



図1 Hallopeau-Siemens 型 RDEB の臨床像。  
全身の著明な水疱、潰瘍形成を認める。

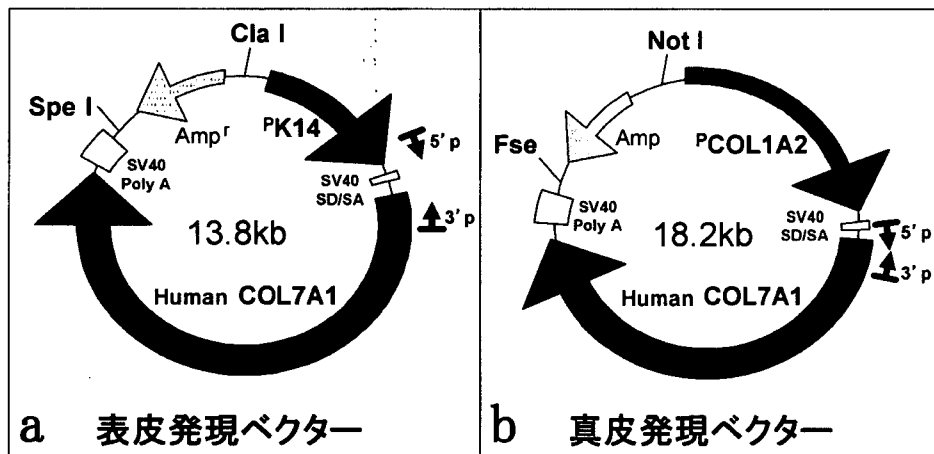


図2

- a) 表皮ケラチノサイトにヒトVII型コラーゲンを発現させるベクターの構造模式図。  
<sup>p</sup>K14; ヒトケラチン14プロモーター、Human COL7A1; 導入目的遺伝子 (ヒトVII型コラーゲン)、5'p; PCRスクリーニング時の5'プライマー、3'p; PCRスクリーニング時の3'プライマー
- b) 真皮の線維芽細胞にヒトVII型コラーゲンを発現させるベクターの構造模式図。  
 pCOL1A2; I型コラーゲンプロモーター、Human COL7A1; 導入目的遺伝子 (ヒトVII型コラーゲン)、5'p; PCRスクリーニング時の5'プライマー、3'p; PCRスクリーニング時の3'プライマー

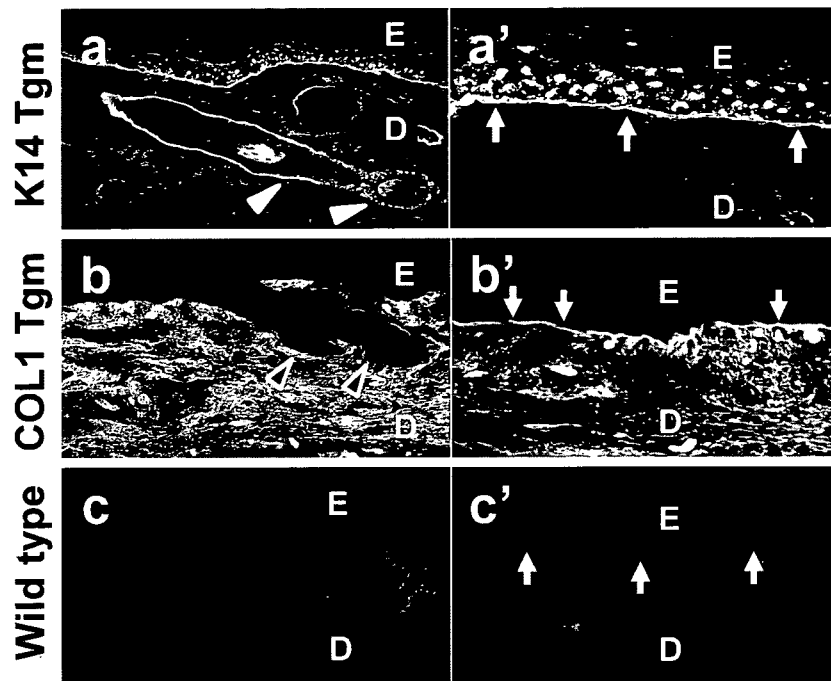


図 3

- a) K14 Tgm の免疫蛍光抗体法所見；弱拡大像。表皮内にドット状、基底膜部に線状、および毛包上皮 (△) にも LH7.2 抗体の沈着を認めた。a') 同；強拡大像。表皮ケラチノサイト細胞質の一部および基底膜部に線状に沈着を認めた。
- b) COL1 Tgm の免疫蛍光抗体法所見；弱拡大像，真皮全層に LH7.2 抗体の沈着を認めた。毛包上皮内 (▲) には反応を認めない。b') 同；強拡大像。真皮内に広範囲に顆粒状の沈着および基底膜部に線状に沈着を認めた。
- c) Wild type マウスの免疫蛍光抗体法所見；弱拡大像。c') 同；強拡大像。表皮、真皮および基底膜部に特異的反応を認めない。
- ↑；基底膜部、E；表皮、D；真皮。

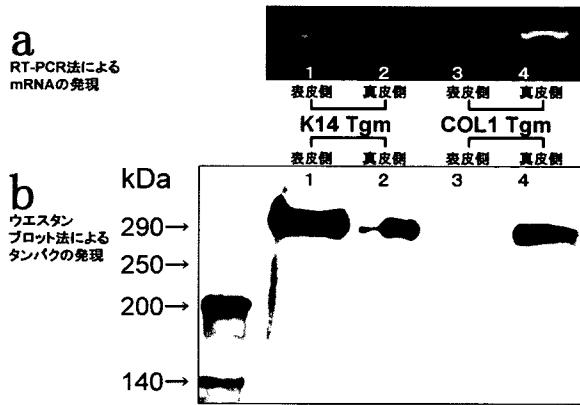


図 4

図 4

a) Tgm皮膚の RT-PCR の電気泳動所見。

1 ; K14 Tgm の表皮側、2 ; K14 Tgm の真皮側、3 ; COL1 Tgm の表皮側、4 ; COL1 Tgm の真皮側。1、2、4 にて mRNA の発現が認められた。

b) Tgm 皮膚のウエスタンブロットによる蛋白の発現。

1 ; K14 Tgm の表皮側、2 ; K14 Tgm の真皮側。3 ; COL1 Tgm の表皮側。4 ; COL1 Tgm の真皮側。1、2、4 にて 290kDa のヒト VII 型コラーゲン蛋白の発現が認められた。

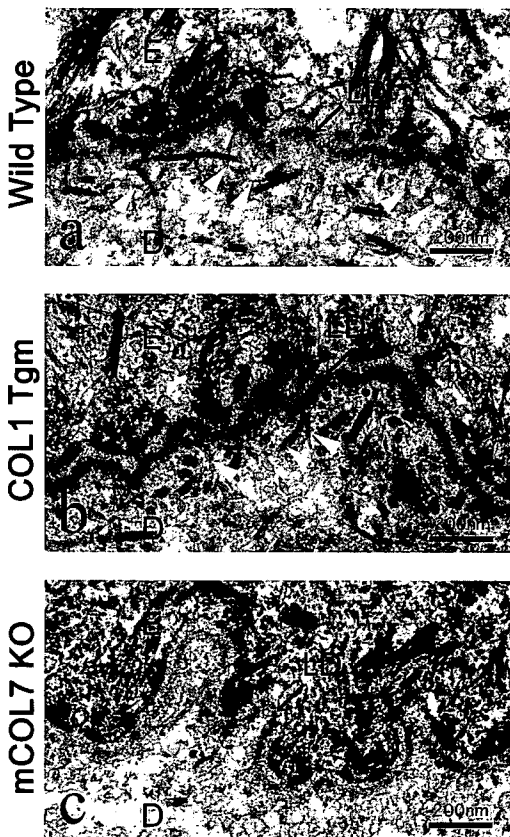


図 5

図 5

透過電子顕微鏡所見 (a、b、c)。

a) Wild type マウス、および b) COL1 Tg マウス：基板から真皮側に向かい半弧状の係留線維がみられる。c) mouse COL7A1 ノックアウトマウス：係留線維を認めない。

△；係留線維，E；表皮，D；真皮，LD；基板 (lamina densa)。

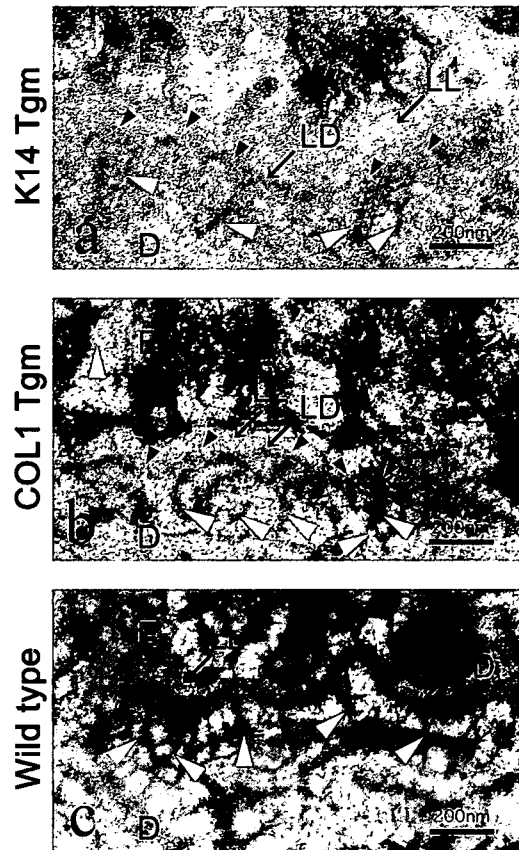


表 6

免疫電子顕微鏡所見 (a, b, c).

a) K14 Tg マウス、および b) COL1 Tg マウス：基底板部に金コロイド粒子の存在を認める。真皮側に向かい半弧状の係留線維がみられ、その基部に金コロイド粒子がみられるものもある。c) Wild type マウス：金コロイド粒子の存在を認めない。

▲；金コロイド粒子、△；係留線維、E；表皮、D；真皮、LL；透明層 (lamina lucida)、LD；基底板 (lamina densa)。

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

羊膜付き三次元培養皮膚の簡易作製法の開発

分担研究者 橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授

**研究要旨** 表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で培養皮膚の改良・開発を行い、平成18年度までに羊膜付き三次元培養皮膚を開発した。この新たな培養皮膚は基底膜を十分保持し、形態的には正常皮膚に最も近いもので、栄養障害型表皮水疱症患者の手指棍棒状癒着への臨床応用にて非常に有用であることを示した。羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンをうっているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンをういない簡易作製法を開発した。簡易作製法で作製した羊膜付き三次元培養皮膚はゲルあり羊膜付き三次元皮膚とくらべて遜色ないことが明かとなった。

共同研究者

白方裕司 愛媛大学大学院医学系研究科附属再生医療研究センター

**A. 研究目的**

表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で三次元培養皮膚の改良を行い、昨年度までに基底膜構成タンパクを十分発現する羊膜付き三次元皮膚を開発した。この羊膜付き三次元皮膚は形態的には正常皮膚に極めて近いもので、マウス移植実験においても生着性は良好であった。この羊膜付き三次元皮膚を用いて獣皮様母斑患者の母斑部を広範囲に切除し、肉芽の形成が得られた時点で移植したところ、羊膜付き三次元培養皮膚は良好に生着し、速やかに上皮化した。さらに、栄養障害型表皮水疱症の手指棍棒状癒着を解離し、皮膚欠損部に羊膜付き三次元培養皮膚移植し、その有用性を検討したところ、移植片は良好に生着し、術後4週でほぼ完全に上皮化した。しかし、羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンをうっているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンをういない簡易作製法を開発

することを目的とした。

**B. 研究方法**

形成外科手術時の余剰皮膚から out-growth 法を用いて線維芽細胞を培養し、継代5代目の細胞を使用した。角化細胞は無血清培養法にて培養し、3回継代した細胞を使用した。

①コラーゲンをういる場合

コラーゲンゲル中で線維芽細胞を培養し、5日後に無細胞化した羊膜をゲルの上に置き、密着させた。6日後に角化細胞をゲルの上に播種した。8日後に空気に曝露することにより重層化させ、さらに7日間気相下にて培養した。

②コラーゲンをういない場合

インサートに直接線維芽細胞を播種し、4時間後、1日後、5日後に羊膜を直接密着させ、6日後に角化細胞を播種した。その後の気相下培養はゲルありのものと同様に行った。

気相下培養後7-9日目にサンプルを回収し、HE染色、免疫組織染色にて形態、基底膜構成成分の発現について比較検討した。さらにヌードマウスへの移植にて生着

性について検討した。

### C. 研究結果

ゲルを用いなくても重層化した三次元培養皮膚が作製できることが明らかとなった(図1)。形態的にはゲル付きのものと比較して遜色ないことが明らかとなった。ゲルなしの群で、羊膜を密着させる時期により多少の形態の変化がみられた。線維芽細胞を播種してから1日以内に羊膜を密着させ、5日間培養した群では羊膜のなかに線維芽細胞が入り込んでおり、表皮基底層直下まで細胞の浸潤がみられ、形態的にもゲルありのものと同様であった。しかし、線維芽細胞を播種5日後に羊膜を密着させた群では、羊膜内への線維芽細胞の浸潤が少なく、表皮細胞の配列の乱れが認められた(図2)。基底膜の構成成分であるラミニン5、VII型コラーゲン、IV型コラーゲンは表皮真皮境界部で線状に発現がみられており、ゲルあり羊膜三次元皮膚と同様の所見であった。ヌードマウスへの移植実験においてはゲルなし羊膜三次元皮膚は良好に生着し、組織学的にも表皮の構造は良好に保たれていた。真皮内での血管新生、肉芽形成も良好であった(図3)。

### D. 考察

我々はこれまでに栄養障害型表皮水疱症に対する自己培養表皮シート移植、自己三次元培養皮膚移植の有用性を示してきた。昨年度までの研究成果で羊膜を併用した新たな三次元培養皮膚を開発し、この新たな三次元培養皮膚はマウスへの移植実験では良好な生着性を示し、形態学的にも優れたものであった。獣皮様母斑患者においてその有用性を検討したところ、従来の三次元培養皮膚に比べ生着性では明らかに優れており、パッチグラフトでも良好に生着し、生着した培養皮膚は急速に拡大し、皮膚欠損面を覆うことができた。さらに羊膜付き自己三次元培養皮膚を用いて栄養障害型表

皮水疱症患者の棍棒状手指癒着を治療したところ、羊膜付き三次元培養皮膚は手指の棍棒状手指癒着治療に非常に有用であることが明らかとなった。このように有効性については異論のないところであるが、三次元皮膚の作製には時間と手間がかかることが最大の問題である。この点をクリアしなければ培養皮膚の発展は期待できない。今回開発した簡易作製法は以下のような特徴がある。①線維芽細胞を播種してから2週間以内で移植に使用できる。②ゲルあり三次元培養皮膚と比べ、qualityは同等。③コラーゲンゲルの作製の手間がはぶける。④動物由来材料であるコラーゲンを使用しなくてよい。このうち動物由来成分を使用しなくて良い点は将来の再生医療の発展においては重要なポイントであると思われる。また、簡単に作製できることが明らかとなったため、各施設においても十分に作製が可能であり、従ってこの治療法の恩恵を受けることができる患者が増加することが予想される。今後はゲルなし羊膜付き三次元皮膚の臨床応用における有効性について検証する必要がある。

### E. 結論

羊膜付き三次元培養皮膚の簡易作製法を開発した。ゲルありの羊膜三次元皮膚と同程度の品質を有していることを明らかにした。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表(平成19年度)

論文発表

Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Wang X, Hirakawa S, Tohyama M, Yamauchi T, Takashi K, Kagechika H, Hashimoto K: STAT5a/PPAR gamma pathway regulates

involucrin expression in keratinocyte differentiation. **J Invest Dermatol** 127:1728-1735, 2007.

Nagai H, Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Yang L, Hashimoto K: Suppressor of cytokine signaling 3 negative regulation of signal transducer and activator of transcription 3 in platelet-derived growth factor-induced fibroblast migration. **J Dermatol** 34:523-530, 2007.

Nanba D, Inoue H, Shigemi Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. **J Cell Physiol** 214:465-73, 2008

Tohyama M, Hashimoto K, Yasukawa M, Kimura H, Horikawa T, Nakajima K, Urano Y, Matsumoto K, Iijima M, Shear NH: Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. **Br J Dermatol** 157:934-40, 2007

Tohyama M, Sayama K, Komatsuzawa H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tokumaru S, Nagai H, Hirakawa S, Sugai M, Hashimoto K: CXCL 16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. **Int Immunol** 19:1095 - 1102, 2007.

Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: Pre-B-

cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. **Oncogene** 26:339-48, 2007

Shirakata Y, Kishimoto J, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis. **J Dermatol Sci** 45:69-72, 2007

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** 127:2106-15, 2007

Morita S, Shirakata Y, Shiraishi A, Kadota Y, Hashimoto K, Higashiyama S, Ohashi Y: Human corneal epithelial cell proliferation by epiregulin and its cross-induction by other EGF family members. **Molecular Vision** 13:2119-2128, 2007

Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K: PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. **J Dermatol Sci** 50:53-60, 2008.

学会発表

Hirakawa S, Kodama S, Brown LF, Paavonen K, Hashimoto K, Alitalo K,

Detmar M.: Targeted overexpression of VEGF-A or -C in the skin promotes lymph node lymphangiogenesis and metastasis 2<sup>nd</sup> International symposium on cancer metastasis and the lymphovascular system, Sanfrancisco, U.S.A., May 2-5, 2007.

Hirakawa S, Murakami S, Hashimoto K.: Milroy's disease : a case report of the congenital lymphedema pedigree The 15<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Jeju, Japan, June 2-3, 2007.

Yang L, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K.: Development of a new skin equivalent model using de-epithelialized amnion membrane 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, May 9-12, 2007.

Sayama K, Kajiya K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Nagai H, Akira S, Kishimoto J, Hashimoto K.: Ablation of TAK1 in

mouse keratinocytes disturbed hair follicle development 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, May 9-12, 2007.

Dai X, Shirakata Y, Sayama K, Tokumaru S, Hirakawa S, Tohyama M, Yang L, Hashimoto K.: PPAR-gamma is involved in 1.25-dihydroxyvitamin D3-induced beta-defensin-3 and cathelicidin expression in normal keratinocyte. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, May 9-12,2007.

Shirakata Y, Yang L, Hashimoto K.: A new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. 8<sup>th</sup> Congress of the German-Japanese Society of Dermatology, Yokohama, November 15-17, 2007

#### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

11. 特許取得：なし
12. 実用新案登録：なし
13. 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

簡易作製羊膜付き三次元培養皮膚の有用性に関する研究

分担研究者 橋本公二 愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授

**研究要旨** 表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で培養皮膚の改良・開発を行い、平成18年度までに羊膜付き三次元培養皮膚を開発した。この新たな培養皮膚は基底膜を十分保持し、形態的には正常皮膚に最も近いもので、栄養障害型表皮水疱症患者の手指棍棒状癒着への臨床応用にて非常に有用であることを示した。羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンをういているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンをういない簡易作製法を開発した。簡易作製法で作製した羊膜付き三次元培養皮膚はゲルあり羊膜付き三次元皮膚とくらべて遜色ないことが明かとなった。この羊膜付き三次元培養皮膚を獣皮様母斑患者へ臨床応用し、その有用性について検討した。

共同研究者

白方裕司 愛媛大学大学院医学系研究科附属再生医療研究センター

### A. 研究目的

表皮水疱症に対する再生医療法を確立する目的で三次元培養皮膚の改良を行い、羊膜付き三次元皮膚を開発した。この羊膜付き三次元皮膚は形態的には正常皮膚に極めて近いもので、獣皮様母斑患者の母斑部ならびに、栄養障害型表皮水疱症の手指棍棒状癒着癒痕拘縮形成術後の皮膚欠損部に羊膜付き三次元培養皮膚移植し、その有用性を検討したところ、移植片は良好に生着し、術後4週でほぼ完全に上皮化した。しかし、羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンをういているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンをういない簡易作製法を開発した。ゲルなし羊膜付き三次元皮膚は形態的には正常皮膚に極めて近いもので、マウス移植実験においても生着性は良好であった。簡易作製法にて作製したゲルなし羊膜付き三次元皮膚を用いて巨大色素性母斑患

者の母斑切除部に移植し、その有用性について検討した。

### B. 研究方法

患者生検皮膚から outgrowth 法を用いて線維芽細胞を培養し、継代5代目の細胞を使用した。角化細胞は無血清培養法にて培養し、3回継代した細胞を使用した。カルチャーインサートに直接線維芽細胞を播種し、翌日無細胞化処理した羊膜を載せ、4日間静置培養した。培養開始後5日目に患者由来角化細胞をゲルの上に播種した。2日後に空気に曝露することにより重層化させ、7日間気相下にて培養したものを移植に用いた。

### C. 研究結果

全身麻酔下に患者の右肩の巨大色素性母斑直径約20cmを皮下脂肪の深さで切除し、人工真皮を移植した。2週間後には赤色肉芽の形成がみられた。肉芽の表面をメスにて薄く切除し、表面をできる限り平坦化し、ゲルなし羊膜付き三次元培養皮膚を切手大の大きさにパッチグラフトを行った(図1)。

メッシュガーゼを覆いタイオーバー固定を行った。感染症には弱いため翌日タイオーバーを除去したところほとんどの培養皮膚が生着していた。パッチグラフトは7日目の時点でしっかりと生着し、以後植皮片は急速に拡大し、術後20日目には完全に上皮化した(図2)。

#### D. 考察

表皮水疱症の再生医療として、我々はこれまでに自己培養表皮シート移植、自己三次元培養皮膚移植の有用性を示してきた。昨年度までの研究成果で羊膜を併用した新たな三次元培養皮膚を開発し、新たな三次元培養皮膚はマウスへの移植実験では良好な生着性を示し、形態学的にも優れたものであった。昨年度には巨大色素性母斑患者においてその有用性を検討したところ、従来の三次元培養皮膚に比べ生着性では明らかに優れており、パッチグラフトでも良好に生着した。また、生着した培養皮膚は急速に拡大し、皮膚欠損面を覆うことができた。また、表皮水疱症患者の手指棍棒状癒着について癒痕拘縮形成術を施行し、癒着を離開した部位に羊膜付き三次元培養皮膚を移植し良好な結果を得た。しかし、羊膜付き三次元培養皮膚はコラーゲンをうっているため作製に時間と手間がかかることが最大の問題であった。そこで、コラーゲンをういない簡易作製法を開発した。ゲルなし羊膜付き三次元皮膚は形態的には正常皮膚に極めて近いもので、マウス移植実験においても生着性は良好であった。簡易作製法にて作製したゲルなし羊膜付き三次元皮膚を用いて巨大色素性母斑患者の母斑切除部に移植し、その有用性について検討したところ、ゲルあり羊膜三次元皮膚と同等の有効性を示した。今回の検討により簡易作製法であるゲルなし羊膜付き三次元培養皮膚の臨床での有効性が示された。簡易作製ゲルなし羊膜付き三次元皮膚が栄養障害型表皮水疱症に対しても有効であるか

についての検討が今後必要であると思われる。

#### E. 結論

簡易作製法であるゲルなし羊膜付き三次元培養皮膚を用いて巨大色素性母斑患者の皮膚欠損部を治療し良好な結果を得た。ゲルなし羊膜付き三次元皮膚は、表皮水疱症の再生医療として期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表(平成19年度)

論文発表

Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Wang X, Hirakawa S, Tohyama M, Yamauchi T, Takashi K, Kagechika H, Hashimoto K: STAT5a/PPAR gamma pathway regulates involucrin expression in keratinocyte differentiation. **J Invest Dermatol** 127:1728-1735, 2007.

Nagai H, Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Yang L, Hashimoto K: Suppressor of cytokine signaling 3 negative regulation of signal transducer and activator of transcription 3 in platelet-derived growth factor-induced fibroblast migration. **J Dermatol** 34:523-530, 2007.

Nanba D, Inoue H, Shigemi Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. **J Cell Physiol** 214:465-73, 2008

Tohyama M, Hashimoto K, Yasukawa M, Kimura H, Horikawa T, Nakajima K, Urano Y, Matsumoto K, Iijima M, Shear NH: Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. **Br J Dermatol** 157:934-40, 2007

Tohyama M, Sayama K, Komatsuzawa H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tokumaru S, Nagai H, Hirakawa S, Sugai M, Hashimoto K: CXCL 16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. **Int Immunol** 19:1095 - 1102, 2007.

Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. **Oncogene** 26:339-48, 2007

Shirakata Y, Kishimoto J, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis. **J Dermatol Sci** 45:69-72, 2007

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** 127:2106-15, 2007

Morita S, Shirakata Y, Shiraishi A, Kadota Y, Hashimoto K, Higashiyama S, Ohashi Y: Human corneal epithelial cell proliferation by epiregulin and its cross-induction by other EGF family members. **Molecular Vision** 13:2119-2128, 2007

Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K: PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. **J Dermatol Sci** 50:53-60, 2008.

#### 学会発表

Hirakawa S, Kodama S, Brown LF, Paavonen K, Hashimoto K, Alitalo K, Detmar M.: Targeted overexpression of VEGF-A or -C in the skin promotes lymph node lymphangiogenesis and metastasis 2<sup>nd</sup> International symposium on cancer metastasis and the lymphovascular system, Sanfrancisco, U.S.A., May 2-5, 2007.

Hirakawa S, Murakami S, Hashimoto K: Milroy's disease : a case report of the congenital lymphedema pedigree The 15<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Jeju, Japan, June 2-3, 2007.

Yang L, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K: Development of a new skin equivalent model using de-epithelialized amnion membrane 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles,

May 9-12, 2007.

Sayama K, Kajiya K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Nagai H, Akira S, Kishimoto J, Hashimoto K.: Ablation of TAK1 in mouse keratinocytes disturbed hair follicle development 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, May 9-12, 2007.

Dai X, Shirakata Y, Sayama K, Tokumaru S, Hirakawa S, Tohyama M, Yang L, Hashimoto K.: PPAR-gamma is involved in 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced beta-defensin-3 and cathelicidin expression in normal

keratinocyte. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, May 9-12,2007.

Shirakata Y, Yang L, Hashimoto K.: A new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. 8<sup>th</sup> Congress of the German-Japanese Society of Dermatology, Yokohama, November 15-17, 2007

**H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）**

11. 特許取得：なし
12. 実用新案登録：なし
13. 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

表皮水疱症に対する遺伝子治療法の開発

分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

**研究要旨** 表皮水疱症の治療のために、遺伝子治療の可能性について検討した。そのために皮膚組織特異的な遺伝子導入ベクターの開発を行い、基底細胞抗原である desmoglein 3 に対する一本鎖抗体をもった HVJ envelope (HVJ-E) vector の構築に成功した。この標的導入 HVJ-E に Type VII collagen 遺伝子を封入し、Type VII collagen 遺伝子欠損マウスの水疱内に導入した。これにより Type VII collagen が基底膜上に産生された。

共同研究者

玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科  
准教授

知野剛直 岐阜大学医学部皮膚科

北島康雄 岐阜大学医学部皮膚科教授

**A. 研究目的**

遺伝性疾患の究極的な治療法は遺伝子治療である。しかしそのためには遺伝子の長期発現、遺伝子欠損組織への選択的な遺伝子導入など様々な技術革新が必要である。先天性表皮水疱症の劣性重症型では原因遺伝子産物である VII 型コラーゲンの完全欠損のため、表皮が真皮から容易に剥離し全身に水疱が生じる。本研究では、表皮水疱症の皮膚組織への VII 型コラーゲン遺伝子の選択的な導入による究極治療法の開発を目指した。

**B. 研究方法**

皮膚基底細胞の抗原である desmog 1 ein 3 (Dsg3) に対する抗体のハイブリドーマより抗体遺伝子を分離し、一本鎖抗体を作製した。HVJ の F 蛋白遺伝子の様々な欠失変異体を作製し、これと GFP 遺伝子とのキメラ遺伝子を培養細胞に発現させ、細胞膜上にキメラ GFP を発現させる F 変異体

を同定し、この遺伝子と一本鎖抗体遺伝子を融合してキメラ遺伝子を構築し、これをサル腎臓細胞 (LLCMK2) に導入して安定に発現する細胞クローンを分離した。これに wild-type HVJ を感染させて、産生される HVJ を回収し、キメラ蛋白の挿入を免疫電顕、western blot で確認し、Dsg3 に対する結合を ELISA で測定した。また Dsg3 強発現 NIH3T3 細胞への感染を F 蛋白の免疫染色で検証した。次いで、キメラ HVJ を紫外線で不活性化し、封入剤を用いて VII 型コラーゲン発現プラスミドを封入し、キメラ HVJ envelope vector (HVJ-E) を作製した。遺伝子表皮水疱症のモデルである VII 型コラーゲン遺伝子欠失マウスの水疱内にキメラ HVJ-E を導入し、VII 型コラーゲン遺伝子発現を免疫染色と RT-PCR で調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験については大阪大学医学系研究科での審査を受けており、その安全委員会の指針に従って施行された。

**C. 研究結果及び考察**

Dsg3 を認識する一本鎖抗体と HVJ の F 蛋白欠失変異体とのキメラ遺伝子を作成

し細胞に導入して発現させたところ、F蛋白のシグナルペプチドと膜貫通ドメインの間に標的分子挿入したコンストラクトのみが、細胞膜上にキメラ分子を局在させることができた。次いで、この細胞に wild-type HVJ を感染させて産生される virus progeny を調べると、ウイルスエンベロープに標的分子の挿入が確認され、F蛋白の約6%がキメラ-Fとなっていた。Dsg3を付着させたプレートに対するキメラHVJの結合は、wild-HVJの10倍以上強力であった。このキメラHVJを不活性化し、VII型コラーゲンの発現プラスミドを封入し、表皮水疱症モデルマウスの水疱内に導入したところ、水疱内のほぼすべての皮膚基底膜にVII型コラーゲンが局在するようになった。その発現は wild HVJ-E で遺伝子導入を行ったときの20倍以上であった。

この標識ベクター技術では水疱内に入れることで高効率に遺伝子導入ができる。しかしウイルスのHN蛋白は完全に残存している。HVJのHN蛋白は本来のウイルス受容体であるシアル酸を認識するので、標的化のときの特異性が弱められる欠点があることと、さらにこのHN蛋白は赤血球凝集に関与するので、全身投与時の赤血球凝集反応による毒性の原因となる。そこで、赤血球凝集に関与するHNのRNAをHN特異的なsiRNAでノックアウトする方法をすでに開発した。このsiRNA法と標的分子挿入技術を組み合わせれば、全身投与による標的遺伝子治療が可能になるであろう。

## D. 評価

### 1) 達成度について

難治性の表皮水疱症の究極的な治療は遺伝子治療であり、従来からそれに向けた取り組みが行われてきた。今回の成果は、この治療法の実現のための可能性を示した点で当初の目的を達成し、さらに今後の展望が開けている点から期待以上の成果である

と判断できる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Type VII collagen gene を表皮水疱症モデルマウスの皮膚組織特異的に導入し、発現させた手法は例を見ない斬新なもので、その効率の高さからも注目されるものである。またこのベクター技術もオリジナリティーの高いもので、学術的にもインパクトが大きい。表皮水疱症は、究極的な治療法がないわけで、遺伝子治療の可能性が示されたことは社会的にも意義の高いことで、ベクター技術とあわせて新聞報道もなされた(2007年8月5日朝日新聞朝刊)。

### 3) 今後の展望について

HVJ-E については生産法が確立された。標的化HVJ-Eについても同じ技術が応用可能である。水疱内投与ではなく全身投与の可能背を提示する必要があるが、そのベクターも既に完成しつつある。また長期遺伝子発現も必要であるが、技術としては完成している。今後はこれらの安全性を検証する必要がある。

### 4) 研究内容の効率性について

3年間で遺伝子産物に対する免疫寛容誘導も加味した遺伝性疾患における遺伝子発現の長期化の試み、皮膚特異的遺伝子導入ベクターの開発を行った。これらはすべて遺伝子治療のために重要な課題であり、3年間で目処を付けることができたことは、研究担当者としては効率がよかったと考えている。この技術の鍵となるのはやはりベクター作成法であるが、我々は再現性よく同じ機能をもつベクターを得られるように、標的分子を産生する安定形質転換株を分離している。この細胞に決められた量の野生型HVJを感染させるだけで同じ標的化HVJ-Eを得ることができる。遺伝子のこのベクターへの封入技術は既にキット化されているものと同じ手技であり、汎用性、再現性の高い技術である。

## E. 結論

我々は HVJ-E ベクターに組織特異的な標的能を賦与する全く新しい方法を開発した。素手の開発してきた遺伝子発現の長期化のための技術と合体させれば、遺伝性皮膚疾患の治療にも貢献できることが予想される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表（平成19年度）

### 1. 論文発表

1. 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 CXCR4/SDF1 pathway. **Stem Cells**, 26(1):223-34, 2008.
2. Saga, K., Tamai, K., Kawachi, M., Shimbo, T., Fujita, H., Yamazaki, T., and Kaneda, Y. Functional modification of Sendai virus by siRNA. **J. Biotechnology**, 133:386-394, 2008.
3. Shimbo, T., Kawachi, M., Saga, K., Fujita, H., Yamazaki, T., Tamai, K., and Kaneda, Y. Development of a transferrin receptor-targeting HVJ-E vector. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 364, 423-428, 2007..
4. Kawachi, M., Tamai, K., Saga, K., Yamazaki, T., Fujita, H., Shimbo, T., Nimura, K., Nishifuji, K., Amagai, M., Uitto, J., and Kaneda,

Y. Development of tissue-targeting HVJ envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin. **Human Gene Therapy**, 18, 881-894, 2007.

### 2. 学会発表

- (1) 第23回日本 DDS 学会 シンポジウム “癌治療のための HVJ-E の開発と標的化の試み” 金田安史 平成19年 6月 14日 熊本
- (2) 第13回日本遺伝子治療学会 “A novel strategy for construction of tissue-targeting Sendai virus” Kawachi, M., Tamai, K., Saga, K., Yamazaki, T., Fujita, H., Shimbo, T., Nishifuji, K., Amagai, M., Kaneda, Y. 平成19年 6月30日 名古屋

## H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

### 1) 取得特許

遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター（特許第3942362号）

成立日：2007年 7月11日

発明者：金田安史

出願人：アンジェスエムジー株式会社

### 2) 実用新案登録

改変パラミクソウイルス及びその作製法 (WO2007/061141)

出願日：2007年 5月31日

発明者：河地正子、佐賀公太郎、玉井克人、  
金田安史

出願人：ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学

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

表皮水疱症に対する細胞療法の可能性の検討

分担研究者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学 教授

**研究要旨** 表皮水疱症の治療のために、細胞治療の可能性について検討してきた。まずマウス胎仔への細胞導入法を確立し、これにより欠損蛋白に対する免疫寛容を誘導することができた。これを用いて胎生期に骨髄細胞の導入を行い、移植した骨髄細胞由来線維芽細胞が、出生後皮膚においてVII型コラーゲンを基底膜部に供給し、その結果、平均生存期間を約3週間延長することに成功した。

共同研究者

玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科  
准教授

知野剛直 岐阜大学医学部皮膚科

北島康雄 岐阜大学医学部皮膚科教授

**A. 研究目的**

先天性表皮水疱症に対しては遺伝子治療や細胞療法が根本的な治療法になると考えられており、その技術開発がなされてきた。このような先天性疾患では、原因遺伝子産物が先天的に完全欠損していることが多く、欠損蛋白に対する免疫寛容が破綻している可能性が示唆される。昨年度我々は、マウス胎仔循環系に対する低侵襲性細胞移植法を確立し、これにより新たな蛋白発現に対する免疫寛容が誘導できることを報告した。今回はこれを利用して胎生期マウスに骨髄細胞移植を行い、その細胞が皮膚組織で分化して欠損蛋白を供給して欠損した形質を補充できるかどうかについて検討する。

**B. 方法**

胎生14日目マウス (C57/Bl6) に対し、卵黄囊静脈から10週令同種 GFP トランスジェニックマウス (GFPマウス) 由来の骨髄細胞 106 個を含む生理食塩水 10  $\mu$ l を注入した。出生後12週間で GFP 陽性細胞を皮

膚組織において検索した。Type I 及び Type VII collagen, vimentin, fibronectin の発現を免疫染色、RT-PCR により検出した。表皮水疱症のモデルマウスである Type VII collagen ノックアウトの胎仔に対して同様の注入実験を行い、マウスの生存、皮膚組織での Type VII collagen の発現を解析した。

**C. 結果**

胎生14日目に GFP 骨髄を移植したマウスでは、移植2時間後にはほとんどすべての臓器に GFP 陽性細胞が認められた。出生12週後において GFP 陽性のリンパ球や樹状細胞が骨髄、脾臓、胸腺、パイエル板、リンパ節などの免疫担当組織に生着しており、GFP陽性細胞はほぼすべて CD45<sup>+</sup>であった。骨髄におけるキメリズムは約0.5%程度であった。出生後12週間で GFP 陽性細胞が多数皮膚組織に検出された。その細胞は紡錘型をしており、Type I collagen, Type VII collagen, vimentin, fibronectin がすべて陽性であり、線維芽細胞と推定された。Type VII collagen ノックアウトは生後すぐに死亡するが、骨髄細胞導入マウスは3週間生存した。その皮膚組織を観察すると、Type VII collagen が一部の基底膜に沿って局在していた。



## D. 考察

胎生期での骨髄移植によって皮膚組織にも骨髄細胞が浸潤し、その細胞は線維芽細胞に分化して、Type VII collagenなどを供給できることが示された。Type VII collagen 欠損の表皮水疱症モデルマウスは、(この移植法によって) 生後すぐに死亡していたが、3週間生存できた。それはおそらく食道粘膜に Type VII collagen が供給され食餌をある程度摂取できるようになったためではないかと考えられる。このことから、ヒトにおいては胎児期に正常な骨髄細胞を移植すれば、症状の軽減が期待できるのではないかと考えられる。

## E. 結論

胎生期での骨髄細胞移植により表皮水疱症の治療が可能になる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表 (平成19年度)

### 1. 論文発表

1. 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 CXCR4/SDF1 pathway. **Stem Cells**, 26(1):223-34, 2008.
2. Saga, K., Tamai, K., Kawachi, M., Shimbo, T., Fujita, H., Yamazaki, T., and Kaneda, Y. Functional modification of Sendai virus by siRNA. **J. Biotechnology**, 133:386-394, 2008.
3. Shimbo, T., Kawachi, M., Saga, K., Fujita, H., Yamazaki, T., Tamai, K., and Kaneda, Y. Development of a transferrin receptor-targeting HVJ-E vector. **Biochem.**

**Biophys. Res. Comm.** 364, 423-428, 2007..

4. Kawachi, M., Tamai, K., Saga, K., Yamazaki, T., Fujita, H., Shimbo, T., Nimura, K., Nishifuji, K., Amagai, M., Uitto, J., and Kaneda, Y. Development of tissue-targeting HVJ envelope vector for successful delivery of therapeutic gene to mouse skin. **Human Gene Therapy**, 18, 881-894, 2007.

### 2. 学会発表

- (1) 第23回日本 DDS 学会 シンポジウム “癌治療のための HVJ-E の開発と標的化の試み” 金田安史 平成19年 6月 14日 熊本
- (2) 第13回日本遺伝子治療学会 “A novel strategy for construction of tissue-targeting Sendai virus” Kawachi, M., Tamai, K., Saga, K., Yamazaki, T., Fujita, H., Shimbo, T., Nishifuji, K., Amagai, M., Kaneda, Y. 平成19年 6月30日 名古屋

## H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1) 取得特許

遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター (特許第3942362号)

成立日: 2007年 7月11日

発明者: 金田安史

出願人: アンジェスエムジー株式会社

### 2) 実用新案登録

改変パラミクソウイルス及びその作製法 (WO2007/061141)

出願日: 2007年 5月31日

発明者: 河地正子、佐賀公太郎、玉井克人、  
金田安史

出願人: ジェノメディア株式会社、国立大学法人大阪大学

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

骨髄細胞による表皮再生機序解明と表皮水疱症治療への応用

研究協力者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

**研究要旨** 我々は、骨髄由来細胞が表皮水疱症における水疱部表皮再生に寄与している可能性を見出した。特に平成19年度は、骨髄由来表皮再生メカニズムの分子機構解明を目指して研究を進め、水疱内に骨髄由来表皮前駆細胞を誘導する活性 KOI2 が存在することを明らかにした。

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  
知野剛直 岐阜大学大学院医学系研究科  
皮膚科学  
北島康雄 岐阜大学大学院医学系研究科  
皮膚科学

植し、このマウス背部に雌 VII型コラーゲンノックアウトマウス皮膚を移植した。植皮部 GFP 陽性骨髄由来ケラチノサイトの性染色体を解析した。さらに、遺伝子工学的手法を利用して細胞融合性ケラチノサイトのみが選択的に GFP 陽性となるマウスを作製し、骨髄由来ケラチノサイト形成における細胞融合機序の有無を検討した。

3) 移植皮膚片に骨髄由来ケラチノサイトが形成される分子機構を解明するため、皮膚抽出液中の骨髄細胞動員活性物質を生化学的精製手法を用いて探索した。

**A. 研究目的**

先天性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、骨髄細胞による表皮再生機序と、その分子機構の解析を進めた。

**B. 研究方法**

1) 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 マウスを作成した。移植骨髄の生着を待って（移植後6週間）、新生 VII型コラーゲンノックアウト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 陽性ケラチノサイトの有無および VII型コラーゲンの基底膜領域における発現を検討した（前年度までの続き）。

2) 骨髄由来ケラチノサイト形成機序に細胞融合が関与しているかどうかを知る目的で、雄マウス GFP 骨髄を雌マウスに移

**C. 研究結果**

1) 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 VII型コラーゲンノックアウト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、骨髄由来表皮細胞が存在する部位に一致して、VII型コラーゲンノックアウトマウス皮膚の基底膜領域に VII型コラーゲンが存在していることが明らかとなった。

2) 結果2：性染色体解析および細胞融合特異的 GFP 発現マウスの皮膚解析により、骨髄由来ケラチノサイト形成機序は細胞融合ではなく、骨髄細胞の表皮細胞への分化機序により形成されることが明らかと

なった。

3) 結果3: マウス遊離皮膚片抽出液中に、骨髄間葉系幹細胞を皮膚へと動員する生体内生理活性物質 KOI2 が存在すること、皮膚移植後に KOI2 は、移植部位及び循環血液中に大量に放出されることが明らかとなった。KOI2 は既知の生体内蛋白であるが、骨髄間葉系幹細胞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、骨髄幹細胞移植により表皮水疱症を根治的に治療できる可能性が世界で初めて明らかになった。我々の基礎研究成果をもとに、南米チリの研究グループは VII型コラーゲン完全欠損患者皮膚潰瘍部に非血縁健康者由来骨髄間葉系幹細胞を移植した。その結果、長期間難治であった潰瘍部の速やかな上皮化が得られ、その皮膚基底膜部に欠損していた VII型コラーゲンの供給が確認された (IVth International Symposium of EB, Santiago, Chile および私信)。現在チリの研究グループと情報を交換し、骨髄間葉系幹細胞移植による栄養障害型表皮水疱症治療の国際多施設共同研究を進める計画を策定中である。

#### E. 結論

骨髄幹細胞移植により表皮水疱症を根治的に治療できる可能性が世界で初めて明らかになった。今後、骨髄間葉系幹細胞移植による栄養障害型表皮水疱症治療の可能性検討及び臨床研究が必要である。

#### 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 Jan 25;

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 Jan;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 Mar 9;354(2):453-8. Epub 2007 Jan 10.

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 Apr 15;120(Pt 8):1350-7. Epub 2007 Mar 20.

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 Oct;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 Sep 14; [Epub ahead of print]
7. Kikuchi Y, Tamai K, Kaneda Y. Cutaneous gene delivery. **J Dermatol Sci**. 2007 Aug 30; [Epub ahead of print]
  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 Jul;157(1):179-82. **Epub** 2007 May 14.
  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. **Epub** 2007 Jun 26.
  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 Jan;26(1):223-34. **Epub** 2007 Oct 11.
  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**. 2007 Oct 15; [Epub ahead of print]
  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 Dec 21;364(3):423-8. **Epub** 2007 Oct 12
  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 Feb 1;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. 2007 Nov 8; [Epub ahead of print]
  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 Jan 18; [Epub ahead of print]
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