

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11253

研究課題名(和文) 創傷治癒不全および難治性口内炎に対する新規治癒促進剤としてのレプチンの挑戦

研究課題名(英文) Challenge of leptin as new healing accelerant for wound healing and intractable stomatitis

研究代表者

工藤 景子 (KUDOH, Keiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：70380029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：レプチンによる創傷治癒あるいは抜歯窩などの治癒促進効果を検討した。その結果、(1)マウス皮膚創傷部位の線維芽細胞にレプチンが局在すること、(2)マウス線維芽細胞の増殖をレプチンが軽度促進すること、(3)ob/obマウス(レプチン欠損マウス)では野生型と比較して皮膚創傷治癒や抜歯窩の治癒が軽度遅延することを確認できた。以上より、レプチンが創傷治癒や抜歯窩の治癒促進効果を持つ可能性が示唆できた。しかし、ob/obマウスにレプチンを添加した実験系において創傷治癒や抜歯窩の治癒促進を有意には認められなかった。

研究成果の概要(英文)：This research was carried out to examine the healing promotion effects such as wound healing with the leptin or the extraction socket. As a result, (1) leptin was detected in fibroblasts of mouse skin wound healing, (2) leptin promoted mouse fibroblasts, and (3) skin wound healing and healing of extraction tooth socket delayed slightness in comparison with a wild type with the leptin-deficient (ob/ob) mouse. Leptin was able to suggest possibility with wound healing and a healing of extraction tooth socket promotion effect, but wound healing and healing of extraction tooth socket promotion were not significantly accepted in the experiment that added leptin in ob/ob mouse.

研究分野：口腔外科

キーワード：レプチン 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者において、血糖コントロール不良状態で手術を行った場合、創傷治癒不全や創の感染を起こす可能性が高いことは、臨床的にも実験的にも証明されている(日口外誌 39,898-903,1993、歯科学報 8,793-822,1989)。口腔外科臨床の現場においても、糖尿病患者の歯性感染症の重篤症例や外科処置後の易感染症例など治療に苦慮するケースも少なくない。創傷治癒促進剤の研究は、国内外で数多く行われており、bFGF(basic Fibroblast Growth Factor)製剤(フィブラストスプレー[®])が開発され、既に製品化されている。しかし、糖尿病患者における創傷治癒不全に特化した薬剤は未だ存在しない。

申請者は、自身の過去の研究よりレプチン(leptin)というホルモンに着目した。レプチンは、1994年 Zhangらにより、遺伝性肥満マウス(*ob/ob* マウス)の原因遺伝子として単離・同定された。語源はギリシア語で「痩せている」を意味する“leptos”に由来する。レプチンは主に白色脂肪細胞から分泌され、血液脳関門を通過し、視床下部に存在するレプチン受容体を介した糖・脂質代謝の促進、摂食抑制、エネルギー消費亢進などの体重増加抑制作用を示す。そのため、レプチンの欠損する *ob/ob* マウスは糖尿病を発症することが有名である。

一方レプチンが胎盤、胎児の骨・軟骨、骨格筋など脂肪組織以外からも産生・分泌され、造血機能や生殖機能に影響を与えるなど、肥満抑制作用以外にも多彩な作用を示すことも知られている。さらに申請者は、レプチンが末梢の血管新生を促進することで骨成長や骨折治癒を促進することを報告してきた(J Histochem Cytochem. 50:159-169,2002、臨整外 38,60-63,2003)。即ち、局所において軟骨細胞により産生されたレプチンが、パラクライン因子として強力な血管新生作用を発揮し、骨の成長や骨折治癒に対して促進

的役割を果たすということを示したものである。レプチンの血管新生作用は、図1に示すように、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)に匹敵することを申請者は明らかにしている。皮膚や口腔粘膜などの軟組織の創傷治癒においても血管新生は重要な役割を果たしている。そこで、これら組織の治癒過程にもレプチンが関与している可能性が考えられ、創傷治癒におけるレプチンの役割を解明するという発想に至った。

ob/ob マウスは、前述のように糖尿病病態モデルでもあり、本研究ではこれを用いて皮膚欠損創を作製し、その治癒過程におけるレプチンの関わりを検討する(*ob/ob* マウスにおける創傷治癒期間が野生型と比較して遅延すると我々は予測しているため、検討する。)また、口腔外科領域においては抜歯窩治癒不全の改善も重要な課題である。マウス抜歯窩創におけるレプチンの治癒促進効果も検討する。

さらに、糖尿病モデルのみならず、日常臨床で治療に苦慮している抗がん剤などの有害事象として生じる難治性口内炎へのレプチンの有効性も検討する。我々は、既に口腔粘膜治癒遅延モデル(Fujisawaら, J Oral Pathol Med. 32:358-366, 2003)の作製法を確立している。このモデルでは、均一な形・大きさおよび深さの粘膜炎を作製できるため、治癒過程の客観的評価が可能である。また、治癒過程に再現性があるため、レプチンによる治癒促進効果を図るには、有用なモデルである。

本研究により、糖尿病患者の創傷治癒不全や抜歯窩治癒不全、あるいはがん化学療法などによって惹起される難治性口内炎などに対する新しい治癒促進療法の開発に繋がると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、まず、糖尿病患者の創傷治癒不全・抜歯窩治癒不全に対するレプチンの治癒促進効果および創傷治癒における線維芽細胞や血管新生に対するレプチンの影響を検討する。これにより創傷治癒過程・抜歯窩治癒過程におけるレプチンの有効性の検討だけでなく、作用メカニズム解明も目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚創傷部位のレプチンおよびレプチン受容体の局在の検索

(工藤景、宮本、工藤隆)

ICR 雄性 6~8 週齢のマウスを用いる。ペントバルビタール麻酔下、マウス背部を除毛剤にて剃毛し、デルマパンチ® (径 5mm) を用いて直径 5mm の皮膚全層欠損創を作製する。

創傷作製 3、7、10 および 14 日後に創傷面積を NIH image を用いて測定する。また、免疫組織化学的にレプチンおよびレプチン受容体の局在、発現量を検出・定量する。発現量については、NIH image を用い、経時的なレプチンの発現量の変化を確認する。

(2) 皮膚線維芽細胞増殖能に対するレプチンの影響の検討 (工藤景、玉谷)

ICR 雄性 8 週齢マウスの皮膚線維芽細胞を初代培養する。各種濃度 (0、0.1、1、10、100 ng/ml) のレプチンを培地に添加し、マウス皮膚線維芽細胞の増殖への影響を検討する (MTT アッセイにて評価する)。

(3) 皮膚線維芽細胞のサイトカイン分泌に対するレプチンの影響 (工藤景、高丸)

各種濃度 (0、0.1、1、10、100 ng/ml) のレプチンをセミコンフルエントに達したマウス皮膚線維芽細胞 (2) に添加し、分泌する Vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor (TGF)-1、interleukin-1 (IL-1)、

epidermal growth factor (EGF)、TGF-、basic fibroblast growth factor (bFGF)、tumor necrosis factor (TNF)-、interferon (IFN)- の分泌に対する影響を検討する (ELISA にて測定)。

(4) *ob/ob* マウスにおける皮膚創傷治癒の過程を野生型マウスと比較検討 (工藤景、藤澤)

各種マウス (*ob/ob* マウス、野生型マウス) 雄性 6~8 週齢を用いる。ペントバルビタール麻酔下、マウス背部を除毛剤にて剃毛し、デルマパンチ® (径 5mm) を用いて直径 5mm の皮膚全層欠損創を作製。創傷作製 3、7、10 および 14 日後に創傷面積を NIH image を用いて測定し、*ob/ob* マウスと野生型マウスにおいて治癒過程に差があるか、比較検討する。

(5) *ob/ob* マウスの皮膚創傷治癒に対するレプチンの影響 (工藤景、玉谷)

ob/ob マウスの背部皮膚に皮膚欠損創を作製し、100ng/ml レプチン添加白色ワセリンまたはレプチン無添加白色ワセリンを創部に外用塗布を行ったマウスにおいて、創傷作製 3、7、10 および 14 日後に創傷面積を NIH image を用いて測定する。

さらに、血管新生の程度を免疫組織化学的に検討する。創部血管新生の免疫組織化学的解析に血管内皮特異的マーカーである CD31 染色を用いる。染色された面積を NIH image により測定、比較する。

(6) *ob/ob* マウスの皮膚創傷治癒に対するレプチンの影響 (工藤景、玉谷)

(4) に記したように、*ob/ob* マウスの背部皮膚に皮膚欠損創を作製し、100ng/ml レプチン添加白色ワセリンまたはレプチン無添加白色ワセリンを創部に外用塗布を行ったマウスにおいて、創傷作製 3、7、10 および 14 日後に創傷面積を NIH image を用いて測定す

る。

さらに、血管新生の程度を免疫組織化学的に検討する。創部血管新生の免疫組織化学的解析に血管内皮特異的マーカーである CD31 染色を用いる。染色された面積を NIH image により測定、比較する。

(7) *ob/ob* マウスにおける抜歯窩の治癒過程を野生型マウスと比較検討(工藤景、工藤隆)

各種マウス(*ob/ob* マウス、野生型マウス) 雄性 6~8 週齢を用いる。ペントバルビタール麻酔下、歯科用拡大鏡(サージテル、General Scientific 社)を装着し、耳小骨鉗子を使用して、それぞれのマウスの右側第 1 臼歯を抜歯する。

抜歯窩治癒過程を、組織学的にも比較検討するが、皮膚欠損創のように企画されたサイズ(皮膚欠損創は径 5mm の創部作製により開始)ではないため、治癒過程の差に苦慮することも考えられる。これについては、徳島大学の現有設備である動物用 PET/CT を用いて検索する予定にしている。創傷作製 3、7、10 および 14 日後に動物用 PET/CT を用いて撮影し、SUV 値(standardized uptake value)の比較により治癒過程の差を比較検討する。

(8) *ob/ob* マウスの抜歯窩の治癒に対するレプチンの影響(工藤景、工藤隆、玉谷)
(6) に記したように、*ob/ob* マウスの右側第 1 臼歯を抜歯し、抜歯窩に 100ng/ml レプチン添加白色ワセリンまたはレプチン無添加白色ワセリンを外用塗布(抜歯時、3、7 および 10 日後)。抜歯後 3、7、10 および 14 日後に抜歯窩治癒過程を動物用 PET/CT を用いて撮影し、SUV 値の比較により治癒過程の差を比較検討する。また、抜歯後 3、7、10 および 14 日後の組織を用いて血管新生の程度を免疫組織化学的に検討する。抜歯窩血管新生の免疫組織化学的解析に血管内皮特異

的マーカーである CD31 染色を用いる。染色された面積を NIH image により測定、比較する。

4. 研究結果

(1) マウス皮膚創傷部位のレプチンおよびレプチン受容体の局在の検索

3 日目(径 2.83mm)、7 日目(径 1.16mm)、10 日目以降は治癒し欠損創として測定不能。抗レプチン抗体を用いた免疫組織化学的検索を行ったところ、線維芽細胞を中心に、染色された像を認めた(図 1)。

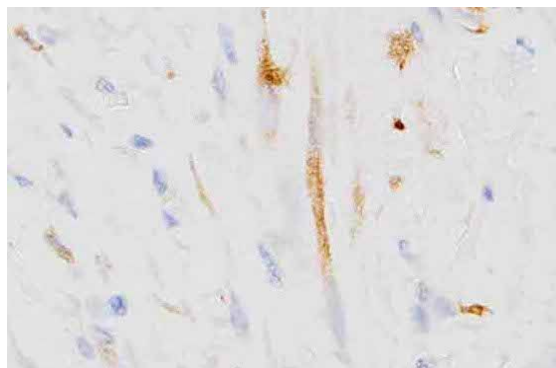


図 1 : 免疫染色 (抗レプチン抗体)

(2) 皮膚線維芽細胞増殖能に対するレプチンの影響の検討

有意差は得られていないが、濃度依存的に細胞増殖傾向を認めた。

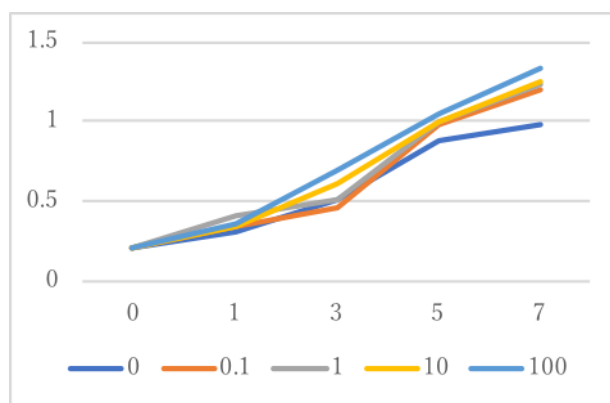


図 2 : 線維芽細胞の増殖曲線 (レプチン添加 (ng/mL))

(3) 皮膚線維芽細胞のサイトカイン分泌に対するレプチンの影響

VEGF, EGF については、レプチン濃度依存的に増加傾向を認めた。

(4) ob/ob マウスにおける皮膚創傷治癒の過程を野生型マウスと比較検討

野生型では創傷作製7日目には欠損創は収縮治癒してきていた。ob/ob マウスでは、少し遅延傾向があったものの10日目には欠損創は収縮治癒してきていた。

(5) ob/ob マウスの皮膚創傷治癒に対するレプチンの影響

レプチン添加ワセリン群とレプチン無添加群では、有意な治癒時期の変化は見られなかった。

(6) ob/ob マウスの皮膚創傷治癒に対するレプチンの影響

野生型はレプチン添加群と無添加群では、有意な治癒時期の変化は見られなかった。ob/ob マウスにおいてレプチン添加群と無添加群では、レプチン添加群の方が、創傷治癒面積の縮小が少し早い傾向があった。(ただし、統計的な有意差はなし。)

(7) ob/ob マウスにおける抜歯窩の治癒過程を野生型マウスと比較検討

野生型では、約3週間で抜歯窩の器質化が終了し上皮化していたが、ob/ob マウスにおいては約1週間の遅れがみられた。

(8) ob/ob マウスの抜歯窩の治癒に対するレプチンの影響

野生型および ob/ob マウスともにはレプチン添加ワセリン群とレプチン無添加群では、有意な治癒時期の変化は見られなかった。ただし、有意差はないものの、レプチン添加群の方が少し治癒が早くなる傾向が認められた。

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1件)

Keiko Kudoh, Takaharu Kudoh, Kanji Tsuru, Youji Miyamoto, A case of tophaceous pseudo gout of the temporomandibular joint extending to the base of the skull, Int. J. Maxillofac. Surg. 査読有, 46, 2017, 355-359.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2016.08.018>

〔学会発表〕(計1件)

工藤景子、玉谷哲也、山村佳子、高丸菜都美、大江剛、工藤隆治、高橋章、藤澤健司、横田美保、鎌田久美子、宮本洋二、当科における扁平苔癬症例の臨床的検討、第20回歯科人間ドック学会、2017年12月10日、鶴見大学会館(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 景子 (KUDOH, Keiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：70380029

(2) 研究分担者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：20200214

工藤 隆治 (KUDOH, Takaharu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：10263865

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：30274236

藤澤 健司 (FUJISAWA, Kenji)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：40228979

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：40513031