

Hashimoto K: A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation **Br J Dermatol** 2003, 149:185-8.

16. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, **Hashimoto K:** So-called biological dressing effects of cultured epidermal sheets are mediated by the production of EGF family, TGF- β and VEGF. **J Dermatol Sci** 2003, 32:209-15

日本語論文

1. 藤山幹子、**橋本公二** : drug-induced hypersensitivity syndrome と HHV-6 臨床免疫 40:219-21, 2003
2. **橋本公二** : D I H S の経緯と診断基準 医学のあゆみ 205:951-4, 2003
3. **橋本公二** : D I H S とはなにか アレルギー・免疫 10:811-5, 2003
4. 山崎研志、白方裕司、佐山浩二、**橋本公二** : 角化細胞の幹細胞 再生医学 40:218-225, 2003
5. 藤山幹子、**橋本公二** : 薬剤誘発性過敏症症候群 アレルギー科 15:381-6, 2003

学会発表

1. Yamasaki K, Dai X, Nanba D, Shiraishi K,

Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Higashiyama S, **Hashimoto K:** PLZF regulates and suppresses melanoma proliferation and tumor growth. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA

2. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, **Hashimoto K,** Amagai M: In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
3. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, **Hashimoto K:** Novel role of angiotensin II in fibroblasts: induction of fibroblast migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
4. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Higashiyama S, **Hashimoto K:** Keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice show marked retardation of skin wound healing. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA

2003. Miami Beach May 2003, USA
5. Nanba D, Shirakata Y, Nakanishi Y, Hieda Y, Ishiguro H, Higashiyama S, **Hashimoto K**: Epidermal hyperplasia and impaired morphogenesis of hair follicles in mice overexpressing a soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 6. Dai X, Yamasaki K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, **Hashimoto K**: All trans-retinoic acid induces production of IL-8 in human keratinocytes via increased phosphorylation of I κ B α in the NF κ B pathway. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 7. Tohyama M, Shirakata Y, Yamasaki K, Sayama K, Tsuda T, Tan E, **Hashimoto K**: production of MIP-1 α /CCL3 is mediated via toll-like receptor 3 in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 8. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Sugai M, Ichijo H, **Hashimoto K**: Epidermal differentiation regulates the production of innate antimicrobial peptides in the skin. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 9. Tokumaru S, Shirakata Y, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K**: EGF receptor transactivation by UV-irradiation is mediated via HB-EGF shedding in human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2003. Miami Beach May 2003, USA
 10. **Hashimoto K**: Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS). 13th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Daejeon Oct 2003, Korea
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

皮膚の多能性幹細胞の単離・培養と性状解析

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療センター

細胞組織再生医学研究部 部長

研究要旨 皮膚の細胞を浮遊培養して1個の細胞から clonal な増殖により sphere を形成させることに成功した。分化条件にすると神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞等に分化し、多能性をもつことを証明した。浮遊培養において TGF- β が sphere の形成に促進的に働くことを明らかにした。

A. 研究目的

皮膚の幹細胞の新しい培養法として浮遊培養を用い、幹細胞を大量に培養することと多分化能を検討し、幹細胞の性質を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

マウス(CD57BL/6J)の耳介皮膚を細切し、Hanks Balanced Solution (HBSS)で洗い、0.1%トリプシン溶液にて 37℃60 分静置した。さらに機械的に細切し、trypsin neutralizing solution (TNS)でトリプシンを中和した。細胞はフィルターで濾過し、遠心にて回収した。培養には 2% B27 supplement を含む DMEM/F12 培地を使用し、表皮細胞増殖因子(epidermal growth factor:EGF)を最終濃度 20ng/ml、塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor:bFGF)を 10ng/ml となるよう

に添加し CO₂インキュベーターで 37度 5%CO₂ の条件下、浮遊系培養皿で 2 週間培養した。スフェアの形成数およびスフェア 1 個当たりの大きさを検討した。さらに以下の増殖因子を添加して control 群と比較検討した。細胞播種濃度：10 cells/ μ l

増殖因子および最終濃度：

transforming growth factor- α (TGF- α) 50ng/ml, ciliary neurotrophic factor (CNTF) 50ng/ml, neurotrophin-3 (NT-3) 50ng/ml, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 50ng/ml, transforming growth factor- β (TGF- β) 1.0ng/ml, bone morphogenic protein 4 (BMP4) 10ng/ml,

分化条件

取得したスフェアを、EGF、bFGF を除いた 1%ウシ血清を含む DMEM/F12 培地で 1 週間培養して分化を誘導し、ニューロンのマーカーの β III Tubulin、アストロサイトのマーカー

一の GFAP、平滑筋のマーカーの α SMA、脂肪滴を染色する Oil red O を用いて免疫染色を行い各種抗体の陽性細胞の割合を検討した。

表面マーカーの検索

スフェア形成前の皮膚の細胞と TGF- β を添加したスフェア、非添加スフェアで各種表面マーカーの発現に違いがあるかを Flow cytometry を用いて検討した。また胎仔脳より作成した neurosphere とも比較した。表面マーカーに E-cadherin、Thy-1、CD34、 β 1 integrin、 α 6 integrin を用いた。

C. 研究結果

マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphere を形成させ、半年以上の長期継代に成功した。wild type マウスと GFP マウスの細胞を混合して浮遊培養したところ、両者のキメラの sphere が出現した。すなわち 1 次 sphere の形成には細胞の凝集が生じている可能性が示唆された。そこで培養液にメチルセルロースを加えて細胞凝集を抑制した。それでも 1 個の細胞から sphere の形成が見られた。スフェアを分化させた場合には β III Tubulin、GFAP、 α SMA、Oil red O 陽性細胞がそれぞれ 5 % 程度検出された。スフェアの形成数およびスフェア 1 個あたりの大きさは TGF- β を添加した場合のみ control 群 (EGF+bFGF) と比較して有意な差が得られた。TGF- β の濃度依存性について検討したところスフェアの形成数においては、0.01ng/ml から有意な差が観察され、

1.0ng/ml で顕著な増加が認められた。スフェア 1 個あたりの大きさは control 群と比較して 0.001ng/ml から有意な差が観察され、1.0ng/ml で顕著な増加が認められた。

スフェア形成時に TGF- β を添加し、分化させた場合には非添加群と比べて β III Tubulin、GFAP、 α SMA、Oil red O 陽性細胞の割合に変化は認められなかった。しかし、分化誘導時に TGF- β を添加した場合には α SMA 陽性細胞は約 6~7 倍の増加が認められた。

スフェア形成前の皮膚細胞に発現している E-cadherin、Thy-1 はスフェアにおいては発現していなかった。これらの表面マーカーは TGF- β 添加においても不変であった。Neurosphere においては一部に Thy-1 陽性所見がえられた。

マウス皮膚より得られるスフェアの形成数は加齢により、減少することを確認した。

D. 考察

neurosphere 法に準じた浮遊培養により sphere を形成させると、細胞の凝集が生じていることが判明した。そこでメチルセルロースを添加して、凝集を抑制しても 1 個の細胞から sphere を形成したので clonal な増殖を証明できたと考えている。また分化条件により多分化能を証明し、長期培養により自己複製能と増殖能を検討して、幹細胞としての性質を証明した。さらに TGF- β により sphere の形成率と細胞数の増加が見られたが、これは neurosphere においては報告されていない現象である。線維芽

細胞はTGF- β により形質転換することが知られているので、皮膚の細胞がTGF- β により transdifferentiation をおこした可能性がある。また本来接着細胞を浮遊状態にして培養しているのので、脱分化しやすくなっている可能性も否定できない。またアポトーシスが抑制された可能性もある。このメカニズムの解明は細胞の可塑性を考える上で非常に重要である。また皮膚組織から皮膚以外の細胞を誘導できる可能性が示唆されたので、自己の細胞を使った再生医療に応用する道がひらける。今後分化効率を高める研究をすすめれば、幹細胞ソースとして皮膚を用いることができると考えられた。

E. 結論

皮膚から神経細胞やグリア細胞、平滑筋細胞に分化する多能性幹細胞を単離・培養することができ、かつ長期にわたって増殖することを確認した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成15年度）

論文発表

英語論文

1. Kawase Y, Yanagi Y, Fujimoto M, **Okochi H**: Characterization of multipotent stem cell in the skin-positive effect of TGF-beta on sphere colony formation. *Exp Cell Res* in press
2. Itoh M, Hiraoka Y, Kataoka K, Huh NH, Tabata Y, **Okochi H**: Novel collagen sponge reinforced with polyglycolic acid fiber produces robust, normal hair in murine hair reconstitution model. *Tissue Engineering* in press
3. Yano S, Komine M, Fujimoto M, **Okochi H**, Tamaki K: Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* in press
4. Yazawa N, Fujimoto M, Sato S, Miyake K, Asano N, Nagai Y, Takeuchi O, Takeda K, **Okochi H**, Akira S, Tedder TF, Tamaki K: CD19 regulates innate immunity by the toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes. *Blood* 2003, 102:1374-80
5. Yano S, Komine M, Fujimoto M, **Okochi H**, Tamaki K: Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 301:841-7
6. Tsunemi Y, Ihn H, Idezuki T, **Okochi H**, Tamaki K: Psoriasis guttata in association with hepatocellular carcinoma. *Acta Derm Venereol* 2003, 83:70-1
7. Mitsui H, Komine M, Shirai A, Kanda N,

Asahina A, Okochi H, Hitomi S, Kimura S, Tamaki K: Chronic active EB virus infection complicated with IgG3 subclass deficiency: an adult case treated with intravenous immunoglobulin and IFN-alpha. Acta Derm Venereol 2003, 83:31-5

8. Nagaoka Y, Okochi H, Tamaki K: Leukocytopenia after administration of itraconazole. Mycoses 2003, 46:240-1

日本語論文

1. 大河内仁志：皮膚の幹細胞と再生医療 最新医学 58suppl:789-796, 2003
2. 大河内仁志：毛髪の再生医療 遺伝子医学別冊 p173-177 2003
3. 大河内仁志：皮膚と再生医療 日皮会誌 113:247-251, 2003
4. 大河内仁志：毛髪の再生にむけて 臨床現場での再生医療の最前線 羊土社 p84-88 2003
5. 大河内仁志：皮膚にある幹細胞と再生医療への応用 BIO Clinica 18:76-80, 2003

学会発表

1. Ura H, Yano S, Fujimoto M, Okochi H: A

keratinocyte outgrowth system useful as a new tool for analyzing proliferation, migration, and differentiation International Investigative Dermatology 2003 Miami Beach May 2003

2. Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H: Effect of transforming growth factor-beta on the proliferation and differentiation of multipotential sphere colonies from skin International Investigative Dermatology 2003 Miami Beach May 2003

3. Fujimoto M, Asano N, Okochi H, Tedder TF, Sato S: Exaggerated B cell signaling by disrupted CD22/SHP-1 inhibitory regulation in the tight-skin mouse International Investigative Dermatology 2003 Miami Beach May 2003

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

栄養障害型表皮水疱症遺伝子治療のための基礎研究

玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 助教授

研究要旨 栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療のための基礎研究を行った。平成15年度の研究内容は、平成14年度に引き続き超音波を利用した生体皮膚への遺伝子導入方法を開発すると共に、VII型コラーゲン遺伝子プロモーターをクローニングした。

共同研究者

山崎尊彦、知野剛直、大鶴聰、金田安史
大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療を実現するためには、生体皮膚への高効率遺伝子導入法を確立する必要がある。とくに、表皮水疱症では、水疱部位、非水疱部位を問わず、表皮・真皮間の接着が破綻しており、わずかな機械的刺激により新たな水疱が形成されるため、有効な遺伝子治療を行うためには、表皮を標的とした低侵襲な遺伝子導入法を開発しなくてはならない。平成15年度の研究では、超音波および造影剤を用いた水疱部表皮への低侵襲性遺伝子導入法の開発を進めた。また、より安全かつ生理的条件に近い遺伝子治療を可能にする目的で、VII型コラーゲン遺伝子(COL7A1)プロモーターのクローニングを行った。

B. 研究方法

1) 水疱部皮膚への遺伝子導入方法の確立：真空吸引装置をヘアレスラット背部皮膚に装着し、陰圧をかけて吸引水疱を形成した。水疱内容液を除去後、GFP 遺伝子発現プラスミド DNA (1 μ g/ μ l in PBS) /10%超音波造影剤 (Optison) 溶液を水疱内に注入し、治療用超音波発生装置 (Ultax) を用いて種々の超音波エネルギーを照射して、遺伝子導入高率をルシフェラーゼアッセイにて検討した。

2) COL7A1 プロモーターのクローニング：COL7A1 プロモーター領域の塩基配列をデータベース上で検索し、約 4000 塩基対のプロモーター領域を PCR にて増幅した。この領域をルシフェラーゼ遺伝子および VII 型コラーゲン cDNA の上流に接続した。

C. 研究結果

1) 水疱部皮膚への遺伝子導入方法の確立：ヘアレスラット背部皮膚に作成した吸引水疱内に GFP 発現プラスミド単独、GFP 発現プラスミド/Optison 溶液を注入し、超

音波エネルギー照射 24 時間後に GFP の発現を検討した。その結果、GFP 発現プラスミド単独に比べ、Optison と併用によって水疱部位の表皮細胞における GFP の強い発現が得られることを確認した。

2) COL7A1 プロモーターのクローニング: データベースから得た COL7A1 プロモーター配列を基にして、転写開始部位上流 4000 塩基、3000 塩基、2000 塩基、および 1000 塩基のヒト DNA を PCR によりクローニングした。それぞれの DNA 断片を、ルシフェラーゼ遺伝子に接続した COL7A1/ルシフェラーゼ・レポータープラスミドを作成し、培養ヒト表皮細胞中に導入してルシフェラーゼ活性を確認、それぞれの DNA 断片が COL7A1 プロモーターとして機能することを確認した。

D. 考察

栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療を成功させるためには、強い外力を加えることなく、低侵襲性に水疱部、あるいは非水疱部皮膚に VII 型コラーゲン遺伝子を導入する必要がある。平成 14 年度には、非水疱部皮膚への遺伝子導入法として、ケミカルピーリングと超音波エネルギーを組み合わせることにより、生体皮膚へ直接プラスミド遺伝子を導入する新たな方法論を開発し報告した。しかし、この方法では水疱部皮膚への遺伝子導入は困難なため、水疱部及びその近傍の皮膚には新たな遺伝子導入法を開発する必要がある。そこで、平成 15 年

度の研究では、超音波および造影剤を用い、水疱部およびその近傍の剥離皮膚に対する低侵襲性遺伝子導入法を開発した。造影剤は、超音波により破裂する際のエネルギーにより細胞表面に微小孔をあけ、同時に発生するジェット流により細胞表面近傍の DNA 溶液が微小孔を通して細胞内に流入する。本研究では、吸引水疱内に DNA/造影剤溶液を注入して超音波を照射することにより、水疱蓋及びその近傍の微小剥離表皮内に遺伝子導入が可能であることを明らかにした。この方法を応用することにより、栄養障害型表皮水疱症の水疱部表皮細胞内に VII 型コラーゲン発現ベクターを導入する遺伝子治療が可能になると考えられる。さらに今回われわれは、COL7A1 プロモーターのクローニングを行った。4000 塩基対の DNA は COL7A1 プロモーター領域全体をカバーするため、このプロモーターを用いて VII 型コラーゲン cDNA を発現させることにより、より生理的に近い状態で遺伝子治療が可能になると思われる。

E. 結論

新しい水疱部皮膚への遺伝子導入法を開発するとともに、COL7A1 プロモーターをクローニングした。今後、VII 型コラーゲンノックアウトマウスを用いてわれわれの方法論の有効性、安全性を検討し、本研究班の研究期間内における臨床応用を目標としたい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表（平成 15 年度）

1. 論文発表

英語論文

1. Oshima K, Shimamura M, Mizuno S, **Tamai K**, Doi K, Morishita R, Toshikazu Nakamura T, Kubo T, and Kaneda Y : Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats. FASEB J in press
2. N. Umegaki, R. Moritsugu, S. Katoh, K. Harada, H. Nakano, **K. Tamai**, K. Hnanada, M. Tanaka : Photodynamic therapy may be useful to debulk cutaneous lymphoma prior to radiotherapy. British J Dermatol in press
3. **Tamai K**, Hashimoto I, Hanada K, Ikeda S, Imamura S, Ogawa H: Japanese guidelines for diagnosis and treatment of junctional and dystrophic epidermolysis bullosa. Arch Dermatol Res 2003, 295: 24-28
4. Kaneda Y and **Tamai K**: Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of intractable skin diseases.

Arch Dermatol Res 2003, 295:63-66

5. Matsuzaki Y, **Tamai K**, Kon A, Sawamura D, Uitto J and Hashimoto M: Keratinocyte responsive element 3 (KRE3): Analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene promoter. J Invest Dermatol 2003, 120:308-12

日本語論文

1. 玉井克人. 先天性表皮水疱症. 今日の小児疾患治療指針. 第 13 版 2003, p. 576
2. 玉井克人. 先天性表皮水疱症を治す、難治性皮膚疾患を治すスキル、皮膚診療プラクティス 15、2003, p238

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

マウス角化細胞 side population の増殖能に関する研究

分担研究者 岡野栄之 慶応義塾大学医学部生理学 教授

研究要旨 表皮角化細胞の幹細胞を同定する目的で、マウス角化細胞の side population 細胞（SP 細胞）の増殖能について検討した。新生児マウス表皮を分離分散し、ヘキスト 33342 で染色後セルソーターを用いて SP 細胞と main population 細胞（MP 細胞）を無菌的にソーティングし、無血清培養法にて培養した。SP 細胞はディッシュに接着したのに対し、MP 細胞はほとんど生着しなかった。数日間の培養で SP 細胞は大きなコロニーを形成したが、MP 細胞のコロニー形成はほとんど認めなかった。従って、表皮 SP 細胞は幹細胞としての要素を持つものと推測され、表皮幹細胞を利用した再生医療を推進する上で、SP 細胞は有用なものであることが示唆された。

A. 研究目的

表皮角化細胞を用いた再生医療を推進するうえで、効率のよい細胞の分離と培養が必要である。このためには、表皮角化細胞の幹細胞を分離・培養することが最も適していると思われる。表皮角化細胞の幹細胞は過去の報告によると $\beta 1$ integrin を強発現していることが明かとなっており、これらに対する抗体を用いた細胞の分離法が利用されてきた。しかし、抗体を用いる方法は少なからず細胞に対するダメージがあるため、臨床応用については疑問が持たれる。平成 14 年度の研究にて、抗体を用いない幹細胞の分離法として骨髄細胞で行われているヘキスト 33342 を用いた分離法（SP 細胞）が角化細胞においても有用であることを示

した。そこで、本年度は SP 細胞が幹細胞の要素の一つである高い増殖能を有するかについて検討した。

B. 研究方法

新生児マウス皮膚を外科的に採取し、エタノール処理後、PBS にて洗浄し、ディスペーゼ処理を 4℃、18 時間行った。表皮と真皮を剥離し、表皮部分をトリプシン処理し細胞を分離した。ヘキスト 33342 を 10, $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、37℃60 分間染色を行った。遠心操作後細胞を $3 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で再懸濁し、高速セルソーター（EPICS ALTRA, ベックマン・コールター社）を用いて SP 細胞と Main population 細胞（MP 細胞）に分離し、I 型コラーゲンコートプレ

ートに播種した。無血清培養液を適量加え、数日間培養し、コロニー形成能にて増殖を比較した。形成されたコロニーが角化細胞であることをケラチン 14 の染色にて確認した。

C. 研究結果

マウス表皮 SP 細胞は N/C 比 (細胞質に対する核の比率) が高く、比較的小さな細胞であるのに対し、MP は大型で、N/C 比の小さい細胞であった (図 1)。ソーティングされ、大きなコロニーとなった細胞は、表皮角化細胞の基底細胞のマーカであるケラチン 14 で染色されたことより、すべての細胞が角化細胞であることが確認できた (図 2)。SP 細胞は培養数日で大きなコロニーを形成したが、MP 細胞は小さなコロニーしか形成せず、長期間の培養でも大きなコロニーにはならなかった (図 3)。細胞数を測定したところ、SP 細胞は 1 平方センチあたり 2000 個以上に増殖したが、MP 細胞は 100 個以下であった (図 4)。

D. 考察

表皮角化細胞の幹細胞の分離法として表面マーカーを用いた分離法が従来おこなわれていたが、この方法では少なからず細胞に対するダメージが危惧されている。また、決定的な表面マーカーは見いだされておらず、抗体による染色に時間がかかることもあり、最適の分離法とはいえない。Side population 細胞 (SP) は骨髄において当初

検討された細胞であり、骨髄 SP 細胞は幹細胞である可能性が高いと報告されている。平成 14 年度に表皮角化細胞における SP の存在を示したが、今回の検討において SP が高度の増殖能を有していることが明らかとなった。すなわち、SP 細胞は表皮幹細胞としての性質を一部有していると思われる。

E. 結論

マウス表皮角化細胞における SP 細胞は幹細胞としての性質である高度の増殖能力を有しており、この細胞を用いた再生医療が発展することが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 15 年度)

論文発表

英語論文

1. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke G, Sakakibara S, **Okano H**: Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker; Musashi1. **Differentiation** 2003, 71:28-41
2. Tonchev AB, Zhao L, Yamashima T, **Okano H**: Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of adult primates. **Glia** 2003, 42:209-224

3. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H: Increased proliferation of neural progenitors and neurogenesis in the postischemic brain of young adult primates. **Mol Cell Neurosci** 2003, 23:292-301
4. Kuo H-C, Pau FKY, Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, Wolf DP: Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. **Biology of Reproduction** 2003, 68:1727-1735
5. Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N: Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells from mouse embryos. **Mol Cell Neurosci** 2003, 24:190-197
6. Ishizuya-Oka A, Shimizu K, Sakakibara SI, Okano H, Ueda S: Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. **J Cell Sci** 2003, 116:3157-3164
7. Kanuka H, Kuranaga E, Hiratou T, Igaki T, Nelson B, Okano H, Miura M: Translocon complex mediates neural cell death and degeneration implicated for polyglutamine toxicity. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003, 100:11723-11728
8. Baker H, Kobayashi K, Okano H, Saino-Saito S: Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. **Cell Mol Neurobiol** 2003, 23:503-518
9. Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kimura M: Growth and differentiation ability of main- and side-population cells derived from skeletal muscle CD34+/45- fraction. **Exp Cell Res** 2003, 291:83-90
10. Miyanomori Y, Kobayashi H, Watanabe M, Nagata T, Imai T, Uesugi S, Okano H, Katahira M: Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than the C-terminal one of a mouse neural protein, Musashi1, as revealed by NMR spectroscopy. **J Biol Chem** 2003, 278:41309-41315
11. Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H: Expression of a splicing isoform of mNumb is downregulated during endocrine differentiation in pancreas. **Differentiation** 2003, 71:486-495
12. Hu QD., Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Natesan

S, Ng YK, Ling EA, Israel A, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K and Xiao ZC.: F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. **Cell** 2003, 115:163-175

13. Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Ohsugi Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H: Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in *spinal cord injury*. **J Neurosci Res In press**

14. Yamashita T, Tonchev BA, Seki T, Sawamoto K, Okano H: Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia.

Hippocampus In press

15. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T: Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. **FEBS Lett** 2003, 535: 131-135

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H-E Staining

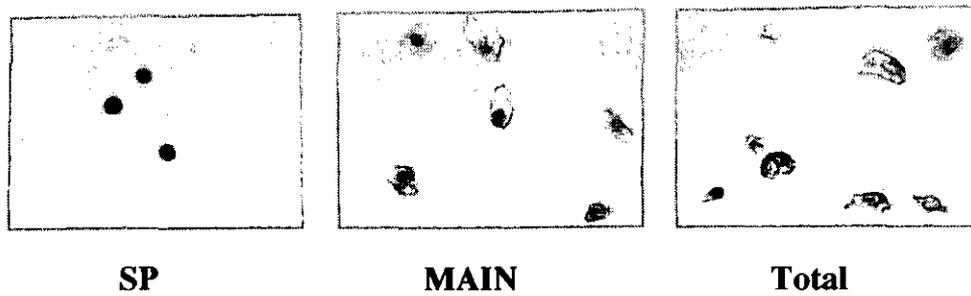


図1 マウス表皮 SP 細胞の形態学的特徴

マウス SP 細胞は N/C 比（細胞質に対する核の比率）が高く、比較的小さな細胞であるのに対し、MP は大型で、N/C 比が小さい。

Immunostaining (Anti-K14)

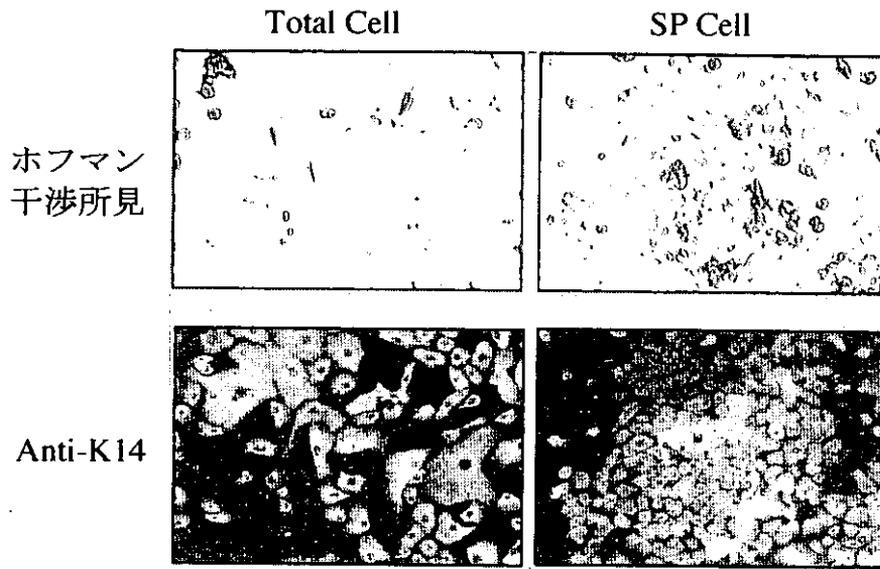


図2 ソートティングした細胞の免疫蛍光抗体法所見

ソーティングされ、大きなコロニーとなった細胞は、表皮角化細胞の基底細胞のマーカーであるケラチン14で染色されたことより、すべての細胞が角化細胞であることが確認できた。

Protocol : SHIRAKATA-SP-OK-PRO
Acq Date : 05-Jun-03

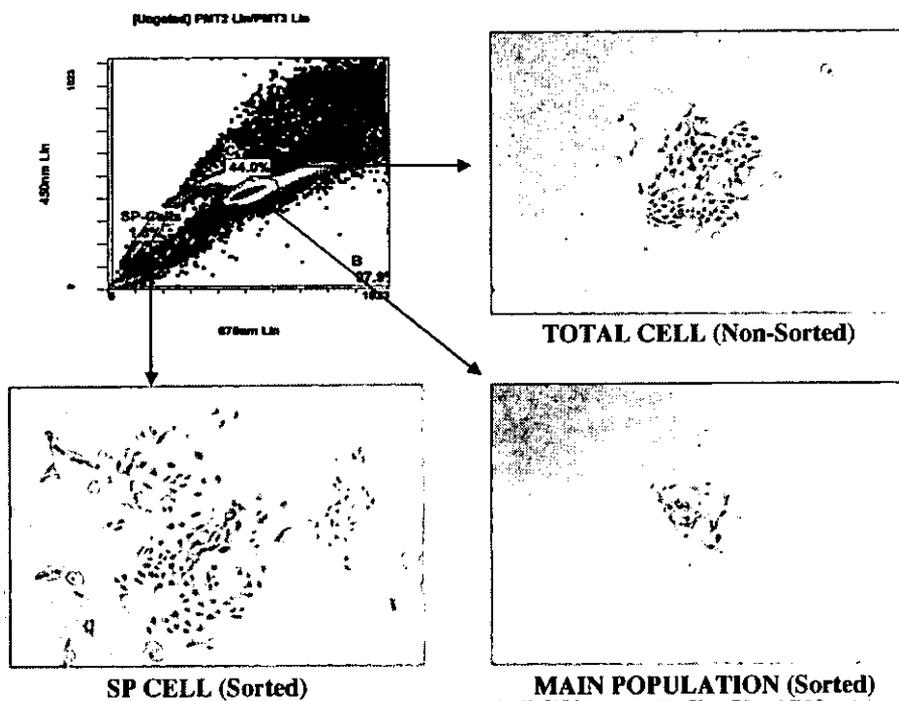


図3 SP細胞のコロニー形成能

SP細胞、MP細胞、ソートなしの全細胞をそれぞれ無菌的にソーティングし、培養を行った。SP細胞は培養数日で大きなコロニーを形成したが、MP細胞は小さなコロニーしか形成せず、長期間の培養でも大きなコロニーは形成しない。

Growth Assay

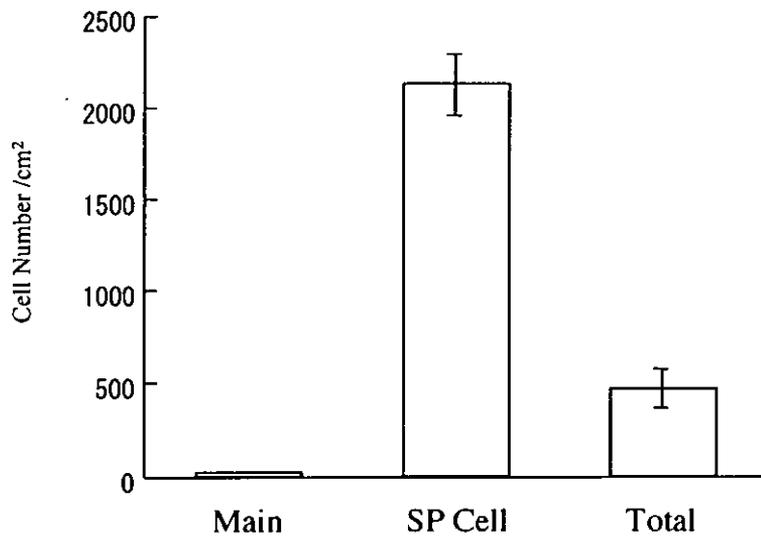


図4 細胞数の測定

増殖したコロニーの細胞数を測定したところ、SP 細胞は1平方センチあたり2000個以上に増殖したが、MP 細胞は100個以下であった。

薬剤性過敏症症候群発症における薬剤の免疫学的作用の検討

分担研究者 塩原哲夫 杏林大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 薬剤性過敏症症候群(DIHS)は、ある限られた薬剤を長期内服後に発症することから、これらの薬剤に何らかの共通の作用があることを推測し、DIHS患者の発症初期と回復後の血清免疫グロブリン値、B細胞数などの免疫学的変動を検討した。DIHSの発症初期では血清免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM)値は、回復後に比較して有意に低下していた。また、発症初期のCD19+細胞数も減少していることを確認した。

A. 研究目的

前年度の研究で薬剤性過敏症症候群(DIHS)は、ある特定の薬剤を内服した後に発症し、経過中にヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)の再活性化を認める重症の薬疹であることが明確にした。さらに、この結果にもとに、DIHSの診断基準案を作成した。本年度の研究では、DIHSが特定の薬剤を2から6週間の長期内服後に発症するという特徴、HHV-6の再活性化は移植後などの免疫不全状態においてもたらされること、さらに、DIHSをもたらず抗けいれん剤などの薬剤は通常用いる薬理作用とは異なる免疫学的作用を有することなどに注目し、DIHSにおいて薬剤が及ぼす免疫学的側面を検討した。

B. 研究方法

1997年から2002年に杏林大学皮膚科に受診した抗けいれん剤内服後に発症したDIHS患者(N=10)の血清を用いてTurbidimetric

immunoassayを用いた血清免疫グロブリン値(IgG, IgM, IgA)、NephelometryによるIgGサブクラス(IgG1-gG4)、さらに、Flow Cytometryを用いたCD19+細胞数の解析を行った。検体は発症初期と完全に回復した後に採取されたものを用いた。対象として、同様の抗けいれん剤内服後に発症した播種状紅斑丘疹型の薬疹患者の検体、また、抗けいれん剤内服にもかかわらず、皮疹の出現が全くみられない患者の検体を使用した。また、DIHSに対する対象疾患として、Stevens-Johnson症候群の患者においても同様の検討を行った。検体は患者の同意を得て採取されたものを使用した。

C. 研究結果

DIHS患者では発症初期には血清免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM)は回復後に比較して有意に低下していた。この発症初期の免疫グロブリン値は抗けいれん剤内服後に発症し

た播種状紅斑丘疹型の薬疹患者や皮疹が全くみられない抗けいれん剤内服中の患者の免疫グロブリン値に比較しても有意な低下を示した。DIHS 患者の免疫グロブリン値の低下は一過性で、約2～3週間後に回復した。また、IgG1-IgG4 サブクラス間においては有意な減少を示したものはなかった。さらに、DIHS 患者の発症初期の CD19+細胞は回復後に比較して減少していた。また、DIHS でみられたと同様の免疫グロブリン値の減少、CD19+細胞の減少は Stevens-Johnson 症候群の発症初期には検出されなかった。

D. 考察

ウイルス感染やウイルス再活性化の防御には、一般に細胞障害性 T 細胞 (CTL) の働きが重要であると認識されている。しかし、ウイルスの種類や感染部位によっては抗体の関与も見過ごすことはできない。今回、抗けいれん剤による DIHS 患者の発症初期に認められた一過性の IgG の減少や B 細胞の減少は、同剤の軽症の薬疹では検出されず、また、他の重症薬疹でも認められなかったことから、DIHS の病因に深く関連した所見ととらえることができる。DIHS においては原因薬剤が感作リンパ球を生み出すだけでなく、B 細胞を障害し、IgG の産生を低下させていると考えられ、このことがウイルス再活性化の引き金となっている可能性がある。

E. 結論

DIHS における血清 IgG や末梢血の B 細胞の

減少は、ウイルスの再活性化に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 15 年度)

論文発表

英語論文

1. Takahashi R, Mizukawa Y, Yamazaki Y, Hayakawa K, Hayakawa J, Kudo A, **Shiohara T**: In vitro differentiation from naive to mature e-selectin binding CD4 T cells: acquisition of skin-homing properties occurs independently of cutaneous lymphocyte antigen expression. *J Immunol* 2003, 171:5769-77
2. Nori M, Iwata S, Munakata Y, Kobayashi H, Kobayashi S, Umezawa Y, Hosono O, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, **Shiohara T**, Morimoto C.: Ebastine inhibits T cell migration, production of Th2-type cytokines and proinflammatory cytokines. *Clin Exp Allergy*. 2003, 33:1544-54
3. Teraki Y, **Shiohara T**: IFN-gamma-producing effector CD8+ T cells and IL-10-producing regulatory CD4+ T cells in fixed drug eruption. *J Allergy Clin Immunol*. 2003, 112:609-15
4. **Shiohara T**, Mizukawa Y.: Recall

phenomenon: some skin-resident cells remember previous insults. **Dermatology**. 2003, 207:127-9

5. Inoue Y, Isobe M, **Shiohara T**, Hayashi H.: Inhibitory activity of CX-659S, a novel diaminouracil derivative, against the rebound phenomenon following withdrawal of corticosteroid therapy for chronic contact hypersensitivity responses. **Int Arch Allergy Immunol** 2003, 13:143-52

日本語論文

1. **塩原哲夫**: DIHD をめぐる重症薬疹アレルギーの新展開 DIHS を中心にした重症薬疹の病態とそのとらえ方. 医学のあゆみ 205: 960-964, 2003
2. **塩原哲夫**: DIHS (Drug-induced hypersensitivity syndrome) DIHS の治療. アレルギー・免疫 10: 836-843, 2003
3. **塩原哲夫**: 診断の指針 治療の指針 中毒疹と薬疹の鑑別. 総合臨床 52:1765-1766, 2003
4. **塩原哲夫**: 薬疹をめぐる諸問題 薬疹とは. アレルギー科 15:375-380, 2003
5. 平原和久、狩野葉子、**塩原哲夫**: カルバマゼピンによる drug-induced

hypersensitivity syndrome の1例. 臨床皮膚 58:1069-1072, 2003

6. 水川良子、**塩原哲夫**: 限局性の痒み陰部ヘルペスと診断されていた固定薬疹. **Visual Dermatology** 2:908-909, 2003
7. **塩原哲夫**: ウイルス感染と薬疹. 日本小児皮膚科学会雑誌 22:59-64, 2003

2. 学会発表

1. **塩原哲夫**: 重症薬疹治療におけるガンマグロブリン療法の問題点. 第15回日本アレルギー春季臨床大会、横浜、2003.5.12
2. 狩野葉子、勝田倫江、**塩原哲夫**: Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) の診断と治療. 第15回日本アレルギー春季臨床大会、横浜、2003.5.12
3. 勝田倫江、早川 順、狩野葉子、**塩原哲夫**: HIV感染患者に出現したST合剤による薬疹の2例. 第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003.5.25
4. 佐久間恵一、狩野葉子、**塩原哲夫**: ステロイドと IVIG の同時投与が奏効した DIHS の1例. 第67回日本皮膚科学会東部支部学術大会、旭川、2003.9.27