

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893320

研究課題名(和文) 創傷治癒モデルを用いた口蓋裂術後瘢痕形成を抑制する薬剂的アプローチ

研究課題名(英文) Pharmacological approaches for the suppression of scar formation after palatoplasty in a wound-healing model

研究代表者

秦 省三郎 (Hata, Shozaburo)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：40736732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：唇顎口蓋裂患者では、口唇形成術、口蓋形成術の術後瘢痕組織の収縮が上顎骨の劣成長や上顎歯列弓の狭窄を引き起こすなど、上顎の成長発育に対して抑制的に働くことが知られている。また、創傷治癒過程において、TGF- β 1を介した線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化は瘢痕の収縮をきたすことが報告されている。本研究では、創傷治癒過程における線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化メカニズムを検討し、薬剂的なアプローチにより瘢痕形成の抑制を行うことを目的とした。その結果、TGF- β 1受容体阻害薬が創傷治癒過程における線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制し、瘢痕収縮を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Scar formation after palatoplasty is considered to inhibit maxillary growth and dento-alveolar development. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) reportedly causes the differentiation of fibroblasts toward cells possessing a contractile phenotype (myofibroblasts) during wound-healing. The aim of this study is to clarify the mechanism underlying the activation of TGF- β 1 in efforts to identify promising pharmacological approaches for the suppression of scar formation. As a result, a TGF- β 1 type I receptor inhibitor appears to be effective in inhibiting the myofibroblastic differentiation, and may be a possible therapeutic approach for the suppression of scar formation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 創傷治癒 筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂患者では、幼少期に口腔と鼻腔の分離と正常な鼻咽腔閉鎖機能の獲得を目的に口唇形成術、口蓋形成術が行われる。しかしながら、術後の創傷治癒過程において形成される瘢痕組織の収縮が上顎骨の劣成長や上顎歯列弓の狭窄を引き起こすなど、上顎の成長発育に対して抑制的に働くことが知られている。臨床においては、唇顎口蓋裂患者に対して顎発育への影響の少ない治療を提供することが強く望まれている現状である。

また、健全な皮膚の維持や瘢痕形成には上皮-結合組織間の相互作用が関与している。創傷治癒過程における線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が瘢痕の形成および収縮をきたし、その分化には TGF-β1 などの成長因子や周囲組織より受ける張力が関与していることが報告されている (Tomasek, J. J. *et al.*, *Nature Rev.* 3, 349-363, 2002)。

そこで我々は、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化メカニズムに着目して、ラット皮膚由来の上皮および結合組織の細胞から構成される三次元細胞培養系を用いた *in vitro* の研究により、α-平滑筋型アクチン (α-SMA) 発現を指標に、上皮細胞から遊離した TGF-β1 によって線維芽細胞が筋線維芽細胞へ変換するメカニズムを報告してきた (Hata *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.* 124, 230-243, 2014) 。その結果、TGF-β1 の活性化を阻害することで線維芽細胞の筋線維芽細胞へ変換を抑制し、瘢痕形成を抑制し得る可能性が示唆された。

そこで、これまでの研究手技、手法を応用して、本研究では、薬剂的なアプローチにより創傷治癒過程における瘢痕形成を抑制する治療法の可能性を検討することを目的とした。

2. 研究の目的

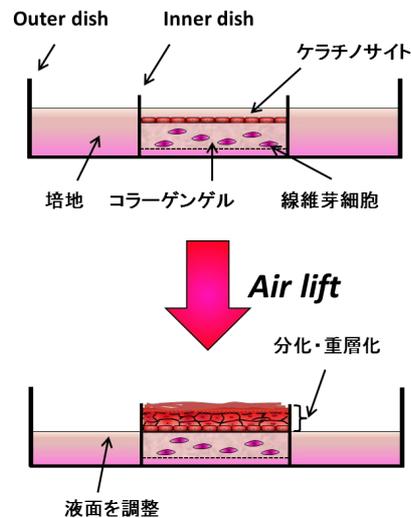
本研究は、創傷治癒過程における線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化メカニズムを検討し、薬剂的なアプローチにより瘢痕形成の抑制を行うことで、唇顎口蓋裂患者に対して顎発育への影響の少ない治療を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 三次元培養系の作製

二日齢 Wistar 系ラットの背部皮膚を採取し、表皮からケラチノサイト、真皮から線維芽細胞を単離し、コラーゲンゲルに線維芽細胞を包埋した後、直径 30 mm の Millicell®-CM (Millipore Co.) に流しこみ、Inner dish を作製する。コラーゲンゲル上に単離したケラチノサイトを播種し、Outer dish に培地を添加して培養する。ケラチノサイトが敷石状に広がったことを確認した後、細胞表面が空気に

曝されるように液面を調整し、ケラチノサイトの分化・重層化を促進する (Air lift)。



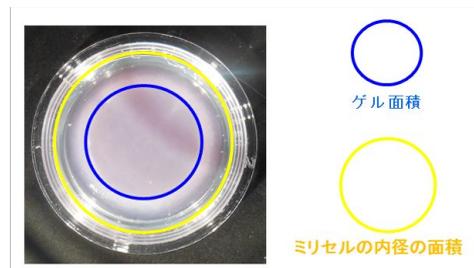
(2) TGFβ タイプ 受容体の阻害薬 (LY364947) の効果の評価

作製した三次元培養系へ外来的に TGF-β1 (20ng/ml) および TGFβ タイプ 受容体阻害薬である LY364947 (3μM) を添加し、Air lift から 10 日経過後に 10%ホルマリンにて固定を行った。通法に従ってパラフィンに包埋し、3μm の厚みで薄切りし、切片を作製した。

筋線維芽細胞の分化マーカーである α-smooth muscle actin (α-SMA) を指標として免疫組織染色法、real time PCR 法を行い、形態学的検索ならびに生化学的検索を行った。

(3) コラーゲンゲルの収縮の解析

画像処理ソフトウェア Image J を用いて、三次元培養系のコラーゲンゲルの面積を経時的に計測し、コラーゲンゲルの収縮率を評価した。

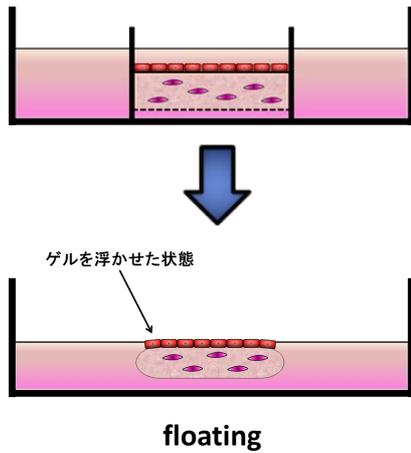


$$\text{ゲルの収縮率} = \frac{\text{ゲルの面積}}{\text{ミリセル内径の面積}}$$

(4) 周囲より受ける張力が α-SMA 発現に及ぼす効果の検討

コラーゲンゲルの培養ディッシュ底面への繫留により生じる張力の影響を受けない

ようにするために、ゲルを inner dish から切り離した状態で培養したもの (floating) と、ゲルを培養ディッシュから切り離さずそのままにしたもの (control) を作製し、 α -SMA 発現の変化を免疫組織染色法にて評価した。



4. 研究成果

TGF β タイプ 受容体阻害薬である LY364947 (3 μ M) を添加し、 α -SMA の発現を検討したところ、免疫組織染色法、および real time PCR 法の結果から、control と比較して LY を添加した群では α -SMA の発現の減少が認められた (図 1)。

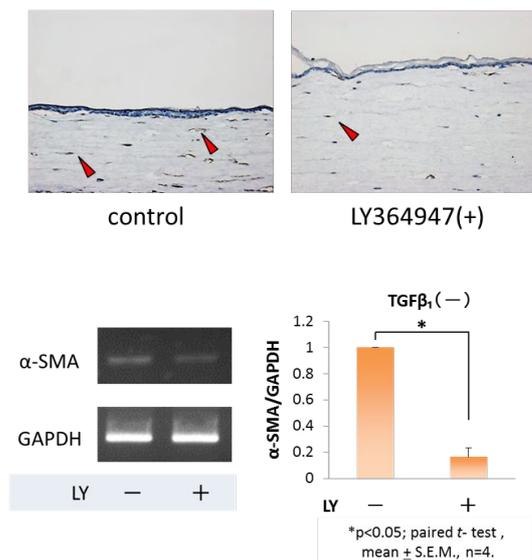


図 1 TGF β タイプ 受容体阻害薬の添加による α -SMA 発現の変化

また、外来的に TGF- β 1 (20ng/ml) を添加した場合においても、LY を添加することによって α -SMA の発現の減少が免疫組織染色

法、および real time PCR 法において認められた (図 2)。

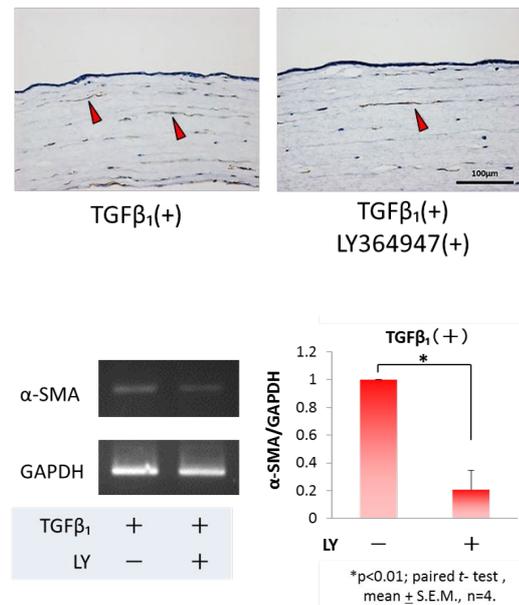


図 2 TGF- β 1 および TGF β タイプ 受容体阻害薬の添加による α -SMA 発現の変化

コラーゲンゲルの収縮の解析において、コラーゲンゲルは、上皮を播種すると経時的に収縮を示した。TGF β タイプ 受容体阻害薬である LY364947 (3 μ M) を添加したところ、コラーゲンゲルの収縮は抑制される傾向が認められた。また、外来的に TGF- β 1 (20ng/ml) を添加したところ、コラーゲンゲルの収縮は促進される傾向を示した (図 3)。

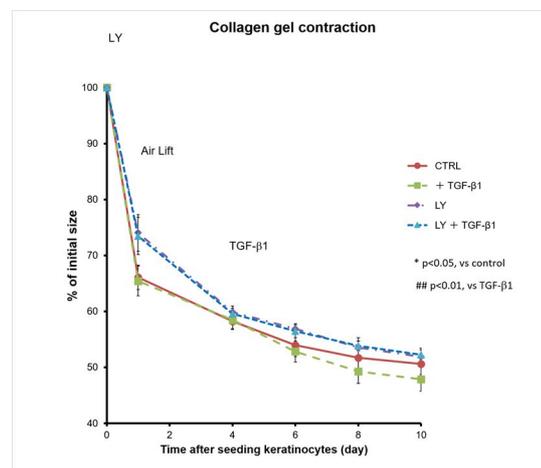


図 3 コラーゲンゲルの経時的な収縮の変化

周囲より受ける張力が及ぼす効果の検討において、control では、染色された細胞が培養ディッシュの底面に対して平行に配列しているのが認められ、一方、floating においては、その平行な配列は失われており、 α -SMA 陽性細胞の減少が認められた (図 4)。

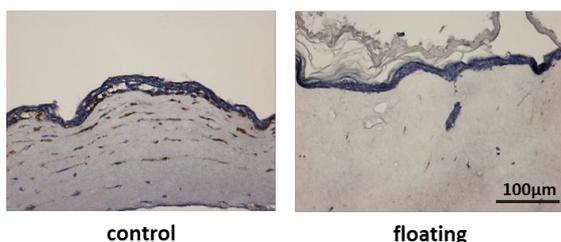


図 4 張力を減じた状況下における線維芽細胞の変化

以上の結果より、TGF β タイプ 受容体の阻害薬 (LY364947) によって、筋線維芽細胞の分化マーカーである α -SMA の発現が抑制され、コラーゲンゲルの収縮が抑制されたことから、TGF β タイプ 受容体の阻害薬が創傷治癒における癒痕収縮を抑制する可能性が示唆された。

今回、三次元培養系を用いることで、TGF- β に依存した癒痕収縮の経時的な変化や、周囲から受ける張力が及ぼす影響について観察することができ、TGF β タイプ 受容体阻害薬の効果を評価することができた。

創傷治癒における癒痕形成、癒痕収縮のメカニズムの解析や薬物療法の検討には今回用いたラット皮膚創傷治癒モデルが有効であると考えられる。今後は、TGF- β 3 や bFGF などのサイトカインや、メカニカルストレスなどの物理的な刺激によって活性化される Transient Receptor Potential (TRP) チャネルとの関連性についてさらなる検討を行っていき、薬剤的なアプローチによる癒痕形成および癒痕収縮を抑制するような治療法の可能性を検討していきたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

秦 省三郎、岡村 和彦、石井 太郎、梶井 貴史、石川 博之、山崎 純
ラット皮膚創傷治癒モデルにおいて MMP 阻害薬が線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑制する
第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2014 年 9 月 25-27 日 福岡

Shozaburo Hata, Jun Yamazaki,
Takashi Kajii, Hiroyuki Ishikawa
MMP inhibitor suppresses myofibroblastic differentiation in three-dimensional wound-healing model of rat skin
115th American Association of Orthodontists Annual Session
2015 年 5 月 15-19 日 San Francisco (USA)

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 省三郎 (HATA, SHOZABURO)
福岡歯科大学 口腔歯学部 助教
研究者番号 : 40736732