

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 年度～2011 年度

課題番号：20390526

研究課題名（和文）bFGF による口蓋裂術後瘢痕形成の制御に関する基礎的研究

研究課題名（英文）The basic study of effects of bFGF on control of post-operative scarring in cleft palate surgery

研究代表者

石川 博之（ISHIKAWA HIROYUKI）

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20184492

研究成果の概要（和文）：Push Back 法による口蓋形成手術において、術直後の bFGF の局所投与により瘢痕形成の抑制と上顎骨の成長抑制の緩和をはかる新しい口蓋裂治療の確立のため、動物モデル実験により基礎データの蓄積を目指した。その結果、bFGF の筋線維芽細胞のアポトーシスの促進効果、コラーゲン線維成熟の抑制効果、歯列弓狭窄の緩和の効果、さらに弾性系線維形成の抑制効果を明らかにすることができた。以上のことから、術直後の bFGF の局所投与は有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The pharmaceutical modulation may reduce unfavorable effects of scarring after cleft palate surgery by the push-back method. This study investigated the effects of local bFGF administration immediately after mucoperiosteal denudation of rat palates on apoptosis in myofibroblasts, collagen changes and dento-alveolar growth during the wound healing. The results showed that bFGF induces rapid reductions in myofibroblasts, suppresses collagen type I and elastic system fibers generation, and relieves dental arch constriction in the wound healing process after mucoperiosteal denudation of rat palates. These findings suggest that bFGF has the potential to reduce maxillary growth inhibition after cleft palate surgery by modulating the palatal wound healing process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：（分科）歯学、（細目）矯正・小児系歯学

キーワード：口蓋裂、瘢痕組織、bFGF、筋線維芽細胞、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂患者では、良好な鼻咽腔閉鎖機能の獲得のため、Push Back 法による口蓋形成手術が広く行われている。しかし、本法では術後の創傷治癒過程で瘢痕組織が生じ、これが重篤な顎発育障害や咬合不全を

もたらすことが知られている。一方、顎発育への影響の少ない手術方法として、Furlow 法や Hotz 床を用いた二段階口蓋形成手術法が行われている。しかし、術後の軟口蓋の挙上度、鼻咽腔閉鎖機能達成の確実性、患者管理の容易さ、また特に裂の大

きな症例に対する口蓋閉鎖の確実性など、他法に勝る Push Back 法の利点も多く、口蓋形成手術の議論は結論が出ていない。そこで、我々は Push Back 法による口蓋形成手術後の創傷治癒過程を薬剤によりコントロールし、癒痕組織の形成を抑制して顎発育に影響の少ない口蓋裂治療を確立するという着想に至った。

basic-Fibroblast Growth Factor (bFGF) は、骨芽細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など幅広い細胞種に対して強力な増殖活性のあることが知られており、また近年では筋線維芽細胞のアポトーシスの促進効果も報告されている (Funato et al., J Dent Res, 1999)。これまでに、我々はラット口蓋に粘膜骨膜剥離の骨露出創を形成し、上皮化の完了した術後 1 週に bFGF 水溶液の単回投与を行い、創傷治癒過程を組織学的に検索してきた (川鍋ら, Orthod Waves, 2004; Kawanabe et al., J Hard Tissue Biology, 2004; Hata et al., Cleft Palate Craniofac J, 2008; Choi et al. Acta Odontologica Scandinavica, 2008)。結果として、口蓋形成手術後の癒痕組織の形成を抑制し、上顎の成長抑制を緩和する薬剤として、bFGF は極めて有望であることが確認された。しかし、これまでの実験では、薬剤の漏出を防ぐため、bFGF の投与時期を上皮再生後の術後 1 週としていたが、この時期は創傷治癒過程がある程度進行した上皮化および肉芽組織の形成期にあたる。そこで、bFGF をより早期に投与して創傷治癒のプロセスを早い段階から修飾することにより、癒痕形成の抑制や上顎骨の成長抑制の緩和をより効果的に行うことができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、Push Back 法による口蓋形成手術において、術直後の bFGF の局所投与により癒痕形成の抑制と上顎骨の成長抑制の緩和をはかる新しい口蓋裂治療の確立のため、動物モデル実験により基礎データの蓄積を目指した。具体的には、ラット口蓋に粘膜骨膜剥離の骨露出創を形成し、フィブリン糊塗布後に bFGF 水溶液の局所投与を行い、その創傷治癒過程の検索から、bFGF の筋線維芽細胞のアポトーシスの促進効果、コラーゲン線維成熟の抑制効果、血管新生の効果、さらに骨成長に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) bFGF の筋線維芽細胞のアポトーシス促進効果について

生後 20 日齢の雄性ウイスターラットを用

いた。ラットは、対照群、粘膜骨膜を剥離した癒痕形成群、剥離直後にフィブリン糊を塗布して bFGF 水溶液 (濃度 $20 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) を投与した bFGF 投与群、溶媒である蒸留水を投与した Sham 群を設定した。術後 2 日、5 日、1 週、2 週、4 週に麻酔下に屠殺し前頭断連続切片を作製し、HE 染色による病理組織学的検索と筋線維芽細胞に発現する α -SMA とアポトーシス細胞を染め分ける TUNEL 法の蛍光二重染色を用いて免疫組織化学的検索を行った。

さらに、筋線維芽細胞のアポトーシス促進効果を定量的に評価するため、 α -SMA 陽性細胞がアポトーシスを起こした面積を画像処理ソフトウェア Image J にて定量し、Scheffe 法にて多重比較検定を行った。

(2) bFGF のコラーゲン線維成熟の抑制効果と骨成長 (歯列幅) に対する効果について

生後 20 日齢の雄性ウイスターラットを用い、(1) と同様の 4 群 (対照群、癒痕形成群、bFGF 投与群および Sham 群) を設定した。術後 2 日、5 日、1 週、2 週、4 週に麻酔下に屠殺して試料採取後、前頭断連続切片を作製した。切片は HE 染色を行い画像計測ソフトウェアで第一臼歯間距離計測を行った。また、免疫組織化学的検索としてコラーゲン線維のマーカーに抗コラーゲンタイプ I 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。

(3) bFGF の弾性系線維に対する効果について

生後 20 日齢の雄性ウイスターラットを用い、(1) と同様の 4 群 (対照群、癒痕形成群、bFGF 投与群および Sham 群) を設定した。術後 6 週経過時に麻酔下に屠殺し前頭断連続切片を作製した。切片は HE 染色にて病理組織学的に検索した。また、弾性系線維のマーカーとして抗 fibrillin-1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。

さらに、ImageJ を用いて画像上で fibrillin-1 陽性反応の面積を定量評価して Scheffe 法にて多重比較検定を行った。

4. 研究成果

(1) bFGF の筋線維芽細胞のアポトーシス促進効果について (図 1, 図 2, 図 3)

α -SMA のアポトーシス陽性反応 (図 1, 図 2 の黄色の部分) の面積は、癒痕形成群、Sham 群において術後 5 日、1 週で対照群と比較して有意に大きく、術後 2 週で減少を認めた。一方、bFGF 投与群は、術後 2 日で対照群と比較して有意に大きく、術後 5 日以降で減少を認めた。このことから、bFGF を投与することにより、創傷治癒過程で現れる筋線維芽細胞のアポトーシスが促進されていることが考

えられた。さらに、bFGF 投与群は、HE 染色像において術後2週で癒痕形成群、Sham 群と比較して線維性結合組織が疎であり対照群に類似した組織像を示し、二重免疫染色像において術後1週以降、筋線維芽細胞と思われる α -SMA の陽性反応 (図1, 2の赤色の部分) が減少していた。

これらのことから、bFGF を投与することにより、筋線維芽細胞が減少し、創収縮が緩和される可能性が考えられた。(図1、図2、図3)

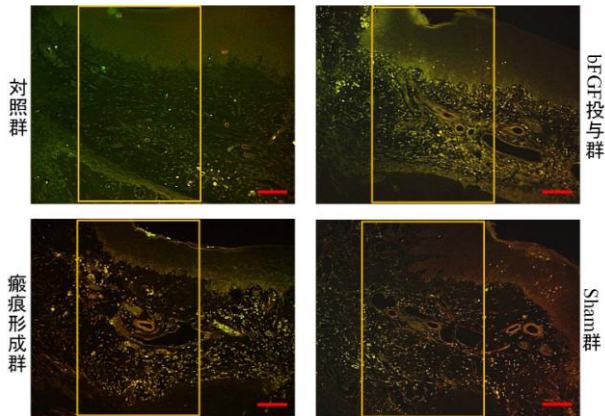


図1 術後2日の蛍光二重染色
黄枠：粘膜骨膜剥離相当部
赤色のバーは 100 μ m を示す

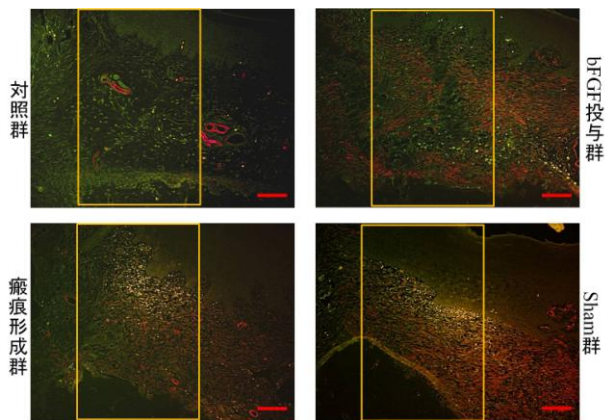


図2 術後5日の蛍光二重染色

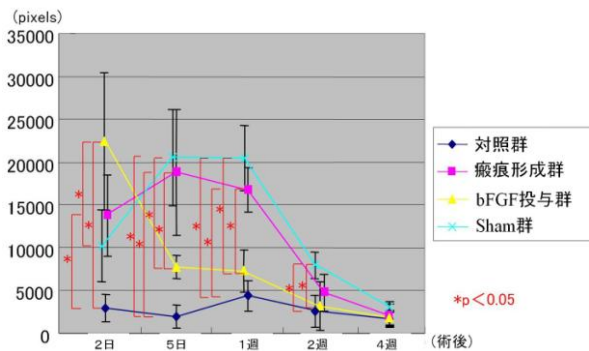


図3 α -SMA のアポトーシス陽性反応面積の比較

(2) bFGF のコラーゲン線維成熟の抑制効果と骨成長 (歯列幅) に対する効果について (図4, 図5, 図6)

第一臼歯間距離計測では、癒痕形成群、Sham 群において、対照群と比べて術後1週までは有意差を認めなかった。術後2週では癒痕形成群は対照群と比べて有意に小さな値を示し、4週も同様であった。Sham 群は術後4週で対照群と比べて有意に小さな値を示した。一方 bFGF 投与群は、術後2週で癒痕形成群よりも有意に大きな値を示し、また4週で対照群と有意差があるものの、癒痕形成群、Sham 群と比べ有意に大きな値を示した。

免疫組織化学的検索では、癒痕形成群、Sham 群において、術後5日以降で固有層と粘膜下組織全体に均一なコラーゲン染色像を認め、経時的に密な束状の像へ変化した。一方、bFGF 投与群は、術後1週までは癒痕形成群や Sham 群と同様な像を示したが、術後2週以降では粘膜下組織でコラーゲン束が疎に見えるようになり、癒痕形成群、Sham 群と比べて対照群に類似した像を示した。

これらのことから、bFGF を投与することにより、コラーゲンタイプ I 線維の過剰な蓄積を抑制することで創傷治癒過程を修飾し、結果的に癒痕収縮を緩和している可能性が考えられた。(図4、図5、図6)

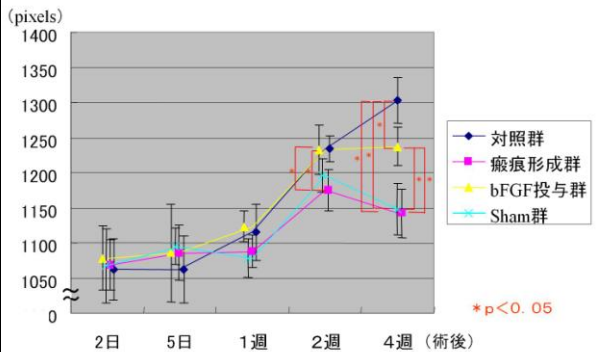


図4 第一臼歯間距離の変化

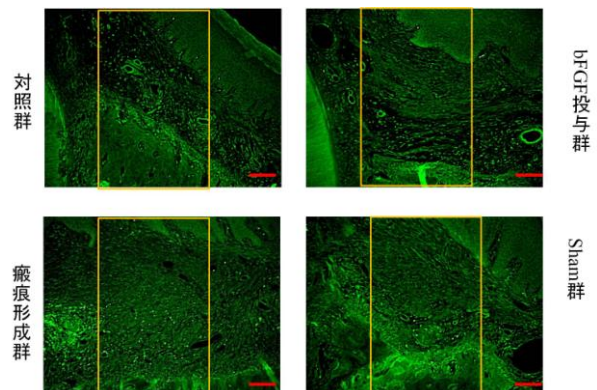


図5 術後2週の蛍光免疫染色
黄枠：粘膜骨膜剥離相当部
赤色のバーは 100 μ m を示す

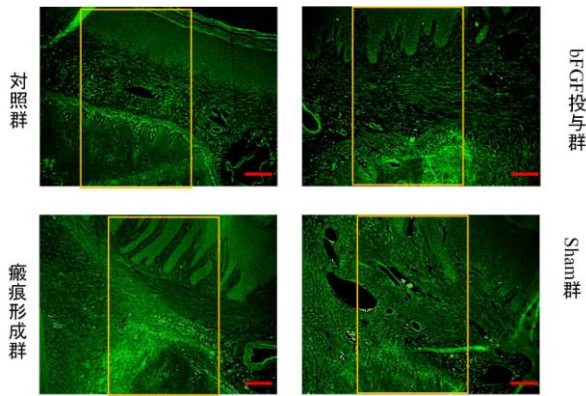


図6 術後4週の蛍光免疫染色

(3) bFGFの弾性系線維に対する効果について (図7, 図8, 図9)

蛍光免疫染色では、対照群において、粘膜下固有層の陽性反応はわずかであったが、瘢痕形成群および Sham 群では、粘膜下固有層全域にわたり陽性反応がみられた。また、陽性反応の範囲がH E染色で瘢痕組織として認められた部位とほぼ一致していた。一方、bFGF投与群では、粘膜下固有層の陽性反応は全域にわたりわずかであった。

また、fibrillin-1 陽性反応の面積の定量データでは、瘢痕形成群および Sham 群は、対照群および bFGF 投与群と比較して有意に大きかった。bFGF 投与群は、対照群と比較して有意差を認めなかった。

これらのことから、瘢痕組織中の弾性系線維はコラーゲン線維と同様、瘢痕組織の形成とともに弾性系線維の量が増加したと考えられた。また、bFGF を投与することにより、瘢痕組織形成が抑制されるとともに弾性系線維の形成も抑制され、正常粘膜組織に近い状態になったと考えられた。(図7、図8、図9)

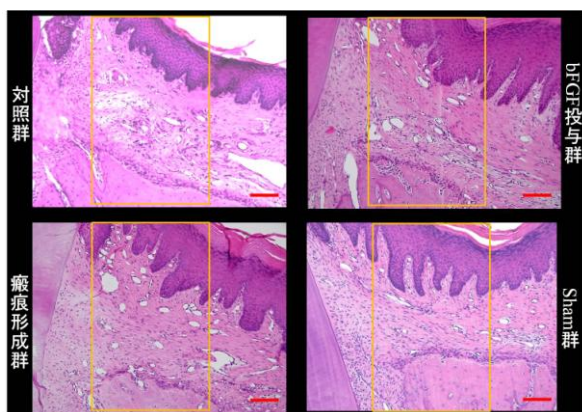


図7 術後6週のHE染色
黄枠：粘膜骨膜剥離相当部
赤色のバーは 100 μ m を示す

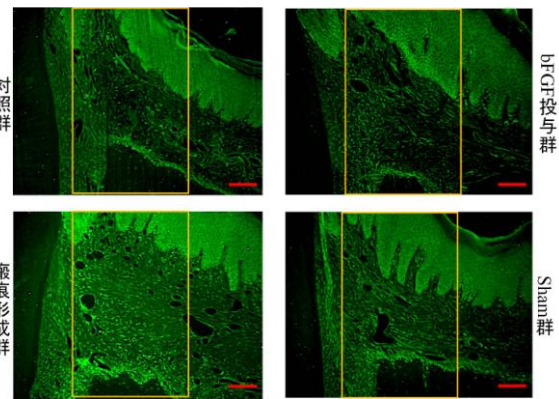


図8 術後6週の蛍光免疫染色

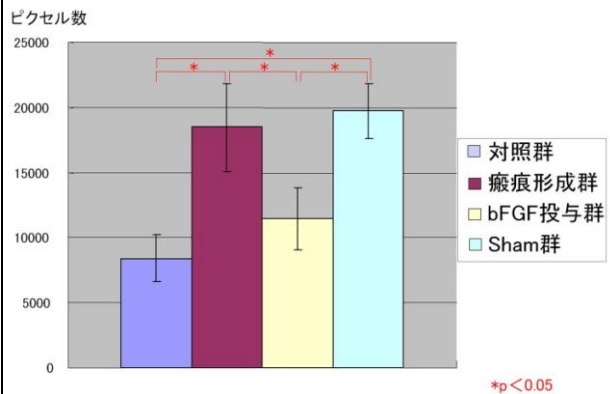


図9 fibrillin-1 陽性反応面積の比較

(4) 得られた成果の国内外の位置づけとポイント

bFGFをはじめサイトカインを用いた再生医療は、近年様々な疾患で注目されている。本研究では口蓋粘膜における粘膜骨膜剥離直後に bFGF 投与を行った場合の粘膜再生について、詳細な病理組織学的データを蓄積できた。これにより国内外を問わず多くの新しい知見が得られたと考えている。専門学会からも後述の学会発表⑥が日本矯正歯科学会大会優秀発表賞に選ばれ、高い評価と期待を頂いている。現在は動物実験による基礎研究の段階であるが、今後データを蓄積し臨床研究へ進展させることで bFGF を応用した顎発育への影響の少ない治療を開発できれば口蓋裂患者の治療に対する国際的な貢献も極めて大きいものと考えている。

(5) 今後の展望

本研究課題では、上記に報告した通り、ラットを用いた動物実験により病理組織学的データを蓄積することができた。今後は、創傷治癒過程における細胞と新生コラーゲン

の動態を追跡する培養モデルを構築し、これを用いて bFGF 投与が創傷治癒に与える影響を種々の条件下（投与回数、時期と間隔、濃度）で検索する予定である。また、このモデルで得られた結果をこれまでの動物実験から得られたデータと照らし合わせて、顎発育抑制を緩和する最適な bFGF 投与の条件を検討し、さらに動物実験でその有効性を評価する予定である。

また、弾性系線維の形成制御については、今後は口蓋粘膜の癒痕組織の形成過程における弾性系線維とコラーゲン線維の割合を経時的に定量して、正常粘膜との比較を行うとともに、そのような組織性状に対する bFGF 投与の効果についても検討していきたい。

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 1 件）

① 植木猛士、秦雄一郎、成富雅則、阿部朗子、玉置幸雄、敦賀英知、沢禎彦、谷口邦久、石川博之、ラット口蓋の創傷治癒過程における弾性系線維の形成と b F G F 投与の影響、福岡歯科大学学会雑誌、査読有、38巻、2012、印刷中

〔学会発表〕（計 6 件）

① 植木猛士、秦雄一郎、敦賀英知、沢禎彦、石川博之、ラット口蓋部癒痕組織における弾性系線維に対する b F G F 投与の効果、第7回九州矯正歯科学会学術大会、2012年2月4-5日、別府国際コンベンションセンター（大分）

② 秦雄一郎、植木猛士、敦賀英知、沢禎彦、谷口邦久、石川博之、ラット口蓋の創傷治癒過程において b F G F 投与は癒痕組織による歯列成長抑制を緩和する、第70回日本矯正歯科学会大会、2011年10月17-20日、名古屋国際会議場（愛知）

③ 秦雄一郎、植木猛士、玉置幸雄、敦賀英知、沢禎彦、谷口邦久、石川博之、術直後の b F G F 投与がラット口蓋の創傷治癒過程におけるコラーゲン線維の蓄積と歯列幅径に与える効果、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2011年5月25-26日、朱鷺メッセ（新潟）

④ 植木猛士、秦雄一郎、敦賀英知、沢禎彦、谷口邦久、石川博之、ラット口蓋部の創傷治癒における筋線維芽細胞のアポトーシスに対する b F G F 投与の定量的評価、第69回日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、パシフィコ横浜（神奈川県）

⑤ Yuichiro Hata、Takeshi Ueki、Kazuki Nakashima、Yuka Nakatomi、Eichi Tsuruga、Yoshihiko Sawa、

Kunihisa Taniguchi、Hiroyuki Ishikawa、Effect of Immediately Post-operative Administration of bFGF on Myofibroblast Apoptosis in the Wound Healing Process of Rat Palate、The 7th International Orthodontic Congress、2010年2月6-9日、Sydney Convention and Exhibition Centre（シドニー、オーストラリア）

⑥ 秦雄一郎、植木猛士、敦賀英知、沢禎彦、谷口邦久、石川博之、術直後の bFGF の局所投与はラット口蓋部の創傷治癒における筋線維芽細胞のアポトーシスを促進する、第68回日本矯正歯科学会大会、2009年11月17-18日、マリンメッセ福岡（福岡）

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 博之 (ISHIKAWA HIROYUKI)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20184492

(2) 研究分担者

沢 禎彦 (SAWA YOSHIHIKO)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70271666

敦賀 英知 (TSURUGA EICHI)
福岡歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：30295901

谷口 邦久 (TANIGUCHI KUNIHISA)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：90105685

秦 雄一郎 (HATA YUICHIRO)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：60465747

(3)連携研究者
()

研究者番号：