

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670499

研究課題名(和文)患者抜去毛包角化細胞由来の3次元培養表皮を使用したTEN/SJSモデルの開発

研究課題名(英文)Development of TEN /SJS in vitro model using three-dimensional epidermis reconstructed from plucked patient's own hair follicle derived keratinocytes.

研究代表者

鎌田 憲明(Kamada, Noriaki)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00334186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：TENやSJSのin vitroモデルを作製するため、患者由来の3次元表皮(3D表皮)、患者の末梢血単核球(PBMC)、被疑薬を用いて検討した。最終的にモデル作製には至らなかったが、その過程で抜去毛包からの3D表皮作製方法、末梢血中にわずかに存在する、被疑薬や代謝物に反応するPBMCを増やす方法を開発した。しかし、被疑薬・代謝産物では増殖しない症例もあり、これらに加えて他の因子(物質、細胞等)も必要な場合が考えられた。また、PBMCを薬剤で活性化しても3D表皮の傷害が起きなかったことから、TENやSJSの表皮傷害は活性化したPBMCだけでは起こらず、他の要素(物質、細胞等)も必要と考えた。

研究成果の概要(英文)：In order to make in vitro disease model of TEN and SJS, we used three-dimensional epidermis (3D epidermis) from patient origin, patient's own peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and culprit drugs. As a result, we could not model these disorders, however, we have developed two methods as below: 1) we could reconstruct 3D epidermis using patient's own plucked hair follicle derived keratinocytes, 2) we could proliferate drug or metabolite reactive PBMCs barely presented in peripheral blood. However, as there existed a case that could react neither culprit drug nor metabolite, we assumed that other factors (substances or cells etc.) might be necessary to activate PBMC in addition to culprit drugs and metabolites.

Moreover, as PBMC activated by culprit drug could not induce lethal injury of 3D epidermis, we suspected that epidermal damage arose in TEN/SJS patients might be caused by not only activated PBMC but other elements (substances or cells etc.).

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚免疫学 薬物アレルギー 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

これまで私はTEN 9例、SJS13例の治療に携わる機会を得た。残念ながら3例は救命できなかったが(発症後2ヶ月以上上皮化することなく死亡(Kamada et al. *Arch Dermatol*, 141: 107, 2005)、重篤な肺障害を残して発症1年半で死亡(Kamada et al. *J Dermatol*, 33: 616, 2006)、劇症肝炎にて死亡(Kamada et al. *J Dermatol*, 37: 534, 2010))私はこれらの患者の治療を通して、「病理組織学的に炎症細胞は比較的少数であるのに、表皮全層にわたる激しいケラチノサイトの障害(アポトーシス)がどのようにして引き起こされるのか?」という表皮障害発症のメカニズムに強い興味を抱くようになった。現時点でSJS/TENの発症メカニズムで明らかにされていることは、表皮の障害はネクローシスではなく、アポトーシスである(Paul et al. *Br. J Dermatol*, 134, 1996)ということであるが、アポトーシスに参与している分子はTNF-(Correia et al. *J Am Acad Dermatol*, 47, 2002)、Fas/FasL(Viard et al. *Science*, 282, 1998、Abe et al. *Am J Pathol*, 162, 2003)、perforin/granzyme(Nassif et al. *J Allergy Clin Immunol*, 114, 2004)、granulysin(Chung et al. *Nat Med*, 14, 2008)など様々な報告がなされているものの、はっきりとした決着はついていない。これらを解明するため、疾患モデルを開発する必要があると考えた。

2. 研究の目的

中毒性表皮壊死症(toxic epidermal necrolysis、以下TEN)やスティーブンス・ジョンソン症候群(以下SJS)は主に薬剤により生じる重篤な皮膚疾患であるが、その発症メカニズムにはまだ謎の部分が多い。この発症メカニズムを根本的に解決するためには、疾患モデルの作製が必要であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 抜去毛包由来ケラチノサイトを用いた3次元培養表皮(3D表皮)の作製
抜去した毛包をDispase処理し、37℃で培養開始。数日してケラチノサイトの初期遊走が認められたら培養を継続し、3D表皮作製が可能になるまで培養を継代する。増えた段階で一部は凍結保存した。(詳細は引用文献を参照)
ケラチノサイトが増えた段階で、24well plateを用い、カルチャーインサート(ThinCert0.4µm高密度(Cat# 662640)、Greiner Bio-One)で3-4日培養。ケラチノサイトが飽和状態になったところ

で3次元培養用の培養液(CnT-02-3DP、CELLnTEC)に変更し、インサート内は空気にさらした状態で14日培養を行い、3D表皮を作製した。

なお、今回の研究では3人の患者(症例1:ゾニサミドによるSJS、症例2:アロプリノールによるTEN、症例3:アセトアミノフェンによるTEN)に協力頂いた。

(2) 薬剤反応性の末梢血単核球(PBMC)の培養

薬剤反応性のPBMCは、末梢血をヘパリン加採血で約20ml採取し、Ficollを用いて末梢血単核球(PBMC)を分離した。PBMCは96well plateでIL-7(100ng/ml)および被偽薬(あるいは代謝産物)を加えて6日間培養後、細胞を回収して24well plateにてIL-7(50ng/ml)を加えて3日間培養、更に細胞を回収して6well plateに移してIL-7(20ng/ml)でさらに3日間培養して得た。得られたPBMCの薬剤反応性の有無は、96well plateを用いて、³H-thymidineの取り込みで評価した。

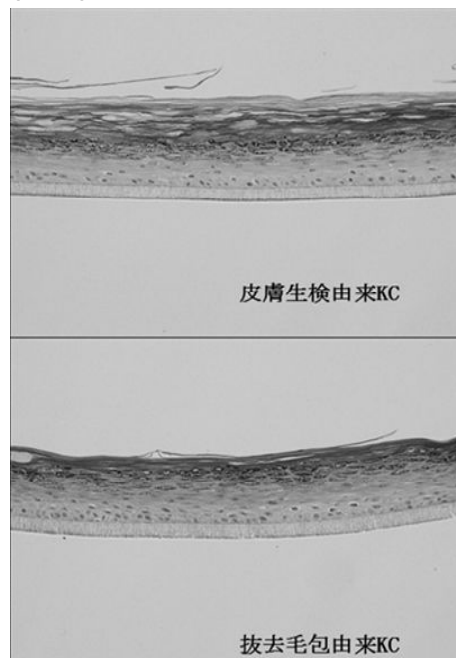
(3) 患者由来3D表皮と患者PBMC、被偽薬との反応

患者由来の3D表皮、患者由来PBMCおよび被偽薬(あるいは代謝産物)を加えて3日間培養を行い、3D表皮を回収してHE染色にて表皮細胞の傷害の有無を評価した。

4. 研究成果

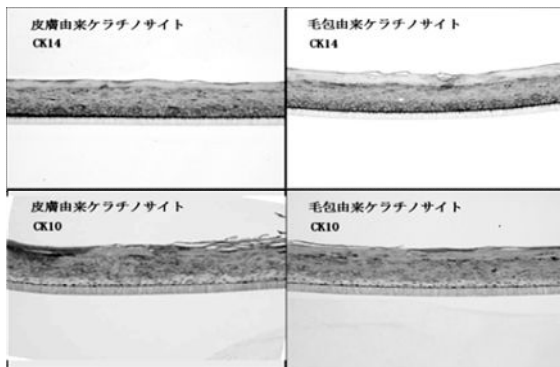
(1) 抜去毛包由来ケラチノサイトを用いた3D表皮の作製

抜去毛包から培養したケラチノサイトから3Dの表皮構造の作製を試みたところ、HE染色では皮膚由来のケラチノサイトで作製した3D表皮と遜色のない結果が得られた。両者とも基底層、有棘層、顆粒層を経て角化しており、違いはみられなかった(図1)。



(図1 皮膚由来ケラチノサイトおよび毛包由来ケラチノサイトから作製した3D表皮のHE染色像)

次いで、ケラチンの発現パターンを検討した。正常の表皮では、基底層にケラチン5、14 (CK5, 14) が、有棘層にケラチン1,10 (CK1, 10) が発現していることから、生検皮膚由来のケラチノサイトおよび毛包由来のケラチノサイトで作製した3次元培養表皮のケラチン発現パターンを比較した。その結果、両者でケラチン (CK14、CK10) の発現パターンに差がみられなかった (図2)。

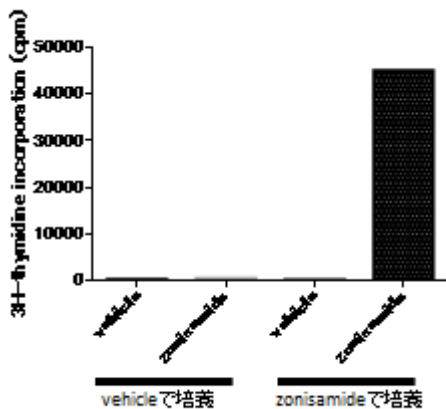


(図2 皮膚由来ケラチノサイトおよび毛包由来ケラチノサイトから作製した3D表皮の比較)

以上の結果、抜去毛包由来のケラチノサイトから作製した3次元培養表皮は、正常表皮とほぼ同等の構造・機能を有しているということが明らかとなった。この3D表皮は、患者の毛包から得たケラチノサイトからも同様に作製することができた。

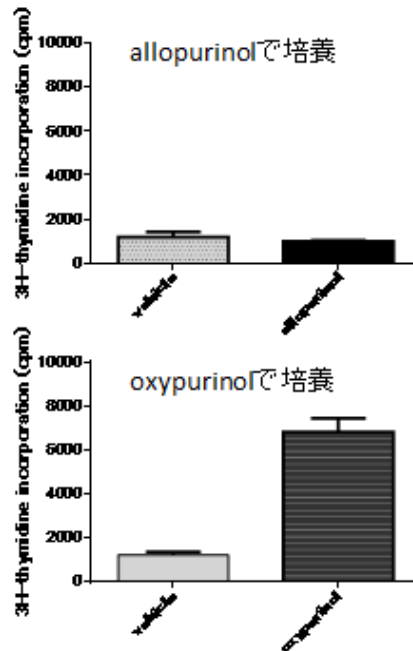
(2) 薬剤反応性の末梢血単核球 (PBMC) の培養

症例1の患者で、3D表皮にPBMC、被偽薬 (ゾニサミド) を加えて培養を行ったが、表皮の傷害は観察できなかった。その理由として、末梢血中には被偽薬に反応するPBMCが極めて少ないことが考えられた。そこで、被偽薬に反応するPBMCを増やす試みを行った。その結果、IL-7を添加して培養することで薬剤反応性PBMCを増やすことが確認できた (図3)。



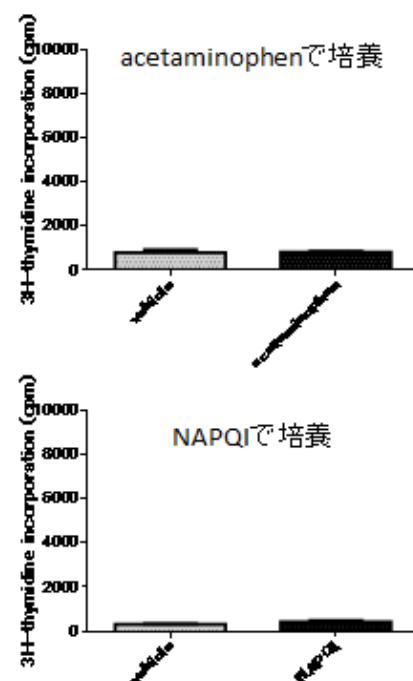
(図3 薬剤に対するPBMCの反応性の検討: 症例1)

そこで、他の症例でも検討を行った。その結果、症例2では被偽薬であるアロプリノールでは増殖がみられず、代謝産物であるオキシプリノールで増殖がみられた (図4)。



(図4 薬剤に対するPBMCの反応性の検討: 症例2)

このことから、代謝産物でも薬疹が生じている場合もあることが示唆された。続いて症例3を検討した。症例3はアセトアミノフェンが被偽薬と考えられたが反応はみられず、その代謝産物であるN-アセチル-p-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) にも反応が見られなかった (図5)。

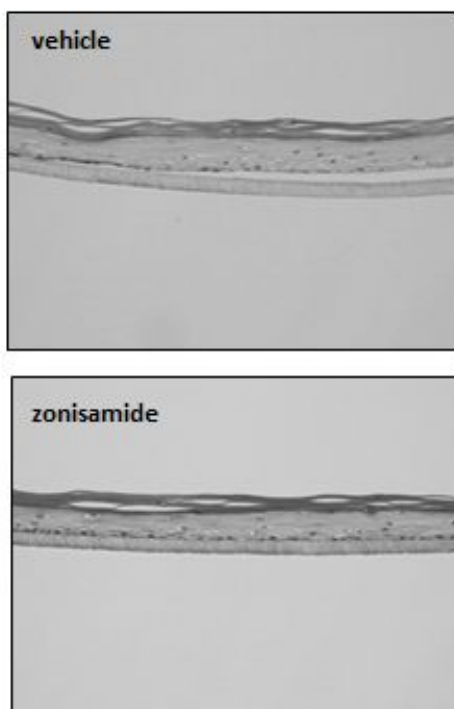


(図5 薬剤に対する PBMC の反応性の検討：症例3)

以上のことから、これら薬疹では、被偽薬やその代謝産物に直接反応する場合と、被偽薬やその代謝産物に加えて何らかの因子(サイトカイン等の物質や制御性T細胞や樹状細胞等の細胞)が関与して初めて発症する可能性が考えられた。

(3) 被疑薬を添加した活性化 PBMC による 3D 表皮傷害の検討

症例1では被疑薬(ゾニサミド)によって PBMC を活性化できることが分かったため、症例1の毛包由来ケラチノサイトから作製した3D表皮に対して、ゾニサミドで活性化したPBMCを用いて傷害することができるか実験を行った。その結果、3D表皮に対する傷害活性は認められなかった(図6)。



(図6 被疑薬によって活性化された PBMC による 3D 表皮変化)

この結果から、SJS/TENにおける表皮傷害は、薬剤反応性PBMCが活性化して放出するサイトカイン等では生じないということが分かった。表皮を傷害するためには、PBMCの活性化に加えて、表皮内への遊走や、他の因子(サイトカイン等の物質や制御性T細胞や樹状細胞等の細胞)が関与して初めて発症する可能性が考えられた。

<引用文献>

笹原 祐介、喜多野 征夫、家本 敦子、吉川 良恵、中野 芳朗、森永 伴法、竹内 勝之、川真田 伸、村上 能庸、玉木(橋本) 知子、抜去毛包を試料とするヒトケラチノサイト培養系の確立、兵医大医学会誌、32巻、2007、95-104

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 憲明 (KAMADA, noriaki)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 00334186

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし