

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10036

研究課題名(和文) 虚血に耐性を持つ培養皮膚の開発

研究課題名(英文) Development of cultured skin which has tolerance in ischemia.

研究代表者

猪口 貞樹 (INOKUCHI, Sadaki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60160008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】PHD阻害剤で培養皮膚に低酸素応答を惹起させることで移植後の細胞が虚血に耐性を示すか否か検討した。【方法と結果】各種PHD阻害剤によるヒト表皮細胞(NHK)、真皮線維芽細胞(HDF)の遺伝子発現変化を網羅的に解析。一部をqPCR、ELISAにて確認した。17種類のHIF-1下流遺伝子が変化した。PHD阻害剤で処理した細胞を免疫不全動物へ移植したところ生着率は低く、再生表皮の剥離脱落が見られた。【考案】PHD阻害剤はHDFからのVEGF分泌を促進するが、皮膚再生を阻害する可能性があり、投与方法などについてさらに検討を要する。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that, when hypoxic response was induced by PHD inhibitors, cultured human skin may get tolerance to ischemia. We examined the expression of HIF-1 downstream genes of normal human keratinocytes (NHK) and human dermal fibroblasts (HDF), after treatment with PHD inhibitors. Change of gene expression was slightly different by cell species. Increased secretion of VEGF from HDF was observed. However, when the treated cells were transplanted into nude mice, mature skin was not regenerated. These results indicate PHD inhibitors may obstruct regeneration of the cultured skin. Further study is required.

研究分野：救急医学

キーワード：再生医療 培養皮膚 PHD阻害剤 血管新生 低酸素応答

1. 研究開始当初の背景

(1)現在、重症熱傷の治療に培養表皮細胞のみからなる細胞シートが用いられているが、真皮を欠く皮膚全総欠損創には生着し難い。

(2)一方、真皮由来線維芽細胞と表皮細胞をハイブリット化した複合型自家培養皮膚は皮膚全層欠損創にも生着するが、重症熱傷の治療に用いる場合、移植後早期の虚血と感染に対する脆弱性が重要な課題として残されている。

(3)hypoxia inducible factor-1 (以下 HIF-1) は低酸素応答に重要な役割を持つ転写因子であるが、prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (以下 PHD2) による不活性化で制御されている。PHD2 阻害剤により HIF-1 が安定化すると、低酸素応答が起こるが、その変化は細胞腫によって異なることが知られている。

(4)以上の知見から、PHD2 の阻害によって移植する皮膚細胞に低酸素応答を起こすことで、低酸素に対する耐性が誘導できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的は、複合型自家培養皮膚移植後早期の虚血に対応するため、PHD 阻害剤によって低酸素応答や創傷治療に関わる HIF-1 を安定化したヒト培養表皮細胞・真皮線維芽細胞を用い、虚血に耐性を持つヒト培養皮膚を開発することである。

3. 研究の方法

(1)各種 PHD 阻害剤によるヒト表皮細胞 (以下 NHK)、真皮線維芽細胞 (以下 HDF)、HaCaT 細胞 (以下 HaCaT) における低酸素誘導因子 (HIF-1) の安定化を western blot にて確認した。なお、本研究では PHD 阻害剤として、DF0 (鉄イオンのキレート剤)、CoCl₂ (金属依存性酵素の阻害剤)、DMOG (PHD の非特異的阻害剤)、新規に開発した阻害剤 TM6008 (PHD2 特異的阻害剤) を用いた。

(2)NHK、HDF、HaCaT を各種濃度の PHD 阻害剤 (DMOG、DF0、CoCl₂ および TM6008) に暴露後、経時的に RNA を回収し、cDNA マイクロアレイ (39,031 probes) を用いて発現遺伝子の網羅的解析を行った。

(3)NHK、HDF で大きく変化した HIF-1 下流遺伝子の一部について、DMOG および TM6008 に暴露後の qPCR による相対発現量を確認 (PHD 阻害剤で影響を受けない RPL5 をリファレンスに使用) し、さらに培地中の分泌蛋白の ELISA による定量を行った。以上を反復のうえ、遺伝子発現の変化を統計的に検討した。

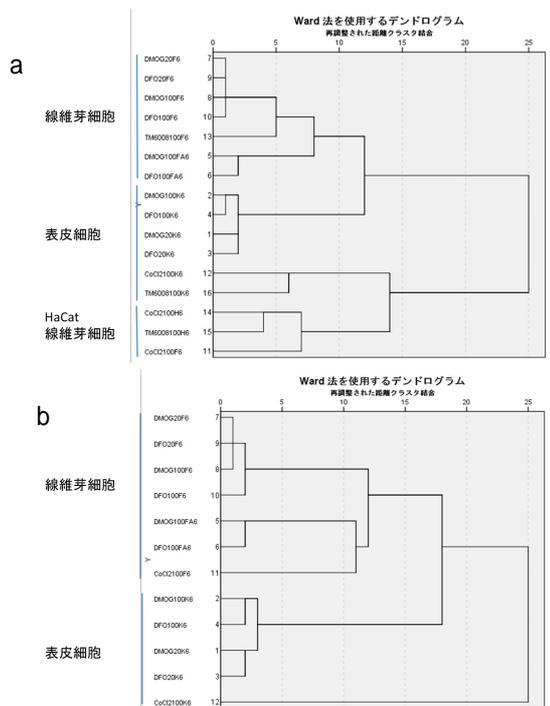
(4)PHD 阻害剤の細胞障害性を MTT 法で確認のうえ、DMOG、TM6008 で処理した HDF と未処理の NHK を混合して免疫不全マウス皮下に移植し、再生された皮膚を病理組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1)各種 PHD 阻害剤の添加により、NHK、HDF、HaCaT における低酸素誘導因子 (HIF-1) の安定化が確認された。

(2)各種濃度の PHD 阻害剤に暴露後、経時的に RNA を回収し、cDNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子の網羅的解析を行った。階層クラスター解析では、各 PHD 阻害剤に対する NHK と HDF の遺伝子発現の変化は明らかに異なっていた。NHK と HDF の DMOG、DF0 による遺伝子発現の変化はそれぞれ類似していたが、CoCl₂、TM6008 による変化はこれらとはやや異なっていた。(図 1)

図 1: 各種細胞への PHD 阻害剤暴露 (20 ~ 100 μM、6 時間) に対する全遺伝子発現変化 (logFc) のクラスター解析。Ward 法によるデンドログラム。K: NHK、F: FA: 包皮・軀幹由来 HDF、H: HaCaT。a は全ての細胞・阻害剤を含む、b は HaCaT・TM6008 を除く解析。



上記マイクロアレイのデータから、PHD 阻害剤に対して logFC が 1 以上増加した NHK および HDF の遺伝子をそれぞれ 486probes、341probes 抽出した。このうち DF0 および DMOG100 μM に対して logFC が 1 以上変化した既知・推定 HIF-1 下流遺伝子は、HDF 64、NHK 32、両者共通 13 (うち既知遺伝子 7) で、両者共通の変化は低酸素環境下のエネルギー代謝、アポトーシスへの抵抗性、ミトコンド

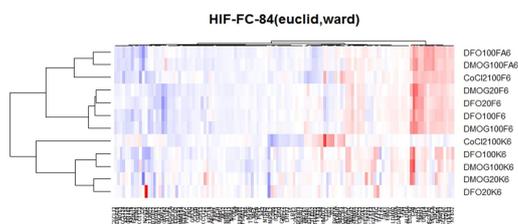
リア・オートファジー、細胞増殖などに関連するものであった(表1)。

表1 : DFO および DMOG100 μ M に対し、NHK、HDF に共通して logFC が 1 以上変化した既知・推定 HIF1 下流遺伝子 (赤字は既知)

ANKRD37	ENO2
BNIP3	NDRG1
BNIP3L(NIX)	PFKFB3
CA9	RAB20
DDIT4	RCOR2
EGLN1	SERTAD1
EGLN3	

PHD 阻害剤 (DMOG、DFO、CoCl₂) に対する各細胞の既知の HIF-1 下流遺伝子 (84 種類) の発現変化を確認したところ、全遺伝子発現の変化と同様に、DMOG、DFO による HDF の変化は類似していたが、DMOG、DFO による NHK の変化とは異なり、また CoCl₂ に対する変化、特に NHK の変化は他と異なっていた (図2)。

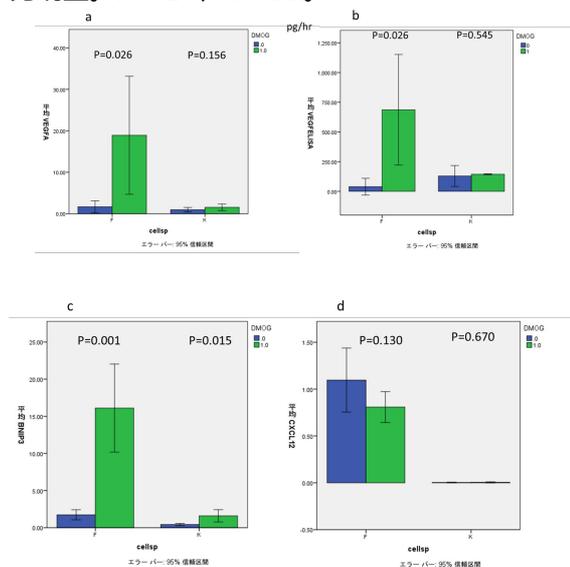
図2 : 各種細胞への PHD 阻害剤暴露 (20 ~ 100 μ M、6 時間) に対する HIF-1 下流遺伝子 84 種類の発現変化 (logFc の heatmap)。右欄の K:NHK、F:FA:包皮・軀幹由来 HDF、上・左欄はデンドログラム (ward 法)、下欄は各遺伝子の名称を示す。



HIF-1 下流遺伝子の発現変化 (logFC) の相関分析を行った。DMOG と DFO による HDF の発現変化は非常に良く相関しており (相関係数 0.891)、特異的に大きく変化したのは MX11、VEGFA、HK2 であった。NHK でも DMOG と DFO による遺伝子発現の変化はよく相関しており (相関係数 0.514)、特異的に大きく変化したのは IGFBP3、ADM、CXCL12 であった。CoCl₂ と DMOG による NHK の遺伝子発現の変化に有意の相関は見られなかった。

(3) 変化の大きな一部の HIF-1 下流遺伝子について、NHK、HDF を DMOG に暴露した後、qPCR および ELISA で発現・分泌を確認した。DMOG100 μ M、6 時間の添加により、NHK、HDF いずれでも BNIP3、EGLN1 (PHD2)、VEGFA の相対発現量が増加、また HDF では VEGF の分泌速度が大幅に増加した (図3)。CXCL12 は HDF で相対発現量が低下、NHK での発現量はわずかであった。IGFBP3 は NHK で相対発現量が増加したが、分泌蛋白は検出感度以下であった。

図3 : DMOG100 μ M で 6 時間暴露後の NHK および HDF の VEGFA 相対発現量 (a) と VEGF の分泌速度 (b)、BNIP3 (c)、CXCL12 (d) の相対発現量。F: HDF、K: NHK。



(4) 各 PHD 阻害剤を 48 時間暴露して細胞障害性を確認したところ、TM6008 には明らかな細胞障害性が見られた。また、NHK に対して DFO は 20 μ M 以上で明らかな細胞障害性を認められたが、DMOG は 50 μ M 以上でのみ軽微な障害性が見られた。

TM6008 処理 HDF と NHK を免疫不全マウスに移植したが、生着しなかった。一方 DMOG 処理細胞の免疫不全マウス皮下移植後における結節形成率も約 20% と低く、病理組織学的に再生表皮の剥離脱落が見られた。

(5) 本研究の結果から、PHD 阻害剤によって NHK および HDF の HIF-1 が安定化し、低酸素応答が起こることが明らかになった。変化する遺伝子は細胞種によってやや異なるが、10% 程度は既知または推定 HIF1 下流遺伝子で、一部は両細胞に共通しており、低酸素環境下のエネルギー代謝、アポトーシスへの抵抗性、ミトコンドリア・オートファジー、細胞増殖などに関連するものであった。また、HDF からの VEGF 分泌が大きく増加することが確認された。以上から、PHD 阻害剤は細胞移植時の虚血への対応に利用できる可能性が高いと考えられた。

一方、新規阻害剤 TM6008 は水に難溶性で培養細胞への細胞障害性が見られ、NHK、HDF の遺伝子変化も他の阻害剤と異なっており、培養細胞への利用は困難と思われた。DFO にも NHK に軽度の細胞障害性が認められたこと、また現在原因は明らかでないが、細胞障害性の少ない DMOG でも移植後の皮膚再生を阻害する可能性が否定できなかったことから、*ex vivo* で PHD 阻害剤を使用するのは難しい可能性がある。

今後は、細胞移植時の PHD 阻害剤全身投与

や阻害剤を基質に封入して徐放性に低濃度長時間投与するなど、PHD 阻害剤の適切な投与法についても検討する必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪口 貞樹(INOKUCHI, Sadaki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：60160008

(2)研究分担者

安藤 潔(ANDO, Kiyoshi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70176014

椎名 隆 (SHIINA, Takashi)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：00317744

平山 令明(HIRAYAMA, Noriaki)
東海大学・先進生命科学研究所・教授
研究者番号：70238393

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

城所 正子(KIDOKORO, Masako)
東海大学・医学部・研究技術員

田中 真紀子(TANAKA, Makiko)
東海大学・医学部・研究技術員