

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15844

研究課題名(和文) 歯周組織を用いたマルファン症候群の新規分子イメージング診断技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel diagnostic technology for marfan syndrome using periodontal tissue

研究代表者

齋藤 正寛 (Saito, Masahiro)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40215562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：マルファン症候群は結合組織の弾性力を司るフィブリリン-1遺伝子の変異で発症する遺伝性の結合組織疾患である。主な死因は解離大動脈瘤となるが、同疾患を確実に診断する方法は存在していないのが現状である。そこで本研究ではフィブリリン-1を中心とする弾性線維を免疫染色で解析し、早期に解離性大動脈瘤を診断する技術開発に取り組んだ。本研究ではヒト大動脈の弾性繊維の解析を可能にするフィブリリン-1抗体を作製し、同サンプルを用いた免疫染色技術を確立した。今後は丸ファン症候群患者の口腔内から採取した歯肉組織を用いて弾性線維を解析して解離性大動脈瘤を診断する技術開発に取り組む予定である。

研究成果の概要(英文)：Marfan syndrome is a genetic connective tissue disease that caused by mutation of fibrillin-1 that is a major component of microfibril. Main cause of death of marfan syndrome is aortic aneurysm and dissection, however no reliable diagnostic method is available at present. In this project, we tried to develop a novel diagnostic technology of aortic aneurysm and dissection that investigating microfibril structure using anti-fibrillin-1 antibody. We generated immunostaining technology that is able to stain microfibril in the human aorta using anti-fibrillin-1 antibody. The diagnostic technology that suspect aortic aneurysm and dissection is going to develop by using gingival tissue obtained from marfan syndrome patient.

研究分野：歯科保存学

キーワード：結合組織疾患

1. 研究開始当初の背景

微細線維は歯周組織の機能維持および組織修復において重要な働きをする。その根拠として、微細線維の崩壊で発症するマルファン症候群が侵襲性歯周炎を発症する事が挙げられる。このマルファン症候群に関して、生命の危機につながる解離性大動脈瘤を発症する事から、微細線維の機能異常が歯周炎および解離性大動脈瘤を引き起こす共通の原因となると考えられている。このマルファン症候群に関して、解離性大動脈瘤の診断に用いる心エコー解析では大動脈の解離を100%予測することは困難であるため、その原因となる微細線維の崩壊を確実に診断する技術開発が求められている。そのため、本研究では比較的入手の容易なマルファン症候群患者の歯肉を採取して、蛍光イメージング技術で微細線維の崩壊を画像解析することで解離性大動脈瘤の破壊状態を予測する、新しい診断技術開発を目的としている。

2. 研究の目的

これまで研究代表者の齋藤は、マルファン症候群は歯周組織の微細線維の崩壊を引き起こし、そのため歯周炎疾患のハイリスク患者であることを報告してきた。そこで、比較的検体の採取の容易な歯肉を対象に微細線維の構造解析を行えば、マルファン症候群の解離性大動脈瘤を診断する新規診断技術として発展すると考えた。そこで、本研究では検体としての歯肉の微細線維の状態を解析するため、組織を透明化して3次元的に微細線維の構造を解析する蛍光イメージング技術の開発する研究計画を立案した。具体的には、東北大学病院心臓外科にて、マルファン症候群と診断され解離性大動脈瘤の手術を実施されたから歯肉を採取して、既に保管してある解離性大動脈瘤の保管検体と合わせて、組織学的に微細線維の崩壊状態を比較検討する事とした。すなわち本研究は期間内に蛍光イメージング技術を用いて歯肉の微細線維の構造を明らかにし、解離性大動脈瘤における組織崩壊を予測する新規診断技術の開発を目指す

3. 研究の方法

研究は、これまでマルファン症候群の新規診断技術を確立するために、その本質的な原因となる微細線維の崩壊を、歯肉組織の検体を用いて蛍光イメージング技術を応用して開発することを目的としている。期間内に以下の研究を行う事を予定している。

1) マルファン症候群の歯肉組織のバイオプシー技術の開発

東北大学病院心臓外科に来院するマルファン症候群患者で、解離性大動脈瘤の手術を行った患者から歯肉組織をバイオプシーする技術を開発する。

2) 微細線維崩壊診断システムの構築

1) で入手した歯肉組織と手術で摘出した大動脈サンプルを用いて、3次元解析に必

要な透明化技術と、微細線維崩壊を定性的に解析する蛍光イメージング診断技術を開発する。

4. 研究成果

本研究の目的であるヒト歯肉の微細線維構造を観察可能なヒトモノクローナル抗体の作成を行い、免疫染色で歯肉の微細線維構造から解離性大動脈瘤を予想可能な検査システムの構築することである。ヒト fibrillin-1 の N 末端領域の組換えタンパク質を 293free style cell を用いて産生し、Ni カラムを用いて精製を行った。精製したタンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。得られたクローンのより、western blotting および免疫沈降に使用できるのを選別し、実験に使用した。倫理委員会の承認の元、インフォームドコンセントを得られたマルファン症候群の患者の解離性大動脈瘤の手術時に得られたサンプルを用いて免疫染色を行った。作成した抗フィブリリン-1 抗体を用いた免疫染色を実施した。東北大学倫理委員会の許可のもとマルファン症候群の患者由来の大動脈のサンプルを用いて免疫染色を行った。解離性大動脈瘤の手術時に摘出したサンプルを用いて免疫染色を行ったところ、抗原賦活化処理を施すことで、前解離状態の部分で見られる特徴的な弾性板の断裂化と抗フィブリリン-1 抗体の免疫染色の状態はエラスチカ・マッソン染色と一致していた。また解離を起こしている部位では抗 fibrillin-1 抗体陽性の微細線維は観察されなかった。解離及び前解離状態共に大動脈中膜に置いて弾性線維の断裂化は観察されたが、外膜にて抗フィブリリン-1 抗体陽性の微細線維の形成が観察された。これらの観察結果よりマルファン症候群の大動脈は弾性線維の部分的な断裂化が進んでおり、解離を起こす部位ではさらに破壊が進んでいることが判明した。解離した部位に関して、弾性線維の破壊機構を観察すると、フィブリリン-1 の結合タンパク質であるパーシカンを分解する ADAMTS4 の集積が起きていることを見出した。ADAMTS4 の発現は、弾性板の破壊部位のみ発現していることから、解離の進行にパーシカンとフィブリリン-1 の破壊が関与することが示唆された。このことから本研究で作成された抗フィブリリン-1 抗体は大動脈瘤の解析において弾性板の破壊の解析に適した抗体であることが確認できた。

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 4 件)

1. Handa K, Abe S, Suresh VV, Fujieda Y, Ishikawa M, Orimoto A, Kobayashi Y, Yamada S, Yamaba S, Murakami

- S, Saito M. Fibrillin-1 insufficiency alters periodontal wound healing failure in a mouse model of Marfan syndrome. Arch Oral Biol. 2018 Mar 6;90:53-60. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.02.017. 査読有
2. Iwamatsu-Kobayashi Y, Abe S, Fujieda Y, Orimoto A, Kanehira M, Handa K, Venkataiah V S, Zou W, Ishikawa M, and Saito M. Metal ions from S-PRG filler have the potential to prevent periodontal disease Clinical and Experimental Dental Research Volume 3, Issue 4 August 2017 Pages 126–133 査読有
 3. Orimoto A, Kurokawa M, Handa K, Ishikawa M, Nishida E, Aino M, Mitani A, Ogawa M, Tsuji T Saito M, F-spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of TGF- β activity. Arch Oral Biol. 2017 Mar 1;79:7-13. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.019. 査読有
 4. Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, Horiuchi K, Nakano K, Kitashiro M, Matsunari H, Kimura T, Arima Y, Sampetean O, Nagaya M, Saito M, Saya H, Kosaki K, Nagashima H & Matsumoto M, Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts. Sci Rep. 2016 April 14;6:24413. DOI: 10.1038/srep24413 査読有

[学会発表](計 21件)

1. 齋藤正寛 口腔と全身の疾患を繋げる共通の標的：メカノバイオロジーを介した結合組織疾患発症機構の解析 第147回日本歯科保存学会秋季学術大会平成29年10月27日盛岡
2. Masahiro Saito Role of ADAMTSL6 on aortic aneurysm and dissection in Marfan

syndrome Gordon reserch conference Elastin, Elastic fibers & microfibrils. 2017.8.1 Boston

3. 石河真幸, Geneva L. Williams, 折本愛、半田慶介、山田吉彦、齋藤正寛、Pannexin 3は新骨形成制御因子である、結合組織学会 2017年6月16日三重
4. 折本愛、石河真幸、半田慶介、千々岩みゆき、望月早月、村澤祐介、磯貝善蔵、岡田保典、齋藤正寛 ADAMTS superfamilyによるMarfan症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析 結合組織学会 2017年6月16日三重
5. V ベンカタ スレッシュ、半田慶介、竹立 匡秀、村上 伸也、齋藤正寛¹ 脂肪由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法の開発: プタモデルを用いた他家移植モデルの確立、第146回保存学会日本歯科保存学会春季学術大会2017年6月9日青森
6. 折本愛、二木正晴、石河真幸、半田慶介、齋藤正寛、ADAMTSL6 β を介したMarfan症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析、第146回保存学会日本歯科保存学会春季学術大会2017年6月9日青森
7. 半田慶介、齋藤正寛、多次元歯槽骨再生療法の実用化を目指したマイクロミニプタ細胞移植モデルの確立、第16回日本再生医療学会総会 2017年3月9日仙台
8. 齋藤正寛 歯周組織再生医療の開発と課題 第16回日本再生医療学会総会 2017年3月7日仙台
9. Orimoto A, Murasawa Y, Isogai Z, Chijiiwa M, Mochizuki S, Imanaka- Yoshida K, Okada Y and Saito M, ADAMTSL6 β exacerbates tissue destruction of aortic aneurysm and dissection in Marfan syndrome mouse model through promotion of ADAMTS4 activity. ASMB2016, St. Petersburg, 2016.11.15

10. Orimoto A, Murasawa Y, Isogai Z, Chijiwa M, Mochizuki S, Imanaka- Yoshida K, Okada Y and Saito M, ADAMTSL6 β exacerbates tissue destruction of aortic aneurysm and dissection in Marfan syndrome mouse model through promotion of ADAMTS4 activity. ASMB2016, St. Petersburg, 2016.11.15
11. 石河 真幸、小林 洋子、折本 愛、半田 慶介、齋藤 正寛、Pannexin 3はWnt/ β -cateninおよびp21 signalingを制御することで骨前駆細胞の増殖を抑制する。第145回保存学会日本歯科保存学会秋季学術大会、2016年10月28日松本
12. 倉本将司、川島伸之、Alamuddin Yassin Bakihit、橋本健太郎、野田園子奈良圭介、齋藤正寛、輿地隆史、Lipopolysaccharide存在下におけるマウス歯乳頭細胞のmineral trioxide aggregateに対する反応性、第145回保存学会日本歯科保存学会秋季学術大会、2016年10月28日松本
13. 富山潔、石澤将人、長谷川晴彦、渡辺清子、河田亮、二瓶智太郎、齋藤正寛、高橋理、浜田信城、Exterkate RAM, 向井義晴、カキタンニン処理をおこなったポリマイクロバイアルバイオフィルム細菌叢の網羅的解析、第145回保存学会日本歯科保存学会秋季学術大会、2016年10月27日松本
14. 津島 賢一郎, 山田 聡, 栗田 敏仁, 山羽 聡子, 阪下 裕美, 木下 昌毅, 竹立 匡秀, 北垣 次郎太, 山下 元三, 柳田 学, 野崎 剛徳, 北村 正博, 齋藤正寛, 村上 伸也、Loeys-Dietz症候群モデルマウスを用いた歯周病の分子病態解析、第59回秋季日本歯周病学会学術大会、2016年10月7日 新潟
15. 半田慶介、丸山顕太郎、根本英二、齋藤正寛、未分化骨芽細胞細胞移植による歯槽骨再生療法について(第一報)ブタ歯槽骨由来未分化骨芽細胞の特性 第59回秋季日本歯周病学会学術大会、2016年10月7日 新潟
16. 肖 滨璐, 金谷 聡介, 向阪 幸彦, 須藤 瑞樹, 齋藤 正寛, 根本 英二、高濃度細胞外カルシウム刺激に対する間葉系未分化細胞の反応性の解析 ~ fibroblast growth factor 2およびbone morphogenetic protein 2の発現誘導~、第59回秋季日本歯周病学会学術大会、2016年10月7日 新潟
17. V. Venkata Suresh, Keisuke Handa, Masahiro Saito. Immature osteoblast derived from micro-mini pig for periodontal tissue regeneration. IADR, 2016.6.23 Seoul, K.
18. Tomiyama , A. Kawata , K. Higashi , K. Watanabe , H. Kumada , H. Hasegawa , M. Saito , O. Takahashi , N. Hamada , Y. Mukai Effects of tannin extracted from persimmon on recovery of biofilms. IADR, 2016.6.22 Seoul
19. Ai Orimoto, Masaharu Futagi, Masaki Ishikawa, Keisuke Handa, Masahiro Saito ADAMTSL6 β accelerated ADAMTS4 activity to enhance in MFS.IADR, 2016.6.22 Seoul
20. 半田慶介、二木正晴、丸山顕太郎、折本愛、石河真幸、根本英二、齋藤正寛、未文化骨芽細胞移植を用いた歯周組織再生療法に関する研究、第144回保存学会日本歯科保存学会春季学術大会、2016年6月10日宇都宮
21. 富山潔、長谷川晴彦、石澤将人、椎谷亮、渡辺清子、河田亮、二瓶智太郎、齋藤正寛、高橋理、浜田信城、Exterkate RAM, 向井義晴、カキタンニンがポリマイクロバイアルバイオフィルムの群集構造に与える構造、第144回保存学会日本歯科保存学会春季学術大会、2016年6月10日宇都宮

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 正寛 (サイトウ マサヒロ)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40215562

(2)研究分担者

吉田恭子(ヨシダ キョウコ)

三重大学医学研究科・准教授

研究者番号：00242967

(3)連研究分担者

石河真幸(イシカワ マサキ)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60432936