

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790773
 研究課題名（和文）中毒性表皮壊死症モデルマウスを用いた表皮ケラチノサイトのアポトーシス誘導の解明
 研究課題名（英文）Elucidation of the apoptotic mechanisms of epidermal keratinocytes in toxic epidermal necrolysis by using mouse GVHD model.
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：鎌田 憲明（Kamada Noriaki）
 所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：00334186

研究成果の概要：TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群におけるケラチノサイトのアポトーシスを起こすメカニズムを解明するため、マウスのGVHDモデルを基礎としてTEN/スティーブンス・ジョンソン症候群類似の皮膚症状の再現を試みた。しかし、残念ながら確実に再現する条件を見つけることができなかった。その原因として、動物をモデルとする限界が考えられたが、また、疾患モデルとして薬剤との関連性が検討できないという問題点も指摘された。そこで改めて疾患モデルを作製するため、患者自身のケラチノサイトを使用して3次元培養表皮を作製し、患者リンパ球と被疑薬を反応させて「in vitro モデル」を作製する方法に変更した。現在モデルの作製中であるが、現時点では患者自身の皮膚から培養したケラチノサイトを使用して、安定して3次元培養表皮が作製可能となり、今後これを使用してモデルを作製する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	150,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚疾患、免疫学、ケラチノサイト、アポトーシス、発症病理

1. 研究開始当初の背景

中毒性表皮壊死症（以下 TEN）は発症率 1 人/100 万人/年程度とまれであるが、高熱を伴い広範囲熱傷類似の皮膚症状を呈する重篤な疾患である。スティーブンス・ジョンソン症候群も類似の疾患であるが、我が国ではびらん面積が体表の 10%以上である場合を TEN と称するのに対して、10%未満である場合

をスティーブンス・ジョンソン症候群と称して区別している。いずれの疾患も死に至る可能性があるが、特に TEN では死亡率が 20%前後と高く、救命できた場合でも、失明を含む視力障害や、肺移植が必要な呼吸器障害など重い後遺症を残すことも少なくない。これまで、私は 10 例以上の TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群の診療に携わる機会を得

たが、治療の過程で「なぜあのような劇的な皮膚症状が発症するのか」ということに興味をもった。TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群の発症機序を調べてみると、表皮の障害はケラチノサイトのアポトーシスであることは受け入れられているものの、アポトーシスを引き起こすメカニズムについては、Fas/FasL、perforin/granzymeB、TNF- α 、NOなど様々な説が主張されているものの、はっきりした結論に至っていない状況であった。また、発症機序が明らかでないため、治療法が確立されていないということ、また治癒した後も、原因薬剤を特定できる確実な検査方法も確立されていないという問題点が残されている。これらの問題を解決するためにも、TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群の発症機序を解明する必要があると考えた。

2. 研究の目的

TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群の発症機序を明らかにするため、まず表皮ケラチノサイトのアポトーシスがどのようにして生じるのかに焦点を絞ることが必要であると考えた。そのためにはさまざまな方法が考えられたが、最も明確に結論を出すためには疾患モデルを作製することが必要と考えた。TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群に類似した皮膚症状を呈する疾患として、GVHD（骨髄移植による移植片対宿主病）が広く知られている。そこで、当初はマウスのGVHDモデルをベースにして、donorやrecipientにアポトーシス誘導に関連する分子の遺伝子ノックアウトマウスを用いて、TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群における表皮ケラチノサイトのアポトーシスを誘導する分子をまず明らかにすることを目的とした。そして、モデルマウスを経時的に解析し、炎症初期からアポトーシス誘導分子の発現に至るまでの過程を明らかにしようと考えた。

まず、過去の報告（Asagoeら Br. J. Dermatol 2001）を参考に、モデルマウスの作製（recipient MHC:H-2^d、ヌードマウス、donor MHC:H-2^b、C57BL/6マウス）を行った。ヌードマウスに致死量の放射線照射（約750Gy）後、donorの脾臓から白血球を採取し、MACS法にてCD4リンパ球、B細胞、CD1陽性樹状細胞を除去してCD8陽性Tリンパ球の割合を増加させた後、 2×10^7 個から 5×10^7 個を尾静脈より移植を行った。1回の実験で10匹のrecipientを使用した。何らかの皮膚症状は全てのrecipientに出現したものの、

TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群類似の皮膚症状はわずか1匹に、しかもごくわずかに部分的にみられただけであった。

そこで、移植するリンパ球の数を増やしたり、投与経路を変更したりして50匹のrecipientを使用した。今度は下痢を起こしてGVHDで死亡する固体が増えてしまい、皮膚症状を確実に再現することができなかった。皮膚症状をより確実に発症させるため、donorを予めrecipientのケラチノサイトを免疫し、その後donorのリンパ球を移植させるモデルで検討を行った。ヌードマウス（H-2^d）の新生児から採取した皮膚のケラチノサイトを培養し、 1×10^5 個から 2×10^5 個の細胞をdonorのC57BL/6マウス（H-2^b）の腹腔内に免疫した後、CD8陽性Tリンパ球の割合を増加させて、 2×10^7 個から 5×10^7 個を尾静脈より移植を行った。しかし、TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群類似の皮膚症状を確実に発現させることができなかった。

更に条件設定を変えて実験を続けることを検討したが、動物実験での限界が考えられたことと、TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群では薬剤の関与が考えられているが、このモデルでは薬剤の関連を明らかにできないことがこの実験系の限界と考えられた。そこで、TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群患者自身の皮膚からケラチノサイトを分離、培養を行い、培養したケラチノサイトを用いて3次元培養表皮を作製し、これを患者リンパ球および薬剤と反応させることで、TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群のin vitroモデルを作製することに変更した。

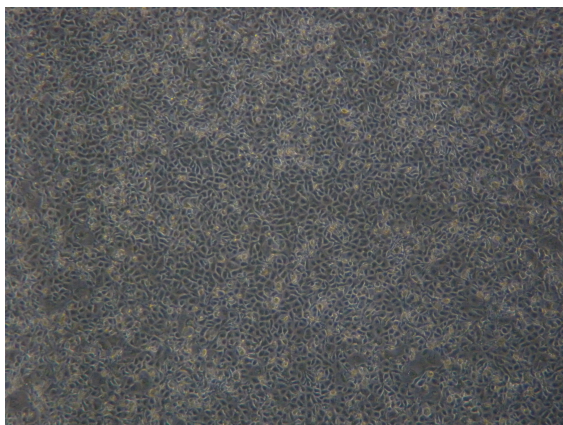
3. 研究の方法

3次元培養表皮を作製するため、各種条件検討を行った。まず、TEN/スティーブンス・ジョンソン症候群の既往がある患者3名から同意を得た上で、8mmトレパンを用いて5~6か所皮膚を採取した。採取した皮膚は、0.025%トリプシンを用いて4°C24時間処理した後、表皮と真皮に分離し、境界部から細胞を遊離させた。遊離させた細胞は、CELLnTEC社のCnT-07培養液を使用し、同社のプロトコルに従ってケラチノサイトの初代培養を行った。培養・増殖させたケラチノサイトは、その後3次元培養表皮を作製するため、CELLnTEC社のCnT-02-3DP培養液を使用し、市販の24well plate用culture insertを用いて（Greiner Bio-one社：ThinCert、Millipore社：Millicell、ベセル株式会社：VECELL-3D insert、BD Falcon社：セルカルチャーインサート、KOKEN社：AteloCell、旭テクノグラス社：ビトリゲル）insert内で立

体的な表皮を構築させた。なお、ケラチノサイトは3回継代したものをを使用した。

4. 研究成果

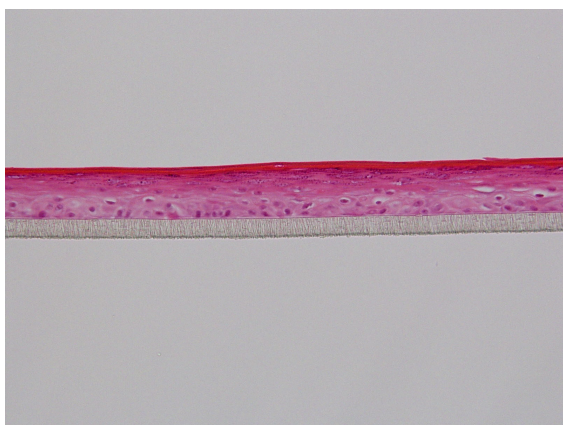
3次元培養表皮作製にあたり、まず最初に患者自身の皮膚からケラチノサイトの初代培養を行ったところ、下図のようにケラチノサイトを分離培養することができた。



そこで、ケラチノサイトを3代継代を行って増殖させ、一部を更に3次元培養表の作製に使用し、残りは疾患モデル作製のために凍結保存した。

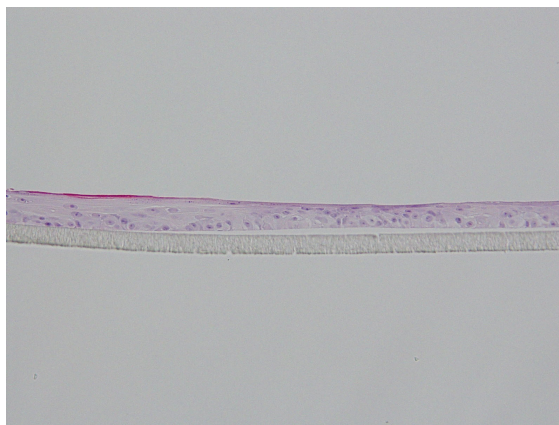
3次元培養表皮もCELLnTEC社のCnT-02-3DP培養液を使用して同社のプロトコールに従って作製を行ったところ、下図のように3次元表皮を構築することができた。

(下図：培養11日後の3次元培養表皮。ケラチノサイトが重層化して増殖しており、顆粒層を経て角化していることが確認できる)。

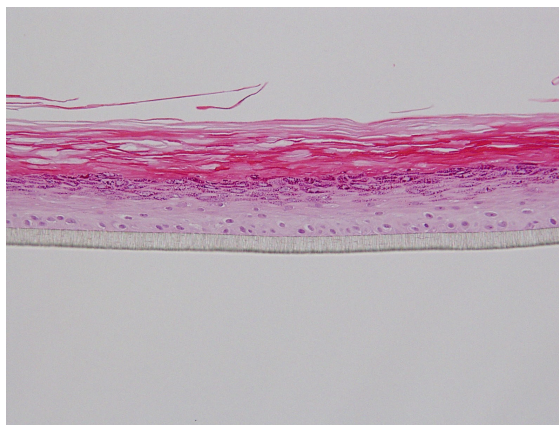


更に、疾患モデルとして使用するにあたり、どの程度の培養期間が適切か、3次元培養を開始して7日後、14日後、21日後、28日後でそれぞれ3次元培養表皮の組織標本作製して比較検討した。

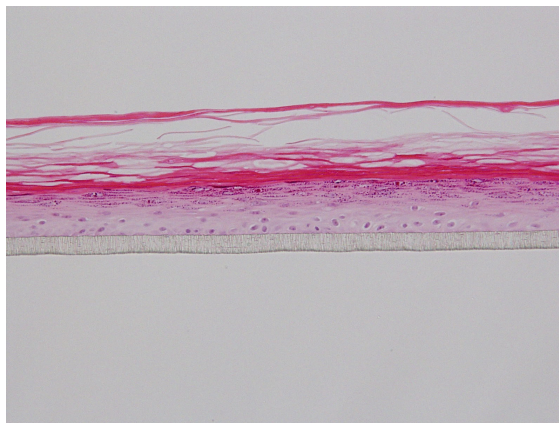
(次図：7日後、立体構造がみられるが、顆粒層ははっきりせず、最表面に角化がごくわずかにみられる程度)



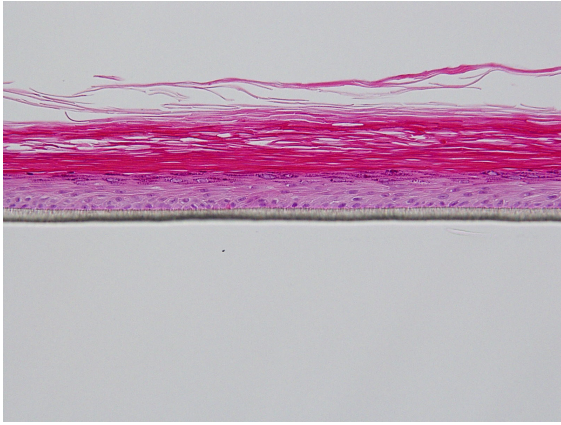
(下図：14日後、7日後と比較して顆粒層と角化層が発達している、)



(下図：21日後、14日後と同様、発達した顆粒層と角化層を認める)



(次図：28日後、角質は著明に肥厚しているものの、表皮はむしろ委縮している印象)



その結果、培養開始後 14 日以降であれば完全な表皮構造を構築できることが判明したが、28 日後では角化が亢進してやや表皮が薄くなる傾向があることから、疾患モデルとして使用することは適さないと判断した。培養開始後 14 日後と 21 日後ではほぼ変わらない結果であったが、より早く実験に使用することを考慮し、最終的に培養 14 日後が最もモデルとして使用するにふさわしいと判断した。また、この 3 次元培養表皮は、凍結したケラチノサイトを用いても同様に作製が可能であった。

現在ここまでしか実験を進めることができなかつたが、今後はこの 3 次元培養表皮を使用して、疾患モデルを作製していきたいと考えている。

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)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

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

なし

(3) 連携研究者

なし ()