

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07388

研究課題名(和文) 微細線維成分MAGP-1のTGF-β 捕捉機能を応用した口蓋裂術後瘢痕抑制法の開発

研究課題名(英文) Development suppression method for the scar after cleft palate repair by applying TGF-beta trapping function of microfibril assembly component MAGP-1

研究代表者

藤田 隆寛 (Fujita, Takahiro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：30781421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂閉鎖術は上顎の成長を抑制し歯並びを悪くすることが問題となっています。手術創を治癒させようと、線維芽細胞がコラーゲンを大量に産生し瘢痕をつくるためです。近年、コラーゲン産生を誘導するTGF-βが体の微細線維を形成するMAGP-1と結合すると、その機能が抑制されることが報告されました。そこで、口蓋裂の手術創にMAGP-1を投与することで、瘢痕形成を抑制できるのではないかと考えました。現在、ヒト歯肉線維芽細胞を伸展性機械刺激で培養する培養系瘢痕モデルを作製し、ヒト歯肉線維芽細胞が伸展性機械刺激で顕著にMAGP-1の遺伝子発現を増大させることを見出しています。

研究成果の概要(英文)：Cleft palate surgery suppresses the growth of the maxilla and makes it difficult to align the teeth. In order to cure surgical wounds, fibroblasts produce a large amount of collagen by anti-inflammatory cytokine TGF-β and form scars. Recently, it was reported that TGF-β is suppressed by binding to MAGP-1 which forms microfibril in somatic connective tissue. Therefore, it was thought that administration of MAGP-1 to cleft surgical wounds could inhibit scar formation. Currently, we have prepared an in-vitro scar model with human gingival fibroblasts cultured in extensible mechanical stimulation, and found that the cells significantly increase MAGP-1 gene expression by extensible mechanical stimulation.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：矯正歯科 線維芽細胞 口蓋裂 瘢痕組織 microfibril TGF MAGP-1

1. 研究開始当初の背景

癒痕は創傷組織の修復の結果、細胞外マトリックスの大量合成が起こったもので、transforming growth factor β (TGF- β)シグナリングの異常な活性化が、その下流にある α 型コラーゲンの過剰産生と筋線維細胞への分化誘導に大きな役割を演じることが明らかにされている (Zhou et al. Overexpression of RACK1 inhibits collagen synthesis in keloid fibroblasts via inhibition of transforming growth factor- β 1/Smad signaling pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:15262-15268.)。最近、MAGP-1 が組織に遊離している活性型 TGF- β を捕捉し過剰な TGF- β シグナリングを抑制するという興味深い報告がなされた。MAGP-1 非存在下の線維芽細胞と脂肪細胞では、TGF- β の持続的な結合が SMAD-2/3 リン酸化を異常に活性化させ、コラーゲンの過剰産生と脂肪組織の異常形成が起こる (Craft. MAGP1, the extracellular matrix, and metabolism. *Adipocyte.* 2014;4:60-64.)。本研究は、線維束の規則的配列と成長に貢献する微細線維の接着分子として考えられていた MAGP-1 が、組織に遊離している活性型 TGF- β を捕捉して微細線維に固定することで、線維芽細胞の過剰な TGF- β シグナリングが抑制されること、MAGP-1 ノックアウトマウスでは線維と脂肪組織の増殖による肥満が起こることに着目し、口蓋創傷部への MAGP-1 投与が癒痕形成を抑制する可能性を考えた。現在、糖尿病臨床医学領域では、MAGP-1 と肥満の関係が世界的に注目されている。血清 TGF- β 濃度はボディ・マス指数に相関し 2 型糖尿病の危険因子であること、その根拠として 2 型糖尿病では TGF- β を捕捉し抑制する組織内

MAGP-1 が減少することで、線維と脂肪組織の異常形成が起こることが明らかにされた (Levin and Borén. The extracellular matrix protein MAGP1 is a key regulator of adipose tissue remodeling during obesity. *Diabetes.* 2014;63:1858-1859.)。

以上を考え合わせ、本研究では、口蓋形成術後の組織に対する MAGP-1 標品の投与が、線維芽細胞の TGF- β シグナル伝達の遮断による癒痕形成の予防に有用である可能性、すなわち MAGP-1 の機能を応用した癒痕抑制のための新しい内科的アプローチを検討する。

2. 研究の目的

本研究は、MAGP-1 標品が TGF- β 抑制によって口蓋の癒痕形成を阻止することが可能かを検討する。口蓋組織の創傷の治癒過程で線維芽細胞が産生する微細線維成分 MAGP-1 と TGF- β との相互作用を *in vitro* の生化学的分析、ならびに癒痕形成動物モデルを応用した *in vivo* の形態学的分析によって明らかにする。

3. 研究の方法

【*In vitro* 研究】

1) 細胞培養

マウス (ICR および BL6) 口蓋線維芽細胞とヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 を使用し、細胞伸展装置専用 α 型コラーゲンコートチャンバーにて α -MEM で通常培養する。90%コンフルエントに達したところで細胞伸展装置 (STB-140, STREX) 内蔵の専用 CO₂ インキュベータ (APM-500, ASTEC) にセットする。

2) 細胞伸展

STB-140 にて至適条件 (伸展率 5 %、周期 60 秒、1 週) で培養する。

3) 微細線維成分分析

微細線維成分 MAGP-1, Fibulin-5 と EMILIN-1 mRNA 発現量をリアルタイム PCR で、またタンパク発現量を特異抗体にて ELISA およびウェスタンブロットにて分析する。また、微細線維配列の規則性を免疫染色と染色領域のスキャン・ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) による面積定量によって評価する。

4) TGF- β と SMAD-2/3 リン酸化の分析

培養上清および細胞の TGF- β 含有量、また細胞の SMAD-2/3 リン酸化を ELISA とウェスタンブロットで分析する。また $\alpha 1(I)$ 型コラーゲン産生をザイモグラフィで定量する。

5) MAGP-1 阻害

MAGP-1 siRNA および抗 MAGP-1 抗体 (Abcam, BD Biosciences) 添加による MAGP-1 阻害環境で伸展培養した細胞について、MAGP-1, Fibulin-5, EMILIN-1 および $\alpha 1(I)$ 型コラーゲンの mRNA 発現量をリアルタイム PCR で、またタンパク発現量と SMAD-2/3 リン酸化を ELISA およびウェスタンブロットにて、さらに線維配列の規則性を免疫染色と ImageJ による面積定量で評価する。

MAGP-1 siRNA および抗 MAGP-1 抗体の未添加培養と比較して、培養上清の

TGF- β 含有量、細胞の SMAD-2/3 リン酸化、ならびに $\alpha 1(I)$ 型コラーゲン産生が増大することを証明する。

【In vivo 研究】

1) マウス

ICR および BL6 マウス口蓋に癒痕を形成する (参考文献 1、2)。さらに、通常マウスの MAGP-1 による癒痕阻止実験が成功した場合、MAGP-1 KO マウス (参考文献 3) を応用した癒痕形成促進の解析に着手する。

2) MAGP-1 阻害 / 投与

MAGP-1 を siRNA および抗 MAGP-1 抗体 (Abcam, BD Biosciences) によって阻害する。骨膜を完全に除去して骨面を解放する癒痕形成術を施行する。痂皮形成直後から、生理食塩水、siRNA および抗体希釈液含有 Atelocollagen (AtrioCell, Koken) あるいは Matrigel (Corning) を 1 日に 1 回、痂皮の表面に塗布あるいはハミルトンシリンジで投与する。ドラッグデリバリー効果は既に確認している。

MAGP-1 標品 (Abnova, Origene) 含有 Atelocollagen あるいは Matrigel を 1 日に 1 回、痂皮の表面に塗布あるいはハミルトンシリンジで投与する。

以上が成功した場合、MAGP-1 KO マウスの癒痕解析に着手する。MAGP-1 KO マウスは開発者の Craft から入手 (参考文献 3)、肥満傾向がある通常マウスとして飼育される。

3) 組織学的分析

正常治癒と癒痕の肉眼的鑑別は1ヶ月で可能となる(参考文献1,2)。非脱灰組織をOCTコンパウンドに包埋して、タングステンナイフと切片専用粘着テープを用いて、川本法で10 μ の凍結連続切片を作製する。

(1) 膠原線維・微細線維の産生量をHEおよびVillanueva, Azan染色にて評価する。

(2) TGF- β の組織内含有量と線維芽細胞におけるSMAD-2/3リン酸化、ならびに組織の α 1(I)型コラーゲン産生を、組織リアルタイムPCRと免疫染色のImageJ解析で定量する。

4. 研究成果

In vitro 研究では、ICRマウスから分離培養した口蓋の線維芽細胞と、ヒト胎児由来の肺線維芽細胞IMR-90を使用し、細胞伸展装置専用 α 1(I)型コラーゲンコートチャンバーにて α -MEMで通常培養に成功した。細胞伸展装置STB-140にて、伸展至適条件(伸展率...5%、周期...60秒、期間:1週間)にて細胞伸展培養に成功した。微細線維成分分析では、微細線維成分MAGP-1, Fibrillin-1とEMILIN-1 mRNA・タンパクが細胞伸展によって増大することを、リアルタイムPCR、ELISA、ウエスタンブロッティングで見出した。これらは培養物において、複合体として共存していたため、免疫染色で共染された。また、ImageJによる蛍光免疫染色の定量的配列規則性評価では、規則的配列の増生はMAGP-1, Fibrillin-1とEMILIN-1によって促進されること、TGF- β の培養上清および細胞における存在はMAGP-1,

Fibrillin-1とEMILIN-1の増生を阻害すること、またSMAD-2/3の細胞質から核内への移行と、核内SMAD-2/3のリン酸化を確認することができた。MAGP-1阻害実験では、抗MAGP-1抗体(Abcam, BD Biosciences)添加で伸展培養した細胞について、MAGP-1, Fibrillin-1とEMILIN-1 mRNA・タンパクが抗体濃度依存性に阻害されることをリアルタイムPCR、ELISA、ウエスタンブロッティングで見出した。規則的配列の増生はMAGP-1, Fibrillin-1とEMILIN-1に対する特異抗体によって抑制されること、さらに、抗MAGP-1抗体未投与下ではTGF- β が培養上清に検出されないこと、細胞のSMAD-2/3リン酸化と α 1(I)型コラーゲン産生が抑制されている可能性も見出している。TGF- β は、線維芽細胞に受容体を介して認識され、コラーゲンなど細胞外マトリックスの産生を促進することで創傷の治癒に貢献するが、TGF- β シグナリングの異常な活性化は、線維芽細胞の筋線維細胞への変化と増殖、コラーゲンの過剰産生による癒痕形成をもたらす。また、MAGP-1ノックダウン環境でもTGF- β がSMAD-2/3リン酸化を異常に活性化させ、コラーゲンの過剰産生が起こる。従って、MAGP-1は微細線維成分EMILINとFibulinの接着を仲介し微細線維を規則的に配列するのみならず、TGF- β を捕捉して微細線維に固定することで、TGF- β の組織内への遊離と、過剰なコラーゲン産生を抑制すると考えられる。口蓋形成術後の創傷へのMAGP-1投与は、口蓋裂の口蓋形成術領域に、癒痕を予防する新しい内科的アプローチとして有用であると考えられた。以上を現在投稿準備中である。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 隆寛 (Fujita Takahiro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号 : 30781421

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし