

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

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 β -defensin-3 and human cathelicidine 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

研究成果の概要（和文）：抗菌活性を付与して細菌感染に強い培養皮膚を開発するため、組み換えウイルスベクターを用いて2種類のヒト抗菌ペプチド（hBD3およびhCAP18/LL37）の遺伝子をヒト皮膚細胞に導入した。作製した組み換えウイルスベクターの感染により、2つの遺伝子は培養したヒト皮膚の細胞に同時に導入され、導入遺伝子は細胞内で発現して抗菌ペプチドhBD3およびhCAP18（LL37の前駆体）が分泌された。

研究成果の概要（英文）：Human β -defensin-3 (hBD3) gene and human cathelicidine antimicrobial peptide-18 (hCAP18/LL37) gene were introduced into cultured human skin cells simultaneously by a recombinant adenovirus vector. The virus infected cells secreted both hBD3 and hCAP18, a pro-peptide of LL37.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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. 研究開始当初の背景

(1) 従来、重症熱傷に対して自家培養皮膚移植が行われているが、受傷後一定期間を経て感染した創への移植成績は良好ではない。重症熱傷における創感染の起原菌は、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。

(2) サルファジアジン銀などの局所抗菌剤は、細胞毒性が強く、培養皮膚移植時には使用できない。またペニシリンなど抗生物質の局所投与は耐性菌を誘導する可能性があるため、好ましくない。

(3) 上皮には自然免疫の一部を担う様々な

抗菌ペプチドが存在する。感染などに際してヒト表皮に誘導的に発現する抗菌ペプチドとしては human β defensin (以下 hBD) および唯一のヒト cathelicidine である hCAP-18/LL37 が知られている。

- (4) 我々は、このうち hBD3 遺伝子をヒト培養表皮細胞、線維芽細胞に導入すると、遺伝子導入細胞は hBD3 を分泌し、生理的塩濃度下でも MRSA を含むグラム陽性菌に抗菌活性を示すことを確認している。一方、hBD3 の MRDP などのグラム陰性菌に対する抗菌活性は十分でなかった。
- (5) 抗菌ペプチド hCAP-18/LL37 はグラム陰性菌にも抗菌活性を示すことが報告されており、加えて新生血管の誘導作用などの有用な生理活性を持つとの研究結果がある。

2. 研究の目的

- (1) hBD3 遺伝子と hCAP18/LL37 遺伝子をタンデムに結合した組み換えアデノウイルスベクターを作製する。
- (2) 上記組み換えアデノウイルスを用いて、hBD3 遺伝子および hCAP18/LL37 遺伝子を同時にヒト皮膚細胞へ導入し、幅広い抗菌活性を持つ培養皮膚の作製を試みる。

3. 研究の方法

- (1) LL37 標準物質を用いて各種菌株に対する抗菌活性を測定する。
- (2) サイトカインにて刺激したヒト培養表皮細胞の RNA より、RT-PCR 法により hCAP18/LL37 の c-DNA をクローニングする。
- (3) 上記 c-DNA を用いて hCAP18/LL37 c-DNA の組み換えアデノウイルスベクターを作製する。また既にクローニングしてある hBD3 cDNA と hCAP18/LL37 cDNA を、IRS を介してタンデムに結合した組み換えアデノウイルスベクターを作製する。
- (4) 上記組み換えウイルスベクターの感染により、ヒト培養表皮細胞および真皮線維芽細胞に hBD3 遺伝子および hCAP18/LL37 遺伝子を単独で、または同時に導入する。

- (5) 各遺伝子導入細胞における、導入遺伝子の発現および抗菌ペプチドの分泌と抗菌スペクトラムを確認する。

4. 研究成果

- (1) LL37 標準物質の抗菌活性を確認したところ、*S. aureus* および *E. coli* の ATCC 標準株に対して抗菌活性を認めた。
- (2) ヒト培養表皮細胞から、RT-PCR 法により hCAP18/LL37 の c-DNA をクローニングし、これを用いて hCAP18/LL37 遺伝子組み換えアデノウイルスベクター (以下 AdLL37) と、hBD3 遺伝子および hCAP18/LL37 遺伝子をタンデムに結合した組み換えアデノウイルスベクター (以下 AdHLG) をそれぞれ作製した。
- (3) AdLL37 の感染により、hCAP18/LL37 遺伝子をヒト培養表皮細胞および線維芽細胞に導入したところ、両細胞において導入遺伝子の発現が認められた。また両細胞の培養上清には、Western blot にて hCAP18 蛋白が検出されたが LL37 蛋白は認められず (図 1)、また培養上清に抗菌活性はほとんど見られなかった。

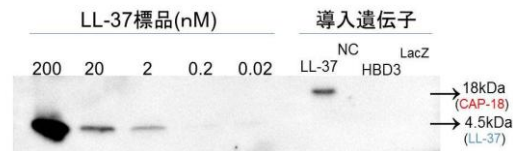


図 1 : 遺伝子導入表皮細胞培養上清の Western blot (hCAP18/LL37)

レーン LL37、hBD3、LacZ は各組み換えウイルスベクター、NC は対照ウイルスの感染細胞培養上清

- (4) AdHLGをヒト培養表皮細胞、線維芽細胞へ感染し、導入遺伝子の発現を確認したところ、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(図2)。またAdHLG感染ヒト培養表皮細胞の培養上清から、Western blotにてhBD3およびhCAP18蛋白が検出された。

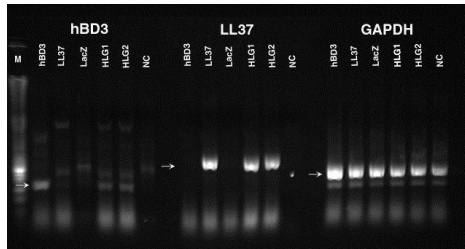


図2：遺伝子導入表皮細胞のRT-PCR

hBD3、LL37、GAPDHのRT-PCR: レーンのhBD3、LL37、LacZは各組み換えウイルスベクター、HLG1、HLG2はhCAP-18/LL37とHBD3をタンデム連結した組み換えウイルスベクター、NCは対照ウイルスの感染細胞

- (5) 本研究で作製した組み換えアデノウイルスベクターの感染により、hBD3 遺伝子とhCAP18/ LL37 遺伝子を同時にヒト培養表皮細胞、線維芽細胞に導入すると、導入遺伝子はいずれの細胞内でも発現し、抗菌ペプチドhBD3およびLL37の前駆体であるhCAP18が分泌されることが明らかとなった。
- (6) hCAP18は創部などで浸出液中のペプチターゼによって部分分解され、抗菌活性を持つLL37となる。本研究ではhCAP18/ LL37 遺伝子導入細胞の培養上清にはhCAP18のみが認められており、*in vitro*では部分分解されなかったものと考えられるが、培養皮膚を創に移植後にはLL37に分解されて抗菌活性を示すことが十分期待できる。
- (7) LL37には、抗菌活性のほかに表皮の増殖や血管新生の促進などの作用があることが知られている。hBD3 遺伝子とhCAP18/LL37遺伝子を同時に導入した細胞からなる培養皮膚は、幅広い抗菌活性を示すことに加えて、これらの作用により移植後の皮膚再生が促進されることも期待できる。従って、現在治療困難な感染を伴う重症熱傷の治療に応用できる可能性は高いものと考えられる。
- (8) 今後、両遺伝子導入細胞からなるヒト培養皮膚の生体内における抗菌活性を測定するとともに、免疫不全マウスへ移植後の皮膚再生に対する両遺伝子導入の影響について、病理組織学的検討を行う予定である。

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)

鈴木 陽介(SUZUKI YOUSUKE)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：90459454

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① 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 β -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.
- ② Inoue S, Kijima H, Kidokoro M, Tanaka M, Suzuki Y, Motojuku M, Inokuchi S. The effectiveness of basic fibroblast growth factor in fibrin-based cultured skin substitute in vivo. J Burn Care Res. 査読有. May-Jun;30(3) 2009、514-9.

〔学会発表〕(計5件)

- ① 秋枝一基, 梅澤和夫, 吉井久倫, 石川祥一郎, 飯塚進一, 田中真紀子, 城所正子, 猪口貞樹、培養皮膚移植後の血管新生に対する高気圧酸素療法の影響、第19回日本熱傷学会関東地方会、2011年1月28日、スクワール麹町
- ② 鈴木陽介、梅澤和夫、井上茂亮、高沢研丞、斎藤剛、田中真紀子、城所正子、猪口貞樹、培養皮膚の抗菌性向上を目指して：human- β -defensin 遺伝子組換え細胞のさらなる検討、第34回日本熱傷学会総会・学術集会、2008年6月28日、名古屋国際会議場
- ③ 猪口貞樹、熱傷治療の先端技術：バイオ人工皮膚の開発と応用、第19回日本急性血液浄化学会、2008年9月20日、御殿山ガーデン ホテルラフォーレ東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

安藤 潔(ANDO KIYOSHI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70176014
梅澤 和夫(UMEZAWA KAZUO)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：30349344