

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792078

研究課題名 (和文) 遺伝子医薬開発を目的とした口蓋粘膜創傷治癒における癒痕形成メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the healing mechanism for developing gene therapy in palatal wounds

研究代表者

泰江 章博 (YASUE AKIHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80300046

研究成果の概要 (和文)：

口唇裂・口蓋裂患者における裂隙閉鎖術後の癒痕組織はその強い癒痕鈎縮により、上顎骨劣成長や上顎歯列弓狭窄をもたらし、その結果患者は重篤な不正咬合を呈する。一方、TGF- β のシグナル伝達因子の1つであるSmad3のノックアウトマウスでは、創傷治癒促進・癒痕形成抑制が認められる。本課題は、Smad3リン酸化特異的阻害剤の創傷治癒過程にもたらす影響を試み、結果、炎症関連因子の発現低下の伴う有意な創傷閉鎖促進が認められた。

研究成果の概要 (英文)：

Cleft palate patients are often subject to maxillary growth impairment and narrow dental arch after surgical closure of the defect in infancy. This is considered to be a consequence of the scar which is formed during palatal wound healing. Smad3 is one of the members concerned to TGF- β signaling pathway, and its deficient mice showed the notably accelerated wound healing in injured palates.

In this study, we investigated the effects of a specific inhibitor of Smad3 phosphorylation in wound repair, and as a result, an accelerated wound closure with down regulation of inflammatory genes was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 ・ 矯正・小児系歯学

キーワード：遺伝子医薬開発、RNAi、Smad3、癒痕形成抑制、SIS3

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂患者における裂隙閉鎖術後の癒痕組織はその強い癒痕鈎縮により、上顎骨劣成長や上顎歯列弓狭窄をもたらし、その結果患者は重篤な不正咬合を呈する。さらには矯正治療後の後戻りの原因にもなることも知られている。このことは、癒痕組織形成の抑制・減少を可能にすることで先に述べた現象を最小限に抑えることの可能性を意味し、これは矯正歯科臨床に大きな飛躍をもたらすことになる。一方、TGF- β のシグナル伝達因子の1つである Smad3 のノックアウトマウスでは、創傷治癒促進・癒痕形成抑制が認められる。近年実現の可能性の高まりつつある RNAi 医薬を Smad3 に適用し同遺伝子の抑制を *in vivo* において実現できれば、矯正歯科臨床のみならず広く医療分野応用可能な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は Smad3 遺伝子を標的として傷治癒促進・癒痕形成抑制を試みることである。当初の手法としては RNAi 法を *in vivo* にて適用するものだったが、Smad3 はリン酸化という修飾を受けることで TGF- β シグナルを伝達することから、そのリン酸化特異的阻害剤を用いることとした。その上で癒痕形成抑制過程における分子メカニズムを解明し、臨床応用へ繋げる。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*における Smad3リン酸化阻害剤の導入: *In vivo*投与する前段階として、Smad3リン酸化阻害剤(以下SIS3)の効果を検証することを目的とし、新生野生型マウス由来上皮細胞ならびに線維芽細胞の初代培養を行い、同阻害剤を適用した。上皮細胞

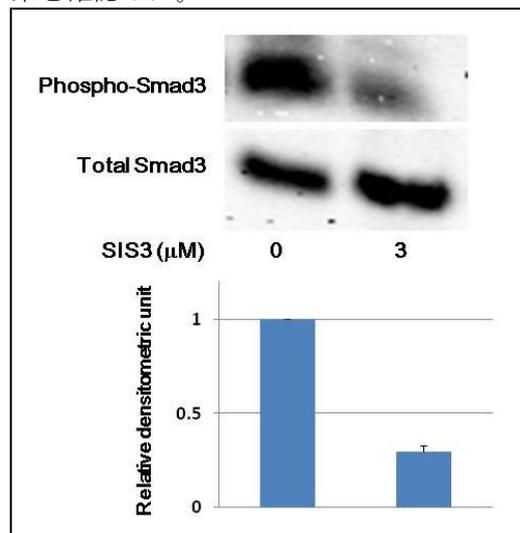
ではTGF- β 1による遊走能抑制に対する効果を、線維芽細胞ではTGF- β 1、MCP-1、MIP-1 β といった炎症関連因子の発現量低下をSmad3ノックアウトマウスで報告されている変化を指標に、real-time PCR法ならびにウエスタンブロット法により確認・判定した。

(2) *In vivo*における Smad3リン酸化阻害剤の導入: 生体マウス口蓋に創傷を作製し、同部位に阻害剤を投与した。

(3) 創傷治癒過程における形態組織学的、免疫組織学的ならびに生化学的検索: SIS3投与マウスの創傷治癒過程を形態組織学的観察のみならず、MIP-1 β 、MCP-1などといった Smad3ノックアウトマウスで低下の見られる分子について免疫染色ならびに real-time PCR法にて評価・定量した。

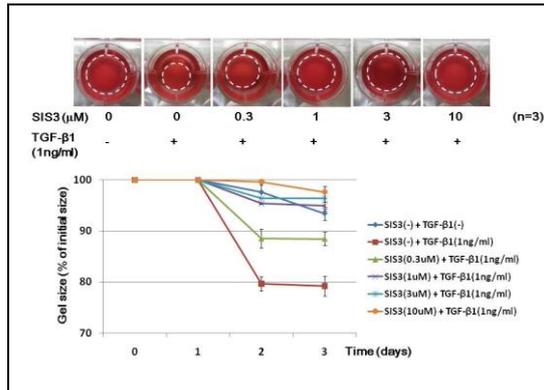
4. 研究成果

(1) 新生マウス皮膚由来線維芽細胞の初代培養系において、SIS3を適用し、immunoblottingにてSIS3のリン酸化抑制効果を確認した。

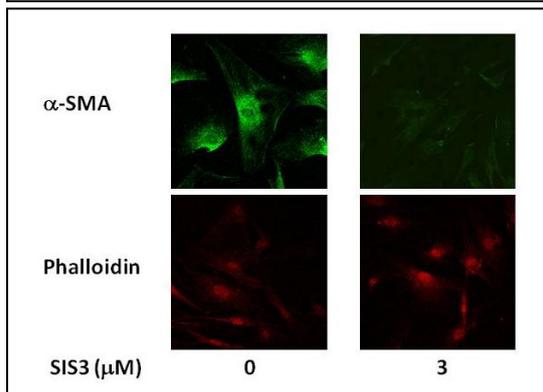
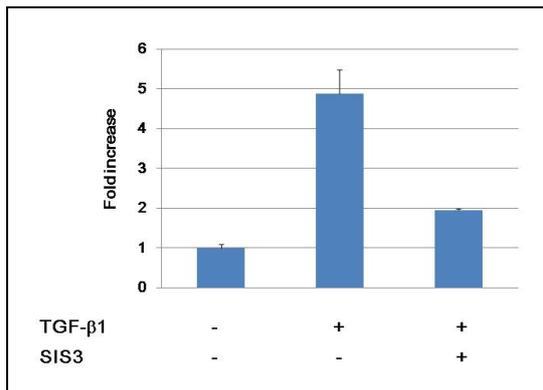


(2) また同線維芽細胞を用いた3次元コラーゲンゲル収縮アッセイを行ったところ、SIS3添加群ではコントロール群と比較してゲル収縮能を抑制し、その効果は濃度依存

的であった。

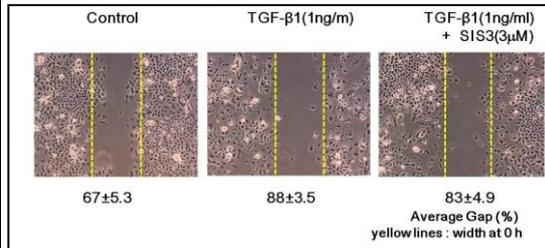


(3) TGF-β1は線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させることで癒痕収縮を引き起こすことが知られている。そこで、その分化マーカーであるα-Smooth Muscle Actin (SMA)の発現をreal-time PCRならびに蛍光免疫染色にて確認したところ、SIS3によりその発現抑制が確認された。

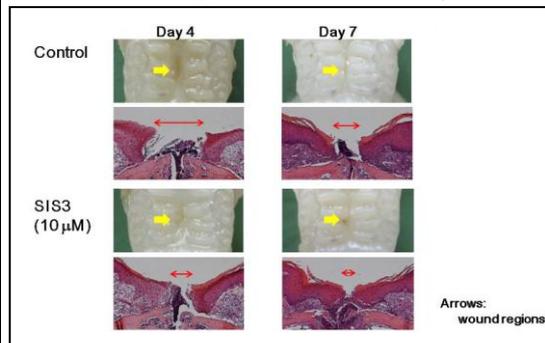


(4) TGF-β1による上皮細胞の遊走能抑制効果がノックアウトマウス由来上皮細胞ではほぼ消失されることが報告されているため、in vitro migration assayを行いSIS3

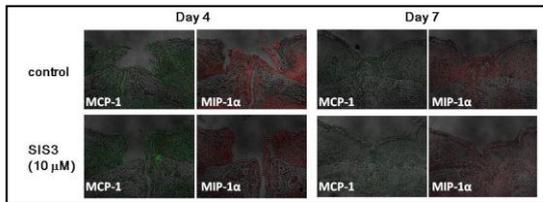
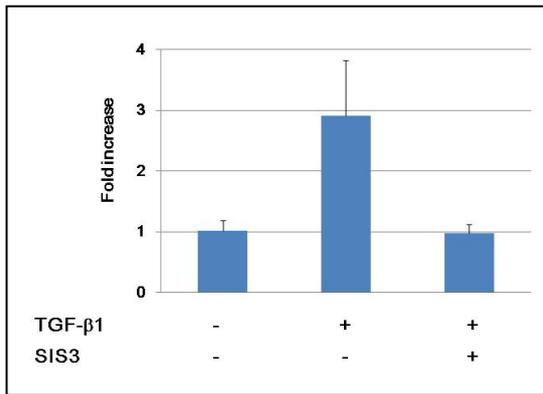
を添加することで同様の効果を期待した。SIS3非添加上皮細胞と比較し、SIS3添加群ではわずかに遊走能が亢進した。



(5) 続いてin vivoにおけるSIS3の創傷治癒促進・癒痕形成抑制能の効果を検証するため、6~8週齢の野生型マウスをネブタールにて麻酔後、尖刀メスを用いて上顎第一臼歯から上顎第三臼歯までの口蓋粘膜正中部に幅1.0 mmの間隔で切開・粘膜剥離し骨面を露出させた上で、同創傷部位にSIS3を添加した。H&E染色による形態組織学的観察より、創傷閉鎖部位における再上皮化、結合組織の修復促進が認められた。



(6) Smad3ノックアウトマウス口蓋創傷部位ではTGF-β1、MCP-1、MIP-1といった炎症関連因子の発現量低下が見られ、同マウス由来線維芽細胞でもTGF-β1刺激による炎症関連因子の発現上昇は認められない。そこで、SIS3によるTGF-β1シグナリングの遮断が同様の効果をもたらすかをreal-time PCR法ならびに免疫組織化学染色にて確認したところ、MCP-1の発現抑制、ならびに創傷治癒部における同因子の発現低下が認められた。



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

- ① 泰江章博、米田尚子、渡邊哲平、田中栄二、Effects of the inhibition of Smad3 phosphorylation on wound healing、国際歯科学研究学会日本部会、平成22年11月20日、北九州
- ② 泰江章博、米田尚子、渡邊哲平、田中栄二、Application of SIS3, a prospective drug, for wound repair acceleration、国際歯科学研究学会、平成22年3月17日、San Diego, Ca USA
- ③ 泰江章博、米田尚子、渡邊哲平、田中栄二、Smad3 遺伝子機能抑制が癒痕組織形成に及ぼす影響、日本矯正歯科学会、平成21年11月20日、横浜
- ④ 渡邊哲平、泰江章博、藤原慎視、田中栄二、Periostin Negatively Regulates Osteoblastic Differentiation in Human Periodontal Ligament Cells、Annual Meeting of IADR Japanese Division、平成21年9月24日、武漢・中国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泰江 章博 (YASUE AKIHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：80300046