

機関番号：16101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21592597
 研究課題名(和文) TGF- β /Smad3 シグナル経路を介した創傷治癒における癒痕形成抑制法の検討
 研究課題名(英文) Novel therapy to prevent scar formation in wound healing via TGF- β /Smad3 signaling pathway
 研究代表者
 田中 栄二 (TANAKA EIJI)
 徳島大学・大学院ヘルパティサイエンス研究部・教授
 研究者番号：40273693

研究成果の概要(和文)：口蓋の創傷治癒過程における癒痕形成抑制のメカニズムを遺伝子レベルで図ることを目的として実験を行い、以下の研究成果を得た。(1) Smad3ノックアウト(KO)マウス由来のfibrocyteにTGF- β 1を加えて、筋線維芽細胞に分化させた場合、Smad3シグナル経路が強く関与し、分化速度を有意に亢進した、(2) Smad3 KOマウスの口蓋粘膜に作成した創傷は、その治癒速度が野生型マウスと比較して有意に亢進し、創傷部の粘膜閉鎖が早期に生じることによって癒痕形成が抑えられた。以上の結果から、TGF- β /Smad3シグナル経路が創傷治癒過程においてきわめて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the role of TGF- β /Smad3 signaling in palatal wound healing using Smad3-deficient (Smad3^{-/-}) mice. Histological examination showed that wound closure was accelerated by promoting proliferation of epithelium and dermal cells in Smad3^{-/-} mice compared with wild-type (WT) mice. Macrophage/monocyte infiltration at wounded region in Smad3^{-/-} mice was decreased in parallel with the diminished production of TGF- β 1, MCP-1 and MIP-1 α compared with WT mice. Fibrocytes, expressing hematopoietic surface marker and fibroblast products, were recruited and produced α -smooth muscle actin in WT mice, but were not observed in Smad3^{-/-} mice. These results suggest that TGF- β /Smad3 signaling may play an important role in the regulation of palatal wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 ・ 矯正・小児歯科

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は日本人の約 500 人に 1 人の割合で発生する、最も頻度の高い先天異常の一つである。口蓋裂は口蓋突起の癒合不全により、口蓋に亀裂が生じた状態であり、生後 1 年 6 か月頃に口蓋形成術を行う。しかし、形成術による裂隙閉鎖後の創部はしばしば癒痕組織を生じ、その強い癒痕鈎縮に起因して上顎骨の成長が抑制される。特に口蓋の癒痕鈎縮は上顎歯列弓の狭窄の原因となり、それに伴って下顎前突、重篤な叢生など様々な不正咬合が惹起され、患者の咀嚼・発音機能が著しく障害されることも多い。これらの機能回復のため、長期間にわたる歯列矯正治療と言語治療が必要となる。口唇口蓋裂患者に対する矯正歯科治療は、その重要性から健康保険の適用となっているが、患者及びその家族にとって身体的及び精神的な負担は大きい。口蓋形成術後の癒痕形成の抑制・減少が可能になれば、上顎骨の患者固有の成長量が期待できる。しかし、口蓋における創傷治癒に関する分子レベルでの病態や、最良の治療法については未だ説明されておらず、分子レベルでの研究が急務と考えられる。

創傷治癒過程は、上皮細胞、間葉系細胞、炎症性細胞等の組織構成細胞間の相互作用が、様々な炎症性サイトカインや成長因子等によって、複雑に制御されている。これらの中で TGF- β は癒痕組織に特徴的な線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に関与することが知られており、癒痕形成のメカニズムを解明する上で最も重要な因子の一つと考えられる。我々は TGF- β の細胞内シグナル分子である Smad3 遺伝子の Exon 8 を欠失させた遺伝子改変マウス (KO マウス) を用いた研究により、このマウスにおけるエナメル質石灰化度の低下を見出し、世界で初めて報告した (BBRC)。このマウスの創傷治癒過程では、治癒速度の亢進と免疫機能の低下が認められるが、耳介においては解剖学的に matrix support が欠失しており、創傷治癒が遅延するという報告があり、解

剖学的な条件と創傷治癒の関連性が示唆されている。口蓋粘膜は組織学的に皮膚と大きく異なっており、また口蓋骨が強固な matrix support として存在するという特徴がある。しかし、これまでに口蓋粘膜の創傷治癒における TGF- β /Smad3 シグナル経路の役割に関する報告はなく、口蓋粘膜における創傷治癒については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

口蓋の創傷治癒過程における癒痕形成のメカニズムを解明と、その抑制を遺伝子レベルで図ることの可能性を開くことを目的に、TGF- β とその細胞内シグナル分子である Smad3 に着目して、以下の実験を行う。

- (1) マウス末梢血由来の fibrocyte の培養実験系を確立し、さらに Smad3 KO マウス由来の fibrocyte の解析を行う。
- (2) Smad3 を標的遺伝子とした iRNA 実験系を確立し、Smad3 を標的遺伝子とした iRNA が fibrocyte の増殖および分化及び影響について解析する。
- (3) Smad3 KO マウス由来の fibrocyte を野生型マウスの口蓋創傷部に移入し、治癒過程を解析することにより、癒痕形成の抑制について検討する。
- (4) Smad3 を標的遺伝子とした iRNA を導入した fibrocyte を野生型マウスの口蓋粘膜に移入し、治癒過程を解析することにより、癒痕形成の抑制について検討する。

3. 研究の方法

- (1) マウス末梢血 (PBMCs) 由来 fibrocyte 培養実験系の確立：新規細胞型として報告された fibrocyte は PBMCs から分離・培養が可能であり、そのマーカーとしてコラーゲンタイプ I と CD13 の二重染色法によって確認する。
- (2) Smad3 KO マウス由来 fibrocyte の *in vitro* における解析：Fibrocyte に TGF- β 1 を作用すると筋線維芽細胞に分

化することから、まずfibrocyteから筋線維芽細胞への分化にSmad3が関与するかどうかをK0マウス、野生型マウス由来のfibrocyteを用いて検討する。さらに、筋線維芽細胞に特徴的な α -smooth muscle actin (SMA) の発現をreal-timePCR法、抗 α -SMA抗体によるwestern blot法、細胞免疫染色法にて検討する。また、fibrocyteのコラーゲン三次元培養における収縮能をcollagen gel contraction assayにて検討する。

(3) Smad3を標的遺伝子としたRNAi実験系の確立: Smad3特異的siRNA発現ベクターを作製する。続いてRNAi実験系の陽性コントロールを確立するために、新生マウス由来筋線維芽細胞を用いてTGF- β 1による細胞応答に対するSmad3 siRNAの効果について検討する。

(4) Smad3を標的遺伝子としたRNAiがfibrocyteの増殖および分化に及ぼす影響: TGF- β 1による筋線維芽細胞への分化を α -SMAの発現を指標にしてreal-time定量PCR法、抗 α -SMA抗体によるwestern blot法、細胞免疫染色法にて検討する。

(5) Smad3 K0マウス由来fibrocyteの野生型マウスへの移入が創傷治癒に与える影響

① PKH-26 (membrane-inserting red dye)でラベルしたSmad3 K0マウス由来のfibrocyteを野生型マウス尾部静脈から移入し、直ちにマウス口蓋粘膜に創傷を作製して、治癒過程について形態組織学的に検討する。

② 創傷治癒組織に遊走したSmad3 K0マウス由来fibrocyteの確認をPKH-26の蛍光免疫染色により行う。

③ 口蓋粘膜創傷治癒後12日の切片において顕著な α -SMAの発現が野生型マウスにおいて認められることが、予備実験で明らかとなっていることから、Smad3 K0マウス由来fibrocyteの局在と α -SMAの発現細胞との関係をそれぞれの特異抗体を用いた蛍光二重染色に

よって検討する。

(6) Smad3 siRNAを導入したfibrocyteの野生型マウスへの移入が創傷治癒に与える影響

① Smad3 siRNAを導入したfibrocyteをPKH-26でラベルし、野生型マウス尾部静脈から移入する。移入後、直ちにマウス口蓋粘膜に創傷を作製して治癒過程について形態組織学的に検討する。

② 口蓋粘膜創傷治癒における瘢痕形成について α -SMAの免疫染色によって検討する。

4. 研究成果

口唇口蓋裂患者の上顎骨の劣成長の原因となる口蓋の創傷治癒過程における瘢痕形成のメカニズムの解明と、その抑制を遺伝子レベルで図ることを目的として、成長因子TGF- β とその細胞内シグナル分子であるSmad3に着目した実験を行った。結果として、

(1) マウス末梢血由来のfibrocyteの培養実験系を確立した。

(2) Smad3 K0マウス由来のfibrocyteにTGF- β 1を加えて、筋線維芽細胞に分化させた場合、Smad3シグナル経路が強く関与し、分化速度を有意に亢進した。三次元collagen gel contraction assayの結果ではSmad3 K0マウス由来のfibrocyteにTGF- β 1を添加するとコラーゲンゲルの収縮は起きるものの、野生型由来マウス由来の細胞と比較して、有意に収縮が抑制された。また、コラーゲンゲル中の α -SMAのmRNAならびにタンパクの発現を解析した結果、Smad3 K0マウス由来のfibrocyteにおける有意な発現抑制が認められた。したがって、Smad3をノックアウトすると α -SMAを発現する筋線維芽細胞による牽引力が抑制されることにより、瘢痕拘縮が生じにくくなることが示唆された。

(3) Smad3 K0マウスの口蓋粘膜に創傷を作成した場合、その治癒速度が野生型マウスと比較して有意に亢進し、創傷部の粘膜による閉鎖が早期に生じることによって瘢痕形成が抑えられた (Figure 1)。

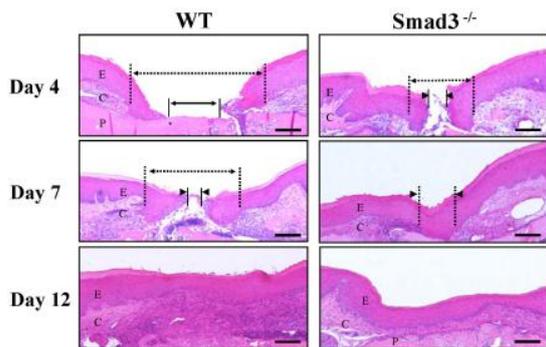


Figure 1. Histological analysis of palatal wounds in WT and *Smad3*^{-/-} mice. A palatal excisional wound of about 1.0-mm width was made in the hard palate. Histological sections were stained with H&E at the indicated time-points after wounding. Mucoepidermal wound width (EWW): the interepithelial gap is marked by solid arrows. Mucodermal wound width (DWW): the gap between the healing connective tissue is denoted by dotted arrows. E, epithelium; C, connective tissue; P, palatal bone. Bars = 100 μ m.

以上の結果から、TGF- β /Smad3シグナル経路が創傷治癒過程においてきわめて重要な役割を果たしていることが明らかとなったこと

(Jinno et al., 2009) より、Smad3を標的遺伝子としたsiRNA創薬が創傷の治癒促進効果および瘢痕形成抑制効果を有する優れた医療技術開発につながるものと考えられた。そこで、予備実験として口蓋裂患者の口唇形成および口蓋形成術後の治癒促進を想定し、野生型マウスの口蓋粘膜に創傷を作成し、Smad3をリン酸化の段階で抑制するSmad3リン酸化阻害剤 (SIS3) の口蓋粘膜への局所投与を行い、その創傷治癒促進効果と瘢痕形成抑制効果について検索した。その結果、SIS3を導入したマウスの口蓋創傷部では再上皮化・結合組織の有意な修復促進効果が認められた。さらに、Smad3 siRNAを口蓋粘膜創傷部に直接滴下する方法で、その修復促進効果もあわせて検討中である。

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 8 件)

1. Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa

Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S: Atelocollagen-mediated systemic applications of myostatin-targeting siRNA improve the muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice. *Development, Growth and Differentiation*, in press. (査読有り)

2. Nakajima A, Tanaka E, Ito Y, Maeno M, Iwata K, Shimizu N, Shuler CF: The expression of TGF- β 3 for epithelial-mesenchyme transdifferentiated MEE in palatogenesis. *Journal of Molecular Histology* 41(6): 343-355, 2010. (査読有り)

3. Tomita Y, Kuroda S, Nakanishi H, Tanaka E: Severity of alveolar cleft affects prognosis of infant orthopedics in complete unilateral cleft lip and palate: Three-dimensional evaluation from chieloplasty to palatoplasty. *Journal of Craniofacial Surgery* 21(5): 1503-1507, 2010. (査読有り)

4. Kondo Y, Takahashi T, Oba Y, Kuroda S, Tanaka E, Moriyama K: Blood flow distribution of repaired lip in cleft lip patients. *Angle Orthodontist* 77(11): 1408-1415, 2009. (査読有り)

5. Jinno K, Takahashi T, Tsuchida K, Tanaka E, Moriyama K: Acceleration of palatal wound healing in *Smad3*-deficient mice. *Journal of Dental Research* 88(8):739-748, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. Nakajima A, Ito Y, Tanaka E, Iwata K, Maeno M, Shimizu N, Shuler C. The functional role of T β R-II and III during palatal fusion. 89th IADR, 16-19th March, 2011, San Diego, CA, USA.

2. Yasue A, Yoneda N, Watanabe T, Tanaka E: Application of SIS3, a prospective drug, for wound repair acceleration. 89th IADR, 16-19th March, 2011, San Diego, CA, USA.

3. Yasue A, Yoneda N, Watanabe T, Tanaka E: Effects of the inhibition of Smad3 phosphorylation on wound healing. 58th Annual Meeting of JADR, Nov. 20-21, 2010, 北九州.

4. Kinouchi N, Kawakami E, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S.

Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin siRNA improves muscular dystrophy. 88th IADR, July 14-17th, 2010, Barcelona, Spain.

〔図書〕(計 1 件)

1. 富田優子、田中栄二(2010) : Blood Flow Distribution of Repaired Lip in Cleft Lip Patients (口唇裂患者の形成術後の口唇における血流分布にかかわる研究). 別冊 the Quintessence 臨床家のための矯正 YEAR BOOK' 10, 症例から学ぶ矯正臨床の楽しさ (伊藤学而、中嶋榮一郎、榎宏太郎、斎藤 功、市川和博編). クインテッセンス出版株式会社, 東京, pp133.

〔受賞〕(計 3 件)

1. Yasue A, Yoneda N, Watanabe T, Tanaka E: Effects of the inhibition of Smad3 phosphorylation on wound healing. 2010 年度 Japanese Associate for Dental Research, 平成 22 年 11 月 20 日、学術奨励賞.
2. 川上恵実、木内奈央、足立太郎、中村彩花、川合暢彦、田中栄二、野地澄晴 : 特殊加工コラーゲンを単体としたマイオスタチン siRNA 投与による骨格筋量調節法の研究. 第 69 回日本矯正歯科学会大会、平成 22 年 9 月 27-29 日、優秀発表賞.
3. 川上恵実、木内奈央、田中栄二、野地澄晴 : 慢性筋委縮疾患制圧を目指した RNA 干渉法を利用した咀嚼筋量制御法の開発研究. 先端歯学スクール 2009、平成 21 年 8 月 27-28 日、優秀発表賞.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 栄二 (TANAKA EIJI)
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号 : 4 0 2 7 3 6 9 3

(2) 研究分担者

木内 奈央 (KINOUCHI NAO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号 : 3 0 4 5 7 3 2 9

川合 暢彦 (KAWAI NOBUHIKO)

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 : 4 0 4 3 7 5 8 8

日浅 雅博 (HIASA MASAHIRO)

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 : 9 0 5 1 1 3 3 7

富田 優子 (TOMITA YUKO)

徳島大学・病院・医員

研究者番号 : 7 0 3 8 0 0 9 5

(3) 連携研究者

なし