

リポソームによるアトピー皮膚炎に対する分子治療法の開発

分担研究者 金田 安史 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

アトピー皮膚炎に対する治療法開発のため STAT 6 decoy を HVJ-liposome を用いて皮下注入したところ、アトピーマウスにおける症状、組織学的変化を有意に抑制した。これは肥満細胞における TNF- α や IL-6 などのサイトカインの分泌抑制によることがわかった。さらに HVJ-liposome の導入効率を飛躍的に高めるためにカチオン化ポリマーとの複合体形成に有効性を検討した。

A. 研究目的

アトピー皮膚炎に対する治療法を開発し、その機構を明らかにするとともに臨床応用の可能性を探る。

B. 研究方法

1) STAT6 の DNA 結合配列をもつデコイ型二重鎖核酸を合成し HVJ-liposome を用いてマウス皮膚組織に導入を行った。デコイとしては、5'-GAT CAA GAC CTT TTC CCA AGA AAT CTA T-3' と 3'-CTA GTT CTG GAA AAG GGT TCT TTA GAT A-5' をアニールした 28 mer の二重鎖とし、コントロールとして scramble decoy ODN, (5'-CGA AAA TTC GTT AAA TCA CTA GCT TAC C -3' と 3'-GCT TTT AAG CAA TTT AGT GAT CGA ATG G-5' をアニールした二重鎖) を用いた。HVJ-liposome は負電荷型のリポソームに不活性化した HVJ を融合することにより作成した。

2) 次に HVJ-liposome の導入効率を高めるために分子量 5,000 の低分子ゼラチンを ethylenediamine により架橋剤を用いて結合させカチオン化したポリマーを作成した。5 mg のカチオン化ゼラチンと 10 mg の脂質より成る HVJ-liposome を混合し、30 分間氷上でインキュベートし複合体を形成させた。ルシフェラーゼ遺伝子を含むリポソームを用いてこれらの複合体による細胞内導入を行い、ルシフェラーゼ活性の測定を行ってその遺伝子導入効率を評価した。最適化条件下で蛍光オリゴ核酸の導入も試みた。

C. 研究結果

1) HVJ-liposome にデコイを封入し皮下に注入した。蛍光ラベルのオリゴ核酸を導入したところ、表皮の下層部に瀰漫性に導入が見られた。抗 DNP-IgE 抗体を静脈注入したアトピーモデルマウスに STAT6 decoy を

皮下注入すると症状の1つである 24 時間後の耳朶腫脹を有意に抑制した。また骨格筋投与においても同様な抑制効果が得られた。皮膚組織学的検査において、STAT6 decoy によって浮腫、好中球や好酸球の浸潤を STAT6 decoy が著明に抑制したが、scramble decoy では効果がなかった。その機構の解明のために肥満細胞を培養して IgE 受容体の刺激後に STAT6 decoy を導入した。これによってヒスタミンの分泌は影響を受けなかったが、TNF- α や IL-6 の分泌が著明に抑制されたが、interferon- γ の分泌は抑制されなかった。

2) HVJ-liposome にカチオン化ゼラチン (CG) を結合させた複合体を培養 keratinocyte、血管内皮細胞にかけたところ、硫酸プロタミン (PS) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と反応させた複合体 (PS-CG-HVJ-liposome) が CG-HVJ-liposome 及び PS-HVJ-liposome の約 10 倍、HVJ-liposome の数百倍、遺伝子導入効率を増強できることがわかった。この遺伝子導入は PS-CG-HVJ-liposome を HVJ の融合蛋白の抗体と反応させることで完全に抑制されたが、エンドサイトーシスの阻害剤である Wortmannin を併用すると 40% の導入阻害が得られ、融合とエンドサイトーシスの両方の関与が示唆された。蛍光オリゴ核酸の導入も可能であった。さらにこれらの中で特に CG との複合体は、マウスの新鮮血清と 37 度でインキュベートしても遺伝子導入活性を 70% 以上維持できることが明らかになった。

D. 考察

STAT6 decoy は in vivo においても Th2 サイトカインの分泌抑制によってアトピー症状の改善を誘起している事が示唆された。今後は 1 回の投与での症状の抑制期間を検討する必要がある。また CG との複合体の生体組織での遺伝子導入効率について詳細な検討が今後必要であるが、アトピー治療のデリバリーシステムとして期待できる。

E. 結論

STAT6 decoy を封入した HVJ-liposome はアトピーの効果的な治療剤として有用であり、CG との複合体形成により遺伝子導入率が飛躍的に増強できること、血液中でのベクター安定化にも寄与できることがわかった。

F. 健康危険情報

特に有害な薬剤や作業は含まれなかった。

G. 研究発表 (平成 16 年度)

1. 論文発表

- 1) Kaneda, Y. and Tamai, K.: Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of intractable skin diseases. Arch. Dermatol. Res. 295, S63-66, 2003.
- 2) Ogushi I, Iimuro Y, Seki E, Son G, Hirano T, Hada T, Tsutsui H, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y., Fujimoto J. Nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure

- in a murine model. *Hepatology* 38, 335-344, 2003.
- 3) Wu, M-H, Yokozeki, H., Takagawa, S., Yamamoto, T., Satoh, T., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: Hepatocyte growth factor both prevents and ameliorates the symptoms of dermal sclerosis in a mouse model of scleroderma. *Gene Therapy*, 11, 170-180, 2004.
- 4) Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G., and Mekada, E.: Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J. Cell Biol.* 163, 469-475, 2003.
- 5) Shimamura, M., Sato, N., Taniyama, Y., Yamamoto, S., Endoh, M., Kurinami, H., Aoki, M., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R.: Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound. *Gene Therapy* 11, 1532-1539, 2004.
- 6) Hiraoka, K., Yamamoto, S., Otsuru, S., Nakai, S., Tamai, K., Morishita, R., Ogihara, T., and Kaneda, Y. Enhanced tumor-specific long-term immunity of HVJ-mediated DC-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunology*, 173, 4297-4307, 2004.
- 7) Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M-H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element "decoy" against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Therapy*, in press.
- 8) Takeda, S., Shiosaki, K., Kaneda, Y., Nakasatomi, T., Yoshizaki, H., Someya, K., Koono, Y., Eda, Y., Kino, Y., Yamamoto, N., and Honda, M.: Hemagglutinating virus of Japan protein is efficient for induction of CD4+ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine. *Clinical Immunology*, 112, 92-105, 2004.
2. 学会発表
- 1) 第102回日本皮膚科学会総会 教育講演 “遺伝子治療の現状と将来展望” 金田安史 (平成15年5月23日・浦安)
- 2) 第104回日本外科学会総会 基調講演 “遺伝子治療の現状と将来展望” 金田安史 (平成16年4月8日・大阪)
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
- 遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター (769385, オーストラリ

アで成立)

2. 実用新案登録

- 1) 所望の機能的性質を有する核酸の単離方法およびそのためのキット

2003年11月20日出願 PCT/JP03/14857

- 2) 脳機能改善のための医薬及び方法

2004年7月29日出願 特願 2004-2226

NDON 外用療法のプロトコール作成および新規核酸医薬の開発に関する研究

分担研究者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬治療の基礎的・臨床的研究を行う。炎症関連遺伝子を制御する転写因子 NFκB に注目し、NFκB の転写因子活性を阻害するおとり型二重鎖核酸医薬（NDON）の治療法としての可能性を詳細に検討した。同時に NDON のデリバリーシステムの改良・同様のアレルギー性疾患である気管支喘息への効果も明らかにし、NDON の抗アレルギー・抗炎症効果を幅広く確認した。

A. 研究目的

炎症関連遺伝子を制御する転写因子 NFκB に注目し、NFκB の転写因子活性を阻害するおとり型二重鎖核酸医薬（NDON）を用いたアトピー性皮膚炎の新しい治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、NDON の作用機序について詳細に検討する。また免疫抑制剤タクロリムス軟膏との効果比較を行った。デリバリーシステムについても検討した。さらにアレルギー性疾患である気管支喘息への効果も同時に検討した。

C. 研究結果

アトピー性皮膚炎モデルマウスを作成し、1.6%NF-κB デコイ軟膏群、タ

クロリムス軟膏、スクランブルデコイ（コントロール群）において比較検討した。HE 染色において 1.6%NF-κB デコイ軟膏は他の 2 つに比較して表皮肥厚が改善しており、トルイジン青染色において 1.6%NF-κB デコイ軟膏は他の 2 つに比べ肥満細胞数が有意に減少していた。また TUNEL 染色では 1.6%NF-κB デコイ軟膏は他の 2 つに比べアポトーシス細胞数が有意に増加。症状の有意な改善も認め、アトピー性皮膚炎の新しい治療法になりうることが示唆された。

さらに軟膏タイプのみならず、無針注射器であるシマジェットを用いた導入法は単に注射器による注入に比して焼く 100 倍の導入効率を示し（マーカー遺伝子発現による定量）、新たなデリバリーシステムになりうる可

能性が示唆された。

また、気管支喘息モデルにおいても、NFκB デコイ噴霧薬の吸入は好酸球の浸潤を阻害し、抗原暴露による気道抵抗の上昇を early phase・late phase とともに緩和できた。このように他のアレルギー性疾患にも NFκB デコイの有用性は示唆された。

D. 考察

アトピー性皮膚炎において NODN は表皮肥厚を改善させ、また炎症性細胞浸潤を促進する ICAM-1 の発現も減少させ、さらに種々のケモカインを放出する肥満細胞をアポトーシス誘導によって減少させることができる。その抗アレルギー作用・抗炎症作用は他疾患モデルにおいても示され、NODN のアトピー性皮膚炎への有用性は本研究により強く示唆されるものと考えられる。

E. 結論

NODN はケモカインを放出する肥満細胞死の誘導、炎症性細胞浸潤を促す ICAM-1 の発現抑制等により、モデル動物において有効性を示しており、またその効果はタクロリムス軟膏と同等以上であった。NFκB デコイの抗アレルギー作用・抗炎症作用は本研究において種々の疾患モデルで示されており、NODN はアトピー性皮膚炎の新しい有効な治療薬になりうると考えられた。

F. 健康危険情報

臨床研究において、NODN に起因すると考えられる重篤な有害事象は現在確認されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakashima H, Aoki M, Miyake T, Kawasaki T, Iwai M, Jo N, Oishi M, Kataoka K, Ohigi S, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of NFκB and ets transcription factors. *Circulation*: 2004; 109:132-138
- 2) Morishita R, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic Potential of Oligonucleotide-Based Therapy in Cardiovascular Disease. *Current Opinion* 2003; 17: 383-389
- 3) 森下竜一 皮膚関連疾患に対する遺伝子治療 日本皮膚科学会雑誌 2003年 113巻第13号:1940-1942
- 4) Tomita N, Ogihara T, Morishita R. Therapeutic potential of oligonucleotides strategy in cardiovascular diseases. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2003; September VOll No3: 463-470

- 5) 森下竜一 炎症や免疫を抑制する「おとり」医薬ゲノムからくすりへ 2003年,15-16
- 6) Tomita N, Morishita R, Tomita T, Ogihara T. Potential therapeutic applications of decoy oligonucleotides. *Current Opinion Mol Therapy*. 2002 Apr,4(2):166-70
- 7) Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, Aoki M, Hashiya N, Sakonjo H, Makino H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Inhibition of NFkappaB activation using cis-element 'decoy' of NFkappaB binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model, *Gene Therapy*. 2003 Feb10(4):356-64

2. 学会発表

- 1) Miyake T, Aoki M, Tanemoto K, Kawasaki T, Morishita R, 「Regression of Experimental Rabbit Aortic Aneurysm by the Treatment with Chimeric Decoy Oligodeoxynucleotides (ODN) Against ets and NFkB」 American Heart Association Scientific sessions 2004,2004年10月26日 (火) New Orleans, Louisiana
- 2) 梶座康夫、富田奈留也、富田哲也、谷山義明、小池弘美、森下竜一「シマジェットを用いたHGF遺伝子及びPGIS遺伝子導入による難治性潰瘍の治療」第8回 Molecular Cardiovascular Conference, 2004年9月3-5(金,土,日) 北海道
- 3) 梶座康夫、富田奈留也、富田哲也、谷山義明、小池弘美、大塚マリアナ今日美、森下竜一「シマジェットを用いたHGF及びPGIS遺伝子導入による難知性潰瘍の治療」第8回日本心血管内分泌代謝学会学術総会,2004年11月26日 (金) 宮崎
- 4) 森下竜一「遺伝子治療のアレルギー性皮膚疾患に対する新展開」第33回日本皮膚アレルギー学会総会・学術大会 2003年7月5日 東京
- 5) 森下竜一「Comparison of the ointment containing NFkB decoy oligodeoxynucleotides with tacrolimus hydrate: Rapid regression and no tachyphylaxis in the treatment of atopic dermatitis in NC/Nga atopic mice model」The Japan Society of Gene Therapy 2003年7月18日 京都
- 6) 森下竜一「皮膚関連疾患の遺伝子治療 from bench to bed」L.O皮膚科学研究会夏季プログラム 2003年8月30日東京

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
 - 1) 複数のノズル孔を有する針無注射器：特願 2003-131127
 - 2) 薬液が収容された針無注射器：特願 2003-131126
 - 3) 針無注射器を用いた皮膚疾患の遺伝子治療：特願 2003-307713
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表（雑誌）

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Mima H., Tomoshige R., Kanamori T., Tabata Y., Yamamoto S., Ito S., Tamai K. , Kaneda Y.	Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector.	J Gene Med	Epub		2005
Ito M., Yamamoto S., Nimura K., Hiraoka K., Tamai K. , Kaneda Y.	Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin.	J Gene Med	Epub		2005
Odanagi M., Kikuchi Y., Yamazaki T., Kaneko T., Nakano H., Tamai K. , Vitto J., Hanada K.	Transcriptional regulation of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene expression by interferon regulatory factor 1 and interferon regulatory factor 2 in normal human epidermal keratinocytes.	Exp Dermatol	13(12)	773-779	2004
Umegaki N., Moritsugu R., Katoh S., Harada K., Nakano H., Tamai K. , Hanada K., Tanaka M.	Photodynamic therapy may be useful in debulking cutaneous lymphoma prior to radiotherapy.	Clin Exp Dermatol	29(1)	42-45	2004
Matsuki A., Yamamoto S., Nakagami H., Aoki M., Tamai K. , Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R.	No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice.	Biochem Biophys Res Commun	315(1)	59-65	2004
Hiraoka K., Yamamoto S., Otsuru S., Nakai S., Tamai K. , Morishita R., Ogihara T., Kaneda Y.	Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides.	J Immunol	173(7)	4297-4307	2004

Oshima K., Shimamura M., Mizuno S., <u>Tamai K.</u> , Doi K., Morishita R., Nakamura T., Kubo T., Kaneda Y.	Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats.	FASEB J	18(1)	212-214	2003
<u>Tamai K.</u> , Hashimoto I., Hanada K., Ikeda S., Imamura S., Ogawa H.	Japanese Study Group for Rare Intractable Skin Diseases. Japanese guidelines for diagnosis and treatment of junctional and dystrophic epidermolysis bullosa.	Arch Dermatol Res	295	S24-8	2003
Kaneko T., <u>Tamai K.</u> , Yamazaki T., Harada K., Nakano H., Hanada K.	Superficial granulomatous pyoderma a case report of two Japanese patients and clinical comparison with foreign patients.	J Dermatol	30(6)	472-476	2003
Kaneda Y., <u>Tamai K.</u>	Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of intractable skin diseases.	Arch Dermatol Res	295	S63-6	2003
Shirakata Y., <u>Tamai K.</u> , Nakaoka H, Tokumaru S., Sayama K., Murakami S., Hashimoto K.	Severe palmo-plantar hyperkeratosis in Koebner epidermolysis bullosa simplex.	J Dermatol	30	135-140	2003
Matsuzaki Y., <u>Tamai K.</u> , 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	120	308-312	2003

Nakamura H., Aoki M., Tamai K. , Oishi M., Ogiwara T., Kaneda Y. and Morishita R.	Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligonucleotides in NC/Nga atopic mouse model.	Gene Therapy	9	1221-1229	2002
Meng X., Sawamura D., Ina S., Tamai K. , Hanada K., Hashimoto I.	Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin.	Exp Dermatol	11	456-461	2002
玉井克人 , 金田安史, 中邨弘重, 森下竜一, 花田勝美, 板見智, 片山一郎	核酸医薬外用剤のアトピー性皮膚炎への臨床応用	アレルギー・免疫	11	1084-1088	2004
玉井克人 , 金田安史, 中邨弘重, 青木元邦, 森下竜一, 片山一郎, 花田勝美	重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬治療: 転写因子NF-kBを標的としたデコイDNA軟膏の臨床応用	医学のあゆみ	210	101-104	2004
玉井克人	遺伝子治療の現状: おとり型核酸医薬など、特集・最近のトピックス 2004	臨床皮膚科	58	171-174	2004
玉井克人	遺伝子治療、特集・皮膚病の最新治療	研究・診断、毎日ライフ	10	60-63	2003

玉井克人	アトピー性皮膚炎の遺伝子治療、新しい治療のABC16	免疫3、アトピー性皮膚炎、最新医学別冊			2003
玉井克人	新規アトピー性皮膚炎治療薬の開発：転写因子NFκBを標的としたODNの臨床応用	アレルギーの臨床	23	196-201	2003
玉井克人、森下竜一、中邨弘重、金田安史、花田勝美	アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬導入による新しい治療法	アレルギー・免疫	10	350-356	2003
Hanakawa Y., Shirakata Y., Nagai H., Yahata Y., Tokumaru S., Yamasaki K., Tohyama M., Sayama K., <u>Hashimoto K.</u>	Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes.	Br J Dermatol.			in press
Ishii K., Harada R., Matsuo I., Shirakata Y., <u>Hashimoto K.</u> , Amagai M.	In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris.	J Invest Dermatol.			in press
Tokumaru S., Sayama K., Yamasaki K., Shirakata Y., Hanakawa Y., Yahata Y., Dai X., Tohyama M., Yang L., Yoshimura A., <u>Hashimoto K.</u>	SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration.	Biochem Biophys Res Commun.	327	100-105	2005

Dai X., Yamasaki K., Shirakata Y., Sayama K., Hashimoto K.	All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes.	J Invest Dermatol.	123	1078-1085	2004
Shirakata Y., Ueno H., Hanakawa Y., Kameda K., Yamasaki K., Tokumaru S., Yahata Y., Tohyama M., Sayama K., Hashimoto K.	TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by 1alpha,25(OH)2vitamin D3.	J Dermatol Sci.	36	41-50	2004
Niiya H., Azuma T., Jin L., Uchida N., Inoue A., Hasegawa H., Fujita S., Tohyama M., Hashimoto K. , Yasukawa M.	Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells.	J Gen Virol.	85	2639-2642	2004
Kohno S., Nakagawa K., Hamada K., Harada H., Yamasaki K., Hashimoto K. , Tagawa M., Nagato S., Furukawa K., Ohnishi T.	Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for malignant glioma therapy.	Oncol Rep.	12	73-78	2004
Dai X., Yamasaki K., Yang L., Sayama K., Shirakata Y., Tokumaru S., Yahata Y., Tohyama M., Hashimoto K.	Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation.	J Invest Dermatol.	122	1356-1364	2004
Hashimoto K. , Yasukawa M., Tohyama M.	Human herpesvirus 6 and drug allergy.	Curr Opin Allergy Clin Immunol	3	255-260	2003

Nanba D., Mammoto A., <u>Hashimoto K.</u> Higashiyama S.	Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF.	J Cell Biol	163	489-502	2003
Iwamoto R., Yamazaki S., Asakura M., Takashima S., Hasuwa H., Miyado K., Adachi S., Kitakaze M., <u>Hashimoto K.</u> , Raab G., Nanba D., Higashiyama S., Hori M., Klagsbrun M., Mekada E.	Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function.	Proc Natl Acad Sci USA	100	3221-3226	2003
Yahata Y., Shirakata Y., Tokumaru S., Yamasaki K., Sayama K., Hanakawa Y., Detmar M., <u>Hashimoto K.</u>	Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for VEGF-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation.	J Biol Chem	278	40026-40031	2003
Nakamura Y., Fukami K., Yu H., Takenaka K., Kataoka Y., Shirakata Y., Nishikawa S.I., <u>Hashimoto K.</u> , Yoshida N., Takenawa T.	Phospholipase Cdelta(1) is required for skin stem cell lineage commitment.	EMBO J	22	2981-2991	2003
Masaki T., Fukunaga A., Tohyama M., Koda Y., Okuda S., Maeda N., Kanda F., Yasukawa M., <u>Hashimoto K.</u> , Horikawa T., Ueda M.	Human herpes virus 6 encephalitis in allopurinol-induced hypersensitivity syndrome.	Acta Derm Venereol	83	128-131	2003
Midorikawa K., Ouhara K., Komatsuzawa H., Kawai T., Yamada S., Fujiwara T., Yamazaki K., Sayama K., Taubman M.A., Kurihara H., <u>Hashimoto K.</u> , Sugai M.	Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes.	Infect Immun	71	3730-3739	2003

Shibata R., Kai H., Seki Y., Kato S., Wada Y., Hanakawa Y., Hashimoto K. , Yoshimura A., Imaizumi T.	Inhibition of STAT3 prevents neointima formation by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of neointimal smooth muscle cells.	Hum Gene Ther	14	601-610	2003
Yamasaki K., Hanakawa Y., Tokumaru S., Shirakata Y., Sayama K., Hanada T., Yoshimura A., Hashimoto K.	SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes.	J Invest Dermatol	120	571-580	2003
Yamasaki K., Toriu N., Hanakawa Y., Shirakata Y., Sayama K., Takayanagi A., Ohtsubo M., Gamou S., Shimizu N., Fujii M., Miyazono K., Hashimoto K.	Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor β autoinduction: A negative feedback mechanism for keratinocyte growth.	J Invest Dermatol	120	1030-1037	2003
Hamada K., Kohno S., Iwamoto M., Yokota H., Okada M., Tagawa M., Hirose S., Yamasaki K., Shirakata Y., Hashimoto K. , Ito M.	Identification of the Human IAL3B Promoter Element and Its Use in the Construction of a Replication-selective Adenovirus for Ovarian Cancer Therapy.	Cancer Res	63	2506-2512	2003
Yanai F., Ishii E., Kojima K., Hasegawa A., Azuma T., Hirose S., Suga N., Mitsudome A., Zaitu M., Ishida Y., Shirakata Y., Sayama K., Hashimoto K. , Yasukawa M.	Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells.	J Immunol	170	2205-2213	2003
Shirakata Y., Tamai K., Nakaoka H., Tokumaru S., Sayama K., Murakami S., Hashimoto K.	Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex.	J Dermatol	30	135-140	2003

Wada T., Shirakata Y., Takahashi H., Murakami S., Iizuka H., Suzuki H., Hashimoto K.	A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation.	Br J Dermatol	149	185-188	2003
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	32	209-215	2003
Sayama K., Yamasaki K., Hanakawa Y., Shirakata Y., Tokumaru S., Ijuin T., Takenawa T., Hashimoto K.	Phosphatidyl inositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes.	J Biol Chem	277	40390-40396	2002
Hanakawa Y., Amagai M., Shirakata Y., Yahata Y., Tokumaru S., Yamasaki K., Tohyama M., Sayama K., Hashimoto K.	Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation.	J Invest Dermatol	119	1231-1236	2002
Hattori N., Komine M., Yano S., Kaneko T., Hanakawa Y., Hashimoto K. , Tamaki K.	Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins.	J Invest Dermatol	119	403-410	2002
Kobayashi M., Amagai M., Kuroda-Kinoshita K., Hashimoto T., Shirakata Y., Hashimoto K. , Nishikawa T.	BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid.	J Dermatol Sci	30	224-232	2002

藤山幹子、橋本公二	薬剤誘発性過敏症症候群	medicina	40	997-999	2003
藤山幹子、橋本公二	drug-induced hypersensitivity syndromeとHHV-6	臨床免疫	40	219-221	2003
橋本公二	DIHSの経緯と診断基準	医学のあゆみ	205	951-954	2003
橋本公二	DIHSとはなにか	アレルギー・免疫	10	811-815	2003
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
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	381-386	2003

橋本公二	上皮再生の現状と新たな展望	medical science digest	28	554-556	2002
Shimamura M., Sato N., Taniyama Y., Yamamoto S., Endoh M., Kurinami H., Aoki M., Ogihara T., Kaneda Y. , and Morishita R.	Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound.	Gene Therapy	11	1532-1539	2004
Hiraoka K., Yamamoto S., Otsuru S., Nakai, S., Tamai K., Morishita R., Ogihara T., and Kaneda Y.	Enhanced tumor-specific long-term immunity of HVJ-mediated DC-tumor fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides.	J. Immunology	173	4297-4307	2004
Sumi K., Yokozeki H., Wu M-H., Satoh T., Kaneda Y. , Takeda K., Akira S., and Nishioka K.	In vivo transfection of a cis element "decoy" against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity.	Gene Therapy			in press
Takeda S., Shiosaki K., Kaneda Y. , Nakasatomi T., Yoshizaki H., Someya K., Koono Y., Eda Y., Kino Y., Yamamoto N., and Honda M.	Hemagglutinating virus of Japan protein is efficient for induction of CD4+ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine.	Clinical Immunology	112	92-105	2004
Wu M-H, Yokozeki H., Takagawa S., Yamamoto T., Satoh T., Kaneda Y. , and Nishioka K.	Hepatocyte growth factor both prevents and ameliorates the symptoms of dermal sclerosis in a mouse model of scleroderma.	Gene Therapy	11	170-180	2004

Kaneda Y. and Tamai K.	Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of intractable skin diseases.	Arch. Dermatol. Res.	295	S63-66	2003
Ogushi I, Iimuro Y, Seki E, Son G, Hirano T, Hada T, Tsutsui H, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y. , Fujimoto J.	Nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure in a murine model.	Hepatology	38	335-344	2003
Yamazaki S., Iwamoto R., Saeki, K., Asakura M., Takashima S., Yamazaki A., Kimura R., Mizushima H., Morib, H., Higashiyama S., Endoh M., Kaneda Y. , Takagi S., Itami S., Takeda N., Yamada G., and Mekada E.	Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities.	J. Cell Biol.	163	469-475	2003
Nakamura H., Morishita R., and Kaneda Y.	Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys.	In Vivo	16	45-48	2002
Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Aoki, M., Yamamoto S., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y. , and Morishita R.	Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound; enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle.	Gene Therapy	9	372-380	2002
Kaneda Y. , Nakajima T., Nishikawa T., Yamamoto S., Ikegami H., Suzuki N., Nakamura H., Morishita R., and Kotani H.	HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector as a versatile gene delivery system.	Molecular Therapy	6	219-226	2002

Endoh M., Koibuchi N., Sato M., Morishita R., Kanzaki T., Murata Y. and <u>Kaneda Y.</u>	Fetal gene transfer by intra-uterine injection with microbubble-enhanced ultrasound.	Molecular Therapy	5	501-508	2002
Nakamura H., Aoki M., Tamai K., Oishi M., Ogihara T., <u>Kaneda Y.</u> , and Morishita R.	Prevention and regeneration of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligonucleotides in NC/Nga atopic mouse model.	Gene Therapy	9	1221-1229	2002
Nakashima H, Aoki M, Miyake T, Kawasaki T, Iwai M, Jo N, Oishi M, Kataoka K, Ohgi S, Ogihara T, Kaneda Y, <u>Morishita R.</u>	Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor kappaB and ets transcription factors.	Circulation	109(1)	132-138	2004
<u>Morishita R.</u> , Tomita N, Kaneda Y, Ogihara T.	Molecular therapy to inhibit NFkappaB activation by transcription factor decoy oligonucleotides.	Current Opinion Pharmacol	4(2)	139-146	2004
Yamasaki K., Asai T., Shimizu M., Aoki M., Hashiya N., Sakonjo H., Makino H., Kaneda Y., Ogihara T., <u>Morishita R.</u>	Inhibition of NFkB activation using cis-element 'decoy' of NFkb binding site reduces neointimal formation in porcine ballon injured coronary artery model.	Gene Therapy	110(4)	356-364	2003
Tomita N., Ogihara T., <u>Morishita M.</u>	Therapeutic potential of oligonucleotides strategy in cardiovascular diseases.	Expert Review of Cardiovascular Therapy	1(3)	463-470	2003