

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20569

研究課題名(和文)皮膚・口腔粘膜の創傷治癒促進薬としてのメトレレプチンの可能性

研究課題名(英文)Methleleptin promotes wound healing in the skin and oral mucosa

研究代表者

井出 信次 (IDE, SHINJI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00611998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、創傷治癒促進薬としてのメトレレプチンの可能性につき検証するとともに皮膚創傷治癒におけるメトレレプチンの作用機序を明らかにすることを目的とした。化学熱傷モデルマウスにおける皮膚創傷治癒過程において、メトレレプチン投与により治癒期間を短縮できることを見出した。また、メトレレプチンがヒト皮膚角化細胞に対して増殖促進効果、分化促進効果、遊走促進効果、血管新生促進効果を有していることが明らかとなり、これらのことから、創傷治癒促進効果は角化細胞の増殖・分化・遊走促進と血管新生促進によるものと考えられた。本研究によりメトレレプチンを創傷治癒促進薬として利用できる可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the possibility of methleleptin as a wound healing promoting agent and aimed to clarify the mechanism of action of methleleptin in skin wound healing.

We found that the healing period can be shortened by administration of methleleptin in the skin wound healing process in chemical burn model mice. In addition, it was revealed that methleleptin has a proliferation promoting effect, a differentiation promoting effect, a migration promoting effect, and an angiogenesis promoting effect on human skin keratinocytes, and from these results, the wound healing promoting effect is keratinized. It was thought that it was due to cell proliferation, differentiation, promotion of migration and promotion of angiogenesis. This study strongly suggested that methleleptin could be used as a wound healing promoter.

研究分野：口腔外科

キーワード：メトレレプチン 創傷治癒 口腔粘膜 皮膚

1. 研究開始当初の背景

レプチンは遺伝性肥満マウスである ob/ob マウスの原因遺伝子として 1994 年 Zhang らによって単離、同定された 16kDa のタンパク質で主に白色脂肪組織から産生・分泌され、糖・脂質代謝促進作用、摂食抑制、エネルギー消費亢進など体重増加抑制作用や血管新生促進作用を示すなど様々な生理作用が知られており、加えてわれわれはレプチンによる創傷治癒促進効果を報告した (PLOS ONE. 9 (7): e101984, 2014, PLOS ONE. 10 (3) e01242, 2015)。

近年、ヒトレプチンの N 末端がメチオニル化された、遺伝子組換え型ヒトレプチン製剤であるメトレプチンが脂肪萎縮症治療薬としてわが国で承認された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、創傷治癒促進薬としてのメトレプチンの可能性につき検証するとともに皮膚および口腔粘膜の創傷治癒におけるメトレプチンの作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

免疫組織化学的検討： 鶴見大学倫理委員会の承認を得て採取した正常マウス皮膚および正常ラビット口腔粘膜、正常ヒト皮膚・口腔粘膜におけるレプチン受容体の発現を確認した。

化学熱傷モデルマウス・ラビット： 皮膚創傷モデルとして ICR マウス (雄性 6 週齢) の背部皮膚に 2 カ所 20% 次亜塩素酸ナトリウムを含浸させた 10×10 mm 濾紙を 5 分間貼付し、化学的な熱傷を作製した。親水性ゲル化創傷被覆・保護剤であるベスキチン® に 100 ng/ml のメトレプチンまたは注射用蒸留水を 400 μl 含浸させ、凍結乾燥を行い、これを化学熱傷創部に貼付し、創部保護ドレッシングにて固定した。口腔粘膜創傷モデルとして日本白色家兎 (雄性、体重 2.5~3.0 kg) の下顎歯肉に、50% 酢酸を含浸させた直径 5 mm 濾紙を 2 分間貼付し、化学熱傷を作製した。翌日から、I 型コラーゲンである Cellmatrix® に 100 ng/ml のメトレプチンを含む溶剤 10 ml または DW10 ml を混和しゲル化させ、創部へ毎日貼付した。

組織学的検討： 経時的に創部の潰瘍の距離を計測するとともに治癒までに要した期間について検討した。加えて、創部組織を採取し、H-E 染色にて組織学的検討を行った。

細胞培養： in vitro におけるメトレプチンの影響について検討を行った。ヒト皮膚角化細胞 (エーディア株式会社より購入) および不死化したヒト口腔粘膜上皮細胞 (RT7) におけるレプチン受容体の発現を RT-PCR 法および Western blot 法で確認した。ヒト皮膚角化細胞およびヒト口腔粘膜上皮細胞にメトレプチンを 0~200 ng/ml 添加した培養液を用いて 1, 3, 5, 7, 10, 14 日間培養

を行い、増殖に対するレプチンの影響についてクリスタルバイオレット法を用いて確認した。さらに分化に対する影響を検討するため、real-time PCR 法にて cytokeratin 4, 10, 13, 14, transglutaminase の上皮細胞マーカーの発現を確認した。

細胞遊走能： scratch assay を用いてヒト皮膚角化細胞およびヒト口腔粘膜上皮細胞の細胞遊走に対するメトレプチンの影響につき検討した。各細胞をマイトマイシン処理後 (12 μg/ml, 2h15m)、Cyto Select 24Well 創傷治癒アッセイ® (CELL BIOLABS, INC.) を使用し、細胞遊走に対するメトレプチンの影響を確認した。

4. 研究成果

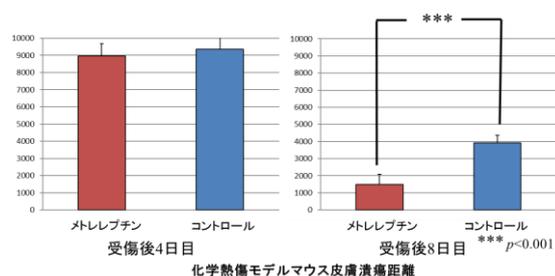
(1) 正常ヒト、マウス皮膚およびヒト、ラビット口腔粘膜におけるレプチン受容体の免疫組織学的検討

免疫組織学的検討において正常ヒト、マウス皮膚およびヒト、ラビット口腔粘膜におけるレプチン受容体の発現を認めた。また、RT-PCR 法にてマウス、ヒト皮膚角化細胞および線維芽細胞、ヒト、ラビット口腔粘膜におけるレプチン受容体の m-RNA の発現および Western blot 法にてレプチン受容体のタンパク質の発現を認めた。

(2) 化学熱傷モデルマウスにおける皮膚潰瘍および化学熱傷モデルラビットにおける口腔粘膜潰瘍治癒過程の組織学的検討
受傷後 8 日目ではコントロール部 (矢印) よりメトレプチン貼付部 (矢頭) で早期の上皮化傾向が認められ、治癒が促進されていることが認められた。また、皮膚潰瘍距離計測の検討では、受傷後 4 日目では潰瘍距離に差を認めなかったが、受傷後 8 日目ではメトレプチン貼付群では有意に潰瘍縮小傾向が認められた。

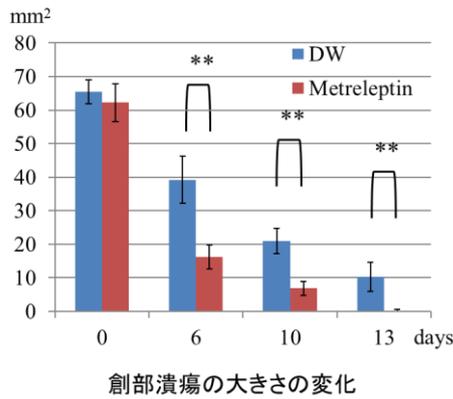


受傷後4日目 受傷後8日目
メトレプチン貼付後の化学熱傷モデルマウス背部皮膚



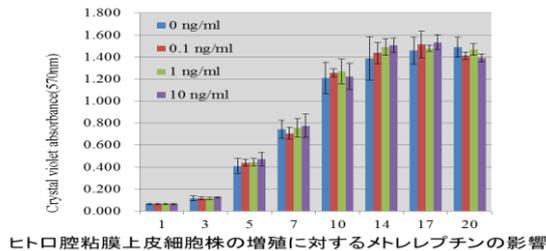
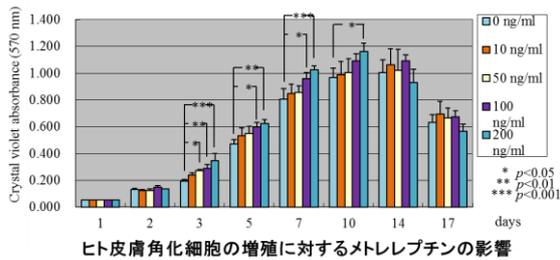
化学熱傷モデルマウス皮膚潰瘍距離

化学熱傷モデルラビット口腔粘膜潰は受傷後6日目以降でメトレプチン貼付群では有意に潰瘍縮小傾向が認められた。



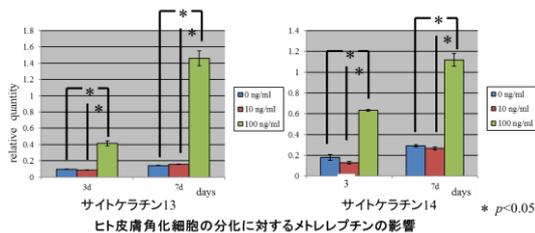
(3) ヒト皮膚角化細胞とヒト口腔粘膜上皮細胞株の増殖に対するメトレプチンの影響

3日目以降でメトレプチンが有意にヒト皮膚角化細胞の増殖を促進していた。



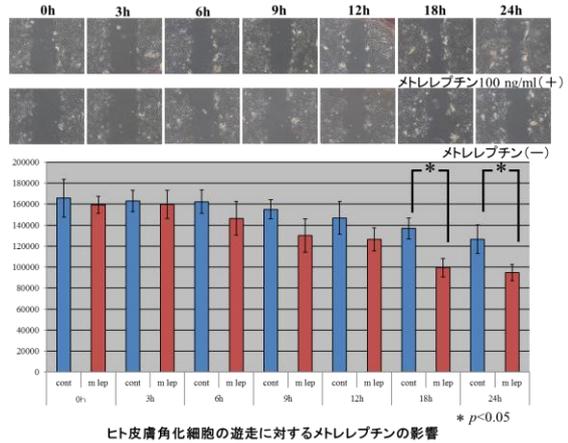
(4) ヒト皮膚角化細胞の分化に対するメトレプチンの影響

メトレプチンが皮膚角化細胞の分化関連分子であるサイトケラチン 13、14 の遺伝子発現を促進している可能性が示唆された。



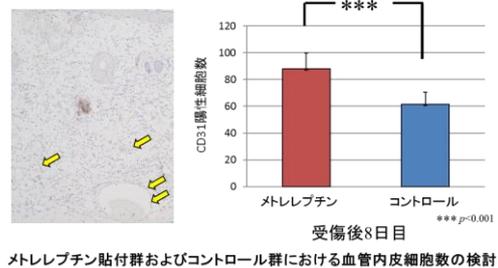
(5) ヒト皮膚角化細胞の遊走に対するメトレプチンの影響

メトレプチン添加ヒト皮膚角化細胞群では 18 時間以降において有意に細胞空隙面積の縮小を認め、メトレプチンによる細胞の遊走促進効果が認められた。メトレプチン添加ヒト口腔粘膜細胞群では 12、24 時間においてメトレプチンによる細胞の遊走促進効果が認められた。



(6) メトレプチン貼付群およびコントロール群における血管内皮細胞数の検討

創傷部上皮直下の組織における、CD31 陽性細胞を計測したところ受傷後 8 日目でメトレプチン貼付群において有意に CD31 陽性細胞 (矢印) が増加していた。



化学熱傷モデルマウスにおける皮膚創傷治癒過程および化学熱傷モデルラビットにおける口腔粘膜治癒過程において、レプチンと同様にメトレプチン投与により治癒期間を短縮できることを見出した。また、メトレプチンがヒト皮膚角化細胞およびヒト口腔粘膜上皮細胞に対して増殖促進効果、分化促進効果、遊走促進効果、血管新生促進効果を有していることが明らかとなった。これらのことから、メトレプチンによる創傷治癒促進効果は角化細胞の増殖・分化・遊走促進と血管新生促進によるものと考えられた。本研究によりメトレプチンを創傷治癒促進薬として利用できる可能性が強く示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 井出 信次, 戸田 (徳山) 麗子, 梅木 泰親, 田所 晋, 竹部 祐生亮, 寺田 知加, 福島 龍洋, 館原 誠晃, 里村 一人: レプチン・レプチン誘導体による創傷治癒促進効果とその新規薬剤としての可能性 第 23 回日本歯科医学会総会 (2016. 10. 21-23, 福岡国際会議場・福岡サンパレス 福岡県福岡市)
- ② 井出 信次, 戸田 (徳山) 麗子, 梅木 泰親, 田所 晋, 竹部 祐生亮, 寺田 知加, 福島 龍洋, 館原 誠晃, 里村 一人: メトレプチンによる創傷治癒促進効果とその新規薬剤としての可能性 第 26 回日本口腔内科学会総会 (2016. 9. 23-24, さん太ホール・さん太ギャラリー・山陽新聞本社ビル 9 階大会議室 岡山県岡山市)
- ③ 井出 信次, 戸田 (徳山) 麗子, 梅木 泰親, 田所 晋, 竹部 祐生亮, 寺田 知加, 福島 龍洋, 館原 誠晃, 里村 一人: 新規皮膚創傷治癒促進薬としてのメトレプチンの可能性 第 70 回日本口腔科学会総会 (2016. 4. 16-17, 福岡国際会議場 福岡県福岡市)
- ④ 井出 信次, 徳山 麗子, 梅木 泰親, 田所 晋, 大久保 充, 竹部 祐生亮, 寺田 知加, 館原 誠晃, 里村 一人: 皮膚創傷治癒におけるメトレプチンの役割 第 69 回日本口腔科学会総会 (2015. 5. 13-15, 大阪国際会議場 大阪府大阪市)
- ⑤ 梅木 泰親, 徳山 麗子, 井出 信次, 大久保 充, 田所 晋, 館原 誠晃, 里村 一人: メトレプチンの口腔粘膜創傷治癒促進効果 第 69 回日本口腔科学会総会 (2015. 5. 13-15, 大阪国際会議場 大阪府大阪市)
- ⑥ 井出 信次, 徳山 麗子, 梅木 泰親, 田所 晋, 大久保 充, 竹部 祐生亮, 館原 誠晃, 里村 一人: 皮膚創傷治癒におけるメトレプチンの役割 第 27 回日本口腔診断学会・第 24 回日本口腔内科学会合同学術大会 (2014. 9. 19-20, 九州大学医学部百年講堂 福岡県福岡市)
- ⑦ 梅木 泰親, 徳山 麗子, 井出 信次, 大久保 充, 田所 晋, 館原 誠晃, 里村 一人: レプチンの口腔粘膜創傷治癒促進効果 第 27 回日本口腔診断学会・第 24 回日本口腔内科学会合同学術大会 (2014. 9. 19-20, 九州大学医学部百年講堂 福岡県福岡市)

[図書] (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井出 信次 (IDE Shinji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 00611998

(4) 研究協力者

里村 一人 (SATOMURA Kazuhito)

戸田 麗子 (TODA Reiko)

田所 晋 (TADOKORO Susumu)

梅木 泰親 (UMEKI Hirochika)