

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18592177  
 研究課題名（和文） 口腔粘膜ケラチノサイトの細胞代謝と分化が創部上皮化に与える影響  
 研究課題名（英文） The effect of cellular metabolism and differentiation of oral mucosa  
 On the epithelization after injury  
 研究代表者  
 尾島 泰公 (OJIMA YASUTAKA)  
 神戸大学 医学部附属病院 医員  
 研究者番号：40403240

研究成果の概要：口腔粘膜の上皮化機構に注目し、口腔粘膜ケラチノサイトそのものの細胞生物学的特性を表皮ケラチノサイトと比較するという新しい観点から、口腔粘膜における創傷治癒についてアプローチした。口腔粘膜の低分化性、パルミチン酸の構成比の比較結果および GLUT1 タンパクおよび mRNA、グリコーゲンの局在領域より、皮膚に比較して口腔粘膜はより活発にエネルギー代謝を行っていると考えられる。このことより、皮膚に比較した「口腔粘膜の易創傷治癒性」の一側面を解明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	800000	0	800000
2007 年度	800000	240000	1040000
2008 年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
総計	2400000	480000	2880000

研究分野：歯学薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：創傷治癒 幹細胞 口腔粘膜 グルコース代謝

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、口腔粘膜の「傷の治りやすさ」や「瘢痕を作りにくい」ことに関する研究は、口腔内の湿潤環境からのアプローチや粘膜下組織における HGF1 やそのレセプターである c-Met からのアプローチ以外は報告がな

った。われわれは口腔粘膜の上皮化機構に注目し、口腔粘膜ケラチノサイトそのものの細胞生物学的特性を表皮ケラチノサイトと比較するという新しい観点から、口腔粘膜における創傷治癒についてアプローチすることを考えた。皮膚における上皮化のメカニズム

については、すでに結論が得られている。すなわち、表皮が傷害を受けると毛包細胞が急激に増殖し表皮に遊走して上皮が再生する、創縁の表皮細胞が活動をはじめ、という二つの上皮化機構が働いている。皮膚においては、創縁からの上皮化よりもこの毛包からの上皮化のほうが圧倒的に優位であることもすでに解明されている。毛包のバルジ領域の細胞には脂肪酸の一種であるパルミチン酸が多量に含まれ、同時に上皮系 stem cell が存在していることが明らかとなっている。stem cell はこのパルミチン酸を用い、静的環境では毛髪や脂腺へと分化している、皮膚が傷害を受けるなどの動的環境ではその分化の方向を皮膚表皮へと転換させ、損傷部を上皮化へと導く。

細胞膜を構成する脂肪酸の中で、このパルミチン酸は表皮細胞のみならずあらゆる細胞の細胞膜を構成する基本単位である。グルコースはまず glucose transporter 1(以下 GLUT1)によって細胞内に取り込まれ、解糖系やペントースリン酸経路を通してパルミチン酸に変換される。そしてこのパルミチン酸からまず他の飽和脂肪酸が生成され、それらを基にして単不飽和脂肪酸が生成される。また、グルコースは別の経路によってグリコーゲンとなり一時的に細胞内に貯蔵される。すなわち、ケラチノサイトにおいてパルミチン酸とグリコーゲンがエネルギー代謝の基本単位であるといえる。

## 2. 研究の目的

口腔粘膜は皮膚に比較して創傷治癒が早く、癒痕を形成しにくい。皮膚とは角化様式や付属器の有無等で大きく異なる口腔粘膜での上皮ケラチノサイトにおけるエネルギー代謝をパルミチン酸の貯蔵領域および GLUT1 の局在領域から細胞生物学的に検討し、口腔粘膜の皮膚に比較した「易創傷治癒性」を解明

することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)、患者の口腔内から採取した組織片を約7時間0.05% Trypsin溶液に浸漬し、機械的にケラチノサイト成分のみを採取した。得られた細胞を Human Keratinocyte Growth Supplement-V2 (HKGS-2) 添加の EpiLife® Medium (M-EPI-500-CA; Cascade Biologics, Portland, OP, USA) を使用し、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。培養細胞が confluent になった場合、継代を行った。

(2)、皮膚表皮と口腔粘膜上皮のケラチノサイトの細胞生物学的相違の検討として、まずパルミチン酸構成比を比較した。正常口腔粘膜および皮膚から直接ケラチノサイトを採取し in vivo として実験に使用した。採取した検体を0.05% Trypsin液中に約7時間浸漬した後、組織片からケラチノサイト成分のみを機械的に擦過・剥離した。得られたサンプルはホモジナイズした後、Folch法に従い脂質を抽出し、クロロホルム、メタノールおよび氷酢酸混合液を展開液として用いて薄層クロマトグラフィー(TLC)によりリン脂質(細胞膜)分画を採取し、ガスクロマトグラフィーで同定可能であった7種類の脂肪酸(ミリスチン酸(14:0)、パルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、パルミトオレイン酸(16:1)、オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)、アラキドン酸(20:4))の構成比を求めた。

(3)、グルコースを上皮細胞へ運び込むためのトランスポーターである GLUT 1 発現の皮膚表皮、口腔粘膜上皮間での比較とグリコーゲン含有細胞の局在について検討。GLUT1 mRNA 発現は RT-PCR 法で、タンパクは Western blot 法を用いて検討し、さらに検体を 4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、5 ミクロンの切片を作成しヘマトキシ

リンエオジン(HE)染色を行った。免疫染色は切片をPK処理後、抗ウサギ GLUT-1 抗体 (AB1340, Chemicon International, Temecula, CA, USA), 用いて通常のABC法にて免疫染色を行い、その発現部位を比較検討した。また、PAS染色およびジアスターゼPAS染色を用い、グリコーゲンの局在についても検討した。

#### 4. 研究成果

(1), 正角化である皮膚表皮に比較して非角化の頬粘膜上皮や錯角化を示す歯肉上皮ではパルミチン酸(16:0)の構成比が有意に高いことが明らかとなった。これは培養ケラチノサイトでも同様の結果を示した。上皮細胞層の違いによるパルミチン酸構成比の相違を明らかにする目的で、皮膚表皮と歯肉上皮を基底層と傍基底層のケラチノサイトにわけ、脂肪酸を解析したところ、歯肉上皮では、皮膚表皮に比較し、パルミチン酸構成比の高いケラチノサイトが上皮層全体に分布することが明らかとなった。また、必須脂肪酸(リノール酸(18:2)+アラキドン酸(20:4))の組成を *in vivo* と *in vitro* で比較すると、表皮、歯肉とも培養細胞において有意に低かった。(図2) 必須脂肪酸(リノール酸(18:2)+アラキドン酸(20:4))のケラチノサイト間で比較すると、表皮(正角化)に比較し、頬粘膜(非角化)や歯肉(錯角化)では必須脂肪酸の構成比が有意に低かった。皮膚表皮に比較して口腔粘膜ケラチノサイトがパルミチン酸を過剰に有すること、歯肉上皮では皮膚表皮に比較してパルミチン酸構成比の高いケラチノサイトが上皮全体に分布することがわかった。細胞膜を構成する基本単位であり、細胞形成の重要なエネルギー供給源であるパルミチン酸が皮膚に比較し口腔粘膜に有意に多く、さらに上皮細胞層間の差がなく同率に分布しているということ

は、口腔粘膜がより活発にグルコース代謝を営んでいるということであると考えられた。

(2), GLUT-1 陽性細胞の分布は、表皮では毛包のバルジ領域と基底層のみであったのに対し、歯肉ではほぼ有棘層全体でその発現が認められ、特に、上皮化組織乳頭部基底層に最も強い発現が確認された。しかし、その発現は細胞分化に伴い弱くなっていた。頬粘膜では、有棘層全体にその発現が確認され、その範囲は歯肉よりも広範であった。人工口腔粘膜では重層化したケラチノサイト全体に発現が認められた。

このようにグルコース・トランスポーターである GLUT1 陽性細胞の分布は、表皮では基底層のみであったのに対し、口腔粘膜では有棘層全体で観察された。

頬粘膜では、有棘層上層の分化亢進細胞で PAS 陽性が確認され、ジアスターゼ消化によりグリコーゲンであることが証明された。歯肉でも同様に有棘層上層の分化亢進細胞の広い範囲でグリコーゲンが確認された。皮膚ではグリコーゲンは確認されなかった。

Western blot 法を用いた実験では、頬粘膜基底層には強い GLUT1 タンパクの発現が認められたが、頬粘膜傍基底層および表皮では認められなかった。

RT-PCR法を用いた実験では皮膚基底層および頬粘膜傍基底層に強い GLUT1 mRNA の発現が認められ、皮膚傍基底層および頬粘膜基底層では弱い発現が認められた。

口腔粘膜上皮は皮膚表皮に比較して広い範囲でグルコース代謝が活発であると考えられた。また、細胞分化の亢進に従いグルコース代謝が低くなり、グリコーゲン陽性細胞の増加が認められたことから、有棘層上方の非分裂細胞では代謝に不必要なエネルギーをグリコーゲンとして貯蔵し、創傷時の動的活動に

おけるエネルギーに使用すると推察された。  
また、口腔粘膜上皮では皮膚表皮に比較して有棘層が極めて厚いことから、より創傷治癒に有利な環境であると考えられた。

現在、重度熱傷の治療には培養皮膚移植が主に用いられているが、皮膚よりも創傷治癒に有利な培養口腔粘膜を移植した方がより早期の治癒が期待できることを示唆している。

## 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 1 件)

(1) Kuroki S, Yokoo S, Terashi H, Komori T. Epithelialization in oral mucous wound healing in terms of energy metabolism. Kobe J Med Sci (in press) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) 黒木信祐, 横尾 聡, 高田直樹, 堀田武司, 尾島泰公, 寺師浩人, 古森孝英. エネルギー代謝と細胞分化からみた口腔粘膜創傷治癒における上皮化機構. 第 52 回日本口腔外科学会総会, 2007 年 9 月 29-30 日, 名古屋.

(2) 黒木信祐, 横尾 聡, 高田直樹, 二村祥子, 堀田武司, 尾島泰公, 寺師浩人, 古森孝英. エネルギー代謝からみた口腔粘膜創傷治癒における上皮化機構—口腔粘膜上皮のグルコース代謝・脂肪酸代謝と細胞分化との関係—. 第 17 回日本口腔粘膜学会総会, 2007 年 7 月 5-6 日, 東京.

(3) 黒木信祐, 横尾 聡, 高田直樹, 二村祥子, 堀田武司, 尾島泰公, 寺師浩人, 古森孝英. エネルギー代謝からみた口腔粘膜創傷治癒における上皮化機構—口腔粘膜上皮のグルコース代謝・脂肪酸代謝と細胞分化との関係

—. 第 61 回日本口腔科学会学術集会, 2007 年 4 月 19-20 日, 神戸

(4) 黒木信祐, 横尾 聡, 二村祥子, 井上玲奈, 宮村 篤, 森山健太郎, 堀田武司, 尾島泰公, 寺師浩人, 古森孝英. エネルギー代謝からみた口腔粘膜創傷治癒における上皮化機構. —口腔粘膜上皮のグルコース代謝・脂肪酸代謝と細胞分化との関係—. 第 51 回日本口腔外科学会総会, 2006 年 10 月 12 日, 13 日, 小倉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾島 泰公 (OJIMA YASUTAKA)  
神戸大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 40403240

### (2) 研究分担者

横尾 聡 (YOKOO SATOSHI)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 00322206  
古森 孝英 (KOMORI TAKAHIDE)  
神戸大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 50251294  
寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)  
神戸大学・医学部附属病院・助教授  
研究者番号: 80217421  
梅田 正博 (UMEDA MASAHIRO)  
神戸大学・大学院医学系研究科・助教授  
研究者番号: 60301280

### (3) 連携研究者