

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16022

研究課題名(和文)好中球と表皮細胞に起因した重症薬疹発症の機序解明と早期診断血清マーカーの確立

研究課題名(英文)The elucidation of mechanisms underlying severe cutaneous adverse drug reactions induced by neutrophils and the establishment of early diagnostic markers

研究代表者

木下 真直 (Manao, Kinoshita)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90813717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症薬疹である Stevens-Johnson症候群 (SJS) と中毒性表皮壊死症 (Toxic Epidermal Necrolysis: TEN) は、全身の表皮壊死に加え多臓器障害を伴い、ときに致死的となる。我々は、活性化した好中球が表皮内に浸潤し、Neutrophil extracellular traps (NETs) を形成することが、SJS/TENの病態に關与していることを見出した。さらに、NETs により放出される抗菌ペプチド (LL37) が表皮に作用することで、ネクロプトーシスによる広範な表皮細胞死が惹起されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬疹は内服薬や注射薬などの投薬により発症し、全身の皮膚粘膜に障害をきたす。特に重症薬疹である SJS/TEN は、全身の表皮壊死に加え多臓器障害を伴い、ときに致死的となる。仮に救命できても、失明など重篤な後遺症を残す患者は多い。薬剤による健康障害としては、重症薬疹が最多である (医薬品医療機器総合機構の集計)。

本来、治療目的で行われる投薬による医原性疾患であること、老若男女を問わず発症しうること、急激な転機で致死的になり得ることから、その病態解明と治療確立は切迫した課題である。

研究成果の概要(英文)：Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis (SJS/TEN) are life-threatening mucocutaneous adverse drug reactions characterized by massive epidermal detachment. We found a mechanism by which neutrophils trigger inflammation during early phases of SJS/TEN. Skin-infiltrating neutrophils undergoing neutrophil extracellular traps (NETs) released LL-37, an antimicrobial peptide, which induced formyl peptide receptor 1 (FPR1) expression by keratinocytes. FPR1-expression rendered keratinocytes vulnerable to necroptosis. Necroptotic keratinocytes further released LL-37 to induce FPR1 expression on surrounding keratinocytes, which likely amplified the necroptotic response. This pathway may be leveraged to establish both early diagnostic markers and therapeutic targets.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：Stevens-Johnson症候群 中毒性表皮壊死症 好中球 NETs NETosis

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬疹は内服薬や注射薬などの投薬により発症し、全身の皮膚・粘膜に障害をきたす疾患である。特に重症薬疹である Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と中毒性表皮壊死症 (Toxic Epidermal Necrolysis: TEN) は、全身の表皮壊死に加え多臓器障害を伴い、時に致死的となる。仮に救命できても、失明など重篤な後遺症を残す患者は多い。さらに、薬剤による健康障害としては、重症薬疹が最多である (医薬品医療機器総合機構の集計)。

本来、他疾患の治療のための投薬による医原性疾患であること、老若男女を問わず発症しうること、急激な転機で致死的になり得ることから、その病態解明と治療確立は切迫した課題である。

SJS/TEN の病態は、全身の広範な表皮細胞の壊死による生体バリアの崩壊にあるが、表皮細胞死に至るまでの一連の分子機序は十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、患者末梢血細胞、血清や水疱内容液、ヒト表皮培養系、ヒト血液細胞培養系を用いて、SJS/TEN において表皮細胞壊死に至るまでの一連の分子メカニズムを明らかにすることを目標としている。特に、我々はこれまであまり注目されていなかった好中球が病態に関与していると仮説を立て、研究を進めた。

### 3. 研究の方法

#### 【検体収集】

まずは、SJS/TEN の病態において好中球がどの程度皮膚病変中に観察されるのか、またその好中球にどのような形態学的・機能的変化があるのかを検討すべく、SJS/TEN の皮膚組織標本を収集した。また、血清や、より病変局所を反映すると想定される水疱液を収集した。

これらの検体は単独施設では十分なサンプル数を確保できないことから、新潟大学、北海道大学、京都大学、慶應義塾大学、杏林大学の各施設から、倫理委員会の審査を経て、検体を収集することにより、科学的妥当性を担保できるサンプル数を確保した。なお、対照疾患として、薬疹類縁疾患 (播種状紅斑丘疹型薬疹、多形滲出性紅斑、固定薬疹、薬剤性過敏症症候群) 好中球性疾患 (急性汎発性発疹性膿疱症、尋常性乾癬、汎発性膿疱性乾癬、壊疽性膿皮症、ペーチェット病、敗血症) 自己免疫性疾患 (全身性エリテマトーデス、急性移植片対宿主病、粘膜類天疱瘡、後天性表皮水疱症) などの組織標本と血清を収集し、解析した。水疱液に関しては、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、第 1 度熱傷、带状疱疹、外傷性水疱、虫刺症を対照疾患として収集・解析した。

さらにより急性病態を的確に捉えるため、急性期の SJS/TEN 患者の末梢血中の好中球、リンパ球、抗原提示細胞なども採取・解析した。

#### 【解析手法】

まず、組織切片中の好中球の存在やその形態変化についてヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin Eosin) 染色、電子顕微鏡などを用いて解析を行った。さらに、好中球を標識するため、抗 Myeloperoxidase, Neutrophil elastase, CD66b 抗体などを用いた免疫染色法により、これらタンパク質発現の変化や形態学的変化を観察した。

さらに、急性期の患者末梢血中の単核球、好中球、CD4 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球、抗原提示細胞の細胞数や表面マーカー発現をフローサイトメトリーで解析したり、これら細胞分画

を薬疹の原因薬や刺激薬剤の存在下に培養した状況での細胞上清や細胞におけるタンパク発現・遺伝子発現をマススペクトロメトリー、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、Western Blot 法、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)などにより検討した。

加えて、患者血清や薬剤刺激細胞上清、各種研究試薬を添加した時の好中球や培養表皮細胞の形態的变化や細胞死の状態を免疫染色法、細胞毒性アッセイ(LDH assay)などで評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 元来、SJS/TEN は獲得免疫機序により発症すると説明され、好中球の病態への関与は注目されてこなかった。事実、SJS/TEN の病変部において好中球が非常に多く浸潤していることは一般的事実としてはあまり認知されていない。しかし、SJS/TEN 患者の病理標本を注意深く観察すると、表皮壊死が起こる前の発症初期において好中球が真皮上層から表皮に浸潤していることが確認された。この好中球の浸潤は病初期の極めて短い期間(発症3日後がピーク)でのみ多く観察され、その後は好中球自身の細胞死によって速やかに好中球形態を呈しなくなってしまうために、これまであまり注目されて来なかったと判明した。

さらに、水疱液中でも非常に多くの好中球が検出されることをフローサイトメトリーにより確認した。

(2) 次にこの好中球の変化について免疫染色、電子顕微鏡観察などにより観察した。大変興味深いことに、表皮内に浸潤している好中球は網目状にクロマチンや抗菌ペプチドを放出する Neutrophil Extracellular Traps (NETs) 形態を呈していることが判明した。これにより、抗菌ペプチド LL-37 が多量に放出されていることが確認された。また LL-37 は SJS/TEN 病勢期の血清や水疱液中でも上昇していることが確認された。

さらに、SJS/TEN 患者血清や水疱液を正常な好中球に添加すると NETs が誘導されることが確認された。この血清による NETs の誘導は、他の薬疹疾患(播種状紅斑丘疹型薬疹、多形滲出性紅斑、固定薬疹、薬剤性過敏症症候群)や表皮壊死を呈するような類似疾患(固定薬疹、急性移植片対宿主病)などでは見られず、SJS/TEN において特異的な現象であった。

(3) 次に好中球の浸潤とその NETs 形成が、SJS/TEN の病態にどのように関与しているのかを検討した。NETs で放出される物質を培養表皮細胞に添加して、その表皮細胞の受容体発現を RT-PCR 法ならびに、Western Blot 法などで検討した。

NETs で放出される物質のうち LL-37 は、SJS/TEN にみられる表皮細胞死であるネクロプトーシスの誘導に重要な N ホルミルペプチド受容体 1 (FPR1 受容体)の発現を惹起することを見出した。この FPR-1 受容体は単球由来の Annexin A1 との相互作用によってネクロプトーシスを誘導することが報告されており、NETs は表皮細胞に FPR-1 受容体の発現、ひいてはネクロプトーシスを誘導することに関与していることが判明した。

(4) 最後に、この NETs がどのように誘導されるのか、について解析を行った。

SJS/TEN 患者の末梢血中の単核細胞を単離し、原因薬剤で刺激後の細胞上清を正常好中球に添加すると NETs が誘導された。SJS/TEN 患者の末梢血単核細胞は NETs 誘導物質を放出していると考えられた。

さらに、この NETs を誘導する物質の同定を試みた。SJS/TEN、播種状紅斑丘疹型薬疹、薬剤性過敏症症候群 などの既往患者から末梢血単核細胞を収集し、原因薬剤刺激した場合に放

出される物質を質量分析解析や ELISA 法により同定・定量した。このなかで SJS/TEN で特異的に放出される物質を絞り込み、さらにその中から NETs 誘導能がある物質を同定した。加えて、SJS/TEN 既往患者末梢血から CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、抗原提示細胞などの分画を抽出し、原因薬剤刺激下におけるどのような細胞から NETs 誘導能がある物質が放出されるか検討した。これらの解析から、SJS/TEN 疾患特異的に、薬剤特異的 CD8 陽性 T 細胞から NETs 誘導物質が放出され、それが SJS/TEN 病態の起爆剤となっている可能性が明らかとなった。この NETs 起爆物質によって一度 NETs が形成されると、その NETs からもさらなる NETs 誘導物質が放出されることも判明し、フィードフォワード制御により、NETs 進行が加速していくことが明らかになってきた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hasegawa Akito, Shinkuma Satoru, Hayashi Ryota, Hama Natsumi, Watanabe Hideaki, Kinoshita Manao, Ogawa Youichi, Abe Riichiro	4. 巻 20
2. 論文標題 RIP3 as a diagnostic and severity marker for Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 2213-2198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaip.2020.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita Manao, Ogawa Youichi, Yamamoto Saori, Simada Shinji, Harada Kazutoshi, Kawamura Tatsuyoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Downregulation of integrin $\alpha$ 6 on keratinocytes in the scar of lichen planopilaris and folliculitis decalvans: Relevance for the disappearance of epidermal Langerhans cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 610 ~ 614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hama Natsumi, Nishimura Keiko, Hasegawa Akito, Yuki Akihiko, Kume Hideaki, Adachi Jun, Kinoshita Manao, Ogawa Youichi, Nakajima Saeko, Nomura Takashi, Watanabe Hideaki, Mizukawa Yoshiko, Tomonaga Takeshi, Shimizu Hiroshi, Abe Riichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Galectin-7 as a potential biomarker of Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis: identification by targeted proteomics using causative drug-exposed peripheral blood cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 2894 ~ 2897.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaip.2019.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Youichi Ogawa, Manao Kinoshita, Shinji Shimada, Tatsuyoshi Kawamura	4. 巻 10
2. 論文標題 Zinc and Skin Disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 199 ~ 199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu10020199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Manao, Okamoto Takashi, Sano Shinya, Mitsui Hiroshi, Takeichi Takuya, Sugiura Kazumitsu, Akiyama Masashi, Shimada Shinji, Kawamura Tatsuyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Deficiency of the interleukin-36 receptor antagonist dramatically improved by secukinumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e280 ~ e281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14330	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Youichi, Kinoshita Manao, Mizumura Nao, Miyazaki Shiho, Aoki Rui, Momosawa Akira, Shimada Shinji, Kambe Taiho, Kawamura Tatsuyoshi	4. 巻 138
2. 論文標題 Purinergic Molecules in the Epidermis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2486 ~ 2488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.04.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Manao, Hirayama Yuri, Fujishita Kayoko, Shibata Keisuke, Shinozaki Youichi, Shigetomi Eiji, Takeda Akiko, Le Ha Pham Ngoc, Hayashi Hideaki, Hiasa Miki, Moriyama Yoshinori, Ikenaka Kazuhiro, Tanaka Kenji F., Koizumi Schuichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Anti-Depressant Fluoxetine Reveals its Therapeutic Effect Via Astrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 72 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.05.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita M, Ogawa Y, Takeichi T, Okamoto T, Osada A, Shimada S, Sugiura K, Akiyama M, Kawamura T, Tsukamoto K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Impetigo herpeticiformis with IL-36RN mutation successfully treated with secukinumab.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 381-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Youichi, Kinoshita Manao, Shimada Shinji, Kawamura Tatsuyoshi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Zinc in Keratinocytes and Langerhans Cells: Relevance to the Epidermal Homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5404093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Y, Kinoshita M, Shimada S, Kambe T, Kawamura T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Zinc transporters in the epidermis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Y, Kinoshita M, Sato T, Shimada S, Kawamura T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Biotin Is Required for the Zinc Homeostasis in the Skin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients.	6. 最初と最後の頁 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Manao Kinoshita, Youichi Ogawa, Natsumi Hama, Inkin Ujiie, Jun Adachi, Shinji Shimada, Yasuyuki Fujita, Hayato Takahashi, TakeshiTomonaga, Riichiro Abe, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps initiate and exacerbate Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis
3. 学会等名 The Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manao Kinoshita, Kayoko Fujishita, Keisuke Shibata, Yuri Hirayama, Youichi Shinozaki, Eiji Shigetomi, Yoshinori Moriyama, Kazuhiro Ikenaka, Kenji F. Tanaka, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Anti-depressant fluoxetine reveals its therapeutic effect via astrocytes
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manao Kinoshita
2. 発表標題 Anti-depressant fluoxetine reveals its therapeutic effect via astrocytes
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of the Japan Glia
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manao Kinoshita
2. 発表標題 NETosis-necroptosis axis mediated by LL-37 initiates and exacerbates Stevens- Johnson Syndrome (SJS) / Toxic Epidermal Necrolysis (TEN)
3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ステイブンス・ジョンソン症候群及び又は中毒性表皮壊死症の評価方法、評価のためのデータ取得方法、及び評価用キット	発明者 木下真直	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-037418	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-



## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小川 陽一  (OGAWA YOUICHI)		
研究協力者	川村 龍吉  (KAWAMURA TATSUYOSHI)		
研究協力者	濱 菜摘  (HAMA NATSUMI)		
研究協力者	阿部 理一郎  (ABE RIICHIRO)		
研究協力者	氏家 韻欣  (UJIIE INKIN)		
研究協力者	長谷川 瑛人  (HASEGAWA AKITO)		
研究協力者	中島 沙恵子  (NAKAJIMA SAEKO)		
研究協力者	野村 尚史  (NOMURA TAKASHI)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	足立 淳  (ADACHI JUN)		
研究協力者	島田 眞路  (SHIMADA SHINJI)		
研究協力者	藤田 靖幸  (FUJITA YASUYUKI)		
研究協力者	高橋 勇人  (TAKAHASHI HAYATO)		
研究協力者	水川 良子  (MIZUKAWA YOSHIKO)		
研究協力者	朝長 毅  (TOMONAGA TAKESHI)		
研究協力者	永尾 圭介  (NAGAO KEISUKE)		
研究協力者	小泉 修一  (KOIZUMI SCHUICHI)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------