

創傷を負った表皮組織に特異的な遺伝子の組み替えを用いた、創傷治癒過程の追跡と表皮再生メカニズムの決定

京都大学大学院 医学研究科

高橋 健 造

Injury to the skin tissue elicits a repair response aimed at restoring the epithelial continuity, which is essential to a normal skin barrier function. Epidermal keratinocytes at the wound edge are recruited for the re-epithelialization of the wound site. However, the mechanism of the re-epithelialization is not easily understood compared with the simple epithelia. While the migration of keratinocytes occurs in the form of a stratified sheet, the relative contribution and ultimate fate of progenitor and differentiating keratinocytes during this vital process remains unclear. In this study, we use the transgenic technology to induce the wound specific gene recombination. We prepared two kinds of the transgenes to introduce the injured epidermis specific gene expression at the suprabasal keratinocytes, one for the wound specific expression of the cre recombinase and the other for the expression of the marker proteins. We used the double transgenic mice to trace the migration of the suprabasal keratinocytes activated at the wound edge. By this transgenic work we might be able to conclude the long term question, whether the suprabasal keratinocytes could recover the mitogenic property and migrate into the ulcerative surface or not.

1 はじめに

皮膚はヒトの体の最も外側に位置し、生体内部の臓器を保護する重要なバリアーとして働いている。外傷などによる皮膚の欠損は、きわめてすばやい治癒反応を引き起こす。この創傷治癒反応は、秒単位で現われる血小板や血管内皮細胞の関与する凝固・止血反応にはじまり、真皮線維芽細胞による創傷部の収縮・肉芽の形成、表皮欠損部への表皮角化細胞の遊走・増殖とこれらによる潰瘍表面の再上皮化から最終的には新生表皮組織の再構築へと続く(文献2, 3, 8, 10)。

外胚葉性の上皮組織であり体表を取り巻く表皮細胞は、消化管や肝臓・腎臓などの内胚葉由来の単層上皮より構成される組織とは異なり、重層化した数層よりなる扁平組織により構成する。すなわち皮膚は基底細胞(Basal Cell)と基底細胞の上層に位置する有棘細胞(Suprabasal Cell)、顆粒細胞(Granular Cell)さらに最外層をなす角質層の数十層の細胞より形成され、単層上皮と比較して遙かに複雑な構成成分よりなる(文献3)。

基底細胞が順次上層の細胞へと分化し、十分な保護能力を獲得しつつアポトーシス類似のシステムにより死滅し脱落していくこの過程は角化と呼ばれ、表皮や口腔粘膜、角膜などの重層扁平上皮に特有な分化形態である。各角化段階の細胞層はそれぞれ固有の機能やそれに伴う細胞生物学的・生化学的な特徴を有する。このため表皮組織の創傷治癒過程は、単層上皮組織のものよりもはるかに複雑な段階

を有する。表皮組織の創傷治癒過程においては、いずれの分化段階の細胞がそれぞれどのような役割を担っているのかはわかっていない。すなわちどの層の細胞が潰瘍部に遊走し、再生し上皮化した新生表皮を構築しうるのはどの細胞に由来しているのかなどは、いまだ決定されていない。

表皮に代表される重層扁平上皮の創傷治癒機転のモデルとして、従来より2つのモデルが提唱されている(図1)(文献7, 8, 10-12)。1つは重層上皮の再上皮化においても単層上皮と同様に、基底細胞の増殖と遊走のみが重要な役割を担い、基底層より上に位置する有棘細胞は補助的な役割のみを持つか、あるいは積極的な関与がないとする考えである(スライディング仮説)(図1上)。

一方、別のモデルであるローリング仮説によると、表皮組織においては創傷外縁の有棘細胞が、基底層へと転がり落ちキャタピラのように次々と欠損した上皮を覆っていくというものである。この考えによると基底層上層の有棘細胞

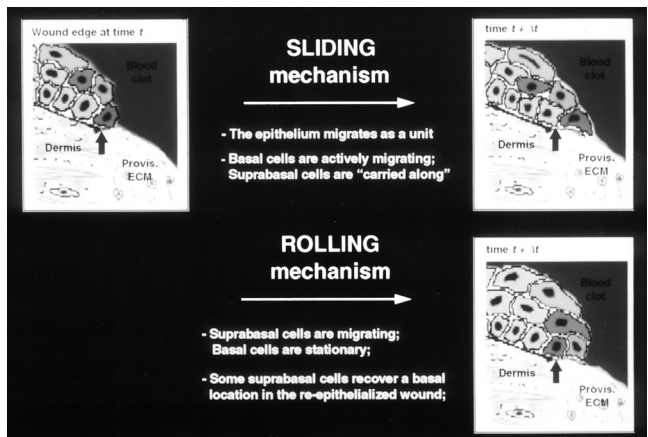


図1 これまでに提唱されている重層上皮組織の創傷治癒過程のモデル

創傷近傍の基底層の細胞のみが潰瘍面に直接遊走すると考えるスライディング仮説と、有棘層の細胞も潰瘍面に転がり落ち、上皮化に参加するとする2説が提唱されてきた。



Injury specific gene marking to follow the wound healing process under the injured epidermis specific gene recombination

Kenzo Takahashi

Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine

胞も表皮の再生に積極的な役割を果たしていることになる(図1下)。しばしば創傷治癒過程の皮膚においては、有棘層の細胞が基底細胞を乗り越え潰瘍面へと落ち込んでいるかのような組織像が観察され、このローリング仮説はこのような組織学的所見にはうまく合致する。しかしながら正常な皮膚組織においては、有棘層より上層の細胞は基底細胞より分化し分裂能を失った細胞であると考えられている。実際、マウスや人の摘出皮膚を短期間 BrdU や放射性サイミジンの存在下で標識しても正常な有棘層の細胞はラベルされてこない。このようにローリング仮説は、有棘細胞が創傷などの刺激により、再び増殖・分裂能を回復し基底細胞の性格を取り戻す脱分化を起こしうるのかという問題に直面する。このように、重層上皮の創傷治癒機転を考える上で、創傷治癒後に再上皮化した新生表皮組織が創傷部近傍の基底細胞にのみ由来するのか、あるいは基底層上層の有棘細胞にも由来するのかは、皮膚の創傷治癒研究における長年の解決すべき大きな命題である。

今回我々は、近年の遺伝子導入マウスの技術を応用し、創傷治癒にかかわる表皮角化細胞、特に有棘層の細胞にマーキングをすることで、創傷部位近傍の有棘細胞が実際の治癒過程においてどう遊走し、表皮の再生にどのような役割を担っているのかを決定したいと考えた。

2 実験方法

創傷表皮に特異的に遺伝子を誘導するために、創傷部近傍の有棘細胞に強く発現することの知られているヒトケラチン6遺伝子を利用することから始めた。我々はこれまでにヒトのケラチン6遺伝子には6種以上の同位体が存在し、それぞれ異なった発現調節をなされていることを同定している(図2)。その中より創傷やフォルボールエステル、レチノイン酸などの刺激により最も強く誘導される同位体であるケラチン6aの発現活性(表1)をトランスジェニックマウスの作製に用いることにした。

今回の研究ではすでに単離し解析を加えてきたヒトのケラチン6a遺伝子の5'側非翻訳領域の(約5kbp)をプロモーターとして利用した発現ベクターを開発した。まず始めに、この発現ベクターを用いてレポーターとなるガラクトシダーゼ蛋白質を繋げた遺伝子を構築し、この導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成し、(図3上)このプロモーターの誘導活性を様々な刺激を加えたマウスの表皮組織において検討を加えた。

この導入遺伝子を持つマウスでは実験結果(図4)に示すように創傷表皮にのみ特異的にガラクトシダーゼ遺伝子を強く発現することが観察された。このマウスを用いて創傷治癒実験を行い、治癒過程を組織学的に追跡することで、創傷治癒過程の早期における有棘細胞の遊走のようすの観察が可能となり、またこのプロモーターが創傷表皮の有棘

層よりも上層の細胞にのみ発現することを確認した。

そこでさらに創傷治癒過程後期あるいは潰瘍局面が再上皮化された後の再生表皮細胞が基底細胞あるいは有棘細胞のどちらの細胞に由来するのかを決定するために、創傷表皮に特異的な遺伝子組み替えシステムを用意した。バクテリオファージ由来のCre/LoxPの組み替えシステムを用い創傷表皮に特異的な遺伝子の組み替えを誘導し、導入した遺伝子自体をマーカーとすることで、潰瘍面に遊走する有棘細胞を追跡することを目指した。マーカーとして導入遺伝子自身を活用することで、レポーターとなる蛋白質が細胞内で変性され追跡が困難になることなく、治癒過程の後期における細胞の遊走の様子や由来の観察が可能となると考えた。創傷治癒過程の完了後に新たに再上皮化された表皮細胞がどのレポーターを発現しているのかを観察することで、新生表皮は表皮基底細胞あるいは基底層上層の有棘細胞のどちらに由来するのかを観察し、創傷治癒過程にお

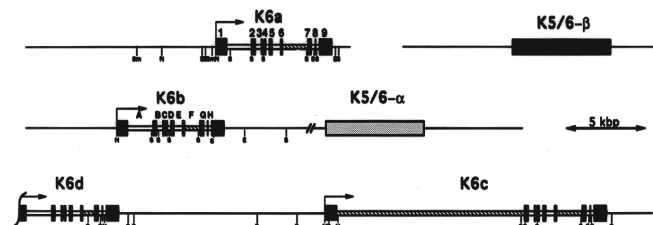


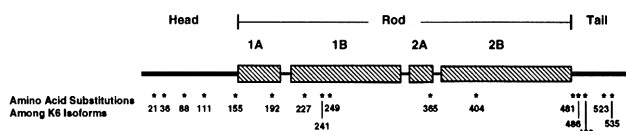
図2 ヒトケラチン6遺伝子同位体群の構造

ヒトの染色体上には少なくとも6種以上のケラチン6同位体が存在し、そのいくつかは互いに隣接して存在する。エクソン-イントロン構造や大きさなど極めて類似した構造を示す。

表1 ヒトケラチン6a遺伝子同位体群の発現様式

ケラチン6同位体は極めて類似した遺伝子構造を保持するが、発現活性は同位体間で大きく異なっている。ケラチン6a同位体がいずれの部位においても有意に発現している。

	No. of clones examined	Isoform profile					
		K6a	K6b	K6c	K6d	K6e	K6f
Skin cDNA library	64	77%	13%	0%	0%	5%	5%
		K6a	K6b + K6f	K6c	K6d + K6e		
Tissue samples							
Scalp skin	155	66%	31%	-	3%		
Sole skin	86	84%	14%	1%	1%		
SCC skin	115	69%	27%	1%	3%		
Cultured samples							
Foreskin	88	99%	1%	-	-		
NHSK	51	80%	14%	2%	4%		
SCC-13	28	96%	-	4%	-		
SCC-9	53	83%	7%	4%	6%		



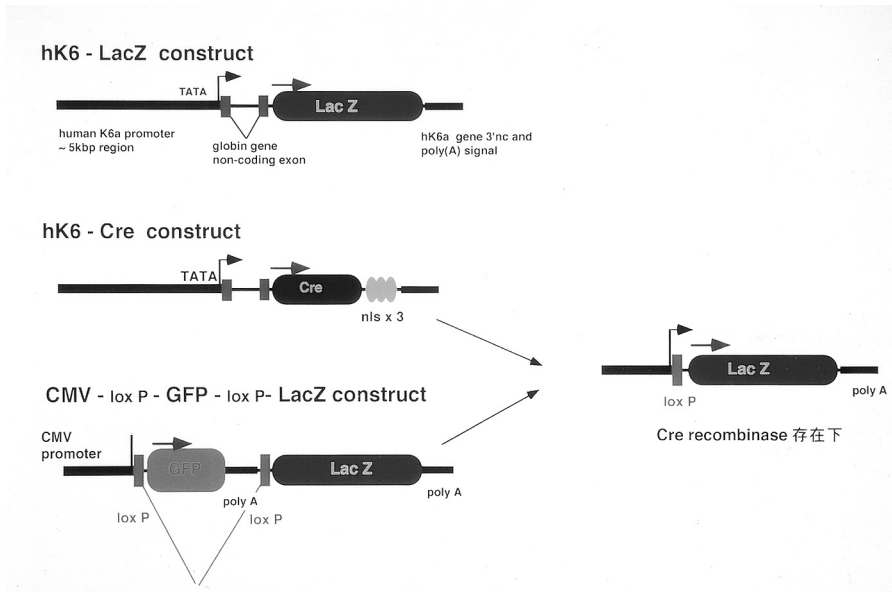


図3 導入遺伝子の構造

上段 (K6a-LacZ) がヒトケラチン 6a 遺伝子プロモーターの下流にガラクトシダーゼ遺伝子を有する。この導入遺伝子によりケラチン 6a 遺伝子を用いた発現ベクターの *in vivo* での転写活性を詳細に検討し、創傷治癒反応の初期における角化細胞の遊走の様子を検討した。中段 (K6a-Cre) はこのヒトケラチン 6a 遺伝子の発現ベクターに Cre リコンビネースを連結した導入遺伝子である。下段 (CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ) はサイトメガロウイルスプロモーターにより転写されるレポーター遺伝子を表す。第一のレポーターである緑色蛍光蛋白 (GFP) はその両端に LoxP 配列を有し、その下流には第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子が結合する。

いては有棘層の細胞が実際に分裂能を取り戻しうるのかを決定できる。

このために、次の 2 種類の導入遺伝子を構築した。1 つ目の導入遺伝子は、バクテリオファージ由来の Cre リコンビネースを創部表皮の有棘細胞にのみ特異的に誘導するためのもので、上記のヒトケラチン 6a 遺伝子由来の 5kbp のプロモーターの下流に Cre リコンビネースを連結させた (図 3 中)。さらに導入遺伝子をマウスの生体内でマーカーとして使うためのレポーター遺伝子の組み合わせをもう 1 つの導入遺伝子として用意した。第一のレポーターである緑色蛍光蛋白 (GFP) の両端に、Cre リコンビネースによって認識される LoxP 配列を配置しておく (図 3 下)。この第一レポーターの下流には第二のレポーター遺伝子としてガラクトシダーゼ遺伝子を繋げ、これらは上流に存在するウイルスのプロモーターにより、全ての細胞に発現されよう構築した。これらの導入遺伝子を染色体上に導入されたトランスジェニックマウスをそれぞれ作成し、両者をかけ合わせ、両方の導入遺伝子をもつダブルトランスジェニックマウスを創傷治癒実験に用いた。

この実験系において、創傷特異的な発現活性をもつケラチン 6a のプロモーターに誘導される Cre リコンビネースは、健全な上皮組織に発現されることはなく、LoxP 配列を認識した組み替えは起こらない。しかし、ひとたびこのダブルトランスジェニックマウスの皮膚に創傷刺激を加えると、近傍の有棘細胞においてケラチン 6a 遺伝子による Cre リコンビネースの発現が誘導され、この働きにより LoxP 配列を介した第一のレポーター遺伝子の組み替えが起こりマウスの染色体より切り離される。その結果、創傷刺激を受けた有棘細胞では第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現が誘導されると考えた。

もし創傷部位への遊走に基底細胞のみがかかわっている

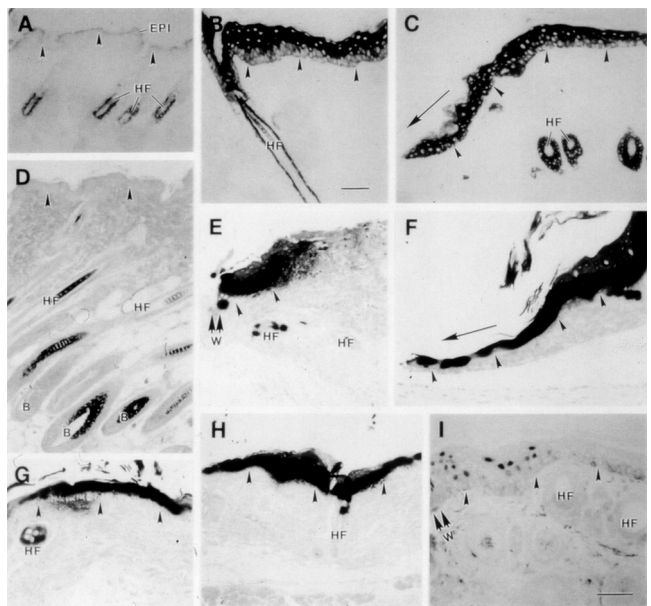


図4 K6a-LacZ 導入マウスを用いた創傷治癒実験。

創傷やフォルボールエステル、レチノイン酸塗布によりガラクトシダーゼ遺伝子は創傷近傍の有棘層の細胞に強く誘導されるが、内在性のケラチン 6a が恒常的に発現する毛囊などの表皮付属器には、全く転写活性はない。

のなら、再上皮化が完了したのちの新生表皮細胞は依然として、第一のレポーターである緑色蛍光蛋白 (GFP) のみを発現している。一方ローリング仮説が予言するように、基底層上層の有棘細胞が再上皮化にかかわるのならば、新生した表皮細胞はすでに Cre リコンビネースによるレポーター遺伝子の組み替えが起こった後なので、第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子が基底細胞から有棘層の細胞まで全ての表皮細胞層で新生表皮において観察されるはずである。

3 結果

図3に示した3種類の導入遺伝子を染色体上に組み込まれたトランスジェニックマウスをそれぞれ数系統ずつ作製した。その中で発現活性の強い子孫への導入遺伝子の伝搬の良好な2-3系のマウスに代表させ以下の実験に用いた。

まずは今回の実験系の基礎となるケラチン6a遺伝子を用いた発現ベクターの転写活性を詳細に検討するために、ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーター(図3上)とした導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて創傷治癒実験を行った。

ヒトのケラチン6蛋白質はケラチン6a同位体蛋白を含め、健全な皮膚においては、毛嚢や脂腺などの付属器の恒常的に発現しているが、表皮角化細胞には基底層から有棘層、顆粒層のいかなる細胞にも発現していない。しかし創傷やフォルボールエステルなどによる刺激を表皮に加えるとケラチン6の蛋白質は急速にそして大量に基底層よりも上層の有棘層・顆粒層の細胞に誘導される(図4)。

ヒトケラチン6a遺伝子の5kbpの非翻訳領域をプロモーターとして利用することにより、ガラクトシダーゼ遺伝子は創傷刺激やフォルボールエステル、レチノイン酸による刺激を受けた表皮や舌、口腔粘膜などの扁平上皮組織の基底層より上層の有棘細胞に強く発現誘導されたが、本来ケラチン6が恒常的に発現している毛嚢などの皮膚の付属器での転写活性は全く失活していた(図4)。このマウスでは、創傷を受けた表皮などの重層扁平上皮においてのみガラクトシダーゼ遺伝子が誘導されるが、その他の健全な表皮や他の上皮組織においては、発生、成長の段階をとおして導入遺伝子は発現されない。また創傷部においても基底層の細胞はガラクトシダーゼ遺伝子の発現は見られない。これらの結果より5kbpのケラチン6a遺伝子プロモーターは創傷表皮の有棘層のマーキングに大変有用な発現ベクターとなることが証明された。実際、創傷治癒過程の早期において、創部近傍の表皮角化細胞が潰瘍部へと遊走する様子が観察された(図4)。しかしながらこの組織像より直接に有棘層の細胞が潰瘍表面を覆い再上皮化した皮膚を構成しているとは決定できない。有棘層の細胞同様基底層の細胞も潰瘍面へと遊走し、その後の分化過程により基底層上層へと角化した細胞がガラクトシダーゼ遺伝子を発現するに至ったとも考えられるためである。また再上皮化が終了した後の再生表皮においては一旦発現したガラクトシダーゼ蛋白は遺伝子の発現がなくなり、蛋白の分解により観察されなくなる。

そこで我々はこの発現ベクターのアイデアを進め創傷部に誘導されるガラクトシダーゼ蛋白ではなくて、遺伝子そのものを追跡マーカーとして用いる導入遺伝子のシステムを構築した。上の実験方法にあげたように部位特異的な

遺伝子組み替え作用を有するCreリコンビネースを上で検討したケラチン6aの発現ベクターを用いて誘導する。

創傷特異的な発現活性をもつケラチン6aのプロモーターに誘導されるCreリコンビネースは、健全な上皮組織に発現されることはなく、第二の導入遺伝子に存在するLoxP配列を認識した遺伝子の組み替えは起こらない。そのため健全な表皮組織においては、基底細胞から有棘層、顆粒層のすべての細胞に上流に位置するレポーターである緑色蛍光蛋白(GFP)の発現のみが観察される。しかし、ひとたびこのダブルトランスジェニックマウスの皮膚に切開を加えると、その近傍の有棘細胞においてケラチン6遺伝子によるCreリコンビネースの発現が誘導され、この働きによりLoxP配列を介した第一のレポーター遺伝子の遺伝子の組み替えが生じ、マウスの染色体より切り離される。その結果、創傷刺激を受けた有棘細胞では第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現が誘導されると考えた。もし創傷部位への遊走に基底細胞のみがかかわっているのなら、再上皮化が完了したのちの新生表皮細胞は依然として、第一のレポーターである緑色蛍光蛋白(GFP)のみを発現している。一方ローリング仮説が予想するように、基底層上層の有棘細胞が再上皮化にかかわるのならば、新生した表皮細胞はすでにCreリコンビネースによるレポーター遺伝子の組み替えが起こった後なので、第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子が基底細胞から有棘層の細胞まで全ての表皮細胞層で新生表皮において観察されるはずである。

まずは、今回開発した発現ベクターを用いたCre/LoxPの遺伝子組み替えシステムが、表皮角化細胞において有効に働くことを示すために培養表皮細胞株(DJM-1)の形質転換に用い、これらの2つの導入遺伝子をin vitroの系で強制発現させた。GFPとガラクトシダーゼ遺伝子の連結したレポーター遺伝子のみの形質転換では、第一のレポーターであるGFPの発現のみ観察され、ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は全く認められなかった。しかしCreリコンビネースの遺伝子と共発現させた際にはGFPの発現は消失しガラクトシダーゼ遺伝子の発現が確認された(図5)。これらの事実は、少なくとも培養表皮細胞においてはこの遺伝子組み替えシステムが働いていることを証明するものである。

これら2種類の導入遺伝子(図3中、下)をもつ遺伝子導入マウスを作成し、それぞれについて5-10系統のマウスのラインを獲得した。この中より発現の強い子孫へと導入遺伝子を伝搬する効率の高い系統を選び、これらを掛け合わせることで創傷治癒後期の表皮角化細胞の遊走の様子を観察した。耳にパンチにより付けた創傷後の組織を48時間後にX-Gal染色したところ、CreとLoxPの両者の導入遺伝子を持つダブルトランスジェニックマウスも創

傷周囲にガラクトシダーゼ遺伝子を誘導しているのが観察された(図6)。そこで、マウスの尾に細長い創傷を作り、経時的に再生上皮におけるガラクトシダーゼ遺伝子の発現を追跡した。マウスの尾は下床直下に尾骨があり、創傷治癒過程に真皮の創傷収縮が関与する率が少なく、上皮の遊走・再生が大きな役割を示すために用いた。

創傷治癒が完了し再上皮化の終了した後の尾皮膚の新生上皮においてはガラクトシダーゼ遺伝子は僅かの孤立的な細胞における発現しか観察されなかった(図7)。

さらに体幹部の皮膚に直径2-3cm程の皮膚全層の切除を加え、経時的な生検によりさまざまな段階でのマーカー

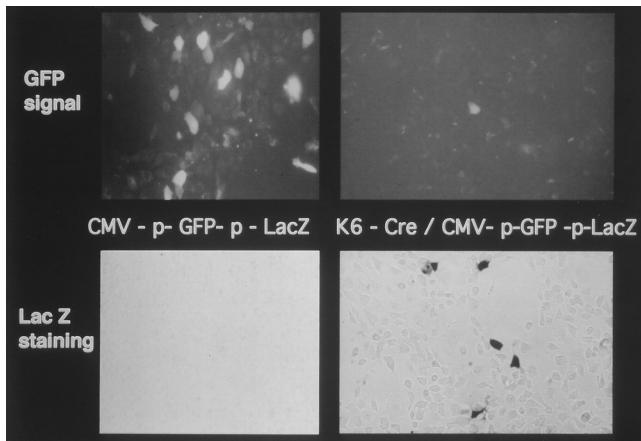


図5 培養表皮角化細胞での導入遺伝子の発現活性
CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ 遺伝子単独では、GFP 蛋白のみが発現するが、K6a-Cre と CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ の共導入においては、GFP 蛋白は切り出され発現が消失するが、LacZ が誘導されている。

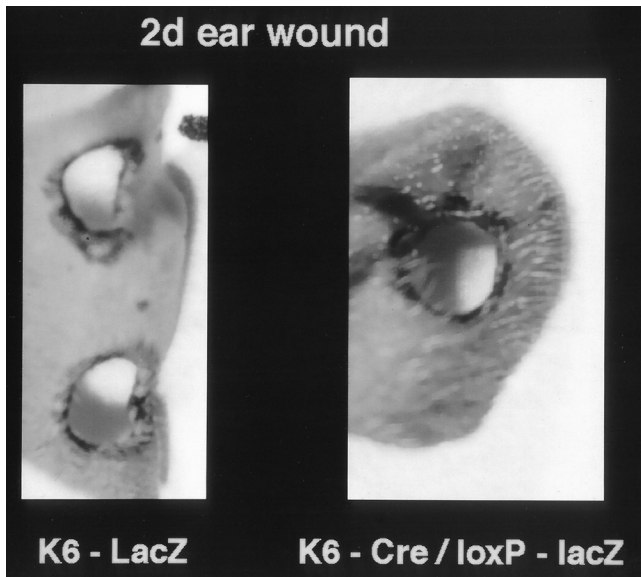


図6 マウスの耳の創縁
イーパンチ後のマウスの耳を X-Gal で染色し、導入遺伝子の転写活性を検討した。K6a-Cre と CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ のダブルトランスジェニックマウスと K6a-LacZ マウスとも創傷局面に青く染色される。

一遺伝子の発現を検討した。体幹表皮を用いたこの創傷治癒実験においても、創傷初期においては第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現が観察されたが、治癒反応の終了した後の再上皮化した表皮においては、ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する細胞は僅かにしか観察されない(図8)。

しかしながら、この事実が直ちに有棘層の細胞が創傷治癒に貢献していないことの証明であるとは断定できない。このマウスの創傷部の表皮の病理像を蛍光抗体法により観察したところ、創傷表皮における Cre リコンビネースの発現は、比較的高いレベルの有棘層あるいは顆粒層に相当する細胞にのみ限られ、基底層の近傍の細胞には発現誘導されていない。このため Cre リコンビネースによって引き起こされる遺伝子組み替えは、さらに遅れ最終的なガラクトシダーゼ遺伝子の発現は顆粒層から角層に近い層に局限するものとして観察された(図9)。そこでヒトケラチ

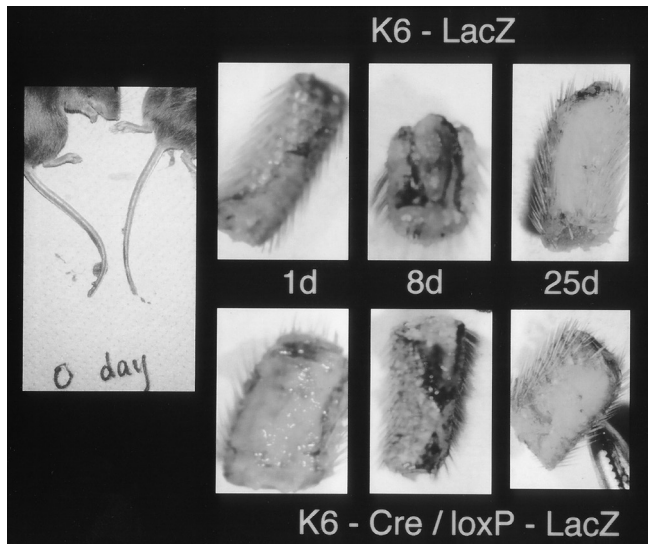


図7 マウス尾部での創傷治癒実験
創傷治癒面近傍の細胞のみ青く染色され、再生された表皮(25d)においては、染色性は消失している。

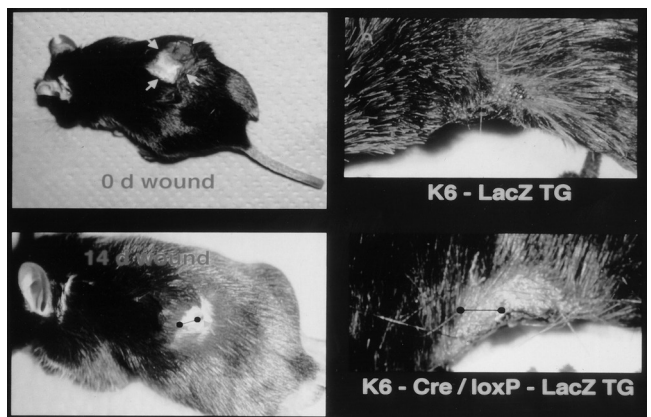


図8 マウスの体幹での創傷治癒実験
治癒過程の遊走面では青く染色されるが、再生表皮組織は LacZ 蛋白の発現は見られない。

ン6a 遺伝子により転写される Cre リコンビネースの活性を強く基底層直上付近まで誘導されるように、トランスジェニックマウスを掛け合わせ、Cre リコンビネース導入遺伝子のコピー数を増加させたマウスを創傷治癒実験に用いた。さらにこのマウス尾部に創傷を加える前処理としてフォルボールエステル (PMA) を尾部に連日塗布し、Cre リ

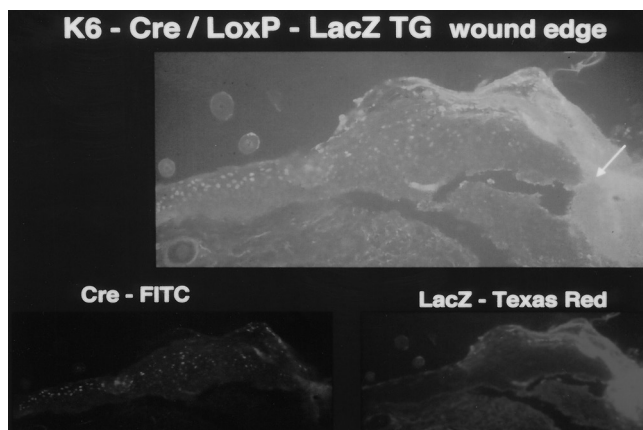


図9 マウス創傷表皮の免疫染色像

創傷表皮において Cre 蛋白は有棘層上層から顆粒層にかけて発現しているが、LacZ 蛋白はさらに表層の角化層に近い細胞にのみ発現している。

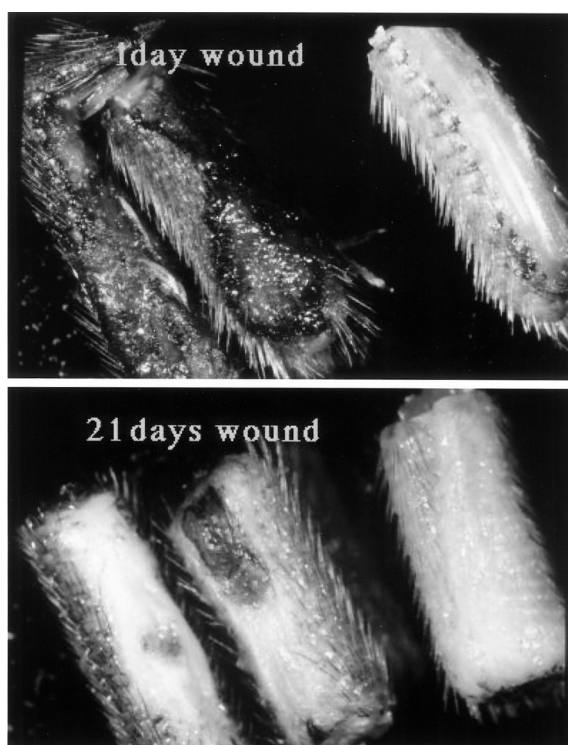


図10 フォルボールエステルによる前処理を加えたマウスの創傷治癒実験

PMA を連日塗布後に尾部に切開を加え、経時的に X-Gal で染色した。左の2ヶが、K6a-Cre と CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ のダブルトランスジェニックマウスで、右の尾が K6a-LacZ マウスのものである。傷面へむかう遊走表皮細胞は青く染色されるが、再生表皮は青く染まらない。

コンビネースをあらかじめ有棘層へと誘導しておいて切開を加える治癒実験を行った。創傷治癒過程の早期においては上記の実験同様に潰瘍面や遊走する細胞にガラクトシダーゼ遺伝子の発現が観察される。さらに健全な尾部表皮全体にもガラクトシダーゼ遺伝子が発現するがこれは全処理のフォルボールエステル塗布により創傷刺激を加える前よりガラクトシダーゼ遺伝子が誘導されていたことを示す (図10上)。治癒過程後期の尾部においても、潰瘍面へと遊走していく角化細胞にはガラクトシダーゼ遺伝子の発現が観察されるが、その遊走面と健全表皮の間の再上皮化の完成した再生表皮においてはガラクトシダーゼ遺伝子の発現は見られない。なおこのころには健全表皮のガラクトシダーゼ遺伝子の発現は消失している (図10下)。

4 結語

これまで上記の導入遺伝子を持つマウスの尾部や体幹の皮膚に大きめの切開を加え、さまざまな段階でのマーカー遺伝子の発現を検討してきた。創傷初期から早期においては第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現は潰瘍へ遊走する細胞に発現する様子が観察されたが、治癒反応の終了した後の再上皮化した表皮細胞においてはガラクトシダーゼ遺伝子を発現する細胞は僅かにであった。この結果は創傷の前処理としてフォルボールエステルによる誘導を試みたマウスにおいても同様であった。

これらの事実を考えると重層上皮においても、ローリング仮説の予想するような有棘層の細胞が再び基底層の細胞へと脱分化し、再生・分裂能を回復するとする考えは証明され得なかった。今後は、単層上皮同様に、表皮組織においてもスライディング仮説が予測するように基底層のみが創傷治癒に重要であるのか、あるいはこの実験系では十分に検証できない欠点があるのかを検討していきたい。

謝辞

この研究のためご支援いただきましたコスメトロジー研究財団に心より感謝いたします。

(文献)

- 1) Pauline Wong, Emma Colucci-Guyon, Kenzo Takahashi, Changhong Gu, and Pierre A Coulombe. "Introducing a Null Mutation in the Mouse K6a and K6b Genes Reveals Their essential Structural Role in Oral Mucosa Epithelia." **J. Cell Biol.** 150, 921-928 2000
- 2) Reiko Inada, Masato Matsuki, Keiko Yamada, Yoichi Morishima, Shen-Chun Shen, Nobuo Kuramoto, Hirokazu Yasuno, Kenzo Takahashi, Yoshiki Miyachi and Kiyofumi Yamanishi "Facilitated Wound Healing

-
- by Activation of the Transglutaminase 1 Gene." **Am J Pathol.** 157 (6), 1875-1882, 2000
- 3) Kenzo Takahashi, Pierre A. Coulombe and Yoshiki Miyachi. "Using transgenic models to study the pathogenesis of keratin-based inherited skin diseases." **J. Dermatol. Sci.** 21(2), 73-95 1999
- 4) Kenzo Takahashi, Bing Young, Kiyofumi Yamanishi, Sadao Imamura and Pierre A. Coulombe. "Two functional keratin 6 genes of mouse show a differential regulation and evolved independently from their human orthologs." **Genomics** 53 (2), 170-183, 1998
- 5) Kenzo Takahashi and Pierre A. Coulombe. "Defining a region of the human keratin 6a gene that confers inducible expression in stratified epithelia of transgenic mice." **J. Biol. Chem.** 272 (18), 11979-11985, 1997
- 6) Kenzo Takahashi and Pierre A. Coulombe. "A transgenic mouse model with an inducible skin blistering disease phenotype." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93, 14776-14781, 1996
- 7) Rudolph D. Paladini, Kenzo Takahashi, Nicola S. Bravo and Pierre A. Coulombe "Onset of Re-epithelization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining role for keratin 16" **J. Cell Biol.** 132, 381-398, 1996
- 8) Kenzo Takahashi. and Pierre A. Coulombe. "The cellular mechanisms of keratinocyte migration into a skin wound site: An open question with important implications" **Cell Vision, J Analytical Morphology** 3 (3), 217-223, 1996
- 9) Kenzo Takahashi, Rudy Paladini and Pierre A. Coulombe. "Cloning and characterization of multiple human genes and cDNAs encoding highly-related type II keratin 6 isoforms." **J. Biol. Chem.** 270 (31), 18581-18592, 1995
- 10) Pierre A. Coulombe, Nicola S. Bravo, Rudolph D. Paladini, Diem Nguyen and Kenzo Takahashi. "Overexpression of human keratin 16 produces a distinct skin phenotype in transgenic mouse skin." **Biochem. Cell Biol.** 73 (9-10), 611-618, 1995
- 11) Rudolph D. Paladini, Kenzo Takahashi, Tracey M. Gant and Pierre A. Coulombe. "cDNA cloning and bacterial expression of the human type I keratin 16" **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 215 (2), 517-523, 1995
- 12) Kenzo Takahashi, Janet Folmer and Pierre A. Coulombe. "Increased expression of keratin 16 causes anomalies in cytoarchitecture and keratinization in transgenic mouse skin." **J. Cell Biol.** 127 (2), 505-520, 1994