

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センター 主任研究員

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、ヒト毛乳頭細胞の培養法の培地の検討を進め、低血清の線維芽細胞培養用培地 modified alpha MEM 培地は DMEM 培地と比べ、1/10 量の血清で同等の増殖能を維持することができ、さらに同条件では有意に増殖速度を促進することを見出した。この効果は modified alpha MEM 培地に含まれる EGF に特に強く依存していることが判った。これらの結果から、ヒト毛乳頭細胞の効率的培養に modified alpha MEM 培地が利用可能であることを示唆するものと考えられた。

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は誘導能を有するヒト毛乳頭細胞の培養法確立が不可欠と考えられた。そこで、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のヒト毛乳頭細胞の増殖能と遺伝子発現に及ぼす影響に

ついて主に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 培養シャーレ中に単離した毛乳頭細胞を移し (non-collagen coated)、DMEM 培地 (10%FBS, 抗生剤入り)あるいは完全 modified alpha MEM 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週間静置培養を線維芽細胞の培養法に従って行った。その後、2-3日おきに培地を交換し、継代は80%コンフルエントを目安にトリプシン処理で剥がして行った。また発毛誘導因子の遺伝子発現量を単層培養と比較する目的で、スフェロイドを作製し、96Wellプレート中に5000個/wellの密度で播種し、2日間培養を行った。

3. 増殖能の測定 ヒト毛乳頭細胞 (75cm² Flask 中で80%コンフルエントまで前培養した継代2代目の細胞) を、24穴プレートに1×10⁴ cells/wellの細胞数で播種した。PBS1mlで1回洗浄後、0.25% trypsin 100ulを添加して37℃、30秒間処理し、細胞が剥離しているのを確認し、DMEM 10% FBS 900ulを添加したコールターカウンターのカップに培地3mlを分注し、細胞懸濁液を全量移し、コールターカウンターで測定した。
4. 発毛誘導因子の発現の検討 方法：ヒトDP培養細胞を2.と同様に6well plateに播種し、48時間培養後DPからtotal RNAを抽出してRT-PCR後、ライトサイクラー(ロシュ製)により内部標準の28S RNA及びLEF-1、versicanの各因子のプライマーでPCRを行い、各プライマーの検量線から発現量を定量した。

C. 研究結果

1. modified alpha MEM 培地のヒト毛乳頭細胞の増殖に及ぼす影響 完全MDHFIII培地(10%FBS)は3倍量のFBS(30%FBS)を添加したDMEM培地中で初代培養した場合に比べ、大幅に増殖速度が早く、生着率も有意に向上した。完全modified alpha MEM培地は同じ添加血清濃度(10%FBS)で有意にヒトDP細胞の増殖能を促進した。添加した増殖因子(1%FBS, +10ng/ml human EGF, +2ng/ml basic FGF)の影響を見たところ、この促進効果はEGFに依存しており、bFGFの添加の有無では大きな変化は認められなかった。次にこの促進効果が単にEGFの増殖因子の添加によるものか、基礎培地による差があるかを確認したところ、この増殖因子添加はDMEM培地に比べ、modified alpha MEM培地で特に顕著な効果が認められた。また、通常DMEM基礎培地では10%のFBSを必要とするところを1/10量の1%で同等の効果が得られることが判明した。
2. modified alpha MEM 培地の発毛誘導因子に与える影響 発毛初期に毛乳頭細胞で誘導されてくることがよく知られている転写因子のLEF-1、及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるバーシカンの発現に及ぼすmodified alpha MEM培地の影響を調べたところ、スフェロイド培養でLEF-1、バーシカンいずれも発現を亢進し、特にLEF-1は統計的に有意に亢進した。平板(単層)培養ではLEF-1は変化なし、バーシカンはむしろ減少していた。

D. 考察

ヒト毛包の細胞移植による再構成、再生にはヒト毛乳頭細胞の充分量の細胞数の確保と誘導能の維持、が必須条件と考えられているが、増殖と共に誘導能が消失することが一般に知られていて、これら二つの条件は相反するものと考えられている。マウスと異なり、ヒト毛乳頭細胞は通常、メカニカルな方法で単離され、1週間以上、アウトグロースを待たなければいけない。さらに、ヒト毛乳頭細胞は通常の皮膚真皮線維芽細胞と比較して、ダブリングタイムが極端に長く、なかなか細胞が増えないことが難点とされていたが、本培地の使用により、短時間でかつ長期の培養の可能性が期待される。また LEF-1 及びバーシカンの発現が modified alpha MEM 培地中で亢進することから誘導能の維持にも効果があることが期待される。スフェロイドと単層培養で発現に差が見られるが、細胞数の確保には単層培養を行ない、誘導能を保持させるために移植前にスフェロイドを形成させる、という方法も考えられる。また、一般にヒト DP の増殖促進に効果があるといわれている FGF と比べ、本培地では EGF により効果が大きいことが判った。ヒト毛乳頭細胞への特異的作用として興味深い。

E. 結論 modified alpha MEM 培地を用いることで、従来と比べ、短期間でかつ高い誘導能の維持が期待されるヒト毛乳頭細胞が得られることの意義は高いと予想される。

さらに検討を進め、実際に modified alpha MEM 培地により、どの程度、誘導能が維持されるか、ヌードマウスへの移植実験を通じてさらに検証を進める必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成 17 年度）

1. 論文発表

1. Ishimatsu-Tsuji Y., Moro O., Kishimoto J. Expression profiling and cellular localization of genes associated with the hair cycle induced by wax depilation. **J. Invest. Dermatol.** 125:410-420, 2005
2. Soma T, Tajima M, Kishimoto J. Hair cycle-specific expression of versican in human hair follicles. **J Dermatol Sci.** 39:147-154. 2005
3. Soma T, Iino M, Tajima M, Kishimoto J. Expression of novel keratin associated protein 5 genes in the cuticle layer of human hair follicles. **J Dermatol Sci.** 38:110-112. 2005

2. 学会発表

1. 辻弓子、相馬勤、江浜律子、白方裕司、橋本公二、鈴木聡、岸本 治郎：細胞移植によるヒト様再生毛包の解析。第 4 回再生医療学会総会 2005 年 3 月 1-2 日大阪

2. 岸本 治郎、辻弓子、相馬勤、江浜律子、白方裕司、橋本公二、鈴木聡：細胞移植によるヒト様再生毛包の機能解析. 第30回日本研究皮膚科学会年会 2005年4月20日 横浜

3. Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Soma T, Shirakata Y, Hashimoto K, Suzuki S, Kishimoto J: Characterization of human hair generated by cellular grafting. 66rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May. 4 - 7, 2005, St.Louis, USA

4. Soma T, Ehama R, Kishimoto J: Microarray analysis of hair inductive signals from dermal papilla cells. 66rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May. 4 - 7, 2005, St.Louis, USA

5. Ishimatsu-Tsuji Y, Moro O, Kishimoto J: Expression profiling and localization of genes associated with hair cycle induced by wax depilation. 66rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology

May. 4 - 7, 2005, St.Louis, USA

3. 講演・シンポジスト

1. 岸本治郎：細胞移植によるヒト毛髪再生の可能性：上皮-真皮の相互作用 「国立遺伝学研究所集會セミナー」 2005年2月 三島

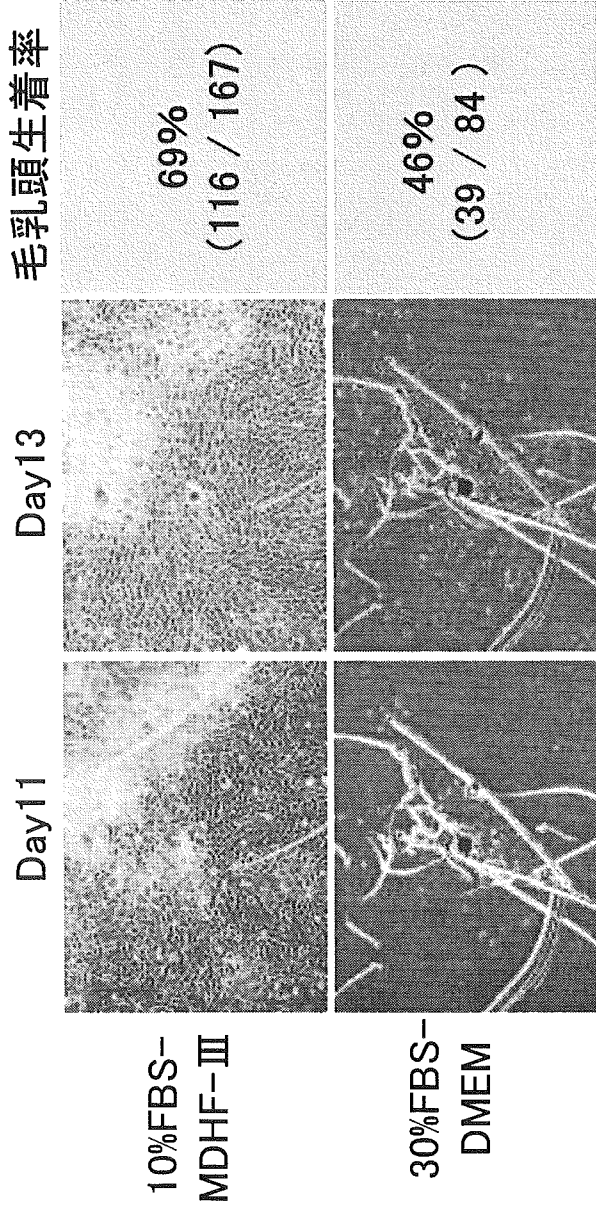
2. 岸本治郎：毛包の発生 基礎と臨床応用の最近の動向について 「第69回日本皮膚科学会東部支部学術大会」 2005年9月24日 盛岡

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

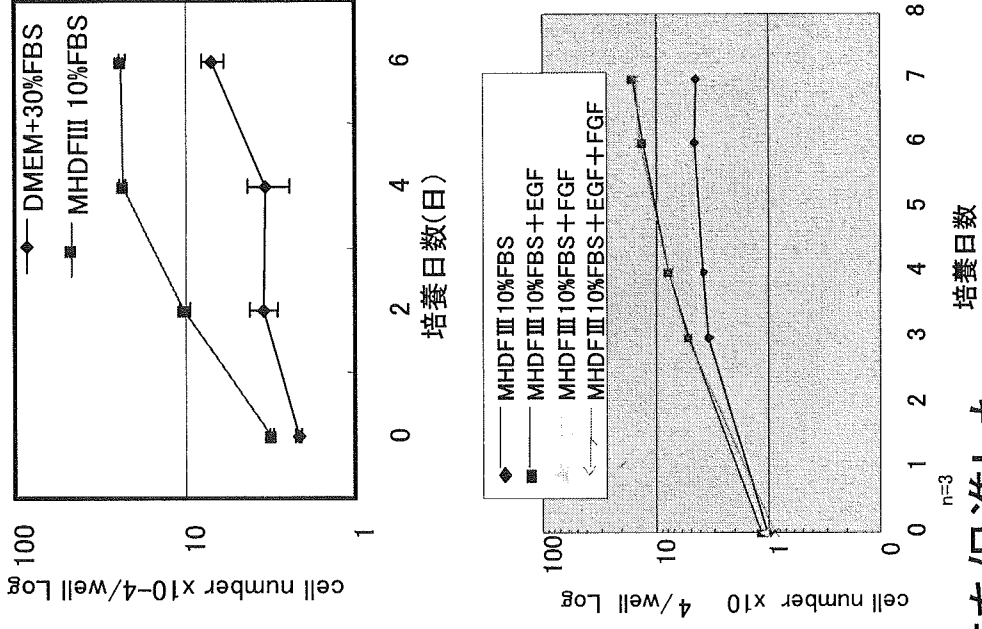
1. 特許取得
出願済2件、出願準備中1件(本年度研究成果)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図-1: MDHF-III 培地のヒト毛乳頭細胞の初代培養に及ぼす影響

アウトグロース時の形態写真および、生着率



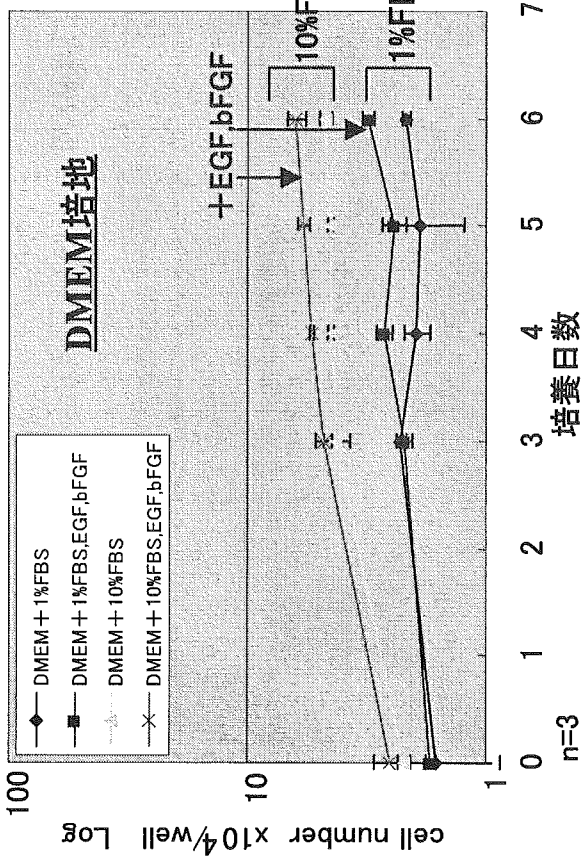
増殖曲線



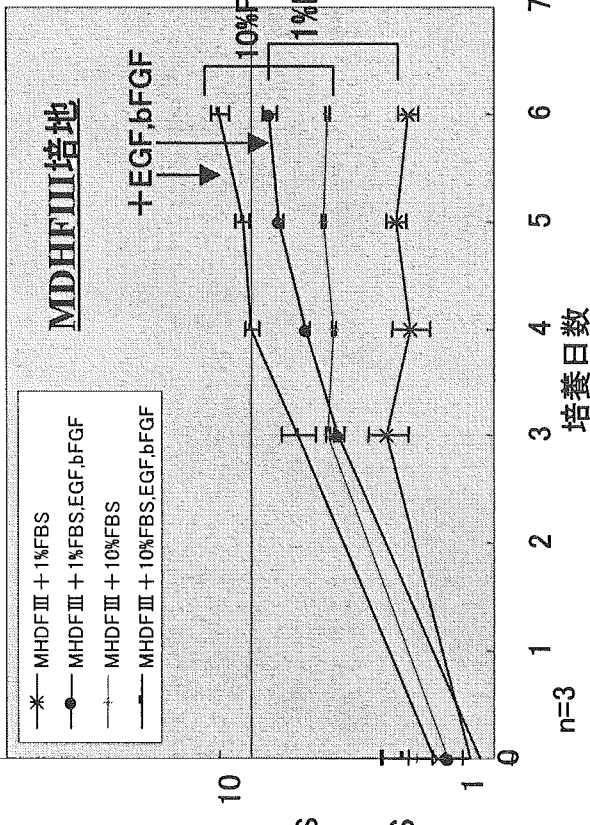
MDHFIII培地はヒト毛乳頭細胞の生着率及び増殖速度を促進した。

図-2 ヒト毛乳頭細胞の増殖に及ぼすMDHFIII培地の効果

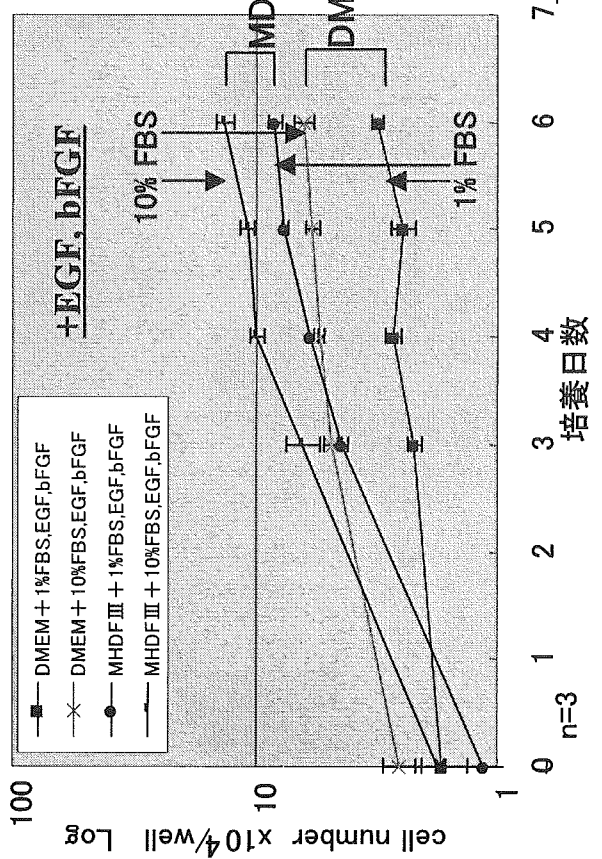
DMEM培地におけるFBS,EGF,bFGFの影響



MHDF III培地におけるFBS,EGF,bFGFの影響



DMEM培地とMHDF III培地の比較



DMEM培地とMHDF III培地の比較

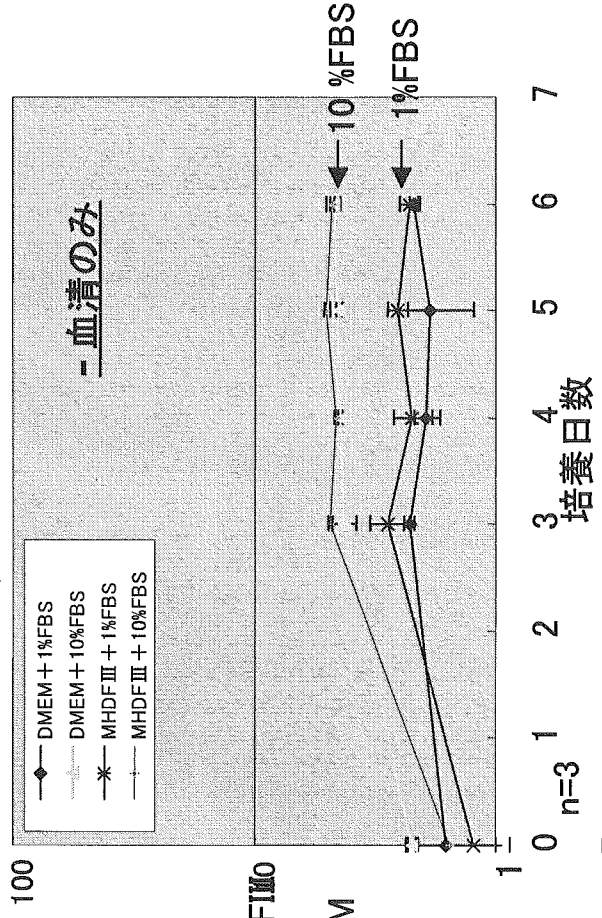
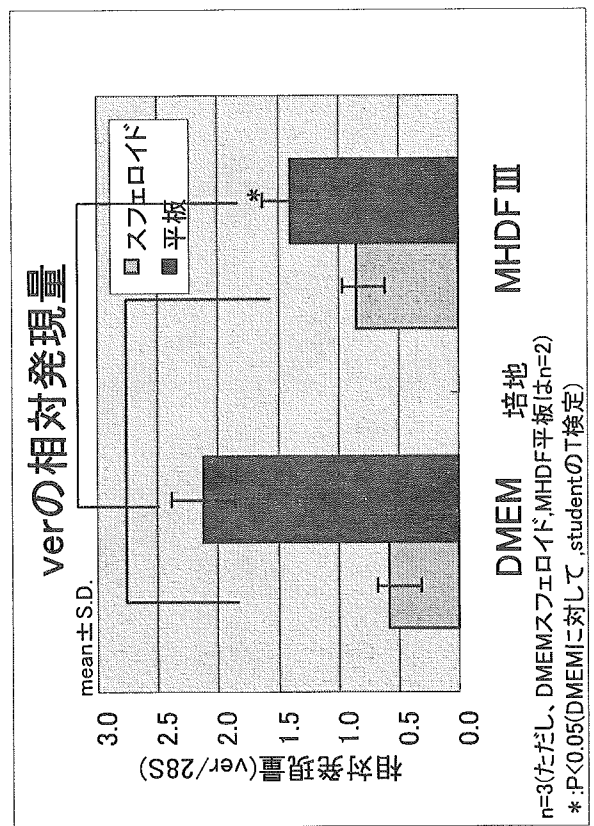
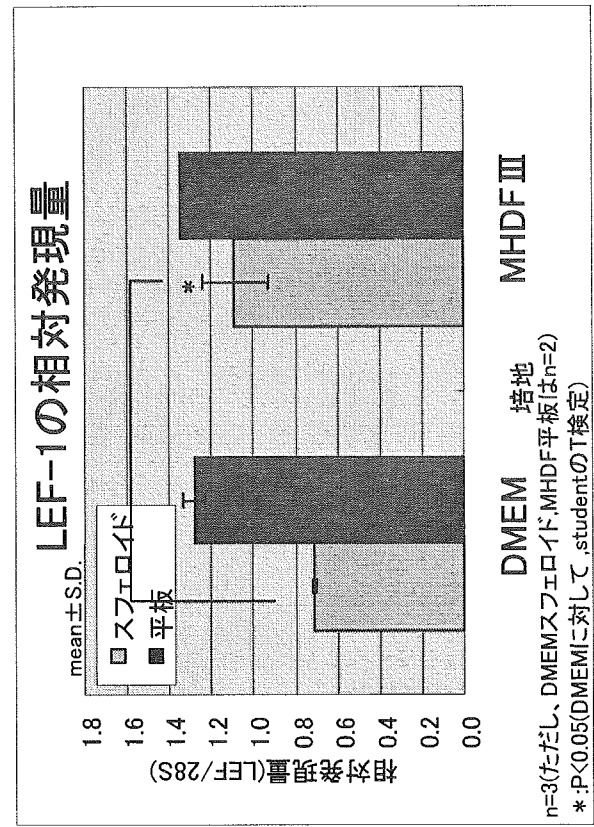


図-3 発毛誘導関連因子の発現に及ぼすMDHFIII培地の効果



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

羊膜を用いた新しい三次元培養皮膚の開発に関する研究

分担研究者 白方裕司 愛媛大学医学部皮膚科 講師

研究要旨 培養皮膚移植の有効性についてはすでに報告してきたが、培養表皮シートの場合、その生着性が低いことが問題となっている。表皮真皮を有する三次元培養皮膚は基底膜がある程度保持されていることを明らかにしているが、正常皮膚と比較すると脆弱である。本研究では正常皮膚により近い新しい三次元培養皮膚を開発したので報告する。

A. 研究目的

培養皮膚はその構成細胞により数種類に分類される。培養表皮シートは角化細胞のみを重層化させたもので、臨床応用はかなり実施されている。我々の臨床応用例においては、生着率が低く、周囲からの上皮化はみられるものの、潰瘍中心部での生着がみられることは少ない。これは、基底膜の成分を欠いていることによると思われる。培養皮膚移植の有効性をあげるためには生着性の向上が不可欠である。培養皮膚のなかで、最も高度なものが三次元培養皮膚である。我々は、自己三次元培養皮膚の作製法を確立し、組織学的に基底膜が保持されていることを既に報告している。昨年度の報告にて、三次元皮膚は生着性の向上が認められたが、いまだ正常皮膚のレベルには達していない。その原因としては、基底膜の形成が充分ではないことが示唆されている。そこで、正常皮膚により近い、基底膜を充

分に有する新たな三次元培養皮膚を開発することを目的とした。

B. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞をコラーゲンゲル中で培養し、5日間静置培養した。5日目に足場となる羊膜をゲルの上に密着させさらに1日間静置培養した。翌日、正常ヒト角化細胞を膜の上に播種した。2日後に空気に曝露することにより重層化させ、7日目に組織を採取し、HE染色にて形態を観察し、免疫染色にて基底膜、表皮細胞間蛋白、ケラチンの発現を比較検討した。さらに基底膜部を電子顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

HE染色所見では、従来の三次元培養皮膚は基底細胞が不揃いで、角化細胞の形態が分化しやすい傾向が見られた。新しい三次元培養皮膚は基底細胞がコンパクトであ

り、その配列は正常皮膚により近いものであった。免疫組織学的検索では、新しい三次元皮膚はケラチン10の発現は弱く、ケラチン6はほぼ全層に発現していた。E-カドヘリン、デスモグレイン1, デスモグレイン3は良好に発現しており、正常皮膚と比較すると遜色なく発現していた。4型コラーゲン、7型コラーゲン、ラミニン5, インテグリン α 6, インテグリン β 4は新しい三次元皮膚では基底膜部に線状に発現し、その発現は正常皮膚に非常に近いものであった。電子顕微鏡所見では新しい三次元皮膚は線状に lamina densa が観察されたが、従来の三次元皮膚では線状の lamina densa はほとんど認めなかった。

D. 考察

三次元培養皮膚の生着性は、培養表皮シートと比較して明らかに高いものであった。自己三次元培養皮膚の作製は複雑で、繊維芽細胞と角化細胞をともに用意する必要があるため、作製は培養表皮シートと比較すると労力・手間・費用を要する。しかしながら、その点を考慮しても、生着性が良いことは治療効果・期間、ひいては治療費用の面で優位であるといえよう。生着性が良いことは、おそらくは基底膜の成分が保持されていることによると思われる。しかし、これまでの解析により、基底膜の成分は不十分であり、時に表皮真皮境界部で裂隙を生じる。今回の研究において、足場となる羊膜を使用することにより基底膜の蛋白が

十分に発現し、重層化開始から7日後には線状の lamina densa の形成が認められた。羊膜は元々基底膜成分を有しているため、羊膜を用いた三次元皮膚は十分に基底膜構成成分を保持していると思われる。これらの結果は、基底膜の形成が不完全な表皮水疱症に対して、新しい三次元皮膚がより有効である可能性を示唆している。言い換えると、蛋白補充療法のさらに上をゆく、組織補充療法ともいえるであろう。この新しい三次元皮膚が実際に栄養障害型表皮水疱症に対して有効であるかについて次年度に検討を進めたい。

E. 結論

角化細胞の足場となる羊膜を用いることにより形態学的に優れた三次元培養皮膚が作製可能であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表（平成17年度）

論文発表

1. Yang L, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes. J Dermatol Sci in press

2. Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K.: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:100-5, 2005
3. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 124:939-46, 2005
4. Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. *Br J Dermatol.* 152:1391-2, 2005
5. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, and Hashimoto K: Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* 118: 2363-2370, 2005
6. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K: New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of β -defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immun* 35:1886-1895, 2005
7. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 40:105-114, 2005
8. Tohyama M, Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Yang L, Nagai H, Takashima A, Hashimoto K: dsRNA-mediated innate immunity of epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:505-11, 2005
9. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K: Induction of keratinocyte migration via transactivation of the EGF receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol.* 175:4662-8, 2005
6. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, 学会発表

1. Y. Yahata, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, T. Mochizuki, S. Hirakawa and K. Hashimoto: The MyD88-dependent signaling pathway of the *Sporothrix schenckii* antigen-induced TLR2 natural immune response in HDMEC. 35th Annual ESDR Meeting. Sep 22, 2005, Tübingen, Germany.
2. K. Sayama, S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, X. Dai, M. Tohyama, H. Komatsuzawa, S. Higashiyama, M. Sugai, and K. Hashimoto: The innate antimicrobial peptide LL-37 induces keratinocyte migration via HB-EGF-mediated transactivation of EGF Receptor and STAT3 phosphorylation. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
3. X. Dai, K. Sayama, Y. Shirakata, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, M. Tohyama, Y. Yahata, S. Tokumaru, and K. Hashimoto: STAT5a-PPAR γ is a novel differentiation-regulating pathway in human keratinocytes. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
4. Y. Hanakawa, M. Amagai, K. Y. Shirakata, Y. Yahata, S. Tokumaru, M. Tohyama, K. Sayama, and K. Hashimoto: Differential effects of dominant negative mutants of desmocollin 3a and 3b on cell-cell adhesion of keratinocytes. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
5. S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, K. Kameda, K. Sayama, and K. Hashimoto: Endothelin-induced keratinocyte migration requires Arc activation and EGFR transactivation via the ETB receptor. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
6. J. Kishimoto, Y. Ishimatsu-Tsuji, R. Ehama, T. Soma, S. Suzuki, Y. Shirakata and K. Hashimoto: Characterization of human hair generated by cellular grafting. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
7. M. Tohyama, Y. Shirakata, K. Sayama, Y. Hanakawa, X. Dai, Y. Yahata, S. Tokumaru, H. Komatsuzawa, M. Sugai and K. Hashimoto: CCL16, a member of ELR-CXC chemokine, is an endogenous antimicrobial agent derived from keratinocytes. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
8. Y. Shirakata and K. Hashimoto: Successful treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with autologous cultured skin. 7th Meeting of

the German-Japanese Society of Dermatology,
June 4th, 2005, Dresden, Germany.

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

橋本公二

1. Yang L, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes. *J Dermatol Sci* in press
2. Gartsbein M, Alt A, Hashimoto K, Nakajima K, Kuroki T, Tennenbaum T.: The role of protein kinase C {delta} activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation. *J Cell Sci.* in press
3. Yoshida, T. Hamada, M. Amagai, K. Hashimoto, R. Uehara, K. Yamaguchi, K. Imamura, E. Okamoto, S. Yasumoto, T. Hashimoto: Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 41:21-30, 2006
4. Komatsuzawa H, Ouhara K, Yamada S, Fujiwara T, Sayama K, Hashimoto K, Sugai M: Innate defences against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *J Pathol.* 208:249-60, 2006
5. Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K.: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:100-5, 2005
6. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 124:939-46, 2005
7. Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. *Br J Dermatol.* 152:1391-2, 2005
8. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, and Hashimoto K.:

Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* 118: 2363-2370, 2005

9. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K: New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of β -defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immun* 35:1886-1895, 2005
10. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 40:105-114, 2005
11. Tohyama M, Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Yang L, Nagai H, Takashima A, Hashimoto K: dsRNA-mediated innate immunity of epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:505-11, 2005
12. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K: Induction of keratinocyte migration via transactivation of the EGF receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol.* 175:4662-8, 2005
13. Sekiguchi A, Kashiwagi T, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Hashimoto Y, Kimura H, Tohyama M, Hashimoto K, Iizuka H.: Drug-induced hypersensitivity syndrome due to mexiletine associated with human herpes virus 6 and cytomegalovirus reactivation. *J Dermatol* 32:278-81, 2005
14. Shushakova N, Tkachuk N, Dangers M, Tkachuk S, Park JK, Zwirner J, Hashimoto K, Haller H, Dumler I: Urokinase-induced activation of the gp130/Tyk2/Stat3 pathway mediates a pro-inflammatory effect in human mesangial cells via expression of the anaphylatoxin C5a receptor. *J Cell Sci.* 118:2743-53, 2005

15. Gu F, Hata R, Ma YJ, Tanaka J, Mitsuda N, Kumon Y, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nakajima K, Sakanaka M: Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells. *J Neurosci Res.* 81:163-71, 2005
16. Komine M, Kakinuma T, Kagami S, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K: Mechanism of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin. *J Invest Dermatol.* 125:491-8, 2005
17. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M.: Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother.* 55:888-96, 2005

玉井克人

1. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K. Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 2005;40:105-14.
2. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2542-7.
3. Ito M, Yamamoto S, Nimura K, Hiraoka K, Tamai K, Kaneda Y. Related Articles, Links Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J Gene Med.* 2005;7:1044-52.
4. 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.* 2005 ;7:888-97

岡野栄之

1. Clarke, R.B., Spence, K., Anderson, E., Howell, A., Okano, H. and Potten, C.S.: A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev. Biol.* 277:443-456, 2005.
2. Suzuki S, Yamashita T, Tanaka K, Hattori H, Sawamoto K, Okano H and Suzuki N.: Activation of cytokine signaling through Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR)/gp130 attenuates ischemic brain injury in rats. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25: 685-693, 2005.
3. Sakaguchi M, Sawamoto K, Shimazaki T, Kitamura T, Shibuya A and Okano H.: A method for gene transfer, single isolation and in vitro assay for neural stem cells. *Inflammation and Regeneration* 25: 50-54, 2005.
4. Hirota Y, Takahashi K, Ueda R, Okano H: Transmembrane protein Tincar is expressed and involved in the development of *Drosophila* photoreceptor cells. *Development, Genes and Evolution* 215: 90-96, 2005.
5. Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H: Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor neuron and sensory neuron-specific expression. *Dev. Biol.* 278: 587-606, 2005.
6. Nakamura Y, Yamamoto M, Miyado K, Okano HJ, Fukagawa R, Higaki K, Yamasaki M, Okano H.: A novel marker for Purkinje cells, KIAA0864 protein. An analysis based on a monoclonal antibody HFB-16 in developing human cerebellum. *J Histochem Cytochem* 53: 423-430, 2005.
7. Nagato M, Heike T, Kato T, Yamanaka Y, Yoshimoto M, Shimazaki T, Okano H, Nakahata T: Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using combination of the surface markers. *J. Neurosci.Res.* 80: 456-466, 2005.
8. Hishikawa K, Marummo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Kohike H, Komori T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T.

- Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 328: 288-291, 2005.
9. Suzuki K, Fukui H, Kayahara T, Sawada M, Seno H, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T: Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 328: 348-352, 2005.
 10. Iwanami A, Yamane J, Katoh H, Nakamura M, Momomoshima S, Ishii H, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H: Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset. *J. Neurosci, Res.* 80: 172-181 (2005)
 11. Iwanami, A., Kakneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Toyama, Y. and Okano, H.: Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. *J. Neurosci., Res.* 80: 182-190, 2005.
 12. Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C: Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated and may remodel neurons after transient global ischemia. *Stroke* 36: 2457-2462, 2005.
 13. Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, Witzel SB, Okano H, Ko, MSH, Ohlsson R, Longo DL, Feinberg AP: Loss of imprinting of *Igf 2* alter intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* 307: 1976-1978, 2005.
 14. Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de Bock F, Okano H, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Lerner-Natoli M. : Increased neurogenesis in human temporal lobe epilepsy: evidence for a new neurogenesis area, the fissura hippocampi. *Neurobiology of Disease* 19: 436-450, 2005.
 15. Yano M, Okano HJ, Okano H: Involvement of Hu and hnRNP K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 280: 12690-12699, 2005.

16. Islam MO, Kanemura Y, Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Hara M, Yamasaki M, Okano H, Miyake J: Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. *Neurosci. Res.* 52: 75-82, 2005.
17. Akamatsu W, Fujiwara H, Mitsushashi T, Yano M, Shibata S, Hayakawa Y, Okano HJ, Sakakibara S, Takano H, Takano T, Takahashi T, Noda T, Okano H.: RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102: 4625-4630, 2005.
18. Tamura M, Nakamura M, Ogawa Y, Toyama Y, Miura M and Okano H: Targeted expression of anti-apoptotic protein, p35, in oligodendrocytes reduces delayed demyelination and functional impairment after spinal cord injury. *Glia* 51: 312-321, 2005.
19. Yoda A, Kouike H, Okano H and Sawa H.: Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Development* 132: 1885-1893, 2005.
20. Kitagawa A, Nakayama T, Takenaga M, Matsumoto K, Tokura Y, Ohta Y, Ichinohe M, Yamaguchi Y, Suzuki N, Okano H, Igarashi R: Lecithinized brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 328:1051-1057, 2005
21. Pignatelli A, Kobayashi K, Okano H, Belluzzi O: Functional responses of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *J. Physiol.* 564: 501-514., 2005.
22. Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, Kubota T, Ishii T, Okano H, Kitajima M: Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. *Histopathology*47: 348-356, 2005
23. Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Koizumi A, Mine Y, Kawase T: Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin *Neurosci. Res.* 53: 276-286, 2005
24. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Fukami S, Itabashi Y,

- Hattori F, Shinazaki T, Ogawa S, Okano H and Fukuda K.: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nature Biotech.* 23: 607-611, 2005.
25. Kambara H, Okano H, Chiocca A, Saeki Y: An oncolytic HSV1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals, even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Research* 65: 2832-2839, 2005.
26. Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, Mihara M, Ohsugi Y, Abe K, Okano H.: Blockade of IL-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice. *J. Neurochem.* 94: 459-468, 2005
27. Matsuda Y, Wakamatsu Y, Kohyama J, Okano H, Fukuda K, Yasugi S: Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development. *Development* 132: 2783-2793, 2005.
28. Yoshimi K, Ren Y.-R., Seki T, Yamada M, Hayakawa H, Ooizumi H, Onodera M, Saito Y, Maruyama S, Okano H, Mizuno Y, Mochizuki H.: Possibility of neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. *Ann Neurol* 58: 31-40, 2005
29. Mori A, Ueda T, Shimizu H, Yoshitake A, Hachiya T, Onoguchi K, Takakura H, Yoshitake M, Taguchi S, Cho Y, Inoue S, Kabei N, Okano H, Yozu R, Sasaki T: An Epidural Cooling Catheter Protects the Spinal Cord Against Ischemic Injury in Pigs. *Annals of Thoracic Surgery* 80: 1829-1833, 2005.
30. Islam MO, Kanemura Y, Tajria J, Mori H, Kobayashi S, Miyake J Hara M, Yamasaki M, Okano H.: Characterization of ABC transporter, ABCB1 expressed in human neural stem/progenitor cells. *FEBS Lett.* 579: 3473-3480, 2005.
31. Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Asano S, Nakatsuji N, Okano H, Tani K.: Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 23:1304-1313, 2005.