

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861984

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レプチンの可能性

研究課題名(英文)Leptin 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・助手

研究者番号：00611998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：レプチンは主として脂肪細胞で産生される抗肥満ホルモンとして知られ、近年、全身投与や局所投与による創傷治癒促進作用が報告されている。しかし、レプチンを創傷治癒促進剤として臨床応用を目指すにあたり、全身投与や複数回の局所投与では全身への副作用が懸念される。そこで本研究ではレプチンの低用量投与による創傷治癒促進作用について検討し、さらに皮膚・口腔粘膜創傷治癒におけるレプチンのメカニズムを明らかにすることで、創傷治癒促進薬としてレプチンが臨床応用できる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Leptin, a 16 kDa anti-obesity hormone, exhibits various physiological properties. Interestingly, skin wound healing was proven to delay in leptin-deficient ob/ob mice. However, little is known on the mechanisms of this phenomenon. In this study, we attempted to elucidate a role of leptin in wound healing of skin and oral mucosa.

Topically administered leptin was proven to promote wound healing in the skin by accelerating proliferation, differentiation/function and migration of epidermal keratinocytes 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 skin.

研究分野：口腔外科、口腔内科

キーワード：レプチン 創傷治癒 皮膚 口腔粘膜

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えたわが国においては、今後口腔癌患者の増加とそのさらなる高齢化が予想される。口腔癌に対しては積極的な外科治療が行われているが、化学療法や放射線療法、さらには患者の高齢化等に伴い免疫療法や温熱療法などの新たな治療法も注目を集めてきている。予備力が低下している高齢患者では、これまでに行われてきた標準治療に伴う副作用をどのようにコントロールするかという課題が重要となる。例えば口腔癌に対する外科治療に伴う組織欠損に対して、自己組織を用いた再建を行う際に、原発巣の治療は良好でも、移植片採取部位に治療不全や遅延、感染が認められたり、瘢痕が強く残ることなどがある。また、放射線療法や化学療法には重篤な口腔粘膜炎を伴うことが多く、これが治療遂行の妨げとなることもしばしば見受けられる。これらの**皮膚創傷や口腔粘膜創傷などにおいて有効な治療法を確立することは今後の悪性腫瘍治療に寄与すると考えられる**。また、国民の高齢化とともに増加することが予想される**口腔粘膜疾患、ドライマウスなどの口腔内科学的疾患や、寝たきり高齢者や糖尿病罹患患者などにみられる皮膚の褥瘡など、皮膚・粘膜全般における創傷治療の効果的治療法の確立が喫緊の課題である**といえる。

一方、抗肥満ホルモンである leptin は遺伝性肥満マウスである *ob/ob* マウス (*ob*: obese) の原因遺伝子として Zhang らにより 1994 年クローニングされた (*Nature* 372: 425-432, 1994) 分子量 16 kDa のタンパク質であり、主に白色脂肪組織から産生・分泌される。その生理作用は多彩で、糖・脂質代謝促進、摂食抑制、エネルギー消費亢進などの体重増加抑制作用を示すほか (*Am J Physiol* 277: E417-E422)、骨形成促進作用 (*Cell* 3:305-317, 2002、*J Histochem Cytochem* 50:159-169, 2002) や、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。また、皮膚角化細胞に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全身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ことが示唆されている (*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、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。**

また、レプチンは抗肥満ホルモンであり、**全身投与に伴って副作用が生じる危険性があることから、より臨床に即し、副作用を抑えることを目的に、DDS (ドラッグデリバリーシステム) を利用した局所単回投与による皮膚創傷治癒促進の可能性**についても着目した。

2. 研究の目的

本研究では皮膚および口腔粘膜の創傷治癒におけるレプチンの役割を明らかにするとともに、レプチンを創傷治療促進薬として用いることが可能かどうかについて検討する。具体的には、マウス皮膚およびウサギ口腔粘膜におけるレプチン受容体の発現を免疫組織化学的に検討する。マウス皮膚創傷モデルおよびウサギ口腔粘膜創傷モデルを作製し、DDS を利用してレプチンを局所に単回投与し、創傷治癒促進効果が認められるか否かについて検討する。その際レプチン投与群とコントロール群における体重の増減、血中 ALT および AST 値、血糖値を測定し、全身的な副作用の有無について検討する。また、採取した創傷皮膚および粘膜を組織学的、免疫組織化学的に検索し、レプチン投与による創傷治癒促進のメカニズムにつき検討する。そこでヒトへの応用を考慮し、ヒト皮膚および口腔粘膜におけるレプチン受容体の発現につい

て免疫組織化学的に検討する。さらに、皮膚角化細胞および口腔粘膜上皮細胞の増殖、分化に対するレプチンの影響について検討することで、*in vitro*においてもレプチンの創傷治癒におけるメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 皮膚化学熱傷モデルマウス: 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12×12mm濾紙を5分間貼付し、化学的な熱傷を作製した。ここに、薬剤徐放性を有する生体吸収性ハイドロゲル(メドジェル[®])に、100 ng/mlのレプチンまたはPBSを10μl含浸させたものをそれぞれ貼付し、創部保護ドレッシングにて固定した。

また、貼付期間中(0、4、8日目)の体重、血糖値、ALT、ASTの変動について検討した。

(2) 口腔粘膜化学熱傷モデルラビット:

日本家兎(雄性 2.5~3.0kg)の口腔粘膜に50%酢酸を含浸させた直径5mm濾紙を2分間貼付し、化学熱傷を作製した。ここに、翌日から、I型コラーゲンであるCellmatrix[®]に100ng/mlのレプチンを含む溶剤10ulまたはPBS10μlを混和してゲル化させ、創部へ毎日貼付した。

また、塗布期間中(0、6、14、18日目)の体重、血糖値、ALT、ASTの変動について検討した。

(3) 組織学的検討:

皮膚化学熱傷モデルでは潰瘍形成後4日目および8日目に創部の潰瘍の距離を計測するとともに、創部皮膚組織を採取、H-E染色を行った。また、口腔粘膜化学熱傷モデルでも潰瘍形成後6日目および13日目に創部潰瘍の長径および短径計測し統計学的解析を行った。

(4) 免疫組織化学的検討:

レプチン受容体およびCD31抗体を用いてレプチン貼付群およびPBS貼付群に対して免疫染色を行い、その局在を検討するとともに、さらに潰瘍部を640×850 μm四方でランダムに5カ所抽出し、陽性細胞数を計測、統計学的処理を行った。

また、正常マウス皮膚、ヒト皮膚、正常ラビット歯肉およびヒト頬粘膜におけるレプチン受容体の発現を確認した。

(5) 細胞培養:

ヒト皮膚角化細胞と不死化したヒト口腔粘膜上皮細胞株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。さらに、ヒト皮膚角化細胞と不死化したヒト口腔粘膜上皮細胞株にレプチンを0~200ng/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をクリスタルバイオレット法にて確認した。また、分化に対する影響を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。

(6) 細胞遊走能: ヒト皮膚角化細胞およびヒト口腔粘膜上皮細胞株をマイトマイシン処理後(12μg/ml, 2h15m)、Cyto Select 24Well創傷治癒アッセイ[®](CELL BIOLABS, INC.)を使用し、細胞遊走に対するレプチンの影響を確認した。

4. 研究成果

(1) 皮膚化学熱傷モデルマウスは次亜塩素酸ナトリウムを含浸させた濾紙を用いて背部皮膚2カ所に12×12mmの熱傷を作製した。

また、コントロール群とレプチン群との間に体重、ALT、AST、血糖値に有意な差は認められなかった。

(2) 口腔粘膜化学熱傷モデルラビットは酢酸を含浸させた濾紙を用いて歯肉に5mmの熱傷を作製した。

また、口腔粘膜化学熱傷モデルラビットにおいても、コントロール群とレプチン群との間に体重、ALT、AST、血糖値に有意な差は認められなかった。

(3) 化学熱傷モデルマウス皮膚潰瘍は、受傷後4日目ではPBS貼付群に比べ、レプチン貼付群では潰瘍距離縮小傾向が認められるも有意差は認められなかった。

一方、受傷後8日目ではレプチン貼付群では有意に潰瘍縮小傾向が認められた。

化学熱傷モデルラビット口腔粘膜潰瘍は受傷後6日目ではコントロール群に比較してレプチン貼付群で潰瘍縮小傾向が認められるも有意差は認められなかった。一方、受傷後13日目ではレプチン貼付群で有意に潰瘍縮小傾向が認められた。

(4) 正常マウス皮膚、ヒト皮膚では角化細胞と線維芽細胞にレプチン受容体の発現を認めた。また、ヒト頬粘膜およびウサギ正常歯肉の有棘細胞層、顆粒細胞層および基底細胞層の一部、さらに上皮皮下組織における血管内皮細胞にレプチン受容体の発現を認めた。

皮膚化学熱傷モデルでは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4日目ではPBS貼付群に比べレプチン貼付群でCD31陽性細胞の増加傾向が認められるも有意差は認められなかった。しかし、8日目では有意にレプチン貼付群においてCD31陽性細胞が増加していた。

口腔粘膜化学熱傷モデルにおいては、6日目のレプチン貼付群とコントロール群の潰瘍直下におけるレプチン貼付群での有意な増加が認められた。

(5) ヒト皮膚角化細胞では7日目以降で有意にレプチンが増殖促進の影響を与えていたが、ヒト口腔粘膜上皮細胞株では増殖に対するレプチンの影響について検討したところ、レプチンによる細胞増殖への影響は認められなかった。

また、real-time PCRにてヒト皮膚角化細胞では分化関連分子であるケラチン13、14、トランスグルタミナーゼの遺伝子発現をレプチンが促進している可能性が示唆されたが、口腔粘膜上皮細胞ではケラチン10およびトランスグルタミナーゼの遺伝子発現においてレプチンがその発現を抑制している可能性が示唆された。

(6) 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、レプチンによる細胞の遊走促進効果が認められた。また、レプチン添加ヒト口腔粘膜上皮細胞株においても12時間まではレプチン添加群とコントロール群で有意差はないものの、24、36時間においてレプチン添加群で有意に細胞遊走の促進が認められた。

<引用文献>

Nature 372: 425-432, 1994
Am J Physiol 277: E417-E422
Cell 3:305-317,2002
J Histochem Cytochem 50:159-169, 2002
Circ Res 83: 1059-1066, 1998
Ulcer Res 33:30-33, 2006
J Invest Dermatol 117:98-105
J Clin Invest 106:501-509, 2000
FASEB J 17:1895-1897, 2003
J Clin Endocrinol Metab 86:5234-5239, 2001

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)

Susumu Tadokoro, Shinji Ide, Reiko Tokuyama, Hirochika Umeki, Seiko Tatehara, Shiki Kataoka, Kazuhito Satomura: Leptin promotes wound healing in the skin. PLOS ONE. 10(3) e01242, 2015, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0121242

Hirochika Umeki, Reiko Tokuyama, Shinji Ide, Masashi Shimozuma, Susumu Tadokoro, Seiko Tatehara, Kazuhito Satomura: Leptin promotes wound healing

in the Oral mucosa. PLOS ONE. 9 (7): e101984, 2014, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0101984

[学会発表](計8件)

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)

Shinji Ide, Reiko Tokuyama, Hirochika Umeki, Susumu Tadokoro, Seiko Tatehara, Kazuhito Satomura: Leptin promotes wound healing in the skin. The 21st ICOMS (2013. 10. 21-24, Barcelona Spain)

Hirochika Umeki, Reiko Tokuyama, Shinji Ide, Masashi Shimozuma, Susumu Tadokoro, Seiko Tatehara, Kazuhito Satomura: Leptin promotes wound healing in the Oral mucosa. The 21st ICOMS (2013. 10. 21-24, Barcelona Spain)

梅木 泰親, 徳山 麗子, 井出 信次, 下間 雅史, 田所 晋, 館原 誠晃, 片岡 志基, 鎌田 伸之, 里村 一人: 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 (2013.10.11-13, 福岡国際会議場 福岡県福岡市)

井出 信次, 徳山 麗子, 梅木 泰親, 田所 晋, 館原 誠晃, 里村 一人: 皮膚創傷治癒におけるレプチンの役割 第13回日本抗加齢医学会総会 (2013.6.28-30, パシフィコ横浜会議センター 神奈川県横浜市)

梅木 泰親, 井出 信次, 徳山 麗子, 田所 晋, 大久保 充, 竹部 裕生亮, 熊坂 祝, 館原 誠晃, 鎌田 伸之, 里村 一人: 口腔粘膜におけるレプチンの役割 第13回日本抗加齢医学会総会 (2013.6.28-30, パシフィコ横浜会議センター 神奈川県横浜市)

井出 信次, 徳山 麗子, 梅木 泰親, 田所 晋, 館原 誠晃, 里村 一人: レプチンによる皮膚創傷治癒のメカニズムの解明 第67回日本口腔科学会

総会 (2013.5.22-24, 栃木県総合文化センター 栃木県宇都宮市)

梅木 泰親, **井出 信次**, 徳山 麗子,
田所 晋, 大久保 充, 竹部 裕生亮,
熊坂 祝, 館原 誠晃, 鎌田 伸之, 里
村 一人: レプチンによる口腔粘膜
創傷治癒の可能性 第 67 回日本口腔
科学会総会 (2013.5.22-24, 栃木県総
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

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

(2)研究協力者

里村 一人 (SATOMURA Kazuhito)
徳山 麗子 (TOKUYAMA Reiko)
田所 晋 (TADOKORO Susumu)
梅木 泰親 (UMEKI Hirochika)