

平成 22 年 3 月 17 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390298  
 研究課題名（和文）フコース転移酵素による regulatoryT 細胞の皮膚特異的遊走能の制御  
 研究課題名（英文）Regulation of skin-directed migration of regulatory T cells by fucosyltransferase  
 研究代表者  
 塩原 哲夫（SHIOHARA TETSUO）  
 杏林大学・医学部・教授  
 研究者番号：10118953

研究成果の概要（和文）：重要薬疹においては、制御性 T 細胞 (Treg) とエフェクター T 細胞 (Teff) の相互関係がその臨床型、重症度を定める最大の要因である。そのため Treg の機能を如何に高めるかが治療が成功するかどうかの鍵となる。本研究により、最も予後の悪い中毒性表皮壊死症 (TEN) の治療として最も有用である血漿交換が、Treg のフコース転移酵素 VII (Fuc-TVII) の発現を高めることにより Treg を局所に遊走させ病変を治癒に向かせる可能性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The delicate balance between effector T cells (Teff) and regulatory T cells (Treg) is the most important factor that determines the clinical phenotype and severity of severe drug eruption. Therefore, enhancing Treg functions is a key to our success of treatment for severe drug eruption. In this study, we for the first time demonstrate that plasmapheresis most useful for treatment of refractory toxic epidermal necrolysis acts to induce Treg migration to the skin by enhancing fucosyltransferase VII (Fuc-TVII) expression in the Treg cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
平成 20 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：(1)制御性 T 細胞 (2)重症薬疹 (3)糖転移酵素 (4)皮膚ホーミング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 強力な免疫抑制作用を有する制御性 T 細胞 (Treg) は、その作用故に感染、炎症、自己免疫、腫瘍などの様々な病態における免疫反応の調節に重要な役割を果たしている。しかし、この Treg が実際の病態において、どの

ような役割を果たし、それが治療によりどのような影響を受けるかに関しての解析は極めて少ない。Treg 自体その表面形質から極めて皮膚に遊走しやすい能力を有していると考えられるため、その皮膚へのホーミングを制御することこそ病態の解明と治療に結び

つくものとする。我々はこれまでの研究において、T細胞の皮膚へのホーミングはフコース転移酵素 VII (Fuc-TVII)により制御されていることを明らかにし (Takahashi R, J Immunol, 2003)ており、この Fuc-TVII の発現こそが Treg の皮膚への遊走能を決定する最大の要素と考えている。

(2) 重症薬疹の中でも中毒性表皮壊死症 (TEN)/Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と薬剤性過敏症候群 (DIHS) はその病態が極めて対照的であることが知られている。すなわち前者は表皮に著明な傷害を認めるのに対し、後者は遅発性で表皮傷害を殆ど認めないが、原因薬中止後も遷延した経過を繰り返す。ことに後者において特徴的に認められる 6 型ヘルペスウイルス (HHV-6) の再活性化は、DIHS の病変における Treg の関与の可能性を考えさせる。

## 2. 研究の目的

重症薬疹における病態の差は、Treg の動態の差、とくにその抑制機能と皮膚へのホーミング機能の差であることを明らかにした後、これまで重症薬疹に対し経験的に行われてきた様々な治療が、この Treg の機能にどのような影響を与えるのかを明らかにしたいと考えた。

(1) TEN/SJS と DIHS において、経過中に Treg の数、機能はどのように変動するか、その機能は Fuc-TVII 発現とどのように相関するかを明らかにする。

(2) 上記重症薬疹が軽快後、後遺症として様々な自己免疫疾患やリンパ腫を発症させることが知られている。これらの後遺症の発症と Treg の数、機能及び Fuc-TVII 発現の関係に関し、発症中、後と経過を追って検討する。

(3) TEN/SJS と DIHS においては、ステロイド大量療法、ステロイドパルス、IVIg、血漿交換などの治療が行われるが、その治療前後における Treg の抑制機能及び Fuc-TVII 発現に関して検討する。

(4) 上記(1)～(3)において、Treg の Fuc-TVII の発現が表面形質の変化にどのような影響を与えるかを明らかにする。

(5) DIHS においては様々なヘルペスウイルスの再活性化が起こり、それが様々な臨床症状を起こす。このようなウイルスの再活性化と皮膚病変の発症における Treg の機能、とくに Fuc-TVII 発現との関連を明らかにする。

(6) Treg の Fuc-TVII の発現を効率良く制御

するためにはどのようなサイトカインが重要かを主に in vitro の培養システムを用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

平成 19 年度

(1) 同じ原因薬により生じた TEN/SJS、DIHS、播種状紅斑丘疹型薬疹 (MP) における経時的な末梢血リンパ球 (PBMC) 中の Treg の数の変動を、主にフローサイトメトリーを用いて解析する。その際、増加している Treg population にはどのようなケモカイン・レセプターが発現しているかもフローサイトメトリーにて明らかにする。対照として、FoxP3<sup>+</sup>Teff にはどのようなケモカイン・レセプターが発現しているかも明らかにする。

(2) これらの患者から様々な時期に採取された PBMC から CD25<sup>+</sup> Treg 分画をカラムを用いて分離し、その中での Fuc-TVII 陽性細胞を二重蛍光抗体法により染色する。Treg 分画中の Fuc-TVII 陽性細胞がどのようなケモカイン・レセプターを発現しているかについても合わせて検討する。平行して RT-PCR 法により mRNA レベルでの発現についても検討する。

(3) 様々な時期に採取した PBMC から Treg 分画を分離し、それを同一患者の様々な時期の PBMC 中から分離した Teff 分画に加え、それを CD3、CD28 で刺激後の増殖反応を <sup>3</sup>H-TdR の取り込みにより検討する。その際、主に健康人 PBMC から得られた antigen presenting cell (APC) をマイトマイシン C 処理後加える。このような条件下で認められる増殖反応に対し、様々な割合で添加された Treg 分画がどの程度この反応を抑制しうるか検討することにより、Treg の制御機能を明らかにする。

(4) 様々な時期に採取した PBMC から CD25<sup>+</sup> 細胞 (Treg) 分画をカラムを用いて除去後、原因薬剤を添加して刺激することにより、培養上清中に放出されるサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-17) をフローサイトメトリーを用いた cytometric bead arrays (CBA) 法により測定する。除去しない場合のサイトカインと比べることによっても、Treg のサイトカイン産生に対する抑制機能を明らかに出来る。

平成 20 年度

(1) TEN/SJS、DIHS、MP 型薬疹において様々な治療が行われるが、その治療が Treg の頻度、ケモカイン・レセプター発現、機能、Fuc-TVII 発現にどのような影響を与えるか明らかにする。とくにヘルペスウイルスの再活性化のタイミングと、これらの様々な Treg

のパラメーターの関係についても明らかにする。

(2) これらの重症薬疹の皮膚病変部において、実際 FoxP3<sup>+</sup> Treg がどの程度浸潤し、その中で Fuc-TVII 陽性細胞がどの位の割合を占めているかを酵素組織化学により明らかにする。FoxP3<sup>+</sup> Teff 中の Fuc-TVII 陽性細胞の割合についても平行して検討する。

(3) DIHS 症例においては経過中しばしばサイトメガロウイルス (CMV) の再活性化を生じ、CMV 抗原が局所浸潤細胞中に陽性となる。酵素組織化学により、CMV 抗原が検出された病変部における FoxP3<sup>+</sup> Treg とそのうちの Fuc-TVII 陽性細胞分画の割合についても明らかにする。その際 PBMC 中の FoxP3<sup>+</sup> Treg 中の割合と比較することにより、FoxP3<sup>+</sup> Fuc-TVII<sup>+</sup> 分画の皮膚への浸潤しやすさを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) TEN/SJS と DIHS の急性期において、PBMC 中の FoxP3<sup>+</sup> Treg 分画の割合は大きな差異を認めた。すなわち TEN/SJS では Treg 分画の頻度は健常人と差がなかったのに対し、DIHS では著明な増加を認め、臨床症状の軽快とともに健常人と差のないレベルまで低下した。この際、増加している Treg 分画には、CCR4, CCR6, E セレクチンリガンド (ESL) など皮膚にホーミングしやすいレセプターが優先的に発現していた。それに対し、同様の皮膚にホーミングしやすい表皮形質は Teff にも発現しており、その割合は TEN/SJS と DIHS では有意な差は認めなかった。

(2) DIHS の急性期の PBMC 中に増加している FoxP3<sup>+</sup> Treg は Fuc-TVII を優先的に発現しており、その割合は TEN/SJS、MP 型薬疹、健常人と比べ有意に高かった。DIHS の際増加している Fuc-TVII 陽性 Treg には CCR6 が優先的に発現していた。

(3) TEN/SJS の急性期に採取された PBMC 中の Treg は、同一患者由来の Teff の増殖反応を抑制する能力が著明に低下していた。これに対し DIHS 急性期の PBMC 由来の Treg ではその抑制能は健常人と差のないレベルが保たれていた。この Treg 機能の低下は TEN/SJS の急性期に限って認められ、臨床症状の回復とともに正常化した。一方、DIHS ではこのような急性期の Treg 機能の低下を認めないかわりに、臨床症状が消退し治療も終了した後、Treg 機能の著明な低下を認めた。DIHS の回復期におけるこの Treg 機能の低下は Fuc-TVII 陽性細胞の減少の程度と平行していた。

(4) TEN/SJS の急性期に得られた PBMC 中の Treg では Teff からの IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 などのサイトカイン産生を抑制する能力が著明に低下していたが、DIHS の急性期では PBMC 中の Treg の分画は健常人と変わらないサイトカイン産生抑制能力を有していた。DIHS では回復後に Treg のサイトカイン産生に対する抑制効果の低下が確認された。

(5) TEN/SJS に対して行われる治療のうち、血漿交換は Treg の頻度を上昇させなかったものの、低下していた Treg の抑制機能と Fuc-TVII 発現の割合を有意に上昇させた。それと平行して血漿中の IL-6 の低下、IL-10 の上昇が認められた。それに対してパルス療法や IVIG は Treg の抑制能や Fuc-TVII 発現をある程度回復させたものの、有意な差とは言えなかった。血漿交換はさらに CD25<sup>+</sup> Teff 分画の Fuc-TVII 発現を減少させることが分かった。パルス、IVIG なども同様に Teff の Fuc-TVII 発現を低下させることにより奏効していると考えられた。

(6) TEN/SJS、DIHS の病変部における FoxP3<sup>+</sup> Treg, Fuc-TVII<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg の浸潤の割合は、DIHS 急性期において最も顕著に増加しており、PBMC の結果を主に反映していた。FoxP3<sup>+</sup> Teff における Fuc-TVII 発現に関しては TEN/SJS と DIHS 急性期ではとくに有意な差は認められなかった。

(7) DIHS においてヘルペスウイルスの再活性化が認められる期間は、Treg 機能、Treg 中の Fuc-TVII 発現は健常人と変わらないレベルに保たれていた。しばしば CMV 抗原陽性細胞周囲に Fuc-TVII<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg を認めた。この機能が次第に低下するとともにウイルスの再活性化は認められなくなった。一方、TEN/SJS においては、Treg 機能の回復に伴いウイルスの再活性化が認められた。

#### 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 16 件)

1. Mizukawa Y, Shiohara T: Non-pigmenting fixed drug eruption as a possible abortive variant of toxic epidermal necrolysis: immunohistochemical and serum cytokine analyses. Clin Exp Dermatol 2009 Epub (査読有)
2. Asano Y, Kagawa H, Kano Y, Shiohara T: Cytomegalovirus disease during severe drug eruptions: Report

- of 2 cases and retrospective study of 18 patients with drug-induced hypersensitivity syndrome. Arch Dermatol 145(9):1030-6, 2009. (査読有)
3. Kano Y, Shiohara T: The variable clinical picture of drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms in relation to the eliciting drug. Immunol Allergy Clin North Am 29(3):481-501, 2009. (査読有)
  4. Takahashi R, Kano Y, Yamazaki Y, Kimishima M, Mizukawa Y, Shiohara T: Defective regulatory T cells in patients with severe drug eruptions: timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome. J Immunol 185(12):8071-9, 2009. (査読有)
  5. Inoue K, Kano Y, Kagawa H, Hirahara K, Shiohara T: Herpes virus-associated erythema multiforme following valacyclovir and systemic corticosteroid treatment. Eur J Dermatol 19(4):386-7, 2009. (査読有)
  6. Shiohara T: Fixed drug eruption pathogenesis and diagnostic tests. Curr Opin Allergy Clin Immunol 9(4):316-21, 2009. (査読有)
  7. Aota N, Shiohara T: Viral connection between drug rashes and autoimmune diseases: how autoimmune responses are generated after resolution of drug rashes. Autoimmun Rev 8(6):488-94, 2009. (査読有)
  8. Aota N, Hirahara K, Kano Y, Fukuda T, Yamada A, Shiohara T: Systemic lupus erythematosus presenting with Kikuchi-Fujimoto's disease as a long-term sequela of drug-induced hypersensitivity syndrome. A possible role of Epstein-Barr virus reactivation. Dermatology 218(3):275-7, 2009. (査読有)
  9. Mizukawa Y, Shiohara T: Fixed drug eruption: a prototypic disorder mediated by effector memory T cells. Curr Allergy Asthma Rep 9(1):71-7, 2009. (査読有)
  10. Naito T, Shiohara T, Hibi T, Suematsu M, Ishikawa H: ROR gamma t is dispensable for the development of intestinal mucosal T cells. Mucosal Immunol 1(3):198-207, 2008. (査読有)
  11. Kano Y, Hirahara K, Asano Y, Shiohara T: HLA-B allele associations with certain drugs are not confirmed in Japanese patients with severe cutaneous drug reactions. Acta Derm Venereol 88(6):616-8, 2008. (査読有)
  12. Shiohara T, Mizukawa Y, Takahashi R, Kano Y: Pathomechanisms of lichen planus autoimmunity elicited by cross-reactive T cells. Curr Dir Autoimmun 10:206-26, 2008. (査読有)
  13. Mizukawa Y, Yamazaki Y, Shiohara T: In vivo dynamics of intraepidermal CD8+ T cells and CD4+ T cells during the evolution of fixed drug eruption. Br J Dermatol 158(6):1230-8, 2008. (査読有)
  14. Nanno M, Kanari Y, Naito T, Shiohara T (17人, 10番目): Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. Gastroenterology 134(2):481-90, 2008. (査読有)
  15. Sakuma K, Kano Y, Fukuhara M, Shiohara T: Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone associated with limbic encephalitis in a patient with drug-induced hypersensitivity syndrome. Clin Exp Dermatol 33(3):287-90, 2008. (査読有)
  16. Mizukawa Y, Takahashi R, Yamazaki Y, Kimishima M, Shiohara T: Fucosyltransferase VII-positive, skin-homing T cells in the blood and skin lesions of atopic dermatitis patients. Exp Dermatol 17(3):170-6, 2008. (査読有)
- [学会発表] (計6件)
1. 塩原哲夫: シンポジウム I. 皮膚と免疫. 免疫再構築症候群と regulatory T 細胞. 第73回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 甲府. 2009年9月26日.
  2. Shiohara T: Viral reactivations in drug-induced hypersensitivity syndrome. 4<sup>th</sup> Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. Sapporo. 2009 July 10.
  3. 塩原哲夫: ランチョン・セミナー「免疫不全状態における感染症と発疹症」免疫再構築症候群とウイルス. 第25回日本皮膚悪性腫瘍学会. 岡山. 2009年5月23日.

4. 塩原哲夫:教育講演「重症薬疹ガイドライン」薬疹の診療への提言. 第108回日本皮膚科学会総会. 京都. 2009年4月26日.
5. 塩原哲夫:招聘講演「感染症と薬剤アレルギー」. 第20回日本アレルギー学会春季臨床大会. 東京. 2008年6月12日.
6. Takahashi R, Kimishima M, Yamazaki Y, Shiohara T: The timing of dysfunction of regulatory T cells determines the pattern and outcome of T cell-mediated severe drug eruption. International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May 17th, 2008.

〔図書〕(計2件)

1. 塩原哲夫:薬剤性過敏症症候群(DIHS)におけるDLSTの意義とその実地ポイントは? 秋山一男、池澤善郎、岩田力、岡本美孝、編. EBMアレルギー疾患の治療. 中外医学社. 東京. p.2011-2. 2009年10月.
2. Shiohara T, Mizukawa Y, Kano Y: Lichen planus. Therapy of skin diseases. Krieg T. ed. Springer Verlag, Berlin. pp.213-22, 2010.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

塩原 哲夫 (SHIOHARA TETSUO)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 10118953

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

水川 良子 (MIZUKAWA YOSHIKO)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 50301479  
高橋 良 (TAKAHASHI RYO)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 00317091