

治療を聴取し、視力との関連を検討した。

また、SJS の患者 57 名と健常日本人 160 名の末梢血より DNA を抽出し、JSNPs (Japanese Single Nucleotide Polymorphisms) に登録されている TLR3 の 7 つの SNPs を、ダイレクトシーケンス法にて解析した。

### C. 研究結果

発症年齢は 3-68 歳 (平均 27.5 歳)、罹患期間は 0-48 年 (平均 16.2 年) であり、66 例中 57 例 (86%) で発症前の薬剤投与があった。発症時の詳細を記憶していた 61 例中 49 例 (80%) で感冒様症状を伴い、32 例において発疹より眼充血が先行した。対象となった 132 眼の現在の視力は 0.1 未満が 71 眼、0.1-0.9 が 37 眼、1.0 以上が 24 眼であった。発症 1 週以内にステロイドの眼局所投与が行われた 19 例 38 眼中、視力 0.1 未満が 8 眼、視力 1.0 以上が 19 眼であったのに対して、投与されなかった 24 例 48 眼は 0.1 未満が 37 眼、1.0 以上は 0 眼であり、初期ステロイド投与群で有意に視力予後が良好であった (Mann-Whitney U test,  $P < 0.00001$ )。

検討した 7 つの SNPs のうち、エキソン 2 に存在する IMS-JST130849G/T ( $p=0.001$ , オッズ比 4.5) とエキソン 4 に存在する IMS-JST130843G/A ( $p=0.046$ , オッズ比 2.2) の 2 つについて、有意な差を認めた。

### D. 考察

SJS/TEN は発症時に結膜充血が発疹に先行することが多い。初期のステロイド眼局所投

与が視力予後に影響する。

発症と TLR3 遺伝子多型との間に有意な相関を認めたことより、自然免疫の異常が発症に関与している可能性が示唆された。

### E. 結論

結膜充血が先行あるいは同時に生じた SJS/TEN では、眼合併症が重篤化する可能性が高く、速やかに眼所見を検討せねばならない。早期より眼局所にステロイドを投与することが視力予後改善に有用である。発症には自然免疫異常が関与する可能性が高く、本症と自然免疫異常の関連を今後さらに検討する必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表 (平成 19 年度)

#### 論文発表

1. Ang LP, Sotozono C, Koizumi N, Suzuki T, Inatomi T, **Kinoshita S**. A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome. **Am J Ophthalmol**. 143(1):178-80, 2007.
2. 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** 2007; 143:367-8.
3. Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi

4. Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Tashiro K, Hamuro J, **Kinoshita S**. Toll like receptor 3 gene polymorphisms in Japanese patients with Stevens-Johnson syndrome. **Br J Ophthalmol**, 91(7):962-5, 2007.
5. Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Hamuro J, **Kinoshita S**. Association of IL4R polymorphisms with Stevens-Johnson syndrome. **J Allergy Clin Immunol**. 120(6):1457-9, 2007.

#### 学会発表

1. Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Hamuro J, **Kinoshita S**. Gene Expression Analysis of Monocytes Derived From the Patients of Stevens-johnson Syndrome With Ocular Complications. 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida,USA, 2007.5.6.
2. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Hibino S, Inatomi T, **Kinoshita S**. Acute Conjunctivitis as the Initial Symptom of

Stevens-Johnson Syndrome With Ocular Complications and the Consequence of Topical Steroids. 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida,USA, 2007.5.6.

3. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, **Kinoshita S**. Clinical Outcome of the Combination of Cultivated Autologous Oral Mucosal Epithelial Transplantation and Penetrating Keratoplasty 007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida,USA, 2007.5.6.
4. Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Tashiro K, Hamuro J, **Kinoshita S**. Toll like receptor 3 gene polymorphisms in Japanese patients with Stevens-Johnson syndrome. 13 th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, JAPAN, 2007. 7.10.

#### 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

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

カルバマゼピンによる薬剤性過敏症候群における 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 8 例及びカルバマゼピンの 2 ヶ月以上の内服歴があり薬疹を発症していない 10 例において HLA 血清タイピング、HLA-B locus の遺伝子タイピングを行った。HLA 血清タイピングでは A31、B51、B61 が、HLA-B locus 遺伝子タイピングでは B\*400201 がコントロール群、一般頻度と比較して高かった。一方、海外で報告のあるカルバマゼピンによる Stevens-Johnson 症候群 (SJS) に特異的とされる B\*1502 は検出されず、DIHS と SJS は異なる病態であるため関連する HLA も異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

カルバマゼピンは重症型薬疹の頻度が高い薬剤の 1 つであり、DIHS では最も高頻度に原因薬剤となる。近年、海外にて重症薬疹が HLA タイプと関連する場合があることが報告され、カルバマゼピンによる Stevens-Johnson 症候群 (SJS) では 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 DIHS と HLA-B 遺伝子座の関連を検討した。

B. 研究方法

対象は平成 14 年～平成 19 年の 6 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 8 例 (男性 3 例, 女性 5 例, 平均年齢 48.25 歳) と種々の基礎疾患のため 2 ヶ月以上のカルバマゼピンの内服歴があり、薬疹を発症していない対照患者 10 例 (男性 5 例, 女性 5 例, 平均年齢 53.1 歳) である。患者より同意を得た後に末梢血を採取し、Ficoill 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

DIHS 患者 8 例と対照患者 10 例の血清タイピング結果を表 1 に示す。DIHS 患者では

A31、B51、B61 が高頻度にみられた。また、HLA-B\*400201 が DIHS 患者で3名にみられたが、コントロール群ではみられなかった。(表 2)

#### D. 考察

カルバマゼピンによる SJS の発症と関連があると報告された HLA-B\*1502 は本研究で調査した DIHS 患者、コントロール群ではみられなかった。一方、DIHS 群では HLA-B\*400201 の頻度が高く、カルバマゼピンによる DIHS の発症に HLA-B 遺伝子座がかかわっていることを裏づける結果と思われる。しかし、今回の調査は小数例の検討であり、今後、多数の症例で検討する必要がある。

#### E. 結論

カルバマゼピンによる DIHS の発症には HLA 遺伝子座、特に HLA-B\*400201 が関係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 19 年度)

Morita E, Kohno K, Matsuo H: Food-dependent exercise anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 47: 109-117, 2007

Tsujino Y, Okamoto K, Morita E: Acetaminophen-induced urticaria without aspirin intolerance. *J Dermatol* 34:224-226, 2007

Saeki H, Iizuka H, Mori Y, Akasaka T, Takagi H, Kitajima Y, Oiso N, Kawada A, Tezuka T, Tanaka T, Hide M, Yamamoto S, Hirose Y, Kodama H, Urabe K, Furue M, Kasagi F, Morita E, Tsunemi Y, Tamaki K: Community validation of the U.K. diagnostic criteria for atopic dermatitis in Japanese elementary schoolchildren. *J Dermatol Sci* 47: 227-231, 2007

Tsujino Y, Kusatake K, Kaneko S, Yamamoto Y, Furumura M, Morita E: Fusion of single-photon emission computed tomography and computed tomography images of sentinel lymph nodes in extramammary Paget's disease of the scrotum. *J Dermatol* 34: 712-715, 2007

原田 晋, 飯島麻耶, 中村晶子, 吉崎仁胤, 松尾裕彰, 森田栄伸: グルテン CAP-RAST が陰性であった小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの 4 症例. *アレルギー* 56: 41-48, 2007

森田栄伸, 河野邦江, 松尾裕彰: FDEIA (food-dependent exercise-induced anaphylaxis) 抗グリアジン IgE 抗体の検出. *臨皮* 61: 52-55, 2007

赤木竜也, 森田栄伸: ペットから感染する皮膚疾患-真菌症. *MB Derma* 130: 23-27, 2007

森田栄伸: 病態から考える抗ヒスタミン薬の使い方 2) 蕁麻疹. *Prog Med* 27: 1787-1791, 2007

森田栄伸: 緊急処置が必要な蕁麻疹. *診断と治療* 95:1515-1522, 2007

千貫祐子, 新原寛之, 河野邦江, 森田栄伸 :  
食物依存性運動誘発アナフィラキシー.  
Visual Dermatology 6: 1136-1137, 2007  
森田栄伸 : 食物依存性運動誘発アナフィラ  
キシー 総合臨床 56: 1848-1851, 2007

**H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

表1 DIHS患者とコントロール患者のHLA血清タイピング

HLA タイピング	DIHS	コントロール群	一般頻度 (引用元 NCBI)
A2	0.375	0.400	0.293
A11	0.375	0.000	0.091
A24	0.500	0.900	0.231
A26	0.125	0.100	0.056
A31	0.625	0.200	0.072
A33	0.000	0.300	0.088
B 7	0.125	0.100	0.057
B35	0.000	0.100	0.075
B39	0.000	0.100	0.014
B44	0.000	0.100	0.075
B46	0.000	0.000	
B48	0.000	0.200	0.037
B51	0.500	0.200	0.101
B52	0.250	0.400	0.028
B54	0.000	0.200	0.036
B55	0.000	0.100	
B58	0.000	0.100	
B60	0.125	0.200	
B61	0.375	0.000	
B62	0.125	0.100	
B67	0.125	0.100	0.003
B75	0.125	0.000	

表 2 DIHS 患者と遺伝子とコントロール患者の HLA-B 遺伝子タイピング

HLA-B 遺伝子 タイピング	DIHS	コントロール 群	一般頻度 (引用元 NCBI)
15010101	0.000	0.100	0.066
151101	0.125	0.100	0.016
1507	0.125	0.000	0.003
350101	0.000	0.100	0.059
3904	0.000	0.100	
4001	0.125	0.200	0.045
440301	0.000	0.100	0.047
4601	0.125	0.000	0.039
4801	0.125	0.200	0.036
5201	0.125	0.000	0.028
5101	0.125	0.000	0.095
510101	0.375	0.200	0.095
520101	0.125	0.400	0.026
5401	0.000	0.200	0.036
5502	0.125	0.000	0.013
5801	0.000	0.100	0.061
670101	0.125	0.100	0.003
70201	0.125	0.100	

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

**Mycoplasma pneumoniae** による小児 Stevens-Johnson Syndrome 症例における  
血清サイトカインと水疱液中 **Mycoplasma** 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 准教授

**研究要旨** 中毒性表皮壊死症 (TEN) ならびに Stevens-Johnson syndrome (SJS) に対する治療指針が現在研究班で作成されつつある。一方、SJS の病因の一つとして感染症の関与が指摘され、なかでも **Mycoplasma pneumoniae** は主要な感染症の一つであることが知られている。そこで、今回我々は、最近経験した 3 例の **Mycoplasma pneumoniae** の関与した SJS 小児例について血中サイトカインについて検討した。さらに、水疱液中の **Mycoplasma pneumoniae** の存在の有無について PCR 法にて検討を行った。その結果、病初期には IL-6 などの炎症性サイトカインの上昇を認めステロイド剤などの治療による皮疹の改善とともにサイトカインは低下した。また、水疱液中の **Mycoplasma pneumoniae** は陰性であった。

**共同研究者**

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、准教授）

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）

**A. 研究目的**

Stevens-Johnson syndrome (SJS) の病因については明らかになっていない。しかしながら、これまで報告された SJS 症例の検討から感染症の関与が明らかにされている。その中でも特に、

**Mycoplasma pneumoniae** が小児 SJS 症例においては重要な位置を占めている。そこで、今回我々は、**Mycoplasma pneumoniae** による SJS の発症機序の解明のために最近経験した **Mycoplasma pneumoniae** が関与した小児 SJS の 3 症例における血中サイトカインの推移を検討する。さらに、SJS 症例の水疱液中の **Mycoplasma pneumoniae** の存在の有無が議論されているため PCR 法にてその存在の有無を明らかにする。



## B. 研究方法

平成16年から19年に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で入院加療したSJS小児例のうち、Mycoplasma pneumoniaeの関与が証明された3症例について検討した。患者保存血清を用い、Flow cytometryを用いた測定法によりサイトカン(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN-g, IL-10など)を経時的に測定した。さらに、急性期水疱液を用いてPCR法によりMycoplasma pneumoniae DNAの存在について検討した。

## C. 研究結果

3例のまとめを表1に示す。症例は3例とも男児(5,8,9歳)であり、3例とも、Mycoplasma pneumoniaeによる肺病変を伴っていた。また、3例とも血清Mycoplasma抗体の上昇(640~5120倍)を認め確定診断した。2例においては咽頭拭い液をPCR法を用いて検討しMycoplasma DNA陽性を確認した。

表1. 症例のまとめ

症例	年齢/性別	Mycoplasma 証明	肺病変	薬物の関与	治療	転帰
1	5/M	抗体価上昇 5120倍	+	なし	$\gamma$ -globulin 1g/kg, mPSL パルス	軽快
2	8/M	抗体価上昇, 610倍 咽頭拭い液 PCR 陽性	+	フルニゾール DLST 陽性	$\gamma$ -globulin 2g/kg, mPSL パルス	軽快
3	9/M	抗体価上昇, 5120倍 咽頭拭い液 PCR 陽性	+	なし	mPSL パルス	軽快

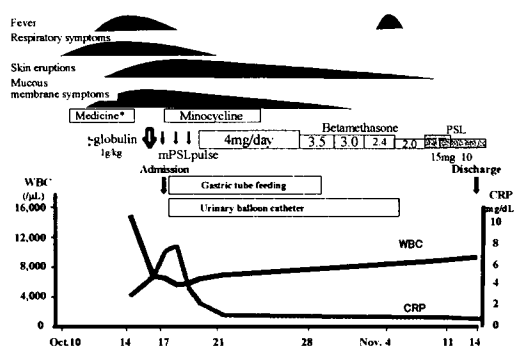


図1. 症例1の経過

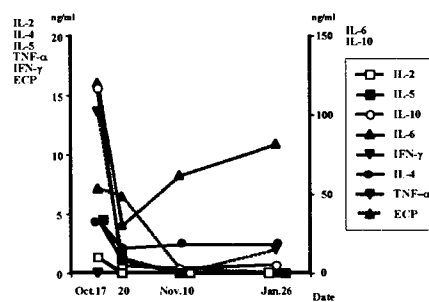


図2. 症例1の血清中サイトカインの推移

症例1についての経過ならびにサイトカインの経時的変化について図1, 図2に示す。病初期の急性期には炎症性サイトカンであるIL-6は高値であった。また、抑制性サイトカンであるIL-10も高値であり、その他、ECP, IFN-gも高値であり、治療に伴う皮疹

の改善とともに多くは正常化した。しかし、TNF-a や IL-2, IL-4 などは低値のままであった。

他の 2 例についても同様に検討し、IL-6, IL-8 は著明の増加、IL-10 も中等度の増加を認めた。また、症例 3 では IL-12 が著増していた。

さらに、水疱液について症例 2 と 3 について *Mycoplasma pneumoniae* DNA を PCR 法にて測定したが陰性であった。コントロールとして咽頭拭い液では PCR 法陽性であり、測定法に問題がない事を確認済みである。

#### D. 考察

これまで、SJS 症例ならびに TEN 症例について、血清中サイトカンについての検討を行ってきた。ステロイドなどの免疫抑制治療前ではすべての症例で炎症性サイトカンが高値である事が明らかにされた。また、治療に伴って正常化する事も確認された。また、水疱液中には *Mycoplasma* は存在しないことが明らかになった。

#### E. 結論

*Mycoplasma pneumoniae* の関与する小児 SJS 症例においては発症急性期に血清中で炎症性サイトカインと同時に抑制性サイトカインの濃度が上昇していた。従って、早期に抗炎症薬による治療を実施することの必要性が

裏付けられたと思われる。今後も症例数を増やして確認する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表（平成 19 年度）

##### 1. 論文発表

原著

1) Aihara Y, Ito R, Ito S, Takahashi S, Yokota S. Toxic epidermal necrolysis in a child successfully treated with cyclosporin A and methylprednisolone. **Pediatr Int.** 49:659-662,2007

2) Harada T, Machida H, Ito S, Aihara Y, Yokota S. Henoch-Schonlein purpura presenting duodenal involvement similar to superior mesenteric artery syndrome in a girl. **Eur J Pediatr.** 166:489-490,2007

3) Ito S, Okuyama K, Nakamura T, Tetanishi JI, Saito K, Matsumoto M, Fujimura Y, Aihara Y, Yokota S. Intravenous gamma globulin for thrombotic microangiopathy of unknown etiology. **Pediatr Nephrol.** 22:301-305,2007

4) Ito S, Machida H, Inaba A, Harada T, Okuyama K, Nakamura T, Aihara Y, Yokota S. Amelioration of steroids and cyclosporine-resistant nephrotic syndrome by pravastatin. **Pediatric Nephrol** 22:603-606, 2007

5) Ito S, Aihara Y, Yokota S. Intravenous gamma globulin for atypical hemolytic uremic syndrome. **Pediatr Nephrol.** 22:909,2007.

6) 伊藤玲子、奥典宏、真部哲治、横田俊平、相原雄幸 横浜市内幼稚園・保育園における食物アレルギーの実態 日本小児アレルギー学会誌 21:51-55,2007

#### 総論

1) 相原雄幸 食物依存性運動誘発アナフィラキシー アレルギー 56:451-456,2007

2) 相原雄幸 運動誘発アナフィラキシーの診断と治療 臨床スポーツ医学24 : 9-16,2007

3) 相原雄幸 ヘルペスウイルスの再活性化と薬物アレルギー  
Drug-induced hypersensitivity syndrome の概念と治療 化学療法の領域23 : 431-438,2007

4) 相原雄幸 即時型食物アレルギーの病態と疾患 小児内科 39 : 549-554,2007

#### 2. 学会発表

1) 相原雄幸 第58回日本アレルギー学会学術集会シンポジウム9 食物アレルギーの最近の動向 食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FEIA, FDEIA) の疫学と診断 2007.11.1 パシフィコ横浜

#### 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

損傷皮膚への骨髄由来表皮前駆細胞動員機構の検討

分担研究者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 准教授

**研究要旨** これまで我々は、骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) や骨髄由来表皮前駆細胞 (bone marrow-derived epithelial progenitor cell, BMEPC) が損傷皮膚に動員され、表皮再生に寄与していることを明らかにしてきた。平成 19 年度は、損傷皮膚より放出される MSC 動員因子の探索を進めた。

共同研究者

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 愛媛大学大学院医学系研究科  
再生医療研究センター

橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科  
感覚皮膚医学

**A. 研究目的**

重症薬疹により損傷した表皮組織や角膜上皮組織の再生を誘導するため、損傷皮膚から骨髄由来MSCを局所に動員する因子 (KOI<sup>2</sup>と命名) が放出されることを予想し、その探索を目的に研究を進めた。

**B. 研究方法**

1) 新生仔マウス皮膚抽出液を作製し、

骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 動員活性をボイデンチャンバー法により検討した。

2) 皮膚抽出液中の MSC 動員因子 (KOI<sup>2</sup>) を、カラムクロマトグラフィー法により精製した。

3) カラムクロマトグラフィーにより精製した KOI<sup>2</sup> 分画を SDS-PAGE により電気泳動し、銀染色により得られたバンドについて、質量分析 (LC-MS/MS) により蛋白同定を進めた。

**C. 研究結果**

1) 結果 1 : 新生仔マウス遊離皮膚片抽出液中に、MSC を動員する生体内生理活性物質 KOI<sup>2</sup> が存在することが、ボイデンチャンバー法により示された。

2) 結果 2 : カラムクロマトグラフィー

により、KOI<sup>2</sup>活性を含む分画の精製が可能となった。

3) 結果3 : LC-MS/MS による分析の結果、KOI<sup>2</sup>活性を持つ蛋白の少なくとも一つは既知の生体内蛋白であったが、損傷皮膚から極めて短時間(数分以内)に放出されること、骨髄由来 MSC の動員活性を持つことが今回の研究で初めて明らかとなった。

#### D. 考察

本研究により、重症薬疹などによって生じる皮膚の障害により、MSC を局所に動員する KOI<sup>2</sup> が損傷皮膚から放出され、損傷部位に MSC を動員して皮膚再生を促進している可能性が示唆された。KOI<sup>2</sup> 活性を医薬として利用することにより、重症型薬疹にともなう難治性皮膚潰瘍の新しい治療法の開発が可能になると期待される。さらに、皮膚における KOI<sup>2</sup> 放出メカニズムを明らかにすることにより、生体内における KOI<sup>2</sup> 放出を促進する新しい治療法の開発も可能になるかもしれない。

#### E 結論

損傷皮膚に骨髄由来 MSC を動員する因子 KOI<sup>2</sup> を探索し、その候補物質の単離に成功した。KOI<sup>2</sup> は既知の物質であったが骨髄由来 MSC 動員活性は知られておらず、この活性を利用した重症型薬疹の治療法開発が可能になるかもしれない。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表(平成19年度)

##### 1. 論文発表

1. 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- $\beta_1$  and IFN- $\gamma$  in normal human epidermal keratinocytes: evident contribution of KPNA2 for nuclear translocation of IRF-1. **J Invest Dermatol.** 2007, 127(6):1456-64.
2. 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, 9(1):55-62.
3. 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, 354(2):453-8.
4. 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** 2007, 120(Pt 8):1350-7.

5. Kawachi M, Tamai K, Saga K, Yamazaki T, Fujita H, Shimbo T, Kikuchi Y, Nimura K, Nishifuji K, Amagai M, Uitto J, Kaneda Y. Development of Tissue-Targeting Hemagglutinating Virus of Japan Envelope Vector for Successful Delivery of Therapeutic Gene to Mouse Skin. **Hum Gene Ther.** 2007, 18(10):881-94.
6. Hayashi H, Nakagami H, Takami Y, Sato N, Saito Y, Nishikawa T, Mori M, Koriyama H, Tamai K, Morishita R, Kaneda Y. Involvement of gamma-secretase in postnatal angiogenesis. **Biochem Biophys Res Commun.** 2007, 363(3):584-90.
7. Kikuchi Y, Tamai K, Kaneda Y. Cutaneous gene delivery. **J Dermatol Sci in press**
8. Nakano H, Toyomaki Y, Ohashi S, Nakano A, Jin H, Munakata T, Akita N, Tamai K, Mitsuhashi Y. Novel COL7A1 mutations in a Japanese family with transient bullous dermolysis of the newborn associated with pseudosyndactyly. **Br J Dermatol.** 2007, 157(1):179-82.
9. Mabuchi E, Umegaki N, Murota H, Nakamura T, Tamai K and Katayama I. Oral steroid improves bullous pemphigoid-like clinical manifestations in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa with COL17A1 mutation. **Br J Dermatol.** 2007 Sep;157(3):596-8.
10. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H and Kaneda Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. **Stem Cells** 2008, 26(1):223-34.
11. Saito Y, Nakagami H, Kurooka M, Takami Y, Kikuchi Y, Hayashi H, Nishikawa T, Tamai K, Morishita R, Azuma N, Sasajima T, Kaneda Y. Cold shock domain protein A represses angiogenesis and lymphangiogenesis via inhibition of serum response element. **Oncogene. in press**
12. Shimbo T, Kawachi M, Saga K, Fujita H, Yamazaki T, Tamai K, Kaneda Y. Development of a transferrin receptor-targeting HVJ-E vector. **Biochem Biophys Res Commun** 2007, 364(3):423-8.
13. Saga K, Tamai K, Kawachi M, Shimbo T, Fujita H, Yamazaki T and Kaneda Y. Functional modification of Sendai virus by siRNA. **J Biotech.** 2008, 133(3):386-94.
14. Nakajima K, Tamai K, Yamazaki T, Toyomaki Y, Nakano H, Uitto J, Sawamura D. Identification of Skn-1n, a Splice Variant Induced by High Calcium Concentration and

Specifically Expressed in Normal Human Keratinocytes. **J Invest Dermatol in press.**

July, 3<sup>rd</sup>, 2007, Seallte, WA, USA.

15. Yamamoto C, Tamai K, Nakano H, Matsuzaki Y, Kaneko T, Sawamura D. Vitamin D(3) inhibits expression of bullous pemphigoid antigen 1 through post-transcriptional mechanism without new protein synthesis. **J Dermatol Sci. 2008 in press**

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得: KOI2 の再生促進医薬としての用途について特許出願予定
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 2. 学会発表

1. 教育講演：水疱症の最先端；栄養障害型表皮水疱症、第 106 回日本皮膚科学会総会、2007 年 4 月 22 日、横浜
2. シンポジウム：骨髄由来末梢血間葉系幹細胞による組織再生誘導、第 25 回日本ヒト細胞学会、2007 年 8 月 3 日、東京
3. Invited lecture: Bone marrow stem cell therapy for epidermolysis bullosa. IVth international symposium of EB, September 27-29<sup>th</sup>, 2007, Santiago, Chile.
4. Invited lecture: Basal keratinocyte-targeting gene delivery system for in vivo EB gene therapy. IVth international symposium of EB, September 27-29<sup>th</sup>, 2007, Santiago, Chile.
5. Bone marrow is an essential source of keratinocytes in the grafted skin. 10<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy,

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

皮膚付属器を有する培養皮膚の作製

分担研究者 岸本治郎 資生堂ライフサイエンス研究センター 毛髪研究グループリーダー

**研究要旨** これまで上皮と真皮の相互作用に着眼点をおいた、細胞移植による毛包を始めとする皮膚付属器官の再生を目指した基盤研究を進めてきた。本年度は、低血清の線維芽細胞培養用培地の MHDFⅢ培地で培養したヒト毛乳頭細胞について、毛包誘導能の有無を移植実験で確認する検討を実施した。

MHDFⅢ培地に Wnt 経路の擬似活性化剤である BIO(GSK-3beta inhibitor 9)を添加して培養したヒト毛乳頭細胞に、マウスの上皮細胞を組み合わせるヌードマウスに細胞移植した結果、毛包の原基や完全な毛包の形成が観察された。BIOを添加しない場合には、毛包誘導は観察されなかった。これらの結果から、毛包誘導能を維持したヒト毛乳頭細胞の培養に、MHDFⅢ培地に BIO を添加した培養方法が有効であることが示唆された。

**A. 研究目的**

本研究の目的は術後のQOL向上を目指して、毛髪を始めとする皮膚付属器官を有する自己培養皮膚作製技術を確立することである。これまでに、マウス毛乳頭細胞とヒト上皮細胞をヌードマウス背部皮膚に細胞移植することで不完全ながらヒト様の形態と毛包特異的な分子マーカーを発現するキメラ毛包の再生を報告してきた。さらなる進化に向けて、誘導能を有するヒト毛乳頭細胞の培養法確立を目標に研究を進めてきた。今年度は、愛媛大より供給を受けた線維芽細胞培養用低血清培地で培養した、ヒト毛乳頭細胞の毛包誘導能について検討し

たので報告する。

**B. 研究方法**

1. ヒト毛乳頭細胞の単離 HAB 研究機構より倫理委員会の承認を得て供給された頭皮組織から、Tobin らの方法に準じて、毛包を単離し、次いで毛乳頭を実体顕微鏡下で単離した。
2. ヒト毛乳頭細胞の培養 35mm 培養シャーレ(non-collagen coated)中に単離した毛乳頭細胞を移し、MHDFⅢ培地中(基礎培地+10%FBS,抗生剤,最終濃度 human EGF 10ng/ml,basic FGF 2ng/ml)で1週間の静置培養を、線維



芽細胞の培養法に準じて実施した。その後、2-3日おきに培地を交換し、コンフルエントを目安にトリプシン処理で剥がし、細胞数が4倍となるよう播種して継代培養を行った。BIOは0.5mMの濃度で添加した。継代培養時にはコールターカウンターを用いて細胞数を計測し、倒立型顕微鏡で細胞形態の観察と写真撮影を行った。

3. チャンバー法による細胞移植 培養したヒトDP細胞 $1 \times 10^7$ 個に、新生仔マウス(C57BL/6)の表皮細胞を混合して、チャンバー法でヌードマウスの背部皮膚に細胞移植を行った。移植から4週間後に移植部位の皮膚を回収して組織標本を作製し、HE染色、Alu配列DNA in situ ハイブリダイゼーション法染色、p-カドヘリン抗体による免疫抗体染色法により、毛包誘導の有無を評価した。

## C. 研究結果

1. MHDF III培地で培養したヒト毛乳頭細胞による毛包誘導 MHDF III培地にBIOを加えて培養したヒト毛乳頭細胞 $1 \times 10^7$ 個に、新生仔マウスの表皮細胞を混合し、ヌードマウスの背部皮膚にチャンバー法で細胞移植を行った結果、移植部位のほぼ中央部の表皮の直下の異所的な場所において、毛包の形成が確認された(図1)。BIOを加えずに培養したヒト毛乳頭細胞を用いた場合には、いずれの場合も毛包誘導は認められなかつ

た。毛球部を持つほぼ完全な毛包以外に、毛包原基様の段階の毛包も存在していた(図2)。形成された毛包の大きさはマウス体毛の毛包と同程度であり、毛球部には上皮画分として用いたC57BL/6マウスに由来すると考えられるメラニン顆粒の存在が認められた。

## 2. ヒト毛乳頭細胞により誘導された毛包の特性評価

ヒトAlu配列特異的なDNAプローブを用いたin situ ハイブリダイゼーション法染色により、形成された表皮の一部において、Alu陽性のヒト毛乳頭細胞がその直下に存在し、表皮側がAlu陽性のヒト毛乳頭細胞を包込むような像が観察された(図2)。また、毛包原基様の毛包の下部にAlu陽性のヒト毛乳頭細胞が接するように存在し、ヒト毛乳頭細胞と上皮が相互作用していると考えられる像も観察され(図2)、その上皮側の基部は毛包原基や毛球部のマーカーであるp-カドヘリン陽性を示した(図3)。一方、形成された毛包の毛球部において、毛乳頭にはAlu陽性のヒト毛乳頭細胞は存在せず、ヒト細胞は毛包周囲の結合性毛根鞘と考えられる部位に存在していた(図4)。

## D. 考察

細胞移植によるヒト毛包の再構成、再生には、毛包誘導能を維持したヒト毛乳頭細胞の数を確保することが、必須の条件であると考えられている。毛乳頭細胞は増殖と

共に誘導能を消失することが知られており、細胞数の確保と誘導能の維持、これら二つの条件は相反するものと考えられている。これまでに、MDHFⅢ培地を用いることによりヒト毛乳頭細胞の初代培養および継代培養を効率的に行うことが可能であること、さらに BIO を加えることでパーシカンを始めとする毛乳頭のマーカー遺伝子の発現が高く維持されることを明らかにしてきた。今回、本培養方法で培養したヒト毛乳頭細胞に毛包誘導が確認されたことから、MDHFⅢ培地に BIO や Wnt リガンドなどの Wnt 経路の活性化因子を添加する培養方法の有用性が確かめられたものと考えられる。一方で、誘導された毛包の毛乳頭はマウスの細胞で占められており、ヒト細胞は毛包周囲の結合織性毛根鞘を形成している観察結果であったことから、あらかじめスフェロイド化したヒト培養毛乳頭細胞をマウスのフットパッドに移植するなど（サンドイッチ法）、チャンバー法とは異なる移植法で毛包誘導を調べる必要があると考えられる。

**E. 結論** MDHFⅢ培地に BIO を添加して培養することで、毛包誘導能を維持したヒト毛乳頭細胞が得られることは、非常に意義深いと考えられる。さらに検討を進め、ヒト毛乳頭細胞の誘導能が、どの程度の長期継代培養まで維持されるか検証する必要があると考えられる。また、結合織性毛根鞘細胞と毛乳頭細胞の関係についても、検

討が必要と考えられる。

#### **F. 健康危険情報**

なし。

#### **G. 研究発表（平成 19 年度）**

##### **論文発表**

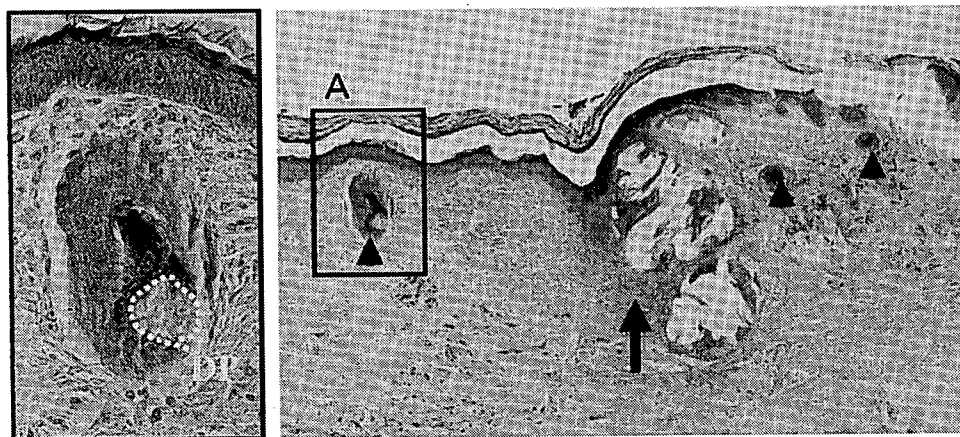
1. Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Iriyama S, Ideta R, Soma T, Yano K, Kawasaki C, Suzuki S, Shirakata Y, Hashimoto K, Kishimoto J. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. *J Invest Dermatol* 127:2106-2115, 2007

##### **学会発表**

1. 岸本 治郎, 白方裕司, 藤原重良, 相馬勤, 橋本公二: ヒト毛乳頭細胞の効率的な培養方法の確立. 第 32 回日本研究皮膚科学会年会, 2007 年 4 月 18 日, 横浜
2. Fujiwara S, Ishimatsu-Tsuji Y, Soma T, Kishimoto J: In vitro generation of human hair follicle bud oriented cellular mass composed of dermal papilla cells and keratinocytes. 5th International Congress of Hair Research, June 13, Vancouver, Canada

#### **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

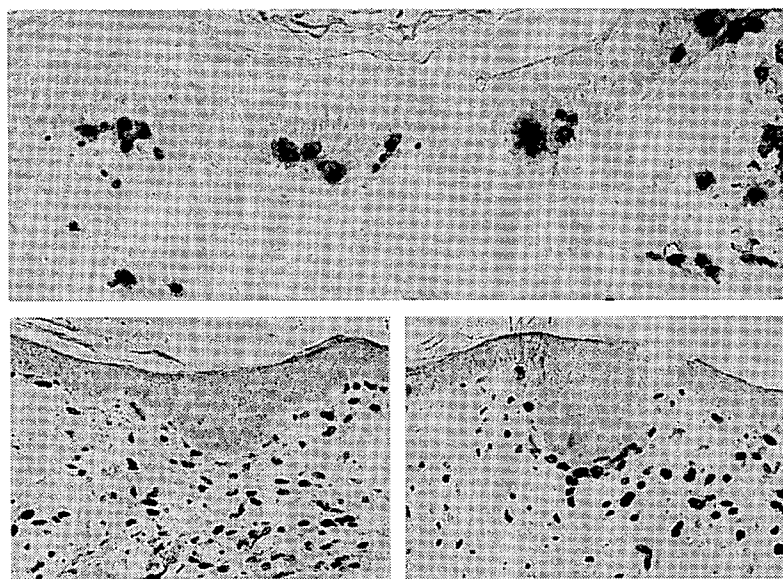


Aの拡大

矢尻: 誘導された毛包

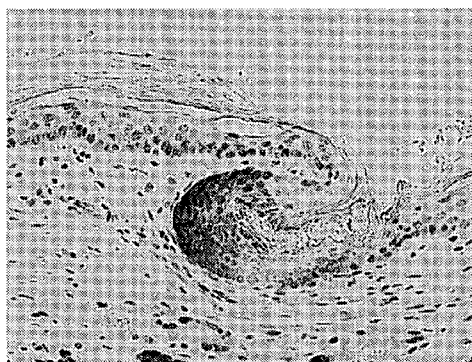
矢印: 移植部位の中央付近

図1: ヒト毛乳頭細胞の細胞移植による毛包誘導



茶色: Alu 陽性のヒト毛乳頭細胞

図2: 誘導された毛包におけるヒト毛乳頭細胞の分布

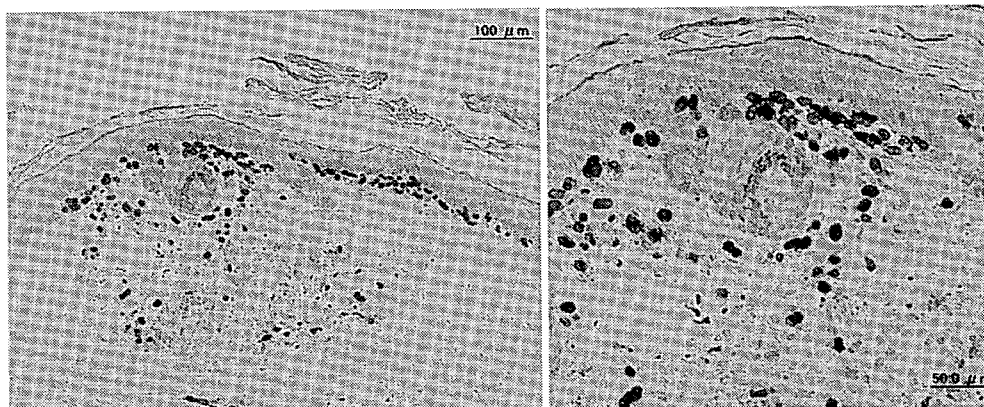


P-カドヘリン免疫染色



Alu DNA ISH染色(ヒト細胞)

図3:誘導された毛包原基でのP-カドヘリン発現



茶色:Alu 陽性のヒト毛乳頭細胞

図4:誘導された毛包の毛乳頭細胞の由来