

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592112

研究課題名（和文）動物実験による  $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮の有効性の検証研究課題名（英文）Verification for the effectiveness of  $\beta 3$  integrin-recombinant cultured epithelium by animal experiments

研究代表者

久保 美代子 (KUBO MIYOKO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00098609

研究成果の概要（和文）：

われわれは $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮の有効性を動物実験により検証した。 $\beta 3$  インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトをレトロウイルスベクター法により作製した。Cell sorting により $\beta 3$  陽性細胞を増加させ（89%）、フィブリンゲル上で5日間培養して培養表皮を作製した。ヌードマウスの創傷治癒遅延モデル（マイトマイシンC外用により作製）での全層皮膚欠損創に同培養表皮を移植し（コントロール培養表皮： $\beta$ -galactosidase cDNA 導入ヒトケラチノサイトを使用）、経時的（1, 2, 3 週）に組織学的検査を行った。その結果、 $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮は、1～3 週のすべての時期においてコントロール培養表皮に比べて軽度から中等度に生着率が増加した。同培養表皮の *in vivo* での有効性を結論づけるために今後さらに実験条件を改善して検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：

We verified the effectiveness of  $\beta 3$  integrin-recombinant cultured epithelium by animal experiments. Human keratinocytes were transduced with  $\beta 3$  integrin subunit cDNA by a retrovirus-mediated transduction method.  $\beta 3$  positive cells were enriched by cell sorting (89% positive), and were cultured on fibrin gels for 5 days to make the cultured epithelium. The cultured epithelia were transplanted to the backs of nude mice on which full-thickness wounds were topically treated with Mitomycin C to make a retarded wound healing model. Cultured epithelia made of  $\beta$ -galactosidase cDNA-transduced keratinocytes were used as a control. Histological examination was done with the samples taken at three time points (1, 2, 3 weeks). Cultured epithelia made of  $\beta 3$ -recombinant keratinocytes increased its take-rate in a slight to moderate degree at all time points. Further experiments should be done to determine the effectiveness of the cultured epithelium *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学, 培養表皮

## 1. 研究開始当初の背景

培養表皮移植は、1981 年、O' Connor らが

はじめて自家培養表皮移植の成功例を報告して以来すでに 30 年の歴史を有し、国内外

での再生医療の最先端の分野である。国内においては、2007年、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングが日本初の再生医療製品として自家培養表皮ジェイス®の製造承認を取得した。しかし、現在、国内外で使用されている培養表皮の生着率は、Ⅲ度熱傷創で平均18%と非常に低く、また褥瘡、静脈うっ滞性潰瘍、糖尿病性潰瘍などの慢性創傷においては30-60%程度である。生着率向上のために改良型培養表皮の開発が望まれている。

インテグリンは、細胞接着分子の1ファミリーであり、細胞と細胞外マトリックス、また細胞と細胞とを結合する膜介在のレセプターである。創傷治癒、器官形成、癌浸潤・転移機構などに重要な役割を果たす。急性創傷での再上皮化過程において遊走表皮細胞は、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 5$ 、 $\alpha \nu \beta 6$ などのインテグリン発現をup-regulateするが、 $\alpha \nu \beta 3$ は発現しない。 $\alpha \nu \beta 3$ は、創傷部に多く存在するフィブリノーゲン (FG)、フィブリン (FB)、変性コラーゲン (gelatin) (GEL)、ビトロネクチン (VN)、フィブロネクチン (FN) など多種類の細胞外マトリックスと反応するインテグリンである。 $\alpha \nu \beta 3$ は、血管内皮細胞、線維芽細胞で発現し、血管新生、肉芽組織形成に機能を果たす。

久保らは、これまでの研究において、正常培養ヒトケラチノサイトは、*in vivo* におけると同様に $\alpha \nu \beta 3$ を発現しないことを確認し、またFG、FBに接着せず、移動しないことをはじめて報告した。さらにレトロウイルスベクター法により $\beta 3$ インテグリン・サブユニットcDNAを導入したヒトケラチノサイトは、細胞表面に $\alpha \nu \beta 3$ を発現し、リガンドであるFG、FB、GEL、VN、FNに対してコントロール細胞 ( $\beta$ -galactosidase cDNA導入ヒトケラチノサイト、正常ヒトケラチノサイト) に比べて有意に細胞接着が増加し、細胞伸展が増加することを示した。そしてこのFB、GELに対する細胞接着は、 $\alpha \nu \beta 3$ ならびにRGDに依存性であることを証明した。加えて、5日間のcell growth assayにおいて $\beta 3$ インテグリン・サブユニットcDNA導入ヒトケラチノサイトはFG、FB、VN、GEL上でコントロール細胞に比べて有意に細胞増殖が増加すること、また14時間のhaptotaxis migration assayにおいて同ケラチノサイトはFG、FB、GEL、VN、FNに対してコントロール細胞に比べて有意に

細胞移動が増加することを明らかにした。

このように、現在までに得られた*in vitro*での諸細胞機能の検索結果は、 $\beta 3$ インテグリン・サブユニットcDNA導入ヒトケラチノサイト (recombinant keratinocytes) を使用して作製する培養表皮が難治性の深い熱傷創や慢性創傷部 (FG, FB, GEL が多く存在する) への培養表皮移植片の生着率向上に有用であることを強く示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、種々の難治性の創傷部、すなわち深い熱傷創ならびに慢性創傷部にも生着率の高い培養表皮を分子生物学的手法を用いて開発することである。私たちは、 $\alpha \nu \beta 3$ の機能—創傷部に多く存在するFG, FB, GEL, VN, FNなどと反応 (接着, 移動, 増殖) し得る—に着目し、レトロウイルスベクター法により $\beta 3$ インテグリン・サブユニットcDNAを正常培養ヒトケラチノサイト ( $\alpha \nu$ の遺伝子は持っている) に導入し、 $\alpha \nu \beta 3$ を細胞表面に発現させて、FG, FB, GELと反応し得る機能を付加することを考えた。このようにして分子生物学的に工作した培養ヒトケラチノサイト (recombinant keratinocytes) を使用して作製する培養表皮は、創傷部に多く存在するFG, FB, GELなどと反応 (接着, 移動, 増殖) し、それにより移植片の生着率を向上させることが可能であると理論的に推測できた。

私たちは、現在までに $\beta 3$ インテグリン・サブユニットcDNA導入ヒトケラチノサイトの*in vitro*での諸細胞機能の解析をほぼ終了したので、本研究において、 $\beta 3$ インテグリン組み換え型培養表皮の*in vivo*での有効性を動物実験により検証した。そのために研究期間内に次のことを行った。(1)  $\beta 3$ インテグリン・サブユニットcDNA導入ヒトケラチノサイトを作製した。(2)  $\beta 3$ インテグリン組み換え型培養表皮作製法を決定した。(3) ノードマウスを用いて創傷治癒遅延モデルを作製した。(4) ノードマウスでの創傷治癒遅延モデルにおいて $\beta 3$ インテグリン組み換え型培養表皮の生着率向上に対する有効性を検証した。

また本研究の最終的目標は、同培養表皮を臨床に応用することであり、商品化することである。

### 3. 研究の方法

(1)  $\beta 3$  インテグリン・サブユニット cDNA 導入ヒトケラチノサイトを作製した.

レトロウイルスベクター法により $\beta 3$  インテグリン・サブユニット cDNA を正常ヒトケラチノサイトに導入した. 具体的には, 高力価  $\beta 3$ -組み換えレトロウイルスの producer cells (米国ですでにクローニングをし, 凍結保存してある) を培養し, その上清中の $\beta 3$ -組み換えレトロウイルスを正常ヒトケラチノサイト (Cascade 社) に感染させた. 培地は EpiLife + growth factor (Cascade 社) を用いた. Subconfluent の状態で同ケラチノサイトを凍結保存した. 凍結保存したケラチノサイトを培養して,  $\alpha v\beta 3$  の蛋白発現を蛍光抗体法ならびに FACS により確認した後, cell sorting により  $\alpha v\beta 3$  発現陽性細胞の enrichment を行った. そしてそれらをさらに増殖させた後, 再び凍結保存した. コントロール細胞として, 同様方法により  $\beta$ -galactosidase cDNA 導入ヒトケラチノサイトを作製した.

(2)  $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮作製法を決定した.

以下の方法について検討した.

① I 型コラーゲン膜を使用して培養表皮を作製した.

市販の I 型コラーゲン膜上で $\beta 3$  インテグリン・サブユニット cDNA 導入ヒトケラチノサイトを培養して培養表皮を作製した. コントロール細胞として,  $\beta$ -galactosidase cDNA 導入ヒトケラチノサイトを用いた. I 型コラーゲン膜として, 豚由来コラーゲン膜 (ペルナック<sup>®</sup>) と細胞培養用透過性コラーゲン膜 (AteloCell<sup>®</sup>) とを比較した.

②コラーゲングル, フィブリンゲルを使用して培養表皮を作製した.

高研社のアテロコラーゲン, Carbiochem 社のフィブリノーゲンを材料として, 所定のプロトコールによりコラーゲン溶液, フィブリノーゲン溶液を作製した. 24 well plate 用の CellCrown Insert にそれらの溶液を 200  $\mu$ l ずつ加えて, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間 (37°C) インキュベートしてゲル化させた (フィブリン作製時はトロンビンを加えてゲル化させた). コラーゲングル, フィブリンゲル上で上記細胞を EpiLife + growth factor 培地で 5 日間培養して培養表皮を作製

した.

(3) ヌードマウスを用いて創傷治癒遅延モデルを作製した.

免疫不全マウス (ヌードマウス) を実験動物として用いた. 動物実験モデルとして, 急性創傷モデルでは創傷治癒経過が早いために  $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮とコントロール培養表皮との間に効果の差を生じにくいことが予想されたので, 創傷治癒遅延モデルを作製する必要があった. 創傷治癒遅延モデル作製法として, 以下の方法について検討した.

①マイトマイシン C 外用により創傷治癒遅延モデルを作製した.

ヌードマウスの背部皮膚に full-thickness wounds を 2 箇所ずつ作製し, 皮下にシリコンチャンバー (lower chamber, 直径 11 mm) を装着後, マイトマイシン C 溶液 (0.5 mg/ml 濃度, 0.2~0.3 ml) をガーゼに含浸させたものを 5 分間, 潰瘍部に適用した. PBS で洗浄後, シリコンチャンバー (upper chamber) をかぶせ, 皮膚を含めて 2 箇所縫合し, 絆創膏を貼付して創部を固定した. 経時的 (1, 2, 3 週後) に潰瘍部の状態を肉眼的ならびに組織学的に観察し, コントロール群 (PBS ガーゼ, 5 分間処置) と比較検討した.

②ストレプトゾトシン投与により糖尿病モデルマウスを作製した.

ヌードマウスにストレプトゾトシン溶解液を 2 日間, 連続で腹腔内投与 (100 mg/kg) した. 3-7 日毎に血糖値を測定し, 高血糖 (血糖値 400 mg/dl 以上) になった時点で, 背部に 1.5 cm 四方の全層皮膚欠損創を作製した. 潰瘍部の経時的観察は①と同様に行った. そしてコントロール群 (生食を腹腔内投与) と比較検討した.

(4) ヌードマウスでの創傷治癒遅延モデルにおいて $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮の有効性を検証した.

(3) で比較した創傷治癒遅延モデルのうち, マイトマイシン C 外用による方法を採用した.  $\beta 3$  インテグリン・サブユニット cDNA 導入ヒトケラチノサイトを使用して作製した培養表皮を移植し, 培養表皮の生着率への効果を経時的な肉眼的ならびに組織学的検索によりコントロール群 ( $\beta$ -galactosidase

cDNA 導入ヒトケラチノサイト使用の培養表皮を適用)と比較検討した。培養表皮作製法は、(2)で検討したうちの最適のもの、すなわちフィブリンゲル上で細胞を培養して培養表皮を作製する方法を採用した。

#### 4. 研究成果

(1)  $\beta 3$  インテグリン・サブユニット cDNA 導入ヒトケラチノサイトを作製した。

レトロウイルスベクター法により  $\beta 3$  インテグリン・サブユニット cDNA を正常ヒトケラチノサイトに導入した。同遺伝子導入ケラチノサイトは細胞表面に  $\alpha v\beta 3$  を発現することが蛍光抗体法ならびに FACS により確認できた。さらに、cell sorting により平均 89%の  $\alpha v\beta 3$  発現陽性率を得た。コントロール細胞として、同様方法により  $\beta$ -galactosidase cDNA 導入ヒトケラチノサイトを作製した。

(2)  $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮作製法を決定した。

① I 型コラーゲン膜として、豚由来コラーゲン膜 (ペルナック®) と細胞培養用透過性コラーゲン膜 (AteloCell®) とを比較した。その結果、AteloCell®のほうが正確な細胞数を使用でき、均一な培養表皮を作製することができた。

②コラーゲンゲル、フィブリンゲル上で細胞を 5 日間培養して培養表皮を作製した。両者とも、 $\beta 3$  インテグリン・サブユニット cDNA 導入ヒトケラチノサイトならびに  $\beta$ -galactosidase cDNA 導入ヒトケラチノサイト使用で重層する培養表皮を作製できたことを組織学的に確認した。

*In vivo* での創傷部 (とくに慢性創傷部) の状態を反映させるには、フィブリンゲル使用での培養表皮作製法が最適であると考えた。

(3) ノードマウスを用いて創傷治癒遅延モデルを作製した。

マイトマイシン C 外用による方法が、ストレプトゾトシン腹腔内投与による方法に比べて、確実に創傷治癒遅延モデルを作製することができ、また簡便であった。

(4) ノードマウスでの創傷治癒遅延モデルにおいて  $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表

皮の生着率向上効果について検証した。

ノードマウスでの創傷治癒遅延モデルとして、マイトマイシン C 外用による方法を採用した。また、培養表皮作製法はフィブリンゲル上で上記細胞を 5 日間培養して作製する方法を採用した。培養表皮移植片は、生検トレパン (直径 8 mm) で切除し、潰瘍部に 30 分間静置した後、ソフラチュール、培地を含浸させた創傷被覆材を重ねし、シリコンチャンバー (upper chamber) をかぶせ、2 針皮膚を含めて縫合、テープ貼付により固定した。培養表皮の生着率向上効果は経時的 (1, 2, 3 週間) な組織学的検査により調べた。その結果、 $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮は、1~3 週後のすべての時期においてコントロール培養表皮に比べて軽度から中等度に生着率が増加した。しかし、現時点では同組み換え型培養表皮の動物実験での有効性を結論づけるにはデータが不十分である。今後さらに実験条件を改善すると同時に実験数を増加して検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ①久保美代子, 森口隆彦: フィブラスト®スプレー添付溶解液および塩化ベンザルコニウムの I 型コラーゲン上で培養した正常ヒトケラチノサイト, 正常ヒト線維芽細胞に対する細胞毒性について  
日本皮膚科学会雑誌, in press, 2011.
- ②稲川喜一, 岡博昭, 山本康弘, 田中伸吾, 篠山美香, 山本真弓, 後藤峰範, 森口隆彦: 褥瘡に対する陰圧閉鎖療法 (特集 局所陰圧閉鎖療法)  
形成外科, 53(3):277-283, 2010.
- ③Inagawa K, Oohashi T, Nishida K, Minaguchi J, Tsubakishita T, Yaykasli KO, Ohtsuka A, Ozaki T, Moriguchi T, Ninomiya Y: Optical imaging of mouse articular cartilage using the chondroitin sulfate binding property of fluorescent-labeled octaarginine.  
Osteoarthritis Cartilage, 17(9):1209-1218, 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- ①Miyoko Kubo, Takahiko Moriguchi, Natsumi Maehara, Ken Kataoka, Nam-ho HUH,

Kiichi Inagawa: The development of improved cultured epithelium using  $\beta 3$  cDNA-transduced keratinocytes to increase its take-rate.

17th International Society for Cellular Therapy Annual Meeting, May 20, 2011, Rotterdam, Netherlands

- ②久保美代子, 森口隆彦, 前原奈都美, 片岡健, 許南浩, 稲川喜一: Beta3インテグリン・サブユニットcDNA導入ケラチノサイトを用いた培養表皮の開発—生着率向上に向けて—

第10回日本再生医療学会総会, 2011年3月2日, 東京都

- ③Miyoko Kubo, Takahiko Moriguchi, Natsumi Maehara, Kiichi Inagawa: Fibronectin distribution with pressure ulcers significantly decreased in the papillary dermis under the migrating epidermis compared with those of burns. 20<sup>th</sup> European Tissue Repair Society Congress, September 16, 2010, Gent, Belgium

- ④久保美代子, 森口隆彦, 稲川喜一: bFGFのケラチノサイト, 線維芽細胞への細胞増殖促進効果とフィブラスト<sup>®</sup>スプレー添付溶解液の細胞毒性

第2回日本創傷外科学会, 2010年7月31日, 神戸市

- ⑤久保美代子, 森口隆彦: bFGFはI型コラーゲン上で培養した正常ヒトケラチノサイト, 正常ヒト線維芽細胞の細胞増殖を濃度依存性に促進する—フィブラストスプレー添付溶解液の細胞毒性による影響—

第59回日本形成外科学会中国・四国支部学術集会, 2010年2月21日, 広島市

- ⑥久保美代子, 森口隆彦: 褥瘡では熱傷に比べて真皮内の種々の部位でフィブロネクチン分布が減少する

第1回日本創傷外科学会, 2009年1月17日, 東京都

- ⑦Miyoko Kubo, Takahiko Moriguchi: Basic fibroblast growth factor increases cell growth of normal human keratinocytes and fibroblasts in extracellular matrix- and dose-dependent manners. The Third World Union of Wound Healing Societies' Meeting, June 5-7, 2008, Toronto, Canada

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: RECOMBINANT KERATINOCYTES

発明者: Richard A. Clark, Miyoko Kubo

権利者: The Research Foundation of State University of New York

種類: United States Patent

番号: US 6,268,215 B1

取得年月日: July 31, 2001

国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 美代子 (KUBO MIYOKO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00098609

### (2) 研究分担者

森口 隆彦 (MORIGUCHI TAKAHIKO)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号: 10111816