

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09781

研究課題名(和文) スティーブンス・ジョンソン症候群は、なぜマイコプラズマ肺炎に伴って発症するのか？

研究課題名(英文) Why does Stevens-Johnson syndrome develop with mycoplasma pneumoniae?

研究代表者

高橋 良 (TAKAHASHI, RYO)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：00317091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：スティーブンス・ジョンソン症候群の発症は、マイコプラズマ肺炎(MP)感染症が関連している事が知られているがその因果関係は判っていない。MP感染症のFoxp3+Tregを精査したところ、回復期では抑制機能が無いIL-17A+Foxp3+細胞が増加していた。IL-17A+Foxp3+細胞の増加は、CD14dimCD16+ proinflammatory monocyteがTLR-2依存性にIL-6を豊富に産生し、Tregから分化させた為であった。このように、MP感染症回復期では機能不全のTregが増加することによって、アレルギー性疾患や自己免疫疾患を発症するリスクが高くなっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although the relation of Stevens-Johnson syndrome (SJS) and Mycoplasma pneumoniae (MP) infection has been well known, it remains unknown how MP infection contributes to SJS development. We investigated the frequencies and phenotype of regulatory T cells (Treg) in the peripheral blood of MP infection and viral infections patients at onset and after clinical resolution, and healthy controls.

The functional Treg was significantly decreased not only in the acute but also resolution stage of MP infection. IL-17A+Foxp3+ T cells was significantly increased in the resolution stage of MP infection. The development of IL-17A+Foxp3+ cells were found to be dependent on the generation of the 'pathogenic' pMOs, which are characterized by the potential to abundantly produce IL-6 in a TLR-2-dependent manner. Our findings suggest that MP infections could serve to enhance the risk of subsequently developing severe allergic diseases by chronically abrogating Treg-mediated suppression.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アレルギー 感染症 薬疹 制御性T細胞 SJS

1. 研究開始当初の背景

(1) スティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome : SJS) とマイコプラズマ肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* : MP) 感染症の関連性について

SJS は、一般市販薬の風邪薬・頭痛薬を含む数千種類にも及ぶ薬剤によって引き起こされる深刻な薬剤アレルギーである。SJS は高熱とともに口唇・口腔・眼結膜・外陰部に高度の発赤・びらん・出血などの粘膜病変が、さらに全身の皮膚に紅斑・水疱・びらんが認められる重篤な全身性疾患である。

SJS の発症原因として、単純疱疹ウイルス、マイコプラズマ肺炎、細菌、真菌等の種々のウイルスや細菌による感染症が先行して見られることが知られている。しかしながら、これらの感染症が SJS の発症機序にどのように関連しているのかは明らかになっておらず、その因果関係を解明することによって、SJS の発症を抑える可能性がある。

(2) 重篤薬疹の発症機序に Treg の質的異常が関与している事を発見

我々は以前の研究で、SJS の急性期患者末梢血液中に存在する免疫の調和を司る CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の質的異常があることを見出した。(研究業績 : Takahashi R et al., The Journal of Immunology, 8071-79, 2009、高橋 良 : 平成 20~21 年度科学研究費補助金・若手研究 (B) 研究課題、及び第 11 回ガルドルマ賞受賞論文)。本研究では、急性期における Treg の数は健常人とほぼ同等の割合が保たれているにもかかわらず、Treg の主要な機能である抑制機能が優位に失われており、回復期になると抑制機能が正常化した。すなわち、通常は Treg が過剰な免疫反応を抑制しているが、抑制機能が低下した事によって、エフェクター T 細胞が薬剤に対して必要以上に反応し、その結果、重篤な皮膚症状を引き起こす SJS を発症する事が考えられた。

(3) では、MP 感染症患者の末梢血 Treg はどのような状態になっているのか？

MP 感染症が SJS 発症に先立って見られる事から、MP 感染症の Treg に何らかの変調が起きている可能性が考えられた。そこで MP 感染症患者末梢血の Treg を、水痘 (varicella zoster virus : VZV)、ヒトパルボウイルス B19 (human parvovirus B19 : PB19) 感染症など、一般的なウイルス感染症を対照として数や機能等を解析した。

MP 感染症患者急性期及び回復期の末梢血中の Treg 数を調べると、健常人と比較して有意差は見られなかった。次に、Treg の抑制機能を調べた結果、一般的なウイルス感染症の急性期では Treg の抑制機能が低下し、その結果 CD8⁺T 細胞等の抗ウイルス作用活性が上昇し、ウイルス排除の働きを高める。実際、対照疾患の VZV 及び PB19V 感染症の急性期

では Treg の抑制機能が優位に低下。そして回復期では健常人と同程度に復帰した。ところが MP 感染症では、急性期のみならず回復期でも抑制機能が著しく低下していた。しかも驚くべき事に、回復後 3 ヶ月~1 年を経過しても抑制機能が持続的に低下していた事を新たに発見した。

さらに Treg のフェノタイプを調べると、CCR6⁺の Treg が MP 感染症患者で優位に多い事が判った。そこで CCR6⁺および CCR6⁻の Treg の抑制機能を調べたところ、CCR6⁻ Treg の function が CCR6⁺よりも低い事が判った。すなわち、MP 感染症の Treg の機能が低下している理由は、CCR6⁻ Treg の割合が増加している為と考えられた。(研究業績 : 高橋 良 : 平成 22~23 年度科学研究費補助金・若手研究 (B) 研究課題)

しかしながら、なぜ MP 感染症が回復した後も Treg の機能が低下し続けてしているのかは、解明できていない。

2. 研究の目的

重症薬疹の SJS の発症には、MP 感染症が関連している事が知られているが、その因果関係は判っていない。我々は、以前に SJS 患者急性期の末梢血では Treg の抑制機能が著しく低下していることを見出した。この Treg の質的変化が SJS 発症に関与すると推測し、MP 感染症の患者末梢血中の Treg を解析したところ、Treg の抑制機能が回復後も長期間にわたって持続的に低下している事を見出したが、なぜそうなるのかは明らかになっていない。近年、我々は単球のサブポピュレーションが Treg の機能・分化を制御する事を見出した。本研究では MP 感染症患者の単球と Treg の機能解析とインタラクションの解析を行い、MP 感染症でどのようにして Treg の抑制機能低下が持続されつづけ、そして SJS を発症するのかを解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) MP 感染症の急性期および回復期、ボランティア健常人からのリンパ球の採取・保存。杏林大学医学部付属病院皮膚科の医師の協力の元、十分なインフォームドコンセントを行い、サンプル採取の協力を得られた MP 感染症患者の急性期・回復期、及び健常人より採血し、リンフォプレップを用いて末梢血単核細胞 (PBMC) を分離後、解析時まで細胞凍結保存液 (セルバンカー) 下で -80 ディープフリーザーにて凍結保存した。

(2) PBMC 中に存在する Treg のフェノタイプの詳細な解析。

anti-human CD25、Foxp3、CD4、CD127、CD39、CTLA-4、HELIOS、CD45RA 等のモノクローナル抗体を使用し、当教室現有設備のフローサイトメトリー (FCM : BD 社 FACSCanto II)

を用いて、凍結保存した各症例患者・健常人の PBMC を計測し、Treg 上のそれらの発現を個々の細胞レベルで解析し、発現様式がどのように変化しているのかを調べた。一般的に抑制機能を持つ Treg のフェノタイプは、CD4⁺Foxp3⁺ CD25⁺ CD127^{mid} CD39⁺ CTLA-4⁺ HELIOS⁺ であるが、Foxp3⁺細胞を CD45RA と Foxp3 の発現強度によって、抑制機能を持つ CD45RA⁺Foxp3⁺ natural Treg (nTreg)、CD45RA⁺Foxp3⁺ induced Treg (iTreg)、そして抑制機能が無い CD45RA⁺Foxp3⁺ non-suppressive Treg の 3 種類の分画の頻度を調べるのが重要である。

(3) PBMC 中の Th17 の測定

IL-17A を産生する Th17 (IL-17A⁺細胞) 細胞は、自己免疫疾患やアレルギーの発症に関与しているが、Treg の分化は Th17 と相互に関係し、かつて Treg だった細胞が Th17 へ分化する (ex Treg) ことも近年の研究報告で判ってきている。MP 感染症患者では、Treg の抑制機能が低下していることから、抑制機能のある iTreg が IL-17A を産生する Th17 へ分化している可能性を否定出来ない。そこで凍結保存した各症例患者・健常人の PBMC を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 及び Ionomycin の混合溶液で 4 時間刺激し、産生されるサイトカインを Brefeldin A で細胞内に留めさせた後、anti-IL-17、CD4、CD45RA、Foxp3 モノクローナル抗体で染色し、FCM で測定した。CD4⁺細胞中の Th17 の割合だけではなく、iTreg/non-Treg 中における IL-17A の陽性率を算出し、健常人と比較した。

(4) 単球の解析

対象患者の PBMC を anti-CD14、CD16 モノクローナル抗体で染色し、単球のサブポピュレーションの割合を測定した。単球は、CD14 と CD16 の発現によって CD14⁺CD16⁻ classical monocyte (cMO) と CD14^{dim} CD16⁺ proinflammatory monocyte (pMO) 分画に分けることが可能である。それぞれの分画からのサイトカイン産生を測定するために、Toll-Like receptor 2 (TLR2; MP を認識) リガンドの Pam3Cys-SKKKK、比較対象として TLR4 リガンドの Lipopolysaccharide (LPS: グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分) で PBMC を刺激し、Brefeldin A を添加して 4 時間培養後、細胞内サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-1 等) を FCM で解析した。なお、IL-10 の場合は、Brefeldin A の代わりに Monensin を使用し、15 時間培養を行った。

(5) MP 感染症患者の単球が抑制機能の無い CD45⁺Foxp3⁺分画 (non-Treg) を選択的に誘導するのか?

我々が開発した単球を用いた Treg 誘導アッセイ (Takahashi R et.al., The Journal of Immunology 192: 969-978. 2014) を使用し、健常人から磁気ビーズソーターを使用して

CD3⁺T 細胞を分取後、蛍光細胞トレーサーの CFSE 色素で染色し、健常人及び MP 感染症患者から pMO (cMO) を FACS Aria セルソーターで分取後、CFSE⁺CD3⁺ T 細胞と anti-CD3+CD28 モノクローナル抗体存在下で 96well ラウンドマイクロプレートにて培養を行った。細胞内に長期間存在する事が可能な CFSE 蛍光色素は、細胞分裂毎に dilution されて、その蛍光強度が低下するため、細胞分裂を容易に判定することができる。

培養 7 日目に細胞を回収し、Brefeldin A 存在下で PMA 及び Ionomycin の混合溶液で 4 時間刺激し、CD4、CD45RA、anti-IL-17A、Foxp3 モノクローナル抗体で染色し、FCM で測定した。この時、CFSE の蛍光強度が低い分画 (CFSE^{low}) に存在する細胞が、新たに誘導された細胞である。CFSE^{low}Foxp3⁺、CFSE^{low}IL-17⁺ の割合、iTreg、non-Treg 分画の割合、及びそれらにおける IL-17A 発現を解析した。

4. 研究成果

(1) MP 感染症回復期患者末梢血中に IL-17A⁺ の induced Treg/ non-suppressive Treg 細胞が増加していることを見出した。

MP 感染症患者の急性期・回復期、及び MP 感染症の比較対象として VZV、EB ウイルス感染症、PB19 感染症等のウイルス疾患の急性期・回復期、そして健常人における Treg の末梢血中における割合の計測、皮膚ホーミングレセプターやケモカインレセプター発現頻度の解析を行った。健常人と比較して MP 感染症の急性期/回復期では CD4⁺細胞中の CD25⁺Foxp3⁺Treg の頻度に変化はなく、皮膚ホーミングレセプター、ケモカインレセプターの発現頻度、Treg の代表的なマーカーである CTLA-4 等の発現にも変化が見られなかった。MP 感染症の Treg を精査すると、急性期・回復期では抑制機能を持つ iTreg が減少し、non-suppressive Treg が増加していることを明らかにした。さらに proinflammatory サイトカインである IL-17A を測定したところ、MP 感染症の回復期で優位に増加しており、IL-17A⁺ の induced Treg/ non-suppressive Treg 細胞が増加していることを明らかにした。

(2) MP 感染症回復期患者末梢血中の pMO が MP の菌体成分を TLR2 で認識し、IL-6 を産生することを見出した。

我々は以前、Treg のサブポピュレーションの変調に単球から産生されるサイトカインが関与している事を明らかにしている。単球は MP の菌体成分を TLR2 で認識し活性化する事がわかっているので、その ligand の Pam3Cys-SKKKK で刺激してどのようなサイトカインが産生されるのか調査したところ、pMO から IL-6 (T 細胞を Th17 に分化誘導させるサイトカイン) 産生が MP 感染症の回復期で健常人と比較して優位に増加していた事を明らかにした。この現象は、MP 感染症

急性期のサンプルや比較対象として実験を行ったTLR4 ligand 刺激では見られなかった。

(3) MP 感染症回復期患者末梢血中の pMO からの IL-6 が IL-17A⁺Foxp3⁺細胞を誘導させた。

次に、実際に MP 感染症回復期の pMO が IL-17A⁺Foxp3⁺細胞を誘導するのか、セルソーターで患者末梢血単核細胞から pMO を分取し、ボランティアの健常人より得た CD3⁺T 細胞を anti-CD3+CD28 モノクローナル抗体存在下で共培養を行ったところ、IL-17A⁺Foxp3⁺細胞が有意に増加した。この増加は anti-IL-6 抗体を添加することによって抑制されたことから、pMO から産生された IL-6 が IL-17A⁺Foxp3⁺細胞を誘導したと推測された。

(4) MP 感染症回復期患者末梢血中の pMO の TLR 発現に変化が見られた。

TLR2 は TLR1 及び TLR6 とヘテロダイマーを構成しリガンドと結合し細胞が活性化するため、TLR の発現頻度によって細胞の活性化が変化する可能性が考えられる。そこで、本年度では、MP 感染症患者とボランティアの健常人より得た末梢血中の pMO の細胞膜に発現している TLRs (TLR1, 2, 6) の発現頻度を、フローサイトメトリーを用いて比較調査した。TLR1 の発現は MP 感染症急性期・回復期共に健常人と比較して有意差は見られなかったが、驚くべきことに TLR2 の発現は MP 感染症急性期・回復期共に健常人よりも有意に発現が低下していた。一方、TLR6 の発現は MP 感染症回復期で有意に発現が増加していたことを見出した。

以上の結果をまとめると、一般的なウイルス感染症の急性期では、病原体を排除するために一時的に抑制機能がある iTreg が減少し、免疫を活性化させ、回復期になると再び健常人と同等のレベルまでに iTreg が“復帰”する。この機序は単球には依存しない一般的な機構であると思われる。しかしながら、MP 感染症では回復期になっても iTreg が減少し続けたままで、さらに抑制機能が無い IL-17A⁺Foxp3⁺細胞が増加し続けていた。これは pMO が TLR2 を介して MP を認識して過剰な IL-6 を産生した結果、iTreg を IL-17A⁺Foxp3⁺に分化誘導したと推測され、MP 感染症特有の単球に依存した機序によるものである。

このように、MP 感染症の回復期では、“病原性の pMO”によって長期間にわたって免疫のバランスが崩れ、免疫活性化状態が維持され続け、その結果、SJS を始めとするアレルギー性疾患や自己免疫疾患を発症するリスクが高くなっていると思われる。故に、MP 感染症では回復期においても慎重にフォローアップすることが必要であると考えられ、また将来的には、MP 感染症を起因とした SJS では、pMO と Treg を治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

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 49:192-202, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

Ryo Takahashi, Yukiko Ushigome, Tetsuo Shiohara: An unfavorable shift from Treg to Th17 development can be preventable by selective depletion of IL-6-producing proinflammatory monocytes. 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Okayama, December 11-13th, 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 高橋 良 (TAKAHASHI RYO)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：00317091

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()