

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 齋藤奈央

学位論文題名

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)

【背景と目的】

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たり、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、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。SJS/TEN の発症メカニズムは不明な点が多く、そのため治療法、予防法の開発も滞っている。解明が進んでいない原因として、疾患モデルマウスが確立していないことも原因の 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、ヒトの病態と解離しており、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実験を行った。

【対象と方法】

SJS/TEN から回復した患者、通常薬疹から回復した患者を対象とした。

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。一部の実験では、 $CD4^+$ 細胞、 $CD8^+$ 細胞を除去し PBC 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。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。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 $PBS100 \mu l$ 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。

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、 $200 \mu\text{l}$ 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 $100 \mu\text{l}$ 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。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。

【結果】

SJS/TENから回復した患者末梢血を免疫不全マウスに尾静脈注射し、原因薬剤を連日経口投与したところ、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。さらに、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、原因薬剤を経口投与すると、植皮部に細胞死を認め皮膚症状の再現にも成功した。

【考察】

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、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。

【結論】

今回の研究によって、SJS/TEN患者PBMCをNOGマウスに移植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。