

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17260

研究課題名（和文）p21細胞周期チェックポイントを標的とした口蓋粘膜創傷治癒機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of palatal mucosal wound healing mechanism targeting p21 cell cycle checkpoint

研究代表者

森 浩喜（MORI, Hiroki）

徳島大学・病院・助教

研究者番号：90779985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：癒痕組織は口唇裂口蓋裂患者における特徴的な顎顔面・歯列弓形態を決定づける最大の要因と言われている。本研究では口蓋粘膜の創傷治癒過程での低酸素ストレス下におけるマクロファージの動態について、創傷治癒過程での細胞周期に中心的な役割を果たすp21を分子標的として検討した。結果として、p21ノックアウトマウスにおいて、WTマウスと比較して有意に創傷治癒の遅延が認められた。また、成長観察を行った結果、WTマウスと比較して、老齢マウスにおける骨量の現象が有意に抑えられていることが、CTによる解析により明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癒痕組織は口唇裂口蓋裂患者における特徴的な顎顔面・歯列弓形態を決定づける最大の要因と言われている。口腔粘膜は創傷治癒が早く、癒痕組織も生じにくいとされている。しかし、口蓋形成術後に形成される癒痕組織は翼突口蓋縫合部における癒痕拘縮を惹起し、収縮能に乏しい癒痕組織が顎顔面成長に大きな影響を与えると考えられる。そこで、今回外界からのストレスにより損傷されると、細胞周期を停止させることにより異常なDNA増殖を抑制すると同定されたp21について検索を行い、p21が創傷治癒の遅延に関係していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Scar tissue is said to be the most important factor in determining the characteristic maxillofacial and dental arch morphology in patients with cleft lip and palate. In this study, we investigated the macrophage dynamics under hypoxic stress during palatal mucosal wound healing with p21 as a molecular target, which plays a central role in the cell cycle during wound healing. As a result, significantly delayed wound healing was observed in p21 knockout mice compared to WT mice. Moreover, as a result of observation of growth, it was revealed by CT analysis that the phenomenon of bone mass was significantly suppressed in aged mice as compared with WT mice.

研究分野：小児歯科

キーワード：口蓋裂 創傷治癒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癒痕組織は口唇裂口蓋裂患者における特徴的な顎顔面・歯列弓形態を決定づける最大の要因と言われている。口腔粘膜は組織学的には皮膚と大きく異なっており、唾液中の epidermal growth factor (EGF) や vascular endothelial growth factor (VEGF) といった成長因子の影響により、創傷治癒が早く、癒痕組織も生じにくいとされている。しかし、口蓋形成術後に形成される癒痕組織は翼突口蓋縫合部における癒痕拘縮を惹起し、収縮能に乏しい癒痕組織が顎顔面成長に大きな影響を与えると考えられる。癒痕組織による、上顎骨・口蓋骨の成長抑制や歯科矯正治療における治療後の後戻り、顎裂部位への骨移植や骨切り術・骨延長術を行った際の術後安定性の低下は患者の ADL や QOL を著しく低下させ、特に言語形成期、思春期における心理的・機能的影響は甚大で、ひいては将来において社会的、経済的に悪影響を及ぼす。このような口蓋粘膜の癒痕に対する対策として根本的な改善方法は無い。よって口蓋粘膜の癒痕組織形成に対する薬物並びに遺伝子治療を開発することは非常に社会的に重要であると言える。

我々はこれまでに、TGF- $\beta$  の標的遺伝子発現を制御する細胞内情報伝達物質である Smad3 が癒痕形成について重要な分子標的であることを報告してきた。さらに最近、申請者は TGF- $\beta$  /Smad3 シグナルと S1P/S1P3 シグナルとのシグナルクロストークが細胞遊走能や軟骨創傷治癒に重要な役割を果たしていることを報告した (Mori H et al. Am J Pathol 2015)。Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 は、低酸素環境における細胞生存に必須のタンパクであり、申請者らは HIF-1 とヘテロ二量体を形成する AhR シグナルとサイトカイン RANKL シグナルとのクロストークが、マクロファージから破骨細胞の分化に重要な役割を果たし骨折の創傷治癒と関係していることを報告した (Izawa T, Mori H et al. J Immunol 2016)。p21 は、cyclin-dependent kinase inhibitor の一種で、外界からのストレスにより損傷されると、細胞周期を停止させることにより異常な DNA 増殖を抑制すると同定された (Cell 19;75:805-16, 1993)。その後、p21 が細胞のアポトーシスを調節 (Oncogene 12;16:705-12, 1998) することが明らかとなり、近年 STAT 経路を介して軟骨基質である aggrecan や MMP-13 の代謝に関与しているという報告もある (Arthritis Res Ther 7;17:314, 2015)。p21 KO マウスの耳介にパンチで hole を作製すると WT マウスと比較して hole の閉鎖が遅延し、組織学的にも修復遅延がみられた報告 (PNAS30;107:5845-50, 2010) があることから、創傷治癒過程においても低酸素状態におけるマクロファージ活性化に関して、p21 が創傷治癒過程での細胞周期に中心的な役割を果たしていると推察される。

### 2. 研究の目的

口唇裂口蓋裂患者における裂隙閉鎖術後の癒痕組織はその強い癒痕拘縮により、骨格・歯列において重篤な不正を呈することとなる。癒痕組織形成の抑制、減少を可能とすることで矯正歯科臨床ならびに形成外科臨床において大きな飛躍をもたらすこととなる。これまでに、当教室ではレーザー・ドップラー式血流画像化装置を用いて口唇裂患者の口唇形成術後の上口唇表層部の血流分布の測定を試みた結果、多くの症例において癒痕付近に限局した明らかな低血流領域がみられた (Angle Orthod 79:1182-87, 2009) ことから術後の癒痕組織は低酸素状態であることがわかる。これまで申請者は低酸素ストレスに対する細胞の適応応答の中で中心的な HIF-1 を分子標的とした軟骨細胞における創傷治癒について報告してきた。創傷治癒過程は一連の治癒段階における組織構成細胞である上皮細胞、間葉系細胞、炎症性細胞等の相互作用が様々な炎症性サイトカイン、成長因子等によって複雑に制御されている。炎症性細胞の中でもマクロファージは低酸素環境に集積する性質があるが、マクロファージ活性化における低酸素シグナルの役割は明らかになっていない。

p21 は cyclin-dependent kinase inhibitor の一種で、DNA が外界からのストレスにより損傷されると、細胞分裂周期を停止 (G1 arrest) させることにより異常な DNA 増殖を抑制する分子として同定された。近年 p21 のそれ以外の働きとして NF- $\kappa$ B, c-Myc, C/EBP, E2F, STAT3 などの転写活性を調節するとの報告がなされている。そこで本研究では口蓋粘膜の創傷治癒過程での低酸素ストレス下におけるマクロファージの動態について、創傷治癒過程での細胞周期に中心的な役割を果たす p21 を分子標的として検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウスの口蓋中央部から遠心に長さ 3 mm、幅 1 mm の粘膜を剥離し、その経時的変化を病理組織学的、形態学的に観察する。創傷治癒過程に応じた口蓋組織中のマクロファージの分化解析 (M1/M2 比): マクロファージの分化マーカーについてフローサイトメーターにて発現パターンの解析を行う。口蓋粘膜組織のマクロファージ解析に必要な分化マーカーを決定後、創傷治癒の進展に応じた口蓋組織中のマクロファージの数や分化状態 (M1/M2 比) を検討する。p21 を介した創傷治癒過程におけるマクロファージの局在と増殖の確認 (組織免疫染色): 口蓋組織を分散後、血球細胞にゲートをかけて F4/80, CD11b 等で展開することによりマクロファージの数や M1/M2 比を求めることができるが、さらに創傷治癒組織にどのように存在するかを知る必要がある。そこで口蓋組織中の凍結切片やパラフィン切片を用い、蛍光免疫染色による M1, M2 マクロファージ等の創傷治癒過程における口蓋粘膜組織中での局在を確認することによって、病態マクロファージの機能を推測できると考えている。

また、創傷治癒過程において集積しているマクロファージについて口蓋粘膜組織中での増殖

の有無に対して、Ki-67 等を利用して確認する。

#### 4. 研究成果

P21 ノックアウトマウスを用いマウスの口蓋中央部から遠心に長さ 3 mm、幅 1 mm の粘膜を剥離し、その経時的变化を病理組織学的、形態学的に観察した。WT マウスと比較して創傷治癒が遅延し、マクロファージ・単球の遊走・走化性因子 MIP-1、MCP-1 の発現低下とマクロファージ・単球数の減少による過剰な炎症反応が抑制されること、またマウス末梢血由来線維芽細胞においても遊走能低下により創傷治癒が有意に抑制されることが明らかとなった。過去の論文同様に、p21 KO マウスの耳介にパンチで hole を作製すると WT マウスと比較して hole の閉鎖が遅延し、組織学的にも修復遅延がみられた。創傷治癒過程において、マクロファージの M1/M2 比が M1 に有意に傾いていった。

P21 ノックアウトマウスにおいて、成長観察を行った結果、WT マウスと比較して、老齢マウスにおける骨量の現象が有意に抑えられていることが、CT による解析により明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 市原亜起, 堀内信也, 小笠原直子, 森浩喜, 天知良太, 渡邊佳一郎, 木内奈央, 泰江章博, 田中栄二	4. 巻 30
2. 論文標題 徳島大学病院矯正歯科における口唇裂・口蓋裂患者の永久歯の歯数異常に関する調査.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 中・四国矯正歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 51 ~ 58
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 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 Mori Hiroki, Izawa Takashi, Mori Hitoshi, Watanabe Keiichiro, Kanno Takahiro, Tanaka Eiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Skeletal open bite with amelogenesis imperfecta treated with compression osteogenesis: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Head & Face Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13005-019-0187-7	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 Fujita Mutsumi, Sato-Shigeta Minami, Mori Hiroki, Iwasa Akihiko, Kawai Nobuhiko, Hassan Ali H., Tanaka Eiji	4. 巻 45
2. 論文標題 Protective Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Mandibular Condylar Cartilage Exposed to Mechanical Overloading	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ultrasound in Medicine & Biology	6. 最初と最後の頁 944 ~ 953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.006	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tsendsuren Khurel-Ochir, Takashi Izawa, Hiroki Mori, Akihiko Iwasa, Islamy Rahma Hutami and Eiji Tanaka
2. 発表標題 The role of p21 on the development of TMJ-OA
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Orthodontic Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Islamy Rahma Hutami, Hiroki Mori, Tsendsuren Khurel-Ochir, Akiko Mino, Akihiko Iwasa, Eiji Tanaka and Takashi Izawa
2. 発表標題 HIF-1alpha regulates the palatal wound healing through M1/M2 macrophage reprogramming
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田こころ, 赤澤友基, 森浩喜, 岩本勉.
2. 発表標題 下顎左側乳犬歯が早期脱落した4歳男児の1例
3. 学会等名 中四国小児歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森浩喜, 岩本勉, 齋藤早紀, 上田公子, 高石和美, 山村佳子, 日浅雅博, 堀内信也, 田中栄二.
2. 発表標題 本院における口唇口蓋裂児への治療の取り組み.
3. 学会等名 徳島県歯科医学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤澤友基, 岩田こころ, 黒厚子璃佳, 河原林啓太, 宮寄彩, 藤島史帆, 森浩喜, 杉本明日菜, 北村尚正, 上田公子, 中川弘, 長谷川智 - , 岩本勉.
2. 発表標題 本院小児歯科 の初診患者の動向と主訴の変遷について.
3. 学会等名 徳島県歯科医学大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----