

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16205

研究課題名（和文）重症薬疹の病態解明と新規バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Investigation of the pathogenesis and identification of biomarkers for Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis

研究代表者

長谷川 瑛人 (Akito, Hasegawa)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90749574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000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（SJS）や中毒性表皮壊死症（TEN）は、広範囲のびらんを特徴とする、重篤な薬疹である。SJS/TENでは、表皮細胞がアポトーシスやネクロトーシスという細胞死を起こす。本研究では、パイロトーシスという細胞死が病態へ関与するか解析した。SJS/TENの病変部では、パイロトーシスもみられた。培養表皮細胞を用いて、重症薬疹モデル細胞を作成し、細胞死の各経路の相互作用について解析した。RIP1阻害剤添加により、モデル細胞の細胞死の量が優位に低下した。このことから、RIP1は重症薬疹における、各種細胞死の経路の主要調節因子として働いていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スティーブンス・ジョンソン症候群（SJS）や中毒性表皮壊死症（TEN）は、広範囲のびらんを特徴とする、致死率の高い重篤な薬疹である。本研究では、SJS/TENの病態に深く関わる、表皮細胞の細胞死の病態を解明することを目指した。

SJS/TENでは、表皮細胞がアポトーシスやネクロトーシスという細胞死を起こす。その他に、別の細胞死であるパイロトーシスもみられた。我々は重症薬疹のモデル細胞を作成し、各種細胞死の阻害効果を解析した。RIP1阻害剤により細胞死の量が優位に低下した。RIP1はSJS/TENの新規治療ターゲットとして有用である可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) are life-threatening, severe adverse cutaneous drug reaction. In lesional skin on SJS/TEN, apoptosis and necroptosis were shown. In this study, we investigate whether pyroptosis, other type of cell death, was shown in SJS/TEN.

In epidermis of SJS/TEN patients, pyroptosis was also occur. We established SJS/TEN model cell which was induced apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. Using this model cell, we analyzed regulation factors for each cell death pathway. Addition of RIP1 inhibitor to model cell decreased the mount of cell death. This result suggested that RIP1 may act as main regulator of cell death in SJS/TEN.

研究分野：重症薬疹

キーワード：重症薬疹 細胞死 ネクロトーシス パイロトーシス インフラマゾーム

1. 研究開始当初の背景

スティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome: SJS) や中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis: TEN) などの重症薬疹は、全身の皮膚の広範囲にびらん、表皮剥離を生じる、重篤な疾患である。発熱や全身倦怠感などの全身症状に加え、眼や口唇、外陰部などの皮膚粘膜移行部に重篤な粘膜病変がみられる。これらは稀な疾患ではあるが、高い死亡率を有する (SJS: 4.8%, TEN: 14.8%)。そのため、発症早期に正確に診断し、適切な治療を開始することが必要とされている。しかしながら、その病態には未だに不明な点も多く、早期診断に有効な検査法も確立していない。

SJS/TEN は病理組織学的に表皮細胞の細胞死を特徴とする。この細胞死には apoptosis と necroptosis という 2 種類のプログラムされた細胞死が関与している。Apoptosis 経路や necroptosis 経路に関係する経路には inflammasome 経路がある。Inflammasome 経路は主に炎症を制御する経路であるが、pyroptosis というタイプの細胞死を起こすことも分かっている。この inflammasome 経路が SJS/TEN の病態に関与するかについての研究はなされていない。

2. 研究の目的

本研究は、これまで研究がなされていない、SJS/TEN の病態における inflammasome 経路の関与を解析し、診断や重症度予測に有用なバイオマーカーを開発することを目的とする。SJS/TEN において特異的な病態を解明することが、早期診断のための検査法の開発につながると期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、SJS/TEN において、inflammasome 経路が活性化しているかどうか、apoptosis 経路や necroptosis 経路との調節因子がどのように働いているかを解明し、それを早期診断、重症度予測バイオマーカーの開発へ応用することが目標である。

(1)

SJS/TEN の病変部皮膚で pyroptosis が起きているか解析した。本研究の事前検討にて、SJS/TEN 患者の病変部皮膚において、活性型 caspase 1 が検出されることを見出し、inflammasome 経路が病態に関与している可能性があることを確認している。

今回我々は、SJS/TEN 患者の病変部皮膚の凍結切片を用いて pyroptosis のマーカーである活性型 gasdermin D が検出されるかどうか、蛍光免疫染色を用いて解析した。

また、過去の研究で、表皮細胞に SJS/TEN 患者急性期の血清を添加すると細胞死を誘導できることを明らかにしている。この SJS/TEN 血清を添加した HaCaT 細胞においても、同様に gasdermin D が活性化しているかを解析した。

(2)

SJS/TEN の病態解明のために SJS/TEN モデル細胞の作製を行った。SJS/TEN の病態には単球が放出する Annexin A1 が表皮細胞の FPR1 に結合することで起こる necroptosis が重要である。FPR1 は SJS/TEN の皮疹部表皮細胞においては発現が上昇しているが、健常の皮膚表皮細胞では発現が低い。また、この FPR1 発現の上昇は、好中球が放出する LL-37 の P2X7 受容体刺激によるということが報告されている。

今回我々は、HaCaT 細胞に LL-37 と Annexin A1 を共刺激し細胞死を誘導できるか検討した。また、LL-37 と annexin A1 の共刺激により、apoptosis や necroptosis、pyroptosis がどのような割合で起きているか解析した。

(3)

作製した SJS/TEN モデル細胞を用いて、各細胞死の経路がどのように調節されているかを解析する。LL-37 と annexin A1 で共刺激したモデル細胞に各細胞死の阻害剤を添加し、細胞死の量や、細胞死の種類がどのように変化するか解析した。

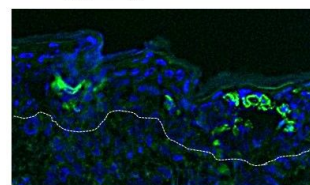
4. 研究成果

(1)

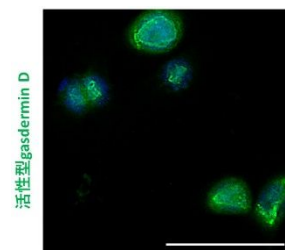
SJS/TEN 患者の病変部皮膚で pyroptosis が起きているかどうかを解析した。患者皮膚の凍結切片を用いた解析において、SJS/TEN 患者の病変部表皮に、pyroptosis のマーカーである活性型の gasdermin D が陽性の細胞が確認された。

また、表皮細胞に患者血清を添加し、細胞死を誘導するモデルに

活性型 gasdermin D



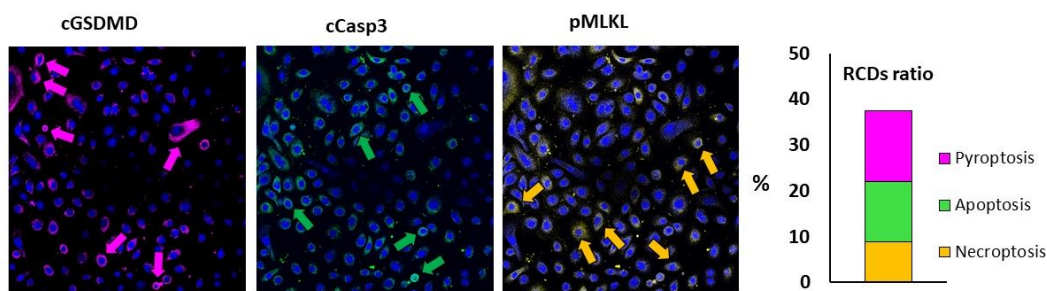
おいても、pyroptosis が起きているか確認した。このモデルにおいても、SJS/TEN 患者血清を添加された HaCaT 細胞で活性型 gasdermin D が陽性となる細胞が確認された。これらの結果から、SJS/TEN の病変部では、これまで報告されている apoptosis や necroptosis 以外にも、pyroptosis も起きていることが確認できた。



(2)

SJS/TEN モデル細胞を作製するために、不死化表皮細胞である HaCaT 細胞に LL-37 と annexin A1 で共刺激した。これにより、細胞生存率が低下した。

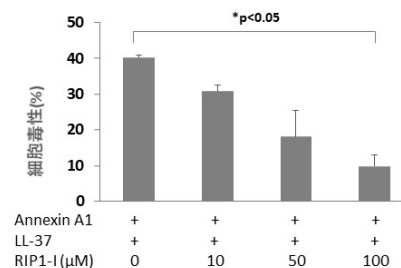
LL-37 と annexin A1 で共刺激した HaCaT 細胞を、apoptosis のマーカーである活性型 caspase-3、necroptosis のマーカーであるリン酸化 MLKL、pyroptosis のマーカーである活性型 gasdermin D で染色したところ、3 種類の細胞死が同程度の割合で起きていることが明らかになった。



(3)

作製した SJS/TEN モデル細胞では、apoptosis、necroptosis、pyroptosis の 3 種類の細胞死が起きていることが確認できた。この細胞モデルに、各細胞死の阻害剤を添加した。

Apoptosis 阻害剤や necroptosis 阻害剤、pyroptosis 阻害剤をそれぞれ添加すると、各種細胞死の割合の変化はあったが、細胞死の量自体に変化はなかった。このことから、細胞死の各経路は相互に作用しており、ひとつの経路が阻害されることで、その他の経路が活性化されていることが示唆された。しかし、各細胞死の経路に参与する、RIP1 の阻害剤を添加したところ、モデル細胞において細胞死の量が優位に低下した。このことから、RIP1 は重症薬疹における、各種細胞死の経路の主要調節因子として働いていることが明らかになった。



本研究で得られた成果により、重症薬疹の細胞死には RIP1 が重要な役割を担っており、RIP1 阻害剤が、重症薬疹の新規治療薬として有用である可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Tomoki Nishiguchi
2. 発表標題 Formyl peptide receptor 1 triggers cell death signals in keratinocyte as SJS/TEN model
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Saito, Akito Hasegawa, Tomoki Nishiguchi, Natsumi Hama, Riichiro Abe
2. 発表標題 Pyroptosis of keratinocyte in Stevens-Johnson syndrome / toxic epidermal necrolysis
3. 学会等名 SID 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Saito, Akito Hasegawa, Riichiro Abe
2. 発表標題 Pyroptosis of keratinocyte in Stevens-Johnson syndrome / toxic epidermal necrolysis
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruna Kimura, Akito Hasegawa, Riichiro Abe
2. 発表標題 Characteristic keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis induced by immune checkpoint inhibitors
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------