

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461691

研究課題名(和文)薬剤を用いた薬疹モデルマウス樹立の研究

研究課題名(英文)Establishing a murine model of cutaneous adverse drug reaction

研究代表者

小豆澤 宏明 (Azukizawa, Hiroaki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：10379240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬疹は主にヒトの臨床検体を用いて研究が行われているが、1つの薬剤で薬疹を発症する患者数は限られており、薬疹の病態解明や治療法の確立には、薬剤を用いた薬疹動物モデルの樹立が重要と考えられる。この研究では、マウスT細胞受容体が認識する自己抗原由来のペプチドとその改変ペプチドに対する結合能の違いを利用して、ヒトで薬疹を起こす薬剤が結合能に及ぼす影響を検討することで、特定のT細胞受容体が、薬剤により活性化するメカニズムを解明を目指した。薬剤反応性T細胞をインタフェロン産生により検出する方法を確立し、ヒトにおいて薬疹の原因となる薬剤約150種類を用いて薬剤に対する反応性を検討した。

研究成果の概要(英文)：In mice, it is difficult to induce rash or drug eruption by administration of certain drugs in vivo. Here, we studied in vitro screening of mouse drug reactive T cells isolated from either T cell receptor (TCR) transgenic mice or wild-type mice to find candidate drugs for establishing animal model of drug eruption using drugs. OT-I TCR transgenic mice and wild type mice were used for this study. When enriched CD8+ T cells from OT-I mice were stimulated with SIINFEKI peptide in the presence of autologous antigen presenting cells in vitro, IFN-gamma production was detected by intracellular staining. By using this assay, we tried to detect IFN-gamma production by either OT-I T cells or wild-type T cells after adding 150 drugs independently.

研究分野：皮膚科学

キーワード：薬疹 動物モデル Stevens-Johnson症候群 中毒性表皮壊死症 薬剤性過敏症候群

1. 研究開始当初の背景

薬疹は多くの場合薬剤により生体内で免疫反応が誘導されることで、皮膚に炎症が誘導される。疾患の治療中に用いられた薬剤により、薬疹が発症すると、治療の中断、代替治療法の選択など、患者にとって不利益が大きい。薬疹の研究は近年目覚ましい発展を遂げているが、根本となる薬疹の発症機序については未だにほとんど解明されていない。薬疹の病態解明には、薬剤を用いた動物モデルの樹立が重要と考えるが、薬剤を用いて薬疹を誘導する動物モデルの樹立は困難であるため、その病態解明が進んでいない。

T細胞免疫が関与し、皮膚が特異的に障害される免疫疾患としては、天疱瘡、扁平苔癬、乾癬といった自己免疫反応の関与が考えられる疾患から、薬疹、ウイルス性発疹といった外因性の誘因による皮膚障害まで多数の疾患がある。皮膚特異的な自己免疫反応を考える上では、自己反応性T細胞がどのようにして自己抗原を認識し、活性化するのか、そのメカニズムの詳細な解析が重要となる。

我々はこれまでに皮膚自己抗原を骨髄由来の抗原提示細胞がCD8⁺T細胞に提示することで、CD8⁺T細胞の活性化が起こり、皮膚ケラチノサイトのアポトーシスを起こす病態について動物モデルを樹立して明らかにしてきた。この動物モデルは重症薬疹の病態を解明する貴重な情報を提供した。我々は皮膚表皮のモデル自己抗原としてケラチン5プロモータ下に膜結合型ニワトリ卵白アルブミン(OVA)を発現するトランスジェニックマウス(K5-mOVA)を作製し、皮膚表皮からの抗原輸送、抗原提示を解析してきた。皮膚に発現した自己抗原は骨髄由来の抗原提示細胞により、皮膚所属リンパ節でMHC class I上に提示されており、これをCD8⁺T細胞が認識すると、それらは速やかに活性化、分裂し、皮膚へ浸潤、表皮ケラチノサイトのアポトーシスを誘導することを報告した(Azukizawa H, Kosaka H, Sano S, et al. Induction of T-cell-mediated skin disease specific for antigen transgenically expressed in keratinocytes. *Eur J Immunol.* 2003 Jul;33(7):1879-88.)。さらに、CD8⁺T細胞の表皮自己抗原への反応性は、正常では胸腺由来のCD4⁺CD25⁺ regulatory T cell (以下Tregと略す)により制御され、表皮ケラチノサイトを傷害しないが、Tregによる免疫寛容が破綻すると傷害し始めることを明らかにした(Azukizawa H, Sano S, Kosaka H, et al. Prevention of toxic epidermal necrolysis by regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1722-30.)。さらにこのCD8⁺T細胞による表皮障害メカニズムは薬剤過敏症による皮膚障害の最重症型である中毒性表皮壊死症(TEN)の病態を再現する動物モデルとしての有用であった。

(Azukizawa H, Itami S. *Animal Models of Toxic Epidermal Necrolysis, Drug Hypersensitivity/* editor, W.J.Pichler, KARGER 2007 129-139.ISBN 978-3-8055-8269-8) 一方で、表皮自己抗原が抗原提示細胞のMHC class II上に提示されるのかについてはK5-mOVAを用いて、定常状態において皮膚から所属リンパ節へ遊走する樹状細胞がMHC class II上に皮膚自己抗原を提示し、Naïve CD4⁺T細胞から極少数のCD25⁺Foxp3⁺Tregをde novoで誘導することを明らかにした(Azukizawa H, Döhler A, Kanazawa N, et al. Steady state migratory RelB⁺Langerin⁺ dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol* **2011**. 41(5):1420-34.)。

この研究から、自己免疫皮膚疾患およびそれに類似する疾患においては、細菌感染やウイルス感染などにおいては、感染による自己抗原への反応性の変化、免疫寛容の破綻、また、自己抗原そのものの修飾などの変化が加わると考えられる。

自己免疫疾患の発症のtriggerとなるものとしてはウイルス感染、紫外線暴露など、様々な要因が知られるが、最近では薬疹も薬剤により、HLA分子上に提示される自己ペプチドが変化することが明らかとなるなど(illing P et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire, 2012 Nature)、皮膚からの自己抗原が、どのような修飾を受けることが、T細胞の皮膚特異的自己免疫反応のtriggerとなるのかを検討することが重要となってきた。

2. 研究の目的

ヒトの薬疹の病態において皮膚特異的に免疫反応をおこすのに関わる表皮特異的自己抗原は未だ明らかではないため、この研究では、K5-mOVAマウスの抗原エピトープが、MHC class I、class IIともに明らかであることを利用して、自己免疫にかかわる自己反応性T細胞の抗原結合能(Avidity)が薬剤によりどのように変化するのかを検討する。薬剤により抗原への結合能が修飾されるペプチドと薬剤の組み合わせを特定し、それを用いてK5-mOVAマウスを免疫することで、薬剤を用いた薬疹動物モデルの樹立を目指す。

3. 研究の方法

本研究ではin vitroの実験で、OVA特異的T細胞受容体トランスジェニックマウス(OT-I、OT-IIマウス)の脾細胞1×10⁶個に、OVA由来のMHC class Iリガンド(SI INFEKL, OVA257-264)、それらのアミノ酸の一部を置

換した改変ペプチドリガンド SIITFEKL (T4, Altered peptide ligand) により、ペプチドごとに異なる抗原結合能(avidity)を定量的に検討した。CD90.1(Thy1.1)⁺の OT-I あるいは野生型マウス CD8⁺T 細胞を CD3/CD28 T細胞刺激ビーズにより1週間刺激した。薬剤・ペプチド・CD90.2(Thy1.2)⁺抗原提示細胞を加えて IFN- γ 産生誘導を細胞内染色でフローサイトメトリーで検出した。抗原結合能は濃度を段階希釈したペプチド (10^{-13} ~ 10^{-6} M) で刺激し、インターフェロン産生細胞を細胞内染色することで、フローサイトメトリーで検出し、T細胞中のインターフェロン産生細胞の割合をペプチド濃度とともにプロットすることでT細胞受容体の抗原結合能を定量化した。さらにそこに、ヒトで薬疹を起こすことが知られている薬剤約150種類を、1薬剤ずつ添加することで、OVA 関連のペプチドにたいするT細胞の反応性を修飾する薬剤をスクリーニングして特定した。In vivo では K5-mOVA マウスを用いて、OT-I マウスと交配しダブルトランスジェニックマウスを作成した。

4. 研究成果

T4ペプチドはSIITFEKLと比べOT-I細胞によるIFN- γ 産生誘導が弱いことを確認し、T4ペプチドが、薬剤とともにMHC class Iに結合することで、強いIFN- γ 産生誘導が起きるかを検討した。カルバマゼピン、フェニトインなどの抗てんかん薬ではマウスT細胞のIFN- γ の産生誘導を認めなかった。重症薬疹の原因薬剤とされるNSAIDsやそれらを含んだ総合感冒薬でもマウスT細胞のIFN- γ の産生誘導を認めなかった。アモキシシリンやミノサイクリンなどの抗生剤でもマウスT細胞のIFN- γ の産生誘導を認めなかった。150種類以上の薬剤を加えて反応性の変化を検討したが、OT-I細胞でも野生型マウスの細胞でもIFN- γ の産生量の増加を検出できなかった。また、同時に、これら150種類の薬剤の添加で、T4ペプチドによるIFN- γ 産生は変化がみられなかった。今回のassayはT細胞受容体への結合力が低い場合でも、薬剤特異的T細胞をスクリーニングするのに適していると考えた。他の薬剤やペプチドを使用することで薬剤特異的T細胞を発見する可能性はあると考えた。

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10件)

1. 小豆澤 宏明 重症薬疹の診断と治療薬疹におけるリンパ球刺激試験でとらえる薬剤特異的T細胞臨床免疫・アレルギー科 59巻4号 Page438-444 2013

2. 小豆澤 宏明 【薬疹を診る-注意点とその対応】薬疹を診る 注意点とその対応 日本医師会雑誌 142巻3号 Page481-491 2013
3. 小豆澤 宏明 薬物アレルギー-疑うべきポイントと対処法【薬物アレルギーの発症機序 薬事】56巻14号 Page2135-2140 2014
4. Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S, Katayama I, Takeda J, Sano S. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. J Invest Dermatol. 133(11):2555-65 2013
5. Hirobe S, Azukizawa H, Matsuo K, Zhai Y, Quan YS, Kamiyama F, Suzuki H, Katayama I, Okada N, Nakagawa S. Development and clinical study of a self-dissolving microneedle patch for transcutaneous immunization device. Pharm Res. 30(10):2664-74. 2013
6. Chung WH, Chang WC, Lee YS, Wu YY, Yang CH, Ho HC, Chen MJ, Lin JY, Hui RC, Ho JC, Wu WM, Chen TJ, Wu T, Wu YR, Hsieh MS, Tu PH, Chang CN, Hsu CN, Wu TL, Choon SE, Hsu CK, Chen DY, Liu CS, Lin CY, Kaniwa N, Saito Y, Takahashi Y, Nakamura R, Azukizawa H, Shi Y, Wang TH, Chuang SS, Tsai SF, Chang CJ, Chang YS, Hung SI; Taiwan Severe Cutaneous Adverse Reaction Consortium; Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium. Genetic variants associated with phenytoin-related severe cutaneous adverse reactions. JAMA. 312(5):525-34. 2014
7. Kano Y, Tohyama M, Aihara M, Matsukura S, Watanabe H, Sueki H, Iijima M, Morita E, Niihara H, Asada H, Kabashima K, Azukizawa H, Hashizume H, Nagao K, Takahashi H, Abe R, Sotozono C, Kurosawa M, Aoyama Y, Chu CY, Chung WH, Shiohara T. Sequelae in 145 patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: survey conducted by the Asian Research Committee on Severe Cutaneous Adverse Reactions (ASCAR). J Dermatol. Mar;42(3):276-82. 2015

8. Aihara M, Kano Y, Fujita H, Kambara T, Matsukura S, Katayama I, Azukizawa H, Miyachi Y, Endo Y, Asada H, Miyagawa F, Morita E, Kaneko S, Abe R, Ochiai T, Sueki H, Watanabe H, Nagao K, Aoyama Y, Sayama K, Hashimoto K, Shiohara T; SJS/TEN Study Group. Efficacy of additional i.v. immunoglobulin to steroid therapy in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *J Dermatol.* 42(8):768-77. 2015
9. Hirobe S, Azukizawa H, Hanafusa T, Matsuo K, Quan YS, Kamiyama F, Katayama I, Okada N, Nakagawa S. Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. *Biomaterials.* 57:50-8. 2015
10. Hanafusa T, Kato K, Azukizawa H, Miyazaki J, Takeda J, Katayama I. B-1 B cell progenitors transiently and partially express keratin 5 during differentiation in bone marrow. *J Dermatol Sci.* 81(3):173-81. 2016

〔学会発表〕(計 6件)

1. 井上知子、花房崇明、小豆澤 宏明、横見典明、片山一朗 抗 TNF- 阻害薬投与後発症した、thymoma non-associated multiorgan autoimmunity の一例 第112回 日本皮膚科学会総会 2013.6.14-16 横浜
2. Hiroaki Azukizawa A case of TEN by aspirine World SCAR joint meeting 2013.11.15 Keelung, Taiwan
3. Hiroaki Azukizawa Lymphocyte transformation test demonstrated by flow cytometry. The 8th International Congress of Cutaneous Adverse Reactions 2013.11.16-17 Chang Gung University, Taiwan
4. Kenichi Kato, Hiroaki Azukizawa, Takaaki Hanafusa, Ichiro Katayama In vitro screening of drug-reactive T cells in mice. The 39th Annual meeting of Japanese society of Investigative Dermatology. 2014.12.12-14 Suita, Osaka
5. Hiroaki Azukizawa, Kenichi Kato, Ichiro Katayama. Analysis of B cell subsets in severe cutaneous adverse reaction. The 6th Drug Hypersensitivity Meeting.

2014.4.9-12 Bern Switzerland.

6. 加藤健一、小豆澤 宏明、片山一朗 UVB から UVA 領域で紅斑反応をみとめたアミオダロンによる光線過敏症の一例 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 2015.11.20-22 松江

〔その他〕
ホームページ等 該当ございません。

6. 研究組織
(1)研究代表者
小豆澤 宏明 (AZUKIZAWA, Hiroaki)
大阪大学医学系研究科招へい教員
研究者番号 : 10379240