

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462687

研究課題名(和文) Smad3抑制による癒痕声帯の治療法開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for vocal fold scar by inhibiting Smad3 pathway

研究代表者

増田 聖子 (Masuda, Masako)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70346998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：声帯癒痕に対する治療法の開発のため、Smad3を抑制する遺伝子実験を計画した。前哨研究としてフェレット声帯癒痕モデルを作製し、組織学的な特徴について評価した。粘膜固有層の面積減少、コラーゲン線維の増加、ヒアルロン酸の減少が見られた。免疫染色ではコラーゲン1、コラーゲン3、Fibronectinの発現が癒痕側で有意に増加しており他の動物種での報告と同様での所見だった。今回の結果を踏まえてSmad3抑制の研究を行いたい。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a new treatment of vocal fold scar, we focused on the smad3 gene, which are known to contribute the scar formation. We planned to inhibit smad3 expression by using smad3 siRNA. Preliminary, we analyzed the pathological feature of ferret vocal fold scar model. The result showed that reduction of the area of lamina propria, increased collagen fiber, and decreased hyaluronic acid at scar side compared with untreated side. Immunostaining showed that collagen 1, collagen3 and fibronectin positive area were significantly increased ($p<0.05$) in scar side compared with untreated side. These results are similar to the reports of other animal models. We are going to start study using siRNA based on these results.

研究分野：喉頭科学

キーワード：声帯癒痕 Smad3 コラーゲン線維 ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

慢性的な炎症や外傷、手術、放射線治療などは声帯の癒痕化をもたらし、正常な声帯粘膜波動を妨げることにより、難治性の嚔声を引き起こす。この癒痕声帯に対する治療法は未だ確立されていない。当教室ではこれまでにフェレットの癒痕声帯モデルを確立し、in vitro 実験でその病態について解析を行ってきた。

Smad ファミリーは細胞増殖抑制因子 TGF- β の細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている分子群である。TGF- β の作用は複雑であるが、その多くは細胞増殖抑制作用と細胞外マトリックス産生促進作用の2つに集約される。Smad3 は TGF- β の I 型レセプターに直接結合してリン酸化され、細胞内シグナル伝達物質として働く。Smad3 ノックアウトマウスでは創傷治癒が非常に速やかに、きれいにおこることが知られている。

組織傷害部位での Smad3 発現の抑制は良好な創傷治癒の促進に有用であると考えられているが、喉頭領域での検討は行われていない。これまで皮膚、肝、肺、小腸等において Smad3 抑制による抗線維化作用が確認されており、声帯でも抗線維化作用を発揮する可能性が高い。

2. 研究の目的

当初の計画ではラットを用いた声帯癒痕モデルを作製し、電気穿孔法を用いて、ラット声帯に Smad3-siRNA を導入する方法を確立し、声帯癒痕に Smad3-siRNA を導入することで声帯癒痕が抑制されるかどうかを計測することを目的としていた。

しかし、ラットをもちいた声帯焼灼による癒痕モデルの作製が困難であったためフェレット声帯癒痕モデルを新たに作製し、si-RNA 導入実験の先駆実験としてフェレット声帯癒痕モデルの組織学的特徴を検討した。

3. 研究の方法

若年成人オスフェレット 10 頭を使用した。フェレットをキシラジン、ケタラルルの筋肉注射で麻酔をかけ、フェレット用の喉頭観察手術台に寝かせた。アームの先端に接合した長鼻鏡を用いて喉頭展開し、声帯を直視下においた。電気メスをもちいて右声帯を電気焼灼して創を作成し、4 週後にフェレットを安楽死させ、喉頭を摘出した。OCT コンパウンドに包埋して凍結し、8 μ m の薄切切片を作成した。4%パラホルムアルデヒドで組織を固定し、HE 染色、EVG 染色、Alcian-blue 染色と免疫染色 (collagen1、collagen3、Fibronectin) を行った。撮影した画像を画像解析ソフト image j をもちいて声帯粘膜固有層における免疫染色陽性の面積の割合を測定し、処置側と非処置側で比較した。

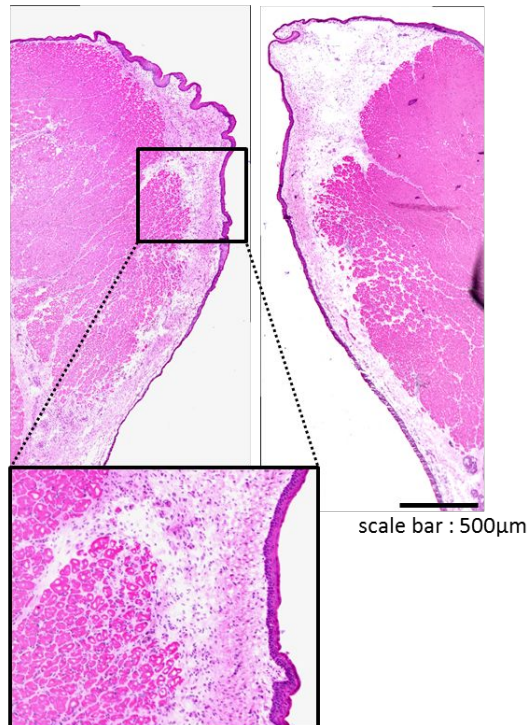
4. 研究成果

< 結果 >

組織学的評価では、他の動物種と同様に、処置側で粘膜固有層の面積の減少が見られた。EVG 染色では赤紫色のコラーゲン線維の増加が見られ、また黒紫色のエラスチン線維の減少が見られた。また Alcian blue 染色ではヒアルロン酸の減少が見られた。この所見も他の動物種と同様の結果だった。

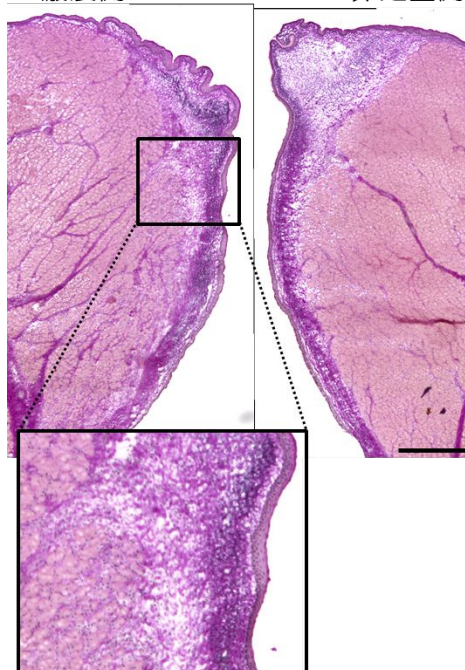
HE 染色

癒痕側 非処置側

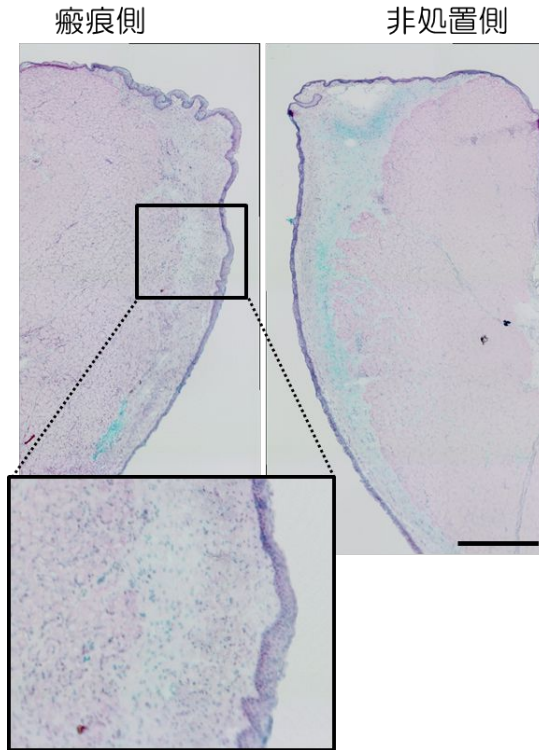


EVG 染色

癒痕側 非処置側

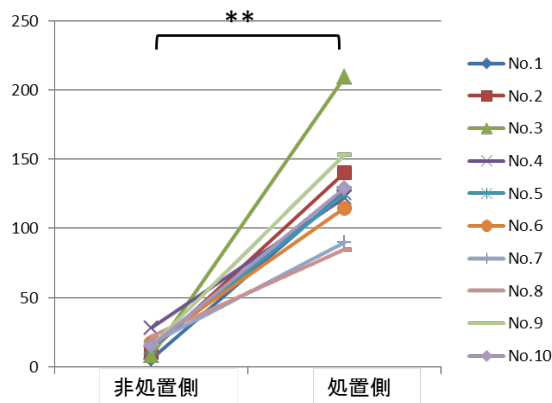


Alcian blue 染色

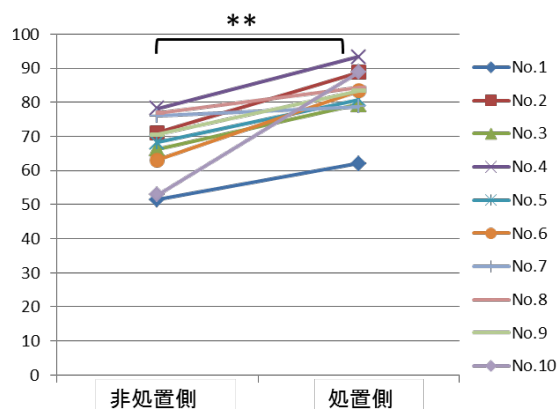


免疫染色

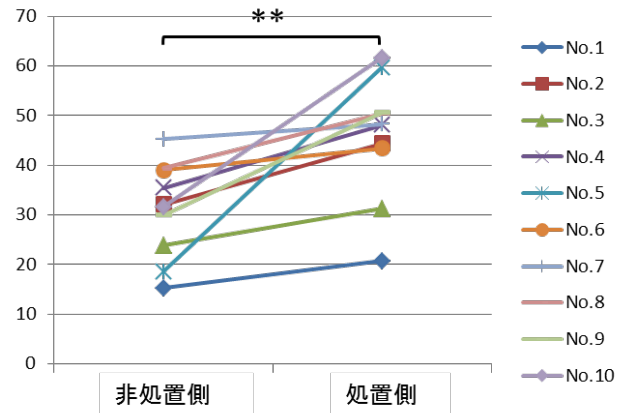
Collagen 1



Collagen3



Fibronectin



生体粘膜固有層の中で Collagen1、Collagen3、Fibronectin の染色陽性部分の割合を計測し、処置側と非処置側で比較した。Collagen1、Collagen3、Fibronectin のいずれも処置側で有意にタンパクの発現が増加していた。特に collagen 1 は処置側と非処置側での発現の差が大きかった。

<考察>

フェレット声帯癒痕モデルを作製し、その組織学的特徴について評価した。フェレットの声帯癒痕は他の動物種での報告と同様の結果を示し、声帯粘膜固有層におけるコラーゲンの増加、Fibronectin の増加、ヒアルロン酸の減少が見られた。とくにコラーゲン1が著明に増加しており、癒痕声帯に対する si-RNA 導入実験をおこなった際により指標になると考えられた。

si-RNA の導入実験を行うに向けて、現在準備を進めているが、フェレットはあまりノックダウンを行う研究に用いられる動物種ではなく、siRNA の設計に時間がかかっており、実際に siRNA の導入には至っていない。しかし、フェレットの声帯は長鼻鏡を用いることで容易に直視下に声帯膜様部が観察でき、遺伝子導入操作も容易であることが予想される。

今回の研究期間では当初の目的である Smad3-siRNA の導入実験まで至らなかったが、今後、siRNA を導入し、Smad をノックダウンすることで癒痕抑制が得られるかについて研究を進めていきたい。

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 0 件)

〔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

増田聖子 (MASUDA, Masako)
熊本大学医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：70346998

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

熊井良彦 (KUMAI, Yoshihiko)
熊本大学大学院生命科学研究部 (医)
耳鼻咽喉科 頭頸部外科・助教
研究者番号：00555774

(4) 研究協力者

()