

重症薬疹のバイオマーカー探索および病態解析

分担研究者 梶島健治 京都大学大学院医学研究科皮膚科 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 京都大学大学院医学研究科皮膚科 助教

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、未だ死亡率が高い最重症薬疹である。しかし、SJS/TEN の病態の進展を早期に予測するバイオマーカーは未だ確立されていない。我々は SJS/TEN の病態の解析および病態の進展を予測しうるバイオマーカーの確立を目指し、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、動物モデルの開発が重要である。これまでに、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ことを期待される。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群 (SJS)及び中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis; TEN)は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解析は困難である。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 (Ivl)プロモーター制御下にモデル自己抗原 (卵白アルブミン ovalbumin; OVA) 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、OT-I-CD8 細胞は移入後 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。

昨年度までの研究から、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、どの細胞がリンパ節内での clonal deletion を誘導するかについて検討した。

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 $b2m^{-/-}$; Ivl-mOVA マウスに放射線を照射し、congenic の野生型または $b2m^{-/-}$ 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 $b2m^{-/-}$; 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、Ivl-mOVA マウスの末梢リンパ節で惹起されるクローン除去は、放射線感受性のある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確認された。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、疾患治療への応用が期待される。

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. Cho M, Nonomura Y, Kaku Y, Dainichi T, Otsuka A, Kabashima K. Generalized Lichen Nitidus Following Anti-PD-1 Antibody Treatment. JAMA Dermatol. 2018 Mar 1;154(3):367-369.
2. Komori T, Otsuka A, Irie H, Horiguchi A, Honda T, Kabashima K. Drastic effect on giant lung metastatic melanoma by sequential administration of nivolumab with ipilimumab/radiation combination therapy. J Dermatol. 2018 Jan;45(1):e7-e8.
3. Komori T, Otsuka A, Kaku Y, Irie H, Honda T, Hirata M, Kataoka TR, Kabashima K. Total cell necrosis of metastatic malignant melanoma at the

regional lymph node in a patient treatment with nivolumab. J Dermatol. 2018 Jan;45(1):e11-e12.

4. Kitayama N, Nakamizo S, Nonomura Y, Kaku Y, Endo Y, Dainichi T, Okura M, Hida T, Yamashita T, Otsuka A, Kabashima K. Case of diffuse panbronchiolitis developed in a patient with epidermodysplasia verruciformis. J Dermatol. 2017 Dec;44(12):e363-e364.
5. Ono S, Egawa G, Kitoh A, Dainichi T, Otsuka A, Nakajima S, Honda T, Kabashima K. Local inflammation exacerbates cutaneous manifestations in a murine autoimmune pemphigus model. J Allergy Clin Immunol. 2017 Jun;139(6):2026-2028.e5.

2. 学会発表

1. 中島沙恵子: 薬疹のメカニズム. 第81回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 新宿/東京, 平成29年11月18日.
2. Nakajima S., *Candida albicans* skin colonization exacerbates the inflammation of murine psoriasis-like dermatitis: 第46回日本免疫学会学術大会、仙台、平成29年12月14日.

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