

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：16101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792432
 研究課題名（和文）Smad3 タンパク質リン酸化を標的とした創傷治癒促進・瘢痕形成抑制術の開発
 研究課題名（英文）Development of the method promoting wound healing and inhibiting scar formation via targeting Smad3 protein phosphorylation
 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：80380046

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瘢痕組織はその強い瘢痕鉤縮により、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・瘢痕形成抑制が認められる。本課題では、RNAi法による Smad3 遺伝子発現抑制の口蓋創傷治癒過程に及ぼす影響を調べた結果、炎症関連因子の発現低下を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 the inhibition of Smad3 gene expression 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
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、瘢痕形成抑制

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

の瘢痕組織はその強い瘢痕鉤縮により、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発現抑制を *in vivo* において実現させれば、矯正歯科臨床のみならず医療分野に広く応用可能となる。

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り、手法としては RNAi 法を *in vivo* にて適用するもので、デリバリーとしては Pluronic gel を用いた。癒痕形成抑制過程における分子メカニズムを解明することで、臨床応用へ繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*における Smad3 siRNA の導入：マウス口蓋粘膜正中部に作製した創部に Smad3 siRNA を Pluronic gel をデリバリーとして塗布後、36時間経過した後、周囲組織を回収し、リアルタイム RT-PCR 法にて Smad3 遺伝子発現を評価・定量した。

(2) 創傷治癒過程における炎症関連因子の発現に関する検討：生体マウス口蓋に創傷を作製し、Smad3 siRNA 投与3日後のマウス口蓋粘膜創部周囲組織における TGF- β 1、MCP-1、MIP-1 α といった炎症関連因子の解析をリアルタイム RT-PCR 法にて評価・定量した。

(3) 創傷治癒過程における癒痕形成に関する因子の発現に関する検討：生体マウス口蓋に創傷を作製し、マウス口蓋粘膜創部周囲組織において、Smad3 siRNA 投与3日後の α -SMA の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて、また、12日後にウエスタンブロット法にて発現解析を行った。

(4) 創傷治癒過程における線維化関連因子の発現に関する検討：生体マウス口蓋に創傷を作製し、マウス口蓋粘膜創部周囲組織において、Smad3 siRNA 投与3日後に Type I Collagen と Fibronectin の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて、また、12日後にウエスタンブロット法にて発現解析を行った。

4. 研究成果

Smad3 遺伝子発現の局所阻害による創傷治癒促進・癒痕形成抑制法の確立を目的として、Smad3 をターゲット遺伝子とした RNA 干渉法による局所阻害を行うことで、その効果の検証を行った。その結果を以下に示す。

(1) Smad3 siRNA を導入した口蓋では、コントロールと比較して Smad3 遺伝子の有意な発現低下を認めた。また、創傷治癒組織の HE 染色像から、創傷作製3日後における Smad3 siRNA 塗布群の創部閉鎖は優位に促進していた。

(2) TGF- β 1、MCP-1、MIP-1 α といった炎症関連因子は、Smad3 siRNA 塗布群においてコントロールと比較し、有意にその発現量が低下していた。

(3) 癒痕形成に関する α -SMA の発現は、RNA、タンパクレベルとも、Smad3 siRNA 添加群において、有意にその発現量が低下していた。

(4) Smad3 siRNA を添加したマウスの口蓋粘膜創傷部では、線維化関連因子である Type I Collagen ならびに Fibronectin の発現抑制が、RNA、タンパク両レベルにおいて認められた。

以上より、Pluronic gel をデリバリーとした RNA 干渉法による Smad3 遺伝子発現抑制は、口蓋の創傷治癒促進・瘢痕形成抑制に有効であり、RNA 干渉医薬応用の可能性が示唆された。

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3件)

- ① Yoneda N, Yasue A, Watanabe T, Tanaka E.
Down-regulation of Smad3 Accelerates Palatal Wound Repair.
Journal of Dental Research. 査読有、
2013 in press
DOI: 10.1177/0022034513491575
- ② Watanabe T, Yasue A, Fujihara S, Tanaka E.
PEROSTIN regulates MMP-2 expression via the $\alpha v \beta 3$ integrin/ERK pathway in human periodontal ligament cells.
Archive of Oral Biology. 査読有、57(1)、
2012、52-59
DOI:10.1016/j.archoralbio.2011.07.010
- ③ Watanabe T, Yasue A, Tanaka E.
Inhibition of Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)/ Smad3 Signaling Decreases Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Stability by Inducing Prolyl Hydroxylase 2 (PHD2) Expression in Human Periodontal Ligament Cells.

Journal of Periodontology, 査読有、2012
in press
DOI: 10.1902/jop.2012.120373

[学会発表] (計7件)

- ① 米田尚子、泰江章博、渡邊哲平、田中栄二：Smad3 遺伝子抑制が瘢痕組織形成に及ぼす影響。第36回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2012.12.24-25、国立京都国際会館（京都市）
- ② Takeda C, Yasue A, Yoneda N, Watanabe T, Tanaka E. Inhibitory effects of Smad3 phosphorylation on wound repair. 第60回 JADR 2012.12.14-15、朱鷺メッセ（新潟市）
- ③ Mitsui SN, Yasue A, Watanabe K, Horiuchi S, Tanaka E. Candidate gene analysis in patients with tooth agenesis. 第60回 JADR 2012.12.14-15、朱鷺メッセ（新潟市）
- ④ Yoneda N, Yasue A, Tanaka E. Effects of Smad3 gene inhibition on scar formation. ASEAN plus and Tokushima Joint International Conference, Dec 7-9, 2012, Ambarrukmo Royal Hotel, Yogyakarta, Indonesia.
- ⑤ 米田尚子、泰江章博、渡邊哲平、三井なおみ、田中栄二：核酸医薬からの瘢痕組織形成抑制アプローチ。第71回日本矯正歯科学会大会、2012.9.26-28、盛岡市アイスアリーナ（盛岡市）
- ⑥ Mitsui SN, Yasue A, Watanabe K, Watanabe T, Yoneda N, Horiuchi S, Tanaka E.: Msx1 gene analysis in non-syndromic tooth agenesis. 第71回日本矯正歯科学会大会、2012.9.26-28、

盛岡市アイスアリーナ（盛岡市）

- ⑦ 渡邊哲平、泰江章博、米田尚子、田中栄二：Smad3 リン酸化抑制は PHD2 発現を誘導し HIF-1 α の分解を促進する．第 71 回日本矯正歯科学会大会、2012.9 26-28、盛岡市アイスアリーナ（盛岡市）

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：80380046

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

