

敏症症候群(DIHS)118症例の臨床的検討 第105回日本皮膚科学会総会, 京都2006. 6

12. 渡辺千恵子, 高橋さなみ, 相原道子, 池澤善郎: インフルエンザワクチンによる薬疹が疑われた2症例. 第36回日本皮膚アレルギー学会総会・第31回日本接触皮膚炎学会総会, 淡路, 2006, 7.
13. 井上雄介, 小岩克至, 小野田雅仁, 相原道子, 池澤善郎: イソソルビドによる多形紅斑型の薬疹の1例. 第36回日本皮膚アレルギー学会総会・第31回日本接触皮膚炎学会総会, 淡路, 2006, 7.
14. 松木美和, 池田信昭, 神林靖子, 櫻井紀子, 西 香織, 山野朋子,

蒲原 毅, 山川有子, 松井矢寿恵, 池澤善郎: フェノバルビタールによる中毒性表皮壊死症の1例. 第36回日本皮膚アレルギー学会総会・第31回日本接触皮膚炎学会総会, 淡路, 2006, 7.

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

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

カルバマゼピンによる薬剤性過敏症症候群における HLA の解析

分担研究者 森田栄伸 島根大学医学部皮膚科教授

研究要旨

カルバマゼピンによる drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) の 5 例およびカルバマゼピンによる播種状紅斑丘疹型薬疹 (MP) の 2 例において HLA-B の遺伝子タイピングを行った。患者に共通してみられるタイプはみられなかったが、B*400201 と B*5101 がそれぞれ 3 例にみられ HLA-B は疾患感受性遺伝子の可能性が示唆された。

A. 研究目的

カルバマゼピンは広く用いられているてんかん治療薬であるが、重症型薬疹の頻度の高い薬剤のひとつである。これまで薬剤による副作用が HLA タイプと関連する可能性があることが知られている。最近、カルバマゼピンによる Stevens-Johnson 症候群が HLA-B 遺伝子と関連することが報告された。本研究では、カルバマゼピンによる薬疹と HLA-B 遺伝子座の関連を確認することを目的とした。

B. 研究方法

対象は平成 14 年～平成 18 年の 5 年間に島根大学医学部附属病院皮膚科を受診したカルバマゼピンによる DIHS 患者 5 例（男性 1 例，女性 4 例，平均年

齢 41.1 歳）およびカルバマゼピンによる MP 患者 2 例（男性 1 例、女性 1 例、平均年齢 49.0 歳）である。患者より同意を得た後に末梢血を採取し、Ficoll Hypaque を用いて単核球を分離し、DNA を抽出した。HLA-B の遺伝子タイピングは PCR-SBT 法により行った。

C. 研究結果

7 例の患者のタイピング結果を表 1 に示す。全ての患者に共通したタイプはみられなかった。HLA-B*400201 と HLA-B*5101 がそれぞれ 3 例にみられた。

表 1 HLA-B 遺伝子タイピング

病型	HLA-B	
DIHS	400201	4601
DIHS	510101	670101
DIHS	520101	400201
DIHS	1507	5502

MP	4001	510101
DIHS	5101	5201
MP	400201	151101

D. 考察

これまでカルバマゼピンによる Stevens-Johnson 症候群と関連があると報告された HLA-B*1502 は、本研究で調査した患者ではみられなかった。今回の検討では B*400201 と B*5101 がそれぞれ 3 例にみられ、高頻度である可能性があるが、これらのタイピングは東洋人で比較的頻度の高いタイプであるため、疾患との関連はさらに症例数を増やして検討する必要がある。最近、アロプリノールによる重症薬疹が HLA-B*5801 と極めて強い関連があることが明らかにされたことから、カルバマゼピンによる重症薬疹も B 遺伝子座と関連がある可能性があり、今後さらに検討する必要がある。

E. 結論

カルバマゼピンによる重症薬疹の発症は HLA-B 遺伝子座と関連がある可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

辻野佳雄，森田栄伸，大藤 聡：染毛

剤による接触蕁麻疹症候群の 1 例. 皮膚科の臨床 48(5) : 641-644, 2006

2. 学会発表

金子 栄，森田栄伸，高橋 勉，藤山 幹子，橋本公二：一過性に HHV-6 DNA が血清中ならびに水疱内に認められた TEN の 1 例. 第 105 回日本皮膚科学会総会，京都市 2006 年 6 月 3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

眼障害を伴う Stevens-Johnson 症候群 (SJS) / 中毒性表皮壊死症 (TEN) の解析

分担研究者 木下 茂 京都府立医科大学 眼科学教授

研究要旨 Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と中毒性表皮壊死症 (TEN) はしばしば重篤な眼合併症を生じ、重篤な視力障害を後遺症とする。本研究では眼合併症の病態を解析し、有効な治療法について検討した。急性期より治療に関与できた症例について、その治療内容と視力予後を解析した。また慢性期（癒痕期）患者の眼所見を詳細に解析し、視力に影響する因子を検討した。その結果、発症初期より全身および局所にステロイドを投与した患者は、全例で視力障害を残さなかった。慢性期の視力障害患者は全例で角膜上皮幹細胞を消失しており、角膜上皮幹細胞消失による結膜侵入、角膜混濁の程度が視力と相関した。以上より、急性期にステロイドを十分に使用して眼表面の炎症を軽減し、角膜上皮幹細胞消失を回避することが視力予後改善のために重要であると考えられた。

A. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と中毒性表皮壊死症 (TEN) は重篤な眼合併症を生じ、生涯にわたる視力障害を後遺症とする。しかし発症頻度が稀であることと致死率が高いことから、両疾患における眼障害の実態は不明であり、視力障害を回避する有効な治療法も明らかでない。本研究では、1) 急性期より眼科的治療を十分に行えた症例について、その所見、治療内容と視力予後を解析した。2) SJS と TEN

における眼障害の病態を明らかにすることを目的に、癒痕期症例の眼所見を解析した。

B. 研究方法

1) Prospective study として、新規患者に対して発症後極めて早期よりステロイドパルス療法とベタメタゾン局所投与を行った。眼所見の推移と治療内容を記録し、慢性期（発症後1年以上）における眼所見と視力を解析した。2) 慢性期患者 138 眼の眼所見について

て、輪部上皮残存、生体染色、上皮欠損、結膜侵入、血管侵入、角膜混濁、角化、充血、瞼球癒着、睫毛乱生、皮膚粘膜移行部、マイボーム腺圧出油脂、涙点閉鎖の13項目について評価し、視力との関係を解析した。

C. 研究結果

1) 2003年3月以降、5例において発症初期(発症後0-7日、平均3.4日)より全身にステロイドパルスを行い、局所にベタメタゾンを使用した。急性期に、全例で角結膜上皮障害と偽膜形成を認めたが、ステロイド使用により消炎され、これらの所見が消失した。

発症後1年において、5例10眼すべてにおいて視力は1.0以上であり、視力障害を後遺症としなかった。

2) 慢性期の視力障害患者は、全例で輪部上皮すなわち角膜上皮幹細胞が完全消失しており、角膜上皮幹細胞消失による結膜侵入、血管侵入、角膜混濁の程度が視力に相関した。

D. 考察

急性期に角膜上皮幹細胞が消失することにより結膜侵入、角膜混濁、血管侵入を生じて、視力障害に至ると考えられた。急性期よりステロイドを使用した患者全例において輪部上皮が保たれ、視力予後が良好であったことより、急性期に眼表面の炎症を抑制して

輪部上皮の消失を回避することが、視力予後の改善に結びつくと考えられた。

E. 結論

急性期に眼表面の高度炎症を制御し、角膜上皮幹細胞の消失を回避すれば、両疾患の視力予後が著しく改善する。そこで、SJSおよびTENの治療指針(平成18年11月厚生労働省発行)に眼所見と眼科的治療法を記載した。今後は急性期治療と予後に関する、プロスペクティブな大規模スタディを行っていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(平成18年度)

論文発表

1. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Mid-term results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141:267-275, 2006.
2. Nakamura T, Ang LPK, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood NJ, Kinoshita S: The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens

- Johnson syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci 47:909-916, 2006.
3. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S: The transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. Ophthalmology 113:1765-1772, 2006.
 4. Tanioka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Ang LPK, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, Kinoshita S: Establishment of a human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci 47:3820-3827, 2006.
 5. Ang LPK, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S: Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplantation for severe ocular surface disease. Arch Ophthalmol, in press.
 6. Ueta M, Sotozono C, Tokunaga K, Yabe T, Kinoshita S: Strong association between HLA-A*0206 and Stevens-Johnson syndrome in the Japanese. Am J Ophthalmol, in press.
 7. Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K, Yamada M, Kinoshita S: A new grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. Ophthalmology, in press.
 8. 木下 茂、外園千恵、稲富 勉、中村隆宏、小泉範子、川崎 諭、上田真由美、横井則彦、上野盛夫、笹井芳樹：再生医学による重症角膜疾患の新規治療法開発への戦略的研究。最新医学 62:132-180, 2007. (ベルツ章受賞論文)
- 学会発表
1. 外園千恵, 小泉範子, 上田真由美, 東原尚代, 稲富勉, 横井則彦, 山田昌和, 海道美奈子, 村戸ドール, 坪田一男, 木下茂：慢性期 Stevens-Johnson 症候群患者の視力と前眼部所見. 第30回角膜カンファレンス, 東京, 2006. 2. 9.
 2. 荒木やよい, 稲富勉, 外園千恵, 木下茂：Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症の初期治療の検討. 第30回角膜カンファレンス, 東京, 2006. 2. 9.
 3. 外園千恵, 木下茂, 白方裕司, 橋本公二：Stevens-Johnson 症候群

および TEN の診断基準と眼所見.
第 40 回日本眼炎症学会, 米子,
2006. 7. 8.

4. 上田真由美, 外園千恵, 屋部登志雄, 徳永勝士, 木下茂: 日本における Stevens-Johnson 症候群の HLA 解析. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10. 6.
5. 外園千恵, 上田真由美, 小泉範子, 日比野佐和子, 稲富勉, 木下茂: Stevens-Johnson 症候群の病歴と視力予後. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10. 6.

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ヒト表皮角化細胞 side population の長期増殖能力に関する研究

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 ヒト角化細胞の side population 細胞（SP 細胞）が長期にわたり増殖が可能であるかについて検討した。ヒト角化細胞を培養し、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）をソーティングした。それぞれの分画を培養し、継代を繰り返したところ、初期の増殖能は SP 細胞が優れていたが、長期にわたる培養では MP 細胞のほうが増殖能は勝っていた。

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、表皮角化細胞の幹細胞を同定することが不可欠である。昨年度までの研究成果により、抗体を用いない幹細胞の分離法として骨髓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が、SP 細胞は継代操作により減少することが明らかとなった。本年度は SP 細胞の性質を明らかにするために、長期間培養における SP 細胞の特性について検討した。

B. 研究方法

凍結保存しておいた 2 代目のヒト表皮角化細胞を播種し、無血清培養法にて培養した。培養後 5 日目の subconfluent になった条

件で、トリプシン/EDTA を用いて細胞を回収し、ヘキスト 33342 を 10 ug/ml の濃度で添加し、37°C60 分間染色を行った。遠心操作後細胞を 3x10E6/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 細胞と全分画の細胞を分離採取した。引き続き無血清培養を行い、細胞がサブコンフルエントになった時点で継代を繰り返し、どの程度まで細胞が増殖するかについて検討した。また、皮膚組織から直接分離した角化細胞を用いて同様に検討した。

C. 研究結果

SP 細胞は main population (MP) 細胞と比較して、継代初期では増殖能力が高く、サブコンフルエントになるまでの時間が短く、数代継代までは増殖能力が高いことが明と

なった。皮膚組織から分離した角化細胞においても初期の増殖能は高いものであった。しかし、継代を繰り返すに伴い、SP細胞は増殖が急に低下し、7-8回継代で増殖を停止する傾向が見られた。一方MP細胞においては7-8回継代後も順調に増殖し、10-12代まで継代可能であった。この現象は皮膚組織から分離した角化細胞でも同様であった。

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。前年度までの研究において、ヒト表皮角化細胞のSP細胞が幹細胞としての性質を有していることを確認したが、継代によりSP細胞の幹細胞としての維持が困難であることが明らかとなった。この現象が培養条件によるものか、幹細胞としてはあわないものなのかについて長期培養にて検討した。継代数回までは明らかにSP細胞のほうが増殖は優れていたが、その後はSP細胞は急速に増殖が低下した。この結果はSP細胞はstem cellとしての性質と言うよりはむしろ

transit amplifying cellとしての性質を有していると思われる。早急に培養皮膚として使用することを必要とする熱傷などにおいてはSP細胞を用いた培養皮膚は有効であると思われるが、長期間生存・増殖することが必須である遺伝子治療にとっては適していない可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト表皮角化細胞におけるSP細胞の性質を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成18年度）

論文発表

1. Ozawa Y, Nakao K, Shimazaki T, Shinmura S, Kurihara T, Ishida S, Yoshimura A, Tsubota K, **Okano H**: SOCS3 is required to temporally fine-tune photoreceptor cell differentiation. Dev Biol in press
2. Jomphe C, Lemelin PL, **Okano H**, Kobayashi K, Trudeau LE: Bidirectional regulation of dopamine D2 and neurotensin NTS1 receptors in dopaminergic neurons. Eur J Neurosci 24:2789-800, 2006.
3. Kaneko N, **Okano H**, Sawamoto K: The role of cholinergic system in regulating

- survival of new neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes to Cells* 11: 1145-59, 2006.
4. Yamashita T, Deguchi K, Sawamoto K, **Okano H**, Kamiya T, Abe K: Neuroprotection and neurosupplementation in ischaemic brain. *Biochem Soc Trans* 34 (Pt 6):1310-1312, 2006.
 5. Yamashita T, Popivanova BK, Guo J, Tonchev AB, Kotani S, Wakayama T, Iseki S, Sawamoto K, **Okano H**, Fujii C, Mukaida N: Implication of 'Down syndrome cell adhesion molecule' in adult neurogenesis of monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 16: 924-35, 2006.
 6. Terakawa M, Sato S, Ashida H, **Okano H**, Obara M: Integrity of plasmid deoxynucleic acid after application of laser-induced stress waves used for gene transfection. *Jpn J Appl Phys* 45: pp. L768-9, 2006.
 7. Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, **Okano H**: A selective Sema3A-inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12:1280-9, 2006.
 8. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, **Okano H**, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45:213-22, 2007.
 9. Yamada M, Tanemura K, Ozawa M, Ohyama R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Mizuno H, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Ishitsuka C, Nagai A, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, **Okano H**, Kondoh T: Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells* in press.
 10. Kato N, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Ozawa Y, Yoshida S, Higa K, **Okano H**, Tsubota K: Beta-catenin activation and epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of pterygium. *IOVS* in press
 11. **Okano H**: Adult neural stem cells and central nervous system repair. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 60: 215-28, 2006.

12. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Matzuzaki Y, Fukuda K, **Okano H**, Tsubota K: Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult cornea. *Stem Cells* 12:2714-22, 2006.
13. Ishii K, Nakamura M, Dai HN, Finn TP, **Okano H**, Toyama Y, Bregman BS: Neutralization of Ciliary Neurotrophic Factor reduces astrocyte production from transplanted neural stem cells and promotes regeneration of corticospinal tract fibers in spinal cord injury. *J Neurosci Res* 84:1669-81, 2006.
14. Kurihara T, Ozawa Y, Shinoda K, Nagai N, Inoue M, Oike Y, Tsubota K, Ishida S, **Okano H**: Role of the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker, telmisartan, in neuroprotection against retinal inflammation. *IOVS* 47:545-52, 2006.
15. Arata Y, Kouike H, Zhang Y, Herman M, **Okano H**, Sawa H: Wnt signaling and a Hox protein cooperatively regulate PSA-3/MEIS to determine daughter cell fate after asymmetric cell division in *C. elegans*. *Dev Cell* 11:105-15, 2006.
16. Okada S, Ishii K, Miyao T, Shimzakai T, Katoh H, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Nakamura M, Toyama Y, **Okano H**: Conditional ablation of STAT3/SOCS3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 12: 829-34, 2006.
17. Chan C, Moore BE, Cotman CW, **Okano H**, Tavares R, Hovanesian V, Pinar H, Johanson CE, Svendsen CN, Stopa EG: Musashi1 antigen expression in human fetal germinal matrix development. *Exp. Neurol* 201: 515-8, 2006.
18. Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, **Okano H**, Sawamoto K: Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying precursors in the subventricular zone. *Neurosci Lett* 403: 63-7, 2006.
19. Yamashita T, Ninomiya M, Acosta PH, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, **Okano H**, Sawamoto K: Subventricular-zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26: 6627-36, 2006.
20. Sakaguchi M, Shingo T, Shimazaki T, Okano HJ, Shiwa M, Ishibashi S, Oguro H, Ninomiya M, Kadoya T, Horie H, Shibuya A, Mizusawa H, Poirier F, Nakauchi H, Sawamoto K, **Okano H**: A carbohydrate

- binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7112-7, 2006.
21. Hara T, Nakamura K, Nakahara Y, Migishima R, Yokoyama M, **Okano H**, Mizushima N: Suppression of autophagy in neural cells causes a neurodegenerative disease. *Nature* 441: 885-9, 2006.
 22. Miyagi S, Nishimoto M, Saito T, Ninomiya M, Sawamoto K, **Okano H**, Muramatsu M, Oguro H, Iwama A, Okuda A: The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cell specific enhancer in the telencephalon. *J Biol Chem* 281:13374-81, 2006.
 23. Artaamangkul S, Torrecilla M, Kobayashi K, **Okano H**, Williams JT: Separation of Mu opioid receptor desensitization and internalization. *J Neurosci* 26:4118-25, 2006.
 24. Rawal N, Castelo-Branco G, Sousa KM, Kobayashi K, **Okano H**, Arenas E: Spatial and temporal expression dynamics of Wnt signaling components in the developing midbrain. *Exp Cell Res* 312:1626-36, 2006.
 25. Murata J, Tokunaga A, Okano H, Kubo T: Notch1 activation demonstrated in situ, during mouse cochlear development. *J Comp Neurol* 497:502-18, 2006.
 26. Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, **Okano H**: Transcription factor protein expression patterns by neural or neuronal progenitor cells of adult monkey subventricular zone. *Neuroscience* 139:1355-67, 2006.
 27. **Okano H**: Thoughts on the biomedical sciences in Japan and Australia. *Inflammation and Regeneration*. 26:16-7, 2006.
 28. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Martin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, **Okano H**, Alvarez-Buylla A: New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-31, 2006.
 29. Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Aoki M, Sobue G, Itoyama Y, **Okano H**: Disease progression of SOD1 (G93A) ALS model rats. *J Neurosci Res* 83: 119-33, 2006.
 30. Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Nakamura M, **Okano H**, Igarashi R: Lecithinized superoxide

- dismutase (PC-SOD) improved spinal cord injury-induced motor dysfunction through suppression of oxidative stress and enhancement of neurotrophic factor production. *J Control Release* 110:283-9, 2006.
31. Nagata H, Akiba Y, Suzuki H, **Okano H**, Hibi T: Expression of Musashi-1 in the rat stomach and changes during mucosal injury and reconstitution. *FEBS Lett* 580:27-33, 2006.
 32. Kanai R, Tomita H, Shinoda A, Takahashi M, Goldman SA, **Okano H**, Kawase T, Yazaki T: Enhanced therapeutic efficacy of G207 for the treatment of glioma through Musashi1 promoter retargeting of gamma 34.5-mediated virulence. *Gene Therapy* 13: 106-16, 2006.
 33. Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, **Okano H**: Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res* 83: 575-83, 2006.
 34. Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, **Okano H**, Ando K, Hotta T: Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 113:701-10, 2006.
 35. Nishimura T, Yamaguchi T, Tokunaga A, Hara A, Hamaguchi T, Kato K, Iwamatsu A, **Okano H**, Kaibuchi K: Role of Numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2. *Mol. Biol. Cell* 17:1273-85, 2006.
 36. Toriya M, Tokunaga A, Sawamoto K, Nakao K, **Okano H**: Distinct functions of human Numb isoforms revealed by misexpression in neural precursor cells in *Drosophila* larval brain. *Dev. Neurosci* 28:142-55, 2006.
 37. Sugiyama-Nakagiri Y, Akiyama M, Shibata S, **Okano H**, Shimizu H: Expression of RNA-binding protein Musashi in hair follicle development and hair cycle progression. *Am J Pathol* 168:80-92, 2006.
 38. Fukuhara Y, Li X-K, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, **Okano H**, Takahashi T, Okuyama T: Histopathological and behavioral improvement of murine Mucopolysaccharidosis type VII by

intra-cerebral transplantation of neural stem cells. *Molecular Therapy* 13: 548-55, 2006.

39. **Okano H**, Nakamura M, Toyama Y: Stem cell therapies for injured spinal cord. *Inflammation and Regeneration* 26:18-28, 2006.

40. **Okano H**, Kohyama J, Ohba H, Sakaguchi M, Tokunaga A, Shimazaki T, Okano HJ: Neural stem cells: Isolation and self-renewal. In *Tissue Stem Cells; Biology & Applications*. (Edited by Potten, Wilson, Clarke, Renehan, Marcel Dekker), Taylor & Francis Group, LLC, New York, pp. 55-70, 2006.

41. **Okano H**: Transplantation of neural

stem cells for spinal cord regeneration. In *Encyclopedic References of Neuroscience* (Edited by Binder D, Hirokawa N and Windhorst U) Springer-Verlag (Heidelberg, Germany), 2006

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

移植皮膚に対する骨髄由来表皮前駆細胞の役割検討

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 骨髄細胞が生体移植皮膚の生着・再生に寄与している可能性を検討した。その結果、骨髄由来表皮前駆細胞がマウス背部に移植した皮膚片内に著明に遊走し、細胞融合ではなく分化で角化細胞に分化していることを明らかにした。これらの結果は、移植皮膚片の再生に骨髄由来表皮前駆細胞が寄与している可能性を初めて明らかにしたものであり、植皮が唯一有効な治療法である先天性表皮水疱症に対する根治的治療法開発の礎になると期待する。

共同研究者

山崎尊彦、大鶴聰、菊池 康、金田安史（大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学）

白方裕司、橋本公二（愛媛大学大学院医学系研究科）

ウスを作成した。移植骨髄の生着を待つ（移植後6週間）、新生マウス（♀）皮膚を切除してGFP-BMTマウス背部皮膚に移植した。皮膚移植2週後に植皮部皮膚を生検し、GFP陽性表皮細胞の有無、およびFISH法による性染色体数およびその種類を検討した。

A. 研究目的

栄養障害型表皮水疱症の根治的治療法を確立することを目的として、生体皮膚移植片の生着・再生における骨髄由来細胞の寄与を検討した。

B. 研究方法

GFP遺伝子トランスジェニックマウス（♂）より骨髄を採取し、野生型同系マウス（♀）に移植してGFP-BMTマ

C. 研究結果

1) GFP陽性骨髄細胞を移植したGFP-BMTマウス背部に移植した新生マウス皮膚の再生過程で、骨髄由来GFP陽性表皮細胞が新生毛包内および再生表皮内に多数存在することが確認された。さらに、その性染色体の検討により、骨髄由来表皮細胞はXY即ち移植骨髄由来細胞由来であることが

明らかとなった。

D. 考察

今回我々は、世界で初めて骨髄由来表皮角化細胞が植皮片の再生に寄与していることを明らかにした。さらに、骨髄由来表皮角化細胞は、植皮片に本来存在している角化細胞と融合しているのではなく、未分化細胞から分化により形成されていることが示された。これらの結果は、従来極めてまれとされていた骨髄由来表皮細胞が、少なくとも植皮環境の中では極めて重要な役割を果たしていることを示唆していると考えられる。

栄養障害型表皮水疱症の治療法としては、自家皮膚移植が唯一有効な治療法として臨床現場で行われている。しかし、根治的治療を可能にするためには、植皮片内に欠損しているVII型コラーゲンを供給する必要がある。我々は、骨髄細胞由来表皮細胞がVII型コラーゲン産生能を有していることを既に確認している。これらの結果は、他家骨髄移植が栄養障害型表皮水疱症の根治的治療法に成り得る可能性を示唆すると共に、患者生体内よりこれらの細胞を単離し、VII型コラーゲン遺伝子を導入した後に再度移植することにより、自己造表皮幹細胞を利用した新たな幹細胞遺伝子治療法

の確立が可能になると期待される。

結論

自家植皮片内における骨髄由来表皮細胞の存在と、その細胞を利用した表皮水疱症の根治的治療法開発の可能性が初めて示された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表 (平成 18 年度)

論文発表

1. Kaneko T, Tamai K, Matsuzaki Y, Yamazaki T, Nakano H, Kon A, Hashimoto I, Hanada K, Kaneda Y, Uitto J. Interferon-gamma down-regulates expression of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene (BPAG1) in epidermal keratinocytes via novel chimeric sequences of ISRE and GAS. *Exp Dermatol.* 2006 Apr;15(4):308-14.
2. Nishikawa T, Nakagami H, Matsuki A, Maeda A, Yo CY, Harada T, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y. Development of High-Throughput Functional Screening of Therapeutic Genes, Using a Hemagglutinating Virus of Japan Envelope Vector. *Hum Gene Ther.* 2006 Mar 24;

- 17(4):470-5.
3. Kunugiza Y, Tomita N, Taniyama Y, Tomita T, Osako MK, Tamai K, Tanabe T, Kaneda Y, Yoshikawa H, Morishita R. Acceleration of wound healing by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase with Shima Jet. *Gene Ther.* 2006 Mar 30; 13(15):1143-52.
 4. Mima H, Yamamoto S, Ito M, Tomoshige R, Tabata Y, Tamai K, Kaneda Y. Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. *Mol Cancer Ther.* 2006 Apr;5(4):1021-8.
 5. Saito Y, Nakagami H, Morishita R, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. *Circulation.* 2006 Sep 12;114(11):1177-84. Epub 2006 Sep 4.
 6. Yasuoka E, Oshima K, Tamai K, Kubo T, Kaneda Y. Needleless intranasal administration of HVJ-E containing allergen attenuates experimental allergic rhinitis. *J Mol Med.* 2006 Oct 28; [Epub ahead of print]
 7. Iwata T, Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Tamai K, Tomita Y. Dominant dystrophic epidermolysis bullosa caused by a novel G2037R mutation and by a known G2028R mutation in the type VII collagen gene (COL7A1). *J Dermatol.* 2006 Aug;33(8):550-6.
 8. Umegaki N, Tamai K, Nakano H, Moritsugu R, Yamazaki T, Hanada K, Katayama I and Kaneda Y. Differential regulation of karyopherin alpha 2 expression by TGF- β_1 and IFN- γ in normal human epidermal keratinocytes: evident contribution of KPNA2 for nuclear translocation of IRF-1. *J Invest Dermatol.* 2007 Jan 25;
 9. Suvanasuthi S, Tamai K and Kaneda Y. Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using HVJ envelope vector. J

Gene Med. 2007 Jan;9(1):55-62.

10. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 9;354(2):453-8. Epub 2007 Jan 10.
11. Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, Harada T, Takaoka K, Kato H, Tamai K, and Kaneda Y. Comparative Roles of Twist-1 and Id-1 in Transcriptional Regulation by BMP Signaling. *J Cell Sci* in press

H. 的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 発明の名称：間葉系幹細胞誘導剤及び組織再生促進剤並びに間葉系幹細胞の調整方法、出願番号：特願 2006-77243、出願日：2006年3月20日
2. 発明の名称：骨髄間葉系幹細胞誘導因子とその同定・分離法、出願番号：特願 2006-293582、出願日：2006年10月30日
3. 発明の名称：間葉系幹細胞誘導剤及び組織再生促進剤並びに間葉系幹細胞の調整方法、出願番号：PCT/JP2006/315406、出願日：2006年8月3日

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

中毒性表皮壊死症(TEN)に対するシクロスポリン A(CsA)治療についての検討

分担研究者 相原雄幸 横浜市立大学附属市民総合医療センター

小児総合医療センター 準教授

研究要旨 中毒性表皮壊死症(TEN)に対する治療指針が現在研究班で作成されつつある。そのなかで、副腎皮質ステロイド薬の早期大量療法が推奨されてきている。しかしながら、ステロイド薬が有効でない症例も存在し、治療法の確立が望まれている。これまでいくつかの薬剤が TEN の治療に使用されている。そこで、今回 ciclosporin A(CsA)について文献的検討を行った。その結果、1989年の最初の報告以降これまでに12論文が報告されていた。症例報告が大部分であり、比較試験はなかった。皮疹の進行停止や再上皮化などが比較的早期になるなど有効性を示唆する報告があった。しかしながら、ステロイド薬との併用例も多く、有効性を評価するためには今後比較試験などの検討が必要である。

研究協力者

相原道子（横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科学、準教授）
伊藤玲子（横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター、診療医）

免疫グロブリン大量療法や血漿交換療法なども推奨されている。一方、その他の治療法として ciclosporin A(CsA)有用性についての報告も散見される。そこで、TEN 症例に対して CsA 治療を行なった論文報告について詳細な解析を行ない、CsA の有用性の有無を明らかにする。

A. 研究目的

中毒性表皮壊死症(TEN)に対する治療法は現在のところ確立されたものはない。今回の治療指針のなかでも副腎皮質ステロイド薬の早期の大量療法導入が推奨されている。しかしながら、ステロイド薬大量治療でも反応しない症例もある。他の治療法としては、

B. 研究方法

国内外の TEN と CsA 治療の論文報告を PubMed より検索した。すべての論文報告 12 編ならびに我々の論文(in press)からすべての CsA 治療例 27 症

例を抽出した。これらの症例について、性別、年齢、診断薬剤摂取歴や基礎疾患、臨床所見（皮膚・粘膜所見、合併症、検査値）、CsA 投与時期、投与量、投与経路、投与期間、効果、ステロイド薬治療の併用の有無および経過、後遺症などについて検討を行った。

C. 研究結果

1989 年の Renfro L らの報告以降これまでに TEN 症例に対して CsA を使用した論文は 12+1 編が報告されている（表 1）。欧米を中心に 9 カ国より報告があった。フランスからの報告はなかった。このうち一例は我々の症例で in press である。13 編中 1 編を除いて、少数例の検討であり、厳密な比較試験の報告はなかった。また、大部分は皮膚科医による報告であった。

表 1. 報告例

著者	雑誌	発行年	国	例数
1 Renfro L	Int J Derm	1989	米国	1
2 Hewitt J	Clin Exp Derm	1992	英国	3
3 Zeki I	Br J Derm	1995	英国	1
4 Sullivan JR	Aus J Derm	1996	オーストラリア	1
5 Jarrett P	Clin Exp Derm	1997	ニュージーランド	1
6 Jarrett P	Clin Exp Derm	1997	ニュージーランド	1
7 Szepietowski J	J Eur Acad Derm Vene	1997	ポーランド	3
8 Arevalo JM	J Trauma	2000	スペイン	11
9 Robak E	J Med	2001	ポーランド	1
10 Yung A	Aus J Derm	2002	ニュージーランド	1
11 Hashim N	Acta Derm Venereol	2004	英国	1
12 Paquet P	Arch Dermatol Res	2005	ベルギー	2
13 Aihara Y *	Pediatrics Inter	2007	日本	1

* in press

総症例数は 28 例で、一例は 2 回治療が実施されていた。症例の男女比は、7:20 と女性が多く、年齢は 8-82 歳で、平均 (mean±SD) は 38±17 歳で

あった。TEN による皮膚障害面積は体表面積の 66±24% (30-100%) であった。皮膚生検は 21 症例で実施されていた。患者の基礎疾患としては神経疾患 9 例、骨関節疾患 5 例、感染症 5 例、悪性腫瘍 1 例、その他 6 例であった。原因薬剤としては抗けいれん薬 8 例、非ステロイド性抗炎症薬 6 例、抗菌薬 4 例、その他 6 例、不明 2 例であった。（表 2）

表 2. 症例まとめ 1

1. 総症例数	27名 (1例は2回投与)		
2. 男女比	7:20		
3. 年齢	38 ± 17歳 (8-82歳)		
4. 皮膚障害面積	66 ± 24% (30-100%)		
5. 生検実施	21症例		
6. 基礎疾患		7. 原因薬剤	
基礎疾患	例数	原因薬剤	例数
神経疾患	9	抗けいれん薬	8
骨関節疾患	5	NSAIDs	6
感染症	5	抗菌薬	4
悪性腫瘍	1	痛風治療薬	2
その他	6	その他	6
不明	1	不明	2
	27		26

CsA 投与開始時期は皮疹出現後 5.3 ± 3.3 日で投与期間は 12.7 ± 4.2 日 (4-25 日) であった。投与方法は静注 8 例、経管 20 例であり、投与量はそれぞれ 1-5mg/kg/day 持続あるいは 2 回に分けて、あるいは 3-10mg/kg/day 分 2 内服投与が実施された。CsA のトラフ値の測定は 4 例で記載があり、100-500ng/ml と幅があった。