

スティーブンス・ジョンソン症候群の発症機序の解明

高橋 良

杏林大学大学院医学研究科
共同研究施設フローサイトメトリー部門

【目的】

重症薬疹の一つであるスティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome : SJS) の発症には、マイコプラズマ肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* : MP) 感染症が関連している事が知られているが、その因果関係は判っていない。我々は、以前にSJS患者急性期の末梢血では制御性T細胞 (Treg) の抑制機能が著しく低下していることを見出した。このTregの質的変化がSJS発症に関与すると推測し、MP感染症の患者末梢血中のTregの抑制機能を解析したところ、水痘 (varicella zoster virus : VZV)、ヒトパルボウイルスB19 (human parvovirus B19 : PB19) 感染症、Epstein-Barr virus (EBV) 感染症など、一般的なウイルス感染症と比較して回復後も長期間にわたって持続的に抑制機能が低下している事を見出したが (図1)、なぜそうなるのかは明らかになっていない。近年、我々は

単球のサブpopulationの一つであるCD14^{dim}CD16⁺ proinflammatory monocyte (pMO) がTregの分化を制御する事を発見した。本研究ではMP感染症患者の単球とTregのインタラクションの解析を行い、どのようにしてTregの抑制機能低下が持続されるのかを解明することを研究目的とした。

【材料・方法】

(1) 細胞

MP感染症患者の急性期・回復期、およびボランテ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、末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。

(2) 細胞内サイトカイン産生の検出

T細胞からのIL-17A⁺細胞の検出 : PBMCをphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 及びionomycinで4時間刺激し、産生されるサイトカインをBrefeldin Aで細胞内に

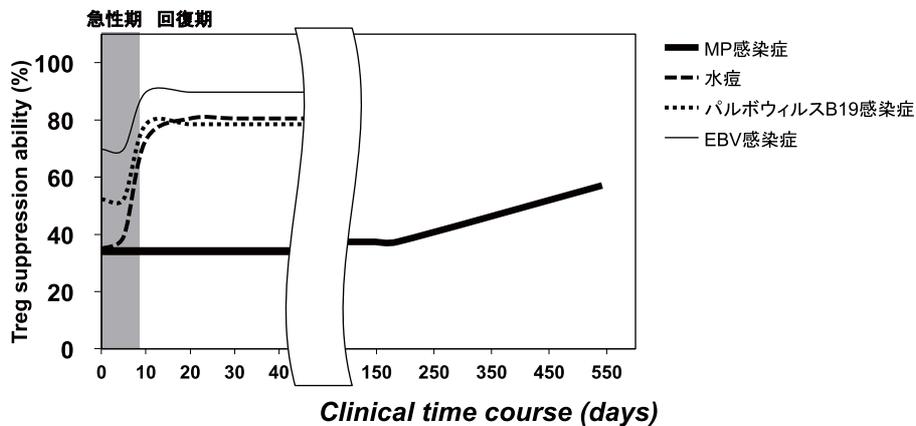


図1 MP感染症及び比較対象感染症におけるTreg細胞の抑制機能の時系列変化
各感染症患者の急性期・回復期からそれぞれのタイミングでTreg細胞を、そして健康人よりCD3⁺T細胞をセルソーターで分離後、CD3及びCD28抗体で刺激し培養を行った。細胞増殖能は³Hサイミジンの取り込みを測定した。

留めさせた後, anti-IL-17, CD4, CD45RA, Foxp3モノクローナル抗体で染色しフローサイトメトリー (FCM) で測定した。

単球からのIL-6⁺細胞の検出: MP菌体成分を認識するToll-Like receptor 2(TLR2)リガンドのPam3Cys-SKKKK, 比較対象としてTLR4リガンドのLipopolysaccharide (LPS) でPBMCを刺激し, Breferdin Aを添加して4時間培養後, 細胞内サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-1 β 等) をFCMで測定した。

(3) 単球とCD3⁺T細胞の混合培養

健常人から磁気ビーズソーターを使用してCD3⁺T細胞を分取後, CFSE色素で染色した。健常人及びMP感染症患者からpMOをFACS Ariaセルソーターで分取後, CFSE⁺CD3⁺T細胞とanti-CD3及びCD28モノクローナル抗体存在下で96wellラウンドマイクロプレートにて培養を行なった。また, この培養系にIL-6中和抗体を添加したアッセイも評価した。培養7日目に細胞を回収し, Breferdin A存在下でPMA + ionomycinで4時間刺激し, anti-IL-17, CD4, CD45RA, Foxp3モノクローナル抗体で染色し, FCMで測定した。

【結果・考察】

(1) MP感染症のTregのサイトカイン産生

Tregは主要なマーカーであるFoxp3とCD45RAの発現パターンから, 抑制機能を有するCD45RA⁺Foxp3⁺natural Treg (nTreg)とCD45RA⁻Foxp3⁺⁺induced Treg (iTreg),

そして抑制機能を有さないCD45RA⁻Foxp3⁺(non-Treg)に分類することが出来る。MP感染症患者の回復期のTregを調べると, 末梢血液中のiTregが減少し抑制機能を持たないCD45RA⁻Foxp3⁺(non-Treg)細胞の割合が増加しており, さらにCD45RA⁻Foxp3⁺(non-Treg)細胞は, IL-17Aを産生している事がわかった。

(2) MP感染症の単球からのサイトカイン産生

単球をTLR2 ligandで刺激したところ, pMOからIL-6 (T細胞をIL-17Aを産生する細胞 (Th17) に分化誘導させるサイトカイン) 産生がMP感染症の回復期で優位に増加している事を明らかにした。

(3) MP患者回復期のpMOがIL-17⁺Foxp3⁺細胞を誘導する

実際にMP感染症回復期のpMOがIL-17A⁺Foxp3⁺細胞を誘導するのかを調べるために, 患者PBMCからpMOを分取し, それを健常人より得たCD3⁺T細胞と共にanti-CD3及びCD28抗体存在下で培養したところ, Foxp3⁺細胞中のIL-17A⁺細胞が有意に増加した。この増加はanti-IL-6中和抗体を添加することによって抑制された。

以上の結果から, MP感染症回復期ではpMOがTLR2を介してMPを認識し, IL-6を産生した結果, IL-17A産生細胞が増加し免疫活性化状態になり, その結果, 薬剤アレルギーであるSJSを発症しやすい状況になっていると推測された。