

細胞・遺伝子工学を用いた抗細菌口腔粘膜の開発

齊藤 正人 [北海道医療大学個体差医療科学センター / 講師]

背景・目的

ディフェンシンは主に上皮で発現している抗細菌性のタンパクである。過去に口腔上皮でのディフェンシンの発現状態について *in vitro* および *in vivo* で検索を行い、ディフェンシンが口腔上皮の細菌感染防御機構に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。

口腔内難治性潰瘍治療のため、本研究では遺伝子導入によりディフェンシンを過剰に発現させた上皮細胞を作製し、上皮細胞の増殖・分化の状態を確認した後、ヌードラット口腔内の実験的に作成した潰瘍部へディフェンシン強発現角化上皮を移植し、上皮の付着状態や、抗細菌性について検討を行う。

内容・方法

1)ヒト角化上皮細胞へのヒト ディフェンシン(hBD)遺伝子の導入

ヒトケラチノサイト細胞株HaCaT細胞にhBD-1、-2および-3のプラスミドをリポフェクチン法により導入する。コントロールとして、hBD-1、-2、-3のsiRNAを導入し、それらの発現をknockdownしたHaCaT細胞と、遺伝子を組み込んでいないvector(mock)を導入したHaCaT細胞を作製した。

2)hBD強発現HaCaT細胞の増殖・分化状態の確認

hBD-1、-2および-3強発現HaCaT細胞はMTT assayにより細胞増殖性を確認する。また細胞の分化状態を確認するため、TaqMan real-time RT-PCRを用いて、Involucrin、Keratin10およびkeratin14 mRNAの発現を観察する。

3)ヌードラットへのhBD強発現HaCaT細胞の移植

ヌードラットの硬口蓋部に5mm X 5mmの創傷を形成する。コンフルエントになった細胞にDispaseを添加し、シート状に浮いてきた細胞シートを、創傷形成したヌードラット口腔潰瘍部に移植する。上皮細胞移植後7日目にH.E.染色および各種免疫組織化学染色を行い、標本を観察する。

結果・成果

1)ヒト角化上皮細胞へのhBD遺伝子の導入の確認

hBD-1、-2および-3のプラスミドを導入したHaCaT細胞は、発現確認のためhBDそれぞれのRT-PCRを行った。hBD-1、-2、-3のプラスミドを導入したHaCaT細胞それぞれは、vectorのみを導入したmockと比べ、明らかに強いバンドが確認された。hBD-1、-2および-3のsiRNAを導入

したものでは、それぞれのバンドが認められないか、わずかなシグナルであった。

2)hBD強発現HaCaT細胞の増殖・分化状態の確認

hBD-1、-2、-3を強発現させたHaCaT細胞は、mockと比べ有意に細胞増殖率の低下が認められた。またhBD-1と-3の強発現により、高分化のマーカーであるInvolucrin、Keratin 10の発現上昇が認められ、低分化のマーカーであるKeratin 14の発現低下が確認された。さらに、siRNAによりhBD-1、-2、-3をknockdownしたHaCaT細胞では、mockと比べ有意に細胞増殖率の上昇が認められた。hBD-1と-3の発現低下により、Involucrin、Keratin 10の発現低下とKeratin 14の発現上昇が確認された。

3)ヌードラットへのhBD強発現HaCaT細胞の移植

ヌードラットの硬口蓋部に5mm X 5mmの創傷を形成し、6時間後、12時間後、18時間後そして24時間後の創傷治癒過程の標本を作製した結果、創傷形成後18時間から24時間で上皮の断裂が認められなくなることを確認した。上皮細胞移植の結果はまだ得ていない。

本研究では、hBD強発現ヒト角化上皮細胞を作製することができ、同時にhBD発現knockdown細胞も作成することができた。これらの細胞の分化および増殖を比較することにより、hBD強発現細胞では細胞増殖が低下し、特にhBD-3強発現細胞において分化状態が高まるため、hBD-3強発現細胞がヌードラットへの上皮細胞移植に適していると考えられた。

以上の結果より、hBDの発現はケラチノサイトの分化と細胞増殖に密接に関連しており、hBDはケラチノサイトで二つの役割を果たしていると考えられた。細菌感染の際に細菌を殺傷するのみならず、ケラチノサイトの分化を誘導することで物理的バリアーである角化を亢進させていると考えられる。また、上皮が炎症などで破壊された場合、hBDがケラチノサイトの分化を誘導することで上皮の再生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

今後の展望

現在までのところ、ヌードラットへのhBD強発現細胞の移植の結果を得ていない。口腔内は非常に複雑な形態をしており、創傷部位に細胞シートを貼り付けることが困難である。今後実験を重ね、好結果を得たいと考えている。本研究において、hBDの発現上昇ならびに発現低下が、細胞の増殖および分化に強い影響を与えることが示唆された。このことはアフタや潰瘍などに対する抗細菌性粘膜を得ることに有利に働き、さらに重層扁平上皮癌等の研究にも有用であると考える。この分野の発展のためよりいっそ実験を進めてゆきたいと考える。