

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04047

研究課題名(和文)重症薬疹における特異的細胞死機序解明とバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Elucidation of specific cell death mechanism and biomarker search in severe drug eruption

研究代表者

阿部 理一郎 (Riichiro, Abe)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60344511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、重症薬疹において(A)表皮細胞壊死の機序、(B)薬剤に対する免疫反応惹起機序、(C)発症感受性因子、の解明・同定を行い、重症薬疹の発症機序の全貌を明らかにする。さらに得られた結果を用いて診断・治療のターゲットとなるバイオマーカーの同定を行い、診断法樹立および新規治療薬開発を行った。(A)galectin-7などのバイオマーカーの同定しさらに別の細胞機序(ferroptosisなど)の疾患特異的機序を解明した。(B)(A)で得られた因子による特異的発症機序の解明を行った。(C)バイオマーカーをターゲットとした重症薬疹治療薬の開発を行い、候補化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症薬疹であるスティーヴンス・ジョンソン症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死症(TEN)は、全身の皮膚多形紅斑、粘膜傷害と発熱を伴う、未だに致死率の高い重篤な疾患である。SJS/TENでは、表皮細胞の細胞死を特徴とするが、私たちはこの細胞死機序の解明を主に行った。

これまで知られていなかった新規の細胞死によっておこること、さらにその詳細な機序を解明した。さらにこの機序も用いて、細胞死を阻害する薬剤の開発を行っている。

新しい重症薬疹の治療薬が会津できれば、医療において安心安全や薬剤使用を行うことが出来る。

研究成果の概要(英文)：We elucidated and identified (A) the mechanism of epidermal cell necrosis, (B) the mechanism of inducing immune response to drugs, and (C) the onset susceptibility factor in severe drug eruption, and elucidated and identified the mechanism of onset of severe drug eruption. Reveal the whole picture of. Furthermore, using the obtained results, we identified biomarkers that are targets for diagnosis and treatment, established diagnostic methods, and developed new therapeutic agents. (A) We identified biomarkers such as galectin-7 and elucidated disease-specific mechanisms of other cellular mechanisms (ferroptosis, etc.). (B) The specific pathogenic mechanism of the factors obtained in (A) was elucidated. (C) We developed a therapeutic drug for severe drug eruption targeting biomarkers and identified candidate compounds.

研究分野：皮膚科、薬疹

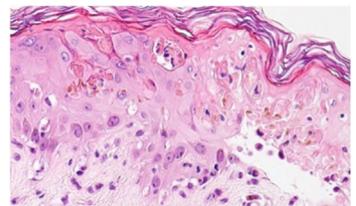
キーワード：重症薬疹 細胞死 Stevens-Johnson症候群 中毒性表皮壊死症

## 1. 研究開始当初の背景

薬剤による健康被害は国民医療に関して最も重要な課題の一つである。特に重症薬疹（中毒性表皮壊死症：TEN、Stevens-Johnson 症候群：SJS）（右図）は皮膚（表皮）が広範に壊死することでびらん・潰瘍を生じる疾患で、特に TEN は致死率が 20%と未だ高率であり、早急な対策が望まれる。しかし重症薬疹の発症機序については未だ十分に解明されず、有効な診断法、治療法の開発が遅れている。本疾患の病態において以下が明らかになっていない。



**表皮細胞壊死機序**：表皮細胞のみに局限し、かつびまん性に生じる細胞死は、本疾患の最大の特徴であり、病態に最も深く関わる現象でと考えられる。これまでは細胞障害タンパク（可溶性 FasL、granulysin など）もしくは細胞障害性 T 細胞の直接作用で apoptosis が起こるとされていたが、その疾患特異性など不明な点が多くあった、最近の我々の検討で、本疾患特異的な necroptosis（プログラムされた細胞死で、necrosis の形態をとり、炎症を惹起する）により細胞死を生じることを明らかにした（Saito N, *Sci Transl Med* 2014）。しかし apoptosis と necroptosis の関与の違いやその調節など全貌は未だ不明である。



**薬剤に対する生体反応惹起機序**：薬疹は薬剤が異物として認識される免疫反応と理解され、その機序として、薬剤がハプテンとして認識される、薬剤が HLA 自体に結合することで提示される自己ペプチドの多様性を誘導する、などと想定されていた。しかしこれらの仮説で説明できる薬剤はわずかで限定された状況だけである。加えて免疫反応惹起から細胞障害がいかに誘導されるか、全く不明である。

**発症感受性因子**：薬剤の抗原提示の観点から HLA の haplotype の検討が多くなされ、特定の HLA は特定の薬剤による重症薬疹発症との強い関連が明らかにされてきた。しかし前述のように一般的な薬疹の説明にはいまだほど遠い。また T 細胞への抗原提示の部分のみの検討がほとんどで、表皮細胞などターゲットの皮膚での発症感受性因子の検討は皆無である。

## 2. 研究の目的

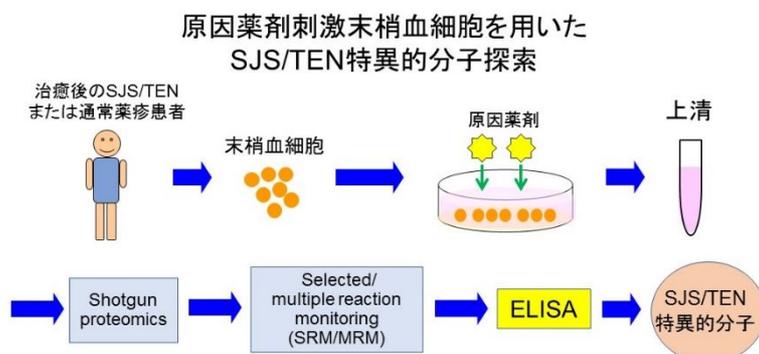
本研究において、（A）表皮細胞壊死の機序、（B）薬剤に対する免疫反応惹起機序、（C）発症感受性因子、の解明・同定を行い、重症薬疹の発症機序の全貌を明らかにする。さらに得られた結果を用いて診断・治療のターゲットとなるバイオマーカーの同定を行い、診断法樹立および新規治療薬開発を行う。

## 3. 研究の方法

### （1）重症薬疹特異的因子探索

**In vitro モデルを用いた培養上清タンパク質の解析**：治癒後に同意を得た重症薬疹患者および通常薬疹患者から採取した末梢血細胞に薬疹原因薬剤を加え、培養液中に発現するタンパク質（ペプチド）を質量分析法

にて解析し、原因薬剤投与前後で変化する候補因子の同定を行う（右図）。この解析は研究分担者の医薬基盤研究所・創薬標的プロテオミクスプロジェクトの朝長毅プロジェクトリーダーと共に行う。まず shotgun 法で上清中



に含有されるタンパク質を同定する。その後、変化するタンパク質を SRM/MRM 法（選択反応モニタリング (SRM) と多重反応モニタリング (MRM) を組み合わせた質量分析）を用いて対象タンパク質を定量する。さらに実際の重症薬疹発症時の血清を用いて発現亢進があるかを、経時的な患者血清を用いて ELISA・免疫プロット法などを用いた候補因子の発現レベル解析を行い最終的な同定を行う。

**Single cell RNA-Seq を用いた薬剤特異的リンパ球における細胞内 mRNA の解析：**薬剤特異的リンパ球が含まれる薬剤添加患者末梢血細胞からシングルセル単離後、選択した細胞について、Chip 上で細胞を溶解後、逆転写反応および PCR を行い cDNA を取得する。同時に細胞識別のバーコード nano-well barcode or cell specific barcode (WBC) および分子識別の Unique Molecular Identifier (UMI) の付与を行う。次に PCR を行いシーケンスに供するライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いて WBC/UMI 配列の取得および遺伝子配列の取得を行い、WBC に基づき細胞ごとの配列データに分類する。取得した配列データを参照配列へマッピングし、遺伝子発現定量解析を行う。重症薬疹患者と通常薬疹患者の薬剤特異的リンパ球でデータを比較することで、重症薬疹の薬剤特異的リンパ球の特異性を明らかにし、特異因子の同定を行う。

**皮膚を用いた RNA-Seq による重症薬疹感受性因子の探索：**細胞死が誘導されるターゲット組織としての皮膚組織において、重症薬疹感受性を規定する因子の探索を行う。具体的には、治癒後の重症および通常薬疹患者で、皮疹が生じなかった部分の皮膚を用いて RNA-Seq を行い、重症薬疹患者皮膚における特異的因子を探索する。現在すでに解析を開始し、いくつかの候補分子の同定に至っている。

## (2) 表皮細胞壊死機序の解明：

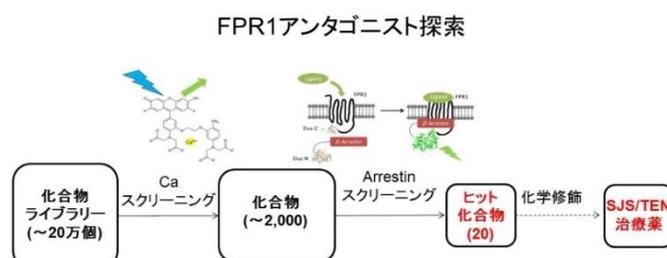
重症薬疹病変部における細胞死 (apoptosis/necroptosis) の詳細な解析を行う。重症薬疹病変部(表皮)を apoptosis マーカー(cleaved caspase8), necroptosis マーカー(phosphorylated MLKL)を用いてその陽性細胞数、分布状態を検討する。これまでの preliminary な検討で、重症薬疹病変部では apoptosis と necroptosis が混在していたが、興味深いことに通常薬疹病変部では細胞死を呈する率は少ないがほぼすべて necroptosis のマーカーが陽性であった。一方、necroptosis の最終過程において、細胞死を回避し炎症を惹起することがごく最近明らかになった (Gong YN, Cell 2017., Daniels BP, Cell 2017)。通常薬疹でも同様の機序で重症薬疹への進展を防ぐためにインフラマゾームの形成を介した機序が生じているか検討する。これまでの検討で、通常薬疹病変部での necroptosis マーカー陽性の細胞はインフラマゾームマーカー(cleaved caspase1)も陽性であった。本研究でさらに、我々が樹立した重症薬疹表皮細胞死 *in vitro* モデル(培養上清添加による表皮細胞死誘導)を用いて、necroptosis 回避機序に関わる分子(ESCART III およびインフラマゾーム関連因子)の発現状態について検討し、細胞死現象の全容の解明を行う。

## (3) 疾患発症関連候補因子からの診断法および治療薬開発

重症薬疹特異的分子探索の検討で得られた候補分子について臨床検体(患者血清)を用いた validation を行う。具体的には、候補因子の重症薬疹の発症病態への関与について *in vitro* モデルにて検討する。加えて候補因子の迅速測定試験(イムノクロマト法)を開発する。我々は試験法開発に実績がある(出願番号: JP2009/140830、「重症薬疹易罹患性診断用マーカー、重症薬疹易罹患性の診断方法および重症薬疹易罹患性診断用キット」)(後述)。

さらに同定された候補因子またはその経路をターゲットにした創薬を行う。化合物スクリーニングは研究分担者の東京大学理学系研究科小澤岳昌教授と共同で行う。

先行研究として、重症薬疹特異的因子探索にていくつかの候補分子の同定に至っており、その一つの G タンパク共役受容体 (GPCR) である FPR1 のアンタゴニストの探索を行っている。



GPCR の細胞内シグナルである G タンパク経路 (Ca スクリーニング) と arrestin 経路 (arrestin スクリーニング) をいずれも阻害する化合物を、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーを用いた探索を開始している。現在複数の候補化合物を同定しており、さらに化学修飾を行いリード化合物の決定を目指す。さらに非臨床試験を我々が樹立したモデルマウス (Saito N, *J Allergy Clin Immunol* 2013) を用いて行う。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 重症薬疹特異的因子探索

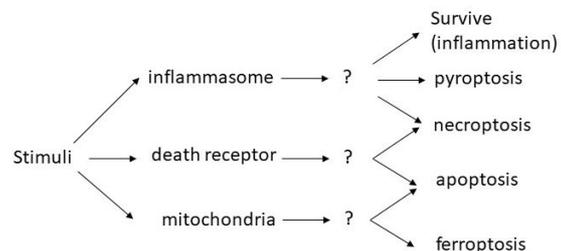
**In vitro モデルを用いた培養上清タンパク質の解析** : 治癒後に同意を得た重症薬疹患者および通常薬疹患者から採取した末梢血細胞に薬疹原因薬剤を加え、培養液中に発現するタンパク質 (ペプチド) を質量分析法にて解析し、原因薬剤投与前後で変化する候補因子の同定を行った。まず shotgun 法で上清中に含有されるタンパク質を同定した。その後、変化するタンパク質を SRM/MRM 法 (選択反応モニタリング (SRM) と多重反応モニタリング (MRM) を組み合わせた質量分析) を用いて対象タンパク質を定量した。さらに実際の重症薬疹発症時の血清を用いて発現亢進があるかを、経時的な患者血清を用いて ELISA・免疫ブロット法などを用いた候補因子の発現レベル解析を行い最終的な同定を行った。本研究においてこの手法にて galectin-7 が特異的因子であることを同定した (*J Allergy Clin Immunol Pract* 2019)。

**Single cell RNA-Seq を用いた薬剤特異的リンパ球における細胞内 mRNA の解析** : 薬剤特異的リンパ球が含まれる薬剤添加患者末梢血細胞からシングルセル単離後、選択した細胞について、Chip 上で細胞を溶解後、逆転写反応および PCR を行い cDNA を取得する。同時に細胞識別のバーコード nano-well barcode or cell specific barcode (WBC) および分子識別の Unique Molecular Identifier (UMI) の付与を行う。次に PCR を行いシーケンスに供するライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いて WBC/UMI 配列の取得および遺伝子配列の取得を行い、WBC に基づき細胞ごとの配列データに分類する。取得した配列データを参照配列へマッピングし、遺伝子発現定量解析を行う。重症薬疹患者と通常薬疹患者の薬剤特異的リンパ球でデータを比較することで、重症薬疹の薬剤特異的リンパ球の特異性を明らかにし、特異因子の同定を行う。

**皮膚を用いた RNA-Seq による重症薬疹感受性因子の探索** : 薬剤特異的リンパ球が含まれる薬剤添加患者末梢血細胞を同一患者由来表皮細胞とともに共培養を行い、経時的にサンプル採取後シングルセル単離後、選択した細胞について、遺伝子発現定量解析を行った。変動 RNA 発現において細胞死シグナルの差異に着目し、個々の細胞における変化から、重症薬疹患者と通常薬疹患者の薬剤特異的リンパ球でデータを比較することで、重症薬疹の薬剤特異的リンパ球の特異性を明らかにし、特異因子の同定を行っている。現在まだ特異的因子の同定には至っていない。

##### ( 2 ) 表皮細胞壊死機序の解明 :

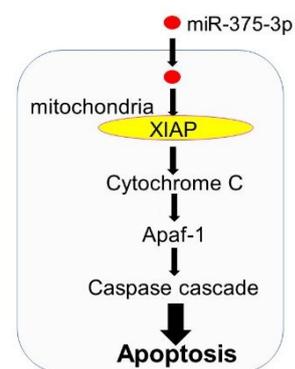
重症薬疹における種々の細胞死 (apoptosis/necroptosis/pyroptosis/ferroptosis) の詳細な解析を行った (右図)。上記の single cell RNA-Seq での細胞死誘導シグナル解析のデータからそれぞれの細胞死誘導の起点となる因子を同定した。例えば、single cell レベルで inflammasome 発現後に pyroptosis、necroptosis、または survive する際に有意に発現の差異が出る因子を同定できれば、その因子を解析することで細胞死誘導機序が解明できる。また重症薬疹病変部における apoptosis (cleaved caspase8)、necroptosis (phosphorylated MLKL)、inflammasome (cleaved caspase1) 及び ferroptosis (4-Hydroxynonenal) などを用いてその分布状態など検討し、実際の病変部での解析も行っている。



また我々は重症薬疹患者血清添加による表皮細胞死誘導の *in vitro* アッセイを確立し (J Allergy Clin Immunol Pract 2020) さらに FPR1 発現誘導を行うことで安定して necroptosis (pMLKL 陽性) を検出できるよう改善を行った (未発表データ)。この系を用いて、細胞死誘導の過程における種々細胞死惹起を解析している。

一方、ごく最近 necroptosis の最終過程において、細胞死を回避し炎症を惹起することが明らかになった (Zheng M, Cell 2020., Tummers B, Immunity 2020)。我々も preliminary な検討として、通常薬疹でも同様の機序で重症薬疹への進展を防ぐために inflammasome の形成を介した機序が生じているか検討したところ、通常薬疹病変部でも少数の necroptosis マーカー陽性であるが細胞死を起こしていない細胞がみられ、それらは inflammasome マーカーも発現していた。さらに、inflammasome 経路の最終産物である IL-1 は、通常薬疹病変部で発現が高く、逆に重症薬疹病変部で発現が低く、重症薬疹では necroptosis 経路が主に働いており、inflammasome 経路の活性は抑えられていることが示唆された (未発表データ)。この結果に基づき、necroptosis 回避機序に関わる分子 (ESCART III および inflammasome 関連因子) の発現状態について検討し、細胞死現象の全容の解明を行っている。重症薬疹発症過程において、inflammasome 経路に誘導する機序が解明できれば発症阻害のターゲットとなりうる。

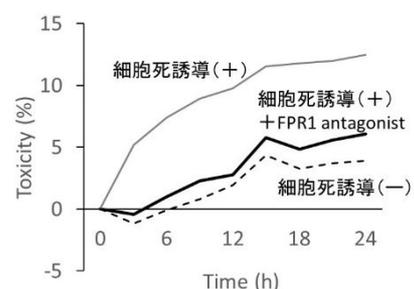
また、miRNA は発症病態への関与が様々な疾患で明らかになっている。我々は血漿エクソソームに着目し、重症薬疹患者血漿エクソソーム中の miRNA を解析したところ、miR-375-3p が有意に多く含有されていた。さらに miR-375-3p はアポトーシス調節因子である XIAP 発現を阻害することでアポトーシスを抑制した (右図)。さらに、miR-375-3p/XIAP は、NLRP3 インフラマソームの活性化も促進した (Sci Transl Med, 2020)。



### (3) 疾患発症関連候補因子からの診断法および治療薬開発

重症薬疹特異的分子探索の検討で得られた候補分子について臨床検体 (患者血清) を用いた validation を行った。具体的には、候補因子の重症薬疹の発症病態への関与について *in vitro* モデルにて検討した。

さらに同定された候補因子またはその経路をターゲットにした創薬を行った。重症薬疹特異的因子探索にていくつかの候補分子の同定に至っており、その一つの G タンパク共役受容体 (GPCR) である FPR1 のアンタゴニストの探索を行っている。GPCR の細胞内シグナルである G タンパク経路 (Ca スクリーニング) と arrestin 経路 (arrestin スクリーニング) をいずれも阻害する化合物を、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーを用いた探索を行っている。現在複数の候補化合物を同定しており、前述の *in vitro* アッセイにて、特定の候補化合物が強い細胞死阻害活性があることを明らかにした (右図)。さらに非臨床試験を我々が樹立したモデルマウス (J Allergy Clin Immunol 2013) を用いて非臨床研究も開始している。本研究において、最終的に重症薬疹治療薬開発を目指す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

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 Hasegawa Akito, Shinkuma Satoru, Hayashi Ryota, Hama Natsumi, Watanabe Hideaki, Kinoshita Manao, Ogawa Youichi, Abe Riichiro	4. 巻 8
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 1768 ~ 1771.e7
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 Meier-Schiesser Barbara, Feldmeyer Laurence, Jankovic Dragana, Mellett Mark, Satoh Takashi K., Yerly Daniel, Navarini Alexander, Abe Riichiro, Yawalkar Nikhil, Chung Wen-Hung, French Lars E., Contassot Emmanuel	4. 巻 139
2. 論文標題 Culprit Drugs Induce Specific IL-36 Overexpression in Acute Generalized Exanthematous Pustulosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 848 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.10.023	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 該当する

1. 著者名 Ito Takamasa, Shiromizu Takashi, Ohnishi Shunsuke, Suzuki Shotaro, Mabe Katsuhiro, Hasegawa Akito, Ujiie Hideyuki, Fujita Yasuyuki, Sato Yuichi, Terai Shuji, Kato Mototsugu, Asaka Masahiro, Tomonaga Takeshi, Shimizu Hiroshi, Abe Riichiro	4. 巻 142
2. 論文標題 Potential role of extracellular vesicle-mediated antigen presentation in Helicobacter pylori hypersensitivity during eradication therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 672 ~ 676.e12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.02.046	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿部理一郎
2. 発表標題 重症薬疹の病態とバイオマーカー
3. 学会等名 日本皮膚科学会東京東部合同支部総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部理一郎
2. 発表標題 薬疹のメカニズム
3. 学会等名 日本皮膚科学会東京支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部理一郎
2. 発表標題 Role of exosome mediated antigen presentation in antibiotic related allergic reactions
3. 学会等名 DHM2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018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
研究分担者	新熊 悟  (Shinkuma Satoru)  (00613788)	奈良県立医科大学・医学部・准教授    (24601)	

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
研究分担者	小澤 岳昌  (Ozawa Takeaki)  (40302806)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授    (12601)	
研究分担者	朝長 毅  (Tomonaga Takeshi)  (80227644)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・上級研究員    (84420)	

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