

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17588

研究課題名(和文) マルファン症候群から迫る新規歯周病ペプチドの創製

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach from Marfan syndrome for the drug discovery of periodontal diseases

研究代表者

折本 愛 (Orimoto, Ai)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30710967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 微細線維は、結合組織形成を制御する細胞外マトリックスで主成分はフィブリリン1 (FBN-1)である。本研究では、FBN-1と結合し、結合組織強度を調整する弾性線維の重合調節因子であるADAMTSL6に着目した。ADAMTSL6変異体の組み換えレトロウイルスを作製し、微細線維を内在性に発現するMG63細胞に感染を行い、ADAMTSL6のFBN-1結合ドメインと微細線維促進効果の検証を行った。この結果より、FBN-1の結合タンパク質であるADAMTSL6の3番目のTSPドメインが、微細線維形成に重要な役割を果たしている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マルファン症候群(MFS)は、FBN-1のミスセンス変異を原因とする遺伝性結合組織疾患である。ADAMTSL6は、FBN-1と結合し、微細線維の形成を促進することが報告されていたが、マルチドメイン構造を持つADAMTSL6のどの領域が、FBN-1と結合するかは不明であった。本研究では、ADAMTSL6のFBN-1に対する結合ドメイン解析により、ADAMTSL6の3番目のTSPドメインを介して微細線維の形成を促進することを証明した。本研究成果は、マルファン症候群を含む他の結合組織疾患に対する病態解明および有効な治療技術へと発展する可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)： Fibrillin 1 is the major component of extracellular matrix microfibrils. Although ADAMTSL (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs like) 6 is one of the fibrillin 1 binding proteins, the detailed mechanism underlying the involvement of ADAMTSL6 in microfibril formation remains unclear. In this study, we created deletion mutants of ADAMTSL6 and examined their interactions with fibrillin 1 assembly. Our data showed that the third thrombospondin type I domain of ADAMTSL6 influence the microfibril formation.

研究分野： 歯科

キーワード： ADAMTSL6 結合組織疾患 微細線維

## 1. 研究開始当初の背景

私たちの体の中で、歯、皮膚、骨格および血管などの結合組織は、線維性細胞外マトリックスにより機械的強度および弾性を維持している。細胞外マトリックスは、機能不全になると、難病である結合組織疾患が引き起こされることから、その機能維持が病気の治療と予防に重要な働きをすることが明らかにされてきた。我が国で難病指定されているマルファン症候群(MFS)は、線維性細胞外マトリックスのうち、微細線維の主成分である fibrillin-1 (FBN-1) のハプロ不全を原因に微細線維崩壊症を引き起こすため、体全体の結合組織が脆弱化し、解離性大動脈瘤や歯周病を含む様々な結合組織疾患を発症する。遺伝病であるにも関わらず、3~5千人に1人と高い割合で発病し、日本国内でも2万5千人~4万1千人の近くの患者がいると考えられている(Miyairi et al, Int. Heart J 2013)。MFSの患者には延命に必要な薬物療法と人工血管置換手術に加え、妊娠、激しい運動の回避、極度の近視などのライフスタイルに制限があり、これらを改善する新たな治療技術の開発が切望されている。MFSの原因となるFBN-1は、結合組織の強度と弾性の維持に関わっていることに加え、TGF $\beta$ , Bmpを含むサイトカインを取り込む事でシグナルの調節をする分子であることが知られている。また、FBN-1に結合したLatent transforming growth factor- $\beta$  binding proteins4 (LTBP4)は、Fibulin-5を介してElastinの沈着と弾性線維形成が促進されている。このようにFBN-1は、様々な分子間ネットワークを形成することで、結合組織における弾性機能とサイトカインシグナルを制御すると考えられている。これまでに、FBN-1結合タンパク質であるADAMTSL6 $\beta$ がFBN-1微細線維形成を促進することが報告されている。本研究では、歯周炎と循環器疾患のハイリスク集団であるマルファン症候群に着目し、その原因である微細線維機能低下は、全身性結合組織疾患と歯周炎を繋げる共通の標的とし、FBN-1を中心とする微細線維の重合に関わる細胞外マトリックスのネットワークを明らかにする。これらの研究成果を元に、MFSや歯周病を含む結合組織疾患を改善する創薬開発へ発展する事も期待できる。

## 2. 研究の目的

MFSの本質的な原因である組織破壊機構を解明するためには、FBN-1を中心とする微細線維の重合に関わる、細胞外マトリックスのネットワークを明らかにする必要がある。これまでに、FBN-1結合タンパク質であるADAMTSL6 $\beta$ は、FBN-1微細線維形成を促進する細胞外マトリックス因子であることが報告されている。本研究では、ADAMTSL6 $\beta$ をMFSの解離性大動脈瘤や歯周病などに対する新たな創薬ターゲットとして開発するために、ADAMTSL6 $\beta$ のFBN-1結合配列を決定し、FBN-1微細線維再生に重要なADAMTSL6 $\beta$ のアミノ酸を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) FBN-1と結合するADAMTSL6 $\beta$ のドメイン解析

ADAMTSL6 $\beta$ の一次構造はN末端よりsignal peptid (S)、spacer ドメイン(Sp)、thrombospondin type-1 (Tsp1)moti (1-5)、そしてC末端のPLACドメインに至る。このマルチドメイン構造のどの領域がFBN-1と結合するのか特定するため、C末端から逐次ドメインを欠失させた改変分子を作出した。C末側にV5-Hisを付加したADAMTSL6 $\beta$ 変異体の発現ベクターを構築し、FreeStyle 293-F cellsに遺伝子導入し、上清をNi-NTA担体を使用し精製を行った。精製したそれぞれADAMTSL6 $\beta$ 欠失変異体の組換えタンパク質を用いて、FBN-1に対する結合を免疫沈降で確認した。

### (2) 結合ドメイン配列の微細線維促進効果の検証

(1)の結果を基に、ADAMTSL6 $\beta$ のFBN-1への結合ドメインが微細線維形成に関与するどうかを検証のため、ADAMTSL6 $\beta$ および2つのADAMTSL6 $\beta$ 変異体のレトロウイルスベクター：pMYs-ADAMTSL6 $\beta$  (amino acids 1-658)-IP、pMYs-ADAMTSL6 $\beta$  $\Delta$ TSP2 (amino acids 1-370)-IP、pMYs-ADAMTSL6 $\beta$  $\Delta$ TSP3 (amino acids 1-489)-IPを構築した。その後、HEK293細胞へ、レトロウイルスプラスミドをリポフェクションにて導入し、ウイルスを産生・回収した。その回収した組み替えウイルス溶液を、内在性に微細線維を発現するMG63細胞へ感染させ、FBN-1線維形成能を蛍光免疫染色で確認した。

## 4. 研究成果

### (1) FBN-1と結合するADAMTSL6 $\beta$ のドメイン解析

ADAMTSL6 $\beta$ は、FBN-1のN末端と結合するとの報告はあるが、ADAMTSL6 $\beta$ のどのドメインがFBN-1と結合するのかは、不明なままである。そこで、ADAMTSL6 $\beta$ のC末端から逐次ドメインを欠失させたADAMTSL6 $\beta$  $\Delta$ PLAC、ADAMTSL6 $\beta$  $\Delta$ TSP/ $\Delta$ PLACの組換えタンパク質と

FBN-1 の N 末端側の rF11 の組換えタンパク質を用いて免疫沈降を行なったところ、ADAMTSL6 $\beta$  は、TSP ドメインを介して Fibrillin-1 の N 末端と結合することが示された (図 1 左)。さらに、TSP ドメインのどの領域に結合するのか調べるため、ADAMTSL6 $\beta$   $\Delta$  PLAC の C 末端から 逐次ドメインを欠失させた、ADAMTSL6 $\beta$   $\Delta$  TSP1,  $\Delta$  TSP2,  $\Delta$  TSP3,  $\Delta$  TSP4 を作製し、同様に rF11 と免疫沈降を行った。その結果より、3 番目の TSP ドメインが、FBN-1 と結合するドメインであることが示された (図 1 右)。

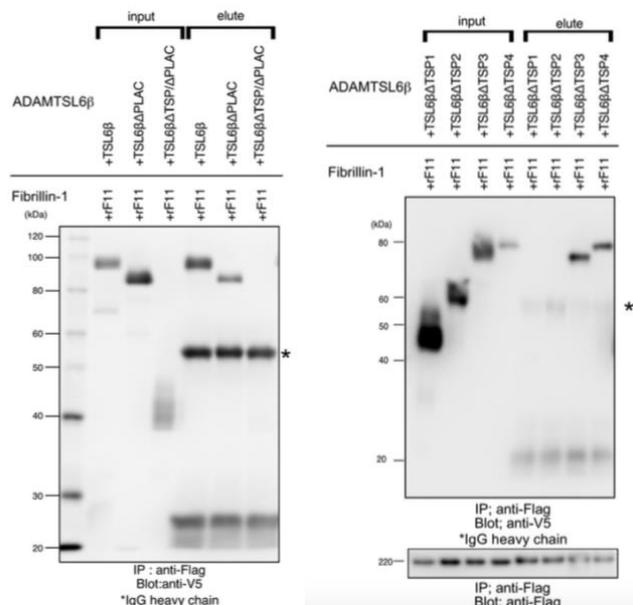


図 1. FBN-1 と結合する ADAMTSL6 $\beta$  のドメイン解析

## (2) 結合ドメイン配列の微細線維促進効果の検証

(1) で得られた FBN-1 と結合する ADAMTSL6 $\beta$  の 3 番目の TSP ドメインが微細線維形成能に関与するかを免疫染色で検証したところ、コントロール群と比較し、優位に FBN-1 微細線維形成の促進が認められた。さらに、ADAMTSL6 $\beta$  の 3 番目の TSP ドメインを欠失した細胞では、微細線維形成能促進が認められなかった。以上のことから、ADAMTSL6 $\beta$  の 3 番目の TSP ドメインが、微細線維形成に重要な役割を果たしていることがわかった。

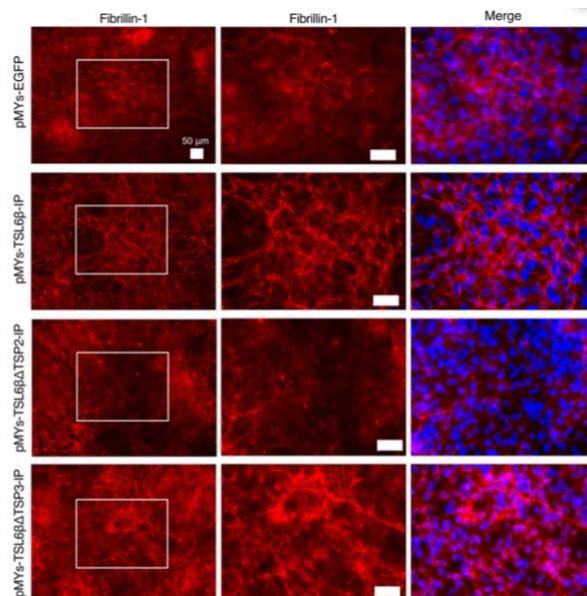


図 2. 結合ドメイン配列の微細線維促進効果の検証

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Fukuda Tomokazu, Furuya Kai, Takahashi Kouhei, Orimoto Ai, Sugano Eriko, Tomita Hiroshi, Kashiwagi Sayo, Kiyono Tohru, Ishii Tsuyoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Combinatorial expression of cell cycle regulators is more suitable for immortalization than oncogenic methods in dermal papilla cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101929 ~ 101929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101929	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 Orimoto Ai, Kyakumoto Seiko, Eitsuka Takahiro, Nakagawa Kiyotaka, Kiyono Tohru, Fukuda Tomokazu	4. 巻 15
2. 論文標題 Efficient immortalization of human dental pulp stem cells with expression of cell cycle regulators with the intact chromosomal condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e029996-e23014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229996	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 Orimoto Ai, Fukuda Tomokazu	4. 巻 0
2. 論文標題 ADAMTSL6 promotes fibrillin 1 microfibril assembly, which is possibly mediated via binding through the third thrombospondin type I domain to fibrillin 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11337	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 Fukuda Tomokazu, Takahashi Kouhei, Takase Shin, Orimoto Ai, Eitsuka Takahiro, Nakagawa Kiyotaka, Kiyono Tohru	4. 巻 8
2. 論文標題 Human Derived Immortalized Dermal Papilla Cells With a Constant Expression of Testosterone Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 157-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00157	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 Orimoto Ai, Katayama Masafumi, Tani Tetsuya, Ito Keiko, Eitsuka Takahiro, Nakagawa Kiyotaka, Inoue-Murayama Miho, Onuma Manabu, Kiyono Tohru, Fukuda Tomokazu	4. 巻 525
2. 論文標題 Primary and immortalized cell lines derived from the Amami rabbit ( <i>Pentalagus furnessi</i> ) and evolutionally conserved cell cycle control with CDK4 and Cyclin D1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1046-1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.036	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 Yoko Iwamatsu Kobayashi, Syouta Abe, Yoshiyasu Fujieda, Ai Orimoto, Masafumi Kanehira, Keisuke Handa, Venkata Suresh Venkataiah, Wei Zou, Masaki Ishikawa, Masahiro Saito	4. 巻 3
2. 論文標題 Metal ions from S PRG filler have the potential to prevent periodontal disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical and Experiment Dental Research	6. 最初と最後の頁 126-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.70	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 Furuya Kai, Wu Tao, Orimoto Ai, Sugano Eriko, Tomita Hiroshi, Kiyono Tohru, Kurose Takahiro, Takai Yoshihiro, Fukuda Tomokazu	4. 巻 8
2. 論文標題 The transcriptome of wild-type and immortalized corneal epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41597-021-00908-9	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 Furuya Kai, Fujibayashi So, Wu Tao, Takahashi Kouhei, Takase Shin, Orimoto Ai, Sugano Eriko, Tomita Hiroshi, Kashiwagi Sayo, Kiyono Tohru, Ishii Tsuyoshi, Fukuda Tomokazu	4. 巻 23
2. 論文標題 Transcriptome analysis to identify the downstream genes of androgen receptor in dermal papilla cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Genomic Data	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12863-021-01018-6	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 Orimoto Ai, Takahashi Kohei, Imai Masaki, Kiyono Tohru, Kawaoka Yoshihiro, Fukuda Tomokazu	4. 巻 73
2. 論文標題 Establishment of human airway epithelial cells with doxycycline-inducible cell growth and fluorescence reporters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 555 ~ 569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-021-00477-0	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

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 折本 愛、客本斉子、永塚貴弘、仲川清隆、清野 透、福田智一
2. 発表標題 変異型CDK4,サイクリンD1, TERTの3遺伝子導入による効率の良い無限分裂ヒト歯髄幹細胞の樹立
3. 学会等名 第52回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 折本 愛、二木 正晴、石河 真幸、半田 慶介、齋藤 正寛
2. 発表標題 ADAMTSL6 を介したMarfan症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会春期学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 ADAMTS superfamilyによるMarfan症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析
3. 学会等名 第49回日本結合組織学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ai Orimoto, Yousuke Murasawa, Zenzo Isogai, Satsuki Mochizuki, Hiroyuki Kumamoto, Satoshi Fukumoto, Yasunori Okada and Masahiro Saito
2. 発表標題 ADAMTSL6 exacerbates tissue destruction of aortic aneurysm and dissection in Marfan syndrome mouse model through promotion of ADAMTSL4 activity
3. 学会等名 Elastin, Elastic Fibers & Microfibrils Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------