

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17275

研究課題名(和文) 微細線維関連タンパクのTGF-β抑制機能を応用した癒痕抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of scar suppression method applying TGF-beta inhibitory effects of microfibrillar-associated protein 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂手術の治療後に癒痕が形成されることが問題となっています。癒痕の主役は手術部位の線維芽細胞がコラーゲンを大量に産生することです。コラーゲン産生はTGF-βを促進します。そこで、TGF-βが弾性線維成分MAGP-1と結合することに注目しました。培養線維芽細胞はTGF-βおよびMAGP-1 mRNA発現を張力とともに増加、MAGP-1とTGF-βは複合体として共存していることがわかりました。MAGP-1はTGF-βを捕捉して細胞に結合することを防ぐ可能性が考えられ、口蓋裂手術創傷へのMAGP-1の投与は癒痕を予防するためのアプローチとして有用であると考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂手術創傷へのMAGP-1の注射投与を考えています。MAGP-1の注射投与が癒痕を予防するためのアプローチとして確立されれば、口蓋裂手術創傷後の癒痕による歯列狭窄、またそれを防止するための手術や治療から、患者さんを解放する大きなメリットがあります。患者さんへの装置のセットを必要とせず、定期的に注射をするだけで良いので負担が少なく、確立されると社会的歯科医学的に大きく普及されると予想されます。

研究成果の概要(英文)：Formation of scars after treatment for cleft palate surgery is a big problem. The main factor of scarring is that the fibroblasts at the surgical site produce large amounts of collagen. TGF-β promotes Collagen production. Therefore, we focused on the binding of TGF-β to the elastic fiber component MAGP-1. It was found that cultured fibroblasts increased TGF-β and MAGP-1 mRNA expression with tension, and that MAGP-1 and TGF-β coexisted as a complex. MAGP-1 may capture TGF-β and prevent it from binding to cells, and administration of MAGP-1 to cleft palate surgical wounds may be useful as an approach to prevent scarring.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 口蓋裂手術 癒痕 予防 MAGP-1 コラーゲン TGF-β 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口蓋裂に対する口蓋形成術において、術後に起こる癒痕を予防的に解決する方策は未だ不十分である。癒痕は創傷治癒後に transforming growth factor- (TGF-) のシグナル伝達が抑制されず、線維芽細胞が活性化されたままである場合に形成される。2014年、適度な力学的負荷環境に置かれた線維芽細胞が、微細線維接着タンパク microfilament associated glycoprotein-1 (MAGP-1) の産生を増大させること、MAGP-1 は微細線維の規則的配列に接着分子として主要な役割を演じることを示した (Fujita T, Tsuruga E, Yamanouchi K, Sawa Y, Ishikawa H. Microfilament-associated glycoprotein-1 controls human ciliary zonule development in vitro. Acta Histochemica et cytochemica, 47, 11-17, 2014.)。近年、このような MAGP-1 が、組織内において活性型 TGF- を捕捉することで、線維芽細胞の TGF- による異常なシグナリングの持続と過剰な結合組織形成の誘導を阻止することが報告された。これらのことを考え合わせ、Push-back 法などの術後癒痕に対する MAGP-1 の応用を着想した。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、TGF- シグナリングの異常な活性化が型コラーゲンの過剰産生と筋線維芽細胞の分化誘導に大きな役割を演じる (Zhou et al. 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- を捕捉し過剰な TGF- 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- 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 MAGP-1 が TGF- を捕捉して微細線維に固定することで、線維芽細胞の組織に遊離している過剰な活性型 TGF- シグナリングを抑制することに着目し、口蓋裂手術創の MAGP-1 注射投与による癒痕予防法を考えた。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した。

2. 研究の目的

本研究は、口蓋形成術後の創傷に対する MAGP-1 投与が線維芽細胞の TGF- シグナル伝達遮断による癒痕予防に有用である可能性を、MAGP-1 と TGF- との相互作用の in vitro の生化学的分析によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

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、細胞伸展装置専用型コラーゲンコートチャンバーにて MEM で通常培養した。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) にセットした。

2) 細胞伸展

STB-140にて至適条件（伸展率5%、周期60秒、1週）で培養した。

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した。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した。

4) ELISA 分析

培養上清および細胞の TGF- β 含有量を ELISA とウェスタンブロットで分析した。

5) 免疫沈降（IP; ImmunoPrecipitation）

TGF- β 含有培地にて伸展培養した線維芽細胞を 0.05% Tween-20 に溶解、抗 MAGP-1 抗体（Abcam, BD Biosciences）添加 IP 緩衝液にて処理、遠心したペレットを SDS 緩衝液に溶解して、TGF- β 抗体によるウェスタンブロットで分析を行なった。

6) 組織学的分析

伸展培養した線維芽細胞を-20度 100%メタノールで 10 分間処理、TGF- β 抗体および MAGP-1 抗体による免疫染色をお行なった。

4. 研究成果

MAGP-1 は、リアルタイム PCR、ELISA、およびウェスタンブロットによる細胞伸長によってタンパク質を減少させ、mRNA を増加させることがわかった。フィブリリン 1mRNA は細胞の伸長によって減少した。これは、MAGP-1 が細胞の伸長と MAGP-1 タンパク質の減少により TGF- β 1 を捕捉することによる微細線維成分フィブリリン-1 の減少によるものと考えられる。MAGP-1 と TGF- β 1 は免疫染色により発現し、複合体として共存していることが示唆された。規則的な配列の成長は MAGP-1 によって促進され、培養上清および細胞内の TGF- β の存在は MAGP-1、フィブリリン-1 の成長を阻害する。TGF- β は受容体を介して線維芽細胞に認識され、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生を促進することで創傷治癒に寄与するが、TGF- β シグナル伝達の異常な活性化は、筋線維細胞への細胞の形成と増殖、および瘢痕形成につながる。MAGP-1 は、微細線維成分の接着を仲介し、微細線維を規則的に配置するだけでなく、TGF- β を捕捉して微細線維に固定することで過剰なコラーゲン産生を抑制すると考えられる。多くの正常な器官は、涙腺および強膜、粘膜固有層および粘膜下組織、舌腺、正弦波毛細血管および小葉間などの結合組織に MAGP-1 タンパク質を有する。本研究から、細胞の伸展は MAGP-1 を増加させ、MAGP-1 の TGF- β 1 捕捉効果がコラーゲンのみならず、予想に反して微細線維成分フィブリリン-1 をも減少させることで、口蓋裂後の創傷への MAGP-1 の投与が口蓋裂の口蓋形成領域における瘢痕を予防するための新しい医学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。

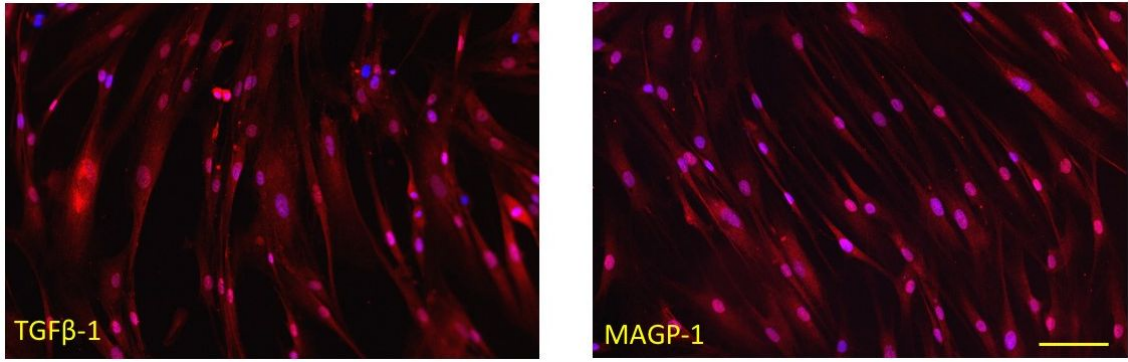


図 1.ヒト歯根膜線維芽細胞での TGF- 1 および MAGP-1 の免疫染色。ヒト歯根膜線維芽細胞は、-MAM で張力なしに TGF- 1 と MAGP-1 を発現した。

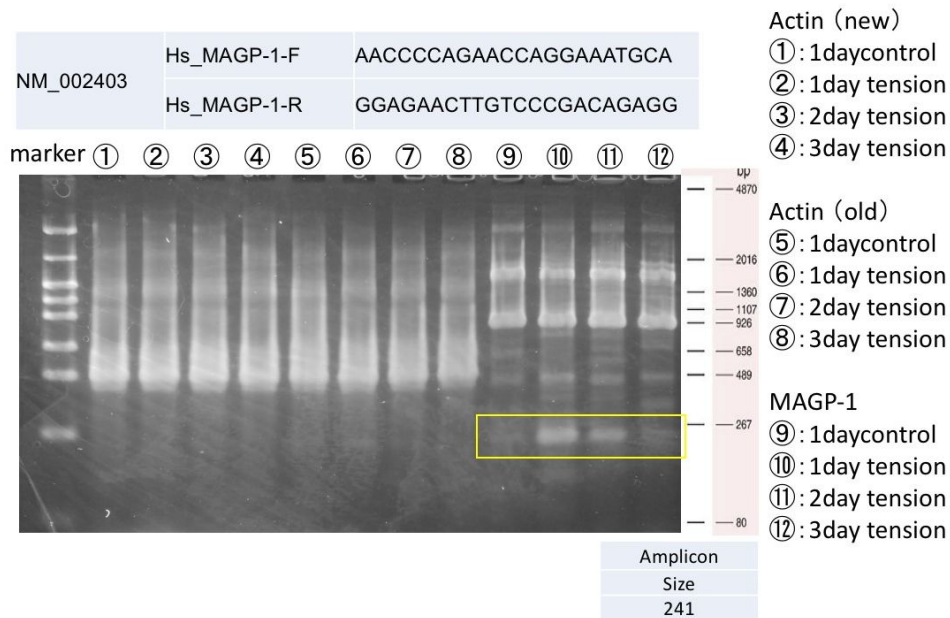


図 2.ヒト歯根膜線維芽細胞上の MAGP-1mRNA の RT-PCR。細胞は MAGP-1mRNA を 1 日間張力で発現し、3 日で減少した。

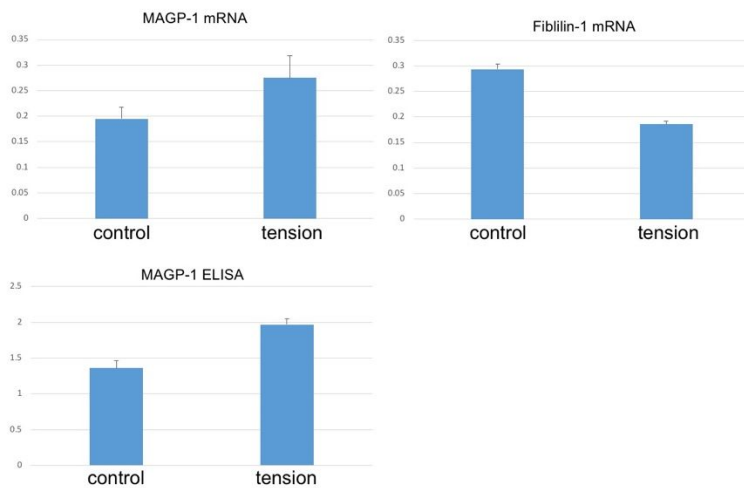


図 3.ヒト歯根膜線維芽細胞上の TGF- 1 および MAGP-1mRNA のリアルタイム RT-PCR。ヒト歯根膜線維芽細胞は、-MAM において張力なしで TGF- 1 および MAGP-1 mRNA およびタンパク質を発現し、張力とともにそれらを増加させた。

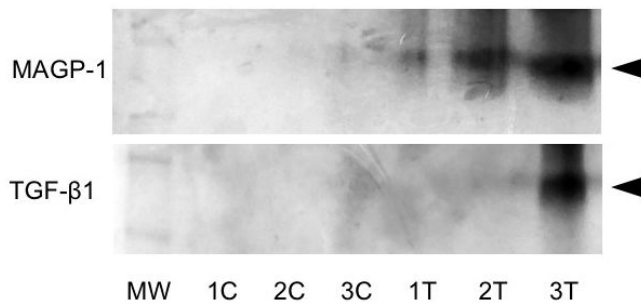


図 4.ヒト歯肉線維芽細胞における MAGP-1 および TGF- β 1 タンパク質の免疫沈降分析。ヒト歯肉線維芽細胞は MAGP-1 を発現し、3 日間緊張させて増加させました。抗 MAGP-1 を含む沈殿生成物では、TGF- β 1 は張力のある細胞で 3 日間検出された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件) 投稿準備中

〔学会発表〕(計 1 件)

・第 67 回 JADR 総会・学術大会 / 第 4 回 IADR APR (Asia Pacific Region) 学術大会

発表日：2019 年 11 月 28 ~ 30 日

場所：Brisbane, Australia

演題：Development of scar suppression method applying TGF- β 1 function of microfibril protein.

演者：Fujita T, Kajiwara K, Takara K, Sakagami R, Kojima H, Sawa Y, Tamaoki S.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 隆寛 (福岡歯科大学)

研究者番号：30781421、2021 年 3 月 31 日退職により資格返上。

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takahiro Fujita, Koichiro Kajiwara, Kenyo Takara, Sachio Tamaoki, Ryuji Sakagami and Yoshihiko Sawa
2. 発表標題 Development of scar suppression method applying TGF- function of microfibril protein
3. 学会等名 第67回JADR総会・学術大会 / 第4回IADR APR (Asia Pacific Region) 学術大会 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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