

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659857
 研究課題名（和文） 口腔粘膜創傷治癒に特有なシグナル伝達の探索
 —皮膚と口腔粘膜上皮の相違—
 研究課題名（英文）
 Examination of signaling pathway specific to oral mucosa wound healing.
 - Difference between oral mucosa and epidermis -
 研究代表者
 前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)
 新潟大学・医歯学系・教授
 研究者番号：40183941

研究成果の概要（和文）：

皮膚に比べ口腔粘膜の傷は早く治り、瘢痕形成が少ないというこの現象を口腔粘膜上皮細胞と皮膚上皮細胞の細胞学的特性の相違から説明するために創傷部で活性化する PI3 キナーゼ/Akt/mTOR シグナル経路をインビトロで薬学的操作のみにより活性化し、まず口腔粘膜上皮で起こる反応を創閉鎖能、タンパク発現で確認したが、用いた薬剤ではそれらに有意な違いが観察されなかった。

研究成果の概要（英文）：

Oral mucosa heals faster than does skin, and scar formation during the wound healing in oral mucosa is also less than that in skin. We attempted to explore these differences between oral keratinocytes and epidermal keratinocytes in vitro by intrinsic cellular, biological characteristics. PI3kinase signaling pathway was activated by using a pharmacological means. Using a scratch assay (in vitro wound healing assay), cell motility and protein expressions related to PI3kinase were examined. Those reagents used in this study did not induce any significant differences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：

ケラチノサイト、PI3K/Akt シグナリング、PTEN、創傷治癒モデル、細胞運動能

1. 研究開始当初の背景

PI3 キナーゼ/Akt/mTOR シグナルは細胞のタンパク合成を促進し細胞成長・増殖に関わる経路である。正常組織では制御されているが、発生過程や癌組織では活性化し、組織増大の中心的役割を果たしている (Clark, 2009)。腫瘍抑制因子 PTEN (ピーテン：phosphatase and tensin homologue) はこの経路を抑制するタンパクであるが、最近、

PTEN 作用を遺伝子レベルで不活化したマウスで脊髄損傷や皮膚欠損部の劇的な組織再生が報告され (Liu, 2010; Squarize, 2010)、“薬物の一時的な作用”による mTOR (mammalian target of rapamycin) 活性化がヒト成人の機能・組織欠損に対する再生治療に効果的であることが示唆された。

一方、in vivo では、皮膚に比べ口腔粘膜の創傷は早く治り、瘢痕形成が少ない。Chen

(2010)は皮膚上皮細胞による炎症促進性サイトカインの産生に関する in vitro 実験により、mTOR 活性化による皮膚創閉鎖促進が遺伝子改変マウスで起きても、口腔粘膜で同じ反応が起こると限らないことを示した。このことは創傷に対する細胞反応は皮膚と口腔粘膜で異なることを意味する

2. 研究の目的

本研究では mTOR を活性化するストラテジーとして上図に示した 3 方向からのアプローチ ([1] PI3 キナーゼ/Akt/mTOR 経路に inputs する外来性成長因子 : [2] 同経路の抑制因子 PTEN 阻害剤 : [3] 同経路のネガティブフィードバックを回避する PI3 キナーゼ/Akt 非依存性物質 (PA) による活性化) により、薬学的操作による口腔粘膜の創閉鎖機転の促進に効果的なシグナル経路の解明する。成人ヒト培養口腔粘膜上皮細胞を用い、(1) 通常の上皮細胞単層培養下で培地に、上記 [1] ~ [3] の単独投与による創閉鎖能の測定、(2) 細胞の mTOR の活性、細胞移動能と細胞サイズの変化の測定、(3) 最も有効と判定した薬剤投与による 3 次元培養口腔粘膜 (口腔粘膜線維芽細胞組み込み型) を用いた創閉鎖過程の組織学的観察により、口腔粘膜と皮膚の細胞学的特性の相違を解明する。

3. 研究の方法

約 3-5 継代を行った培養口腔粘膜および皮膚上皮細胞を創閉鎖測定用ウェルに播種、100%コンフルエントになった時点で 3 つの薬剤を加えてインサートを除去、無細胞領域を創面と仮定し 24 時間、48 時間後に写真撮影、無細胞領域の面積を測定し、創閉鎖%を計算し測定値とする。実験群 1 つに対して、同時に 3 サンプルの測定を行い、平均を計算する。右に添加薬剤の違いによる実験群をまとめた。

この後 one way ANOVA で統計学的検討を行い、最も高度に創閉鎖が確認された薬剤を口腔粘膜と皮膚で決定する。

創閉鎖能測定をした細胞におけるタンパク発現変動、および細胞サイズ解析

タンパク発現解析はウェスタンブロッティングで行うため、PI3 キナーゼ/Akt/mTOR シグナル経路のタンパクを網羅的に行う。

PTEN, phospho-Akt, Akt, phospho-mTOR, mTOR (以上 PI3 キナーゼ/Akt カスケード)

phospho-S6K, S6K, phospho-S6, S6, 4EBP1, eIF4E (以上タンパク合成に関わる mTOR シグナル下流の基質)

なお、アプローチ①に用いるレプチンは唾液に含まれるサイトカインであり皮膚上皮細胞での効果を全く認めない場合には、皮膚・口腔粘膜上皮いずれの細胞も産生している成長因子リコンビナントの VEGF あるいは KGF を代わりに添加して実験を継続する。また、アプローチ②、③の薬剤が万が一細胞毒性を示した場合の代替薬剤は、②では bpV(pic), ③では PA の代謝産物であるリゾホスファチジン酸を用いて行う。

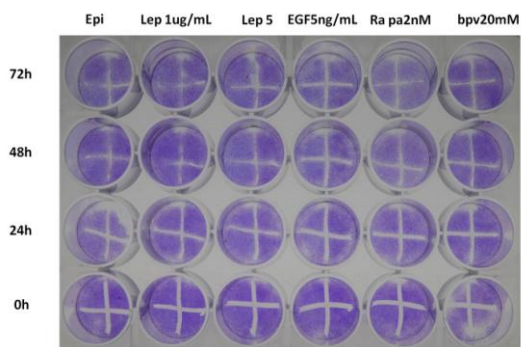
		口腔粘膜上皮細胞		および		皮膚上皮細胞		
mTOR活性剤		①レプチン	②bpV(phen)	③PA	④なし(対照)			
mTOR阻害剤 ラパマイシン		-	+	-	+	-	+	/
実験群		1	2	3	4	5	6	7

4. 研究成果

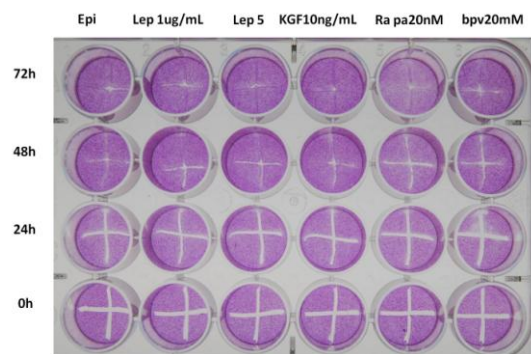
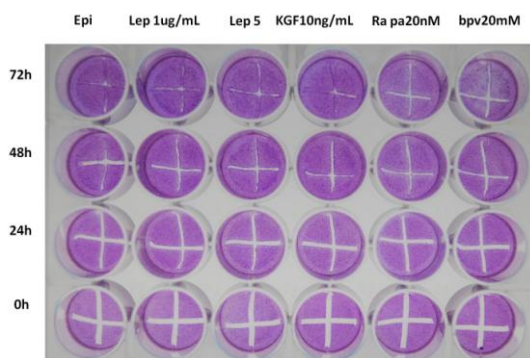
当初の計画では、①外来性の成長因子、②シグナル経路内の PTEN タンパク阻害、そして、③この経路非依存性の mTOR 活性化剤を用いることにしていたが、予定以上の数にのぼる口腔粘膜上皮細胞で創閉鎖能実験をおこなったにもかかわらず、用いた薬剤による統計学的有意差が出現しなかった。このことから、計画には記載していなかったが MTT ア

ッセイ法をもちいて、細胞の増殖能を確認してみたが、こちらはほとんど増殖能に差が生じていないことを確認した。逆にMTTアッセイではラパマイシンを添加した群では有意差をもって増殖能の減少が認められたため、細胞の遊走能に関してはレプチンの効果は極小であることが示唆された。

実験の結果の写真を以下に示した。



写真のように計画に用いた薬剤について、有意差のある創閉鎖の結果が得られなかった。とくにポジコンとして使用したEGFについて、まったくポジコンの様相を呈していなかったため、次のオプションとして、KGFを用いて追加実験を行った。

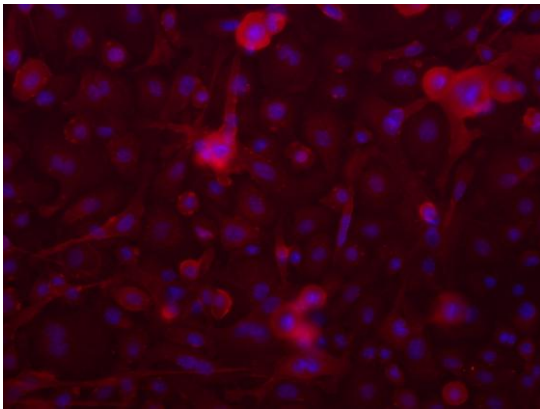
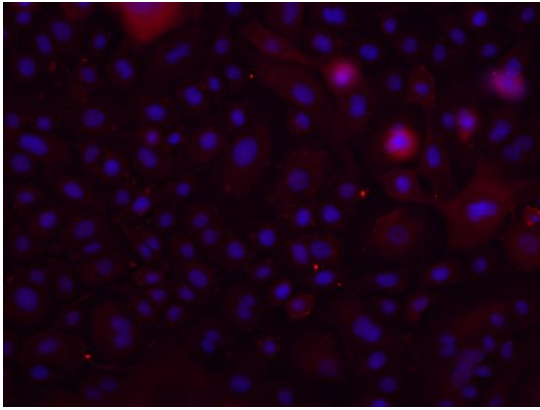


本実験では、ポジコンであるKGFに匹敵して5ug/mLのレプチンでもやや、創の閉鎖が早まった結果を示したので、実験を進め、レプチンは細胞膜上のレセプターを介してシグナルが細胞内に伝達されるため、細胞膜上のレプチンレセプターの発現をウェスタンブロットと細胞組織化学により検討したところ、残念ながらレプチンの発現を確認することができなかった。

従ってここにおいて、本研究の仮説の実証が困難であると判断したために、当初の研究計画の実施を断念した。よって皮膚の細胞を用いた実験を行うことはなかった。

ところが、最近になって、口腔粘膜と皮膚の創傷治癒の早さの違いはhypoxia-inducible factor1 α (HIF-1 α)の発現の違いであるという報告がでた。HIF1 α はPI3K/Aktシグナリング経路の下流にあるmTOR経路に支配されている。HIF1 α の正常口腔粘膜上皮細胞に関する報告は皆無であり、今後HIFを介したシグナル経路によって、口腔粘膜の創傷治癒に影響を及ぼすシグナル経路を探索し、今後の挑戦的萌芽研究につなげるために、細胞染色を行った。

新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：80242436



上は21%の通常のインキュベータで培養した細胞であるが、HIF1 α を発現していないのに対し、下は1%の酸素濃度で72時間培養した細胞で、HIF1 α の発現が観察された。HIF1 α の発現によって変化する遺伝子は200を超えるといわれており、今後HIF1 α シグナル経路に注目して、口腔粘膜の創傷治癒について検討をすすめていく所存である。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：40183941

(2) 研究分担者

泉 健次 (IZUMI KENJI)