

平成21年 4月14日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591326
 研究課題名（和文） 制御性 T 細胞による B 細胞分化の抑制とウイルスの再活性化誘導の機序
 研究課題名（英文） Pathomechanisms of viral reactivation and inhibition of B cell differentiation associated with regulatory T cell
 研究代表者
 狩野 葉子 (KANO YOKO)
 杏林大学・医学部・准教授
 研究者番号：20142416

研究成果の概要：薬剤性過敏症症候群(DIHS)と Stevens-Johnson 症候群(SJS)/中毒性表皮壊死症(TEN)の血中の制御性 T 細胞(Treg)の量と機能を解析し、DIHS では発症初期の Treg の増加がヘルペスウイルスの再活性化をもたらしている可能性が示唆され、一方、SJS/TEN では Treg の機能低下がエフェクター T 細胞の過度の活性化をきたし、このために表皮の傷害を引き起こしている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,300,000	690,000	2,990,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：(1) 制御性 T 細胞 (2) 薬疹 (3) リンパ球 (4) DIHS (5) ウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) DIHS は限られた原因薬により遅発性に生じ、薬剤中止後も遷延した経過をとって様々な臓器に病変を認め、回復後しばしば自己免疫疾患を生ずる特異な薬剤誘発性疾患である。Human herpesvirus (HHV-6)の再活性化のみが注目されているが、他のヘルペスウイルスの再活性化もしばしば認められ、GVHD との類似性が指摘されている。DIHS に特徴的に認められるヘルペスウイルスの再活性化の機序は明らかではないが、我々が報告した

低ガンマグロブリン血症と B 細胞、NK 細胞の減少は、その原因となりうる重要な所見である。これらの異常は同じ薬剤により生じた軽症の薬疹では認められず、ヘルペスウイルスの再活性化を認めるような DIHS の発症時にのみ特異的に認められることから、DIHS の発症及びそれに伴って認められるウイルスの再活性化に密接に関与している可能性が高い。

(2) 最近、我々は DIHS 患者では発症時に immunoglobulin(Ig)、B 細胞、NK 細胞の

低下だけでなく、regulatory T細胞 (Treg)の著明なexpansionが特異的に認められることを見出した。TregのこのようなexpansionはDIHSの発症初期にのみみられ、以後臨床症状の回復とともに急速に退縮する。しかし、同様のexpansionと退縮の所見は他の重症薬疹の急性期には認められない。

- (3) この退縮過程の異常が、後に生じてくるような自己免疫疾患の発症に関係するのではないかと推測される。TregがB細胞を傷害する結果として免疫反応を抑制すると最近の報告や、NK細胞がB細胞の分化に大きな役割をしているとの報告を考え合わせると、DIHSの発症初期に認められるこのようなTregのexpansionがIg低下などの異常をもたらす、ウイルスの再活性化を誘導する引き金になっているのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

TregのマーカーとしてCD25より機能との関連の深いFoxP3発現を指標として用いて、TregのexpansionがB細胞、NK細胞の分化、活性化を阻害し、結果としてDIHSでみられるIg産生の低下、ヘルペスウイルスの再活性化がもたらされるのではないかとこの可能性を明らかにする予定である。本研究における主な実験は、我々がこれまで保存してきた多数のDIHS患者及びSJS/TEN患者の急性期と回復期の末梢血リンパ球を用いて行う。

- (1) DIHSにおいて急性期にexpandしたTregが、回復期に正常に戻った同一患者由来のB細胞、NK細胞に対して傷害を与え、結果的にIgG、IgM産生の低下に結びつくことを明らかにする。
- (2) B細胞に対するこのような傷害活性は急性期のDIHS患者のTregだけが保有しているのか、健常人やSJS/TEN患者のTregも同程度の活性を有しているかについても本研究において明らかにする。
- (3) TregがB細胞、NK細胞を傷害する機序に関しても、cell-to-cell contact dependentなのか、そしてもしそうならCD95/CD95Lを介したアポトーシスなのかなどについても検討する。
- (4) TregにもToll-like receptor (TLR) 2, 4などが発現しており、それを介して加えられた刺激がTregの機能に影響を与えることも示されている。
そこで、DIHS患者のTregをTLR 2, 4リガンドで刺激した場合にはB細胞に対する傷害活性は低下するのか、亢進するのかについても明らかにする。
- (5) このような傷害の結果として、潜伏感染

しているヘルペスウイルスの再活性化が起りうるかについても、ウイルスDNAが全血中に検出されなくなった時点の回復期のリンパ球に急性期のTregを加えることにより再活性化が誘導されることをreal-time PCR法を用いて明らかにする。

- (6) しかし、これとは全く逆の可能性、すなわちB細胞、NK細胞の低下がTregのexpansionをもたらすという可能性についても検討する。
- (7) DIHSの回復期に認められるTregの退縮過程の異常が、自己免疫疾患の発症に結びつく可能性についても検討する。
- (8) DIHSにおいて認められるウイルスの再活性化から各臓器の傷害、ひいては自己免疫疾患発症に至る過程でのTregの果たす役割を明らかにする。

最終的に、我々が治療として用いているステロイドがこの過程にどのような影響を与えるかを明らかにすることにより、より適切な治療法を確立する。

3. 研究の方法

- (1) 同じ原因薬により生じたDIHS、SJS/TEN、軽症型薬疹の様々な時期の末梢血リンパ球(PBL)中のFoxP3+CD4+CD25+Tregの頻度をフローサイトメトリーにて測定する。現在までの予備実験ではTregが著明に増加するのはDIHSの急性期のみであるが、その増加が他の細胞分画(eg. B細胞、 γ δ T細胞)の頻度にどのような影響を与えるかについても明らかにする。さらにその増減と患者の血清中のIgレベルや臨床症状、再活性化されるウイルスのDNA量とのその相関についても検討する。特に、DIHSでは皮疹消退後、増加していたTregがどのように退縮していくかを経時的に検討する。また、これらの過程にステロイド治療やIntravenous immunoglobulin治療がどのような影響を与えるかについても、これらの治療を行わなかった症例との比較で明らかにする。
- (2) 健常人、DIHS回復期のPBLよりCD19+カラムを用いてB細胞分画を分離し、それをPWMの存在下で6日間培養を行い上清中に検出されるIgM、IgG量をヒトIgM、IgG特異的ELISAを用いて測定する。健常人B細胞を用いた我々の予備実験では、この系に自己NK細胞を添加した時に最も著明なIgM、IgGの産生がみられている。DIHS患者ではNK細胞に機能的な欠損があるが、このNK細胞添加によるIgM、IgG産生の増強が健常人と同様にみられるか否かについて検討を試みる。B細胞のみ、あるいはB細胞に自己NK細胞を加え

て培養した場合の上清中の IgM、IgG 産生のレベルを健常人と DIHS 回復期で比較することにより、DIHS 患者では B 細胞、NK 細胞レベルの異常があるかが確認できる。

- (3) 上記(2)で用いた健常人、DIHS 回復期、それに SJS/TEN 回復期の患者の PBL から得た B+ NK 細胞分画に、健常人、DIHS や SJS/TEN 急性期 PBL から分離した CD4+CD25+Treg を加え、PWN で 6 日間刺激することにより上清中に検出される IgM、IgG 量を ELISA により測定する。Treg 分画を B+ NK 細胞分画に加える前に、抗 CD3 や PMA あるいは原因薬剤などで短時間刺激を行う実験もあわせて行う。
- (4) 上記(3)の実験において Treg 添加により B 細胞にアポトーシスが誘導される可能性を明らかにするため、B 細胞に対する Annexin V binding をフローサイトメトリーで解析する。
- (5) もし上記(3)の実験において、Treg が B 細胞による IgM、IgG 産生を抑制するという結果が得られたら、その抑制に Treg と B 細胞の直接の contact が必要か否かを、transwell plate を用いて培養することにより明らかにする。
- (6) Treg が B 細胞からの IgM、IgG 産生を抑制することがウイルスの再活性化をもたらす可能性を明らかにするため、平成 19 年度と同様の培養を行い、その後回収された細胞中のウイルス量と培養前のウイルス量の比較を行う。
- (7) すなわち、ウイルス DNA を検出しなくなった時点の回復期の DIHS 患者の PBL から B 細胞、NK 細胞分画を分離した後、急性期 DIHS の PBL から分離した Treg を(様々な刺激により活性化させた後に) 加え 6 日間培養する。培養開始時と開始後に回収されたリンパ球中のウイルス DNA を real-time PCR 法を用いて解析する。解析するウイルスは HHV-6、-7、Epstein-Barr virus (EBV)、cytomegalovirus (CMV) である。上清中の IgM、IgG の減少とウイルスの再活性化がどの組合せで培養を行った時にみられるのか、両者の相関はあるのかについて明らかにする。
- (8) 再活性化してくるウイルスの reservoir として monocyte や T 細胞の可能性もあるため、B+ NK だけでなく全 PBL を用いて同じ培養を行う実験も平行して行う。もし全 PBL を用いた時にのみウイルスの再活性化を認める場合には、全 PBL から monocyte、CD4、CD8、 $\gamma\delta$ T 細胞などどの分画を除去した場合に再活性化が認められなくなるかを明らかにすることにより、再活性化したウイルスが潜伏感染し

ている細胞を同定出来ると考えている。

- (9) Treg は Toll-like receptor (TLR) 2、4 など発現しているが、それを介して刺激された Treg が機能的に亢進するのか低下するのかについては、現在一定の結果が得られていない。そこで、本研究では様々な時期の DIHS、SJS/TEN 患者や健常人から分離された Treg を Pan3Cys (TLR2 リガンド)、LPS (TLR4 リガンド) で刺激後、B+ NK 細胞の培養系に加え、上清中の IgM、IgG 量を測定する。それとともに B 細胞にどの程度アポトーシスが誘導されるかについても Annexin V binding により検討する。

これらの研究により TLR2 を刺激するウイルス感染や薬剤刺激が Treg の機能にどのような影響を与える結果として、Ig 産生の低下やウイルスの再活性化が誘導されるかが明らかになる。

4. 研究成果

- (1) 重症薬疹である DIHS と SJS/TEN の発症初期の末梢血中の Treg の量と機能を解析し、DIHS の急性期には Treg は顕著に増加しており、T 細胞の増殖やサイトカイン産生を抑制する機能や、皮膚への遊走に必要な接着分子の発現は健常人と同様に保持されていた。一方、SJS/TEN では Treg の量は健常人のそれと比較して有意な差はなかったが、サイトカイン産生による Treg の機能の評価ではその機能が著明に低下していた。
- (2) DIHS の発症初期では機能的に正常な Treg が増加することが、潜伏しているヘルペスウイルスの再活性化の一因になっている可能性がある。
- (3) SJS/TEN では Treg の機能的な低化により薬剤特異的エフェクター T 細胞の過度の活性化をまねき、表皮の壊死性の変化をもたらしている可能性がある。
- (4) 回復後の Treg の量、機能の解析結果では、DIHS において発症初期に増加していた Treg は正常に復したが、機能の傷害が生じていた。一方、SJS/TEN では発症初期に低化していた Treg の機能は臨床症状の回復期には正常の機能に復していた。
- (5) このような DIHS の回復後の Treg の機能低下は DIHS 回復後に発症する後遺症として認められる自己免疫疾患の出現に関与している可能性がある。
- (6) 重症薬疹における Treg の解明は未だ世界的にみてもなされておらず、この解析結果は非常に重要な意味をもつ。すなわち、ウイルス再活性化をきたす重症薬疹である DIHS 発症機序の解明に繋がった
- (7) このような結果は重症薬疹治療のステロ

イドの適切な使用方法やより良い治療の選択に導き、患者に有用と考えられる。

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 6 件)

1. 狩野葉子: 重症薬疹研究の今後の方向—薬剤性過敏症候群を中心に—. J Environ Dermatol Cutan Allergol 3(1):7-10, 2009, (査読有り)
2. 狩野葉子: 抗悪性腫瘍薬による皮膚病変. 医薬ジャーナル 44(12):3-6, 2008.
3. 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):616-618, 2008, (査読有り)
4. Shiohara T, Mizukawa Y, Takahashi R, Kano Y. Pathomechanisms of lichen planus autoimmunity elicited by cross-reactive T cells. Curr Dir Autoimmun 10(N):206-226, 2008, (査読有り)
5. 狩野葉子: 薬剤と発汗. Visual Dermatology 7(9):1020, 2008, (査読無し)
6. 狩野葉子: 薬事・食品衛生審議会(副作用・感染被害判定部会)から. Visual Dermatology 7(7):790, 2008, (査読無し)

[学会発表] (計 4 件)

1. Kano Y, Hirahara K, Asano Y, Mitsuyama Y, Takahashi R, Shiohara T: Association between drug and human herpesvirus in drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms. 3rd International drug hypersensitivity meeting, Paris, 2008. 4. 12.
2. 狩野葉子: 教育講演 皮膚科医が知っておくべき特徴的な薬疹 分子標的療法ではどのような皮膚病変に注意すべきか? 第 107 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2008. 4. 20.
3. Kano Y, Asano Y, Hirahara T, Shiohara T: Autoimmune diseases occurring after drug-induced hypersensitivity syndrome. 6th International conference on HHV-6 & 7, Baltimore, 2008. 6. 21.
4. 狩野葉子: 日常診療における薬疹とウイ

ルス性発疹症の見分け方. 第 24 回日本臨床皮膚科医会三支部合同学術大会, 東京, 2008. 11. 30.

[図書] (計 2 件)

1. 狩野葉子: Sweet 病の第 1 選択薬は? EBM 皮膚疾患の治療. 宮地良樹, 幸野 健編, 東京, 中外医学社, 2008. 4. 25, p. 94-97.
2. Shiohara T, Mizukawa Y, Takahashi R, Kano Y: Pathomechanisms of lichen planus autoimmunity elicited by cross-reactive T cells. In: Dermatologic Immunity. Nickoloff BJ, Nestle FO (Ed.) Basel, Karger, 2008. p. 206-226.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 葉子 (KANO YOKO)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号: 20142416

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 良 (TAKAHASHI RYO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 00317091