



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on mouse model generated by using PBMCs and the skin of Stevens-Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis patients
Author(s)	齋藤, 奈央
Description	配架番号 : 2087
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11215号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11215
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56173
Type	doctoral thesis
File Information	Nao_Saito.pdf



学位論文

Studies on mouse model generated by using PBMCs and the skin
of Stevens-Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis patients

(Stevens-Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis の
モデルマウス作成に関する研究)

2014 年 3 月

北海道大学

齋藤奈央

学位論文

Studies on mouse model generated by using PBMCs and the skin
of Stevens-Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis patients

(Stevens-Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis の
モデルマウス作成に関する研究)

2014 年 3 月

北海道大学

齋藤奈央

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	15 頁
考察	27 頁
総括および結論	29 頁
謝辞	30 頁
引用文献	31 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Nao Saito., Naoya Yoshioka., Riichiro Abe., Hongjiang Qiao., Yasuyuki Fujita., Daichi Hoshina., Asuka Suto., Satoru Kase., Nobuyoshi Kitaichi., Michitaka Ozaki., Hiroshi Shimizu.

Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis mouse model generated by using PBMCs and the skin of patients

Journal of Allergy and Clinical Immunology. 131, 434-41 (2013).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Nao Saito, Riichiro Abe, Naoya Yoshioka, Hongjiang Qiao, Yasuyuki Fujita, Daichi Hoshina, Satoru Kase, Nobuyoshi Kitaichi, Michitaka Ozaki, Hiroshi Shimizu

Highly sensitive model mice of Stevens-Johnson syndrome

第 35 回日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会、2010.12、和歌山

2. Nao Saito, Riichiro Abe, Naoya Yoshioka, Hongjiang Qiao, Yasuyuki Fujita, Daichi Hoshina, Hiroshi Shimizu

Production of SJS/TEN model mice using patients PBMCs and skin

SID 71st Annual Meeting, 2011.5, Phoenix, Arizona

緒言

重症薬疹は、薬剤により皮膚・粘膜症状をきたす薬疹の中で重篤な後遺症を残し、時に致死的となる疾患を総称する。代表的な疾患として、Stevens-Johnson 症候群 (Stevens-Johnson syndrome: SJS)、中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis: TEN) が含まれる¹⁾。びらん及び水疱の面積が体表の10%未満をSJSと診断し、10%以上を最重症型のTENと診断する²⁾。SJSの罹患率は人口100万人あたり3.1人、TENでは人口100万人あたり1.3人と非常に稀ではあるがTENの死亡率は19%と非常に高率であり³⁾、かつSJS/TENは急速な進行をきたすことが多く、早期の診断と適切な治療が非常に重要である。特に85%の患者が眼病変を呈し急性期には結膜のびらん、角膜潰瘍、癒着を認め、慢性期には慢性結膜炎、瘢痕、眼球運動障害、視力低下や失明に至ることがある⁴⁾。

SJS/TENに対する治療として大量のステロイドホルモン全身投与が最も効果があるとされているが、治療に反応しない症例においては次なる効果的治療法が確立されていない⁵⁾。そのため未だ致死率が高く、後遺症を残す誘因となっている。医学的・医療的にも、薬剤治療の根本が揺るがしかねない疾患であるが、未だ発症メカニズムは解明されず、そのため治療法、予防法の開発も滞っている。

発症メカニズムの解明が進んでいない原因として、発症頻度が少ないことがあげられる。今までは100万人当たり数人～十数人と言われており、かつ急激な発症するため、入院病院を集中させることが難しく、系統だった治療を施したり、データを解析することが困難であった。しかし、近年薬剤の使用量が増えるに従い重症薬疹の発症頻度も増加している。

SJS/TENの病態は不明な点が多いが、細胞障害性T細胞が関与するとされている。細胞障害性T細胞は、CD8⁺細胞が主となりmajor histocompatibility complex (MHC) class Iに反応するものが主体であり様々な細胞障害物質 (グラニューライシン^{6,7)}・パーフォリン・グランザイム・TNF- α など) を放出し、またFasリガンド⁸⁾ やsoluble Fas ligand (sFasL)⁹⁾ を介して標的細胞の細胞死を誘導する。標的細胞を攻撃する細胞障害性T細胞の一部はメモリーT細胞となり生体内に長期にわたり存続し、再度同一の

薬剤を摂取した場合にさらに反応が増強し、臨床的にも症状の増悪をひきおこす。また、疾患モデルマウスが確立していないことも病態解明が進まない原因の1つとして挙げられる。現在までに報告されている重症薬疹モデルマウスは、マウス表皮細胞にovalbumin (OVA)を発現させ、さらにCD8⁺細胞がOVA特異的なT細胞受容体を持つマウスを用いることで重症薬疹に類似した表皮剥離を認めた^{10,11)}。このモデルマウスは重症薬疹の臨床所見に類似した表現型を再現しているが、免疫学的には薬剤（外来抗原）を用いておらず、薬剤による免疫応答を十分再現していない。

これらの知見をもとにSJS/TENの病態を再現するためにSJS/TENから回復した患者末梢血を用いて重症薬疹モデルマウスを作成することができるのではないかと考え、この仮説を検証するために実験を行った。

まず、ヒトの peripheral blood mononuclear cell (PBMC)を免疫不全マウスに移植してマウス対ヒトの graft-versus-host reaction (GVHR)を確認した。マウスにヒトの PBMC を尾静脈注射すると 21 日目以降にマウスの末梢血中に human CD45⁺細胞の増加を認め、マウスは徐々に体重減少、皮膚障害を認め GVHR をおこし死亡に至った。SJS/TEN と GVHR の症状は類似しており、GVHR を除外した状況でモデルマウスを作成するため 14 日以内に実験系を確立することとした。

また、治癒後の SJS/TEN 患者末梢血中に薬剤特異的な T 細胞が存在していることを IFN- γ ELISPOT を用いて確認した。

重症薬疹から回復した患者末梢血を免疫不全マウスに注射し被疑薬を連日経口投与したところ 12 日目に眼球結膜の充血を認め、病理組織学的に細胞死を確認した。この症状は、SJS/TEN の眼病変に類似し SJS/TEN の症状を再現することに成功した。一方眼症状は、患者末梢血から CD8⁺細胞を除去すると認められず、CD8⁺細胞が細胞死の誘導に重要であることが示された。

SJS/TEN 患者 PBMC を用いたモデルマウスでは SJS/TEN で認められる眼症状の再現に成功したが皮膚には症状が認められず更なる検討をおこなった。重症薬疹から回復した患者の正常皮膚を免疫不全マウスに移植し、生着後に同患者の PBMC を尾静脈注射し被疑薬を連日経口投与すると、植皮部に細胞死を認めるなど皮膚症状の再現にも成功した。

以上の結果から SJS/TEN の病態を SJS/TEN 患者 PBMC および皮膚を用

いて免疫不全マウスで再現することに成功することができた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

DLST	Drug-induced lymphocyte stimulation test
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSpot
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fetal bovine serum
GVHR	Graft-versus-host reaction
HE	Hematoxylin-Eosin
MACS	Magnet-activated cell sorter
MHC	Major histocompatibility complex
NOG	NOD/Shi- <i>scid</i> , IL-2R γ^{null}
ODSR	Ordinary drug skin reaction
OVA	Ovalbmin
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PI	Propidium iodide
sFasL	Soluble Fas Ligand
SJS	Stevens-Johnson syndrome
TEN	Toxic epidermal necrolysis
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling

実験方法

1. SJS/TEN 患者の末梢血および皮膚採取

治癒後の SJS/TEN 患者末梢血、皮膚を採取しモデルマウスの作成を試みた。本研究は「重症薬疹モデルマウスの作成および病態解明に関する研究」として北海道大学病院倫理委員会で承認を受け、患者への十分なインフォームドコンセントを行い同意を得た患者を対象に実施した。患者の被疑薬は、SJS/TEN 患者でアセトアミノフェン 3 名、ベンゾブロマロン 1 名、アモキシシリン 1 名、フェニトイン 1 名、通常薬疹患者でアセトアミノフェン 1 名、フェニトイン 1 名でいずれも回復して 6 カ月から 3 年が経過している（表 1）。

Case	Age/sex	Culprit drug	Type of cutaneous adverse reaction
1	55/M	Acetaminophen	TEN
2	46/M	Acetaminophen	SJS
3	49/F	Acetaminophen	SJS
4	49/M	Benzbromarone	SJS
5	37/F	Amoxicillin	SJS
6	71/M	Phenytoin	SJS
7	70/M	Acetaminophen	Maculopapular type
8	78/M	Phenytoin	Maculopapular type

表 1

薬疹患者情報

SJS/TEN から回復した患者末梢血を EDTA 試験管で 30ml 採取した。この末梢血を PBS と等量希釈し、Ficoll-Isopaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) の上層にゆっくり滴下し遠心分離を行った。遠心分離後、Ficoll-Isopaque 上層の白色層をピペットで回収し、PBS で洗浄し PBMC を回収した。また、同意が得られた SJS/TEN 患者から皮膚を採取した。皮膚は 1%E 入りキシロカイン 5ml で局所麻酔をしたのちに 15 番メスで 5mm～10mm 大に切除し、5-0PDS で真皮縫合し、5-0 ナイロン

で表皮縫合を行った。採取した一部の皮膚は、PBS で洗浄後に脂肪を除去し表皮側を底面にしてディスパーゼ II (Roche, Basel, Switzerland) 3ml に浸し一晩冷蔵庫 (4℃) で反応させた。翌日、表皮側を鑷子で剥離し、2 mm角に刻み 5% EDTA 3ml に浸しインキュベーター (37℃) で 7 分反応させた。その後、コットン付駒込ピペットで強くピペッティングを行い 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 PBS を 3ml 加え遠心した。上清を除去し再度 PBS で洗浄し、沈殿物に supplement および 1% penicillin-amphotericin B を添加した CNT-BM (CELLnTEC, Bern, Switzerland) を 5ml 加え 6cm のシャーレで初代培養をおこなった。コントロールとして通常薬疹 (Ordinary drug skin reaction : ODSR) から回復した患者の末梢血、および皮膚を採取した。

2. IFN- γ ELISPOT

ELISPOT assay は、単一細胞レベルで分泌されたサイトカインを検出できる非常に高感度な免疫アッセイである。本研究では、ELISPOT assay kit (Human IFN- γ ELISPOT PVDF-Enzymatic; Diaclone, Besancon, France) を使用した。Human IFN- γ ELISPOT は、抗原特異的なリンパ球が抗原提示されたときに IFN- γ を産生することで抗原特異的なリンパ球数を定量することができる。IFN- γ 特異的キャプチャー抗体でコートされたウェルを PBS で 3 回洗い、RPMI media 1640 (Life technologies, Carlsbad, California, USA) を 200 μ m ずつ加え室温で 30 分安置した。30 分後に RPMI media 1640 を除去しそれぞれウェルに患者末梢血から単離した PBMC を RPMI media 1640 に懸濁し加えた。その後、それぞれのウェルに被疑薬添加、陽性コントロール、陰性コントロールを設定した。被疑薬は、Drug-induced lymphocyte stimulation test (DLST) で陽性となった濃度になるように薬剤を溶解し添加した。陽性コントロールは anti-CD3 m-ab を加えた。陰性コントロールには RPMI media 1640 を加えた。プレートをインキュベーター (37℃) で 24 時間反応させ、24 時間後に PBS で 4 回洗浄し、Stop solution (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) を加え実体顕微鏡で観察しスポットの出現を確認して 5 分以内に超純水で洗浄して反応を停止させた。プレートが乾燥した後に Immunospot S5 Versa Analyser (Cellular Technology Limited, OH, USA) を用いてスポット数をカウントした。

3. マウス対ヒトの Graft-versus-host reaction (GVHR) の検討

マウスを用いた研究は「北海道大学動物実験に関する規程」に従い実施した。6 週齢から 7 週齢の NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null} (NOG) マウスを公益財団法人実験動物中央研究所から購入した。NOG マウスは、T 細胞、B 細胞、NK 細胞が欠損している重度の免疫不全マウスであり¹²⁾、ヒトの造血細胞を移植すると免疫不全のため拒絶反応が生じずマウスの体内にヒトの造血細胞が定着しヒト免疫系を再構築することが可能となり様々な疾患モデルとして報告されている¹³⁾。しかしながら、マウスの体内でヒト細胞がマウス臓器細胞を異物と認識し GVHR をおこすことが報告されている¹⁴⁾。このため、予備実験としてマウス対ヒトの GVHR の発症時期を確認した。約 1×10^7 個の健常人 PBMC を、NOG マウスの尾静脈に静脈注射した。その後、連日体重測定、皮膚症状、眼症状を確認し 7 日毎にマウスの末梢血をフローサイトメトリーで解析した。マウスは徐々に体重減少を認め、40 日目には眼球結膜の充血、脱毛、著明な体重減少を認め死亡した。死亡直前のマウスの末梢血、脾臓の浸潤細胞をフローサイトメトリーで検討し、皮膚、眼、肺、肝臓を凍結保存ならびにホルマリン固定し hematoxylin-Eosin (HE) 染色に提出した。

4. マウスの PBMC、脾臓の発現解析：フローサイトメトリー

サンプルとして、マウスの PBMC、および脾臓を用いた。マウスの PBMC は尾静脈先端を 2 mm 切除し、血滴を形成しヘマトクリット管に回収した。血液は、氷上で 0.1% EDTA 含有の PBS 10ml に懸濁した。脾臓は、生理食塩水に浸し PBS 3ml を加えた 10cm シャーレ上で 1ml シリンジのシリンジ管で押しつぶし細胞を単離した。マウス末梢血ならびに脾臓細胞は、遠心した後に Red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) 1ml に懸濁し、室温で 15 分安置した。懸濁液が透明になったことを確認し、1% FBS および 0.3% アジ化ナトリウムを添加した PBS (以下 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) バッファー) で 1ml にメスアップして遠心をおこなった。その後、下記の抗体を加え、氷上で 30 分安置した後、FACS バッファー 1ml を加え、2 回遠心し FACS チューブに移しフローサイトメトリーで測定した。一次抗体として PE-conjugated mouse CD45, FITC-conjugated human CD45, PerCP-conjugated human CD3, FITC-conjugated human CD4, PE-conjugated human CD8 or

PE-Cy7-conjugated human CD56 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用いた。フローサイトメトリーは FACS-Aria (BD Bioscience)を使用し、FACS DiVa software (BD Bioscience)を用いて解析した。

5. SJS/TEN モデルマウスの作成

A. SJS/TEN 患者由来 PBMC モデル

SJS/TEN 患者末梢血を EDTA 試験管で 30ml 採血し、Ficoll-Isopaque を用いて PBMC を採取し 2×10^6 細胞を PBS に懸濁した。被疑薬を経口ゾンデで NOG マウスに投与し、30 分後に準備した SJS/TEN 患者末梢血を尾静脈に静脈注射した (図 1)。経口投与は連日実施し、眼球結膜、皮膚の所見ならびに 7 日毎にマウス末梢血の解析をフローサイトメトリーで実施した。経口投与開始 12 日目に眼球結膜の充血を認め、同日に解剖し、血液および、眼、皮膚の凍結保存ならびに 10%ホルマリンで固定した。マウスに投与する薬剤の濃度は、ヒトが内服する 1 回量をマウスの体重換算に計算し PBS100 μ l に溶解した。薬剤投与量は、ヒト 1 回投与量mg $\times$ マウスの平均体重 20g/(ヒトの平均体重 50kg)とした。

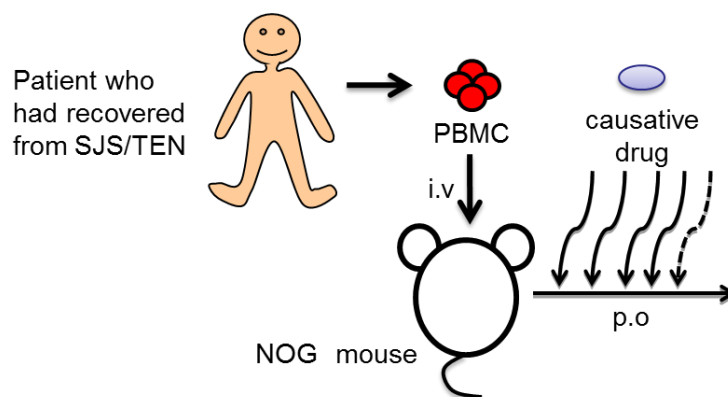


図 1

B. Ex-vivo モデル

SJS/TEN 患者末梢血を EDTA 試験管で 30ml 採血し、Ficoll-Isopaque を用いて PBMC を採取した。PBMC は 2×10^6 細胞/ml になるように complete RPMI (RPMI media 1640, 10% fetal bovine serum (FBS), 2-mercaptoethanol) に懸濁し、96 ウェル U 底に 1 well あたり 100 μ l ず

つまいた。そこに、被疑薬を $10\mu\text{l}$ と complete RPMI $90\mu\text{l}$ を加えインキュベーター (37°C) で 6 日間培養した。6 日目にそれぞれのウェルから細胞と上清を回収し、遠心して細胞を回収し 2×10^6 細胞を PBS $100\mu\text{l}$ に懸濁した。細胞を準備した後に被疑薬を経口ゾンデで NOG マウスに投与し、30 分後に患者末梢血を尾静脈に注射した。経口投与を連日実施し、眼球結膜、皮膚の所見ならびに 7 日毎にマウス末梢血の解析をフローサイトリーで実施した。経口投与開始 6 日目に眼球結膜の充血を認め、眼、皮膚を凍結保存ならびに 10%ホルマリン固定した。

C. $\text{CD}8^{+}$ 細胞、 $\text{CD}4^{+}$ 細胞除去モデルマウス

$\text{CD}8^{+}$ 細胞、 $\text{CD}4^{+}$ 細胞のそれぞれの病態への関与を検討するために、SJS/TEN 患者末梢血を採取し、 1×10^7 細胞あたり Magnet-activated cell sorter (MACS) バッファー (PBS 500ml , 5%FBS, 2mM EDTA) $80\mu\text{l}$ を加えた。そこに $\text{CD}8^{+}$ ビーズ、 $\text{CD}4^{+}$ ビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) をそれぞれ $20\mu\text{l}$ ずつ加えた。よくピペッティングした後に 4°C で 15 分安置し遠心後に 1ml の MACS バッファーに懸濁した。準備した細胞を Depletes の条件で MACS (Miltenyi Biotec) にかけて $\text{CD}8^{+}$ 細胞、 $\text{CD}4^{+}$ 細胞を除去した PBMC、 $\text{CD}4^{+}$ 細胞、および $\text{CD}8^{+}$ 細胞を除去した PBMC を回収した。それぞれの細胞を 1×10^6 ずつ分注して FITC-conjugated human $\text{CD}4$, PE-conjugated human $\text{CD}8$ 抗体で染色し FACS で目的細胞が除去されていることを確認した。 $\text{CD}4^{+}$ 細胞、 $\text{CD}8^{+}$ 細胞をそれぞれ除去した PBMC は 2×10^6 細胞ずつ NOG マウスに尾静脈注射し、連日被疑薬を経口投与し眼症状、皮膚症状を確認した (図 2)。

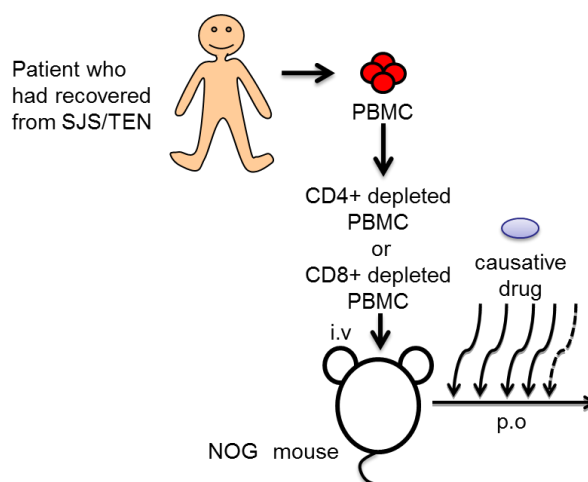


図 2

CD4⁺細胞または CD8⁺細胞を除去したモデルマウス

D. SJS/TEN 植皮モデルマウス

SJS/TEN から回復した患者から採取した正常皮膚を NOG マウスの背部に移植した。マウスの背部の毛を 15 番メスで剃り鑷子で保持して 1cm 四方の皮膚を切開した。移植片を切開創にのせ 6-0 バイクリル糸にて辺縁を 4 か所縫合しガーゼにワセリンをつけてテープで 2 重に固定した。固定による運動障害をさけるためマウスの足の基部のテープに切開を入れた。14 日後に植皮の生着を確認した。

一方植皮 8 日目に、同一の SJS/TEN 患者から末梢血を採取し、10%FBS を含有した complete RPMI 培地と被疑薬剤を加えた培地に 1×10^7 細胞/ml に懸濁し、200 μ l ずつ 96 ウェル U 底にまきインキュベーター (37°C) で 6 日間培養した。6 日目に細胞を回収し、 2×10^6 細胞を PBS 100 μ l に懸濁した。植皮が生着した NOG マウスに被疑薬を経口ゾンデで投与し、30 分後に準備していた SJS/TEN 患者末梢血を尾静脈に注射した。経口投与は連日実施し、眼球結膜、皮膚の所見ならびに 7 日毎にマウス末梢血の解析をフローサイトリーで実施した (図 3)。経口投与開始 8 日目に植皮部の色調の変化を確認し、眼、植皮部を凍結保存ならびに 10%ホルマリン固定した。

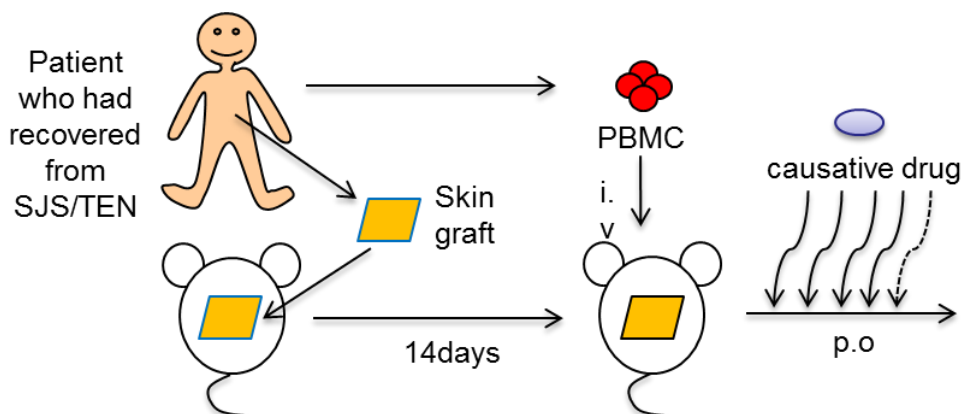


図 3

SJS/TEN 植皮モデルマウス

6. モデルマウスの眼、皮膚での細胞死、浸潤細胞の検討：免疫組織染色

組織を凍結ケースにクリオマウント (Muto, Tokyo, Japan) で包埋し -80°C で凍結した。凍結ブロックをクリオスタットを用いて $5\mu\text{m}$ にスライスしスライドガラスにのせた。

A. HumanCD45⁺, humanCD4⁺, humanCD8⁺, cleaved caspase3 の免疫染色

スライドガラスを 1 時間風乾したのちに、10%マイルドホルムで 15 分固定し、PBS で 5 分 3 回洗浄後、10%ヤギ血清を 2 滴滴下し湿潤箱で 15 分室温でブロッキングをおこなった。その後、1 次抗体を加え 37°C 30 分反応させ、PBS で 5 分 3 回洗浄し 2 次抗体を加え室温で 60 分安置した。PBS で 5 分 3 回洗浄し、100 倍希釈の propidium iodide (PI) を $20\mu\text{l}$ 加え室温で 5 分安置し、PBS で 5 分 3 回洗浄し封入液で封入しカバーガラスをのせた。一次抗体、cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), human CD4 and CD8 (BD Biosciences)、二次抗体は FITC-conjugated goat anti-mouse IgG, (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) を使用し、蛍光顕微鏡 (Fuoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) をもちいて撮影した。

B. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色

スライドガラスを 1 時間風乾したのちに、10%マイルドホルムで固定し PBS で 5 分 3 回洗浄した。Permeabilization buffer $100\mu\text{l}$ で氷上 5 分反応させ PBS で 5 分 3 回洗浄し、用意していたラベリング液 $50\mu\text{l}$ (TdT $5\mu\text{M}$ + labeling safe buffer $45\mu\text{M}$) を加えインキュベーター (37°C) で 60 分反応させた。その後 PBS で 5 分 3 回洗浄し、PI を加え PBS で 5 分 3 回洗浄し封入液で封入した。

7. モデルマウスの血中サイトカインの測定

モデルマウスの末梢血を回収し、血清を保存した。血清を用いてグラニューライシンおよび soluble Fas Ligand (sFasL) を、Human granulysin

ELISA (BML, Tokyo, Japan) および Human/murine soluble FasL ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) を使用し測定した。また、Human IL-2, 4, 6, 17, 10, TNF- α , IFN- β 、IFN- γ については、BCA assay (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いて測定を行った。

8. 統計処理

実験データは t 検定を用いて統計処理を行った。P < 0.05 を有意差ありとみなした。

実験結果

1. SJS/TEN 患者末梢血の採取、および薬剤特異的細胞の確認

SJS/TEN から回復した患者末梢血中には、薬剤特異的に反応し IFN- γ を産生する細胞が長期にわたって存在していることが示唆されており^{15,16)}、本実験において確認実験を行った。SJS/TEN から回復後半年～3 年が経過した患者の末梢血を 20ml 採取し、Ficoll-Isopaque を用いて PBMC を回収した。ELISPOT Kit を用いて細胞に被疑薬剤を滴下し IFN- γ の産生を確認したところスポット数が有意に上昇した。また、被疑薬添加 5 日間後には IFN- γ 陽性スポット数が更に上昇していた (図 4)。コントロールとして、健常人の PBMC を用いて薬剤で刺激を与えたが陽性細胞は認められなかった (図 5)。以上から SJS/TEN 患者では薬剤特異的な細胞が長期に渡って末梢血中に存在していることを確認し、また被疑薬による刺激で増加することを確認した。

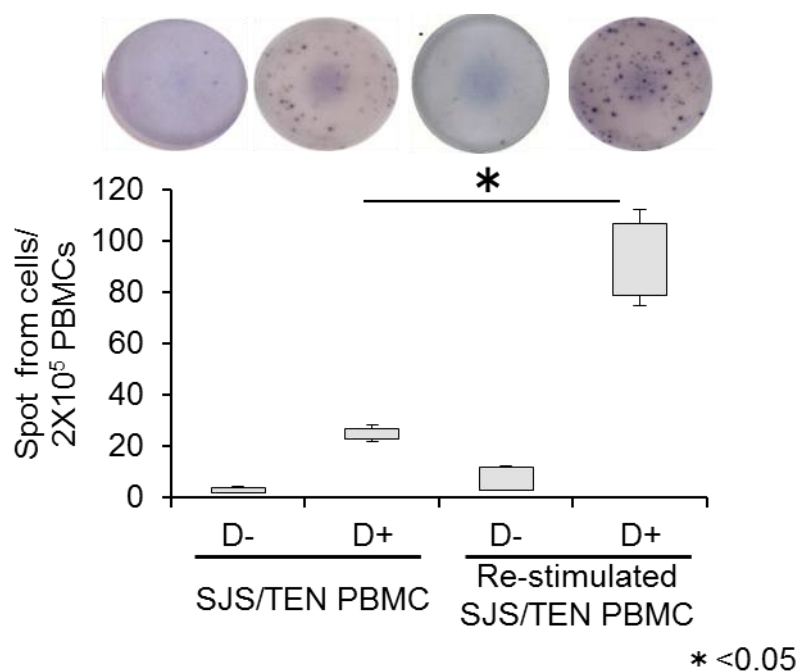


図 4
SJS/TEN 患者 PBMC の ELISPOT データ

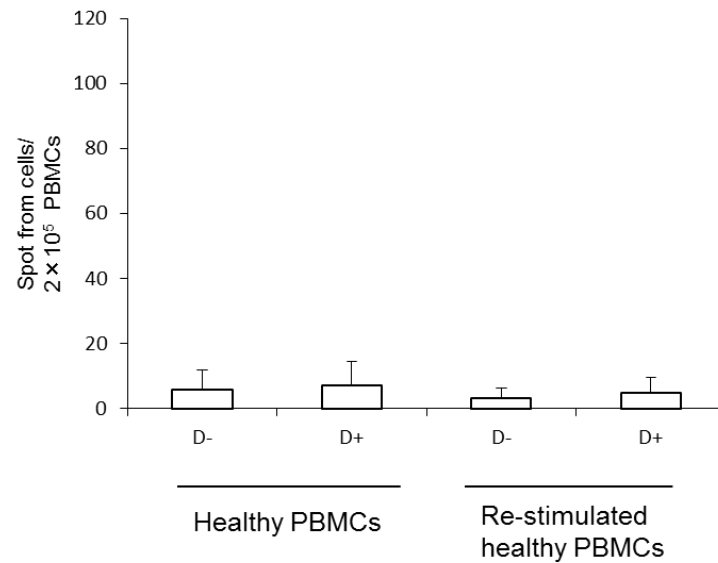


図 5

健常人 PBMC の ELISPOT データ

2. ヒト vs マウスの GVHD の検討

重度の免疫不全マウスである NOG マウスにヒトの PBMC を移植するとヒト細胞が宿主であるマウス臓器細胞を拒絶する。本研究では、SJS/TEN 患者 PBMC をマウスに移入するにあたり、GVHR の発症時期を検討する必要がある。健常人 PBMC を 1×10^7 細胞を尾静脈注射し、連日体重測定、皮膚症状、眼症状を確認し 7 日毎にマウス末梢血をフローサイトメトリーで確認した。マウスは、Day12 から徐々に体重減少を認めた (図 6)。

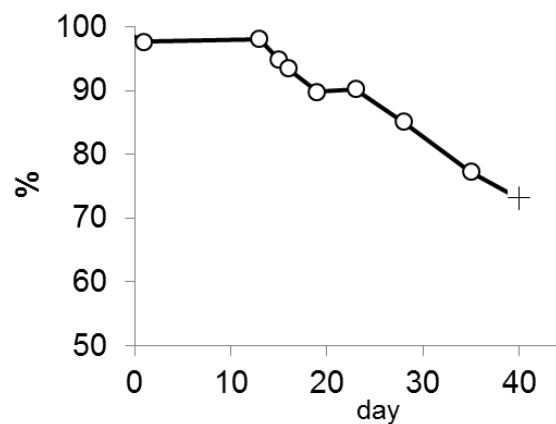


図 6

GVHD モデルマウスの体重

末梢血のフローサイトメトリー解析では Day21 から human CD45⁺細胞が増加した (図 7)。

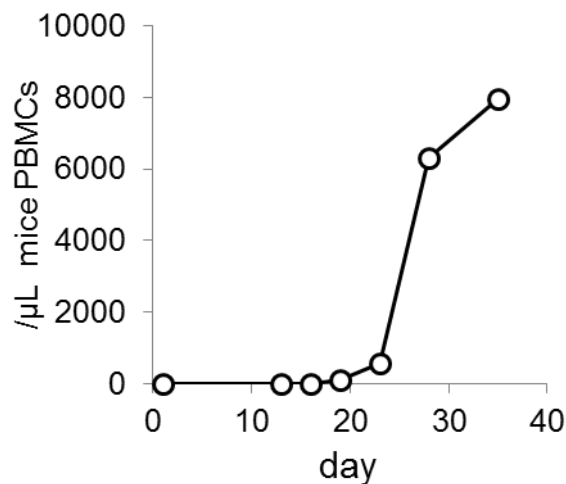


図 7

GVHD モデルマウスの末梢血 FACS

GVHR を起こしたマウスは、脱毛、下痢が出現し Day40 に死亡した (図 8)。



図 8

GVHD モデルマウス (day40)

組織学的に検討したところ、Day40 のマウスの眼球結膜にはヒト細胞 (Human CD45⁺細胞) の著明な浸潤を認め末梢血液のフローサイトメトリーと組織学的所見から GVHR を確認した (図 9)。

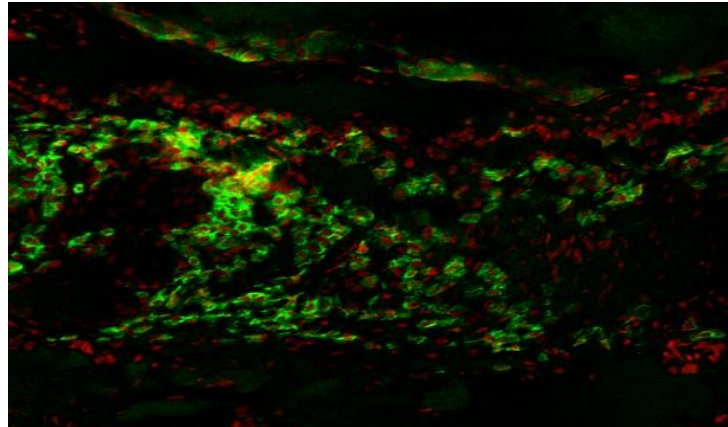


図 9

マウス眼球結膜の免疫染色

Human CD45⁺細胞：緑色 核：赤色

以上の結果から、NOG マウスにヒト PBMC を移植すると Day21 からヒト細胞の増加を認め GVHR が起こることを確認した。

3. SJS/TEN 患者 PBMC モデルの作成

A. SJS/TEN 患者由来 PBMC モデルおよび Ex-vivo モデル

マウス（宿主）対ヒト（移植片）の GVHR が Day21 から発症し、GVHR を除外した条件下でモデルマウスを作成するため Day14 までの期間で SJS/TEN 発症の有無を検討することとした。

SJS/TEN モデルマウスは、SJS/TEN から回復した患者 PBMC 2×10^6 細胞を尾静脈注射し、被疑薬を連日経口ゾンデで経口投与した。コントロールとして PBS を連日経口投与した。眼球結膜、皮膚症状およびマウスの末梢血液のフローサイトメトリー解析を施行した。被疑薬を経口投与しているマウスでは Day12 に眼球結膜の充血を認めたが、コントロールでは認められなかった（図 10）。眼球結膜の充血は、患者 PBMC を被疑薬で刺激した後に NOG マウスに尾静脈投与すると 6 日目に眼球結膜の充血を認め、被疑薬で刺激することでより早期に症状が発症した（表 2）。



図 10

SJS/TEN モデルマウス

左：PBS 投与 右：被疑薬投与

モデルマウスの眼の HE 染色では結膜下浮腫を認め、死細胞を検出する TUNEL 染色では陽性細胞を多数認めた（図 11）。しかし、マウスの皮膚では症状を認めなかった（図 12）。

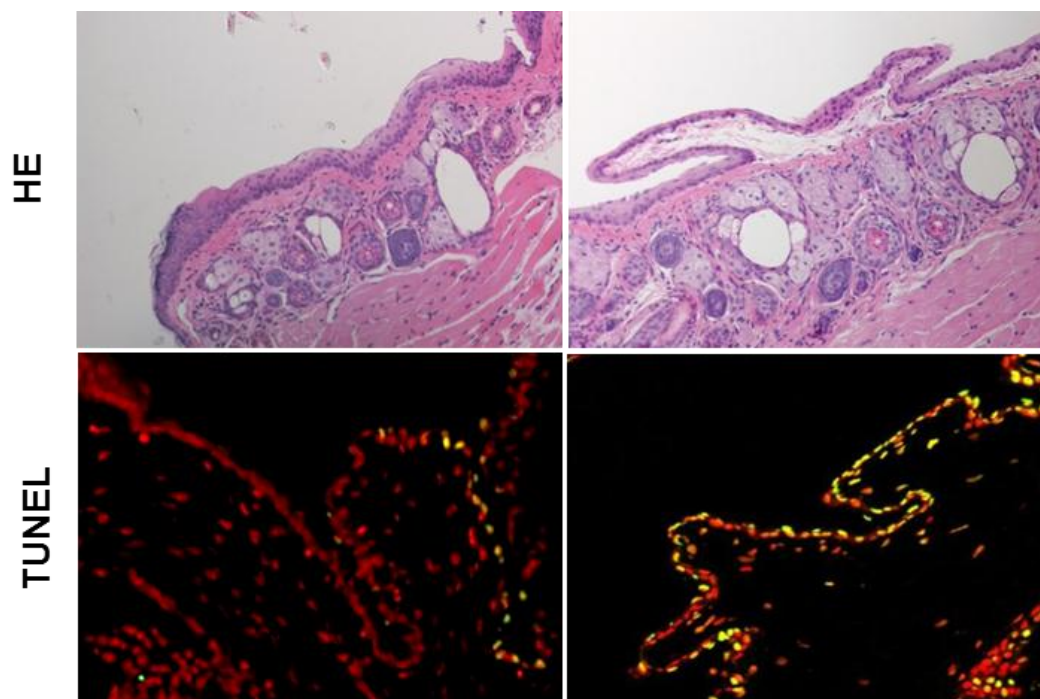


図 11

SJS/TEN モデルマウスの眼球結膜

左：PBS 投与、右：被疑薬投与

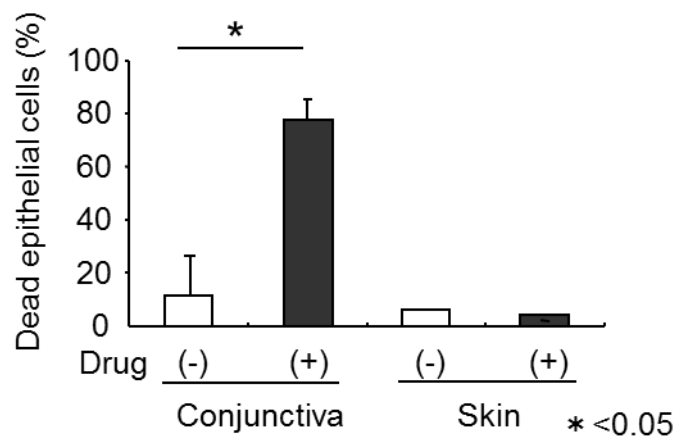


図 12
SJS/TEN モデルマウスの眼球結膜

マウスの末梢血、脾臓では human 細胞が軽度上昇し、マウスの脾臓を用いた human IFN- γ マウスの脾臓を用いでは、薬剤特異的な細胞の増加がみられた (図 13)。

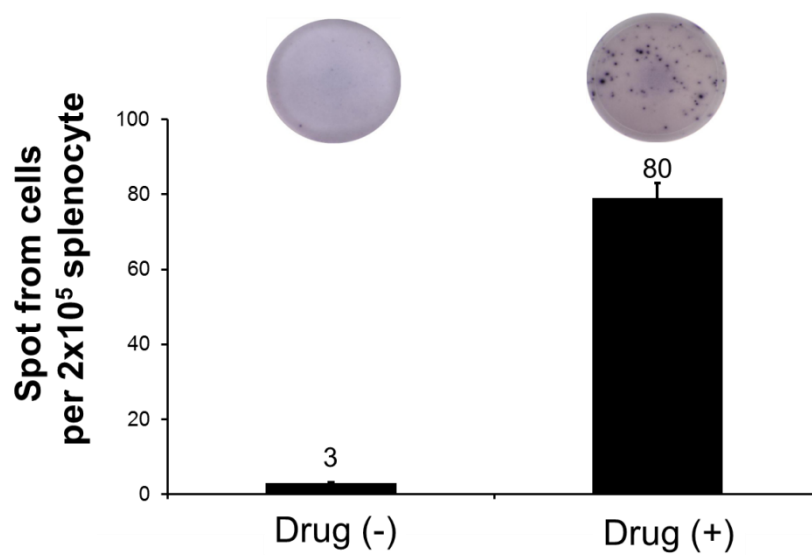


図 13
SJS/TEN モデルマウス脾臓の human IFN- γ ELISPOT

コントロールとして、通常薬疹の PBMC および健常人の PBMC を NOG マウスに尾静脈注射し、被疑薬剤を経口投与したが眼症状は出現しなかった (図 14)。



図 14
ODSR モデルマウスの眼
左：PBS 投与 右：被疑薬投与

B. CD8⁺細胞、CD4⁺細胞除去モデルマウス

次に SJS/TEN 発症における CD4⁺および CD8⁺細胞の関与について検討した。これまで、細胞障害性 T 細胞である CD8⁺が主体となり^{6,17)} 様々な細胞障害物質 (グラニューライシン、パーフォリン、グランザイム、TNF- α など) を放出し細胞死を誘導することが報告されている。そこで、SJS/TEN 患者 PBMC から CD4⁺、CD8⁺細胞をそれぞれ除去し、NOG マウスに移植し、症状の出現の有無を検討した。

SJS/TEN 患者末梢血を 30ml 回収し、PBMC を単離したのちに MACS を用いて CD4⁺細胞、および CD8⁺細胞をそれぞれ除去した。それぞれのサンプルは FACS を用いて除去の確認を行った

CD4⁺細胞、CD8⁺細胞をそれぞれ除去した SJS/TEN 患者 PBMC を NOG マウスに尾静脈注射し、被疑薬を連日経口投与したところ Day14 に CD4⁺細胞を除去したモデルマウスでは眼球結膜の充血を認めたが、CD8⁺細胞を除去したモデルマウスでは症状が出現しなかった (図 15) (表 2) この結果は、CD8⁺細胞が SJS/TEN の病態に深く関与していることを示唆する。

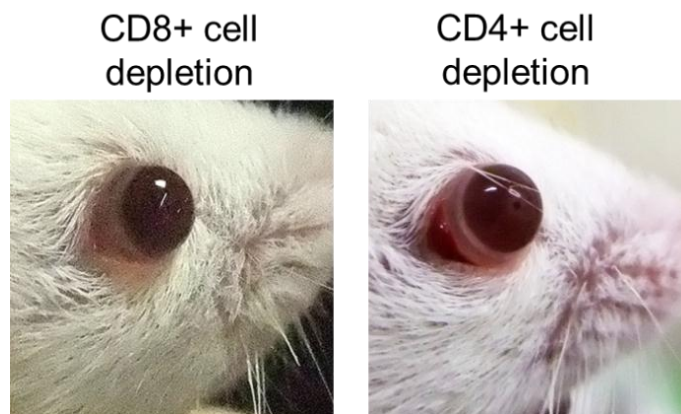


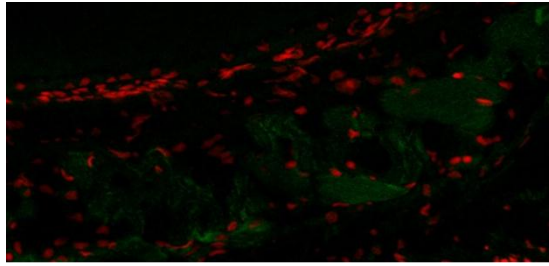
図 15

左：CD8 陽性細胞除去 右：CD4 陽性細胞除去

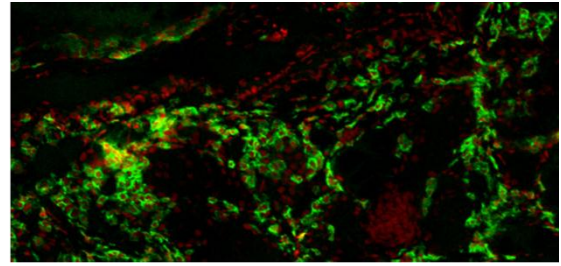
Injected cells	causative drug intake	SJS-like symptom (ocular manifestation)
SJS/TEN-PBMC	+	+ (day 12)
SJS/TEN-PBMC	-	-
Restimulated SJS/TEN-PBMC	+	+ (day 6)
SJS/TEN-PBMC depleted CD8+ cells	+	-
SJS/TEN-PBMC depleted CD4+ cells	+	+ (day 14)
Ordinary drug skin reaction-PBMC	+	-
Ordinary drug skin reaction-PBMC	-	-
Healthy control-PBMC	+	-
Healthy control-PBMC	-	-
None	+	-

表 2

しかし、SJS/TEN モデルマウスの眼球結膜にはヒト細胞の浸潤を認めず、一方 GVHR モデルではヒト細胞の著明な浸潤を認めた。これより SJS/TEN モデルマウスによる細胞死は何らかの液性因子が関与している可能性が示唆された（図 16）。



SJS/TEN model



GVHR

図 16

Human CD45⁺細胞の免疫染色

緑：Human CD45⁺細胞 赤：核

そこで、これまで SJS/TEN 発症への関与が報告されている sFasL, グラニューライシンまた human IL-2, 4, 6, 17, 10, TNF- α , IFN- β , IFN- γ についてモデルマウスの血清中で上昇している可能性を考慮し測定した。結果は、いずれも有意な上昇を認めなかった。

以上の結果より SJS/TEN 患者 PBMC を NOG マウスに移植し被疑薬を経口投与することで SJS/TEN の眼症状に類似した眼症状を出現させることに成功した。このモデルマウスの病態には、ヒト CD8⁺細胞が発症に深く関与していることが分かったが、マウスの眼にはヒト細胞の浸潤がほとんど認められず何らかの液性因子が細胞死に関与している可能性を示唆された。また、SJS/TEN 患者 PBMC を用いた SJS/TEN モデルマウスでは SJS/TEN で認められる皮膚症状を呈しておらず、この原因として皮膚がヒト由来ではないことを考慮し、皮膚をヒト化した新たな SJS/TEN モデルマウスの作成を行った。

C. SJS/TEN 植皮モデルマウス

SJS/TEN から回復した患者皮膚を NOG マウスの背部に移植し、移植が生着した後に、尾静脈から同患者の PBMC を注射した。注射後、連日被疑薬をマウスに経口投与し、コントロールでは PBS を経口投与した。被疑薬を経口投与したマウスは Day5 ころから植皮部の色調が茶褐色になり、Day8 には拡大傾向を示した (図 17,18)

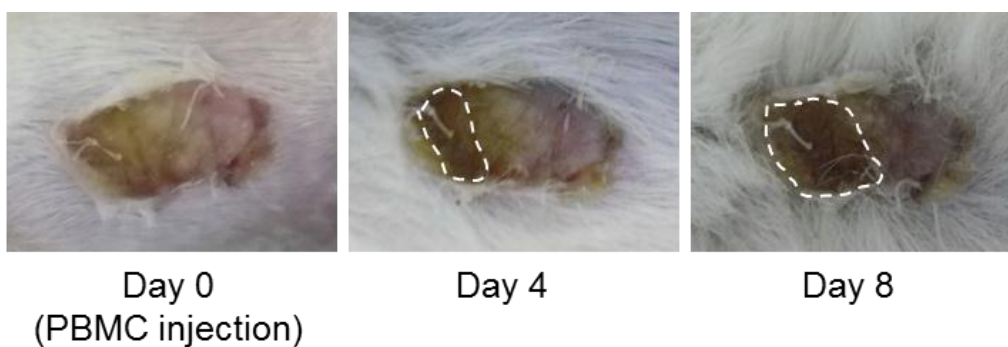


図 17
SJS/TEN 患者皮膚植皮部

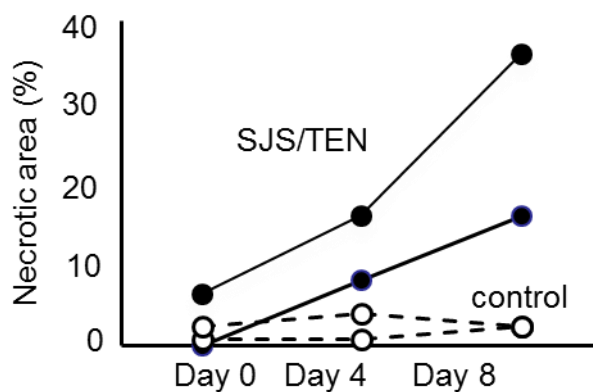


図 18
SJS/TEN 植皮モデルマウス

モデルマウスの皮膚を cleaved caspase3 染色で確認したところ、cleaved caspase3 陽性の死細胞を認めた（図 19）。

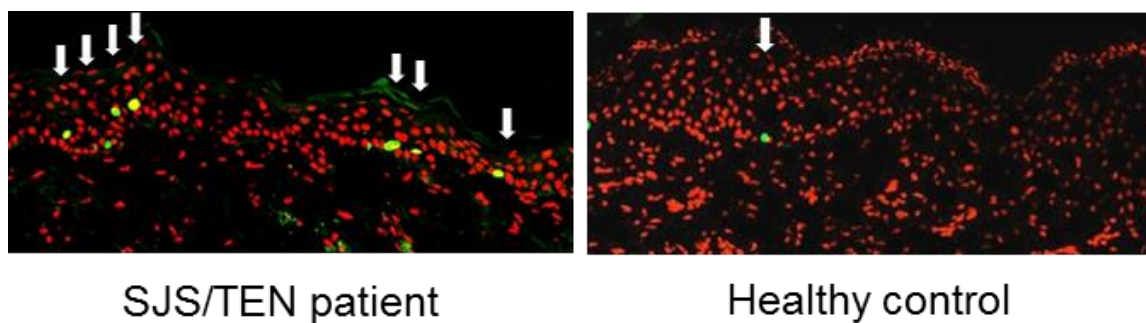


図 19
Cleaved caspase3 の免疫染色
緑：Cleaved caspase3 染色 赤：核染色

コントロールとして、通常薬疹の患者皮膚を NOG マウスに移植し同患者の PBMC を尾静脈投与し被疑薬を経口投与したが症状は認められず、cleaved caspase3 陽性の死細胞は認められなかった（図 20）

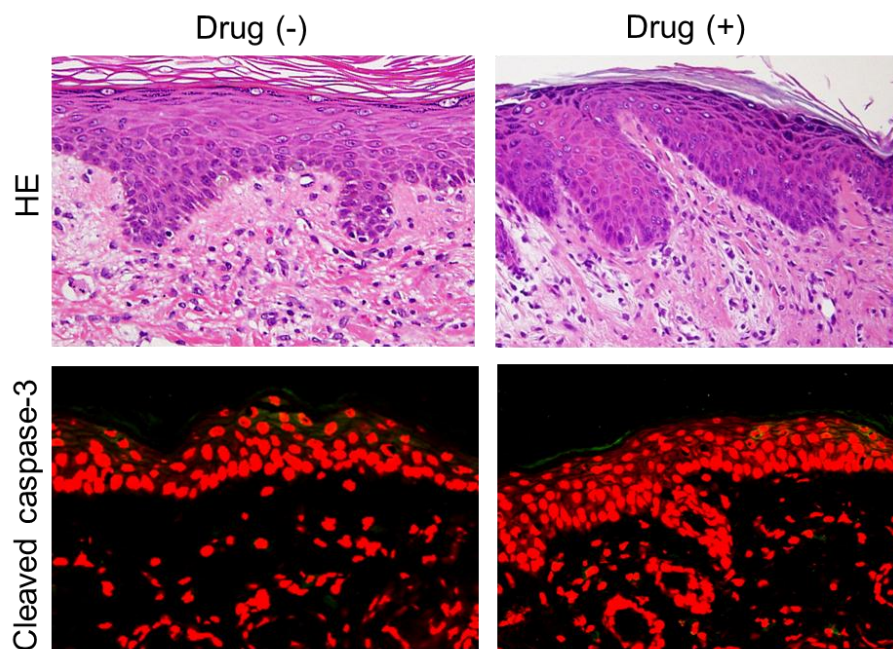


図 20
ODSR 植皮モデルマウス

上記の結果から、皮膚、末梢血を患者由来にすることで SJS/TEN に類似した皮膚症状を再現することに成功した。

皮膚への浸潤細胞について HumanCD4⁺、CD8⁺細胞の 2 重染色を施行したところ、SJS/TEN モデルマウスと健常コントロールで有意差は認められなかった（図 21）。

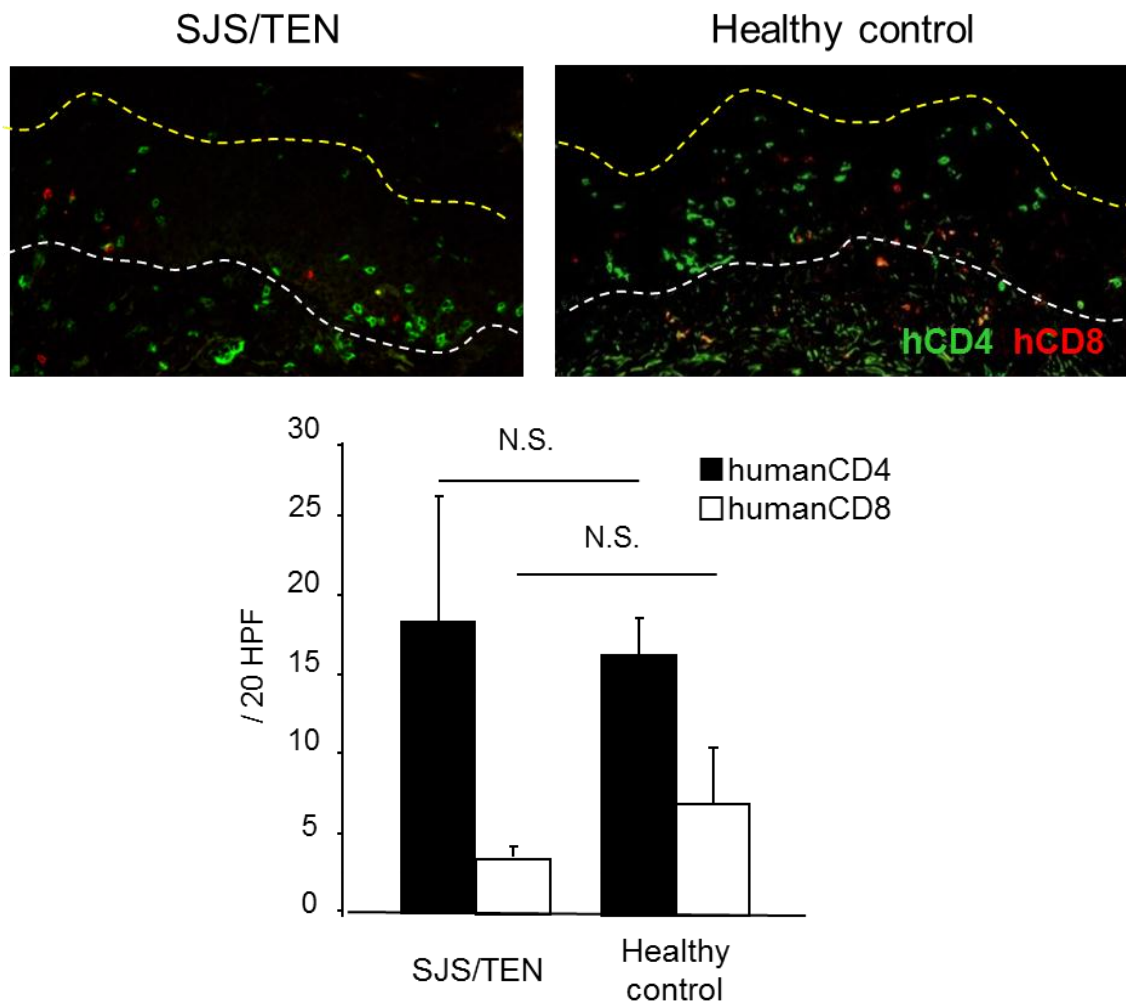


図 21
Human CD4⁺,CD8⁺の免疫染色
緑 : CD4 赤 : CD8

以上の結果から、SJS/TEN 患者皮膚植皮部への浸潤細胞に差がなく、何らかの液性因子がSJS/TENモデルマウスの細胞死に関与していることが示唆された。

考察

Stevens-Johnson 症候群 (SJS)/ Toxic epidermal necrolysis (TEN)は、急激な経過で紅斑、びらん、粘膜疹が出現し、時に致死的となる重症薬疹であり、SJS/TEN の発症病態は未だ不明な点が多い。それは本疾患のモデルマウスが確立されておらず研究が進んでいないことも原因の一つであった。本研究では病態解明のために、より生体に近いモデルマウスの作成を試み、SJS/TEN から回復した患者 PBMC および皮膚を用いて病態を再現することに成功しことが非常に特記すべき点である。

本研究において、SJS/TEN から回復した患者末梢血中に薬剤特異的な細胞が長期に渡って存在するとした既報告の結果を再確認した。SJS/TEN から回復した患者は、回復後にも原因薬剤を内服すると重症薬疹を発症する。このため、患者には被疑薬の理解ならびに注意を促している。重症薬疹では、皮膚のびらんとともに眼球結膜の充血、びらんを形成し SJS/TEN から回復後も羞明、ドライアイ、視力低下といった後遺症に悩まされている。本研究では、上記の臨床所見をもとに SJS/TEN から回復した患者末梢血と被疑薬を用いて SJS/TEN で認められる眼症状を再現することに成功した。この眼症状は、患者末梢血を被疑薬で刺激したのちに NOG マウスに移植するとより早期に症状が出現した。

一方で、SJS/TEN における標的細胞の細胞死は、CD8⁺細胞が病態に深く関与し^{6,17)} 紅斑丘疹型の薬疹では CD4⁺細胞が関与しているという報告¹⁹⁾がある。しかし、SJS/TEN 発症早期の皮膚では表皮細胞の細胞死が認められるが浸潤細胞が非常に少ない。このため浸潤細胞による直接障害ではなく、何らかの液性因子が細胞死を誘導しているのではないかと考えられる。特に、本研究では CD8⁺細胞を除去すると眼症状が認められず、CD4⁺細胞を除去しても眼症状が認められたことから CD8⁺細胞が細胞死の誘導に重要であることがモデルマウスにおいて解明された。しかし、モデルマウスの眼球結膜には移入したヒト細胞の浸潤は認められず、また末梢血においてもヒト細胞の増加を認めないことから眼球結膜の細胞死はヒト細胞による直接浸潤ではなく何らかの液性因子による可能性を示唆していた。SJS/TEN モデルマウスの脾臓では、ヒト細胞の増加を認め、脾臓の細胞を用いた ELISPOT では、薬剤特異的に IFN- γ を産生する細胞を確認した。本研究の結果から、

病変局所の眼部以外の、おそらくは脾臓または末梢血中に存在するヒト細胞が眼症状の発症に深く関与していることが示唆された。

SJS/TEN の原因となる液性因子として Chung ら⁶⁾が *granulysin* を報告している。Chung らの報告では、SJS/TEN の水疱内において *granulysin* が有意に上昇していることを見出し、さらに我々は発症早期の SJS/TEN 患者血清において、通常薬疹より有意に *granulysin* が上昇していることを報告した⁷⁾。一方、French ら⁸⁾のグループは SJS/TEN における表皮細胞のアポトーシスは Fas, Fas ligand によって誘導されると報告し、SJS/TEN の発症早期に sFasL が上昇していることを明らかにした¹⁶⁾。これらの結果は SJS/TEN の病態の一面を示していると考えられるが、本研究で作成したモデルマウスを用いてさらに詳細な病態が解明できると考える。また、本研究では、薬剤特異的な T 細胞が脾臓で確認されており、経口投与された薬剤の抗原提示は脾臓で行われ、抗原提示の後に液性因子が血中に放出され症状を呈すると考えられる。抗原提示細胞として NOG マウス由来およびヒト由来の細胞が考えられるが、NOG マウスは T 細胞、B 細胞、NK 細胞を欠損し、さらに樹状細胞の機能不全を呈している。このためマウス由来の樹状細胞が抗原を提示することができずヒトの抗原提示細胞がヒトの T 細胞に抗原を提示していると考ええる。

末梢血を用いた SJS/TEN モデルマウスによって CD8⁺細胞の関与が示唆されたが本モデルマウスの問題点として皮膚に症状を認めないことが挙げられる。皮膚に症状が出現しない原因について検討し、皮膚が患者由来ではないことが原因と考えられた。そこで SJS/TEN から回復した患者の皮膚を免疫不全マウスに植皮し、植皮が生着した後に同患者の末梢血を尾静脈注射し、さらに原因薬剤を経口投与すると、植皮部の色調が変化し免疫染色では細胞死を認めることに成功した。この症状は、通常薬疹の患者皮膚、末梢血を用いた場合には認められなかった。以上の結果から SJS/TEN の病態を免疫不全マウスで再現することに成功することができた。

本研究を通じて、SJS/TEN 患者末梢血、皮膚を用いて病態を再現することに成功したが、どのような液性因子が細胞死を誘導しているのか不明な点が多い。本研究で得られた知見をもとに更に研究を継続し新規治療法の解明を進めていきたいと考える。

総括および結論

本研究の結果、以下の結果を得ることができた。

- ・ SJS/TEN 患者 PBMC を NOG マウスに移植し、被疑薬を経口投与することで SJS/TEN における眼症状を再現することに成功した。
- ・ SJS/TEN における眼症状の発症には CD8+細胞が深く関与している。
- ・ SJS/TEN モデルマウスでは皮膚症状を認めなかったが、皮膚を患者由来にすることで SJS/TEN の皮膚症状を再現することに成功した。

今回の研究によって、SJS/TEN 患者 PBMC を NOG マウスに移入し被疑薬を加えると SJS/TEN における眼症状を発症することが解明された。SJS/TEN の眼症状の発症には CD8+細胞が重要であり、さらに NOG マウスの皮膚を患者由来にすることで皮膚の症状を再現するに至った。この知見より、SJS/TEN の病態には、薬剤刺激による何らかの液性因子の関与ならびに SJS/TEN 患者の表皮細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究の知見をもとに、更なる研究を継続した。SJS/TEN 患者 PBMC を被疑薬で刺激した時に何らかの液性因子が放出されていると仮定し、被疑薬で刺激した培養上清を回収した。また、患者由来の表皮細胞が細胞死に深く関与している可能性を考え、患者表皮細胞に培養上清を加えて細胞死を検討した。SJS/TEN 患者培養上清を SJS/TEN 患者表皮細胞に加えると細胞死を確認し、通常薬疹や健常人の表皮細胞では細胞死を認めなかった。今後、細胞死誘導メカニズムについて更なる研究を継続している。

今後の課題としては、SJS/TEN モデルマウスを用いた新規治療実験や SJS/TEN モデルマウスの知見をもとに発症要因を検討し、重症化のリスク因子を同定し発症を未然に防ぐことが将来的な目標となる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水 宏教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 阿部理一郎准教授に心より深謝いたします。そして本研究にご協力いただきました SJS/TEN、通常薬疹の患者様に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、北大皮膚科教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

1. Roujeau, J.C. *et al.* Medication use and the risk of Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. *N Engl J Med.* 333,1600-7 (1995).
2. Bastuji-Garin, S. *et al.* Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme. *Arch Dermatol.* 129, 92-6 (1993).
3. 北見 周. Stevens-Johnson 症候群ならびに中毒性表皮壊死症の全国疫学調査—平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）重症多形滲出性紅斑に関する中佐研究—. 日皮会誌. 121, 2467-82 (2011)
4. Di Pascuale, M.A. *et al.* Correlation of corneal complications with eyelid cicatricial pathologies in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis syndrome. *Ophthalmology.* 112, 904-12 (2005).
5. Pereira, F.A., Mudgil, A.V., Rosmarin, D.M. Toxic epidermal necrolysis. *J Am Acad Dermatol.* 56, 181-200 (2007).
6. Chung, W.H. *et al.* Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Nat Med.* 14, 1343-50 (2008).
7. Abe, R., Yoshioka, N., Murata, J., Fujita, Y., Shimizu, H. Granulysin as a marker for early diagnosis of the Stevens-Johnson syndrome. *Annals of internal medicine.* 151, 514-5 (2009).
8. Viard, I. *et al.* Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science.* 282, 490-3 (1998).
9. Abe, R. *et al.* Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. *Am J Pathol* 162, 1515-20 (2003).
10. Azukizawa, H. *et al.* Induction of T-cell-mediated skin disease specific for antigen transgenically expressed in keratinocytes. *Eur J Immunol.* 33, 1879-88 (2003).
11. Azukizawa, H. *et al.* Prevention of toxic epidermal necrolysis by regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 35, 1722-30 (2005)

12. Ito, M. *et al.* NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 100, 3175-82 (2002).
13. Ito, M., Kobayashi, K., Nakahata, T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol*. 324, 53-76 (2008).
14. Ito, R. *et al.* Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation*. 87, 1654-8 (2009).
15. Beeler, A., Engler, O., Gerber, B.O., Pichler, W.J. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 117, 455-62 (2006).
16. Rozieres, A. *et al.* Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy. *Allergy*. 64, 534-42 (2009).
17. Hanafusa, T., Azukizawa, H., Matsumura, S., Katayama, I. The predominant drug-specific T-cell population may switch from cytotoxic T cells to regulatory T cells during the course of anticonvulsant-induced hypersensitivity. *J Dermatol Sci*. 65, 213-9 (2012).
18. Murata, J., Abe, R., Shimizu, H. Increased soluble Fas ligand levels in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis preceding skin detachment. *J Allergy Clin Immunol*. 122, 992-1000 (2008).
19. Hari, Y. *et al.* T cell involvement in cutaneous drug eruptions. *Clin Exp Allergy*. 31,1398-408 (2001).