

## 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4月30日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791085

研究課題名（和文）重症薬疹発症機序の解明～マイコプラズマ肺炎感染症との関わりへの解明～

研究課題名（英文）The elucidation of the mechanism and pathogenesis of severe drug eruption.

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）：重症薬疹のステイブンス・ジョンソン症候群（SJS）の発症にマイコプラズマ肺炎（MP）感染症が関連しているが、その因果関係は不明である。我々は以前に SJS 急性期では免疫調節を司る制御性 T 細胞（Treg）の機能が低下している事を見出した事から、Treg の質的変調が関与することが考えられた。そこで MP 感染症の Treg を解析したところ、一般的なウイルス感染症とは異なり、回復後も長期間に渡り Treg の機能が低下している事を見出した。また、MP 感染症の Treg は、機能が低い CCR6<sup>+</sup>Treg の割合が増加している事もわかった。これらの所見から、エフェクター T 細胞が活性化しやすい状況が長期間続き、薬剤等へのアレルギー反応が起こりやすい状態になり、その結果 SJS を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mycoplasma pneumoniae (MP) infection is related in the pathogenesis of Stevens-Johnson syndrome (SJS) which is severe drug eruption. However, its causal relationship is unclear. We previously found that the functional activity of regulatory T (Treg) cells was impaired in the acute stage of SJS. We therefore investigated whether Treg cells were related to development of SJS. The functional activity of Tregs was profoundly impaired during the acute phase of infection with MP, varicella-zoster virus, and parvovirus B19. In particular, the impaired Treg function was associated with a decrease in the CCR6<sup>+</sup>Tregs in infection with MP but not with other viral infections. Upon resolution, however, the impaired Treg function had been restored in viral infections, while it remained abrogated even 1 year after infection with MP. Our findings suggest that MP infections could serve to enhance the risk of subsequently developing severe allergic diseases by chronically abrogating Treg-mediated suppression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：regulatory T cell・SJS・TEN・マイコプラズマ肺炎・皮膚免疫

1. 研究開始当初の背景

(1)ステイブンス・ジョンソン症候群 (SJS)  
および中毒性表皮壊死症 (TEN) とマイコプ

ラズマ肺炎感染症の関連性について

ステイブンス・ジョンソン症候群 (SJS)  
 あるいは重症型多形滲出性紅斑 (erythema)

exsudativum multiforme major: EEMM) は、市販の風邪薬・頭痛薬をはじめとして、数千種類にも及ぶ薬剤によって引き起こされる深刻な薬害である。なかでも皮膚疾患の中で最も重篤とされているのが中毒性表皮壊死症 (Toxic Epidermal Necrolysis: TEN) である。SJS は高熱とともに口唇、口腔、眼結膜、外陰部に高度の発赤、びらん、出血などの粘膜病変が、さらに全身の皮膚に紅斑、水疱、びらんが認められる重篤な全身性疾患である。TEN は、ほぼ全身に及ぶ広範囲な紅斑、水疱、表皮剥離、びらんをきたし、表皮細胞の全層性壊死性変化を本態とする最重症型薬疹である。

SJS/TEN の発症原因として、単純疱疹ウイルス、マイコプラズマ肺炎、細菌、真菌等の種々のウイルスや細菌による感染症が先行して見られることが知られている。しかしながら、これらの感染症がどのように SJS/TEN の発症機序に関連しているのかは、いまだ明確ではなく、重篤な皮膚疾患の発症を医薬品の投与に先立って余地する事は大変困難である。

#### (2) 重篤薬疹の発症機序に制御性 T 細胞の量的・質的異常が関与している事を発見

我々は先の研究で、重篤薬疹の一つである薬剤性過敏症候群 (Drug-induced Hypersensitivity Syndrome: DIHS) と SJS/TEN の患者末梢血液中において、免疫の調和を司る CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の質的・量的な異常が見られることを見いだした。(研究業績 論文 1: The Journal of Immunology, 182:8071-79, 2009、高橋 良: 平成 20~21 年度科学研究費補助金・若手研究 (B) 研究課題)。この研究では、CD4<sup>+</sup>T 細胞における Treg の頻度を FACS で調べた結果、Treg がヘルペス属ウイルスの再活性化が後に確認された急性期の DIHS 患者末梢血中で健常人と比較して有意に増加している特徴的な所見を得た。

一方、ヘルペス属ウイルスの再活性化を後に確認できなかった SJS/TEN では、急性期および回復期のいずれの時期でも Treg の割合に変化が見られなかった。次に、DIHS および SJS/TEN の Treg が持つ細胞増殖の抑制機能について調査した結果、DIHS 急性期の Treg は、健常人とほぼ変わらない function を持っていたが、回復期の function は有意に失われている事が判った。面白い事に、SJS/TEN では DIHS とは全く正反対の態度を示し、急性期の Treg は function が有意に失われている事に対し、回復期では function が回復している事が判った。また、SJS/TEN は、Treg の function が急性期で有意に失われていた事から、薬剤に対する過剰なアレルギー反応が重篤な皮膚症状を引き起こしている事が考えられたが、急性期の SJS/TEN で見られた

Treg の機能的変調が、なぜ発生しているのかはいまだ明確ではない。さらに SJS/TEN の発症とマイコプラズマ肺炎感染症の関連性に関してよく判っていない。

#### (3) 考えられるストーリーと判っていない事

マイコプラズマ肺炎感染症が SJS/TEN 発症に先立って見られる事から、SJS/TEN 発症の何らかの原因に関わっている事が想像できる。ところで、マイコプラズマ肺炎菌体膜成分は Toll-like receptor (TLR) 2 および 6 の複合体によって認識されるが、近年、TCR の刺激下で TLR2 のリガンドである Pam3Cys を Treg に作用させると、Treg の function が低下する事が判った (Liu et al. PNAS 2006, 103, 7048-7053)。我々が得た SJS/TEN 急性期における Treg function が低下しているという所見と、Liu らの *in vitro* の実験結果を総合すると、

- ① マイコプラズマ肺炎に感染。
  - ② マイコプラズマ肺炎の菌体成分が Treg に作用し、Treg の function が低下する。
  - ③ 免疫の調和が崩れ、Treg によって恒常的に活性化を押さえられていた effector/memory T 細胞が活性化しやすくなる。
  - ④ その結果、極めてアレルギー反応が起きやすくなる環境になり、この時に投与された薬剤に対してアレルギー反応が発生する (?)。
  - ⑤ Treg の function が低下しつづける間、薬剤アレルギー反応は増大し、SJS/TEN の発症になる (?)。
- というストーリーを描く事ができる。

## 2. 研究の目的

以上の様に、マイコプラズマ肺炎感染症と Treg の function の低下には深い関係があり、さらに SJS/TEN の発症機序に影響を及ぼすと考える事が出来る。そこで、我々はマイコプラズマ肺炎感染症患者および比較対象として水痘、麻疹、パルボウイルス B19 などのウイルス感染症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) マイコプラズマ肺炎感染症患者および比較対象のウイルス感染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ーの発現やケモカインレセプターの発現解析を進める。
- (2) マイコプラズマ肺炎感染症患者および比較対象のウイルス感染症例における Treg

の細胞増殖の抑制機能の有無を調べる。

### 3. 研究の方法

急性期および回復期のマイコプラズマ肺炎感染症、対象疾患として水痘、麻疹、パルボウイルス B19 感染症、およびボランディア健康人末梢血からインフォームドコンセントを得てリンパ球の採取・保存を行う。フローサイトメトリーや免疫組織化学染色を用いて Treg の頻度および皮膚ホーミングレセプタ、ケモカインレセプターの発現を解析する。Treg の細胞増殖抑制機能を測定するために、セルソーターにて各疾患患者より CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg および CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder 細胞分画を分取後、3H-サイミジンの取り込みによる測定で評価する。また、事前実験において、Treg の CCR6 の発現は健康人では約 50% であったが、マイコプラズマ肺炎感染症患者では有意に減少している事が判った。CCR6 の発現が Treg の細胞増殖抑制機能に関与するのかをセルソーターにて CCR6<sup>+</sup>Treg と CCR6<sup>-</sup>Treg に分離後、3H-サイミジンの取り込みによる測定で評価する。さらにマイコプラズマ肺炎感染症患者の病変部分に CCR6<sup>+</sup>Treg がホーミングしているかどうかを、免疫組織化学染色にて検出する。

マイコプラズマ肺炎感染症および比較対象として水痘、麻疹、パルボウイルス B19 感染症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) マイコプラズマ肺炎感染症、水痘、麻疹、パルボウイルス B19 感染症、ボランデ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急性期および回復期のマイコプラズマ肺炎感染症、水痘、麻疹、パルボウイルス B19 感染症、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°C) 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各感染症患者、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

#### プタおよびケモカインレセプターの解析

同様に、CLA、CCR4、CCR6 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。

#### (4) 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、凍結保存した各感染症患者の急性期および回復期、健康人の PBMC から Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画) 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<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 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。培養終了 1 日前に <sup>3</sup>H-サイミジンを添加し、培養を行う。その後、当施設現有設備のセルハーベスターにて固体シンチレーターに吸着させる。そして当施設現有設備のプレートカウンターで増殖した細胞内に取り込まれたトリチウムサイミジン量を cpm 数で計測し、細胞増殖率を測定する。

#### (5) CCR6<sup>+</sup>Treg の機能解析

健康人の Treg は Treg の半数が CCR6 を発現しているのだが、マイコプラズマ肺炎感染症の急性期および回復期の Treg では、CCR6 発現が低下している所見を事前実験で得ている。Treg は CCR6 発現によって 2 つのフェノタイプを分ける事が可能であり、CCR6<sup>+</sup> Treg は effector/memory-like Treg とされている (Kleinewietfeld M et.al. *Blood* 2005, 105, 2877-2886)。そこで健康人の Treg を用いて、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Treg をそれぞれ分離し、<sup>3</sup>H サイミジン RI アッセイによる機能解析を行う。もし、CCR6<sup>-</sup> Treg の function が CCR6<sup>+</sup> よりも低い場合は、マイコプラズマ肺炎感染症で認められる機能低下型 Treg を間接的に証明する事が出来る。

#### (6) マイコプラズマ肺炎感染症の病変部分に存在する Treg の解析

マイコプラズマ肺炎感染症患者の末梢血中の Treg は CCR6<sup>-</sup>の細胞が増えている事から、これらの Treg が実際に病変部分にホーミングしているのかどうか蛍光抗体法による蛍光二重組織染色を行い、CCR6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>の細胞を検出する。場合によっては、より感度が高い免疫組織化学二重染色を行う。同様に、水痘、麻疹、パルボウイルス B19 感染症の組織切片でも染色を行い比較する。

### 4. 研究成果

まず、MP 感染症患者末梢血中の Treg 数を調べると、急性期・回復期でも健常人とは有意差が見られなかった。これは対照疾患でも同様な結果であった。

次に、Treg の細胞増殖に対する抑制機能を調べた。通常、ウイルス感染症の急性期では Treg の抑制機能が落ちて、CD8<sup>+</sup>T 細胞等の抗ウイルス作用活性が高まりウイルス排除の働きを高める。実際、対照疾患の VZV 及び PB19V 感染症の急性期では CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖抑制機能が優位に低下し、回復期では健常人と同程度に回復した。ところが MP 感染症では、急性期はもちろん回復期でも抑制機能が低下していた。しかも驚くべき事に、回復後 3 ヶ月～1 年を経過しても抑制機能が持続的に低下していた事を新たに発見した。

さらに Treg のフェノタイプを調べると、CCR6<sup>-</sup>の Treg が MP 感染症患者で優位に多い事が判った。そこで健常人の CCR6<sup>+</sup>および CCR6<sup>-</sup>の Treg の抑制機能を調べたところ、CCR6<sup>-</sup> Treg の function が CCR6<sup>+</sup>よりも低い事が判った。すなわち、MP 感染症の Treg の機能が低下している理由は、CCR6<sup>-</sup> Treg が増加している為と考えられた。

この機能低下している CCR6<sup>-</sup> Treg が実際に皮膚病変に存在するのかを証明するために、CCR6 と Foxp3 の免疫化学二重染色を行ったところ、MP 感染症の病変部位には CCR6<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg が存在し、対象疾患の VZV 感染症である帯状疱疹の病変部位には CCR6<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg が存在することを確認した。

これらの結果から、MP 感染後は抑制機能が低い CCR6<sup>-</sup> Treg の割合が増加しており、皮膚局所へホーミングするが、実際にはエフェクター T 細胞の活性を押さえる事ができない環境に陥り、薬剤等のアレルギー反応が極めて起こりやすい状態になり、STS/TEN を引き起こす可能性が示唆された。

## 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 2 件)

①制御性 T 細胞と重症薬疹:石田正, 高橋 良, 塩原哲夫, 日本皮膚科学会雑誌 121 巻: 2682～2685, 2011. 査読有

② Hirahara K, Kano Y, Mitsuyama Y, Takahashi R, Kimishima M, Shiohara T: Differences in immunological alterations and underlying viral infections in two well-defined severe drug eruptions. Clin

Exp Dermatol 35: 863-868, 2010. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

①水川良子, 狩野葉子, 高橋 良, 塩原哲夫: マイコプラズマ感染は DIHS 発症を抑制する, 日本皮膚科学会 愛媛地方会 橋本公二教授退職記念 第 53 回学術大会・総会 平成 23 年 3 月 19 日 (土) 松山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 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