

【研究の背景】

マルファン症候群は、微細線維と呼ばれる細胞外マトリックスの異常が原因でからだ全体の結合組織が脆弱化して弾力性が減少し、大動脈や肺、皮膚、関節、骨、歯根膜といった機械的圧力の負担の大きい組織の機能異常がおこります。そのため、高身長や大動脈瘤、肺気胸、関節の異常可動、骨の異常成長、歯周病といった様々な病気が発症します。このマルファン症候群は、5千人に1人と高い確率で発症する遺伝病であり、国内に2万5千人近くの患者がいると考えられています。マルファン症候群は微細線維の主成分であるフィブリリン1の遺伝子にミスセンス変異と呼ばれる遺伝子変異が原因で、正常なフィブリリン1遺伝子の産生量が半減してしまうため、フィブリリン1の絶対量が半減してしまい、機械的外力が低下してすることで発病します。マルファン症候群はその症状によりI型、II型に分類されており、I型は微細線維の遺伝子の異常で前述の症状がはっきりとみられるタイプであり、眼に特徴的な症状がでるとII型に分類され、最も多いのはI型とされています。

微細線維は、組織の強度の維持に重要な役割を果たすばかりでなく、生理活性物質であるTransforming Growth Factor-type beta (TGF-β)と結合して、その機能を調節する働きを有しています。微細線維の形成不全は、体の強度の低下につながるばかりでなく、TGF-βと結合できなくなるためにTGF-βが過剰に活性化され、活性化されたTGF-βが周囲の細胞に作用して結合組織分解酵素を産生するようになります(図1左側)。そのためマルファン症候群では組織の破壊が進行し、大動脈瘤、歯周病を含む特徴的な症状を発症すると考えられています(図1右側)。

マルファン症候群では、大動脈や心臓など循環器がもろくなるため、血圧を下げる薬の服用や、血管が破裂しそうなケースでは人工血管に置き換える手術が行われます。また口腔内では、歯周病を発病した歯を抜歯による治療で取り除かれます。最近では、TGF-β活性を抑制する薬を使用して微細線維の崩壊を抑制して大動脈瘤の予防治療も行われるようになりました(図1右側)。このようにマルファン症候群に対する外科手術およびTGF-βを抑制する薬物療法で、その症状を予防できるようになりましたが、マルファン症候群の主要原因である微細線維の機能低下を回復させる新たな治療技術の開発が大きな課題として考えられてきました。

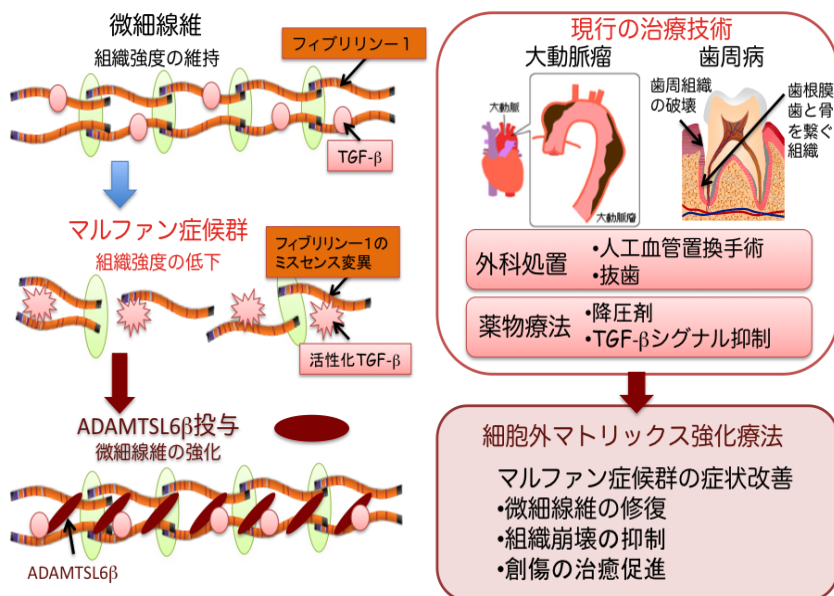


図1 マルファン症候群と細胞外マトリックス強化療法による治療戦略
左側：マルファン症候群ではフィブリリン1のミスセンス変異により微細線維形成不全とTGF-βの病的な活性化が起こり、弾力力の低下と組織の崩壊が進行する。ADAMTSL6βの投与によりマルファン症候群の残されたフィブリリン1の重合が促進され微細線維を強化することで、その機能低下と組織崩壊を抑制する。
右側：マルファン症候群では大動脈瘤、歯周病などの疾患を発症する。これらの疾患に対し、外科処置あるいは薬物療法で対応されてきたが、微細線維崩壊を改善する治療は開発されていない。微細線維成分であるADAMTSL6βを用いて微細線維を強化する『細胞外マトリックス強化療法』で、微細線維修復、組織崩壊、創傷の治癒を促進し、マルファン症候群の症状改善を図る。

【研究成果の概要】

1. 微細線維再生を誘導するADAMTSL6βの発見

これまで大阪大学、蛋白質研究所の関口教授のグループでは、細胞外マトリックスの持つ役割を明らかにするため、これまで知られていない新しい細胞外マトリックス成分を探すプロジェクトが進められてきました。このプロジェクトの中で、2010年にADAMTSL6βが微細線維と結合するタンパク質として発見され、そしてこのタンパク質が微細線維の形成を誘導することが示されました。そこで私たちの研究グループでは、生体内における微細線維形成をADAMTSL6βが誘導出来るかを調べるために、生体内でADAMTSL6βを過剰に発現する遺伝子組換え動物（ADAMTSL6βトランスジェニックマウス：TSL6β-TG）を作製し、ADAMTSL6βが血管や皮膚、歯根膜の微細線維を増やすかどうかを調べました。その結果、正常の動物（WT）と比較して、血管や皮膚、歯根膜で微細線維が明らかに増えていることが判明しました。（図2）。このことより、ADAMTSL6βは生体内で微細線維形成を誘導する作用を有することが明らかになりました。

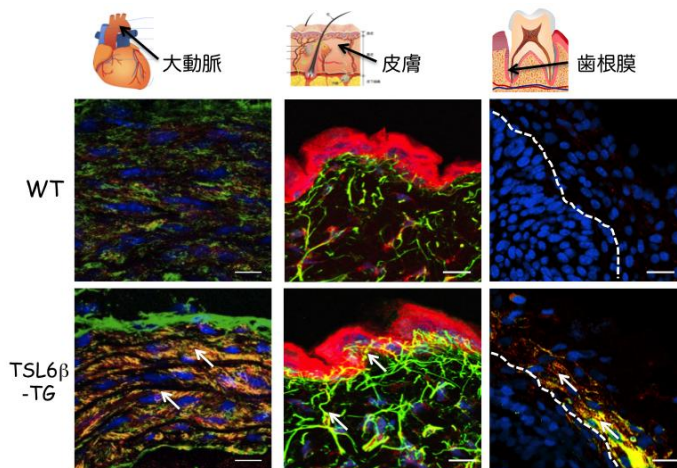


図2 ADAMTSL6βは結合組織の微細線維を増加させる

ADAMTSL6βを過剰発現させたマウス（TSL6βTG）と正常マウス（WT）について、大動脈（左側）、皮膚（中央）および歯根膜（右側）における微細線維形成能をフィブリリン1（緑）とADAMTSL6β（赤）の抗体を用いた免疫染色で観察した。WTマウスと比較して、大動脈では中膜の、皮膚では真皮、歯根膜では靭帯組織でフィブリリン1（緑）とADAMTSL6β（赤）陽性の黄緑の微細線維（矢印）が増えていることが観察される。Bar=50 μm

2. ADAMTSL6βは歯根膜の傷の治癒に關与する

本研究では、ADAMTSL6βの微細線維形成不全の改善能力を調べるため、歯根膜をモデルとして、ADAMTSL6βが破壊された微細線維を修復出来るかどうかを調べました。歯根膜は、歯と骨を繋げる靭帯とよく似た組織で微細線維に富んでおり、マルファン症候群でも歯周病を発症するため、微細線維形成モデルとして有用なモデルとなりうると考えられます。

ADAMTSL6βが歯根膜の微細線維形成に関わるかを調べるために、歯根膜発生過程で微細線維の形成される様子を観察すると、発生の未熟な歯根膜でADAMTSL6βは豊富に合成され、その場所にADAMTSL6βが存在することが分かりました（図3A 上段、下段左側矢印）。このことからADAMTSL6βは、歯根膜の微細線維が形成される過程で働く物質であると考えられました。

次にADAMTSL6βが歯根膜の微細線維の修復に関わるかを調べるために、抜歯により歯根膜を断裂することで微細線維を破壊し、その後の治癒過程を観察しました（図3B）。歯根膜に損傷を与えると、損傷後3-14日では組織治癒過程が観察されますが、14日目以降には治癒することが観察されました（図3B、上段）。ADAMTSL6βは、歯根膜が修復される時期で微細線維と共にその合成量が高まり、ADAMTSL6βが修復部位に蓄積することが観察されました（図3B、下段）。これらの結果より、ADAMTSL6βは歯根膜の微細線維が修復する時に働いている可能性が示されました。

〈参考資料〉

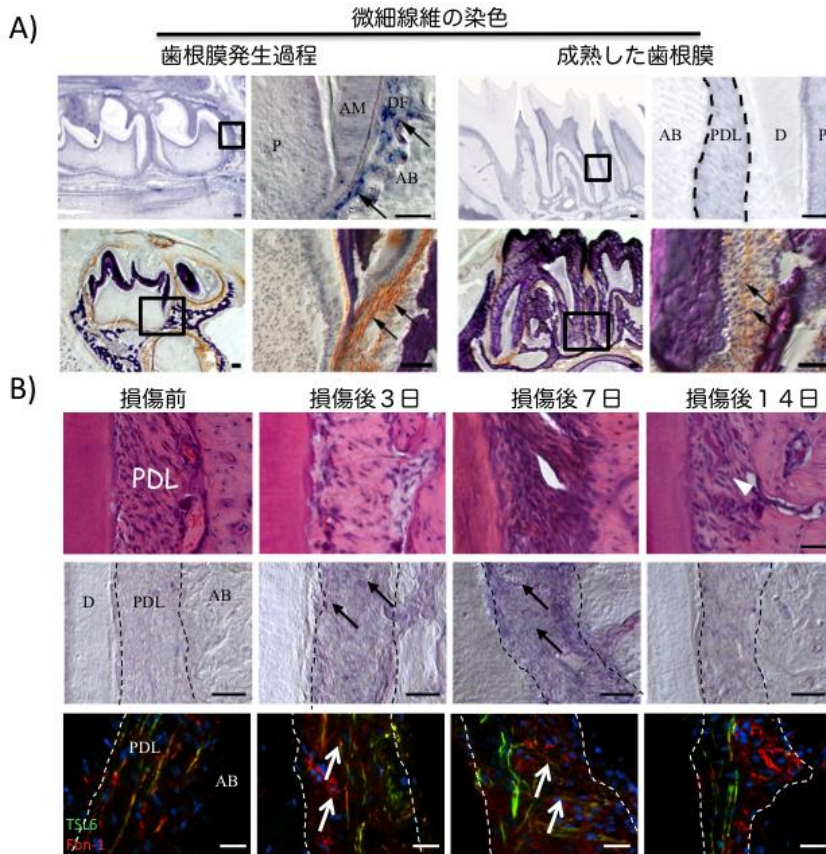


図3 Adamtsl6βは歯根膜の微細線維の修復に関わる

A) 歯根膜の発生過程におけるADAMTSL6βの産生を示す。ADAMTSL6βの遺伝子が歯根膜の発生原基である歯小嚢で高発現（上段、矢印）している。ADAMTSL6β抗体陽性の微細線維が歯小嚢で豊富に作られ、成熟歯根膜では低下している像を示す（下段、矢印）。四角内の拡大像を右側に示す。

B) 歯根膜治癒過程におけるADAMTSL6βの産生を示す。上段：歯を再植し歯根膜損傷後の治る過程を示す。3日目では破壊されている像が観察されるが、7,14日で治るのが観察される。

中断：歯根膜修復過程でADAMTSL6βの遺伝子の産生は損傷後3日と7日で増加するが（矢印）、14日になると検出されなくなった。ADAMTSL6β（TSL6; 緑）およびフィブリリン1（Fbn-1; 赤）陽性の微細線維の形成量も3日と7日で高まり、14日で低下することが観察された（矢印）。

Bar=50 μm

3. ADAMTSL6βはマルファン症候群患者由来細胞の微細線維形成不全を改善する

本研究では、ADAMTSL6βのマルファン症候群に対する治療効果を解析するため、フィブリリン1の発現量を遺伝子組み換え操作で1/2以下に控えたモデル動物を用いて解析を行いました。このモデル動物は、歯根膜の微細線維形成は正常動物と比較して少なく、組織の形成不全を起こすことが知られています。そこで、この歯根膜の微細線維形成不全をADAMTSL6βが改善するかを解析するため、コラーゲンにADAMTSL6βを含ませたシート状のゲルを歯根膜に挿入したところ（ADAMTSL6βシート：図4A）、微細線維の形成不全を改善させるばかりでなく、傷の修復を促進させることが分かりました。（図4B、右側）次にADAMTSL6βがマルファン症候群患者の微細線維の形成不全を改善できるかを解析しました。マルファン症候群患者から提供された歯根膜細胞は、健康な人の歯根膜細胞と比較して微細線維の形成不全が見られますが（図4C、左側）、ADAMTSL6βを加えることで微細線維形成が誘導され、微細線維形成不全の改善が観察されました（図4C、右側）。

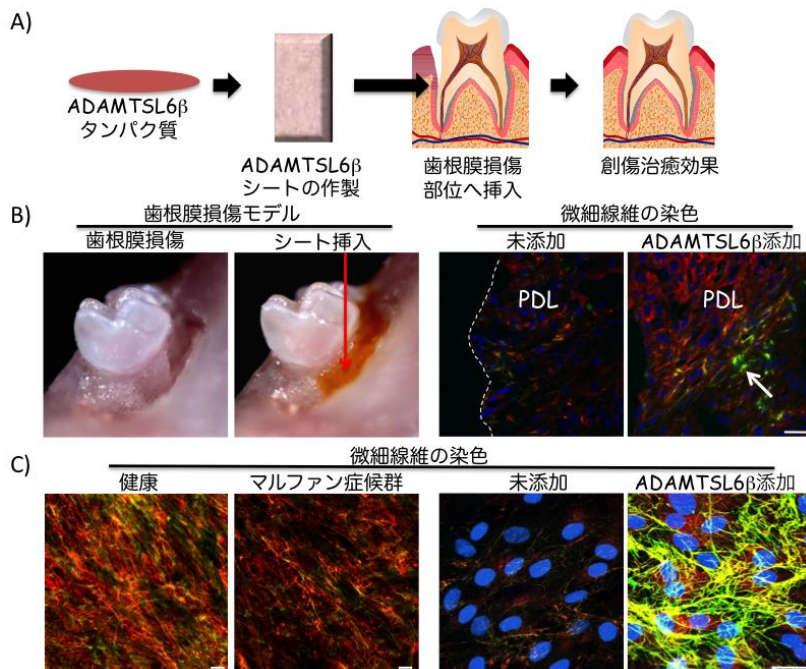


図4 ADAMTSL6βはマルファン症候群における歯根膜の微細線維形成不全を改善する

A)ADAMTSL6βシートを用いた歯根膜への投与方法。ADAMTSL6βタンパク質を含有しているコラーゲンゲルシートを歯根膜損傷部位へ挿入し、創傷治癒効果を調べた。

B)左側：ADAMTSL6βシートを歯を脱臼させた露出した歯根膜の損傷面へ挿入した。

右側：ADAMTSL6βのシート挿入後微細線維の回復像。ADAMTSL6β(緑)、フィブリリン1(赤)陽性の微細線維の形成量の増加が観察される。(矢印)

C) マルファン症候群由来歯根膜細胞は健康な人の歯根膜細胞と比較してフィブリリン1(赤)陽性の微細線維の量が低下している(左側)。マルファン症候群由来歯根膜細胞にADAMTSL6βを添加した結果、フィブリリン1(赤)、ADAMTSL6β(緑)陽性の黄緑の微細線維が明らかに増加している(右側)。Bar=50μm

以上の結果より、微細線維の構成成分であるADAMTSL6βを補充する新たな治療戦略により、マルファン症候群の微細線維形成不全を回復させる治療技術に発展しうる可能性が期待されます(図5)。本研究課題では、歯根膜モデルにおいて効果を解析しましたが、現在、大動脈瘤モデルを利用して詳細な解析を進め、マルファン症候群の幅広い疾患に対して同様の効果が認められるかの解析を進め、その効果を検証しています。また歯根膜のように治療としてアクセスしやすい部位での補充療法は実用적입니다。大動脈瘤や心臓疾患などでは分子を補充することが難しい組織もあります。このような場合に向けて、ADAMTSL6βの発現を高めるような薬物のスクリーニングを進め、微細線維の成分の強化による治療技術の確立に向け研究を進め、マルファン症候群の患者さんの疾患の改善に役立ちたいと考えています。

新規マルファン症候群治療技術の開発

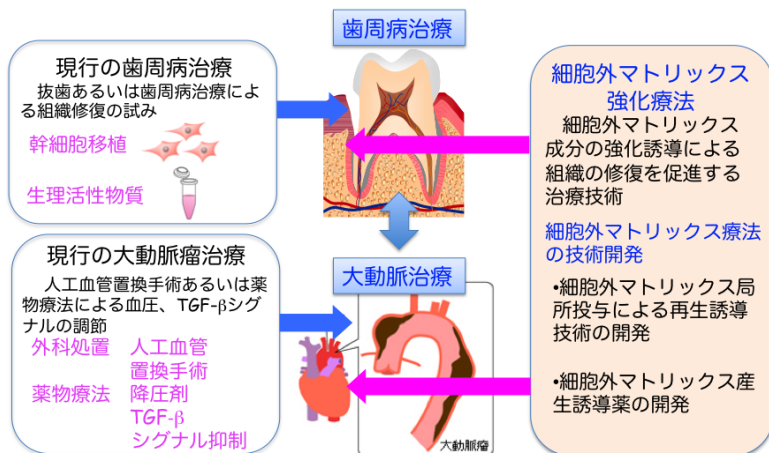


図5 細胞外マトリックス強化療法による新規マルファン症候群の治療技術の開発

細胞外マトリックス強化療法の技術開発は、マルファン症候群の現行の歯周病、大動脈の治療技術で補えなかった微細線維形成を改善する新規治療技術として発展する可能性が期待される。歯周病のように外部からアクセス可能な場合は、細胞外マトリックスの局所投与による再生誘導、大動脈瘤の場合は細胞外マトリックスの産生を誘導する薬剤の開発を試みる。

■論文について：

ADAMTSL6 β rescues fibrillin-1 microfibril disorder in a Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly

Masahiro Saito^{1,2*}, Misaki Kurokawa¹, Masahito Oda¹, Masamitsu Oshima², Ko Tsutsui⁶, Kazutaka Kosaka⁵, Kazuhisa Nakao², Miho Ogawa³, Ri-ichiroh Manabe⁹, Naoto Suda⁸, Ganburged Ganjargal⁸, Yasunobu Hada^{1,10}, Toshihide Noguchi⁷, Toshio Teranaka⁵, Kiyotoshi Sekiguchi⁶, Toshiyuki Yoneda⁴ and Takashi Tsuji^{1,2,3}

¹Department of Biological Science and Technology, Faculty of Industrial Science, ²Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, ³Organ Technologies Inc.,

⁴Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Dentistry, Osaka University,

⁵Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College, Kanagawa,

⁶Institute for Protein Research, Osaka University, ⁷Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, ⁸Maxillofacial Orthognathics, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University,

⁹RIKEN Genomic Sciences Center, RIKEN Yokohama Institute, Yokohama, ¹⁰Oral Implantology and Regenerative Dental Medicine, Graduate school, Tokyo Medical and Dental University

Running title : ADAMTSL6 β rescues disorder in Marfan syndrome

Address Corresponding to: Masahiro Saito, DDS, PhD, Faculty of Industrial Science and Technology, Tokyo University of Science, Noda, Chiba 278-8510, Japan. Phone: +81-4-7122-1829, Fax: +81-4-7122-14996-6879-2890, E-mail: mssaito@rs.noda.tus.ac.jp

■関連機関およびプロジェクトについて

・東京理科大学、総合研究機構、社会連携部、オーガテクノロジーズ器官再生工学プロジェクトについて（総合研究機構年報より抜粋）

総合研究機構は新しい学問の進展に対応し、かつ社会のニーズに応えるために、複数の学問分野の教員が協力して、学際型、分野横断型の総合的な研究体制を構築すると共に、産業界や行政、学外の専門家とも積極的な連携を図ることにより、優れた研究効果を創出・発信することを目指しています。さらに本学の学術教育研究体制の持続的発展・強化と人材育成環境の格段の高度化を実現することにより、社会に大きく貢献することを目的としています。総合研究機構、社会連携部は、本学の教員が責任者となり実施する外部資金による共同研究のうち、社会連携の推進に対し、特段に貢献できると認められるもので、重要性を有する社会連携プロジェクトを実施することを目的とします。

社会連携部、オーガテクノロジーズ器官再生工学プロジェクトは平成21年1月に設置。

・所在地：〒278-0022 千葉県野田市山崎2641（東京理科大学 野田キャンパス内）

・プロジェクト代表者：辻 孝（総合研究機構・教授、大学院基礎工学研究科・生物工学専攻・教授）

・株式会社 オーガテクノロジーズについて

別紙、（株）オーガテクノロジーズの説明資料参照のこと

・所在地：〒101-0048 東京都千代田区神田司町2-2

・代表取締役社長：朝井 洋明

・ホームページ：<http://www.organ-technol.co.jp/>

・主な事業概要：再生医療向け医薬品および材料の製造・販売および輸出入、治療用細胞、組織、器官の受託製造、販売、および輸出入

・厚生労働省・厚生科学研究費補助金「厚生科学疾病・障害対策研究分野、難治疾患克服事業」について

・厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学研究費補助金は、「厚生労働科学研究の振興を促し、もって、国民の保健医療、福祉、生

〈参考資料〉

活衛生、労働安全衛生等に関し、行政施策の科学的な推進を確保し、技術水準の向上を図ること」を目的とし、独創的又は先駆的な研究や社会的要請の強い諸問題に関する研究について競争的な研究環境の形成を行い、厚生労働科学研究の振興を一層推進する観点から、毎年度厚生労働省ホームページ等を通じて、研究課題の募集を行っています。応募された研究課題は、事前評価委員会において「専門的・学術的観点」や「行政的観点」等からの総合的な評価を経たのちに採択研究課題が決定され、その結果に基づき補助金が交付されます（厚生労働科研費公募要項より抜粋）。

・「厚生科学疾病・障害対策研究分野、難治疾患克服事業」

根本的な治療法が確立しておらず、かつ、後遺症を残すおそれが少なくない難治性疾患について、病状の進行の阻止並びに患者の身体機能の回復及び再生を目指した画期的な診断法及び治療法の研究開発の推進に資することを目的とする研究

•本成果に関わる研究課題

「遺伝性急性進行型歯槽膿漏症候群の診断基準確立の更なる推進に関する研究」平成23-24年度
研究代表者：村上 伸也（大阪大学大学院歯学研究科、教授）

•独立行政法人日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究(B)、挑戦的萌芽研究 について

科学研究費補助金は、人文・社会科学から自然科学まで全ての分野にわたり、基礎から応用までのあらゆる「学術研究」（研究者の自由な発想に基づく研究）を格段に発展させることを目的とする「競争的金」であり、専門分野の近い複数の研究者による審査により、豊かな社会発展の基盤となる独創的・先駆的な研究に対する助成を行うものです。（科学研究費補助金公募要領より引用）

•本成果に関わる研究課題

平成 21-23 年度、基盤研究（B）、研究代表者：齋藤正寛

「ADAMTSL4 の歯根膜再生能力の解析ならびに新規歯科保存治療薬の開発」

平成 22-23 年度、挑戦的萌芽、研究代表者：齋藤正寛

「遺伝子改変マウス作製技術を応用した歯根膜再生モデル動物の開発」

以 上