

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792082

研究課題名（和文） 代謝調節ホルモン・レプチンと顔面口腔領域における胎児発育との関連に関する研究

研究課題名（英文） Relationship between leptin and orofacial development in fetus.

研究代表者 中村 由紀 (NAKAMURA YUKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70452779

## 研究成果の概要（和文）：

本研究と関連したこれまでの研究業績より、レプチンが味覚器にも作用していることが明らかになり、口腔内器官もまたレプチンの作用部位であることが分かった。今回の実験結果では胎児マウス下顎骨におけるレプチン受容体の発現を確認することができなかった。レプチン受容体の発現が認められないとすると、顎骨へのレプチンの直接作用の可能性は低い。しかし、中枢を介した顔面口腔領域の発達への関与が可能性として考えられるため、その点については今後の検討課題である。

## 研究成果の概要（英文）：

From previous research results related to this study clarified that leptin also acts on taste organ. We found that taste organ is also the site of action of leptin. The results of this experiment could not confirm the expression of leptin receptor in fetal mouse mandible. If no expression of leptin receptor in the jaw of a fetus, the possibility of direct action of leptin to the jaw development is considered to be low. However, the possibility that leptin is involved in the orofacial development mediated the central system, is a subject of future investigation.

## 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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児歯科

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：発生・分化、胎児発育、レプチン

## 1. 研究開始当初の背景

1994年、肥満遺伝子 ob がクローニングされ、その遺伝子産物であるレプチンが発見された (Zhang Y et al., Nature, 1994)。レプチンは脂肪細胞から分泌され、主に視床下部に存在するレプチン受容体を介して摂食を抑制すると同時に、交感神経を介して基礎

代謝を亢進し、最終的に体脂肪量を調節し肥満の抑制に働く。その受容体は脳のみならず、骨格筋、肝臓、すい臓、味覚器など多くの臓器に分布しており、作用は摂食調節の他に、味覚、造血、生殖と多岐にわたる。本申請者はこれまでに、味覚器におけるレプチンの生理作用についての検索を進め、レプチンが甘

味感受性を抑制しており、口腔内器官もまたレプチンの作用部位であることを示した (Nakamura N et al., 2008)。レプチンと同様に全身的な代謝制御に関わるインシュリンや IGF- I, II は、様々な口腔組織形成に重要であると報告されてきた。しかしながら、レプチンの口腔組織形成と発育における役割については未だ解析がなされていない。

### レプチンと骨形成

近年、レプチンが交感神経系を介して、骨芽細胞における破骨細胞分化因子 Rankl の発現を増加させることにより骨吸収を促す方向に働くこと (Florent E et al., Nature, 2005) が報告された。即ち、骨形成にレプチンが関与していることが示唆されたのである。さらに、レプチン-中枢神経系による骨形成メカニズムに骨芽細胞の時計遺伝子が関与しているという報告も紹介され、レプチンが日内周期性を持つことをあわせ考えると、興味深い報告が相次いでいる。

また一方では、レプチンは胎盤からも分泌されていること、胎児組織においてもレプチン受容体が発現していることが次第にわかってきた。マウス胎児では中枢神経回路形成への関与が報告されている。レプチンが胎児発育に関わっていることは強く予想されることから、本研究では、胎児期の口腔領域の発育におけるレプチンの機能を組織学および分子生物学的手法を用いて解析を行う。

## 2. 研究の目的

脂肪細胞由来のホルモンであるレプチンは、摂食抑制やエネルギー代謝亢進に関与する生理活性物質として広く知られている。一方、胎児期においてもレプチンは、胎盤から産生されていることや胎児組織器官にもレプチン受容体が発現していることから、胎児発育への関与が示唆されている。しかしながら、胎児におけるレプチンの機能については不明な点が多く、特に顔面口腔領域においては未だ解析がなされていない。我々の研究機関ではこれまでにマウス・ヒトの成体におけるレプチンの機能解析を進め、口腔領域においてもレプチン受容体が発現しており摂食に関与する機能を持つことを明らかにした。本研究では、胎児期の顔面口腔領域におけるレプチンの機能解析を行い、胎児発育への関与について検索し解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 胎児正常マウス胎児を用いて、血中レプチン濃度を測定し成体との比較を行う。

胎生 13 日から 16 日の C57BL/6J マウス胎児を用いて、正常な胎児血中のレプチン濃度を測定する。また、測定を日中と夜間に分け

て行い日内周期性についての検索を行う。

(2) レプチンが口腔の発生においてどのような役割があるのかを検討するために、レプチン受容体 (Ob-R, Ob-Rb) mRNA の発現およびタンパクの局在について検索を行う。

口腔領域のレプチン作用部位としては味蕾、唾液腺が知られており、レプチン受容体 (Ob-R) が発現していることがわかっている。本研究では C57BL/6J マウス胎児の組織切片を用いて、in situ hybridization 法、免疫染色法にてレプチン受容体 (Ob-R, Ob-Rb) mRNA およびタンパクの発現を解析する。

(3) レプチンは交感神経系を介して骨芽細胞の分化に関与していることは知られている。そこで、胎児レプチン欠損マウス (Ob/Ob マウス) を用いて口腔領域の細胞分化について組織学的 (in situ hybridization 法、免疫染色法)・分子生物学的手法 (RT-PCR 法、Western blot 法) を用いて検索を行い、胎児正常マウスと比較する。

①レプチンは交感神経系を介して骨芽細胞の分化に関与していることは知られている。そこで、胎生 13 日から 16 日の Ob/Ob マウスの口腔領域において骨添加に関与する分化マーカー【Bone morphogenetic proteins (BMP), Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Insulin-like growth factor (IGF)】と骨吸収に関与する分化マーカー【破骨細胞分化因子 (RANKL),】の発現を解析する。

②骨格筋細胞の分化に関与する転写因子【筋分化調節因子 (MyoD)】の発現を解析する。

③脂肪細胞の分化に関与する転写因子【peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ )】の発現を解析する。

(4) 現在、レプチンが関与する骨形成の機序は中枢神経系を介すると考えられており骨組織形成におけるダイレクトなレプチンの機能は不明であるが、培養細胞を用いて外因的にレプチンを作用させ細胞分化に対するダイレクトな影響を検索する。

①未分化な間葉系細胞の分化に及ぼすレプチンの作用について検索する。

Bone morphogenetic proteins-2 (BMP-2) は未分化間葉系の培養細胞 (C3H10T1/2 細胞) を骨芽細胞へ分化させることが知られている。骨芽細胞への分化に与える影響を検索するため、BMP-2 存在下、不存在下で C3H10T1/2 細胞にレプチンを作用させ、ALT 活性や PTH 応答性について、またオステオカルシン産生誘導について検討を行う。

②骨芽細胞の分化に及ぼすレプチンの作用について検索する。

BMP-2 存在下、不存在下で骨芽細胞様細胞株

(MC3T3-E1) にレプチンを作用させ ALT 活性と PTH 応答性、オステオカルシン産生誘導について検討を行う。

③ 筋細胞の分化に及ぼすレプチンの作用について検索する。

筋芽細胞は BMP-2 の作用により筋管細胞への分化が抑制され、骨芽細胞への分化へ転換することが知られている。そこで、筋管細胞への分化能を有した培養細胞 (C2C12 細胞) に BMP-2 存在下、不存在下でレプチンを作用させ、筋分化に重要な転写因子である miogenin、MyoD の発現について検討を行う。

④ 脂肪細胞の分化に及ぼすレプチンの作用について検索する。

前駆脂肪細胞はいく種ホルモンに応答性を持つことが知られている。そこで、前駆脂肪細胞株 (3T3L-1) にレプチンを作用させ、Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GDH) 活性、PI3-kinase 活性の測定を行う。

⑤ 骨髄間質細胞の分化に及ぼすレプチンの作用について検索する。

骨髄間質細胞は BMP-2 の作用により骨芽細胞へと分化することが知られている。そこで、BMP-2 存在下、不存在下で骨髄間質細胞由来細胞株 (ST2) にレプチンを作用させ ALT 活性と PTH 応答性、オステオカルシン産生誘導について検討を行う。

#### 4. 研究成果

脂肪細胞由来のホルモンであるレプチンは、摂食抑制やエネルギー代謝亢進に関与する生理活性物質として広く知られている。一方、胎児期においてもレプチンは、胎盤から産生されていることや胎児組織器官にもレプチン受容体が発現していることから、胎児発育への関与が示唆されている。しかしながら、胎児におけるレプチンの機能については不明な点が多く、特に顔面口腔領域においては未だ解析がなされていない。我々の研究機関ではこれまでにマウス・ヒトの成体におけるレプチンの機能解析を進め、口腔領域においてもレプチン受容体が発現しており摂食に関与する機能を持つことを明らかにした。本研究では、胎児期の顔面口腔領域におけるレプチンの機能解析を行い、胎児発育への関与について検索し解明することを目的とした。

胎児正常マウスを用いて、血中レプチン濃度を測定し成体との比較を行うためサンプル収集した。成体マウスは 2.5~3.5ng/ml の範囲で変動したのに対し、胎児マウスにおける血中レプチン濃度は約 1.0ng/ml であった。また、胎児正常マウスの組織切片を用いて顔面口腔領域におけるレプチン受容体 (Ob-R, Ob-Rb) mRNA およびタンパク質の発現解析を進めており、昨年からのデータ取得を継続している。今回の実験結果では胎児マウス下顎

骨におけるレプチン受容体の発現を確認することができなかった。レプチン受容体の発現が認められないとすると、顎骨へのレプチンの直接作用の可能性は低く、従来の報告にあるようにレプチンが制御する骨吸収機序は中枢の受容体にレプチンが作用し交感神経系を介すると考えられる。中枢を介した顔面口腔領域の発達への関与が可能性として考えられるため、その点については今後の検討課題である。

#### 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 2 件)

1. 中村由紀; 総説: 飽食ホルモン・レプチンによる甘味感受性の抑制と食調節. 小児歯科学会雑誌, 48 巻 (4), 505-510 頁, 2010, 査読有
2. 重村憲徳, 中村由紀, 二ノ宮裕三; 総説 味覚と肥満. 日本咀嚼学会誌, 20 (1), 48-55 頁, 2010, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. 中村由紀; 飽食ホルモン・レプチンによる甘味感受性の抑制と食調節. 第 48 回有限責任中間法人日本小児歯科学会大会, 奨励賞受賞講演, 2010 年 5 月 19-20 日. 名古屋 (名古屋国際会議場)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村由紀 (NAKAMURA YUKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70452779

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：