

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592661

研究課題名(和文)慢性創傷での再上皮化促進のための再生医療の確立 再上皮化機序に基づいて

研究課題名(英文)The establishment of regenerative medicine for promoting re-epithelialization of chronic wounds -based on re-epithelialization mechanisms-

研究代表者

久保 美代子(Kubo, Miyoko)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00098609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはフィブリン(FB)三次元培養系でbeta3インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトの諸細胞機能(接着,増殖)を検査した.フィブロネクチン除去フィブリノーゲン(3 mg/ml)に種々の濃度のトロンビン(0.05 - 96 U/ml)を加えてFBを作製した.同FB培養系において,beta3インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトはコントロールの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と細胞増殖が増加した.さらに,これらの細胞増殖はトロンビンの濃度に依存した(6 U/mlトロンビンでピークとなるベル型パターン).

研究成果の概要(英文)：We examined the cell adhesion and the cell growth of beta3 cDNA-transduced human keratinocytes using three-dimensional culture system of fibrin gels. Fibrin gels were made adding fibronectin-depleted fibrinogen (3 mg/ml) and various concentrations of thrombin (0.05 - 96 U/ml). The cell adhesion and the cell growth of beta3 cDNA-transduced human keratinocytes significantly increased than those of beta-galactosidase cDNA-transduced human keratinocytes or normal human keratinocytes on the fibrin gels at all concentrations of thrombin. Furthermore, the cell growth of these 3 kinds of cells on the fibrin gels varied depending on concentration of the thrombin added. Namely, the cell growth pattern was bell-shaped having the peak on the FB gel of 6 U/ml thrombin used.

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 再上皮化 フィブリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会に伴い、褥瘡、糖尿病性潰瘍、静脈うっ滞性潰瘍などの慢性創傷の患者数は増加する一方であり、これらの慢性創傷に対する有効な治療法の開発が強く望まれている。現在、さまざまな外用剤、創傷被覆材、培養皮膚などが開発されてきている。しかし、まだまだ改善が必要である。より有効な治療を行うためには、その病因・病態生理（機能上の変化）の正確な把握と病態生理の機序解明が必須であり、またそれらの解析結果に基づいた治療法の確立が重要である。

慢性創傷の病因・病態生理は多種多様であるが、慢性創傷の病態生理の特色の一つに再上皮化の遅延（ケラチノサイト遊走の障害）がある。この再上皮化遅延の機序に関しては、他の病態生理の機序同様、ほとんど解明されていないのが現状である。再上皮化過程において、ケラチノサイトのインテグリン発現、真皮細胞外基質, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)や urokinase-type plasminogen activator (uPA), サイトカインや増殖因子などはケラチノサイトの接着, 移動, 増殖に関与する重要な因子である。

久保らは、これまでの研究において、慢性創傷（褥瘡）における再上皮化遅延の機序解明のために褥瘡部遊走表皮細胞におけるインテグリン発現の変化と真皮細胞外基質の変化を急性創傷（熱傷）でのそれらと比較して検討してきた。その結果、遊走表皮細胞の $\alpha 5 \beta 1$ 発現、真皮内フィブロネクチン(FN)分布は表皮遊走に有意に関与する因子であることが証明できた。また、褥瘡でのケラチノサイト遊走障害は、遊走表皮細胞 $\alpha 5 \beta 1$ 発現と真皮内FN分布の減少が一因であることが明らかになった。

また、久保らは、慢性創傷部にも生着率の高い改良型培養表皮の開発を行ってきた。この研究は、再上皮化過程において細胞の接着、移動、増殖に重要な機能を果たすインテグリン 特に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(GEL)と反応し得る $\alpha v \beta 3$ インテグリン の遺伝子を正常培養ヒトケラチノサイトに導入してやり  $\alpha v \beta 3$  を発現したヒトケラチノサイトを使用して培養表皮を作製するものである（ex vivo 遺伝子治療型培養表皮の開発）。In vitro での実験では、同recombinant keratinocytesの有用性を示すデータを得ている。現在、動物実験による有効性の検証を行っている。

さらに、申請者らはbasic fibroblast growth factor (bFGF)のヒトケラチノサイト、ヒト線維芽細胞に対する細胞増殖促進効果について研究してきた。その細胞増殖促進効果は、bFGF濃度に依存性であり、また細胞が接着する細胞外基質に依存性であることを明らかにした。

近年、ヒトでのiPS細胞作製の成功により、再生医療の臨床応用実現への期待がにわかに高まってきた。この再生医療における3大要素は、細胞外基質（足場）、細胞、細胞増殖因子であることは周知の事実である。さらに今日、細胞増殖因子のソースとして多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) の有用性が注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らがこれまでにやってきた研究結果に基づいて、再上皮化促進のための再生医療を確立することである。そのアプローチとして、本研究では再生医療の3大要素である細胞外基質（とくにFN）、 $\beta 3$  インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイト、細胞増殖因子（とくにbFGF, PRP）に焦点をあてて、それらの単独あるいは併用投与により、再上皮化促進効果と $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮の生着率向上効果の有無をin vitro およびin vivo で検索し、またそれらの効果に関してどの組み合わせ方法が最も有効であるかを解析する。

具体的には、研究期間内に次のことを行う。  
(1) In vitro での三次元（ゲル）培養系で、細胞外基質（FN）、細胞増殖因子（bFGF, PRP）の単独あるいは併用投与により $\beta 3$  インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトの諸細胞機能（接着、増殖、移動）に与える効果を明らかにする。

(2) 動物実験で、細胞外基質（FN）、 $\beta 3$  インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイト、細胞増殖因子（bFGF, PRP）の単独あるいは併用投与によるin vivo での再上皮化促進効果と $\beta 3$  インテグリン組み換え型培養表皮の生着率向上効果を明らかにする。またそれらの最も有効な組み合わせ方法を確立する。

最終的目標は、最適の方法を臨床に応用することである。

## 3. 研究の方法

(1) In vitro での三次元（ゲル）培養系で、細胞外基質（FN）、細胞増殖因子（bFGF, PRP）の単独あるいは併用投与により $\beta 3$  インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトの諸細胞

機能（接着，増殖，移動）に与える効果を検索した。

1)  $\beta 3$  インテグリン遺伝子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KBM-Gold基礎培地 + 増殖因子（Lonza社）を用いた。Subconfluentの状態と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) コラーゲンゲル培養系で細胞接着を検査した。

高研社のアテロコラ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を作製した。96 well plateに70  $\mu$ lのコラーゲン溶液を加えて，CO<sub>2</sub>インキュベーター内で2時間（37℃）インキュベートしてゲル化させた。その後，20,000個の正常ヒトケラチノサイトを播種し，無血清低Ca培地（KBM-Gold基礎培地）で3時間培養した。また，種々の濃度（0, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml）のFNをコートあるいはミックスして，その細胞接着促進効果の有無を検索した。

3) フィブリンゲル培養系で諸細胞機能（接着，増殖，移動）を検査した。

Carbiochem社のフィブリノーゲン(FG)を材料として用いた。所定のプロトコールによりFG溶液を作製した。96 well plateに70  $\mu$ lのFG溶液およびトロンビン（持田製薬）を加えて，37℃で1時間インキュベートしてゲル化させてフィブリン(FB)を作製した。その後20,000個の正常ヒトケラチノサイトを播種し，無血清低Ca培地（KBM-Gold基礎培地）で3時間培養し，細胞接着を調べた。また，種々の濃度のFN（0, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml）をコートあるいはミックスして細胞接着促進効果の

有無を検査した。

上記FBゲル内にFN(100  $\mu$ g/ml)あるいはbFGF(1  $\mu$ g/ml)をミックスし，同ゲル上に0.2% agar + 6 x 10<sup>4</sup>個の正常ヒトケラチノサイトを2  $\mu$ l播種し，KGM-Gold培地で24時間培養し，その細胞移動を調べた（agar droplet migration assay）。

96 well plateにフィブロンectin(FN)除去フィブリノーゲン(FG)溶液（3 mg/ml）70  $\mu$ lを加え，さらに種々の濃度のトロンビン（0.01, 0.1, 1, 10 U/ml）を加えて，37℃で1時間インキュベートしてフィブリン(FB)を作製した。FBゲル上に1 x 10<sup>4</sup>個の細胞を播種し，無血清低Ca培地で培養した。1時間の細胞接着アッセイ（KBM-Gold基礎培地使用）ならびに5日間の細胞増殖アッセイ（KGM-Gold培地使用）を行い， $\beta 3$ インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイト（コントロールとして $\beta$ -galactosidase cDNA導入ヒトケラチノサイト，正常ヒトケラチノサイト）の諸細胞機能（接着，増殖）を比較した。

の結果をふまえ，同培養系でさらにトロンビンの濃度を変化させて， $\beta 3$ インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイト（コントロールとして $\beta$ -galactosidase cDNA導入ヒトケラチノサイト，正常ヒトケラチノサイト）の細胞増殖に与える影響を調べた。FN除去FGの濃度は生理的FG濃度である3 mg/mlに固定し，種々の濃度のトロンビン（0.05, 0.09, 0.18, 0.36, 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48, 96 U/ml）を加えて，FBを作製した。同FBゲル上に1 x 10<sup>4</sup>個の細胞を播種し，KGM-Gold培地で5日間培養した。

#### 4. 研究成果

(1) In vitroの三次元（ゲル）培養系での $\beta 3$ インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトの諸細胞機能（接着，増殖，移動）の検索

1) 平成23年度中に上記の方法により $\beta 3$ インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトを作製した。 $\alpha v \beta 3$ 発現陽性率は83%であった。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。それらの細胞を平成24年度以降に行うin vitroならびにin vivoの実験のために液体窒素中にストックした。

2) コラーゲンゲル培養系での正常ヒトケラチノサイトの細胞接着の検索

3時間の細胞接着アッセイで，正常ヒトケラチノサイトのコラーゲンゲルへの細胞接着は良好であった。しかし，FNコートによる細胞接着促進効果はなかった。ただし，FNミックスにより接着した細胞の細胞伸展が有意に増加した。

3) フィブリンゲル培養系での諸細胞機能  
(接着,増殖,移動)の検索

3時間の細胞接着アッセイにより,正常ヒトケラチノサイトの細胞接着はフィブリンゲル培養系で軽度であった.その細胞接着は, FN コートによりコートなしに比べてFNの濃度依存性に増加した. FNをミックスした場合も同様であった.

Agar droplet migration assayでは,正常ヒトケラチノサイトの細胞移動はFBゲルのみに比べてFNあるいはbFGFをミックスしたFBゲル上で増加した.

1時間の細胞接着アッセイならびに5日間の細胞増殖アッセイにおいて,  $\beta$ 3インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトはコントロール細胞( $\beta$ -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と細胞増殖が増加した. また, これら3種の細胞増殖はいずれも加えたトロンビンの濃度に依存して変化した.

さらに,  $\beta$ 3インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトとコントロール細胞の細胞増殖はトロンビンの濃度に依存性であり, 6 U/mlトロンピン使用のFBゲルでピークとなるベル型の細胞増殖パターンを示した. また, すべてのトロンピン濃度でのFBゲルで,  $\beta$ 3インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトの細胞増殖はコントロール細胞に比べて有意に増加した.

以上の結果より, 三次元FBゲル培養系で,  $\beta$ 3インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイトの細胞接着, 細胞増殖はコントロール細胞( $\beta$ -galactosidase cDNA導入ヒトケラチノサイト,正常ヒトケラチノサイト)に比べて有意に増加することが観察できた. また, FBゲルの性状の違い(FGとトロンビンの混合比の変化から生じる)がこれらの細胞の細胞増殖に影響を与えることが分かった. 今後, FNならびにbFGF添加によるこれらの細胞の諸細胞機能の変化について検索する予定である.

(2) 動物実験により,  $\beta$ 3インテグリン遺伝子導入ヒトケラチノサイト,細胞増殖因子(bFGF, PRP)の単独あるいは併用投与によるin vivoでの再上皮化促進効果と $\beta$ 3インテグリン組み換え型培養表皮の生着率向上効果を調べる予定であったが,実験が大幅に遅れ,結論を出せる段階にまでは至らなかった.しかし,上記のin vitroでの実験結果から,現在までに,

慢性創傷実験モデルとして,潰瘍部にFBをコートする. 上記の培養表皮細胞はFB(FGとトロンビンの最適比率を考慮)内にミックスして投与する. FB内にFNやbFGFを混合して使用した方が良いかも知れない. などの実験系を設定できた. 今後も検索を続ける予定

である.

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 2 件)

Miyoko Kubo, Ying Zhao, Takahiko Moriguchi: Tranilast inhibits the cell growth of normal human keratinocytes in vitro. Arch Dermatol Res 304:745-753, 2012. 掲載論文のDOI:10.1007/s00403-012-1291-8, 査読有

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 121:1607-1620, 2011. 査読有

[学会発表](計 1 件)

Miyoko Kubo, Takahiko Moriguchi, Natsumi Maehara, Ken Kataoka, Nam-ho HUH, Kiichi Inagawa: The development of improved cultured epithelium using 3 cDNA-transduced keratinocytes to increase its take-rate. 17th International Society for Cellular Therapy Annual Meeting, May 20, 2011, Rotterdam, Netherlands

[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

久保 美代子 (KUBO MIYOKO)  
岡山大学医学部・客員研究員  
研究者番号：00098609

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：