

平成22年5月27日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790815

研究課題名 (和文) 薬剤性過敏症症候群における制御性Tリンパ球の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of regulatory T cells in patient of drug hypersensitivity syndrome

研究代表者

高橋 良 (TAKAHASHI RYO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：00317091

研究成果の概要 (和文)：重症薬疹における制御性T細胞 (Treg) の関与について解析した。Drug-induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS) と Stevens-Johnson Syndrome (SJS) では、急性期及び回復期における Treg の数や Treg 上の皮膚ホーミングレセプタの発現、そして Treg の抑制機能に有意な違いが見られ、これらの所見は重症薬疹の症状や予後に Treg が大きく関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated whether regulatory T cells (Treg cells) associated with the pathogenesis of severe drug eruptions. We have found that the number of Treg cells and the expression of skin-homing receptors on Treg cells was significantly different between Drug-induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS) and Stevens-Johnson Syndrome (SJS) .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：皮膚炎症・再生学・regulatory T cell・DIHS・SJS・ホーミング・皮膚免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬剤性過敏症症候群とヘルペスウィルスの再活性化の関連

突発性発疹の原因ウイルスであるヒトヘルペスウィルス-6 (HHV-6) や HHV-7 等のヘルペス属ウイルスは、体内に潜伏感染し、生涯にわたって持続感染する。健常人では初回感染後に獲得した後天性免疫機能により発症

せずに経過するが、GVHD や薬剤性過敏症症候群 (Drug-induced Hypersensitivity Syndrome: DIHS) ではヘルペスウィルスの再活性化が頻繁に見いだされる。

さらに再活性化の続発症として、いくつかの自己免疫疾患が生ずることが知られている。このことは、これらの病態で生ずる全身

の免疫システムの変調が、その後続くウイルスの再活性化と自己免疫疾患の発症をもたらす可能性を示している。しかしながら、これらの病態で見られる免疫学的な変化が、どのような機序により上記のような続発症をもたらすのかは明らかにされていない。

(2)急性期の DIHS 患者末梢血中に Treg が増加している事を発見

我々は DIHS でのような免疫システムの変調が起こっているのか興味を持ち、後にヘルペスウイルスの再活性化が認められた DIHS 患者末梢血リンパ球のフェノタイプをフローサイトメトリーで解析した。その結果、免疫の調和を司る CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) が、急性期の DIHS 患者末梢血中に著明に増加している特徴的な所見を得た (unpublished data)。

(3)増加した Treg は、極めて皮膚へホーミングしやすいフェノタイプであった

さらに我々は DIHS 患者末梢血の Treg のフェノタイプを解析した結果、大部分の増加した Treg は皮膚ホーミングに關与するケモカインレセプタ CCR4 と皮膚リンパ球抗原 Cutaneous Lymphocyte associated Antigen (CLA)、そして E-セレクトインリガンド (ESL) を発現していた。また、Treg の細胞内には ESL の発現を制御する糖転移酵素のフコシルトランスフェラーゼ VII (fucosyltransferase-VII: FucT-VII) を強く発現しており、さらに急性期 DIHS 患者の病変部組織に FucT-VII 陽性の Treg が浸潤している事を見いだした。一方、回復期になると末梢血中の Treg の割合が減少し、健常人と同じレベルになった。また健常人やヘルペスウイルスの再活性化を確認できなかった (DIHS と同様の重症薬疹の一種である) Stevens-Johnson Syndrome (SJS) 患者末梢血では、Treg は全く増加しておらず、Treg には ESL や FucT-VII が殆ど発現していなかった。

(4)考えられるストーリー

これらの結果から、ヘルペスウイルスの再活性化が認められた DIHS 患者では、

- ① 原因薬剤の投与→薬剤が直接的 or 間接的に CD25⁺Foxp3⁺Treg を増加?
- ② 増加した Treg は極めて皮膚へホーミングしやすい能力 (CCR4⁺ CLA⁺ ESL⁺ FucT-VII⁺) を持つ。
- ③ 皮膚へホーミングした Treg がローカルの免疫を抑制。
- ④ その結果、潜伏感染していたヘルペスウイルスが再活性化する。
- ⑤ 治療によって Treg 数が減少する
- ⑥ (?)→自己免疫疾患の発症

というストーリーを描く事ができる。このストーリーを裏付けるのが DIHS 患者急性期の DLST 陰性検査結果である。これは、薬剤に反応するリンパ球が増加しているにもかかわらず、増加した Treg のためにリンパ球の増殖反応が抑制され、DLST の検査結果が陰性化になることが推測できる。

(5)判っていない事

おそらく薬剤が Treg を増加させていると考えられるが、薬剤が直接 Treg を増加させているのか、あるいは間接的に増加させているのかは判っていない。また、DIHS 患者の急性期において、DLST 陰性の結果から推測すると、増加している Treg は細胞増殖の抑制機能を保有すると考えられるが、しかしながら回復期を含めその詳細は全く判っていない。DIHS 患者で発症する自己免疫疾患は、恐らく Treg の機能不全によって起こる可能性が十分に考えられるが、細胞増殖の抑制機能だけではなくサイトカイン産生の抑制機能不全に偏りがあるのかもしれない。なお、重症薬疹の比較対象として調べた SJS 患者では、Treg の数は正常人と同じ割合であった。

2. 研究の目的

我々は DIHS 患者および比較対象として SJS 患者それぞれの急性期および回復期の末梢血に存在する Treg について、下記の項目を明らかにする。なお、同時にボランティア健常人のサンプルも解析し、比較する。

(1) より多くの DIHS および SJS 症例の急性期および回復期の末梢血中の Treg 数の割合および個々の細胞レベルの皮膚ホーミングレセプタの発現やケモカインの発現、FucT-VII の発現解析を進める。

(2) DIHS および SJS 患者における Treg の細胞増殖の抑制機能の有無を調べる。

(3) DIHS および SJS 患者における Treg のサイトカイン産生抑制機能の有無を調べる。

(4) 上記抑制機能について、原因薬剤による刺激、CD3 モノクローナル抗体を用いた非特異的刺激の両者を行い、Treg の抑制機能が特定抗原 (原因薬剤) だけの刺激を抑制するのか、あるいは非特異的な刺激に対して抑制を行うのかを調べる。

(5) DIHS 患者の末梢血リンパ球に原因薬剤を含む様々な薬剤を加えて *in vitro* で培養を行い、原因薬剤添加によって Treg が増加す

るのかを調べる。

(6) 実験結果から原因薬剤による違い、ウィルス再活性化の違い等と比較する。

3. 研究の方法

DIHSおよび比較対象としてSJSそして健康人におけるTregの割合の計測、皮膚ホーミングレセプタ発現の頻度を解析する。そしてTregの細胞増殖抑制機能を解析する。

(1)DIHS、SJS、ボランティア健康人からリンパ球の採取・保存。

杏林大学医学部付属病院皮膚科の医師の協力の元、十分なインフォームドコンセントを行い、サンプル採取の協力を得られたDIHS、SJS、健康人より採血し、リンフォプレップを用いて末梢血単核細胞(PBMC)を分離し、解析時までセルバンカー™細胞保存液とディープフリーザー(-80℃)にて凍結保存する。

(2)PBMC中のTregの頻度の解析

anti-Human CD25モノクローナル抗体およびanti-Foxp3モノクローナル抗体、anti-CD4モノクローナル抗体を用い、当教室現有設備のフローサイトメトリー(日本BD社FACSCalibur)を用いて凍結保存したDIHSおよびSJS患者、そして健康人PBMC中のTregの割合を計測する。

(3)Tregに発現している皮膚ホーミングレセプタの解析

同様に、CLA、CCR4の発現をモノクローナル抗体で染色しフローサイトメトリーを用いてTreg上のそれらの発現を個々の細胞レベルで解析する。また、我々が開発したassay*でE-セレクトインリガンドの発現を個々の細胞レベルで解析する。

* 研究業績: Takahashi R et. al., *The Journal of Immunology* 171: 5769-5777, 2003

(4)Treg細胞内FucT-VIIの発現の解析

患者PBMCから当教室現有設備の免疫磁気ソーター(MACS)を用いてCD4⁺細胞を分離後、サイトスピン標本を作製する。その後、我々が開発したassay*とanti-Foxp3モノクローナル抗体を用いて、個々のTregにおけるFucT-VIIの発現を免疫組織化学的に解析する。

* 研究業績 Mizukawa Y, Shitara K, Yamazaki Y, Teraki Y, Takahashi R, Narimatsu H & Shiohira T, *J Invest Dermatol*, 117: 743-747, 2001.

(5)Treg機能の解析・細胞増殖抑制機能の解析

Tregの細胞増殖抑制機能を計測するために、凍結保存したDIHS患者の急性期および回復期、健康人のPBMCからTreg(CD4⁺CD25⁺CD127^{mid-low}分画^註)を当教室現有設備のフローサイトメトリー(日本BD社FACSAriaセルソーター)を用いて分離後、CD4⁺CD25⁻エフェクターT細胞とともに培養し、anti-human CD3とanti-CD28モノクローナル抗体にて活性化培養を行う。

4. 研究成果

DIHSおよび対象疾患として重症薬疹のStevens-Johnson Syndrome(SJS)、そして健康人の末梢血リンパ球を用いてCD4⁺T細胞におけるTregの頻度をFACSで調べた結果、Tregが、ヘルペス属ウィルスの再活性化が後に確認された急性期のDIHS患者末梢血中で健康人と比較して有意に増加している特徴的な所見を得た。さらにDIHS急性期のTregにおける皮膚ホーミング関連分子(E-セレクトインリガンド(ESL)およびCCR4)の発現を調べてみると、増加していた大部分のTregにESLとCCR4が有意に発現している特徴的な所見を得た。このTregの増加は、回復期になると健康人と変わらない値に戻った。一方、ヘルペス属ウィルスの再活性化を後に確認できなかったSJSでは急性期および回復期のいずれの時期でもTregの割合及び皮膚ホーミング関連分子の発現に変化が見られなかった。すなわち、DIHS急性期のTregは、極めて皮膚へ行きやすいフェノタイプという事が判った。

次に、DIHSおよびSJSのTregが持つ細胞増殖の抑制機能について、トリチウム-サイミジン up-takeにて調査した。Tregが増加しているDIHS急性期のTregは、健康人とほぼ変わらない抑制機能を持っていたが、驚いた事に回復期の抑制機能は有意に失われている事が新たに判った。面白い事に、SJSではDIHSとは全く正反対の態度を示し、急性期のTregは抑制機能が有意に失われている事に対し、回復期では抑制機能が回復している事が判った。

さらに薬疹の原因薬で刺激後、T細胞から産生されるサイトカイン産生に対するTregの抑制機能を測定してみると、DIHS急性期の末梢血単核細胞(PBMC)からTregを除くと、T細胞からのサイトカイン産生が増加した。一方、DIHS回復期では、サイトカイン産生の変化は見られなかった。同様に、急性期SJS

の PBMC を用いた実験では、サイトカイン産生の変化は見られなかった。すなわち、Treg のサイトカイン産生に対する抑制機能も、DIHS 急性期では保持しているが回復期で機能不全になる、SJS 急性期では機能不全になり、回復期では機能を保持しているという特徴的な結果を得た。また、テグレトール等の原因薬で DIHS 急性期の PBMC を刺激すると、培養 5 日目で CD25⁺Foxp3⁺ Treg 細胞が増加した。この現象は DIHS 急性期で Treg が増加している事と一致した。

以上の結果から、DIHS 急性期の皮膚症状が SJS と比較して重篤では無いのは、抑制機能を有する Treg が皮膚へホーミングし、薬剤に反応するエフェクター T 細胞を押さえている結果だと考えられた。また、潜在性ウイルスを抑制しているウイルス特異的な T 細胞までを抑制し、その結果ヘルペスウイルスの再活性化が起こることも推測された。DIHS 回復期では Treg の機能不全が長く続き、その結果自己免疫性疾患を発症することが示唆された。一方、SJS では Treg 機能不全の為、薬剤に反応するエフェクター T 細胞がよりアクティブに活躍し、DIHS と比較して激しい症状を呈することが示唆された。

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 3 件)

① 高橋 良, 重症薬疹とレギュラトリー T 細胞: 査読無. 臨床免疫・アレルギー科 54 巻 1 号:投稿中, 2010.

② Takahashi R, Kano Y, Yamazaki Y, Kimishima M, Mizukawa Y, and Shiohara T. Defective regulatory T cells in patients with severe drug eruptions: timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome: 査読有. The Journal of Immunology 182:8071-79, 2009.

③ Shiohara T, Kano Y, and Takahashi R. Current concepts on the diagnosis and pathogenesis of drug-induced hypersensitivity syndrome: 査読有. JMAJ 52:347-352, 2009.

[学会発表] (計 4 件)

① Shiohara T, Kano Y, Takahashi R: Update on regulators: regulatory T cells in

DIHS/DRESS and SJS/TEN. 3rd International drug hypersensitivity meeting. Paris, 2008. 4. 12.

② 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.

③ Takahashi R and Shiohara T: Trafficking receptor expression on regulatory t cells in severe drug eruptions, DHM3, Paris, France, Apr 11-13, 2008.

④ Takahashi R, Kimisima M, Yamazaki Y, and Shiohara T: Severe drug hypersensitivity disorders is induced by dysfunctional Tregs, The International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May 14-17, 2008.

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 良 (TAKAHASHI RYO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 00317091