、clonal deletion を誘導する細胞について検討した。

B. 研究方法

重症薬疹のモデルとして、表皮に膜型 OVA を発現する Ivl-mOVA マウスに、OVA 特異的 T 細胞受容体を発現する OT-I マウスの CD8 陽性 T 細胞 (OT-I-CD8) を移入し、

その動態を解析した。

MHC-I を発現する Ivl-mOVA マウスまたは MHC-I を発現しない b2m<sup>-/-</sup>; Ivl-mOVA マウスに放射線を照射し、congenic の野生型または b2m<sup>-/-</sup> マウス由来骨髄を移入し、骨髄キメラマウスを作成した。

これらのキメラマウスに、OT-I-CD8 を移入し、クローン除去の程度をフローサイトメーターで評価した。

### (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経て承認を受けており、法令を遵守して行った。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った。

なお、本研究は遺伝子治療研究や臨床介入研究は含まない。

## C. 研究結果

MHC-I を発現しない b2m<sup>-/-</sup>; Ivl-mOVA マウスでは、移入 18 時間後のクローン除去が起こらなかった。クローン除去は、移入した骨髄の MHC-I 発現には依存しなかった。

## D. 考察

今回の結果から、Inv-mOVA マウスの末梢リンパ節で惹起されるクローン除去は、骨髄由来細胞ではなく、放射線耐性のリンパ節間質細胞によるものであることがあきらかになった。間質細胞のうちどの細胞がクローン除去を惹起しているか、クローン除去を惹起する細胞が AIRE を発現しているか等については、今後の検討が必要である。

間質細胞によるクローン除去機構を応用することで、自己反応性 T 細胞を除去したり、SJS / TEN における細胞傷害性 T 細胞を除去することが可能になると考えられる。

今後の検討が必要である。

## E. 結論

Ivl-mOVA マウスに移入した OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞は、移入後 18 時間で激減する。その機序は末梢性クローン除去と考えられる。SJS / TEN においても同様の現象が存在するかは検討の余地がある。

今年度の研究から、末梢性クローン除去が、樹状細胞などの professional antigen presenting cells ではなく、放射線耐性の間質細胞であることがあきらかになった。間質細胞によるクローン除去機構を解明することは、有害な CD8 陽性 T 細胞クローンを人為的に除去する方法の開発につながると期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Amano W, Nakajima S, Yamamoto Y, Tanimoto A, Matsushita M, Miyachi Y, Kabashima K: JAK inhibitor JTE-052 regulates contact hypersensitivity by down regulating T cell activation and differentiation. *J Dermatol Sci* 84(3): 258-65, 2016.
2. Honda T, Kabashima K: Novel concept of iSALT (inducible skin-associated lymphoid tissue) in the elicitation of allergic contact dermatitis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 92 (1): 20-8, 2016.
3. Egawa G, Kabashima K: in vivo imaging of cutaneous DCs in mice. *Methods Mol Biol* 1423: 269-74, 2016.
4. Otake H, Otsuka A, Nonomura Y, Iga N, Kabashima K: Up-regulation of activation markers on basophils in patients with

papuloerythroderma. Acta Derm Venereol 96 (32):410-1, 2016.

5. Saito K, Kitoh A, Hanakawa S, Nomura T, Miyachi Y, Kabashima K: Percutaneous exposure to high-dose hapten induces systemic immunosuppression through the inhibition of dendritic cell migration. J Dermatol Sci 81 (2): 136-40, 2016.

## 2. 学会発表

1. 野村尚史、要石就斗、菊地綾子、加来洋、遠藤雄一郎、大日輝記、椋島健治: 下口唇粘膜障害で発症したTS-1によるStevens-Johnson症候群の一例. 第46回日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会, 新宿 / 東京, 平成28年11月5日.
2. Sakurai K, Dainichi T, Matsumoto R, Nakano Y, Kabashima K: Establishment of a novel murine model of psoriasis by activating p38 MAPK pathway. The 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Sendai/Miyagi, December 9-11, 2016.

## 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