

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592512

研究課題名（和文）口腔ケラチノサイトのエネルギー代謝と分化再生能を指標とした創傷治癒マーカーの開発

研究課題名（英文）Epithelialization in oral mucous wound healing in terms of energy metabolism

研究代表者

横尾 聡 (YOKOO SATOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00322206

研究成果の概要（和文）：口腔粘膜上皮ケラチノサイトの脂肪酸組成とエネルギー代謝との関係から口腔粘膜の創傷治癒における上皮化機構を検討し、表皮に比較した口腔粘膜の「易創傷治癒性」を解明し、その結果を指標とした創傷治癒マーカーの開発を試みた。手術時に採取した表皮、口腔粘膜上皮および培養口腔粘膜上皮を使用し、1. Gas chromatography を用いたケラチノサイトの細胞膜脂肪酸構成比の解析、2. RT-PCR を用いた各上皮組織の基底細胞と傍基底細胞におけるグルコース・トランスポーター：GLUT-1 mRNA の発現量の解析、3. 培養口腔粘膜ケラチノサイトの必須脂肪酸添加分化誘導による GLUT-1 の発現解析を行なった。その成果として、1. 表皮に比較し、口腔粘膜上皮ではパルミチン酸(16:0)の構成比が高値を示した。2. 口腔粘膜上皮では基底層に比較し、傍基底層でのパルミチン酸(16:0)構成比、GLUT-1 タンパクおよび mRNA 発現量が低値を示した。3. 必須脂肪酸による分化亢進ケラチノサイトでは GLUT-1 の発現が低下していた。これらのことから、パルミチン酸(16:0)構成比はグルコース代謝活性と比例することが明らかとなった。また表皮では、必須脂肪酸が高値を示し、さらにお必須脂肪酸は細胞分化を亢進させることも明らかとなった。すなわち、口腔粘膜上皮は表皮に比較して、低分化でかつ高グルコース細胞代謝細胞を多く有し、これが「易創傷治癒性」の一側面である可能性があることから、創傷治癒マーカーの開発への指標となりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the “healing capacity” of wounds of the oral mucosa in comparison to those of the skin, and to evaluate the wound healing mechanism of oral mucosa using a cytobiological approach from the aspect of energy metabolism in oral keratinocytes. Samples of epidermal and oral keratinocytes collected at surgery and of cultured oral keratinocytes were used to analyze (1) by gas chromatography the composition of fatty acids (16:0, 18:2, 20:4) in the cell membranes of keratinocytes, (2) by immunohistochemical staining of GLUT-1 antibody and specific PAS staining the localization of glucose metabolism, and (3) by RT-PCR and Western blotting the expression of GLUT-1 mRNA and of protein in the keratinocytes of the basal and parabasal layers of each epithelial tissue. The % composition of palmitic acid (16:0) was significantly higher in buccal mucosal keratinocyte and in the gingival than in the epidermis. Immunohistochemical staining showed GLUT-1 protein in the skin to be expressed only in the bulge region of hair follicles and in the epidermal basal layer, and observed nearly throughout all epithelial cell layers in the oral mucosa. PAS-positive cell were observed among differentiation-enhanced cells in the upper prickle layer in oral mucosa. The same results were obtained from RT-PCR and a Western blotting analysis. The present study demonstrated definite cytobiological evidence that the oral mucosa surpasses the skin in regard to its wound healing capacity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ケラチノサイト，口腔粘膜，創傷治癒，脂肪酸，パルミチン酸

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜の創傷治癒を考える上で，皮膚の再生過程における修復機序は最も参考となる．皮膚では表皮が傷害を受けると，(1)創縁の表皮細胞が活動をはじめるといふ機序と，それと同時に，(2)毛包細胞が急激に増殖し皮膚に遊走して上皮が再生するといふ二つの上皮化機構が働いている．皮膚においては上記上皮化機構のうち毛包からの上皮化の方が主体であることも解明されている．

細胞膜を構成する脂肪酸の中でパルミチン酸(16:0)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．細胞のエネルギー代謝の中心であるグルコース代謝では，体内に摂取されたグルコースは glucose transporter 1 (GLUT1) によって細胞内に取り込まれ，まずパルミチン酸(16:0)へと変換される．このパルミチン酸(16:0)を基にして様々な脂肪酸が合成されることになる．また細胞内に取り込まれたグルコースはグリコーゲンとして一時的に細胞内に貯蔵される．つまり，細胞におけるグルコース代謝は，パルミチン酸(16:0)とグリコーゲンが基本単位であるといえる．その後多くの脂肪酸が産出されるので，パルミチン酸(16:0)は細胞形成の重要なエネルギー供給源である．最近，皮膚において，毛包のバルジ領域にパルミチン酸(16:0)が大量に含まれ，また上皮系の stem cell のほとんどがこのバルジ領域に存在することが明らかとなってきた．静的環境では stem cell はパルミチン酸(16:0)をエネルギー源として毛髪や脂腺へと分化しているが，表皮が損傷を受けるなどの動的環境では豊富なパルミチン酸(16:0)を用いて，急激な細胞増殖により創傷治癒(上皮化)が行われる．すなわち，表皮形成に必要なエネルギー源の貯蔵領域と stem cell の局在領域が一致したことになり，毛包細胞が皮膚上皮系のすべての stem であり，毛包細胞の表皮角化細胞への転換現象が

上皮化現象であるという一視点が明らかとなったといえる．

機能的な口腔粘膜構造は急激な組織複製(組織再生)に対して stem cell や TAC(transient amplifying cell)の段階的な細胞増殖によって維持されている．われわれは，表皮形成に必要なエネルギー源(パルミチン酸:16:0)の貯蔵領域と stem cell の局在領域(毛包細胞のバルジ領域)が一致したことから，毛包細胞が皮膚上皮系のすべての stem であり，毛包細胞の表皮角化細胞への転換現象が上皮化現象であるという上記結論に注目し，皮膚とは角化様式や付属器と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と stem-like cell の局在領域を細胞生物学的に検討することによって，口腔粘膜に比較した「易創傷治癒性・再生能力」と，さらには同じ口腔粘膜でも角化様式，すなわち分化様式の異なる被覆粘膜(頬粘膜，口底粘膜)と咀嚼粘膜(歯肉，硬口蓋粘膜)との細胞生物学的な「創傷治癒性・再生能力の相違」を解明したい．口腔粘膜ケラチノサイトの細胞生物学的な「易創傷治癒性」が明らかになれば，その応用として創傷治癒不全の究明につながり，それをベースとした臨床検査マーカー，すなわち「創傷治癒予測マーカー」を見いだす基礎になるものと思われる．

2. 研究の目的

口腔粘膜上皮ケラチノサイトの脂肪酸組成とエネルギー代謝との関係から口腔粘膜の創傷治癒における上皮化機構を検討し，表皮に比較した口腔粘膜の「易創傷治癒性」を解明し，その結果を指標とした創傷治癒マーカーの開発を試みた．

3. 研究の方法

手術時に採取した表皮，口腔粘膜上皮および培養口腔粘膜上皮を使用し，
(1) Gas chromatography を用いたケラチノ

サイトの細胞膜脂肪酸構成比の解析,
 (2)RT-PCR を用いた各上皮組織の基底細胞と傍基底細胞におけるグルコース・トランスポーター: GLUT-1 mRNA の発現量の解析, (3)培養口腔粘膜ケラチノサイトの必須脂肪酸添加分化誘導による GLUT-1 の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 表皮に比較し, 口腔粘膜上皮ではパルミチン酸(16:0)の構成比が高値を示した。

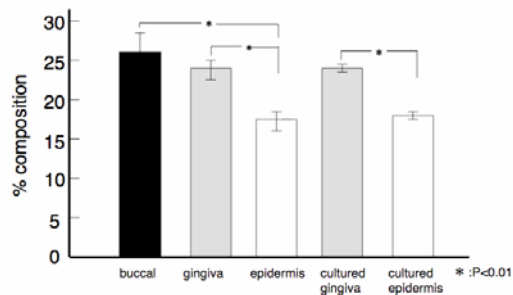


図 1 : Composition of palmitic acid (16:0) between keratinocytes

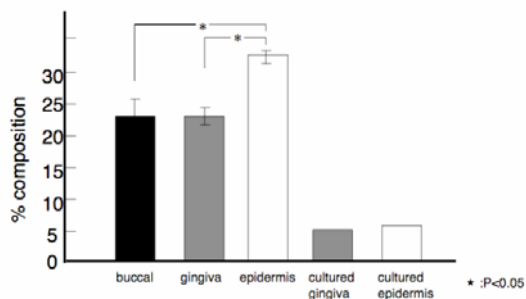


図 2 : Composition of essential fatty acid between keratinocytes

(2) 口腔粘膜上皮では基底層に比較し, 傍基底層でのパルミチン酸(16:0)構成比, GLUT-1 タンパクおよび mRNA 発現量が低値を示した。

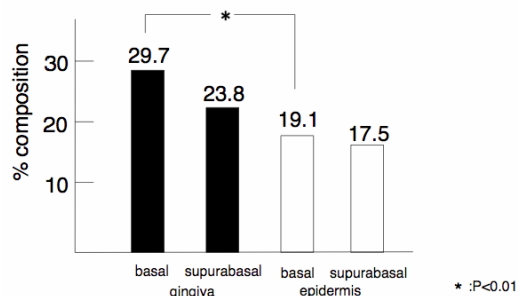


図 3 : The percent composition of palmitic acid (16:0) of epidermis and gingival in basal and suprabasal layer cell

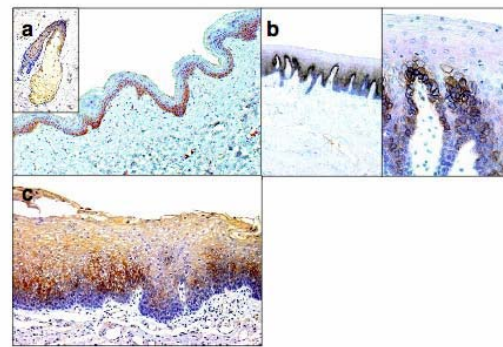


図 4 : Expression of GLUT-1 protein in gingival, buccal mucosal epithelium and epidermis

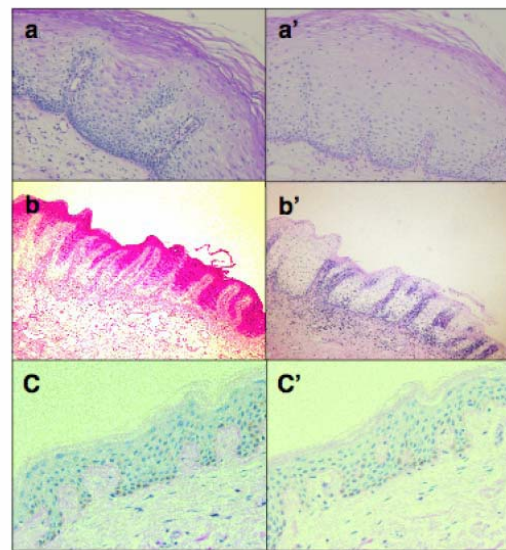


図 5 : PAS and PAS digested with diastase in gingival and buccal mucosal epithelium

(3) 必須脂肪酸による分化亢進ケラチノサイトでは GLUT-1 の発現が低下していた. これらのことから, パルミチン酸(16:0)構成比はグルコース代謝活性と比例することが明らかとなった. また表皮では, 必須脂肪酸が高値を示し, さらに必須脂肪酸は細胞分化を亢進させることも明らかとなった。

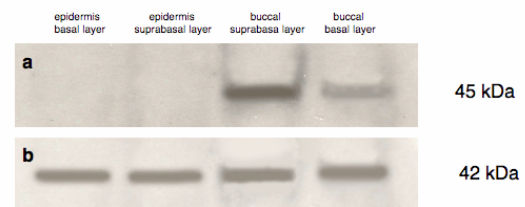


図 6 : Western blot analysis of GLUT-1

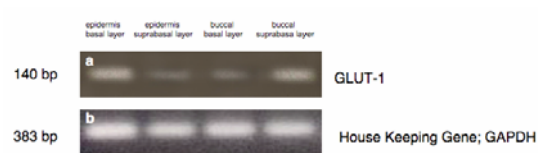


図7：RT-PCR analysis of GLUT-1

以上の結果より、口腔粘膜上皮は表皮に比較して、低分化でかつ高グルコース細胞代謝細胞を多く有し、これが「易創傷治癒性」の一側面である可能性があることから、創傷治癒マーカーの開発への指標となりうると考えられた。

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2件)

①Moriyama K, Yokoo S, Terashi H, Komori T. Cellular fatty acid composition of stratified squamous epithelia after transplantation of ex vivo produced oral mucosa equivalent. Kobe J Med Sci 56: E253-62, 2011. (査読有り)

②Kuroki S, Yokoo S, Terashi H, Hasegawa M, Komori T. Epithelialization in oral mucosal wound healing in terms of energy metabolism. Kobe J Med Sci 55: E5-15, 2009. (査読有り)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横尾 聡 (YOKOO SATOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00322206

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし