

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年9月24日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390327

研究課題名（和文）エフェクターT細胞と制御性T細胞の皮膚への遊走を調節する因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of factors that regulate effector T cell and regulatory T cell recruitment to the skin

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）：本研究において、皮膚病変部へ浸潤するエフェクターT細胞(Teff)と制御性T細胞(Treg)の間のバランスが何によって制御されているかを明らかにしようと考えた。自然治癒傾向のある固定薬疹(FDE)の病変部ではIL-16を強く発現する肥満細胞を多数認め、それがTregを局所に遊走させるのに対し、重症薬疹であるStevens-Johnson症候群(SJS)/中毒性表皮壊死症(TEN)病変部ではこのような肥満細胞は減少しており、それがTregの遊走を阻害する結果、病変が重篤化することが分かった。しかし、このような肥満細胞の増加によるTregの増加は腫瘍の退縮には好ましくない。イミキモドはTLR7/8を刺激するが、繰り返しボーエン病に外用することにより、IL-17を産生する肥満細胞が増加する結果、局所のTregを減少させることにより、腫瘍を退縮させることが出来ることが分かった。このように、肥満細胞がIL-16かIL-17を産生するかにより、Tregの遊走を促したり阻害したりすることにより皮膚の炎症は巧妙に調節されている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated which factors can determine the balance between effector T cells (Teff) and regulator T cells (Treg) in the inflammatory sites. In fixed drug eruption (FDE) lesions that spontaneously resolve, mast cells expressing high levels of IL-16 are abundantly detected, thereby inducing Treg recruitment to the inflammatory site. In contrast, the paucity of mast cells expressing IL-16 in the SJS/TEN lesions that exhibit severe immunopathology made Treg impossible to migrate into the inflammatory site. On the other hand, the abundance of mast cells expressing IL-16 was detrimental to tumor regression through the induction of Treg recruitment. Repeated application of imiquimod able to stimulate TLR7/8 caused an increase in IL-17 expressing mast cells and a profound decrease in the Treg/Teff ratio, which was associated with tumor regression. Thus, the balance between Treg and Teff in the inflammatory site can be determined by mast cells resident in the lesion: if they preferentially produce IL-16, the lesions spontaneously resolve; but if they produce IL-17, immunopathology ensues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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)effector T細胞 (2)regulatory T細胞 (3)皮膚ホーミング (4)薬疹  
(5)ヘルペスウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床検体を用いた研究の多くは、炎症の極期に増加しているものが炎症の起炎物質(細胞)であり、自ずと治療の target は如何にその活性化を制御出来るかが焦点となってきた。しかし炎症の極期にもその炎症をそれ以上に増悪させないように働く機序が働いているはずであり、それを明らかにすることは極めて重要である。しかし、炎症の段階に応じて、炎症を起こす側のエフェクターT細胞(Teff)と抑える側の regulatory T 細胞(Treg)のバランスが制御されているかを明らかにした研究はない。

(2) このような Teff と Treg の遊走のバランスに関与するものとして、T 細胞の皮膚への遊走を制御する E-セレクトイン・リガンドの発現を制御するフコース転移酵素(fucosyltransferase VII, IV; Fuc-T VII, Fuc-T IV)の働きが注目されており、この Fuc-T VII, IV の働きが炎症の段階に応じて変化する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) 重症薬疹では、このような炎症を軽快させる機序としての Treg の皮膚への遊走が何故低下しているのか、軽症の薬疹では何故そのような低下が起こっていないのか、などを明らかにすることにより、重症薬疹の新しい治療を樹立しようと考えた。本研究では、重症薬疹の代表として Stevens-Johnson 症候群(SJS)/中毒性表皮壊死症(TEN)を、軽症の薬疹として固定薬疹(FDE)を対象として、Treg/Teff の皮膚への遊走のバランスがどのような機序により制御されているかを明らかにしようと考えた。

(2) 当初は Treg/Teff のバランスの解析を Fuc-T VII, IV ノックアウトマウスを用いて行う予定であったが、このマウスを多数用意することが難しい点と、ヒトの炎症に一致したモデルを樹立することの困難さから、ヒトの実際の炎症のモデルとして TLR7/8 を刺激する imiquimod を Bowen 病の病変部に繰り返し塗布することにより生じてくる病変を解析の対象としようと考えた。この病変では Treg の減少が効果的に起こるほど Teff が増加し、腫瘍が退縮するわけで、このバランスがどのように制御されているかの解析に恰好のモデルと考えた。

### 3. 研究の方法

(1) SJS/TEN と FDE 患者から発症後の様々な時点で末梢血リンパ球(PBML)を採取し、それから CD8<sup>+</sup>Teff と CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg を分離し、その PBML 中の頻度、表面形質、機能を解析し、それが病変の進展とどのように関係するかを主にフローサイトメトリーを用いて検討した。それと平行して、病変部皮膚にこれらの細胞がどのように遊走して行くかを主に免疫組織化学的に検討した。その際、T 細胞だけでなく局所に存在する細胞として肥満細胞をトリプターゼ染色により同定するとともに、局所のサイトカイン(IL-2, 6, 8, 12, 15, 16, 17, 22, 23)についても免疫組織化学、PCR などを用いて検討した。

(2) マウスの検討については結局十分な結果が得られなかったため割愛する。その結果、もう一つの検討は、イミキモドを外用した Bowen 病の病変部を用いて行った。これも(1)と同様の方法で経時的に得た PBML と病変部皮膚を用いて解析した。病変部皮膚は投与開始時、2, 4, 8, 10, 12 週後に経時的に採取し、主に免疫組織化学及び PCR 法にて浸潤細胞、肥満細胞、サイトカインについて検討した。

### 4. 研究成果

(1) SJS/TEN と FDE で Teff、Treg の PBML 中のバランスを経時的に比較検討すると、PBML 中の頻度では大きな差は認められなかった。しかし、Treg が皮膚へ浸潤するのに必要な CCR4, 6 といったケモカイン・レセプターの発現は、明らかに SJS/TEN では低下していた。それに対して FDE では健常人のそれと差を認めなかった。様々な時期に採取した Treg の機能を検討したところ、SJS/TEN では発症時に著明な機能低下があり、それは症状の軽快とともに回復した。しかし、FDE では全く機能低下は認められなかった。

(2) SJS/TEN における Treg の機能低下は、どうして起こるかに関しては、その一つの因子として SJS/TEN の発症のきっかけになったマイコプラズマ感染の関与が考えられた。何故なら、マイコプラズマ感染(しかし SJS/TEN は発症していない)の患者 PBML を経時的に検討すると、感染後半年にわたり Treg 機能が著明に低下することが分かったからである。このような Treg 側の異常に加えて、病変部皮膚に重要な所見が認められた。FDE の病変部を皮疹軽快後数ヶ月たって(正常に戻った時点で)解析したところ、病変部には多

数の肥満細胞が認められ、それが IL-16 を多数発現していることが分かった。その肥満細胞数、IL-16 発現を薬疹の病変部と比較したところ、FDE の病変部では SJS/TEN と比べ 2 倍近い肥満細胞と IL-16 の発現が認められた。

(3) イミキモドを継続して外用したポーエン病の病変部の様々な時点での CD8<sup>+</sup>Teff と CD4<sup>+</sup>Treg を検討したところ、治療前の病変部では、Treg >> CD8<sup>+</sup>Teff であったが、治療が奏効した群程、Treg/CD8 比は低下することが分かった。しかし治療前後での Treg の機能には変化が認められなかった。さらに病変部皮膚を経時的に検討すると、治療が奏効した症例ほど、病変部には肥満細胞が増加し、その多くが IL-17 を発現していることが明らかになった。IL-16 の発現は IL-17 発現と反比例しており、肥満細胞の IL-16/IL-17 発現の比が高いほど Treg を局所に遊走させ、低いほど Treg の遊走が起りにくくなることが分かった。

(4) イミキモドの直接作用かどうか間接作用かは明らかに出来ていないが、イミキモドを繰り返し外用すると、肥満細胞の IL-17 の発現が高まり、Treg の遊走が阻害される結果、CD8<sup>+</sup>Teff が活性化され、それは腫瘍の退縮には遊離に働くことが推測された。一方、薬疹などの炎症性疾患では、このような肥満細胞の変化は Treg の遊走を阻害する結果として、炎症の増悪、遷延化につながると思われる。

(5) IL-16 を局所投与することにより、Treg がその部に遊走しやすくなり、炎症が軽快していく可能性が考えられ、これを様々な炎症性皮膚疾患の治療に応用することが次のステップの検討となる。

#### 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 8 件)

1. Hirahara K, Kano Y, Shiohara T: Diffuse large B-cell lymphoma as a sequela of Stevens-Johnson syndrome associated with the increased Epstein-Barr virus load. *Eur J Dermatol* 22:144-145, 2012. (査読有)  
DOI:10.1684/ejd.2011.1584
2. Kano Y, Horie C, Inaoka M, Mizukawa Y, Ishida T, Shiohara T: Herpes zoster in patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/DRESS. *Acta Derm Venereol* 92:193-220, 2012. (査読有)  
DOI:10.2340/00015555-1317

3. 塩原哲夫: 薬疹の最先端—最新の概念・病態・治療 薬疹の概念—ここまで広がった薬疹の概念. *医学のあゆみ* 237(7, 8):755-760, 2011. (査読有)  
<http://www.ishiyaku.co.jp/>
4. 塩原哲夫: 薬疹の最先端—最新の概念・病態・治療はじめに. *医学のあゆみ* 238(7, 8):753, 2011. (査読有)  
<http://www.ishiyaku.co.jp/>
5. Ozeki T, Mushiroda T, Shiohara T (12 人、9 番目): Genome-wide association study identifies HLA-A\*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reaction in Japanese population. *Hum Mol Genet* 20:1034-1041, 2011. (査読有)  
DOI:10.1093/hmg/ddq537
6. Shiohara T, Kurata M, Mizukawa Y, Kano Y: Recognition of immune reconstitution syndrome necessary for better management of patients with severe drug eruptions and those under immunosuppressive therapy. *Allergol Int* 59:333-343, 2010. (査読有)  
DOI:10.2332/allergolint.10-RAI-0260
7. 塩原哲夫: 皮膚科セミナリウム 薬疹 固定薬疹. *日皮会誌* 120:1147-1163, 2010. (査読有)  
<http://www.dermatol.or.jp/>
8. 塩原哲夫: 特集「アレルギー疾患の病理像—その共通点と相違点—」薬疹の病理像. *アレルギー免疫* 17:844-852, 2010. (査読有)  
<http://www.iyaku-j.com/>

[学会発表] (計 10 件)

1. Shiohara T: Role of Viral Infection in Drug Allergy. The 2012 American Academy of Allergy Asthma & Immunology Annual Meeting, Orlando (U. S. A), Mar. 3, 2012.
2. 塩原哲夫: 感染症とアレルギー、第 20 回大分アレルギー講習会、大分、2012 年 2 月 4 日.
3. 塩原哲夫: 教育講演 病態から見た薬疹の診断と治療、第 63 会日本皮膚科学会西部支部学術大会、那覇、2011 年 10 月 8 日.
4. 塩原哲夫: DIHS の診療に欠かせない最新知識—免疫再構築症候群としての DIHS—. 第 41 会日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、甲府、2011 年 7 月 16 日.
5. 塩原哲夫: 教育講演 薬剤性過敏症症候

- 群(DIHS)はなぜ起こるのか. 第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会、東京、2011年2月11日.
6. 塩原哲夫: 教育講演 Drug-induced hypersensitivity syndrome の成因・診断・治療. 第60回日本アレルギー学会、東京、2010年11月27日.
  7. 塩原哲夫: 教育講演 Drug-induced hypersensitivity syndrome / Stevens-Johnson syndrome. 第37回日本小児臨床薬理学会、東京、2010年11月3日.
  8. Shiohara T: Future research cooperation's with J-SCAR. Regi SCAR-International Meeting. Freiburg (Germany), Sept. 27, 2010.
  9. Shiohara T: Longitudinal analyses of viral reactivation in severe drug eruptions. Regi SCAR-International Meeting, Freiburg (Germany), Sept. 26, 2010.
  10. Shiohara T: Mechanisms of viral and mycoplasma infections predisposing for severe drug eruptions. Regi SCAR (Severe Cutaneous Adverse Reactions)- International Meeting, Freiburg (Germany), Sept. 26, 2010.

[図書] (計5件)

1. Shiohara T, Mizukawa Y, Kano Y: Review. Fixed drug eruption: The dark side of activation of intraepidermal CD8<sup>+</sup> T cells uniquely specialized to mediate protective immunity. In: Adverse cutaneous drug eruptions (French LE, ed) Curr Probl Dermatol Karger Press, Basel, p.106-121, 2012.
2. Shiohara T, Kano Y, Takahashi R, Ishida T, Mizukawa Y: Review. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): Recent advances in the diagnosis, pathogenesis and management. In: Adverse cutaneous drug eruptions (French LE, ed) Curr Probl Dermatol Karger Press, Basel, 3, p122- 138, 2012.
3. Shiohara T, Kano Y: Drug-induced hypersensitivity syndrome. In: Asian Skin and Skin Diseases. Special book of the 2<sup>nd</sup> World Congress of Dermatology. Eun HC, Kim SC, Lee WS, ed. MEDrang Inc, Seoul. 2011.5.29. p.77-84.
4. 塩原哲夫: DIHS の後遺症として発現する自己免疫疾患とは. 皮膚科臨床アセット. 薬疹診療のフロンタライン. 相原道子編. 東京、中山書店、p.121-124, 2011.

5. 塩原哲夫:薬疹の発症におけるウイルス感染の役割とは. 皮膚科臨床アセット. 薬疹診療のフロンタライン. 相原道子編. 東京、中山書店、p.27-32, 2011.

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