

## 自己評価報告書

平成 22 年 4 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2012

課題番号：20591534

研究課題名 (和文) 幅広い抗菌活性を持つ培養皮膚の開発

研究課題名 (英文) Introduction of human  $\beta$ -defensin-3 and human cathelicidin antimicrobial peptide-18 into cultured human skin cells.

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

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植・再生医療、培養皮膚、抗菌ペプチド、ウイルスベクター、LL37、hBD3

## 1. 研究計画の概要

- (1) 培養皮膚移植による重症熱傷の治療は広く実施されているが、感染創に対する生着率は低い。培養皮膚の抗菌活性を改善することにより生着性を改善し、重症熱傷の救命率を向上することが期待できる。
- (2) 本研究では、2種類の抗菌ペプチド (HBD-3 および hCAP-18/LL37) 遺伝子を、組み換えウイルスベクターを用いてヒト培養表皮細胞・線維芽細胞に導入し、遺伝子導入細胞を用いて広い抗菌活性を持つ培養皮膚を作製することである。

## 2. 研究の進捗状況

- (1) LL37 は、緑膿菌標準株および多剤耐性緑膿菌 (MDRP) に対して抗菌活性を示し、塩濃度に影響され難いことを確認した。
- (2) hCAP18/LL37c-DNA をクローニングし、組み換えアデノウイルスベクターを作製した。同ウイルス感染細胞には導入遺伝子の発現が確認され、培養上清は緑膿菌標準株に対して殺菌的抗菌活性を示した。
- (3) 上記 hCAP-18/LL37 遺伝子と HBD3 遺伝子をタンデムに連結したものを組み換えたアデノウイルスベクターを作製した。同ウイルスを細胞株へ感染したところ、hCAP-18/LL37 遺伝子および HBD3 遺伝子が同時に発現していることが確認された。
- (4) 現在、上記 (3) のウイルス感染細胞からの抗菌ペプチドの分泌、培養上清の抗菌活性を確認中である。

## 3. 現在までの達成度

②概ね順調に進展している。

理由：各組み換えウイルスベクターを作製し、これを用いて細胞株に遺伝子導入を行い、導

入遺伝子が発現することを確認している。in vitro の研究は、期間内に概ね終了すると考えられる。

## 4. 今後の研究の推進方策

- (1) 本年度は、既に作製した組み換えアデノウイルスベクターにより、ヒト培養表皮・線維芽細胞へ hCAP18/LL37 遺伝子および HBD-3 遺伝子を同時導入し、細胞からの活性型 LL37、hBD3 の分泌を確認する。また細胞培養上清の抗菌スペクトラムを計測する。
- (2) 上記が順調に推移すれば、さらに in vivo において培養皮膚の抗菌性向上を確認する予定である。

## 5. 代表的な研究成果

(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 1 件)

- ① □ Suzuki Y, Inokuchi S, Takazawa K, Umezawa K, Saito T, Kidokoro M, Tanaka M, Matsuzawa H, Inoue S, Tuchiya I, Ando K. Introduction of human  $\beta$ -defensin-3 into cultured human keratinocytes and fibroblasts by infection of a recombinant adenovirus vector. Burns. 2011 Feb;37(1):109-16. 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① □  $\beta$ -デフェンシンの抗菌活性と遺伝子組換え細胞の作製、遺伝子発現の検討。鈴木陽介, 井上茂亮, 斉藤剛, 梅澤和夫, 田中真紀子, 城所正子, 猪口貞樹. 熱傷 (0285-113X) 34 巻 2 号 Page121

(2008. 06)

- ②□培養皮膚の抗菌性向上を目指して human- $\beta$ -defensin 遺伝子組換え細胞のさらなる検討。鈴木陽介、梅澤和夫、井上茂亮、高澤研丞、斉藤剛、田中真紀子、城所正子、猪口貞樹。熱傷 (0285-113X) 34 卷 4 号 Page204 (2008. 11)