

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593016

研究課題名(和文) 口腔粘膜創傷治癒におけるレプチンの新規治療薬としての可能性

研究課題名(英文) Leptin promotes wound healing in the oral mucosa

研究代表者

片岡 志基 (KATAOKA, Shiki)

鶴見大学・歯学部・臨床助手

研究者番号：80624676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗肥満ホルモンとして知られるレプチンが最近唾液中にも存在することが報告されている。そこで、今回われわれは、レプチンの多彩な生理作用、特に血管新生促進作用や皮膚角化細胞の増殖促進による創傷治癒促進作用などに着目し、口腔粘膜創傷治癒の促進薬としてレプチンを利用できる可能性について検討した。その結果、化学熱傷モデル動物においてレプチンは口腔粘膜の創傷治癒を促進し、さらにその効果は細胞の遊走および血管新生によるものであることを見出した。これらの結果によりレプチンを口腔粘膜創傷治癒促進薬として利用できる可能性を強く示唆した。

研究成果の概要(英文)：Leptin, a circulating anti-obesity hormone, exhibits many physiological properties. Recently, leptin was isolated from saliva. In this study, we investigated the physiological role of leptin in the oral cavity by focusing on its effect on wound healing in the oral mucosa. As a result, topical administration of leptin significantly promoted wound healing and shortened the duration required for complete healing. Histological analysis of gingival tissue beneath the ulceration showed a denser distribution of blood vessels in the leptin-treated group. Also, migration of human oral epithelial cells was accelerated in the presence of leptin. From these facts, topical administration of leptin was shown to promote wound healing on the oral mucosa by accelerating epithelial cell migration and enhancing angiogenesis around the wounded area. These results strongly suggest that topical administration of leptin may be useful as a treatment to promote wound healing in the oral mucosa.

研究分野：外科系歯学

キーワード：レプチン 口腔粘膜 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

未曾有の超高齢社会を迎えたわが国では、口腔粘膜疾患、ドライマウスなどの口腔内科的疾患が増加してきている。一方、悪性腫瘍に対する化学療法や放射線療法、造血幹細胞移植に代表される先進的治療技術の実施に伴って発症する重篤な口腔粘膜炎症の管理、口腔ケアの必要性・重要性が注目されてきている。今後ますます多くの国民がこのような治療の対象となると予想されることから、口腔粘膜炎症の発症予防、進行抑制、さらには効果的治療のための手段を確立しておくことが喫緊の課題といえる。口腔粘膜の表面を形成する口腔粘膜上皮細胞は、最深層での有糸分裂によってつくられた細胞が表層に向かって移動し、剥がれ落ちた細胞を補填するという連続した細胞新生のシステムによって、その構造を維持している。この有糸分裂は、いくつかの因子、たとえば炎症、ストレスなどに影響を受けるとされているが、その作用機構については不明な点が多い。

一方、レプチンは、1994年に遺伝性肥満マウスの *ob/ob* マウスの原因遺伝子として Zhang らにより単離、同定された分子量 16kDa のタンパク質であり (Nature 372: 452-432, 1994)、主に白色脂肪組織から分泌され、摂食抑制とエネルギー消費亢進 (Neuron 22: 221-232, 1999, Am J Physiol 277: E417-E422, 1999)、骨形成促進作用 (Cell 3:305-317, 2002, J Histochem Cytochem 50: 159-169, 2002)、血管新生促進作用 (Circ Res 83: 1059-1066, 1998, Ulcer Res 33: 30-33, 2006) などが報告されている。皮膚角化細胞ではレプチン受容体の発現が確認され、*in vitro* で角化細胞に対して分裂促進作用を有することが確認されている (J Invest Dermatol 117: 98-105)。さらに、創傷治癒遅延モデルマウスにレプチンを投与することにより皮膚の創傷治癒が促進されることが報告されており (J Clin Invest 106: 501-509, 2000)、皮膚創傷治癒にレプチンが autocrine/paracrine 的に重要な生理的役割を果たしていると考えられている (FASEB J 17: 1895-1897, 2003)。興味深いことに、

このレプチンが最近、唾液腺から分泌され、唾液中に存在することが明らかとなっているが (J Clin Endocrinol Metab 86: 5234-5239, 2001)、その口腔内における生理的役割については未だ不明である。しかし、これまでのレプチンが血管新生促進作用を有することや、皮膚における創傷治癒を促進していることなどを考え合わせると、レプチンが口腔粘膜においても創傷治癒に促進的に働く可能性があることに着目した。

そこで、口腔粘膜におけるレプチン受容体の発現について確認したところ、予備的実験結果ながら、*in vivo* でヒトおよびラット口腔粘膜においてレプチン受容体が発現していること、*in vitro* で口腔粘膜上皮細胞においてもレプチン受容体が mRNA レベルおよびタンパク質レベルで発現していることを確認した。これらの結果は、唾液中に存在するレプチンが、口腔粘膜においてその受容体を介して、何らかの重要な生理的役割を担っている可能性を強く示唆するものであると考えられる。

このことから、本研究においては、血管新生促進作用および皮膚創傷治癒促進作用を有すると考えられるレプチンに着目し、口腔粘膜に対して保護作用や創傷治癒促進作用を有しているかどうか検討するとともに、口腔粘膜炎症の発症予防薬、進行抑制薬、新規治療薬として利用できる可能性について明らかにすることを目的として研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、口腔粘膜炎症に代表される口腔粘膜疾患の発症予防、進行抑制、効果的治療に、レプチンを用いることが可能かどうかを検討することを目的とした。具体的には、口腔粘膜上皮細胞におけるレプチン受容体の発現について *in vivo* および *in vitro* において詳細に検討すると共に、レプチン受容体が機能的なものであることを確認するために、口腔粘膜上皮細胞培養時にレプチンを加え、その時の細胞においてレプチンが機能的に作用したこと、つまりシグナル伝達が行われた

ことを STAT3 がリン酸化されることを利用して確認した。また、ウサギの口腔粘膜に、次亜塩素酸水溶液や酢酸溶液を用いた薬剤性化学損傷を作製し、レプチンを作用させることで創傷治癒促進効果を有するか否かについて検討した。さらに *in vitro* において、口腔粘膜上皮細胞を用いて、培養時に各種濃度のレプチンを添加し、その増殖に対する影響を検討すると共に、コンフルエント後にレプチンを加えることで、分化に対する影響を、上皮細胞のそれぞれの分化段階で発現するマーカーである transglutaminase I、keratin 4、10などを指標に mRNA レベルおよびタンパク質レベルでその発現の変化を検討した。さらに、細胞遊走に対するレプチンの影響についてもスクラッチアッセイを用いて検討することで、レプチンの口腔粘膜創傷治癒に対する影響を明らかにするとともにその詳細なメカニズムについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜創傷治癒に対するレプチンの治癒促進効果の有無の検討

ウサギに対して、酢酸溶液を含浸させた濾紙を一定時間貼付することで、口腔粘膜に薬剤性化学損傷を作製した。これを口内炎モデルとし、創傷作成後、有効な薬理濃度のレプチンを、ゲル化する Type I collagen である Cellmatrix® に混和しゲル化させ、これを創部に貼付した。コントロールには Cellmatrix® のみを貼付した。創傷作成後 6, 13 日目に潰瘍の部分を実測するとともに組織を摘出し、組織学的、免疫組織化学的に検討し、レプチンの創傷治癒促進効果の有無につき、詳細に検討した。

(2) 口腔粘膜上皮細胞におけるレプチン受容体の発現の検討

in vivo における口腔粘膜上皮細胞でのレプチン受容体の発現について、ウサギおよびヒト(健康ボランティア)の口腔粘膜組織を用いて、免疫組織化学的手法により検討した。また、*in vitro* においても、口腔粘膜上皮細胞を用いて、RT-PCR 法およびウエスタン

ブロット法により、レプチン受容体の発現を mRNA およびタンパク質レベルで検討した。

(3) レプチン受容体の機能の確認

口腔粘膜上皮細胞にレプチン受容体が発現していることが確認したのち、その受容体が機能しているか否かにつき検討した。レプチン受容体にレプチンが結合すると、JAK/STAT 経路を介してシグナル伝達が起こる。このとき STAT3 がリン酸化されることを利用して、以下の検討を行った。口腔粘膜上皮細胞の培養時にレプチンを添加し、15 分間作用させた後、細胞を回収し、ウエスタンブロット法にて STAT3 の発現につき検討し、STAT3 のリン酸化レベルをレプチン非添加群と比較した。

(4) 口腔粘膜上皮細胞の増殖に対するレプチンの影響の検討

口腔粘膜上皮細胞の培養時に各種濃度のレプチンを添加し、その増殖に対する影響をクリスタルバイオレット法により検討した。また、口腔粘膜上皮細胞の培養において、コンフルエント時に培養 dish の中央で 2 mm 程度の幅で細胞を剥離し(スクラッチアッセイ)この空隙への細胞の増殖と遊走について、レプチン添加群と非添加群において比較検討した。

(5) 口腔粘膜上皮細胞の分化に対するレプチンの影響の検討

口腔粘膜上皮細胞の培養時にコンフルエント後から各種濃度のレプチンを添加し、その分化に対する影響について、上皮細胞のそれぞれの分化段階で発現するマーカーである transglutaminase I、keratin 4、10 を指標に real time PCR 法やウエスタンブロット法を用いて、mRNA レベルおよびタンパク質レベルでその発現の変化を検討した。

4. 研究成果

ヒトおよびウサギの口腔粘膜における Ob-R の局在を確認するために免疫組織化学的検討を行ったところ、上皮の有棘細胞層、顆粒細胞層および上皮下結合組織中に存在する血管内皮細胞

においてその発現が認められた。ウサギ口腔粘膜化学熱傷モデルにおける潰瘍の大きさの変化を測定した結果、潰瘍は対照群と比べてレプチン投与群で有意に縮小し、治癒に要した期間もレプチン投与群において有意に短縮した。また、潰瘍直下の結合組織の血管数を計測した結果、対照群と比べレプチン投与群で有意に血管が多く認められた。この期間中の体重、AST、ALT および血糖値に異常は認められず、レプチン投与による副作用は認められなかった。また、in vitro においては、RT-PCR 法にて、RT7 細胞における Ob-R の mRNA の発現が認められた。次に、RT7 細胞の増殖・分化に対するレプチンの影響を検討したところ、ともに影響は認められなかった。一方、RT7 細胞の遊走に対するレプチンの影響を検討した結果、レプチン投与群で有意に細胞遊走が促進された。上記の結果より、口腔粘膜におけるレプチンの標的細胞は上皮細胞および血管内皮細胞であること、局所投与されたレプチンが副作用の出現なく口腔粘膜の創傷治癒を促進すること、レプチンが潰瘍直下の結合組織における血管新生を促進すること、さらに、レプチンがヒト口腔粘膜上皮細胞の遊走を促進することが明らかとなった。もちろん、口腔粘膜の創傷治癒は、複数の生物学的経路の存在する複雑な過程により成立するものである。VEGF、FGF、TGF-ファミリーなどの増殖因子が、創傷治癒過程において相乗的に作用することが知られていることから、本研究においても、これらの成長因子が関与する可能性を否定することは出来ない。実際に、レプチンがヒト口腔粘膜の角化細胞においてEGFおよびKGFの発現を誘導することが報告されている。そこで、RT7 細胞にレプチンを投与した場合におけるEGFおよびKGFの合成について、ELISA 法にて確認したところ、今回の検討ではレプチンは RT7 細胞のEGFおよびKGFの産生に明らかな影響を及ぼさなかった。結果の差異の理由についてはまだ不明であり、今後の検討課題である。

本研究において、レプチンを局所投与することで創傷部の上皮細胞の遊走が促進され、かつ潰瘍直下の結合組織

における血管新生が促進されることによって、口腔粘膜の創傷治癒が促進される可能性があることを明らかにした。これらの結果は、唾液中のレプチンの生理的役割を解明する一助となるばかりでなく、レプチンが口腔粘膜における難治性疾患、例えば扁平苔癬や難治性口内炎、頭頸部癌に対する放射線療法および化学療法に伴う口腔粘膜傷害などの治療や予防に有用であり、これまでにない新しい創傷治癒促進薬として使用できる可能性を強く示唆するものであると考えられた。

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 1 件)

Umeki H, Tokuyama R, Ide S, et al., Leptin promotes wound healing in the oral mucosa, PLoS One, 査読有り, 9(7), 2014, e101984, DOI:10.1371/journal.pone.0101984.eCollection 2014

[学会発表](計 3 件)

梅木泰親、徳山麗子、他、口腔粘膜におけるレプチンの創傷治癒促進効果、第 24 回日本口腔内科学会学術大会、2014 年 9 月 19 日～20 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

梅木泰親、徳山麗子、他、レプチンの口腔粘膜創傷治癒促進効果、第 58 回日本口腔外科学会総会学術集会、2013 年 10 月 11 日～13 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

梅木泰親、徳山麗子、他、レプチンによる口腔粘膜創傷治癒促進効果、第 67 回日本口腔科学会学術集会、2013 年 5 月 22 日～24 日、栃木総合文化センター(栃木県宇都宮市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 志基 (KATAOKA Shiki)
鶴見大学・歯学部・臨床助手
研究者番号：80624676

(2) 研究分担者

里村 一人 (SATOMURA Kazuhito)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：80243715

館原 誠晃 (TATEHARA Seiko)

鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：90380089

徳山 麗子 (TOKUYAMA Reiko)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：20380090

井出 信次 (IDE Shinji)
鶴見大学・歯学部・学部助手
研究者番号：00611998