

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22703

研究課題名(和文) 標的指向型liposomeを用いたリラキシンによる口蓋癒痕組織新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of new treatment strategy for the palatal scar tissue using RLN2 carried by the target-orientated liposomes.

研究代表者

森山 啓司(Moriyama, Keiji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20262206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋形成術後に生じる癒痕組織は生涯を通じて口蓋裂患者の顎顔面口腔領域の形態と機能に大きな影響を与える。現在口蓋癒痕組織の根本的治療法はなく、克服すべき課題となっている。口蓋発生におけるヒストンメチル化酵素SETDB1の役割について検討した。神経堤細胞特異的Setdb1欠失マウスを作製し、胎仔マウス口蓋における表現型解析、細胞増殖能について検討したところ、Setdb1は口蓋の発生過程において細胞増殖能およびPax9、Wnt5a、Fgf10の発現に影響を与えている可能性を見いだした。上皮特異的にSetdb1を欠失させたマウスでは、口蓋上皮の異常のみならず歯の発生過程にも深く関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織の癒痕化は損傷を受けた後の創傷治癒過程で生じ、創部の閉鎖に寄与する。炎症性細胞の過剰な遊走によりTGF- $\beta$ の活性化が生じ、線維芽細胞・筋線維芽細胞の増殖や活性化の結果コラーゲンなどの細胞外基質が過剰に産生されることが癒痕組織形成の主なメカニズムとされている。得られた成果は、口蓋発生における上皮組織の増殖やメカニズムの一端を明らかとし、歯科領域にとどまらず、皮膚の癒痕組織や臓器線維症の研究への波及効果が予想される。

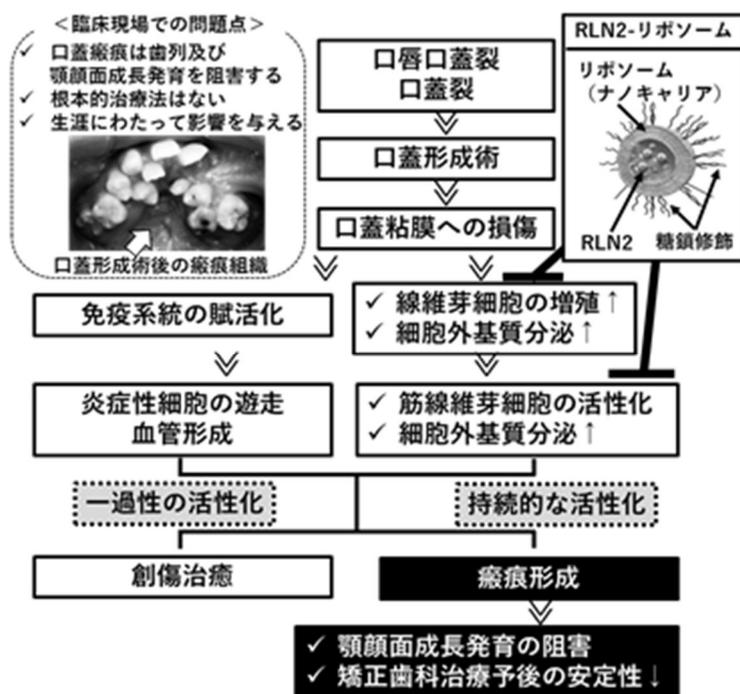
研究成果の概要(英文)：Scar tissue that develops after palatoplasty significantly affects the morphology and function of the maxillofacial-oral region in cleft palate patients throughout their lives. Currently, there is no treatment for palatal scar tissue, and this remains a challenge to overcome. We investigated the role of the histone methyltransferase SETDB1 in palatal development. We generated neural crest cell-specific Setdb1-deficient mice and examined phenotypic analysis and cell proliferative capacity in the fetal mouse palate and found that Setdb1 may affect cellular proliferative capacity and expression of Pax9, Wnt5a, and Fgf10 during palatal development. In mice with epithelial-specific deletion of Setdb1, we showed that Setdb1 may be deeply involved not only in abnormalities of the palatal epithelium but also in the process of tooth development.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂 口蓋発生 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

組織の癒傷化は損傷を受けた後の創傷治癒過程で生じる。炎症性細胞の過剰な遊走により TGF- $\beta$  の活性化が生じ、線維芽細胞・筋線維芽細胞の増殖や活性化の結果、コラーゲンなどの細胞外基質が過剰に産生されることが癒傷組織形成の主なメカニズムとされている。これまでに、線維症や癒傷治療薬として 5-FU や siRNA 製剤 (RXI-109) 等が臨床治験に進んでいるが、副作用が強く実用化には至っていない。RLN を最新の DDS 法によって癒傷組織特異的に応用することは、歯科領域の口蓋裂治療体系に新たな治療体系をもたらすシーズとなる可能性を有し、得られる成果は、歯科



領域にとどまらず、皮膚の癒傷組織や臓器線維症の研究への波及効果が予想される。現在口蓋形成術の術式は施設により様々で依然として口蓋に癒傷組織を有する患者が後を絶たない。研究者代表者らは、RLN2-lipo のマウス頭蓋骨縫合拡大促進作用を報告し、現在 in vivo におけるリポソームの磁性制御による顎顔面骨縫合の新規制御法を世界に先駆けて開発している。リポソームは生体親和性が高く、抗がん剤の DDS として臨床応用されている。リポソーム表面に様々な抗体や糖鎖を修飾することで標的指向性を高めることができ、SLX の修飾により炎症部位特異的な薬剤の輸送が可能となる (図 5)。RLN2 は心血管拡張作用や心筋の線維化予防と心房急収縮率促進作用を有することから、急性心不全の新規治療薬として米国では治験第 III 相に進んでいる。また RLN2 の強力な抗線維化作用を腎臓線維症の治療薬として応用する研究が行われている。さらに、ブタ皮膚の創傷治癒実験では、RLN2 は癒傷形成の顕著な抑制と治癒期間の短縮に寄与すると報告されている。これら研究代表者らの研究実績と RLN2 の国際的な臨床応用への動向を鑑み、口蓋裂患者に対して新たな治療戦略のシーズとなると考え本研究の構想に至った。

### 2. 研究の目的

口蓋裂は顎顔面領域に形態異常をもたらす先天異常疾患のなかで最も頻度の高い疾患である。1 歳ごろ行われる口蓋形成術の合併症として、術後に種々の程度で口蓋に癒傷組織が生じ、生涯を通じて顎顔面口腔領域の形態や口腔機能に大きな影響を与える。現在、口蓋癒傷組織の根本的治療法はなく、克服すべき課題となっている。

リラキシン (Relaxin, RLN) はインシュリン様ペプチドホルモンファミリーに属し、主に周産期後期に子宮や卵巣等より血中に分泌され、骨盤の恥骨結合を弛緩させることが知られている。近年、RLN は強力な TGF- $\beta$  -Smad2 経路阻害作用を有することが明らかにされ、抗線維化作用を持つことが明らかにされた。これらを踏まえ、本研究の目的を以下の 3 項目とした。

- (1) 癒傷組織特異的に存在する筋線維芽細胞および線維芽細胞の不死化とクローン化を行い、これら細胞の表現型に対する RLN2 (RLN2-lipo) の作用を in vitro で解析する。
- (2) 口蓋癒傷形成モデルラットに生体親和性標的指向型リポソーム (糖鎖シアリルルイス X : SLX 表面修飾) を DDS として RLN2-lipo を作用させ、癒傷形成に対する作用を組織学的に検討する
- (3) 癒傷形成モデルラットにおける上顎骨の成長発育様相に与える RLN2-lipo の作用を形態学的に検索する

### 3. 研究の方法

## 研究方法

(1)RLN2-lipo の構築：リポソーム表面に炎症組織に特異的集積を示す糖鎖 SLX を修飾し、RLN2 および Cy5.5 を内包させる (GLYCOLIPO、片山化学)。

(2)ラット株化筋線維芽細胞樹立およびモノクローナル化：4 週齢雄性 SD ラット口蓋粘膜に 3x5mm の骨膜を含む粘膜欠損を形成し、癒痕組織を形成する。これら癒痕組織より、初代培養を経て、セルソーター (学内共有機器、FACS Aria II) にて  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性筋線維芽細胞および対照群として  $\alpha$ -SMA 陰性線維芽細胞を回収後、不死化細胞作製受託サーピス (Applied Biological Materials 社) にておのおの不死化細胞を得、限界希釈法によりクローニング (n=10) を行う。

(3)RLN2-lipo が株化筋線維芽細胞特性に与える影響についての解析：各細胞に RLN2-lipo を作用させ (0~1000 ng/ml)  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$  タンパク質の発現量、Smad 2/3 や JNK シグナル伝達関連因子のリン酸化の定量を行う。また、細胞増殖、アポトーシス、各種 MMPs 発現量、コラーゲン分泌量、コラーゲンゲル収縮率、細胞遊走率について解析する。

(4)RLN2-lipo がラット口蓋癒痕組織の形成および顎成長に与える影響についての解析：上記方法でラット口蓋に癒痕形成を行う (実験群 : n=36、非処置群を対照群とする : n=36) と同時に、生理食塩水、liposome 単独、または RLN-lipo (10~1000 ng/kg) を 48 時間ごとに尾静脈より注入し、liposome の集積状況を *in vivo* imaging にて確認する。1w, 3w で口蓋の切片を作成後、 $\alpha$ -SMA 免疫組織染色、マッソン染色やシリウスレッド染色で癒痕組織料の定量化を行い、至適濃度を求める。また、9w (13 週齢) まで 1w ごとに  $\mu$ CT 撮影を行い、上顎骨の成長量や成長方向を比較する。

## 4 . 研究成果

口蓋発生におけるエピジェネティック関連酵素の一つヒストンメチル化酵素 SETDB1 の役割について報告した。神経堤細胞特異的 Setb1 欠失マウスを作成し、胎仔マウス口蓋における表現型の解析を行ったところ、Pax9、Bmp4、Bmpr1a、Wnt5a、Fgf10 遺伝子発現が有意に低下し、SMAD1/5/9 のリン酸化が低下していた。これらの結果から、Setdb1 は、Pax9 を介した SMAD 依存的な BMP シグナルを減少させることにより、口蓋裂発生に関与している可能性について報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Inoue Atsuhiko, Tsuji Michiko, Baba Yoshiyuki, Moriyama Keiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Non-prosthetic treatment using segmental osteotomy and bone grafting in a patient with cleft lip and palate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plastic and Aesthetic Research	6. 最初と最後の頁 51 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20517/2347-9264.2022.49	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogura Kenji, Kobayashi Yukiho, Hikita Rina, Tsuji Michiko, Moriyama Keiji	4. 巻 62
2. 論文標題 Three dimensional analysis of the palatal morphology in growing patients with Apert syndrome and Crouzon syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 153 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kano Sakurako, Higashihori Norihisa, Thiha Phy, Takechi Masaki, Iseki Sachiko, Moriyama Keiji	4. 巻 598
2. 論文標題 The role of the histone methyltransferase SET domain bifurcated 1 during palatal development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 森山啓司	4. 巻 特別号
2. 論文標題 健康長寿社会における矯正歯科診療の役割を再考する-形態と機能への関与：顎顔面領域の形態形成や機能発達の障害改善に向けた矯正歯科の取り組み	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 歯界展望	6. 最初と最後の頁 109 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kano Sakurako, Higashihori Norihisa, Thiha Phyo, Takechi Masaki, Iseki Sachiko, Moriyama Keiji	4. 巻 598
2. 論文標題 The role of the histone methyltransferase SET domain bifurcated 1 during palatal development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Takayuki, Kurimoto Ryota, Chiba Tomoki, Matsushima Takahide, Nakamichi Ryo, Tsutsumi Hiroki, Takada Kaho, Yagasaki Lisa, Kato Tomomi, Shishido Kana, Kobayashi Yukiho, Matsumoto Tsutomu, Moriyama Keiji, Asahara Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Mkx regulates the orthodontic tooth movement via osteoclast induction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 780 ~ 786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01233-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Pooktuantong Ornnicha, Ogasawara Takeshi, Uezono Masayoshi, Chantarawatit Pintu-on, Moriyama Keiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Optimization of Loading Condition for Maxillary Molar Intrusion with Midpalatal Miniscrews by Using Finite Element Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 11749 ~ 11749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app112411749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwanami Kadowaki Kaori, Uchikoshi Tetsuo, Uezono Masayoshi, Kikuchi Masanori, Moriyama Keiji	4. 巻 109
2. 論文標題 Development of novel bone like nanocomposite coating of hydroxyapatite/collagen on titanium by modified electrophoretic deposition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1905 ~ 1911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.37182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Chenning, Uchikoshi Tetsuo, Liu Lihong, Iwanami-Kadowaki Kaori, Uezono Masayoshi, Moriyama Keiji, Kikuchi Masanori	4. 巻 297
2. 論文標題 Antibacterial-functionalized Ag loaded-hydroxyapatite (HAp) coatings fabricated by electrophoretic deposition (EPD) process	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Letters	6. 最初と最後の頁 129955 ~ 129955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matlet.2021.129955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Teekavanich Chutimont, Uezono Masayoshi, Takakuda Kazuo, Ogasawara Takeshi, Techalertpaisarn Paiboon, Moriyama Keiji	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of Cortical Bone Microdamage and Primary Stability of Orthodontic Miniscrew Using a Human Bone Analogue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1825 ~ 1825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14081825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamimoto Hiroyuki, Kobayashi Yukiho, Moriyama Keiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Relaxin 2 carried by magnetically directed liposomes accelerates rat midpalatal suture expansion and subsequent new bone formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone Reports	6. 最初と最後の頁 100202 ~ 100202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2019.100202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Uezono Masayoshi, Ogawa Takuya, Kang Junka, Moriyama Keiji.
2. 発表標題 Correlation between inferior turbinate and alveolar bone bridge following secondary bone grafting for unilateral cleft lip and palate patients
3. 学会等名 14th International Cleft and Craniofacial Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎貴行、早川大地、小林起穂、辻美千子、森山啓司
2. 発表標題 Stickler症候群、Robinシークエンス、および非症候性口蓋裂患者の歯列弓および口蓋形態の比較
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川卓也
2. 発表標題 当科における矯正歯科治療終了症例から顎裂部骨移植適応時期を考察する
3. 学会等名 第46回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 狩野桜子、東堀紀尚、森山啓司
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素 SETDB1が口蓋発生に与える影響
3. 学会等名 第46回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 姜順花、小川卓也、横内里帆、稲垣有美、船橋健太、上園将慶、森山啓司
2. 発表標題 片側性口唇口蓋裂患者における顎裂部骨移植の時期の違いが顎裂部咬合再建におよぼす影響について
3. 学会等名 第46回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川卓也
2. 発表標題 包摂性のある社会の実現に向けた矯正歯科の役割～難病や障害を抱えている患者の矯正歯科治療～
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iwanami-Kadowaki K, Uchikoshi T, Uezono M, Kikuchi M, Moriyama K
2. 発表標題 Development of novel bone-like nanocomposite coating of hydroxyapatite/collagen on titanium by modified electrophoretic deposition for implant surfaces.
3. 学会等名 ORTHONIGMA VIII
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jindarojanakul P, Kobayashi Y, Kamimoto H, Satraha S, Moriyama K
2. 発表標題 Sod3 regulates periodontal tissue remodeling through ROS modulation during orthodontic tooth movement of rat molars.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society & The 5th International Congress（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎貴行、栗本遼太、千葉朋希、松本力、森山啓司、浅原弘嗣
2. 発表標題 転写制御因子 Mohawk homeobox は破骨細胞の誘導を介して矯正学的な歯の移動を制御する。
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野桜子、東堀紀尚、ピョティハ、武智正樹、井関祥子、森山啓司
2. 発表標題 口蓋の発生過程におけるヒストンメチル化酵素 SETDB1 の役割.
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山啓司
2. 発表標題 口腔顎顔面の形態形成・成長発育異常の診断・治療から考える歯科矯正学の現在と未来 - ヘルスサイエンスの起点としての歯科矯正学.
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山啓司
2. 発表標題 顎顔面領域の形態形成や機能発育の障害改善に向けた矯正歯科の取り組み.
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 紙本裕幸、小林起穂、森山啓司.
2. 発表標題 磁性制御型リポソームにより標的指向化されたリラキシンはラット正中蓋縫合拡大と骨形成を促進する
3. 学会等名 第84回口腔病学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 卓也 (Ogawa Takuya)  (50401360)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  (12602)	
研究分担者	東堀 紀尚 (Higashihori Norihisa)  (50585221)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師  (12602)	
研究分担者	小林 起穂 (Kobayashi Yukiho)  (20596233)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------