

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11358

研究課題名(和文) 創傷治癒培養モデルを用いた口蓋裂術後瘢痕形成の制御に関する研究

研究課題名(英文) Study on control of scar formation after cleft palate with a wound healing model using rat skin

研究代表者

石川 博之 (Ishikawa, Hiroyuki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・常務理事

研究者番号：20184492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：唇顎口蓋裂患者では、口蓋形成手術後に生じる瘢痕組織が、上顎骨の劣成長を引き起こすことが知られている。本研究は創傷治癒時の瘢痕収縮におけるTGF- β 1シグナリングとTRPチャネルの役割について明らかにすることを目的とした。皮膚創傷治癒モデルを作製し、経時的なゲルの収縮を計測した。さらに、TRPV1～4の阻害薬を用いて、皮膚創傷治癒モデルに対する作用を検討した。その結果、TRPV2阻害薬はゲルの収縮を有意に抑制し、筋線維芽細胞マーカーである α -SMAの発現およびケラチノサイトからのTGF- β 1の放出を有意に抑制した。このことから、創傷治癒時の瘢痕収縮にTRPV2の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Postoperative scar tissue on palates is considered to induce maxillary growth inhibition in cleft lip and palate patients. We characterized the role of TRP channels in the release of TGF- β 1 from keratinocytes and the differentiation of fibroblasts to identify possible promising pharmacological approaches to prevent scar formation and contractures. The 3D culture model was made from rat skin seeded on a collagen gel in which dermal fibroblasts had been embedded. Among the TRP channel inhibitors tested, the TRPV2 inhibitors attenuated most potently keratinocyte-dependent and -independent collagen gel contraction due to TGF- β 1 signaling as well as TGF- β 1 release from keratinocytes and α -SMA production in myofibroblasts. TRPV2 was expressed in the epidermis and keratinocyte layers of the model. Compounds targeting TRPV2 channels would ameliorate wound contraction through the inhibition of TGF- β 1 release and the differentiation of dermal fibroblasts in a culture model.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：ケラチノサイト 線維芽細胞 TGF- β 1 TRPV2

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂患者では、良好な鼻咽腔閉鎖機能の獲得のため、Push Back法による口蓋形成手術が広く行われている。しかし、本法では、粘膜骨膜剥離後の創傷治癒過程で形成される癒痕組織が、上顎骨および上顎歯列歯槽部の発育障害や咬合不全をもたらすことが知られている。そこで、これまでに我々は、粘膜骨膜剥離後の創傷治癒過程を薬剤によりコントロールし、癒痕組織の形成を抑制して顎発育に影響の少ない口蓋裂治療を確立することを目指して研究を進めてきた。

口蓋形成手術後の創傷治癒を薬剤によりコントロールするという試みは、他にオランダのNijmegen大学(Cornelissen et al., J Dent Res, 2000)と名古屋大学(Oda et al., J Oral Maxillofac Surg, 2004)で行っているが、顎発育抑制の緩和を示す段階には至っていない。我々は、線維芽細胞成熟の抑制や筋線維芽細胞のアポトーシス促進の効果を示す bFGF に着目して、口蓋形成手術後の癒痕形成の抑制を目指して以下の実験を行ってきた。

1. 上皮化の完了後の bFGF の投与

ラット口蓋に粘膜骨膜剥離の骨露出創を形成し、上皮化の完了した術後 1 週に bFGF 水溶液の単回投与を行って創傷治癒過程を検索したところ、その効果として以下の知見を得た。

- ・筋線維芽細胞数の減少とコラーゲン線維束の成熟の抑制 (川鍋ら, Orthod Waves, 2004)
- ・血管新生による微小循環網の維持 (Hata et al., Cleft Palate Craniofac J, 2008)
- ・コラーゲンタイプ 線維の合成抑制 (図 1、Choi et al., Acta Odontol Scand, 2008)

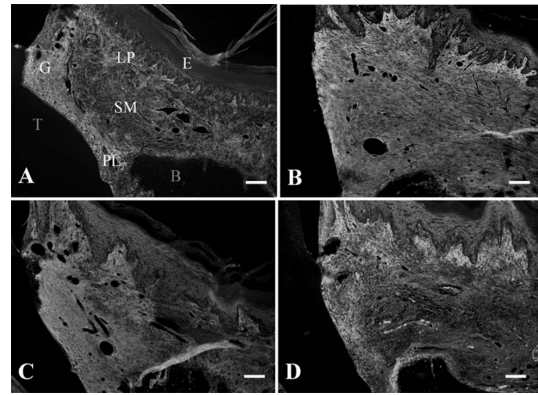


図 1 コラーゲンタイプ 線維の蛍光免疫染色像

A 対照群、B 癒痕 (非投与) 群、

C Sham 群、D bFGF 投与群

一方、形態計測では、bFGF を投与した群は、非投与の群に比べて術後 2 週および 4 週で上顎歯列弓幅径が大きな値を示し、コラーゲン線維蓄積の抑制による一定の効果が得られたと考えられた。しかし、正常群よりも小さな値を示し、原因として術後の創収縮の影響が強いものと考えられた。

2. 術直後の bFGF の投与

そこで、創収縮を担う筋線維芽細胞のアポトーシスを促進させるため、創傷治癒過程のより早い段階、すなわち、術直後に bFGF 水溶液の局所投与を行った。その結果、以下の知見が得られた。

- ・免疫組織化学的検索により、術直後の bFGF 投与群では、非投与群に比べてより早い時期での筋線維芽細胞のアポトーシスが確認された (Hata et al., Acta Odontol Scand, 2013)。
- ・上顎歯列弓幅径は術後 2 週で正常群と同等の値を示し、筋線維芽細胞のアポトーシスの促進による創収縮の抑制効果が示唆された。

以上の成果から、顎発育抑制の緩和のためには、筋線維芽細胞のアポトーシスの促進およびコラーゲン線維蓄積の抑制を達成できるように、投与回数とその時期を検討する必要がある。そのためには、創傷治癒の異なった時点で bFGF を投与し、細胞やコラーゲンの動態を経時的に追跡して、複数回の投与による変化を連続的にとらえる必

要があり、この追跡には培養系を用いた *in vitro* の実験系を最初に行うのが有利と考えられる。研究分担者である山崎は、ラット皮膚由来の線維芽細胞を用いて三次元ゲル内細胞培養系を構築し、 α -平滑筋型アクチン (α -SMA) 発現を指標に、線維芽細胞から収縮性を持つフェノタイプ、すなわち筋線維芽細胞へ変換する TGF- β 1 を介したメカニズムを既に研究している (Hata et al., J Pharmacol Sci, 2014)。

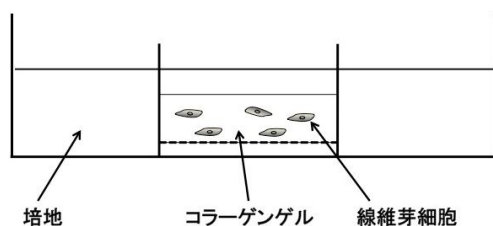


図2 三次元ゲル内細胞培養系の模式図

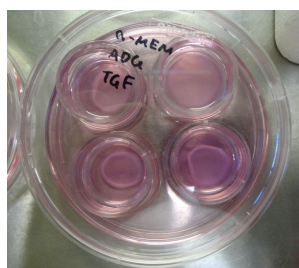


図3 三次元ゲル内細胞培養の写真

一方、TGF- β 1 のアイソフォームである TGF- β 3 は、癒痕形成を減弱するということが報告されている (Shah et al., J Cell Sci, 1995)。また、近年、メカニカルストレスなどの物理的刺激により活性化される TRPV4 チャンネルが、TGF- β 1 によって発現が上昇し、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に関与する可能性が報告されている (Adapala et al., J Mol Cell Cardiol, 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro* で創傷治癒のモデルを構築し、その中で細胞やコラーゲン線維の動態を追跡して、TGF- β 3 や TRP チャンネルの関与について検討する。得られた結果に従ってラットの創傷部位に TGF- β 3 や TRP チャンネル拮抗薬の投与を行い、*in vivo* の系でその

妥当性を検証することとした。

3. 研究の方法

細胞培養系 *in vitro*

三次元培養系に対して TRP チャンネル活性化薬および阻害薬の投与を行った。

実験細胞

生後 2 日齢のラット皮膚から単離した線維芽細胞を用いた。

実験方法

(1) 培養法

既に実施可能な、3D-collagen gel (Nitta Gelatin Inc.) 細胞封入培養により生体を擬似した条件下で培養する。 1×10^5 cells/ml の濃度で線維芽細胞をコラーゲンゲルに封入し、DMEM (10% bovine calf serum) 培養液にて 10 日間三次元で培養した。

(2) 解析法

1) 筋線維芽細胞の収縮の解析

セルカルチャーインサートに対する収縮率を算出するため 2 日間隔の連続写真解析を Image J software を用いて行った。

⇒ 癒痕収縮の定量的評価

2) 筋線維芽細胞および TRPV2 の発現に

関する解析

α -SMA および TRPV2 の免疫蛍光染色を行った。

3) ケラチノサイトから放出される TGF- β 1

の量の解析

モデルに線維芽細胞を包埋せず、ケラチノサイトのみを播種し、TGF- β 1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems.) を用いて、ケラチノサイトから培養液中に放出される TGF- β 1 の量を測定した。

4) 線維芽細胞およびケラチノサイトの

TRPV2 および α -SMA の mRNA 量の解析

培養細胞から抽出した total RNA から cDNA を合成し、PCR (94 °C -5 sec, 58 °C -30 sec, 72 °C -45 sec, 40 cycles) で増幅し、 α -SMA および TRPV2 の発現を定量した。

5) TRPV2 チャンネルの機能的発現の解析

Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fluo 4 で処置した線維芽細胞を用いて、3 秒ごとに細胞のデータのサンプリングを行い、TRPV2 チャンネル活性化薬および阻害薬に対する細胞内カルシ

ウム濃度変化を計測した。

動物実験系 in vivo

in vitro での結果を踏まえて、in vivo での創傷治癒時の筋線維芽細胞の発現および TRPV2 の発現を検討した。

実験動物

生後 2 日齢の Wister 系雄性ラットを用いる。ラットは正常群、瘢痕形成群に分け実験を行う。受傷後 4 日目の皮膚のサンプリングを行った。

実験方法

-SMA および TRPV2 の免疫蛍光染色を行った。

4. 研究成果

ラット皮膚三次元培養系を用いた in vitro の実験系によって、上皮が重層化する過程において恒常的に放出された TGF- β 1 が線維芽細胞の -SMA 発現を増強することから、上皮 - 結合組織の細胞間の相互作用の重要性が明らかとなった。

その後、創傷治癒時の瘢痕収縮における細胞の動態を追跡するために、ラット皮膚三次元培養系を用いて、TGF- β 1 シグナリングと、近年、創傷治癒における線維芽細胞の分化誘導に関与すると報告される Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルの関連性について検討を行ってきた。

平成28年度には、TGF- β 1 受容体阻害薬や、TRPV2 チャンネル活性化薬および阻害薬を用いて三次元培養ゲルの収縮率を計測し、TGF- β 1 受容体阻害薬である LY364947、TRPV2 阻害薬である SKF96365 ならびにTranilast によってゲルの収縮率が有意に減少することを見出した。以上より、瘢痕収縮には、内在性に産生された TGF- β 1 と TRPV2 チャンネルが関与している可能性を示した。

平成29年度には、瘢痕収縮におけるTRPV2 チャンネルの上皮と線維芽細胞における役割を明らかにすることを目的とし、実験を行った。

結果として、TRPV2阻害薬の処置により、ゲルの収縮が用量依存的に抑制されたことから、コラーゲンゲルの収縮にTRPV2の関与が示された。線維芽細胞における -SMAのmRNA量はTRPV2阻害薬によって用量依存的に減少した。ケラチノサイトを播種していない条件下で、TGF- β 1処置によるゲルの収縮がTRPV2阻害薬によって抑制されたことから、線維芽細胞に発現したTRPV2がTGF- β 1によるゲルの収縮に寄与することが明らかになった。TRPV2阻害薬の処置でケラチノサイトから放出されるTGF- β 1の放出量が減少した。三次元培養モデルにおいて、線維芽細胞ではTRPV2ならびに -SMAのmRNAとタンパクが発現し、ケラチノサイトではTRPV2のみのmRNAとタンパクが発現が認められた。TGF- β 1で前処置した線維芽細胞において、TRPV2活性化薬2-APBによって細胞内Ca²⁺濃度が増加し、その効果はTRPV2阻害薬で抑制された。TRPV2をロックダウンした線維芽細胞において、2-APBによる細胞内Ca²⁺濃度増加の抑制と -SMAのmRNA量の減少が認められた。

さらに、動物実験では 2日齢ラットの背部皮膚に創傷を作成し、4日後に創部のサンプリングを行い、免疫蛍光染色を行ったところ、上皮遊走時の上皮舌にTRPV2の発現を認め、結合組織層の肉芽組織にTRPV2ならびに -SMAの発現を認めた。

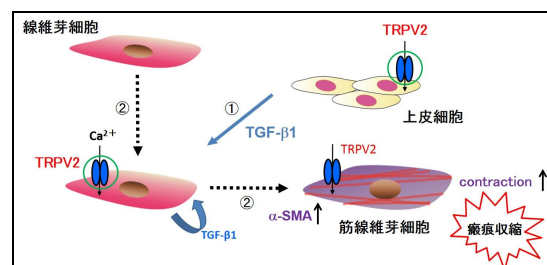


図4. 線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化におけるTRPV2の関与

①上皮細胞に発現するTRPV2はTGF- β 1放出を促進する。
線維芽細胞に発現するTRPV2は筋線維芽細胞への分化を促進する。

結論として、創傷治癒モデルの収縮に線維芽細胞およびケラチノサイトに発現するTRPV2チャンネルが関与すること、また、TRPV2阻害薬

が癬痕収縮を抑制する可能性を示し(図4)、
Journal of Dermatological Scienceに論文受
理された。(IF 3.73)

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)

Taro Ishii, Kunitoshi Uchida,
Shozaburo Hata, Mitsutoki Hatta, Tomo
Kita, Yuki Miyake, Kazuhiko Okamura,
Sachio Tamaoki, Hiroyuki Ishikawa, Jun
Yamazaki. TRPV2 channel inhibitors
attenuate fibroblast differentiation
and contraction mediated by
keratinocyte-derived TGF- β 1 in an *in
vitro* wound healing model of rats.
Journal of Dermatological
Science. 2018; 90(3): 332-42.

[学会発表](計 6 件)

Shozaburo Hata, Jun Yamazaki, Takashi
Kajii, Hiroyuki Ishikawa.

MMP inhibitor suppresses myofibroblastic
differentiation in three-dimensional
wound-healing model of rat skin. 115th
American Association of Orthodontists
Annual Session, San Francisco (USA) May
2015.

石井太郎, 秦省三郎, 山崎純, 石川博之.
ラット皮膚創傷治癒モデルにおいて TGF-
 β 1 を介した筋線維芽細胞の分化が癬痕収縮を促
進する. 第40回 日本口蓋裂学会総会・学
術大会, 大阪, 2016年5月

石井太郎, 秦省三郎, 中島一記, 山崎純,
石川博之. TGF- β 1 シグナリングを介した癬痕
組織を評価するためのラット皮膚創傷治癒モ
デルの作成. 第75回 日本矯正歯科学会大
会, 徳島, 2016年11月

石井太郎, 秦省三郎, 山崎純, 石川博之.
ラット皮膚創傷治癒モデルの収縮に対する
TRPチャンネル阻害薬の抑制効果. 第41回日本口
蓋裂学会総会・学術大会, 東京 2017年5月

石井太郎, 秦省三郎, 八田光世, 内田邦敏,
玉置幸雄, 石川博之, 山崎純. TRPチャンネル阻
害薬はラット皮膚創傷治癒モデルの癬痕収縮を抑制す
る. 第76回 日本矯正歯科学会大会, 札幌,
2017年11月

石井太郎, 秦省三郎, 三宅佑宜, 八田光世,

内田邦敏, 玉置幸雄, 石川博之, 山崎純. ラ
ット皮膚創傷治癒モデルの癬痕収縮に対するTRPチャ
ネル阻害薬の効果. 第44回 福岡歯科大学学会総
会, 福岡, 2017年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川博之 (Ishikawa, Hiroyuki)
福岡歯科大学・口腔歯学部・常務理事
研究者番号: 20184492

(2) 研究分担者

沢禎彦 (Sawa, Yoshihiko)
岡山大学・医歯薬総合研究科・教授
研究者番号: 70271666

(3) 研究分担者

山崎純 (Yamazaki, Jun)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号: 50230397

(4) 研究分担者

梶井貴史 (Kajii, Takashi)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号: 60322822

(5) 研究分担者

中島一記 (Nakashima, Kazuki)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号: 80610980

(6) 研究分担者

秦省三郎 (Hata, Shozaburo)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号: 40736732