

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591889

研究課題名(和文) 抗菌活性を持つ培養皮膚の生体内における機能の解析

研究課題名(英文) Transplantation of cultured human keratinocytes introduced with the gene of antimicrobial peptides.

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(背景・目的)重症熱傷に対する自家培養皮膚移植は、感染創への生着が不良である。本研究の目的は、抗菌ペプチド遺伝子を導入したヒト培養表皮細胞を用いて、感染創に対する培養皮膚移植の成績向上をはかることである。

(方法・結果)ヒト抗菌ペプチド遺伝子(hBD3,hCAP18および両者)を組み換えたウイルスベクターを作製した。これらをヒト表皮細胞に感染して各遺伝子を導入したところ、当該表皮細胞は各抗菌ペプチドを発現・分泌した。遺伝子導入細胞を免疫不全マウスに移植したところ、移植後には正常なヒト皮膚が再生され、炎症反応は見られなかった。

(結論)本研究成果は感染創に対する培養皮膚移植に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Grafting of cultured autologous epidermis (CEA) onto an infected burn wound is difficult.

We cloned cDNA of antimicrobial peptides, hBD3, hCAP-18 or both into adenovirus vectors. By infection with each recombinant vector, the peptide concerned was produced by cultured human epidermal keratinocytes. When the virus infected keratinocytes were subcutaneously injected into a immunodeficient mouse with dermal fibroblasts, histology of normal human skin was regenerated.

CEA introduced with the gene of antimicrobial peptides is likely to improve the transplantation results in the infected burn wounds.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：人工臓器 再生医療 抗菌ペプチド 熱傷 アデノウイルスベクター カテリシジン ディフェンシン
2A配列

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、重症熱傷に対して自家培養皮膚移植が行われているが、感染した創への移植成績は良好ではない。創感染の起因菌は、しばしばメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下 MRSA)や多剤耐性緑膿菌(以下 MRDP)などの抗生剤多剤耐性菌である。また抗生剤の局所使用は耐性菌誘導の観点から好ましくない。

(2) 上皮には様々な抗菌ペプチドが存在し、ヒト表皮に誘導的に発現する抗菌ペプチドとして、human defensin(以下 hBD)および hCAP-18/LL37 が知られている。

(3) 我々は、生理的塩濃度下において、hBD3 は主に MRSA を含むグラム陽性菌に後菌活性を示し、一方 LL37 はグラム陰性菌に抗菌活性をもつことを明らかにしている。このため、様々な感染創に幅広く対応するには、2 つの抗菌ペプチドを用いる必要がある。

(4) また我々は、hBD3 遺伝子、hCAP18/LL37 遺伝子の組み換えアデノウイルスベクターを作製し、これを用いてヒト表皮細胞に各遺伝子を導入することにより、両抗菌ペプチドが発現すること、hBD3 遺伝子導入細胞の培養上清は MRSA に抗菌活性を有することを確認している。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、抗菌ペプチド遺伝子の導入によって抗菌性を付与したヒト培養表皮細胞を移植することにより、従来困難であった感染創に対する培養皮膚移植の生着性向上をはかることである。

(2) 本研究期間には、感染創組み換えウイルスベクターを用いて hBD3 および hCAP-18/LL37 遺伝子を導入した培養皮膚が、当該抗菌ペプチドを発現・分泌し、また移植後生体内においてヒト皮膚組織の再生および局所免疫に対して悪影響を与えないことを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) hBD3 cDNA、hCAP-18/LL37 cDNA、IRES または 2A 配列を用いて両者をタンデムに連結した遺伝子を組み替えたアデノウイルスベクターを作製した(以下それぞれ AdhBD3、AdhCAP18、AdhBD3-IRES-hCAP18、AdhBD3-2A-hCAP18)。また対照として LacZ 遺伝子組み換えアデノウイルスベクター(以下 AdLacZ)を作製した。

(2) LacZ 遺伝子組み換えアデノウイルス

(AdLacZ)を multiplicity of infection (以下 MOI)=50~500 でヒト表皮細胞に感染させ、ヒト真皮線維芽細胞とともに免疫不全マウス移植した。移植後に形成された類上皮嚢胞を切除して、嚢胞壁に形成されたヒト皮膚様組織を非感染細胞移植後の嚢胞と病理組織学的に比較検討した。

(3) 組み換えウイルスベクターの感染により、各遺伝子をヒト培養表皮細胞、線維芽細胞に導入し、導入遺伝子の発現と各抗菌ペプチドの培養上清中への分泌を確認した。また分泌された hCAP-18 が好中球プロテアーゼにて LL37 に分解されることを確認した。

(4) 組み換えウイルスベクターをそれぞれヒト表皮細胞に感染させヒト真皮線維芽細胞とともに免疫不全マウスに移植した。移植後に形成された類上皮嚢胞を経時的に切除し、嚢胞壁に形成されたヒト皮膚様組織を AdLacZ 感染細胞(対照)移植後の類上皮嚢胞と病理組織学的に比較検討した。

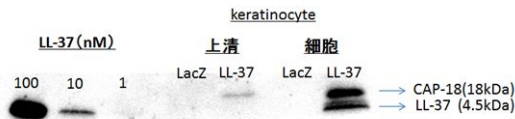
4. 研究成果

(1) AdLacZ を MOI=50~500 でヒト表皮細胞に感染させ、ヒト真皮線維芽細胞とともに免疫不全マウス移植した。感染時間 16 時間、MOI=300 以下では、移植後に形成された類上皮嚢胞壁に正常なヒト皮膚と同様の組織構造が再生され、基底膜蛋白の局在、p63 陽性細胞の密度、ki67 陽性細胞の密度などに対照と差異は見られなかった。一方、MOI=500 以上で感染させた表皮細胞を移植すると生着率の低下、再生した表皮の異常と炎症性細胞浸潤が認められた。以上の結果から、移植に用いる培養表皮細胞に対して、組み換えアデノウイルスベクターは、16 時間、MOI=300 以下で感染させる必要があることが明らかになった。

(2) AdhBD3 および AdhCAP18 を感染させたヒト培養表皮細胞では、RT-PCR で各導入遺伝子の発現が認められた。AdhBD3 感染細胞から western blot で hBD3 が検出されたが、培養上清では濃縮しないと検出できなかった(図 1-a)。ELISA で測定した培養上清における hBD3 の濃度は、0.14~0.82nM であった。AdhCAP18 感染表皮細胞では、western blot で hCAP-18 および LL37 と思われるバンドが認められたが、培養上清では hCAP-18 のみが検出され、LL37 は確認できなかった(図 1-b)。ELISA で測定した培養上清における LL37 の濃度は、0.16~0.18nM であった。以上の結果から、AdhBD3 および AdhCAP18 感染により、遺伝子導入ヒト表皮細胞から各導入遺伝子が発現、分泌されることが確認された。

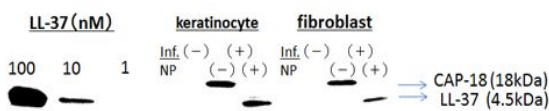


【図 1-a】 AdhBD3 感染ヒト表皮細胞の western blot



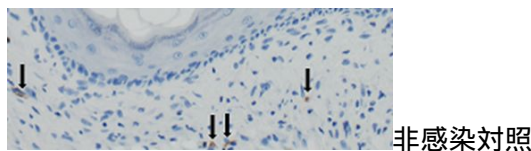
【図 1-b】 AdhCAP18 感染ヒト表皮細胞 western blot

(3) AdhCAP18 を感染させたヒト培養表皮細胞およびヒト真皮由来培養線維芽細胞の培養上清および好中球プロテアーゼ処理後の各培養上清の western blot を行った。いずれの培養上清でも、hCAP-18 が検出され、好中球プロテアーゼ処理後に LL37 に分解されることが確認された(図 2)。従って、遺伝子導入細胞から分泌された hCAP-18 はプロテアーゼ活性を持つ創部では LL37 に分解され抗菌活性を示すものと考えられた。

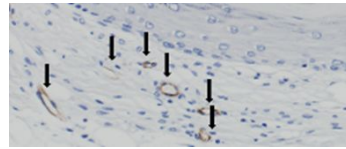


【図 2】 AdhCAP18 感染細胞培養上清の western blot (inf. は組み換えウイルス感染、NP は好中球プロテアーゼ処理)

(4) AdhCAP18 を MOI=300 で 16 時間感染させたヒト培養表皮細胞をヒト真皮由来培養線維芽細胞とともにヌードマウス皮下に移植し、形成された類上皮嚢胞を非感染細胞(対照)移植後の嚢胞と病理組織学的に比較検討した。移植後 12 日目の皮下結節は、感染細胞移植後が非感染対照移植後よりやや大きく、形成された類上皮嚢胞周囲の新生血管(CD31 陽性細胞)の密度は、感染細胞移植後 $191.7 \pm 49.9/\text{mm}^2$ 、非感染対照 $105.9 \pm 26.3/\text{mm}^2$ と感染細胞移植後が有意に高かった(図 3)。また基底膜蛋白の局在、p63 陽性細胞の密度、ki67 陽性細胞の密度などに大きな差異は見られなかった。以上から、ヒト培養表皮細胞に AdhCAP18 を MOI=300 で 16 時間感染させても移植後のヒト皮膚組織の再生に悪影響を与えることなく、周囲結合組織の血管新生を促進するものと考えられた。



非感染対照

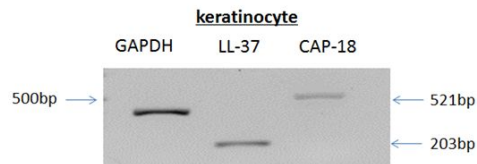


AdhCAP18

【図 3】 AdhCAP18 感染ヒト培養表皮細胞移植後に再生されたヒト皮膚および対照の CD31 免疫染色 (← は CD31 陽性細胞)

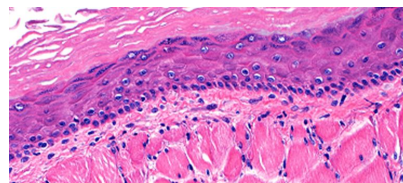
(5) hBD3 cDNA と hCAP-18/LL37 cDNA を IRES 配列で連結した遺伝子の組み替えウイルスベクター(AdhBD3-IRES-hCAP18)をヒト表皮細胞に感染させたところ両導入遺伝子の発現が認められたが、各ペプチドの産生に不均一性がみられた。このため、両 cDNA を 2A 配列により連結した遺伝子を組み替えたアデノウイルスベクター(AdhBD3-2A-hCAP18)を実験に用いた。

(6) AdhBD3-2A-hCAP18 をヒト表皮細胞に MOI=300 で 16 時間感染させたところ、RT-PCR で両遺伝子の発現が確認された(図 4)。また western blot で、遺伝子導入表皮細胞から、hBD3 および hCAP18 が検出された。

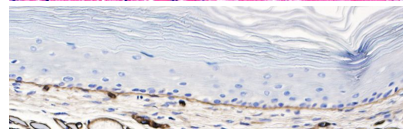


【図 4】 AdhBD3-2A-hCAP18 感染ヒト表皮細胞 (RT-PCR)

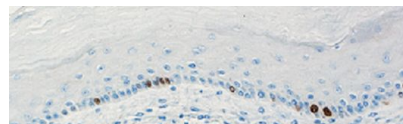
(7) 上記の AdhBD3-2A-hCAP18 感染ヒト表皮細胞を、ヒト真皮線維芽細胞とともに免疫不全マウス移植したところ、正常ヒト皮膚様の構造が再生され、また基底膜蛋白の局在、p63 陽性細胞の密度、ki67 陽性細胞の密度などに対照(AdLacZ 感染細胞移植後)と差異は認められなかった(図 5)。以上の結果から、dhBD3-2A-hCAP18 を MOI=300 で 16 時間感染させたヒト培養表皮細胞は、hBD3 および hCAP18 を発現し、同細胞を移植すると正常ヒト皮膚組織を再生することが明らかになった。



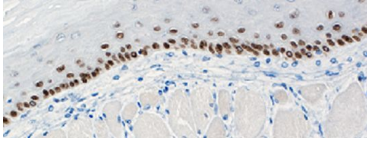
H&E



laminin



ki67



【図5】 AdhBD3-2A-hCAP18 感染表皮細胞を移植後に再生されたヒト皮膚様構造 (H&E および各種免疫染色)

(8) 本研究から、hBD3 cDNA、hCAP-18/LL37 cDNA および両 cDNA を 2A 配列によりタンデムに連結した遺伝子を組み替えたアデノウイルスベクターの感染により、移植後の皮膚再生に悪影響を与えることなくヒト表皮細胞に遺伝子を導入し、各感染細胞からそれぞれの抗菌ペプチドを発現、分泌させることが可能であり、また hCAP-18/LL37 を導入すると、再生皮膚周囲の血管新生促進が期待できることが明らかになった。

(9) 本研究の成果を応用し、熱傷の感染創から検出される菌種に応じて、hBD3、LL37 または両者によって抗菌性を付与したヒト培養表皮細胞を移植することができる。この方法により、従来困難であった感染創に対する培養皮膚移植の生着性向上が期待できるものと考えられる。

(10) 本研究の今後の課題は以下のとおりである。抗菌ペプチドの抗菌活性は創部の塩やタンパクなどに影響され、また CAP18 から部分分解によって様々な抗菌ペプチドが生成されることから、感染創を持つ適切な動物モデルによって、遺伝子導入細胞の生着性がどの程度改善されるか評価する必要がある。また、アデノウイルスベクターは潜在的に免疫反応を起こす可能性があるため、より安全なセンダイウイルスベクターなどによる遺伝子導入についても検討を要する。

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1件)

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

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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
斉藤 剛 (SAITO Takeshi)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30266465

(3) 連携研究者

高沢 研丞 (TAKAZAWA Kensuke)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：00408014

(4) 研究協力者

城所 正子 (KIDOKORO Masako)
東海大学・医学部・研究技術員
松澤 秀之 (MATUZAWA Hideyuki)
東海大学・医学部・技術職員
田中真紀子 (TANAKA Makiko)
東海大学・医学部・研究技術員